Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Российской академии наук

На правах рукописи

ПЕЧНИКОВА ЕВГЕНИЯ ВИКТОРОВНА

Структура вируса штриховатой мозаики ячменя и гигантских бактериофагов EL и Lin68 по данным криоэлектронной микроскопии

(03.01.03 – молекулярная биология)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители: Д.б.н., доцент кафедры Биоинженерии
биологического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова,
Соколова Ольга Сергеевна

К.ф.-м.н., профессор Биркбек колледжа,
Университета Лондона,
Орлова Елена Васильевна

Москва-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 7
Актуальность проблемы. 7
Научная новизна работы. 9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....11
1. Характеристика бактериофагов 11
1.1 Гигантские phiKZ-подобные бактериофаги. 11
1.2 Происхождение различных видов phiKZ-подобных фагов 12
1.3 Геномы phiKZ-подобных бактериофагов 16
1.4 Внутреннее тело 16
2. Биологические свойства палочкообразных вирусов растений (род *Hordeivirus*) 17
2.1 Жизненный цикл ВШМЯ 18
2.2 Организация генома *Hordeivirus* и его экспрессия. 19
2.3 Функции белков ВШМЯ. 21
2.4 Функции белков TGB при передвижении локально и от клетки к клетке.. 21
2.5 Размножение ВШМЯ. 23
2.6 Межклеточный транспорт ВШМЯ. 24
3. Электронная микроскопия макромолекул. 26
3.1. Получение электронно-микроскопическихизображений макромолекул .. 27
3.1.1 Подготовка проб 27
3.1.2 Негативное контрастирование изолированных комплексов. 28
3.1.3 Крио-ПЭМ изолированных и субклеточных комплексов. 30
3.2 Взаимодействие электронного пучка с образцом 30
3.3 Формирование изображения 32
3.3.1 Источники электронов. 32
3.3.2 Система линз электроннного микроскопа. 32
3.3.3 Аберрации в электронной микроскопии. 33
3.3.4. Передача контраста 35
3.3.5 Контраст, создаваемый тонкими образцами. 36
3.4. Детекция ПЭМ изображений 38
3.5. Обработка ПЭМ изображений 39
3.5.1. Предварительная обработка изображений отдельных частиц 39
3.5.2 Определение ЧКХ. 40
3.5.3 Коррекция ЧКХ на изображении. 41
3.5.4 Фазовая коррекция. 41
3.5.5 Коррекция амплитуды. 41
3.5.6 Нормализация изображения. 41
3.6. Выравнивание изображений. 42
3.6.1. Кросс-корреляционная функция. 43
3.6.2 Принципы и стратегии выравнивания 43
3.7 Статистический анализ изображений 44
3.7.1 Метод главных компонент. 44
3.7.2. Иерархическая кластеризация 45

3.8. Определение ориентации ... 46
3.9 3D-реконструкция ... 47
3.9.1. Методы реконструкции в реальном пространстве ... 47
3.9.2 Методы реконструкции в пространстве Фурье ... 49
3.9.3 Распределение проекций ... 51
3.10 Оценка качества реконструкции ... 52
3.10.1 Измерение разрешения ... 52
3.10.2. Температурный фактор и изменение масштаба амплитуд ... 53
3.10.3 Источники неоднородности. ... 53
3.10.4 Методы компьютерной сортировки смешанных структур ... 54
3.11 Интерпретация 3D карты ... 55
4. Применение электронной микроскопии макромолекул в биологии ... 55
4.1 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры вирусов с различной симметрией. ... 56
4.2 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры хвостатых бактериофагов ... 56
4.2.1 Структура фага T4 ... 56
4.2.2 Структура капсида фага phiKZ ... 58
4.2.2 Структура хвоста phiKZ. ... 62
4.2.3 Изучение структуры внутреннего тела ... 65
4.3 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры спиральных вирусов ... 67
4.3.1 Структура вируса табачной мозаики (ВТМ) ... 67
4.3.2 Механизм сборки/разборки ВТМ ... 71
4.3.3 Структура ВШМЯ ... 73

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ ... 77

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ... 78
1. Очистка и выделение вируса ВШМЯ ... 78
2. Выделение бактериофагов ... 79
3. Негативное контрастирование ... 79
4. Крио-микроскопия ... 80
5. Обработка изображений. ... 80
5.1. Икосаэдрическая реконструкция капсидов фагов EL и Lin68 ... 80
5.2. Обработка изображений ВШМЯ ... 81
5.3. Получение картин электронно-лучевого повреждения (СВР) внутреннего тела в капсидах бактериофагов ... 88

РЕЗУЛЬТАТЫ ... 89
1. Морфология и трехмерная организация бактериофагов EL и Lin68 ... 89
2. Организация генома внутри капсидов гигантских бактериофагов ... 91
3. Структура вирионов ВШМЯ по данным крио-ПЭМ ... 93
3.1 Структура ВШМЯ дикого типа ... 93
3.2 Структура рекомбинантного ВШМЯ ... 95
4. Характер сворачивания полипептидной цепи БО ВШМЯ ... 96
5. Контакты между субъединицами БО ВШМЯ ... 100

5.1 Латеральный контакт на внешней поверхности вириона 101
5.2 Аксиальные контакты 103
6. Взаимодействие БО ВШМЯ с РНК 104
7. Возможный механизм диссоциации капсида ВШМЯ 107
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 109
ВЫВОДЫ 113
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 114
БЛАГОДАРНОСТИ 138

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НК - негативная колония

ЭМ - электронная микроскопия

ПЭМ - просвечивающая электронная мироскопия

ICTV - Международный комитет по таксономии и классификации вирусов

ОРС - открытая рамка считывания

ОСШ - отношение сигнал-шум

ЯМР - ядерно-магнитный резонанс

ФРТ - функцией рассеяния точки

ЧКХ - частотно-контрастная характеристика, contrast transfer function (CTF)

ПЗС - приборы с зарядовой связью

ФВК - функция взаимной корреляции

АКФ - автокорреляционная функция

МСА - многомерный статистический анализ

FSC - объемная корреляция Фурье, Fourier shell correlation

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

гРНК - геномная РНК

сгРНК - субгеномная РНК

ВТМ - вирус табачной мозаики

БО - белок оболочки

PDB - protein data base (база данных белковых структур)

ВШМЯ - вирус штриховатой мозаики ячменя, barley stripe mosaic virus (BSMV)

дтВШМЯ - дикий тип ВШМЯ

рекВШМЯ - рекомбинантный ВШМЯ

ПЛВМ - полулатентный вирус мятлика, poa semilatent virus (PSLV)

ВКПЗ - вирус кольцевой пятнистости зорьки, lychnis ringspot virus (LRSV)

ВРА - вирус розеточности арахиса, peanut clump virus (PCV)

ИВРА - индийский вирус розеточности арахиса, indian peanut clump virus

(IPCV)

ЛВОДК - латентный вирус обесцвечивания душистого колоска

TGB - тройной блок генов

ОРС - открытая рамка считывания

ЭПР - эндоплазматический ретикулум

RdRp - РНК-зависимая РНК-полимераза

АТФ - аденозинтрифосфат

CBP - cylindrical burning pattern, картина электронно-лучевого повреждения внутренего тела

КК - карбоксилаты Каспара

ЛК - латеральный контакт

NTP - нуклеозидтрифосфат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Вирусные капсиды в большинстве случаев имеют икосаэдрическую, либо спиральную симметрию. В последние годы изучение структур капсидов с икосаэдрической симметрией было наиболее успешным. К настоящему времени методами рентгеноструктурного анализа и крио-электронной микроскопии получены с высоким или средним разрешением данные о трехмерной структуре капсидов многих икосаэдрических вирусов, инфицирующих хозяев, принадлежащим ко всем царствам живого (Lawrence et al., 2009; Wolf et al., 2010; Wommack and Colwell, 2000). Прогресс в этой области в значительной степени объясняется тем, что в последнее десятилетие были сконструированы мощные электронные микроскопы с когерентным пучком электронов и охлаждением жидким гелием, а также разработаны новые методы обработки микроскопических изображений (Sachse et al., 2007; Clare and Orlova, 2010).

Гигантские вирусы бактерий: бактериофаги **EL, phiKZ, Lin68** относятся к классу Myoviridae и инфицируют патогенные бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa*. Эта бактерия вызывает тяжелые воспалительные заболевания человека и животных (Balcht and Smith, 1994). В связи с устойчивостью бактерии к антибиотикам, встает вопрос об использовании фаговой терапии. Недавно фаги класса Myoviridae были успешно использованы при терапии легочных инфекций (Morello et al., 2011). Показано также, что фаги EL и Lin68 обладают широким спектром литической активности (Буркальцева с соавт., 2002). Таким образом, изучение структуры гигантских фагов является важной задачей для понимания специфичности их взаимодействия с патогенными бактериями.

С другой стороны, неизмеримо меньше информации получено о структурах вирусных капсидов со спиральной симметрией, в частности, спиральных вирусов растений. **Вирус штриховатой мозаики ячменя** (ВШМЯ) образует жесткие палочкообразные вирионы со спиральной организацией белка оболочки и принадлежит к роду *Hordeivirus*, который включает в себя растительные вирусы с

трехчастным геномом, представленным +РНК. Части генома упакованы в отдельные вирусные частицы. Вирус передается при контакте между растениями, через семена и пыльцу и вызывает заболевания от легкой мозаики до летального некроза. Вирусная инфекция приводит к потере до 20% урожая ячменя (Timian and Sisler, 1955).

Палочковидные спиральные частицы ВШМЯ имеют большое внешнее сходство с вирионами вируса табачной мозаики (ВТМ), однако существенно отличаются от них по параметрам спирали (шаг, внешний диаметр и диаметр внутреннего канала) (Атабеков и Новиков, 1966; Киселев с соавт., 1966; Veerisetty, 1978; Atabekov and Novikov, 1989). Сравнение первичной структуры белков оболочки (БО) ВШМЯ и ВТМ, ставшее возможным после секвенирования генома ВШМЯ (Jackson et al., 2009), показало, что, во-первых, эти белки не являются близкородственными (гомология 17%), и, во-вторых, БО ВШМЯ отличается наличием дополнительных фрагментов в белковой последовательности. Эти фрагменты могут образовывать петли в области внутреннего канала вириона и участвовать во взаимодействии с вирусной РНК, а также формировать дополнительные домены (Makarov et al. 2013). Таким образом, учитывая имеющиеся данные о различиях в структуре вирионов ВТМ и ВШМЯ, определение квази-атомной структуры полноразмерных вирионов ВШМЯ существенно расширит наши знания о структуре вирусных капсидов, обладающих спиральной симметрией и их взаимодействии с геномом.

Следует также отметить, что в настоящее время активно развивается направление нанотехнологии, основанное на использовании вирусных частиц в качестве биоплатформ (носителей). В частности, вирусные наночастицы используются для презентации биологических активных веществ. Известно, что ВТМ образует относительно низкомолекулярные агрегаты, которые можно использовать в качестве биоплатформ, несущих антигенные детерминанты патогенов человека и животных (Atabekov et al., 2011). Было показано, что частицы ВШМЯ также могут образовывать низкомолекулярные агрегаты (Атабеков и Новиков, 1966), обладающие большой иммуногенностью, поэтому, их

также можно использовать для создания вакцин.

Следовательно, получение новых данных с высоким разрешением о структуре вирусов с различной симметрией, включая икосаэдрические капсиды бактериофагов и спиральный ВШМЯ, является актуальной задачей молекулярной биологии и представляет интерес как с точки зрения фундаментальной вирусологии, так и с точки зрения практической медицинской нанобиотехнологии.

Научная новизна работы.

В данной диссертационной работе с помощью метода крио-электронной микроскопии (крио-ПЭМ) впервые были получены трехмерные структуры спиральных вирионов ВШМЯ с субнанометровым разрешением (5,1Å и 5,7Å). Впервые обнаружена структурная гетерогенность частиц ВШМЯ и показано наличие двух типов частиц с различными параметрами спирали: широкая (106 субъединиц на период) и узкая (111 субъединиц на период). Открыт новый латеральный гидрофобный контакт между субъединицами БО ВШМЯ.

Впервые исследованы с помощью крио-ПЭМ гигантские phiKZ-подобные бактериофаги *P. aeruginosa*: EL и Lin68. В их капсидах методом облучения повышенной дозой электронов обнаружены белковые внутренние тела, модифицирующие упаковку ДНК. Впервые показано, что размеры внутреннего тела коррелируют с размерами фагового генома.

Практическая значимость работы заключается в выявлении структурных особенностей гигантских бактериофагов EL, Lin68 и вирионов ВШМЯ, кристаллическая структура которых не известна. Полученные знания и разработанные подходы в дальнейшем могут быть применены при исследовании других растительных и бактериальных вирусов; для теоретических исследований в области строения белков, белок-белковых комплексов, и как структурные предпосылки для моделирования, а также для практической работы по детекции и анализу наночастиц биологического происхождения и при создании вакцин с вирусными частицами в качестве носителя.

Достоверность результатов диссертации обеспечивается корректным

использованием современных физических и биоинформатических методов исследования структуры биологических микро- и нанообъектов. Разрешение электронных микроскопов было откалибровано по стандартным образцам. Результаты моделирования пространственной структуры БО ВШМЯ согласуются с экспериментальными данными, полученными методом крио-ПЭМ, что говорит об адекватности построенных моделей. В связи с этим результаты работы являются достоверными, а сделанные на их основе выводы научно обоснованными.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Характеристика бактериофагов

Вирусы бактерий (далее – “бактериофаги” или “фаги”) являются классической моделью для молекулярно-биологических исследований (исследования природы генетического материала, рекомбинации, репликации, репарации, транспозиции, экспрессии генов, генетического кода и т.д.). До сих пор научное внимание было в основном сосредоточено на изучении небольшого числа бактериофагов *E. coli* (Крылов с соавт., 2010). После открытия роли умеренных фагов в горизонтальном переносе генов и в возникновении новых патогенных бактерий вследствие активной миграции фагов между штаммами и видами бактерий, интерес к этим вирусам еще увеличился (Zaneveld et al., 2008; Крылов, 2003).

Другой причиной для изучения структуры и функций фагов стала возможность использования их или кодируемых ими продуктов в лечении некоторых заболеваний, вызванных бактериями, устойчивыми к антибиотикам. Использование живых фагов в терапии требует не только предварительного тщательного изучения их свойств (в целях исключения фагов, кодирующих токсины, аллергены и др.), но и изучения степени родства фагов и возможной предшествующей миграции фагов между видами внутри определенного семейства бактерий и между разными семействами (Крылов с соавт., 2010). В данной работе изучались представители гигантских трансдуцирующих (Джусупова с соавт, 1982) phiKZ-подобных фагов псевдомонад (Krylov et al., 1984; Mesyanzhinov et al., 2002; Крылов и Жазыков, 1978). Эти бактериофаги считаются перспективными для создания смесей для фаговой терапии инфекционных заболеваний (Буркальцева с соавт., 2002; Morello et al., 2011)

1.1 Гигантские phiKZ-подобные бактериофаги

Род phiKZ-подобных бактериофагов входит в семейство *Myoviridae* (бактериофаги с ДНК-геномом, имеющие сократимые хвосты)(Krylov et al., 2007).

Фаг phiKZ был выделен из сточных вод, где обитало большое количество *P. aeruginosa* и обладал большим, по сравнению с другими семействами, икосаэдрическим капсидом, что отразилось в названии «гигантский бактериофаг» (Krylov et al., 2007; Хренова с соавт., 1984; Шабурова с соавт., 2006). В дальнейшем были выделены и другие представители этого рода. Все они паразитируют на бактериях рода *Pseudomonas*, в основном, на *P. aeruginosa*, имеют икосаэдрический капсид диаметром ~122нм, который содержит белковый цилиндр (внутреннее тело), и хвост ~190х21 нм, состоящий из воротничка ~27х3нм и сократимого поперечно исчерченного чехла. После сокращения чехол имеет размеры ~77х27нм (Krylov et al., 2007).

Все представители phiKZ-подобных бактериофагов имеют круговые карты геномов и большинство их генов транскрибируются по часовой стрелке (Hertveldt et al., 2005; Mesyanzhinov et al., 2002). Геном phiKZ имеет мозаичную структуру (Буркальцева с соавт., 2002). PhiKZ-подобные бактериофаги различаются между собой по содержанию G и C (36.8% у phiKZ, 35% у phiST-1 и 49.3% у EL) и размерам генома (Hertveldt et al., 2005).

1.2 Происхождение различных видов phiKZ-подобных фагов

PhiKZ-подобные фаги можно разделить на три вида, названные по первым фагам, обнаружившим видовые отличия, но проявляющим филогенетическое сходство: phiKZ, Lin68 и EL (Hertveldt et al., 2005; Крылов с соавт., 2004). Наиболее часто в природных условиях встречаются фаги вида phiKZ (выделено около 15 неидентичных фагов), значительно реже – фаги видов Lin68 и EL (по два фага в каждом случае) (Буркальцева с соавт., 2002; Крылов с соавт., 2004), и еще реже – phiKZ-подобные фаги почвенных психрофильных псевдомонад (Шабурова с соавт., 2006). Поскольку именно phiKZ является первым подробно изученным фагом в этой группе, он принят Международным комитетом по таксономии и классификации вирусов (ICTV) как типовой для обозначения нового рода phiKZ-подобных фагов семейства *Myoviridae* (Krylov et al., 2007).

Считается, что фаги относятся к разным видам, если уровень гомологии их

геномов не превышает 30% (Krylov et al., 2007). Три вида из рода phiKZ-подобных фагов, активных на *P. aeruginosa*, имеют существенно более низкий уровень гомологии ДНК. Виды phiKZ и EL вообще не обнаруживают гомологии ДНК (ни при ДНК гибридизации, ни при секвенировании геномов) (Hertveldt et al., 2005). У вида Lin68 нет гомологии ДНК с видом EL, но при ДНК гибридизации найдена очень слабая гомология с phiKZ в двух районах генома (Буркальцева с соавт., 2002; Крылов с соавт., 2004). Однако у всех трех видов многие продукты генов имеют высокий уровень сходства аминокислотного состава, поэтому филогенетическое родство этих видов не вызывает сомнений. В процессе эволюции эти три вида фагов существенно дивергировали от общего предка (“прафага”). По-видимому, дивергенция началась и происходила в условиях изоляции хозяев. Могло произойти возникновение разных изолированных субпопуляций одного вида бактерий, исходно инфицированных одним и тем же предковым фагом, но оказавшихся в разных условиях (Крылов с соавт., 2010). Однако, возможен и другой сценарий: изоляция, как следствие инфекции предковым фагом неродственных видов бактерий. При этом движущим фактором дивергенции фагов в разных хозяевах могло стать приспособление к уже существовавшим или возникающим заново отличиям хозяев в системах транскрипции, трансляции, в структурных компонентах поверхности бактерий и др. (Pepin et al., 2008). Уже после прошедшей дивергенции они приобрели (или сохранили) способность к росту на бактериях одного и того же вида – *P. aeruginosa*. Присутствие в геноме фага phiKZ шести генов тРНК, необходимых, по видимому, для адаптации этого фага к росту в ГЦ-богатом хозяине (у бактерий *P. aeruginosa* доля ГЦ пар составляет 66%, а у фага phiKZ – 36%), может свидетельствовать о том, что *P. aeruginosa* не является для phiKZ исходным хозяином (Крылов с соавт., 2010).

Геном фага EL (49% ГЦ пар) – ближе по составу к геному хозяина; у него обнаружен только лишь один ген тРНК. Различие в составах ГЦ пар этих видов фагов и в уровне их приспособления к современному хозяину может отражать предшествующие акты миграции (Крылов с соавт., 2010).

Три вида phiKZ-подобных фагов сейчас находятся на разных этапах своей эволюции. Разделение видов Lin68 и phiKZ произошло сравнительно недавно, что подтверждается как присутствием остаточной гомологии в двух районах генома, так и сравнением последовательностей аминокислот в 26 генопродуктах, кодируемых произвольно выбранными генами фагов Lin68 и phiKZ (Крылов с соавт., 2010).

Родство фагов phiKZ и EL выражено в значительно меньшей степени (Hertveldt et al., 2005) – лишь одна треть предполагаемых генопродуктов фага EL проявляет сходство аминокислотного состава с генопродуктами фага phiKZ (в интервале от 17 до 55%) (Крылов с соавт., 2010). Совсем не наблюдается, несмотря на принадлежность к единому семейству *Myoviridae*, признаков родства между крупными T4-подобными фагами кишечных бактерий и phiKZ-подобными фагами при сравнении их генопродуктов (Крылов с соавт., 2010). Лишь такие общие признаки, как параметры спирали сократимого чехла хвоста у фагов T4 и phiKZ сходны, что можно рассматривать как свидетельство приобретения этой структуры от общего предшественника (Fokine et al., 2007). Однако почти полное отсутствие гомологии аминокислотных последовательностей белков сократимого чехла phiKZ и T4 свидетельствует, что это событие произошло очень давно и в ходе дальнейшей эволюции пути этих фагов не пересекались (Крылов с соавт., 2010).

К общим признакам для phiKZ-подобных фагов по классификации, предложенной Крыловым с соавторами (2010), относятся:

1. Голубая опалесценция негативных колоний (НК), обусловленная очень большим количеством фаговых частиц в НК.

2.Образование большого количества очень вязкого продукта, обычно сопутствующее высокой продукции фага. Предполагалось, что это высокополимерная ДНК фага, не включенная в зрелые частицы. Однако обработка таких препаратов фага ДНКазой уменьшала вязкость лишь частично. Остаточная вязкость может быть обусловлена наличием полисахаридов.

3. Известные до сих пор виды фагов рода phiKZ поражают только бактерии

разных видов семейства псевдомонад (*P. aeruginosa, P. putida, P. fluorescens, P. chlororaphis*) (Thomas et al., 2008; Шабурова с соавт., 2006).

4. Еще один общий, по крайней мере, для видов phiKZ-подобных фагов, активных на *P. aeruginosa*, признак – это способность бактерий, множественно инфицированных фагом, расти с образованием колоний (Буркальцева с соавт., 2002). При рассеве таких колоний большинство клеток лизируются, но при этом можно выделить как чувствительные к фагу варианты, неотличимые внешне от исходного штамма PAO1, так и мутантные бактерии, проявляющие новые колониально-морфологические признаки или устойчивость к инфекции другими фагами. Предполагается, что при множественной инфекции бактерия (или ее мутант) переходит в относительно устойчивое псевдолизогенное состояние и в таком виде может делиться, образуя колонию, при условии постоянной реинфекции фагом дочерних клеток. Одно из объяснений механизма псевдолизогении, зависящей от множественности инфекции, предположение, что при этом происходит синтез большого количества белка-репрессора.

5. В отличие от менее сложно устроенных геномов других вирулентных и умеренных фагов в геномах трех секвенированных к настоящему времени фагов рода phiKZ (phiKZ, EL и 201varphi21) не найдено генов, сходных с генами, кодирующими известные ДНК полимеразы (Hertveldt et al., 2005; Mesyanzhinov et al., 2002; Thomas et al., 2008). Возможно, что использование этими фагами для собственной репликации бактериальной ДНК-полимеразы как-то связано с установлением ими особого псевдолизогенного состояния при множественной инфекции.

6. Сходство морфологии частиц и последовательностей аминокислот во многих генопродуктах фагов рода phiKZ подтверждает их филогенетическое родство.

7. Отличительный признак, описанный у фага phiKZ, – специфическая упаковка генома в виде нити суперскрученной ДНК, навитой на спиралевидное центральное образование белковой природы (Krylov et al., 1984; Крылов и Жазыков, 1978).

1.3 Геномы phiKZ-подобных бактериофагов

Геном бактериофага phiKZ представляет собой линейную, избыточную на конце двухцепочечную ДНК, богатую A+T. Он состоит из 280334 п.н. и содержит 306 открытых рамки считывания (ОРС) (Mesyanzhinov et al., 2002). Таким образом, геном phiKZ является одним из самых больших известных фаговых геномов. Только 59 генов (19%) имеют сходства с генами белков с известными функциями у других организмов (включая бактерий, высших эукариот и некоторых неродственных бактериофагов: T4, SPP1 и PBSX). Вероятно, phiKZ кодирует и свою собственную РНК-полимеразу. Ген белка оболочки не имеет сходства с известными капсидными белками других фагов (Krylov et al., 2007).

Геном бактериофага EL (Hertveldt et al., 2005) состоит из 211215 п.н. и, предположительно, имеет 201 ОРС. Отталкиваясь от расположения сходных у phiKZ и EL генов, в геноме EL можно выделить 5 регионов, четыре из которых присутствуют и у phiKZ, и у EL, а один – уникален для EL. Фаг EL является наиболее совершенным среди рассмотренных здесь представителей рода phiKZ-подобных фагов, понимая под этим степень дивергенции в сторону возникновения белков, совмещающих несколько функций, или в сторону оптимизации белков вообще. Возможно, этот процесс привел к укорочению генома EL (Крылов с соавт., 2010).

1.4 Внутреннее тело

Для фага phiKZ характерно наличие внутри капсида белкового внутреннего тела (ВТ), покрытого слоями ДНК (Krylov et al., 1984; Krylov et al., 2007; Fokine et al., 2005). Состав и функции ВТ, а также его роль при инфицировании бактерий остаются неизвестными. Скорее всего, ВТ участвует в упаковке и хранении генома и/или впрыскивании ДНК в клетку. Плотное наматывание ДНК на ВТ может сокращать ее давление на оболочку капсида и организовывать большой геном таким образом, чтобы его было удобно впрыскивать в клетку (Black and Thomas, 2012). Т.к. ВТ не остается внутри капсида после впрыскивания ДНК, оно может также служить вместилищем белков, которые необходимо

транспортировать в клетку вместе с ДНК (Thomas et al., 2012). ВТ состоит как минимум из 6 белков (gp89, 90, 93, 95, 97 и 162) и, вероятно, его предшественник может собираться в отсутствие ДНК (Thomas et al., 2012).

До сих пор остается неизвестным, присутствует ли ВТ у других phiKZ-подобных фагов и влияют ли его размеры на упаковку генома вируса.

2. Биологические свойства палочкообразных вирусов растений (род *Hordeivirus*)

В отличие от бактериофагов, капсид которых обладает икосаэдрической симметрией, капсиды палочкообразных вирусов растений имеют спиральную симметрию.

Члены рода *Hordeivirus* живут в тесном контакте со своими хозяевами, распространяются, в основном, семенами и при соприкосновении растений (Jackson et al., 1989). Члены рода характеризуются тем, что имеют трехчастную геномную (г)РНК, части которой, α, β, и γ, индивидуально упакованы в короткие жесткие стержни, состоящие из ~96% белка и ~4% РНК. На основании морфологии частиц и серологического анализа в этот род включают вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) (BSMV), полулатентный вирус мятлика (ПЛВМ) (PSLV), вирус кольцевой пятнистости зорьки (ВКПЗ) (LRSV), латентный вирус обесцвечивания душистого колоска (ЛВОДК) (ALBV) (Jackson et al., 2009). Эти вирусы легко передаются между растениями механически и вызывают специфические для каждой линии симптомы. Некоторые хозяева, такие, как виды *Chenopodium*, развивают характерные местные поражения, но у большинства хозяев проявляется мозаика слабой до умеренной тяжести (Рисунок 1).

Рисунок 1. Симптомы заражения гордеивирусами. Слева направо: здоровый ячмень, ячмень, зараженный ВШМЯ (Jackson et al., 2009).

Капсидные белки ВШМЯ, ПЛВМ и ВКПЗ близки по размерам (молекулярная масса ~ 23,000-25,000 Да), но данные серологической и молекулярной гибридизации указывают на то, что эти три вируса различны (Hunter et al., 1986, 1989). Более подробный анализ последовательностей гРНК из ВШМЯ, ПЛВМ и ВКПЗ выявил ряд общих черт, в том числе схожую организацию генома и консервативный, типичный для гордеивирусов тройной блок генов (TGB), в который организованы гены движения, что подтверждает их таксономическую принадлежность к роду *Hordeivirus* (Agranovsky et al., 1979; Morozov and Solovyev, 2003; Savenkov et al., 1998; Solovyev et al., 1996).

2.1 Жизненный цикл ВШМЯ

Штриховатая мозаика ячменя (Рисунок 1), заболевание, вызываемое ВШМЯ, была открыта и названа ложной полосатостью ячменя почти 100 лет назад, а в 1924 году было предположено, что это заболевание имеет вирусную природу (Jackson and Lane, 1981).

Способность ВШМЯ передаваться механически от растения к растению была продемонстрирована более 50 лет назад (Hagborg, 1954; McKinney, 1951). Ранее предполагали, что ВШМЯ лишь изредка инфицирует пшеницу и овес, поэтому

считалось, что он имеет ограниченный потенциал для заражения этих культур (Jackson and Lane, 1981). Однако эта оценка требует пересмотра, так как исследования с применением современных чувствительных диагностических методов выявили более широкое распространение и воздействие вируса на пшеницу и другие зерновые культуры (Koklu et al., 2004; Kumari et al., 2006; Mesterhazy et al., 2002).

Существуют многочисленные штаммы ВШМЯ, вызывающие различные симптомы болезни (Jackson et al., 2009). Легкость механической передачи вируса от растения к растению в поле способствует быстрому попаданию вируса к молодым проросткам ячменя, а также может привести к высокой доле зараженных семян и серьезным потерям урожая (Jackson and Lane, 1981).

Другой предполагаемый способ передачи вируса - через пыльцу. Этот способ может обеспечить заражение растений, произрастающих на удалении от источника вируса (Jackson et al., 1989). Однако, в непосредственных полевых испытаниях и в лабораторных опытах, передача через пыльцу не была обнаружена и, следовательно, не может представляться существенным фактором в распространении вируса (Slack et al., 1975).

Так как передача вируса через семена необходима для выживания вируса от сезона к сезону, можно использовать чувствительные диагностические методы для выявления и устранения зараженных запасов семян (Carroll et al., 1980). В результате, распространение ВШМЯ заметно снизилось там, где для производства ячменя применяются современные сельско-хозяйственные технологии. Но вирус все еще может представлять собой проблему в развивающихся странах, которые не в состоянии применять эффективные методы борьбы с вирусными болезнями (Jezewska, 2001; Kumari et al., 2006).

2.2 Организация генома *Hordeivirus* и его экспрессия.

Геномная РНК представителей *Hordeivirus* кодируют семь основных белков (Gustafson and Armour, 1986; Gustafson et al., 1989). αa (метилтрансферазная / хеликазная субъединица репликазы), βa (белок оболочки) и γa (полимеразная

субъединица репликазы) белки закодированы на РНК α, β, и γ, соответственно, и транслируются непосредственно с геномной РНК. Экспрессия TGB белков движения опосредована двумя субгеномными (сг) РНК, обозначаемых сгРНКβ1 и сгРНКβ2 (Рисунок 2).

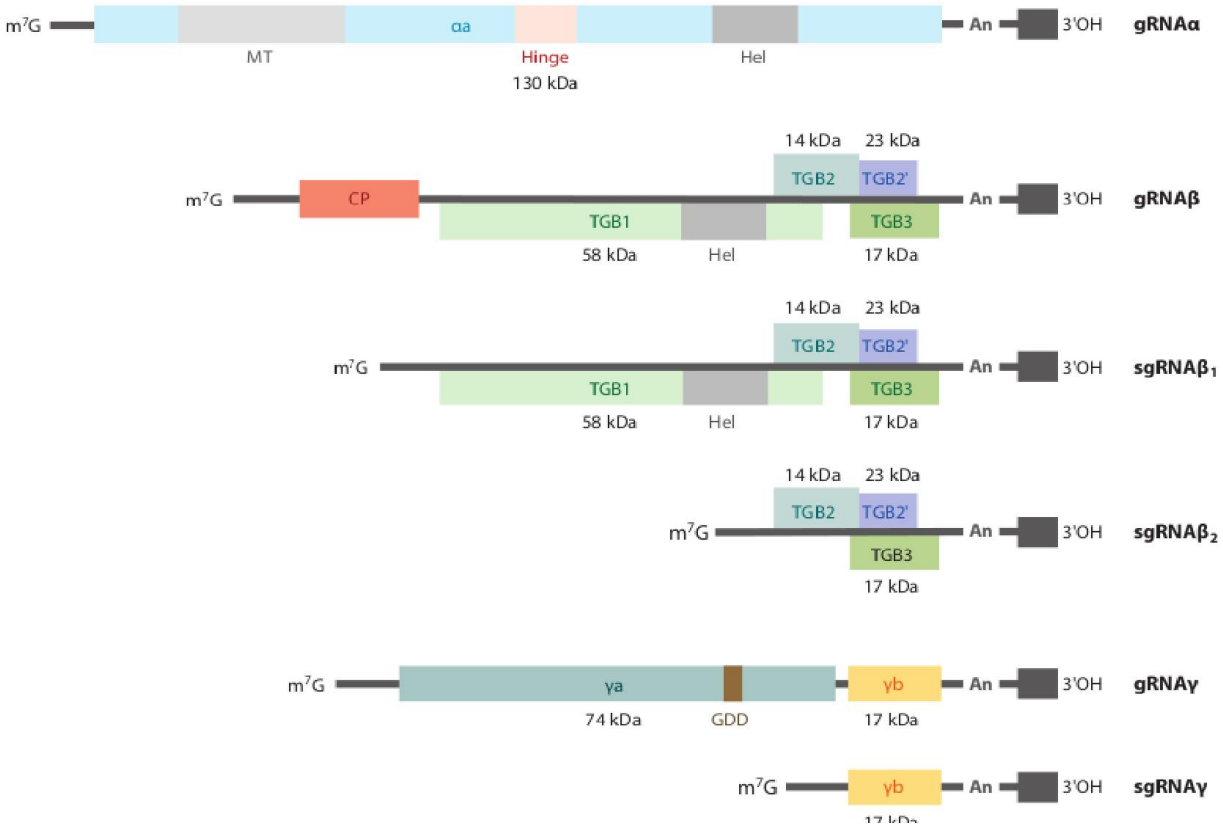


Рисунок 2. Организация генома ВШМЯ (Jackson et al., 2009).

Геномная РНК кэппирована. Незакрашенные прямоугольники на рисунке 2 представляют открытые рамки считывания. Серые прямоугольники - 3'-концевые тРНК-подобные структуры. РНКα кодирует белок αa, который состоит из N-концевого метилтрансферазного (МТ) и С-концевого хеликазного (Hel) доменов. РНКβ кодирует 5 основных белков: белок оболочки (БО) (βa) транслируется с гРНК; белок TGB1 транслируется с сгРНКβ1; перекрывающиеся белки TGB2, TGB3 и TGB2' экспрессируются с сгРНКβ2. На гРНКγ закодированы 2 белка: γa и γb. Белок γa является полимеразной субъединицей репликазы. Белок γb (белок патогенности), богат цистеином, экспрессируется с сгРНКγ. Его ген содержит вторую открытую рамку считывания бицистронной РНКγ.

2.3 Функции белков ВШМЯ.

Все три геномные РНК требуется для заражения растений, кроме того, РНК α и γ могут размножаться в протопластах (Petty et al., 1990). РНКβ причастна к распространению по растению, но ген белка оболочки βа (БО) не является обязательным для системной инфекции, движения от клетки к клетке и по сосудам (Petty and Jackson, 1990). Каждый из TGB белков имеет значение для передвижения в растениях (Lawrence and Jackson, 2001; Petty and Jackson, 1990), за исключением TGB p23 (Lawrence and Jackson, 2001).

Роль αа и γа белков в репликации.

Белки αа и γа у гордеивирусов являются важными субъедницами РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) (Koonin and Dolja, 1993). Возможно, для функционирования этого комплекса необходимы также несколько хозяйских белков, но эти белки еще не идентифицированы.

Белок оболочки (βа).

БО ВШМЯ транслируется непосредственно с гРНКβ и является наиболее многочисленным вирусным белком в зараженных растениях (Gustafson et al., 1981). БО ВШМЯ состоит из 196 аминокислот (22 Кда) (Hunter et al., 1989). БО взаимодействует с гРНК и формирует палочковидные частицы, которые содержат 3 нуклеотида РНК на субъединицу белка. У всех БО гордеивирусов есть несколько консервативных мотивов, сходных с мотивами в БО других палочковидных вирусов (An et al., 2003; Solovyev et al., 1996).

БО ВШМЯ не нужен для заражения системных хозяев (ячмень и табак) (Lawrence and Jackson, 2001; Petty et al., 1990), однако мутанты по БО более агрессивны, чем дтВШМЯ, и вызывают более тяжелые заболевания у ячменя. Растения, инфицированные вирусом с делецией по БО, отстают в росте и развитии и не входят фазу восстановления после инфекции, которая обычно наблюдается в ячмене, инокулированном дтВШМЯ (Jackson et al., 2009).

2.4 Функции белков TGB при передвижении локально и от клетки к клетке.

TGB-надсемейство представляет собой важный класс белков движения

(Melcher, 2000).

TGB1. TGB1 белки у представителей рода *Hordeivirus* имеют массу в диапазоне от 50 до 63 кДа. Их N-концевая часть содержит две положительно заряженных области, богатых лизином и аргинином, которые участвуют в движении вирусов на большие расстояния внутри растения (Morozov and Solovyev, 2003).

TGB1 белки способны связывать РНК (Donald et al., 1997; Kalinina et al., 2001), имеют РНК-хеликазную активность (Kalinina et al., 2002), а также способность гидролизовать нуклеозид трифосфаты и неспецифично связывать оцРНК и дцРНК (Donald et al., 1997; Kalinina et al., 2001).

Белок TGB2. Белок ВШМЯ TGB2 транслируется с редкой сгРНКβ2 и присутствует в инфицированных клетках в соотношении 10:1 (TGB1:TGB2) (Zhou and Jackson, 1996). Белки TGB2 содержат два гидрофобных трансмембранных участка и центральную гидрофильную петлю, разделяющую эти участки. Топологическая модель предсказывает, что гидрофобные участки интегрируются в мембрану с образованием U-образной структуры, где концы белков направлены к цитоплазматической стороне мембраны, а консервативная центральная часть белка обращена впросвет эндоплазматического ретикулума (Solovyev et al., 1996; Zamyatnin et al., 2006).

Белок TGB3. Белок TGB3 кодируется на 3'-концевой ОРС на сгРНКβ2 и транслируется после того, как 40S рибосомные субъединицы «проскакивают» AUG кодон, относящийся к TGB2. По такому механизму *in vitro* TGB3 обычно производится в пропорции 1:10 по отношению к TGB2 (Zhou and Jackson, 1996). TGB3 имеют размер от 18 до 24 кДа и содержат два мембраные области так, что N- и С-концы выступают в просвет ЭПР, а петля находится с цитоплазматической стороны ЭПР.

Функции богатого цистеином белка γb.

Белок γb кодируется в открытой рамке считывания, расположенной с 3'-конца γРНК гордеивирусов, и вносит основной вклад в развитие патогенеза. Эти маленькие, богатые цистеином белки имеют размер от 16 до 20 кДа (Koonin et al.,

1991).

γb в играет важную роль в подавлении механизмов защиты хозяина (Donald and Jackson, 1996; Jackson et al., 2009). Скорее всего, γb подавляет РНК-интерференцию (Johansen and Carrington, 2001) и является мощным супрессором замалчивания генов (Bragg and Jackson, 2004).

2.5 Размножение ВШМЯ.

Модель репликации ВШМЯ утверждает, что, кроме формирования RdRp, белки αa и γa играют главную роль в создании вирусных репликационных фабрик (вироплазм) в пузырьках на внешней оболочке хлоропластов.

ВШМЯ проникает в клетку через повреждения клеточной стенки. В цитоплазме БО отделяется от РНК и начинается трансляция αa и γa субъединиц репликазы. αa связывается с РНКα и привлекает белок γa, гРНК γ и β, а также различные факторы из клетки хозяина к мембранам хлоропластов. В мембранных везикулах происходит репликация генома. RdRp присоединяется к 3'-концам гРНК для инициации транскрипции положительных и отрицательных цепей репликативной формы РНК α, β и γ, а также инициировать транскрипцию на внутренних промоторах отрицательных цепей РНК с образованием сгРНК, которые служат в качестве мРНК для транслиции TGB-белков движения и белка γb. Небольшие количества TGB2 и γb направляются в везикулы около ядра клетки, где они могут участвовать в движении и подавлении защитных систем хозяина. Белок оболочки транслируется с гРНКβ и связывается с положительными цепями гРНК с образованием новых вирионов (Рисунок 3).

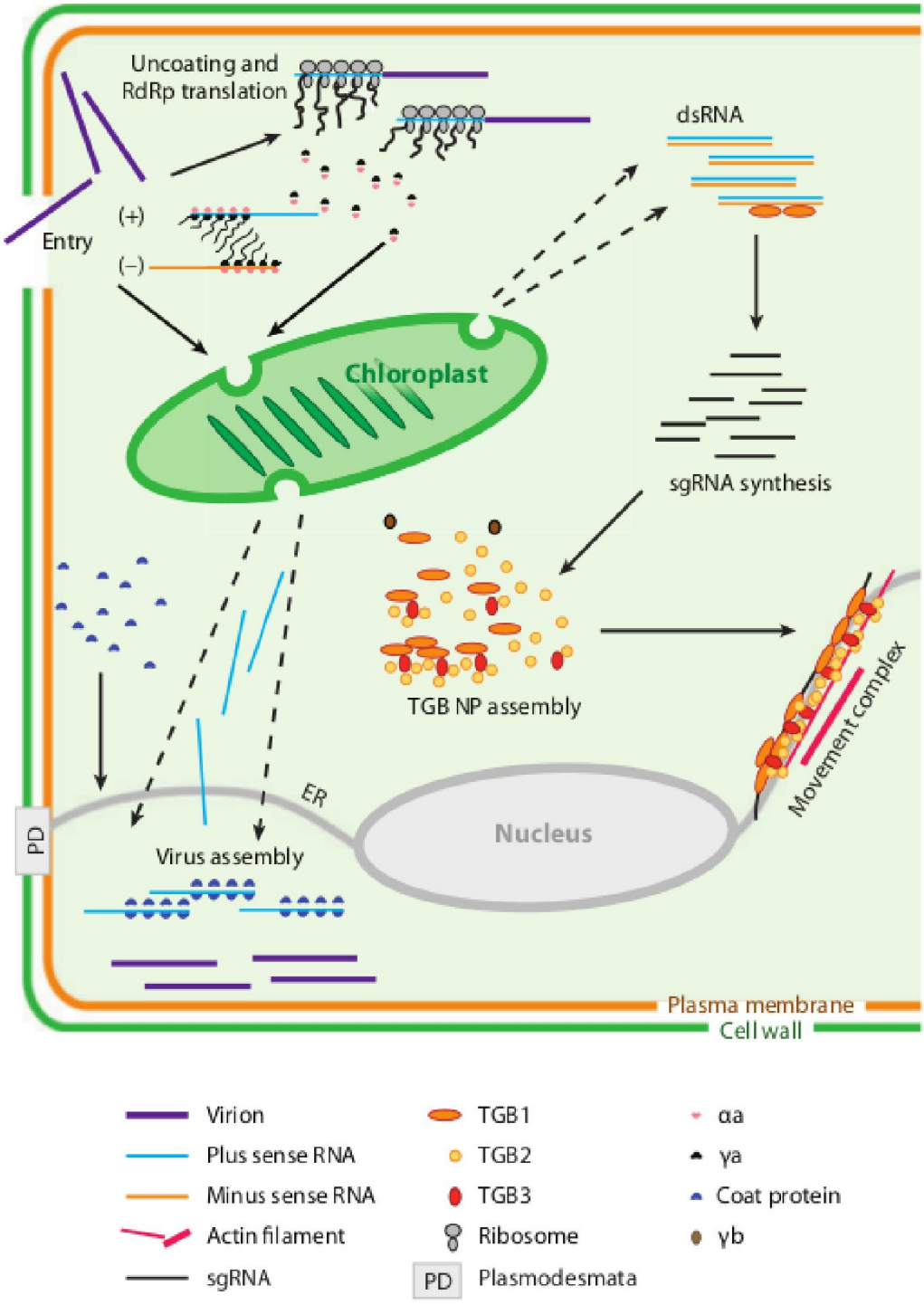


Рисунок 3. Схема репликации и сборки ВШМЯ (Jackson et al., 2009).

2.6 Межклеточный транспорт ВШМЯ.

Межклеточный транспорт ВШМЯ осуществляется с помощью нуклеопротеинового комплекса TGB1, который состоит из TGB1 и смысловых α, β, и γ гРНК и сгРНК. Процесс движения энергозависим и требует АТФ (Morozov and Solovyev, 2003). Это также согласуется с ролью TGB2 в стабилизации

нуклеопротеиновых комплексов, образующихся в плазмодесмах при взаимодействии TGB1 с TGB3.

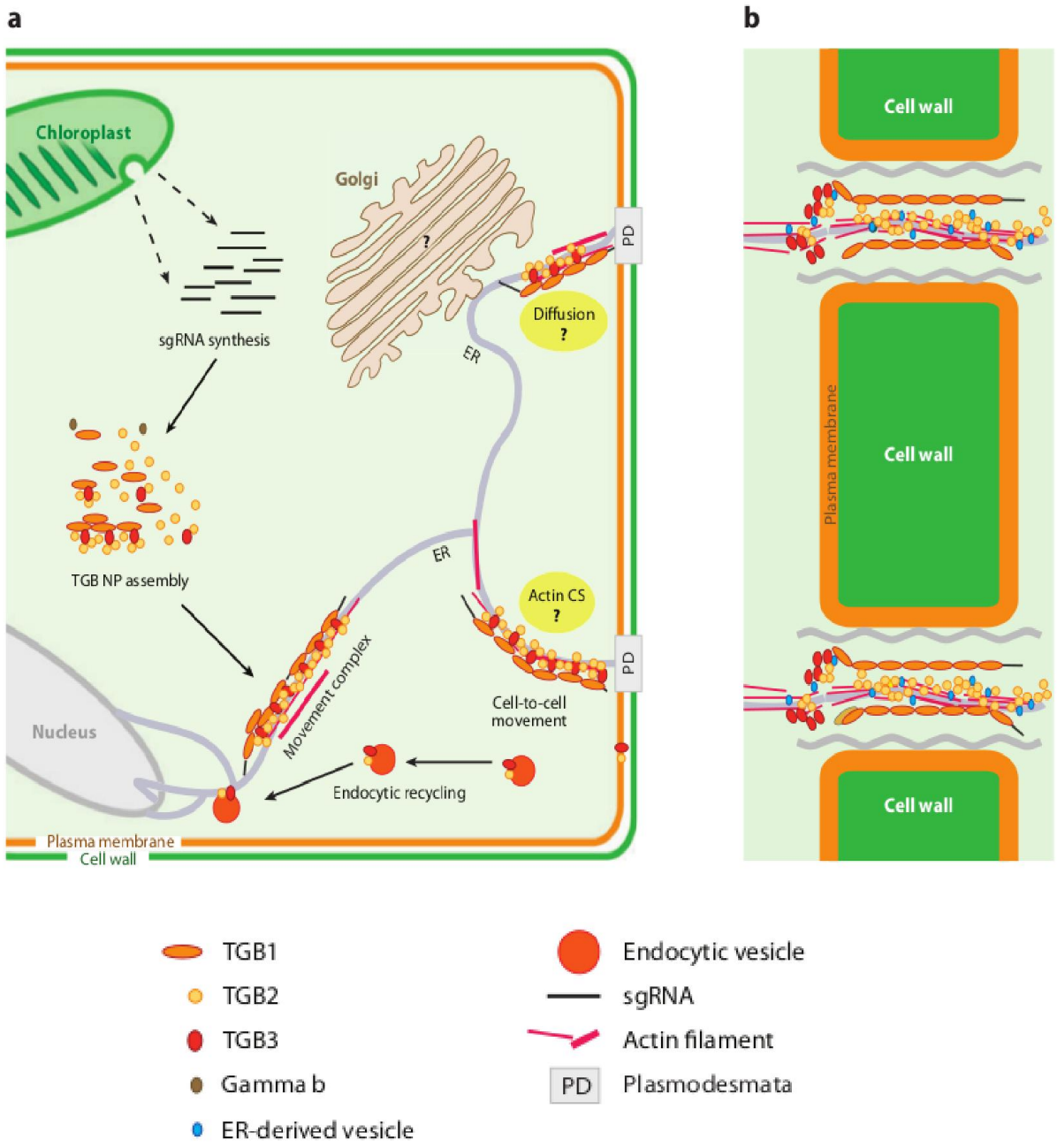


Рисунок 4. Модель взаимодействия TGB-белков при движении гордеивирусов от клетки к клетке (Jackson et al., 2009).

Клеточные механизмы, посредством которых TGB комплексы транспортируются в плазмодесмы, не очень хорошо изучены. После того, как реплицируется гРНК и транслируется сгРНК, нуклеопротеиновый комплекс (НП), содержащий TGB1-белок, + гРНК и сгРНК, ассоциируется с белками TGB2 и TGB3 для передвижения в другие клетки. Механизм внутриклеточного передвижения комплекса может

происходить двумя путями. По одной модели НП направляется к клеточной стенке через взаимодействие ЭПР с актиновой/цитоскелетной сетью (Boevink and Oparka, 2005). Другая недавняя модель предлагает независимый от актиновой/цитоскелетной сети механизм передвижения мембран к плазмодесмам (Schepetilnikov et al., 2005). Обе модели предполагают, что белок TGB3 направляет НП в плазмодесмы и облегчает взаимодействие с рецепторами в десмотрубочках. Белки TGB2 и TGB3, как предполагается, с помощью белков хозяина в десмотрубочках передают НП комплексы через плазмодесмы в соседнюю клетку. На более поздних стадиях заражения, предполагается, что TGB2 опосредует выход TGB3 из десмотрубочек и облегчает попадение в систему эндоцитоза (Рисунок 4).

Наиболее изученными со структурной точки зрения среди вирусов растений являются представители рода *Tobamovirus* (ВТМ). Для всех остальных групп палочкообразных вирусов растений структурные данные более скудные.

Спиральные вирусы с трудом поддаются кристаллизации, поэтому их структуру, в основном, изучают методом рентгеновского рассеивания на волокнах или методом электронной микроскопии макромолекул.

3. Электронная микроскопия макромолекул.

Для полноценного понимания биологических процессов в организмах необходимо знание пространственного (трехмерного или 3D) расположения и динамики участвующих в этих процессах макромолекул, того, как они собираются в сложные молекулярные машины, и как формируют функционирующие органеллы клеток и тканей. На клеточном уровне оптическая микроскопия может показать пространственное распределение и динамику молекул, помеченных флуорофорами. Методы рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии могут предоставить подробную информацию о молекулярной структуре и динамике макромолекул, однако эти методы имеют существенные ограничения (например, размер белков и необходимость их кристаллизовать).

Метод просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) применим для

изучения структур в широком диапазоне размеров от атомных до клеточных. Развитие криогенных методов позволило с помощью ПЭМ получать изображения биологических молекул и клеток в гидратированном, близком к нативному состоянии (Dubochet et al., 1988; Al-Amoudi et al., 2004). В последние годы электронная микроскопия стала одним из основополагающих инструментов в структурной биологии (Lucic et al., 2008; McIntosh et al., 2005).

Параллельное развитие программного обеспечения способствовало созданию программ для расчета 3D-структур из проекционных изображений биологических макромолекул с низкой контрастностью и низким отношением сигнал-шум (ОСШ), полученных с помощью ПЭМ (Frank, 2002; van Heel et al., 2000). Выравнивание и классификация изображений в 2D и 3D являются ключевыми методами для улучшения ОСШ и обнаружения неоднородности в ПЭМ-данных (Orlova and Saibil, 2010).

Различные молекулярные комплексы с разной формой, размерами и в разных биохимических состояниях могут быть изучены с помощью ПЭМ при условии того, что толщина образца значительно меньше микрона. Многообразие образцов можно разделить на 2 типа: биохимически очищенные, изолированные комплексы (отдельные частицы или упорядоченные ансамбли такие, как 2D кристаллы) и уникальные, индивидуальные объекты, например, срезы тканей, клеток или органеллы. Из препаратов изолированных белковых комплексов с множеством одинаковых одиночных частиц, может быть получено много проекций одной и той же молекулы и вычислена ее 3D структура. Карты с субатомным разрешением впервые методом ПЭМ были получены из высокоупорядоченных образцов таких, как 2D-кристаллы и спиральные частицы вирусов (Henderson et al., 1990a; Miyazawa et al., 1999).

Разрешение реконструкций, расчитанных из отдельных частиц макромолекул, постоянно улучшается и уже достигло 2,2 Å (Bartesaghi et al., 2015).

3.1. Получение электронно-микроскопических изображений макромолекул

3.1.1 Подготовка проб

Электронно-микроскопическое исследование макромолекул является мощным средством для визуализации их структурных деталей. Однако, поскольку электроны взаимодействуют с веществом, внутри колонны микроскопа поддерживают высокий вакуум, чтобы избежать нежелательного рассеяния электронов на молекулах газа. Следовательно, образцы для ПЭМ должны быть в твердом состоянии, т. е. необходима их специальная подготовка путем либо обезвоживания, либо стабилизации гидратированных биологических образцов в условиях вакуума (Jensen, 2010).

3.1.2 Негативное контрастирование изолированных комплексов.

Простейший способ для изучения раствора или суспензии изолированных макромолекул – негативное контрастирование, при котором к образцу, нанесенному на сетку, добавляется водный раствор соли тяжелого металла, как правило, 1-2% уранилацетата, избыток жидкости промакивается, а образец высушивается (Orlova and Saibil, 2010; Saibil, 2000) (Рисунок 5а).

Уранилацетат – наиболее широко используемая краска, которая дает высокий контраст, хотя некоторые белковые структуры лучше сохраняются в других контрастерах, таких как соли вольфрама или молибдена (Harris and Scheffler, 2002; Sherman et al., 1981). Контрастер формирует электроннoплотную оболочку на поверхности изучаемого объекта, что дает информацию о размере, форме и симметрии частиц белка, а также дает представление об однородности образца. Метод называется негативным контрастированием, потому что макромолекулы видны, как светлые, несвязавшие краситель области. Этот метод является быстрым и простым.

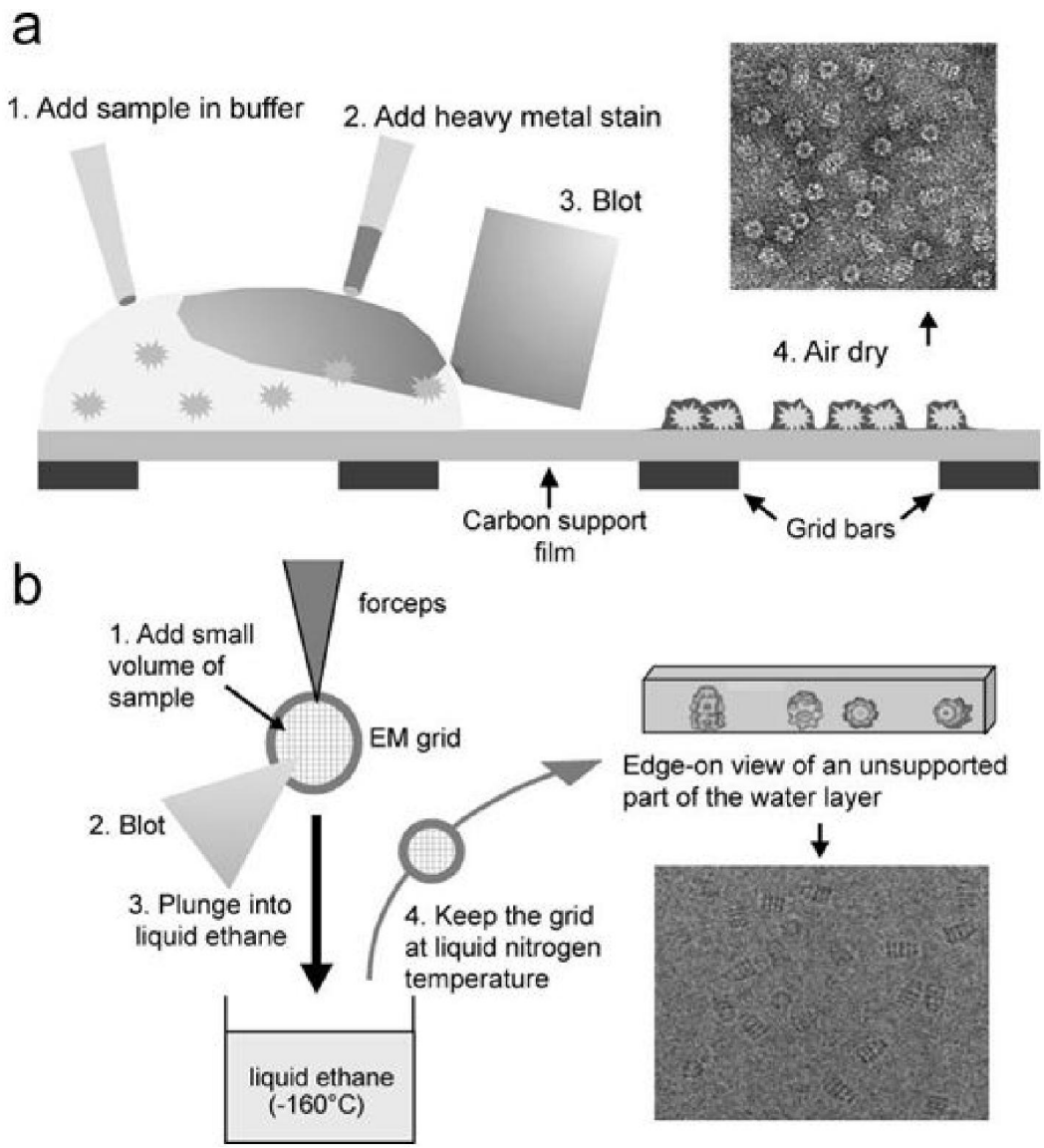


Рисунок 5. Методы подготовки растворов макромолекул для исследования в ПЭМ (Orlova and Saibil, 2011).

Некоторые молекулы хорошо сохраняются при негативном окрашивании, но хрупкие комплексы могут сплющиться или распасться во время окрашивания и последующей сушки. В целом, 3D структура в большей или меньшей степени уплощается под действием контрастера, либо часть структуры может быть искажена или отсутствовать на изображениях. Поэтому предпочтительнее использовать для определения структуры крио-методы. Исключением являются небольшие молекулы (менее ~100-200кДа), для которых сигнал в крио-ПЭМ может быть слишком слаб для точного обнаружения и определения их ориентации. Для таких молекул применяется негативное контрастирование.

3.1.3 Крио-ПЭМ изолированных и субклеточных комплексов.

Клетки и макромолекулы находятся в водном растворе, и водное окружение необходимо для сохранения их структурной целостности. Крио-ПЭМ позволяет стабилизировать образцы в нативном, гидратированном состоянии даже при высоком вакууме. Быстрая заморозка используется для приведения образца в твердое состояние без обезвоживания и/или образования кристаллов льда, образец поддерживают при низкой температуре во все время переноса в колонну и в процессе наблюдения в электронном микроскопе.

Замораживание водных растворов для крио-ПЭМ состоит из 3 этапов: 1) водную суспензию белка наносят на специальную сетку с отверстиями (1-2 мкм в диаметре) в подложке; 2) все излишки жидкости на подложке промакивают; 3) оставшуюся в отверстиях тонкую водную пленку быстро погружают в жидкий этан или пропан (-182 ° C), охлажденный жидким азотом для быстрого оттока тепла от образца (Рисунок 5b). Охлаждение путем погружения в жидкий этан происходит гораздо быстрее, чем при погружении непосредственно в жидкий азот, т.к. жидкий этан, охлажденный жидким азотом, находится ближе к точке замерзания, а не кипения, так что он не испаряется и не производит изолирующего слоя газа. Низкая температура значительно замедляет эффекты повреждения образца электронным пучком.

3.2 Взаимодействие электронного пучка с образцом

Формирование изображений с помощью электронов обеспечивает получение высокого разрешения из-за их короткой длины волны. Тем не менее, взаимодействие электронов первичного пучка с электронами образца вызывает радиационные повреждения препарата. Характер взаимодействия электронов с образцом зависит от энергии электронов и состава образца (Hanszen, 1971). Некоторые электроны проходят через образец без каких-либо взаимодействий, другие отклоняются электростатическим полем ядра, экранированым внешними орбитальными электронами атомов образца, а некоторые электроны могут отклоняться под большим углом или даже претерпевать обратное рассеяние. Из

взаимодействующих электронов некоторые рассеиваются без потери энергии (упругое рассеяние), но другие передают часть своей энергии образцу (неупругое рассеяние) (Рисунок 6).

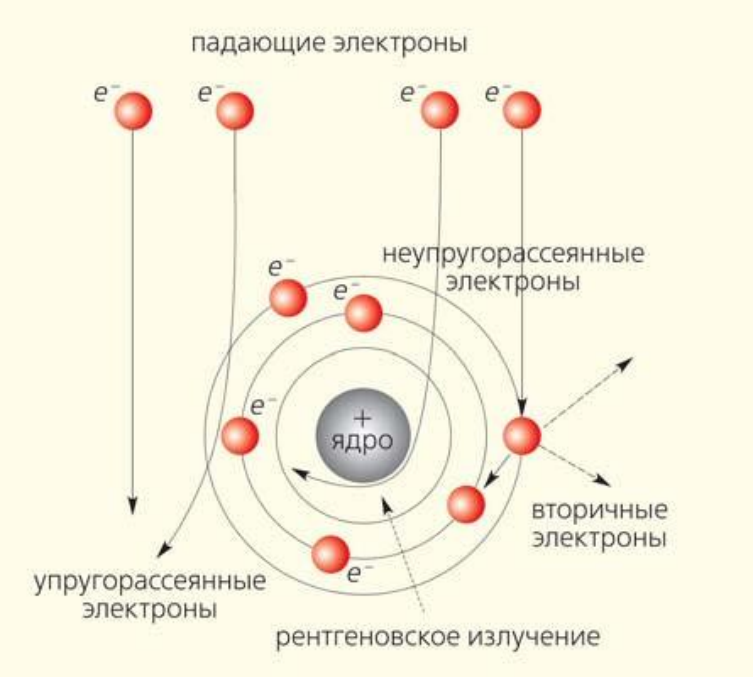


Рисунок 6. Взаимодействие пучка электронов с образцом (Orlova and Saibil, 2011)..

Переданная энергия может ионизировать атомы в образце, вызывать рентгеновское излучение, перегруппировки химических связей и образование свободных радикалов или приводить к рассеиванию вторичных электронов. Все это изменяет структуру образца. Повреждение образцов является существенным препятствием в получении изображений с высоким разрешением. Типичные значения электронной экспозиции, используемые для биологических образцов, - от 1 до 20 e/Å^2. Хотя биологические образцы могут выдерживать воздействие 100-500 e/Å^2, требующие высокого разрешения детали образца терпят изменения уже при экспозициях от 10 e/Å^2 или меньше (Knapek and Dubochet, 1980). Таким образом, радиационное повреждение определяет условия эксперимента и ограничевает разрешение изображений биологических структур. Для снижения радиационного повреждения во время выбора зоны, выравнивания и фокусировки пучка электронов применяются специальные системы "низкой дозы", чтобы блокировать луч до последнего шага - получения изображения (Glaeser and Taylor,

1978; Unwin, 1974). Пример повреждения молекул электронным пучком показан на Рисунке 32B.

3.3 Формирование изображения

В состав электронного микроскопа входит источник электронов (катод), анод, несколько линз, формирующих изображение и система детекции (экран, фотоплетка или цифровая ПЗС камера) (Рисунок 7).

3.3.1 Источники электронов.

Стандартный катод — это вольфрамовая нить, которую нагревают до 2000-3000 °C. Термически испускаемые электроны ускоряются электрическим полем, создаваемым между анодом и катодом. Другим распространенным электронным источником является кристалл LaB6. Такой луч имеет более высокую когерентность и плотность тока. В настоящее время наиболее высокотехнологичным источником электронов является источник с полевой эмиссией (FEG) (Spence, 2003). Получаемый из таких источников луч меньше в диаметре, более когерентный и примерно в 500 раз ярче при очень низком разбросе по энергии производимых электронов (Spence, 2003). Это достигается с помощью одного кристалла вольфрама заостренного так, что его конец имеет радиус ~ 10-25 нм, по сравнению с 5-10 мкм для кристаллов LaB6. Электроны извлекают из кончика кристалла приложением разницы потенциалов на поверхности эмиттера (полевая эмиссия), а затем ускоряют за счет напряжения в 100-300 кВ.

3.3.2 Система линз электроннного микроскопа.

Как и в световой микроскопии, в электронном микроскопе конденсорные линзы преобразовывают расходящейся пучок в пучок параллельный, который освещает образец (Рисунок 7).

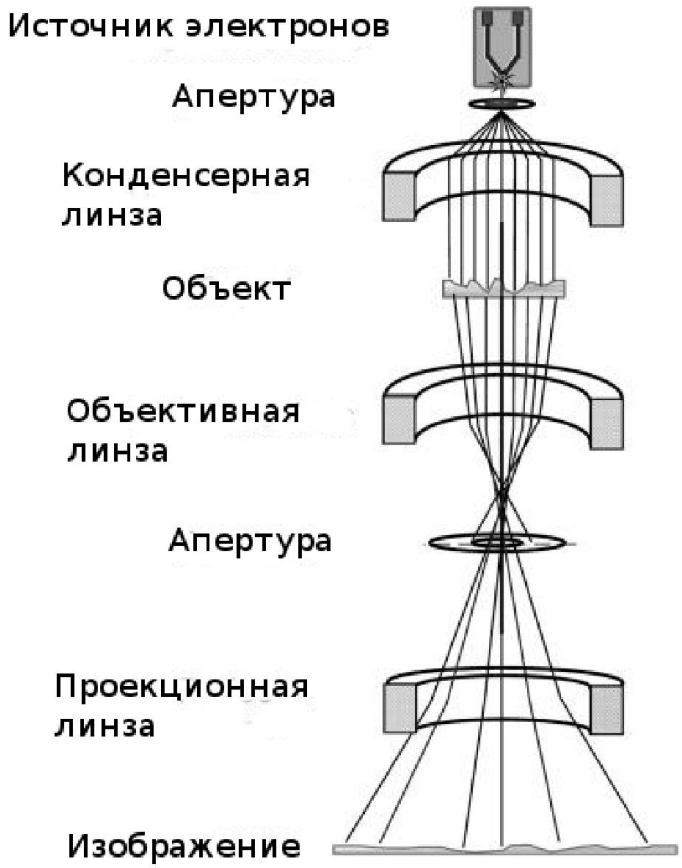


Рисунок 7. Схема устройства электронного микроскопа (Orlova and Saibil, 2011).

В современных электронных микроскопах образец помещается посередине объективной линзы, полностью погружаясь в магнитное поле. Объективная диафрагма помещается в задней фокальной плоскости объективной линзы; диафрагма не позволяет электронам, рассеянным на большие углы, достигнуть плоскости изображения, тем самым повышая контрастность изображения. Объективная линза обеспечивает первичное увеличение (в 20-50 раз) и является наиболее важным оптический элементом электронного микроскопа. Ее аберрации играют ключевую роль при получении изображения. Далее изображение увеличивается промежуточной и проекционной линзами перед тем, как электроны достигают детектора. Кроме того, на задней фокальной плоскости объективной линзы может быть получена и увеличена электронная дифракционная картина

3.3.3 Аберрации в электронной микроскопии.

Электромагнитные линзы имеют те же типы дефектов, что и оптические: сферические и хроматические аберрации, кривизну поля, астигматизм и кому (Reimer and Kohl, 2008), из которых наиболее значимыми являются сферические,

хроматические аберации и астигматизм (Рисунок 8).

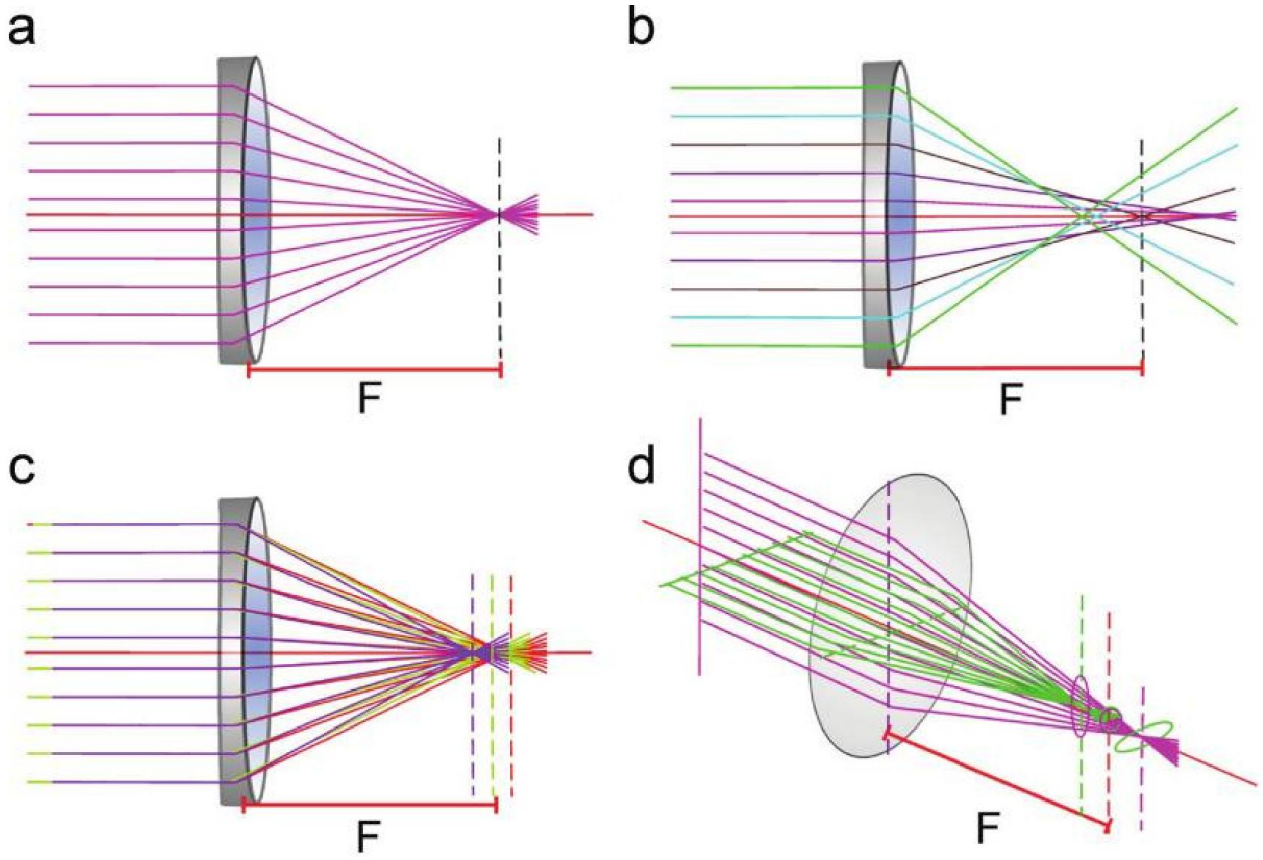


Рисунок 8. Аберрации в электронном микроскопе. A) Отсутствие аберраций. B) Сферическая аберрация. C) Хроматическая аберрация. D) Астигматизм (Orlova and Saibil, 2011). F – фокусное расстояние.

Сферическая аберрация искажает изображение, в связи с зависимостью фокусного расстояния от расстояния до оптической оси (Рисунок 8b). Лучи, проходящие ближе к краю линзы, преломляются сильнее, чем те, которые проходят ближе к оптической оси линзы. Хроматическая аберрация вызвана тем, что линзы фокусируют лучи с большей длиной волны сильнее, так что часть изображения формируется в плоскости ближе к объекту, в результате появляются цветные гало по краям в изображениях (Рисунок 8c). Хроматическая аберрация появляется из-за различий в энергии электронов, вызванные изменениями напряжения в катоде, разбросом энергий электронов в первичном пучке и потерями энергии при неупругом взаимодействии с образцом. Все это размывает мелкие детали изображения. Астигматические аберрации происходят из-за того, что объективная линза немного сильнее преломляет в одном направлении, чем в

перпендикулярном. Это приводит к тому, что изображение точки превращается в эллипс (Рисунок 8f). Астигматизм в электронных микроскопах может быть скомпенсирован катушками стигматора. Описанные аберрации оказывают наибольшее влияние на качество изображеиия, хотя есть и другие аберрации, более высокого порядка, которые должны учитываться для получения высокоразрешенных изображений (Kirkland et al., 2008)..

3.3.4. Передача контраста

Изображения представляют собой вариации интенсивности, вызванные локальными различиями в пропускающей способности образца. Контраст изображения $Cont_{im}$ определяется как отношение разницы между наиболее яркими ρ_{max} и наиболее темными ρ_{min} точками на изображении и средней интенсивностью всего изображения:

(1) $$Cont_{im} = \frac{\rho_{max} - \rho_{min}}{\bar{\rho}}$$

Контраст изображения, получаемый за счет поглощения части падающего луча, называют амплитудным контрастом (Рисунок 9). Т.к. только небольшая часть электронов фактически поглощается биологическим образцом в неупругих взаимодействиях, амплитудный контраст также может быть увеличен с помощью объективной диафрагмы для отсечения электронов, рассеянных под большими углами (Spence, 2003). Одна из трудностей изучения биологических объектов методом электронной микроскопии состоит в том, что биологические молекулы производят очень низкий амплитудный контраст. Они состоят из легких атомов (H, O, N и C) и не поглощают электроны падающего луча, а отклоняют их так, что общее число электронов в выходящей волне после прохождения образца остается прежним. Это означает, что образцы не изменяют интенсивность падающего пучка, и детали изображения остаются неразличимыми. В тоже время электроны взаимодействуют с веществом, так что прошедшие лучи имеют различные длины пути через образец, что дает фазовый сдвиг (Рисунок 10). Эти фазовые изменения, закодированные в выходящей волне, становятся видимыми путем превращения их

в вариации амплитуды, которые непосредственно регистрируются датчиком.

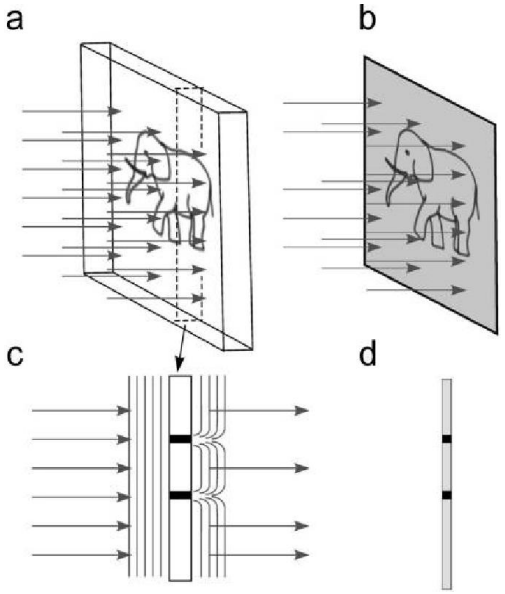


Рисунок 9. Амплитудный контраст (Orlova and Saibil, 2011).

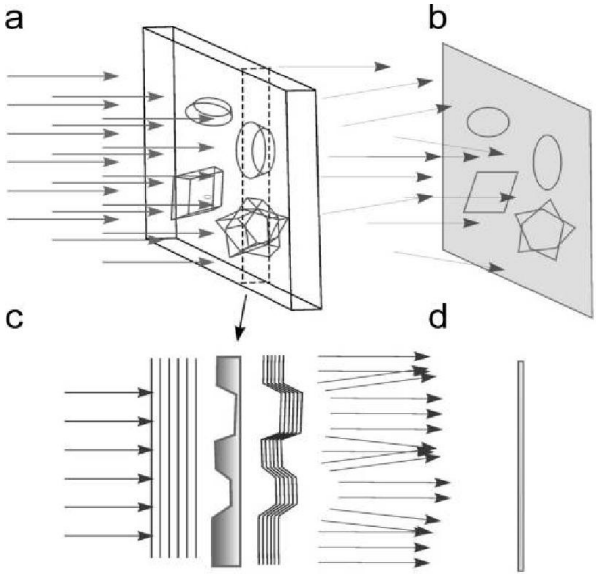


Рисунок 10. Фазовый контраст (Orlova and Saibil, 2011).

3.3.5 Контраст, создаваемый тонкими образцами.

Изображение формируется всеми электронами, как рассеянными, так и нерассеянными, что дает очень мало контрастности в случае тонких, неокрашенных биологических образцов. Тонкие прозрачные образцы рассеивают электроны на малые углы, поэтому являются слабыми фазовыми объектами (Spence, 2003).

Один из способов увеличения контрастности получаемых изображений заключается в использовании веществ, увеличивающих рассеяние, таких как контрастеры в негативном контрастировании. Другой способ - это использование несовершенств микроскопа, например, сферических аберраций.

Нестабильности и ограниченная когерентность электронного пучка служат причиной падения сигнала от мелких деталей изображения, что приводит к их размыванию. Т.е. четкая точка будет отображаться не как точка, а как в размытое пятно. Связь между оригинальной точкой, а ее изображением описывается функцией рассеяния точки (ФРТ) (point spread function, PSF) электронного микроскопа. ФРТ - это функция, которая описывает несовершенства системы в

реальном пространстве.

(2) $\Psi obs(\vec{r}) = \Psi sam(\vec{r}) \otimes PSF(\vec{r})$

Наблюдаемое изображение ($\Psi obs(\vec{r})$) является результатом свертки идеальной проекции объекта ($\Psi sam(\vec{r})$) с функцией рассеяния точки микроскопа ($PSF(\vec{r})$) в реальном пространстве. Удобно описывать влияние этих факторов на изображение посредством использования пространства Фурье (дифракционное пространство, обратное пространство):

(3) $$F\{\Psi_{obs}(\vec{r})\} = F\{\Psi_{sam}(\vec{r})\} \cdot CTF(\vec{R}) \cdot E(\vec{R})$$

где F $\{\Psi_{obs}\}$ является трансформантой Фурье наблюдаемого изображения; $\vec{R}$ является пространственной частотой (координата в фурье-пространстве); F$\{\Psi_{sam}\}$-трансформанта Фурье образца; CTF($\vec{R}$) является частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ) микроскопа, а E($\vec{R}$) является огибающей. E ($\vec{R}$) описывает влияние различных нестабильностей и распада образца под действием пучка (Chiu and Glaeser, 1977).

(4) F$\{PSF(\vec{r})\}$=CTF($\vec{R}$)·E($\vec{R}$)

Т.е. трансформанта Фурье ФРТ является произведением ЧКХ и огибающей.

(5) $CTF(\vec{R}) = \sqrt{1 - A^2} \cdot \sin(\gamma(\vec{R})) + A\cos(\gamma(\vec{R}))$

Где A – амплитудный контраст, а $\gamma(\vec{R})$ зависит от длины волны электронов, коэффициента сферической аберрации линзы и размера дефокуса.

Было установлено, что контраст изображения биологических объектов может быть улучшен путем комбинированного воздействия сферической аберрации и дефокусировки, перемещения плоскости изображения от точного фокуса (Erickson and Klug, 1971). Основанием для повышения контрастности является то, что сферические аберрации в сочетании с дефокусировкой индуцирует фазовый сдвиг между рассеянными и нерассеянными электронами. Чем больше фазовый сдвиг между рассеянными и нерассеянными лучами, тем больше контрастность изображения. Поэтому для получения контрастных изображений обычно

используют дефокусировку в пределах 0,5-3,5 мкм.

Главный эффект ЧКХ на изображения слабых фазовых объектов возникает от осцилляции компонент $\sin(\gamma(\vec{R}))$ и $\cos(\gamma(\vec{R}))$, которые поочередно заменяют знак фазы колец Тона в изображении, подвергнутом преобразованию Фурье, на противоположный (Thon and Valdre, 1971) (Рисунок 9).

Для тонких замороженных образцов, амплитудный контраст для электронов при напряженим 120 кэВ оценивается в 7%, тогда как для негативно окрашенных образцов он может достигать 25% (Unwin, 1974). Для крио-образцов, исследуемых при напряжении 300 кэВ, он падает до ~ 4% (Toyoshima and Unwin, 1988).

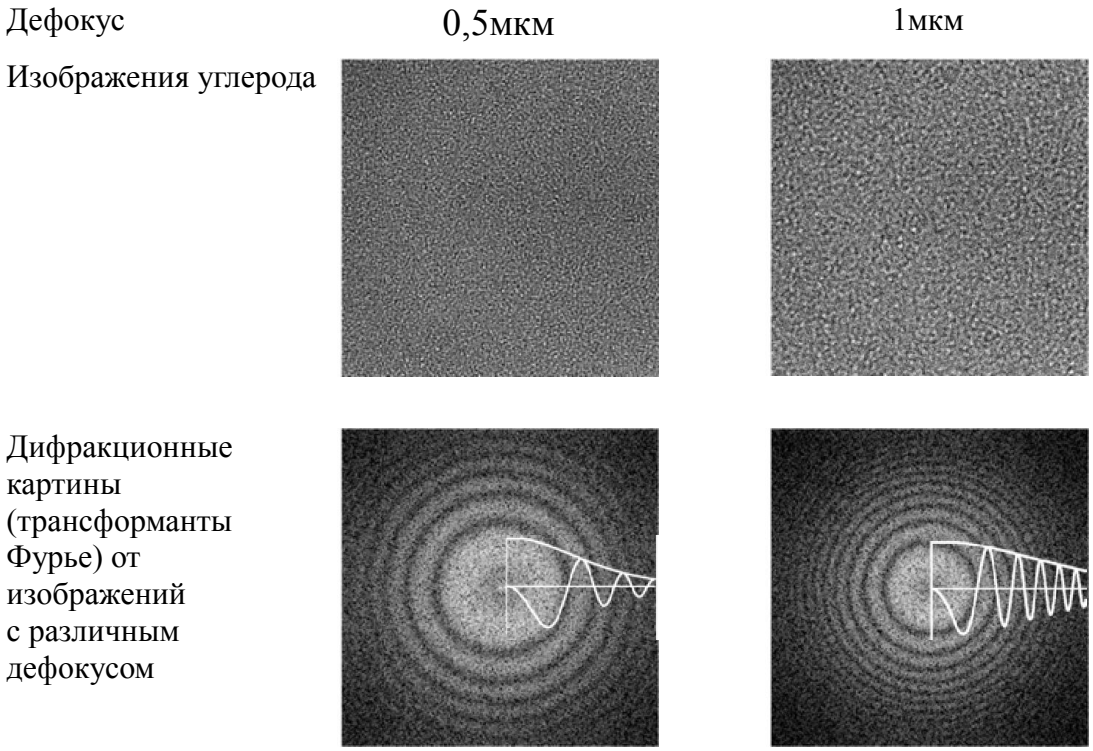


Рисунок 9. Зависимость ЧХК от размера дефокуса. (Orlova and Saibil, 2011)

3.4. Детекция ПЭМ изображений

Фотопленки.

До недавнего времени самым распространенным детектором изображения была фотоэмульсия. Преимущество фотопленки состоит в высокой чувствительности и большой зоне детекции изображения. Фотопленки по-прежнему являются наиболее эффективными детекторами электронов с точки зрения пространственного разрешения на большой площади (количество

эффективных пикселей) и стоимости. Недостатки использования пленок состоят в том, что они вводят дополнительную нагрузку на системы поддержания вакуума в микроскопе в связи с наличием на пленке адсорбированной воды, пленка требует химической обработки (проявления), сушки и оцифровки.

Цифровые детекторы

Цифровые детекторы практически вытеснили пленки в области фотографии и широко используется в ПЭМ в связи с развитием автоматизированного сбора данных и методов томографии. Самыми популярными камерами являются приборы с зарядовой связью (ПЗС), которые преобразуют аналоговый оптический сигнал в цифровой формат.

Поскольку электроны с высокой энергией необратимо повреждают фоточувствительные каналы в ПЗС-матрице, в современных устройствах используется моно- или поликристаллические сцинтилляторы для преобразования электронов в фотоны, которые затем передаются на ПЗС-матрицу. Несмотря на то, что зернистость сцинтиллятора и электронно-фотонного преобразование добавляют шумы в изображения, использование сцинтиллятора значительно увеличивает срок годности ПЗС-матрицы.

ПЗС позволяет записывать изображения с низким контрастом, и электронно-дифракционные картины, где разница интенсивностей может составлять несколько порядков. Недостатком этого типа камеры является высокая стоимость и ограниченный размер сенсора.

Качество цифровых камер в ПЭМ продолжает улучшаться: новейшие камеры с прямой детекцией электронов способны регистрировать электроны напрямую, без использования сцинтиллятора, что снижает шум на получаемых изображениях (McMullan et al., 2014).

3.5. Обработка ПЭМ изображений

3.5.1. Предварительная обработка изображений отдельных частиц

Визуализация биологических объектов требует компромисса между повышением контраста и минимизацией искажения изображения. Применение

дефокусировки увеличивает контраст, но усложняет интерпретацию изображения, потому что некоторые детали могут иметь обратный контраст. Таким образом, получаемое изображение искажено, т.к. идеальное изображение объекта претерпевает свертку с ФРТ и непосредственно не связано с распределением плотности в исходном объекте (Формула 2). Для восстановления информации, изображение должно быть избавлено от эффекта частотно-контрастной характеристики (ЧКХ). ЧКХ, в свою очередь, модифицированная затуханием огибающей функции, связана преобразованием Фурье с ФРТ (Формула 4). Для полного восстановления данных изображения слабых фазовых объектов, необходима деконволюция с ФРТ микроскопа. Процедура ликвидации воздействия ЧКХ называется CTF-коррекцией (Orlova and Saibil, 2011).

3.5.2 Определение ЧКХ.

Для конкретных настроек микроскопа напряжение и сферическая аберрация остаются постоянными, но величина расфокусировки варьируется от изображения к изображению в связи с изменением тока в линзах, высоты и толщины образца.

Определение ЧХК (Zhou et al., 1996) включает в себя расчет вращательно усредненного силового спектра (интенсивности дифракции) набора двумерных изображений, который может быть посчитан только при условии отсутствия астигматизма. Амплитудный профиль (квадратный корень из значения интенсивностей) сравнивают с моделью ЧКХ. В этой модели меняют значение дефокуса так, чтобы найти лучшее соответствие между двумя профилями. Значение дефокуса при лучшем соответствии в дальнейшем применяют для всего набора изображений.

Вращательное усреднение предполагает проведение хорошей коррекции астигматизма. Определение ЧКХ можно проводить автоматически, например, с помощью программного обеспечения CTFFIND3, разработанного Минделлом и Григорьевым (Mindell and Grigorieff, 2003), которое ищет лучшее совпадение экспериментальной ЧКХ и теоретической, рассчитанной для различных дефокусов.

3.5.3 Коррекция ЧКХ на изображении.

ПЭМ изображения точно передают информацию об объекте, если для них скомпенсировано воздействие ЧКХ микроскопа. Полное восстановление спектра образца требует разделить $F\{\Psi_{sam}(\vec{r})\}$ на ЧКХ) (формула 3). Тем не менее, эта операция не возможна из-за того, что ЧКХ имеет нули, и спектр не может быть восстановлен из снимков, сделанных с одним дефокусом. Чтобы полностью восстановить информацию, необходимо использовать изображения, снятые при различных значениях дефокусировки, так что нули каждой отдельной ЧКХ будут заполнены путем объединения данных, полученных с изображений с разными значениями дефокуса.

3.5.4 Фазовая коррекция.

Простейший способ откорректировать влияние ЧКХ — это перевернуть фазы изображения в тех местах спектра, где $\sin\gamma$ меняет свой знак. В большом количестве случаев это дает возможность получить надежную реконструкцию, потому что при большом количестве изображений с разными дефокусами информация, потерянная в окрестностях 0 на ЧКХ одного изображения, восстанавливается за счет информации с другого изображения с другой ЧКХ, которая принимает нулевое значение при других значениях.

3.5.5 Коррекция амплитуды.

Более продвинутый метод восстановления информации состоит в коррекции как фаз спектра изображения, так и амплитудных искажений. Эта поправка обычно принимает во внимание не только колебания ЧКХ, но и компенсирует спад амплитуды при высоких значениях пространственных частот. Амплитудная коррекция была реализована в программах: EMAN (Tang et al., 2007), SPIDER (Frank et al., 1996), Xmipp (Sorzano et al., 2004) и др. Для визуализации деталей высокого разрешения важно исправлять спад амплитуд, обусловленный огибающей функцией при высоких значениях пространственных частот.

3.5.6 Нормализация изображения.

После коррекции ЧКХ, изображение объекта можно рассматривать как приближение 2D проекции 3D-объекта, за исключением областей, где ЧКХ принимает нулевое и близкое к нему значение, т.е. низкий сигнал. Это позволяет проводить анализ изображений, конечной целью которого является определение трехмерного распределения электронной плотности в объекте (Orlova and Saibil, 2011).

Даже при одинаковых настройках микроскопа во время сбора данных различия в ориентации частиц в образце, толщины подложки, условий обработки пленки (при ее наличии) могут привести к различиям в контрасте изображении. Кроме того, структурный анализ часто требует объединения данных, собранных в ходе нескольких сессий на электронном микроскопе. Оптимизация обработки данных требует стандартизации изображений, т.е. нормализации. Это обычная в обработке изображений процедура, направленная на приведение средней плотности всех изображений частиц к одному значению, как правило, нулю.

3.6. Выравнивание изображений

Информация, которую мы хотим извлечь из ПЭМ изображений, т.е. сигнал, является проекцией плотности интересующей нас структуры. Помимо сигнала, изображения содержат флуктуации интенсивности, вызванные шумом различного происхождения. Отношение сигнал-шум (ОСШ, SNR) определяется как

(6) $SNR=P_{signal}/P_{noise}$

где P_{signal} - это энергия (интеграл от силового спектра после нормализации) спектра сигнала, а P_{noise} — энергия шума.

Большое количество изображений частиц находится в различных ориентациях, при этом каждое отдельное изображение имеет низкое ОСШ. Основная задача состоит в определении относительного положения и ориентации изображений этих частиц для совмещения одинаковых проекций с целью повышения ОСШ. Это производится путем определения сдвигов и углов

поворотов, которые приводят каждое изображение в соответствие с эталонным изображением (полученным при усреднении всех частиц в наборе данных). Выравнивания повторяются много раз, так что последовательные усредненные изображения содержат все более и более мелкие детали, которые, в свою очередь, улучшают эталонное изображение для последующих раундов уточнения (Orlova and Saibil, 2011).

3.6.1. Кросс-корреляционная функция

Корреляционная функция широко используется для оценки сходства между изображениями. Взаимная корреляция сравнивает два разных изображения.

(7) $$CCF(\vec{s}) = \frac{\int g_1(\vec{r}+\vec{s})g_2(\vec{r})d\vec{r}}{\sqrt{\int g_1(\vec{r})g_1(\vec{r})d\vec{r} \times \int g_2(\vec{r})g_2(\vec{r})d\vec{r}}}$$

Уравнение 7 определяет нормированную функцию взаимной корреляции (ФВК, CCF) между двумя функциями, $g_1(\vec{r})$ и $g_2(\vec{r})$, где $\vec{r}$ — это вектор в пространстве, а $\vec{s}$ является сдвигом между изображениями. В нашем случае, изображения — это 2D-функции, которые сравниваются, а $\vec{r}$ и $\vec{s}$ - вектора в плоскости изображения. Изображения нормированы к среднему нулевому значению. Без нормализации изображения, ФВК будет компенсирована постоянной, пропорциональной произведению средних значений изображения.

Нормированная функция взаимной корреляции будет принимать максимальное значение, когда два изображения одинаковы и идеально выровнены (Orlova and Saibil, 2011). Кросс-корреляция изображения с самим собой называется автокорреляционной функцией (АКФ).

3.6.2 Принципы и стратегии выравнивания

У набора изображений неизвестной структуры эталон для выравнивания не известен. Подходящий эталон может быть получен из самих данных путем применения серии подходов, известных как выравнивание без эталона (reference-free). В одном из таких подходов первый шаг состоит в смещении предварительно обработанных изображений частиц к центру квадратов, в которых они находятся. Частицы могут быть центрированы либо путем сдвигания центра масс

изображения к центру изображения, либо путем нескольких итераций выравнивания относительно вращательной суммы всех изображений (Dube et al., 1993). В другом варианте берется серия произвольно выбранных изображений и используется в качестве эталона для выравнивания всех других изображений (Penczek et al., 1992).

Из-за низкого ОСШ в крио-изображениях очень важно максимизировать вклад сигнала за счет снижения шума. Есть два способа уменьшить шум в изображениях. В реальном пространстве используют маски вокруг частиц, которые служат для исключения фона в регионах за пределами частиц. В обратном пространстве Фурье может быть применен полосовой фильтр, чтобы исключить низкочастотные компоненты, связанные с изменениями фона и высокочастотные составляющие, выходящие за пределы разрешения, которое планируется получить в результате анализа. В последующих итерациях выравнивания увеличивают вклад более высокочастотных компонент.

В дополнение к произвольному положению и ориентации в плоскости проекции, частицы могут иметь различную ориентацию вне плоскости, что ведет к появлению различных проекций. Для того, чтобы рассортировать изображения в группы с общей ориентацией, применяют статистический анализ и классификацию (van Heel et al., 2000).

3.7 Статистический анализ изображений

Для анализа различий в 2D проекциях используются несколько методов. Классификация может быть осуществлена с помощью иерархической кластеризации или кластеризации к-средних (Orlova and Saibil, 2011).

3.7.1 Метод главных компонент

Каждое изображение *I*x*J* пикселей может быть представлено в виде вектора в $(I \times J)^2$ -мерном гиперпространстве с координатами определяемыми, как значения плотности в каждом пикселе изображения. Таким образом, набор изображений можно рассматривать как множество векторов или, что эквивалентно, как облако точек (концы векторов) в гиперпространстве (Рисунок 10). Похожие изображения

будут соответствовать точкам, которые находятся близко друг к другу в облаке.

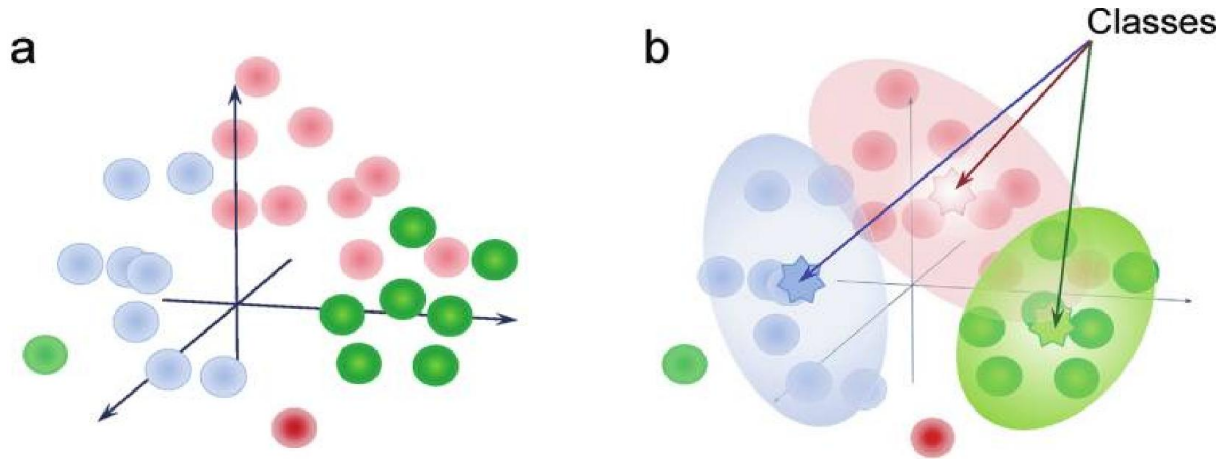


Рисунок 10. Представление изображений в качестве точек в гиперпространстве и их классификация (Orlova and Saibil, 2011).

Суть статистического подхода заключается в сокращении числа переменных, описывающих набор данных и нахождении меньшего набора независимых переменных, называемых главными компонентами. Многомерный статистический анализ (MCA, MSA) определяет наиболее сильные изменения в больших наборах данных и меняет системы координат в гиперпространстве, используя эти основные компоненты в качестве новых осей.

Анализ главных компонент (PCA) в качестве основных компонент использует собственные векторы ковариационной матрицы (попарное сравнение всех изображений) (van Heel et al., 2009). В анализе изображений собственные вектора можно представить в виде собственных избражений (eigenimages), которые показывают регионы наибольших изменений плотности в наборе данных. Маленькие изменения, как правило, относятся к шумовым компонентам данных.

3.7.2. Иерархическая кластеризация

Основные компоненты облака данных могут быть использованы для сортировки изображений на группы путем процедуры кластеризации. Чтобы решить, как группировать изображения, необходимо оценить степень их похожести. Существуют два основных подхода к кластеризации, которые отличаются по начальным процедурам: в агломерационной, или восходящей,

иерархической классификации, каждая точка в гиперпространстве данных изначально рассматривается как группа (класс) с последующим слиянием самых похожих (близких) точек в необходимое число кластеров. Аналитический (разделяющий) подход изначально объединяет все данные в один кластер, который должен быть разделен на более мелкие группы в соответствии с их непохожестью. В зависимости от расстояния до каждой точки данных из существующих кластеров, элемент будет либо присоединяться к ближайшему кластеру, либо служить затравкой нового (van Heel et al., 2009).

3.8. Определение ориентации

Для расчета 3D-карты из набора 2D проекций необходимо определить относительные ориентации этих проекций. Существуют два основных подхода к этой проблеме. Экспериментальный подход включает в себя сбор изображений частиц с разными углами наклона столика в микроскопе (метод случайного конического наклона) (Radermacher et al., 1987). Этот метод хорошо подходит для частиц, которые принимают предпочтительную ориентацию на подложке. Другой подход основан на вычислениях, в нем собираются частицы с различными ориентациями в пространстве (метод общих линий в прямом и обратном пространствах) (Baker and Cheng, 1996; Crowther, 1971; Orlova et al., 1994).

Самая большая проблема в определении ориентации - это определить начальный набор углов для набора данных, полученных из неизвестной 3D-структуры. После этого ориентации могут быть уточнены с использованием исходной модели (Orlova and Saibil, 2011).

Сравнение проекций.

Предварительная 3D-структура даже с очень низким разрешением может быть использована для создания модели путем получения репроекций при различных ориентациях. Набор репроекции будет служить в качестве эталонных изображений нового раунда классификации (Penczek et al., 1994). В методе сравнения проекций каждому изображения приписываются углы Эйлера эталонного изображения, которое дает лучшую кросс-корреляцию с данным

изображением. Для каждого сравнения должны быть проверены все возможные выравнивания в плоскости. После того, как все углы Эйлера приписаны, может быть рассчитана новая 3D-карта и повторена процедура с новыми репроекциями.

3.9 3D-реконструкция

В ПЭМ мы имеем дело с 2D-изображениями, которые (после восстановления информации путем коррекции ЧКХ) можно рассматривать как 2D-проекций трехмерного электронного потенциала образца. Для восстановления трехмерного объекта по его проекциям были разработаны несколько альтернативных подходов (Penczek, 2010). Эти подходы можно разделить на две основные группы: методы, которые выполняют реконструкцию в реальном пространстве (включают в себя метод обратного проецирования и алгебраические методы); в другой группе реконструкция осуществляется в Фурье-пространстве.

3.9.1. Методы реконструкции в реальном пространстве

N-мерная функция может быть восстановлена из её интегралов по континууму прямых линий, которые представляют собой её одномерные прекции (Radon, 1917). Непрерывный набор линейных проекций называют преобразованием Радона N-мерной функции. Процедура, обратная полному (N-мерному) преобразованию Радона, позволяет определить распределение плотностей объекта. Однако существуют трудности в численной реализации обратного преобразования Радона для структурного анализа, поэтому это преобразование реализуется в приближенной форме (Orlova and Saibil, 2011).

Обратное проецирование.

Цифровая проекция под углом α — это двумерная функция, каждый пиксель которой равен сумме плотностей вдоль луча, перпендикулярного плоскости данной функции и исходящего из данного пикселя (Рисунок 11).

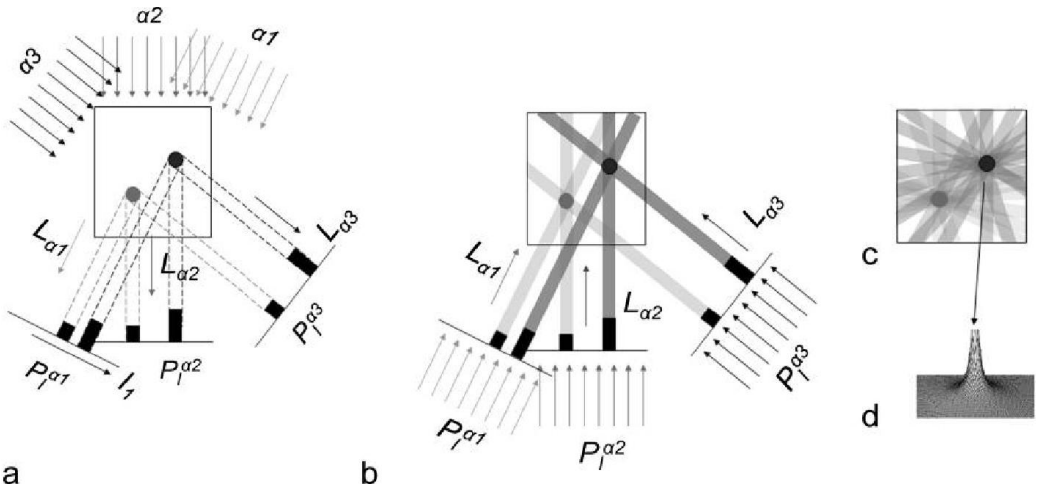


Рисунок 11. Схема получения проекций (a) и обратного проецирования (b), результаты обратоного проецирования (c, d) (Orlova and Saibil, 2011).

Обратное проецирование производится путем растяжения проекцией обратно по объему вдоль направления, в котором была сделана проекция. Пиксели растягиваемой проекции формируют линии, называемые лучевыми суммами. Значение плотности в заданном пикселе реконструкции с координатами (I, J) является суммой всех лучевых сумм, которые проходят через этот пиксель. Тем не менее, эта техника восстанавливает исходный объект не точно, детали размыты или окружены гало (Рисунок 11). Эти искажения возникают из-за того, что реконструкция претерпевает свертку с широкой ФРТ, которая имеет спад 1/r в 2D и $1/r^2$ в 3D-пространстве:

(8а) $$\rho_{rec}(\vec{r}) = \rho_{orig}(\vec{r}) \otimes \frac{1}{r}$$ в двумерном пространстве

(8б) $$\rho_{rec}(\vec{r}) = \rho_{orig}(\vec{r}) \otimes \frac{1}{r^2}$$ в трехмерном пространстве

где $\otimes$ является оператором свертки и $\vec{r}$ является вектором в реальном пространстве (Frank, 2006; Herman, 1981).

Фильтрованное обратное проецирование или методы свертки.

Фильтрованное обратное проецирование представляет собой

модифицированную версию алгоритма обратного проецирования, который корректирует размытость, внесенную функцией ФРТ (Рисунок 11). Операция может быть выполнена в реальном или Фурье-пространстве. В Фурье-пространстве коррекция достигается за счет применения фильтра, соответствующего функции обратной ФРТ. Для 1/r эта функция пропорциональна пространственной частоте и называется рамповым фильтром (Orlova and Saibil, 2011).

Различные фильтры могут быть использованы и в реальном пространстве. В некоторых программных пакетах фильтрация выполняется в 3D-пространстве на реконструкции, полученной путем обратного проецирования.(Harauz and Van Heel, 1986; Herman, 1981; Radermacher, 1988)

3.9.2 Методы реконструкции в пространстве Фурье

Фурье-инверсия.

Методы Фурье, используемые в ПЭМ макромолекул, очень близки к используемым в рентгеновской или электронной кристаллографии, где данные собираются для заполнения Фурье-пространства так, что обратное преобразование Фурье дает 3D-карты объекта в реальном пространстве (Bracewell, 1956). В анализе отдельных частиц метод Фурье-инверсии основан на теореме о том, что трансформанта Фурье проекции объекта соответствует центральному срезу трехмерной Фурье-трансформанты этого объекта (теорема о центральном сечении). Фурье-трансформанты изображений отдельных частиц дают множество центральных срезов в соответствующих направлениях. Эти срезы являются частью 3D объекта в пространстве Фурье, но информация является неполной и должна быть восстановлена путем интерполяции между секциями. Обратное преобразование воспроизводит распределение электронной плотности в объекте. Методы Фурье-инверсии были первыми использованными для 3D реконструкции (Crowther et al., 1970; DeRosier and Klug, 1968).

Реконструкция по Фурье-Бесселю.

Модифицированная версия подхода Фурье широко использовалась для анализа комплексов со спиральной или икосаэдрической симметрией.

Преимущество спиральных или икосаэдрических частиц заключается в их высокой симметрии. Это означает, что каждое изображение эквивалентно многим связанным симметрией проекциям. Количество связанных проекций зависит от симметрии комплекса. Таким образом, для спиральной симметрии число эквивалентных видов определяется числом частиц на период и длиной спирали. В идеальной ситуации, единственное изображение спирали обеспечивает достаточно проекций для получения 3D реконструкции (Amos, 1975; Crowther, 1971; DeRosier and Moore, 1970).

Если молекулярный комплекс имеет вращательную или спиральную симметрию, распределение его плотности удобно описывать в цилиндрических полярных координатах. В этом случае преобразование Фурье объекта может быть выражено, как Фурье-Бессель преобразование. Трехмерная трансформанта Фурье спральной структуры представляет собой набор Z-плоскостей (перпендикулярных оси спирали) каждая из которых содержит концентрические кольца различных радиусов (Crowther, 1971). ПЭМ изображения спиральной структуры дают информацию об ограниченном наборе амплитуд и фаз вдоль этих колец из-за ограниченного числа проекций. Однако, используя данные о симметрии спирали можно восполнить данные о фазах и амплитудах на всем протяжнении описанных колец, которые и определяют 3D Фурье-трансформанту комплекса. Как только информация о 3D Фурье-трансформанте восстановлена, может быть выполнено обратное преобразование для получения 3D реконструкции (Crowther, 1971).

Эти методы остаются актуальными в связи с большим числом спиральных полимеров среди биологических объектов. К сожалению, на практике большинство спиральных комплексов являются гибкими и искаженными, что ограничивает применение методов Фурье-Бесселя. Изначально для преодоления этой проблемы изогнутые спирали выпрямляли (Beroukhim and Unwin, 1997; Carragher et al., 1996), но более эффективное решение было предложено позже. Изображение спирального объекта делится на короткие, перекрывающиеся сегменты, которые выравнивают, как отдельные изображения, относительно эталонных проекций, рассчитанных с модели, такие выровненные сегменты далее

исаользуют для реконструкции (Clare and Orlova, 2010).

В подходе, разработанном Эгельманом (Egelman, 2000), параметры спирали и качество реконструкции оцениваются путем минимизации различия между связанными симметрией элементами в реконструкции. Для различных подъемов спирали и углов поворота между соседними субъединицами считаются реконструкции. Лучшие значения используются для создания моделей, которые применяются для дальнейших итераций процедуры сопоставления проекций.

3.9.3 Распределение проекций

Качество реконструкции зависит не только от качества изображений и реализации алгоритмов, но и от распределения проекций по углам. Методы реконструкции предполагают, что существует бесконечное число проекций, которые равномерно распределены по сфере Эйлера. Сферой Эйлера называют мнимую сферу, начало координат которой находится в центре масс объекта. Пересечение направления проекции со сферой определяет точку на её поверхности, которая обозначает ориентацию проекции (Рисунок 12а).

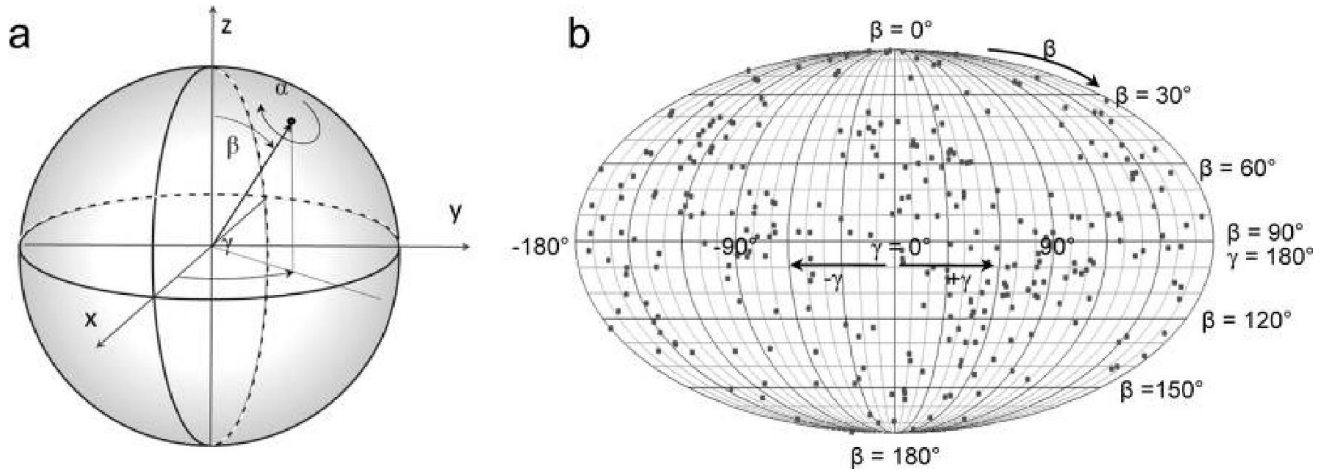


Рисунок 12. Сфера Эйлера и распределение проекций (Orlova and Saibil, 2011).

Распределение этих точек показывает распределение углов проекций исследуемого объекта (Рисунок 12б). Орлов (Орлов, 1975а) показал, что реконструкция объекта может быть получена с изотропным разрешением, если множество проекций распределяется вдоль любой кривой, соединяющей противоположные полюсы сферы Эйлера. Тем не менее, это условие предполагает

бесконечное число проекций, расположенных вдоль таких кривых. К сожалению, даже при применении криомикроскопии биомолекулярные комплексы часто имеют какую-то одну предпочтительную ориентацию, так что проекции оказываются распределены неравномерно в пространстве и условие, необходимое для полной реконструкции, не выполняется. В этом случае, разрешение становится анизотропным из-за отсутствия информации в определенных направлениях (Boisset et al., 1998).

3.10 Оценка качества реконструкции

Убедиться в том, что реконструкция является правильной, а затем оценить ее разрешение - не простая задача. Следует обратить внимание, что разрешение может быть анизотропным, и что оно может варьироваться между различными частями структуры. Например, жесткие части будут более точно представлены, чем гибкие, и периферийные регионы будут сильнее подвержены влиянию ошибок, чем центральные.

Для оценки надежности карт был предложен подход, несколько напоминающий свободный R-фактор в кристаллографии. Идея состоит в том, чтоб собрать несколько наклоненных пар с относительно малым наклоном (10-30°) и определить ориентацию частиц методом сравнения репроекций (Rosenthal and Henderson, 2003).

В случаях, когда карта позволяет различить особенности вторичной структуры, её правильность может быть проверена вписыванием известных атомных моделей структуры.

3.10.1 Измерение разрешения

У ПЭМ и томографических данных сигнал и шум распределены по всему спектру, и не существует простого способа оценить разрешение. Наиболее широко используемым методом определения разрешения реконструкций из отдельных частиц — объемная корреляция Фурье (FSC) в 3D (van Heel and Schatz, 2005; Saxton and Baumeister, 1982). Набор данных разбивают на два эквивалентных поднабора, как правило, разделяют нечетные и четные изображения. Из двух этих

поднаборов рассчитывают отдельные реконструкции. Их 3D Фурье-трансформанты (F1, F2) сравнивают по кросс-корреляции. Средние корреляции для каждого радиуса строются в виде графика, который изменяется от 1 при низком разрешении до 0 при высоком разрешении.

Пространственную частоту на уровне корреляции 0,5 обычно принимают за оценку разрешения, но есть и другие критерии, например, сравнение с уровнем шума, или критерий 0,143, который был предложен на основе рассчета ОСШ (van Heel and Schatz, 2005).

3.10.2. Температурный фактор и изменение масштаба амплитуд

Успехи в области ПЭМ анализа макромолекул означают, что крио-ПЭМ структуры все больше приближаются к субнанометровому разрешению, выявляя не только доменную организацию молекулярных комплексов, но и их вторичных структурных элементов. Поэтому важно, чтобы крио-ПЭМ карты показывали детали, необходимые для интерпретации этих структурных элементов. Методы выравнивания, усреднения и реконструкции обычно приводят к усилению информации в диапазоне низкого разрешения. Следовательно, мелкие детали на карте скрыты. Потеря деталей может быть описана с помощью температурного фактора, или B-фактора, который представляет потерю сигнала с ростом разрешения, как размытие атомов из-за тепловых колебаний. Есть стандартная процедура, позволяющая сделать высокочастотные детали более заметными путем масштабирования экспериментальной карты или путем наложения фильтра для уменьшения вклада низкочастотных компонент (Orlova and Saibil, 2011).

3.10.3 Источники неоднородности.

Разрешение высокомолекулярных структур, полученных в крио-ПЭМ, чаще бывает ограничено конформационными изменениями структуры, чем проблемами микроскопии или обработки изображений. Изображения биологического комплекса в растворе отражают различные состояния этого комплекса, зафиксированные во время заморозки (Orlova and Saibil, 2010). Гетерогенность образца может возникнуть по нескольким причинам: (I) частичное связывание

лиганда молекулярным комплексом (Halic et al., 2004), (II) динамика структуры, отражающая несколько различных реакционных состояний или постепенное преобразование через промежуточные состояния (Heymann et al., 2003; Klaholz et al., 2004) и (III) несколько олигомерных состояний с различной симметрией и/или размером (White et al., 2006). В идеале, различные конформации должны быть стабилизированы и разделены биохимически перед электронно-микроскопическим исследованием (Valle et al., 2003), но во многих случаях это не представляется возможным.

3.10.4 Методы компьютерной сортировки смешанных структур

Для компьютерного разделения смешанных структур были разработаны три основных подхода (Orlova and Saibil, 2010):

В первой группе распознавание неоднородностей и начальная сортировка делается только в ходе 2D анализа. Это "априорная" группа методов, основанная в первую очередь на многомерном статистическом анализе (MCA) деталей в 2D изображениях для выявления структурных вариаций. Изображения сортируются в соответствии с их основными изменениями, которые отражены в собственных векторах низкого порядка. Было показано, что такая техника позволяет разделить вариации в размере до 5% от общего размера (White et al., 2006).

Для второй категории методов сортировки необходима начальная 3D-карта для разделения изображений на подмножества, содержащих изображения молекулярного комплекса в аналогичной ориентации. Затем делается анализ гетерогенности в 2D для каждого подмножества. Это сводит к минимуму ориентационные различия внутри классов и способствует более точному распознаванию конформационных изменений (Klaholz et al., 2004).

Третья категория основана на апостериорном анализе 3D-реконструкций. Создается множество 3D-карт для анализа отклонений. Самые представленные их них затем используются в качестве исходных моделей для уточнения. В так называемой «bootstap» технике (Penczek et al., 2006), 3D карты рассчитывают из случайно выбранных подмножеств изображений; пространственная ориентация изображений определяется методом сопоставления проекций с начальной 3D-

картой. Оценка различий в полученных 3D-картах и локализация высоко-вариативных регионов позволяет оценить ковариантность в популяции и классифицировать 3D-карты. Еще одни подход заключается в классификации 3D-карт на основе максимального правдоподобия, которая идентифицирует конформационной изменчивость в картах, а затем отделяет различные молекулярные состояния (Scheres et al., 2007).

3.11 Интерпретация 3D карты

Встраивание известных атомных структур в ПЭМ карту комплекса является основным инструментом для интерпретации (Jensen, 2010). Большинство карт, полученных из анализа отдельных макромолекул, имеют разрешение в диапазоне 7-30 Å. В этом диапазоне разрешений невозможно построить атомную структуру и не всегда возможно однозначно определить позиции отдельных доменов. В диапазоне низких разрешений (20-30 Å) большие домены могут быть узнаваемы по форме. В диапазоне разрешений 6-9Å можно различить α-спирали вторичной структуры. Отдельные β-слои видны при разрешении 4,5 Å и выше. Боковые цепи подробно видны только у исключительно высоко разрешеных структур. Но вписывание атомных структур в более низко разрешенные карты электронной плотности часто дает хорошие результаты.

Основной принцип вписывания - корреляция двух плотностей. Плотностная карта рассчитывается по атомной структуре при том же разрешении, что и ПЭМ карта, и производится поиск кросс-корреляций в 3D, который используется для выравнивания двух плотностей. Поиск может быть сделан в реальном или обратном пространстве. Для маленьких объектов, вписываемых в большую карту, был разработан метод локальной корреляции (Roseman, 2000), что упрощает вписывание. Даже при невысоком разрешении, если домен имеет асимметричную форму, можно вписать в него атомную структуру с точностью до нескольких ангстрем.

4. Применение электронной микроскопии макромолекул в биологии

Трехмерный электронно-микроскопический анализ - важная часть

структурных исследований в области молекулярной и клеточной биологии. 3D-информация помогает понять работу макромолекулярных машин в клетках и тканях. ПЭМ структура, полученная с достаточным разрешением, может быть в дальнейшем использована для прогнозирования мутаций или потенциальных сайтов для кросс-линкинга, и эти прогнозы могут быть проверены в молекулярно-биологических экспериментах.

Для получения псевдоатомных моделей макромолекулярных комплексов кристаллические структуры отдельных доменов встраивают в ПЭМ карты. В последние годы прогресс в области аппаратного и программного обеспечения позволил выявить механизмы работы различных макромолекулярных машин путем визуализации различных функциональных состояний (Orlova and Saibil, 2011). Международная база данных карт электронной плотности (EMDatabank.org), связанная с PDB, в настоящее время содержит более 1000 структур и постоянно расширяется (Orlova and Saibil, 2011).

4.1 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры вирусов с различной симметрией.

Для получения ПЭМ реконструкций с высоким разрешением, необходимо большое количество различных проекций одной молекулы (Орлов, 1975б). Поэтому карты электронной плотности с субатомным разрешением проще всего рассчитать для объектов, обладающих высокой симметрией (икосаэдрической или спиральной) (Sachse et al., 2010, Clare and Orlova, 2010, Chiu et al., 1977). У таких объектов из каждой проекции можно получить несколько, связанных симметрией, что значительно повышает количество проекций, используемых для реконструкции.

4.2 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры хвостатых бактериофагов

4.2.1 Структура фага T4

Наиболее полная структурная информация на сегодняшний день имеется о фаге T4, дцДНК-содержащем вирусе, относящемся к семейству *Myoviridae* и

инфицирующем *E.coli*. Вирион T4 состоит из капсида и сокращаемого хвоста, который оканчивается базальной пластинкой с 6 длинными фибриллами. По данным крио-микроскопии капсид T4 имеет форму вытянутого икосаэдра (Рисунок 13 A) длиной 1200 Å и шириной 860 Å (Fokine et al., 2004). Основной белок капсида, gp23 (48.7 кДа, 930 копий в капсиде), формирует гексагональную решетку с триангуляционными числами (Caspar and Klug, 1962) T end = 13 для концов и T mid = 20 для середины (Fokine et al., 2004). Расстояние между соседними гексомерами gp23 составляет ~140 Å. Одиннадцать вершин капсида занимают пентамеры специального вершинного белка gp24 (47.2 кДа), а двенадцатую вершину занимает додекамер gp20, который является портальным белком и служит для прикрепления хвоста и выхода ДНК (Driedonks et al., 1981).

Основными белками каписида T4 являются gp23, gp24, gp20, Hoc и Soc и для большинства их них известны кристаллические структуры (Fokine et al., 2005a). Gp23 образует стенку капсида, gp24 расположен на вершинах, gp20 - портальный белок. Считается, что белок, занимающий вершины икосаэдра, gp24, является более поздним приобретением в ходе эволюции (Rao and Black, 2010). Hoc (highly antigenic outer capsid protein) имеет форму гантели и располагается в центре каждого гексона, образованного gp23, и Soc (small outer capsid protein) имеет палочкообразную форму и встраивается между гексонами (Рисунок 13). Оба эти белка необязательны и прикрепляются к капсиду после его сборки (Ishii and Yanagida, 1977; Ishii et al., 1978). Отсутствие этих белков не сказывается на воспроизводстве фагов и их способности инфецировать. Soc взаимодействует с 2 соседними молекулами gp24, склеивая соседние гексоны. Прикрепленные Soc тримеризуются, образуя жесткий каркас, укрепляющий структуру капсида. Hoc не вносит изменений в стабильность каписида, однако, его Ig-подобный домен расположенный на поверхности может взаимодействовать с клеточной поверхностью, что способствует выживанию фага (Rao and Black, 2010).

Упакованная ДНК T4 имеет много общих черт с ДНК других хвостатых фагов: ДНК конденсирована до плотности ~500 мг/мл, расстояние между тяжами ДНК составляет 2.5 нм. ДНК T4 упакована в ориентации, параллельной

продольной оси капсида вокруг внутреннего белкового тела (Cerritelli et al., 1997). Один из внутренних белков T4, IPI8, впрыскивается в клетку вместе с ДНК для ее защиты от эндонуклеаз *E. coli* (Bair and Black, 2007; Bair et al., 2007). Gp2 – белок, защищающий концы фаговой ДНК от эндонуклеаз клетки-хозяина также находится внутри капсида (Wang et al., 2000).

ДНК внутри капсида преимущественно имеет B-форму (Yu and Schaefer, 2008). Отрицательные заряды фосфатных групп уравновешиваются аминами, полиаминами, одно- и двувалентными катионами. Среди всех положительно заряженных аминокислот только лизин, находящийся в составе внутренних белков, контактирует с фосфорами ДНК, что позволяет предполагать, что внутренние белки образуют с ДНК специальные структуры (Rao and Black, 2010).

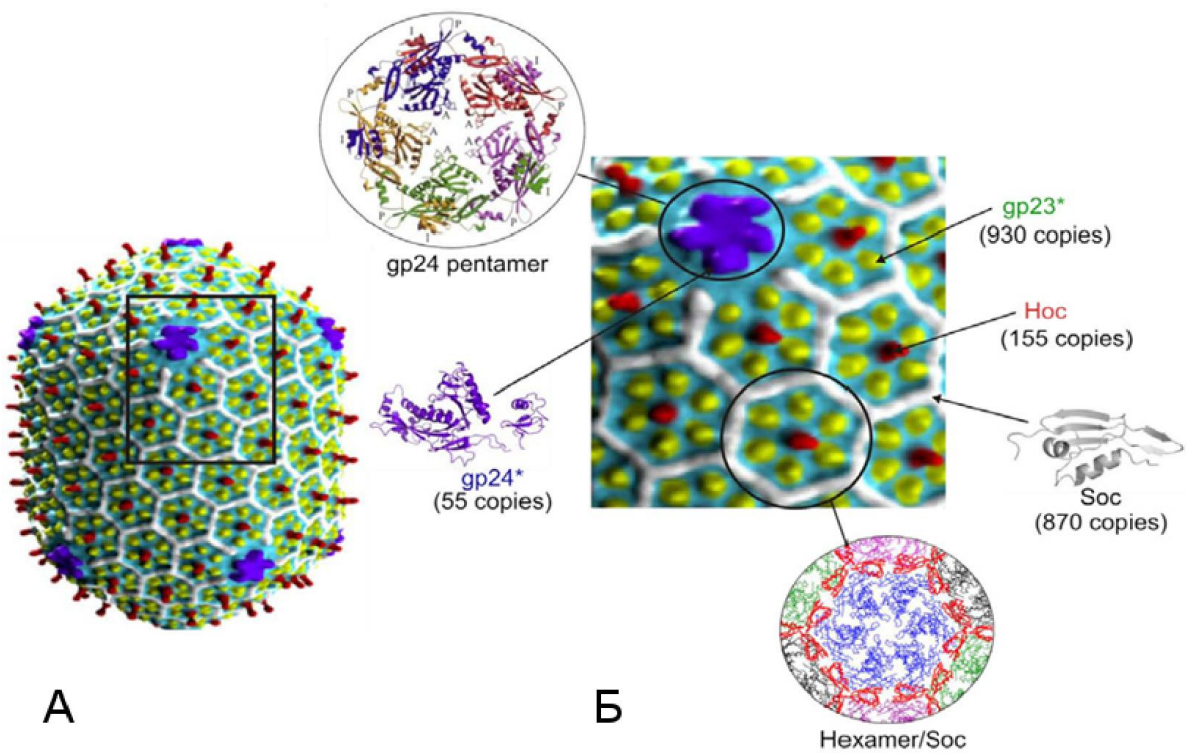


Рисунок 13. Структура капсила бактериофага T4.d. А) Структура T4 по данным крио-ЭМ (Fokine et al., 2005a); Б) увеличенный фрагмент поверхности: gp23 (показан желтым), gp24 (показан синим), Hoc (красный) and Soc (белый) (Fokine et al., 2004).

4.2.2 Структура капсида фага phiKZ

Структурная информация о гигантских phiKZ-подобных фагах до недавнего времени была ограничена результатами, полученными с негативной окраской

частиц (Hertveldt et al., 2005). Только структура бактериофага phiKZ была изучена с помощью крио-ПЭМ (Fokine et al., 2005b, 2007). 3D-структуры двух основных компонентов фага phiKZ, капсида и хвоста были определены разрешением 18 Å и 28 Å, соответственно. Вирион phiKZ состоит из икосаэдрического капсида, 145 нм в диаметре и сократимого хвоста длиной 200 нм (Рисунок 14). Спиральные параметры сократимой части хвоста схожи с таковыми у фага T4 (Fokine et al., 2007).

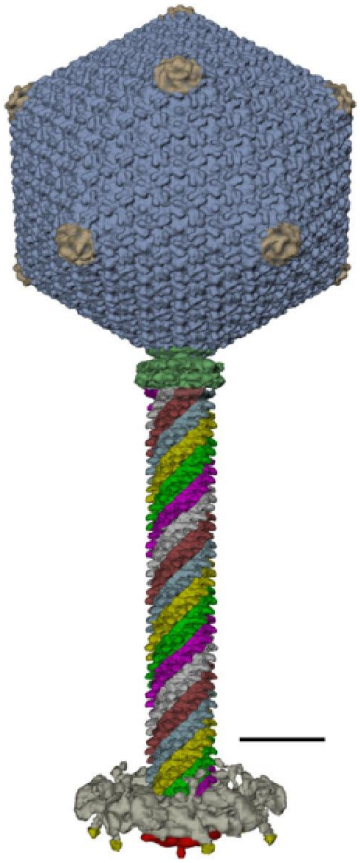


Рисунок 14. Трехмерная структура бакериофага phiKZ (Fokine et al., 2007).

Внешне капсид phiKZ имеет икосаэдрическую симметрию, и его размеры составляют 1455Å, 1235Å и 1260Å вдоль осей 5-го, 3-го и 2-го порядков, соответственно. Основной каписдный белок, gp120, образует гексогональную решетку с триангуляционным числом T=27 (h=3, k=3) (Caspar and Klug, 1962) (Рисунок 15 (a)). Форма капсомеров также сходна с бактериофагом T4 (Fokine et al., 2004, 2005a).

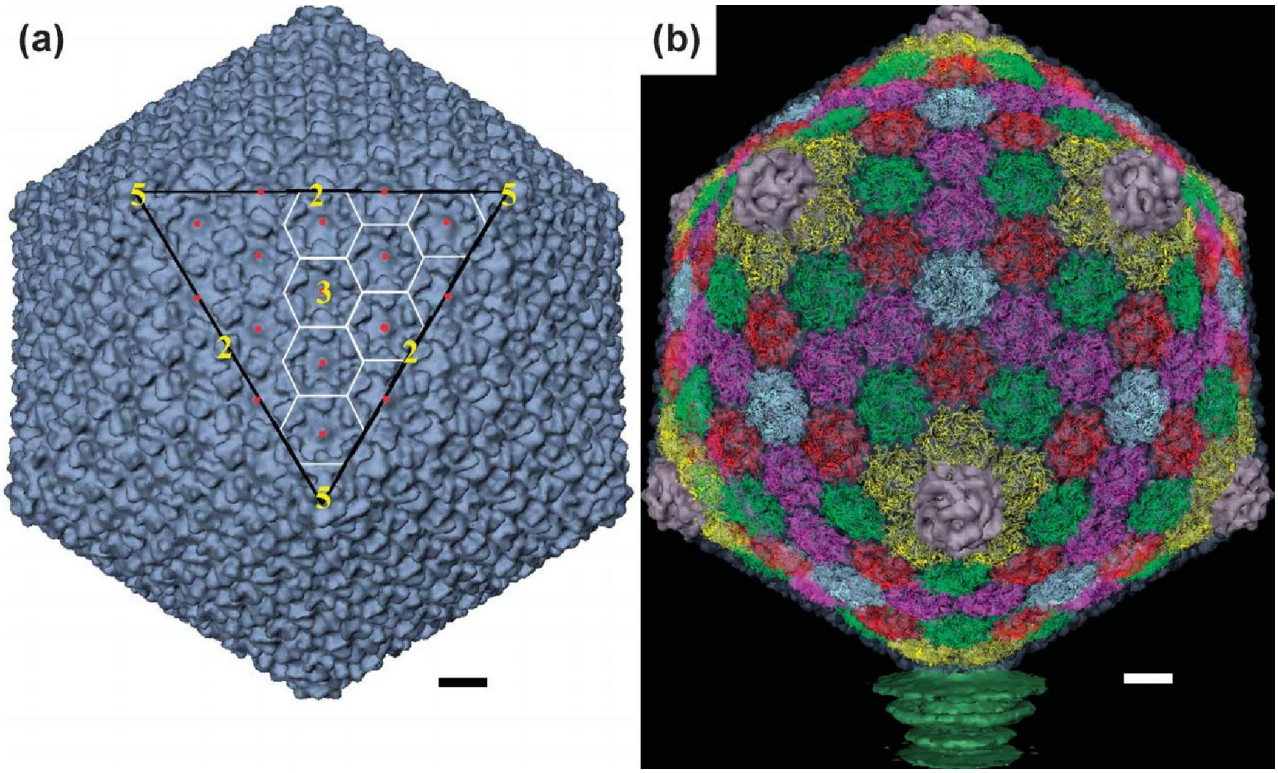


Рисунок 15. Структура капсида phiKZ. a) Поверхность реконстукции капсида phiKZ с разрешением 18 Å и применением икосэдрической симметрии. Черными линиями соединены оси 5 порядка, белым отмечены краницы капсомеров. b) Карта электронной плотности с вписанными кристаллическими структурами капсомеров. Маштабный отрезок – 100Å. (Fokine et al., 2005a)

Расстояние между центрами гексамеров состявляет 145 Å, а между центрами пентамера и ближайшего гексамера – 130 Å (Рисунок 15). Общее количество мономеров gp120 в капсиде 1560. 12 пентамеров, расположенных в вершинах, представлены другими белками. 11 вершин образованы вершинными белками (Рисунок 14 и 15) (Fokine et al., 2005b). Эти пентамерные белки существенно отличатся формой от основных капсидных белков gp120 (Рисунок 15). Двенадцатая вершина занята портальным комплексом, к которому присоединяется хвост. На оси портального комплекса также находится коннектор - часть механизма, участвующего в упаковке ДНК.

PhiKZ и другие хвостатые фаги, видимо, имеют общего предка, о чем свидетельствует визуальная схожесть при наложении капсомеров фагов phiKZ и HK97 (Fokine et al., 2005a).

Основные белки капсида phiKZ имеют на периферии выросты, которые, могут соответствовать E-петле у фага HK97 и сходным петлям у фагов T4 (Fokine et al., 2005a) и φ29 (Morais et al., 2003). Этот вырост у phiKZ образует взаимодействие между соседними капсомерами (Рисунок 16a, отмечены розовым) и может соответствовать по своим функциям небольшому (100 КДа) внешнему капсидному белку T4 Soc (Fokine et al., 2005b).

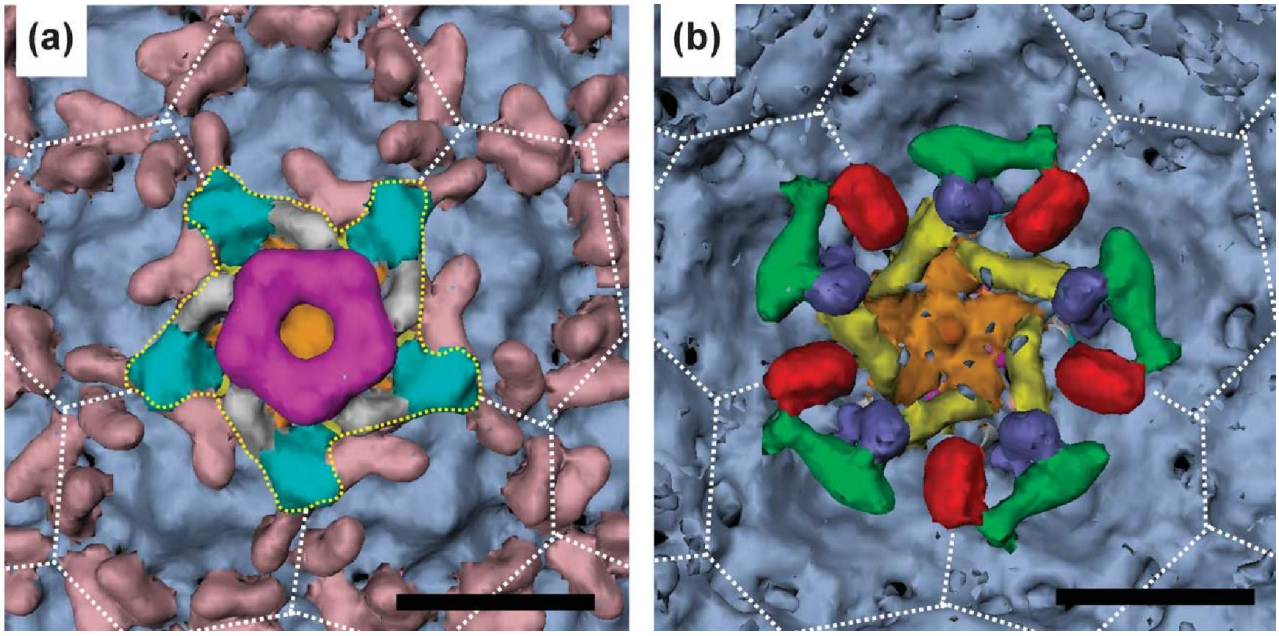


Рисунок 16. Реконструкция вершинного белка на оси пятого порядка, вид снаружи (а) и изнутри (в). а) Вид снаружи, границы вершинного белка отмечены желтыми точками, а границы прилегающих капсомеров – белыми. в) Вид изнутри. Маштабный отрезок – 100A (Fokine et al., 2005a).

Внутри капсида phiKZ с помощью криоэлектронной микроскопии можно наблюдать как минимум 14 концентрических слоев ДНК. Внешние слои находятся друг от друга на расстоянии ~24 Å, но ближе к центру располагаются плотнее. Такие слои являются следствием гексагональной упаковки нитей ДНК, находящихся на расстоянии ~28 Å друг от друга (Рисунок 17 (а)). (Fokine et al., 2007; Hud and Downing, 2001).

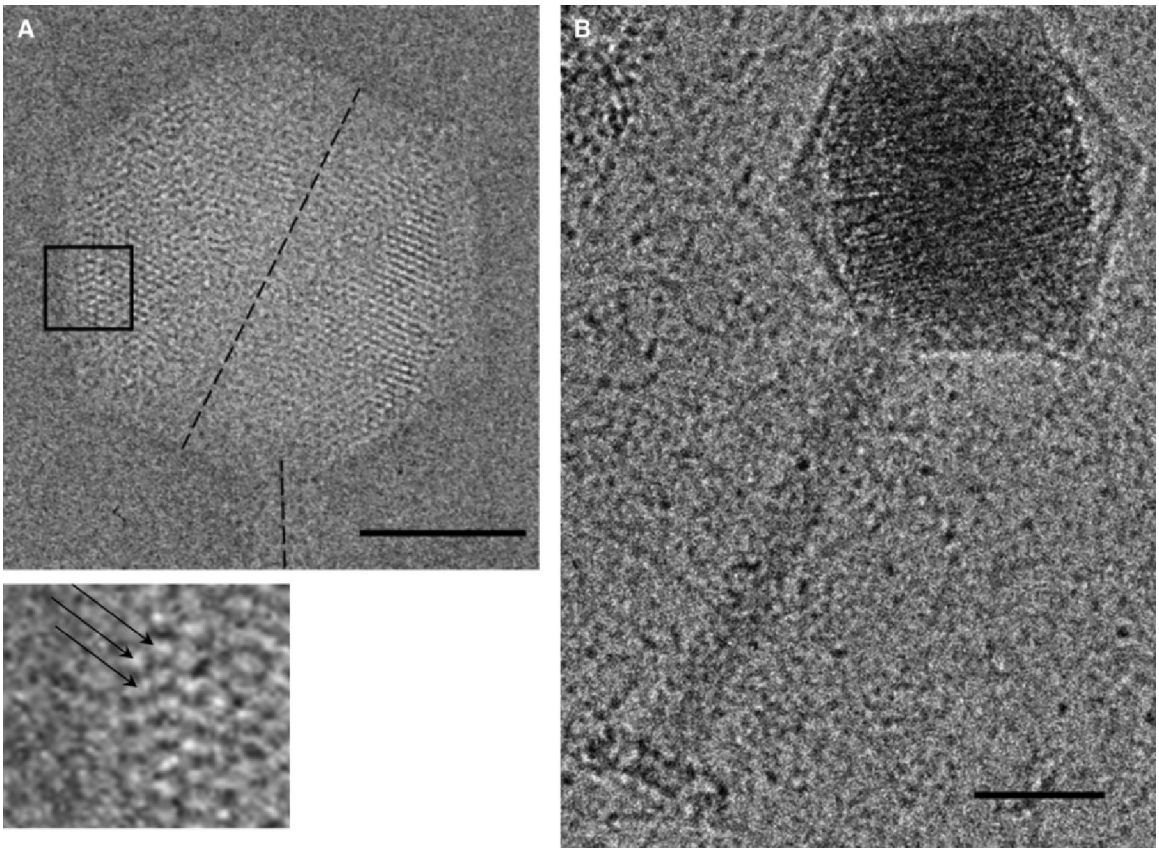


Рисунок 17. Крио-электронные микрофотографии phiKZ. а) изображение показывает гексагональную укладку ДНК (изображение инвертировано, более плотные участки отображены более светлым цветом). На врезке стрелками показаны проекции отдельных нитей двуцепочечной ДНК. в) Изображение phiKZ с частично заполненным ДНК капсидом. Масштабный отрезок – 50 нм. (Fokine et al., 2007)

4.2.2 Структура хвоста phiKZ.

Капсид соединяется с хвостом посредством шеи. У phiKZ в этом районе находятся два диска радиусом ~160 Å (Fokine et al., 2007).

Хвост phiKZ состоит из трубки и окружающего ее сократимого чехла (Рисунок 18). Чехол состоит из ~44 колец. Каждое кольцо состоит из 6 субъединиц gp29, имеет толщину 36,2 Å и повернуто относительно соседнего кольца на 22°. Внешне субъединицы gp29 напоминают gp18 из T4, однако последовательности этих белков различны (Fokine et al., 2007).

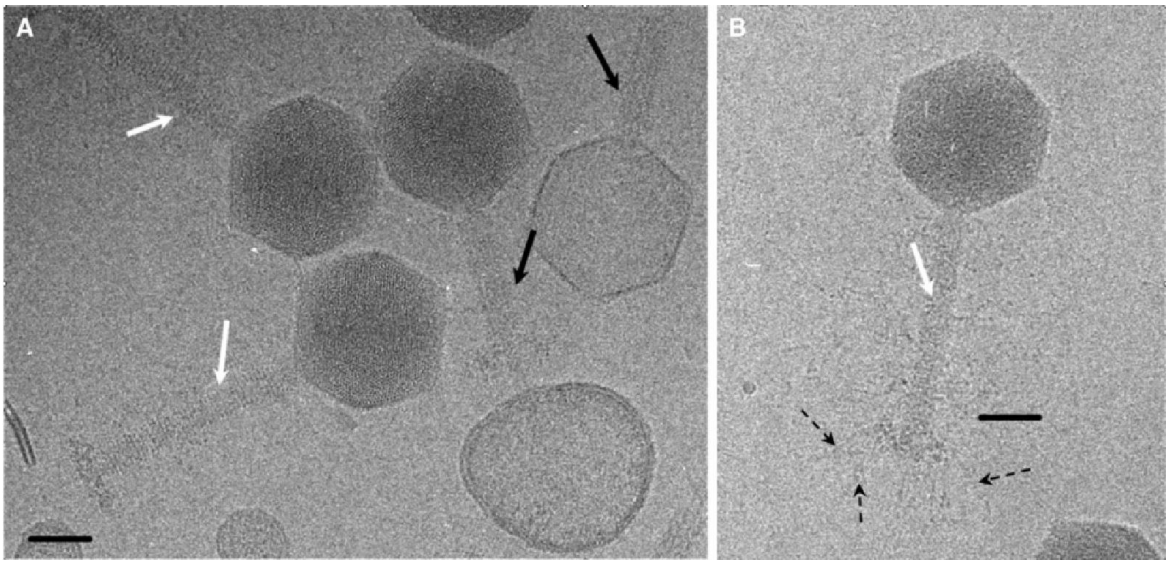


Рисунок 18. Крио-электронные микрофотографии phiKZ. (A) Частицы с несокращенными и сокращенными хвостами отмечены белыми и черными стрелками, соответственно. На Рисунке (B) пунктирными штрихами отмечены фибриллы. Масштабный отрезок – 50 нм. (Fokine et al., 2007)

В несокращенном состоянии чехол хвоста имеет длину ~1600 Å, а после сокращения ~800 Å. Заражение бактерий фагом phiKZ начинается с прикрепления расположенных на хвосте фибрилл к внешней мембране бактерии. Это прикрепление вызывает конформационное изменение базальной пластинки, вызывающее сокращение хвостового чехла. Сокращающийся чехол проталкивает хвостовую трубку сквозь клеточную стенку и межмембранный слой пептидогликанов, что позволяет доставить ДНК фага внутрь клетки (Fokine et al., 2007). Хвостовая трубка имеет внутренний и внешний диаметры 45 и 110 Å, соответственно.

Базальная пластинка (Рисунок 19) имеет плоскую шестиугольную форму, диаметр ~800A и толщину 350 Å, но у вирусов с сокращенными хвостами базальные пластинки шире (Рисунок 18a). Форма и размер базальной пластинки phiKZ значительно отличается от таковой у T4, у которого она в несокращенном состоянии имеет форму купола (Leiman et al., 2004), что указывает на то, что разные виды хозяев привели к дивергенции механизмов инфекции. Тем не менее, у phiKZ, как и у T4 посередине базальной пластинки присутствует иглообразная

структура для прокалывания клеток. Это структура, вероятно, состоит из gp181 и, возможно, имеет трехлучевую симметрию (Fokine et al., 2007).

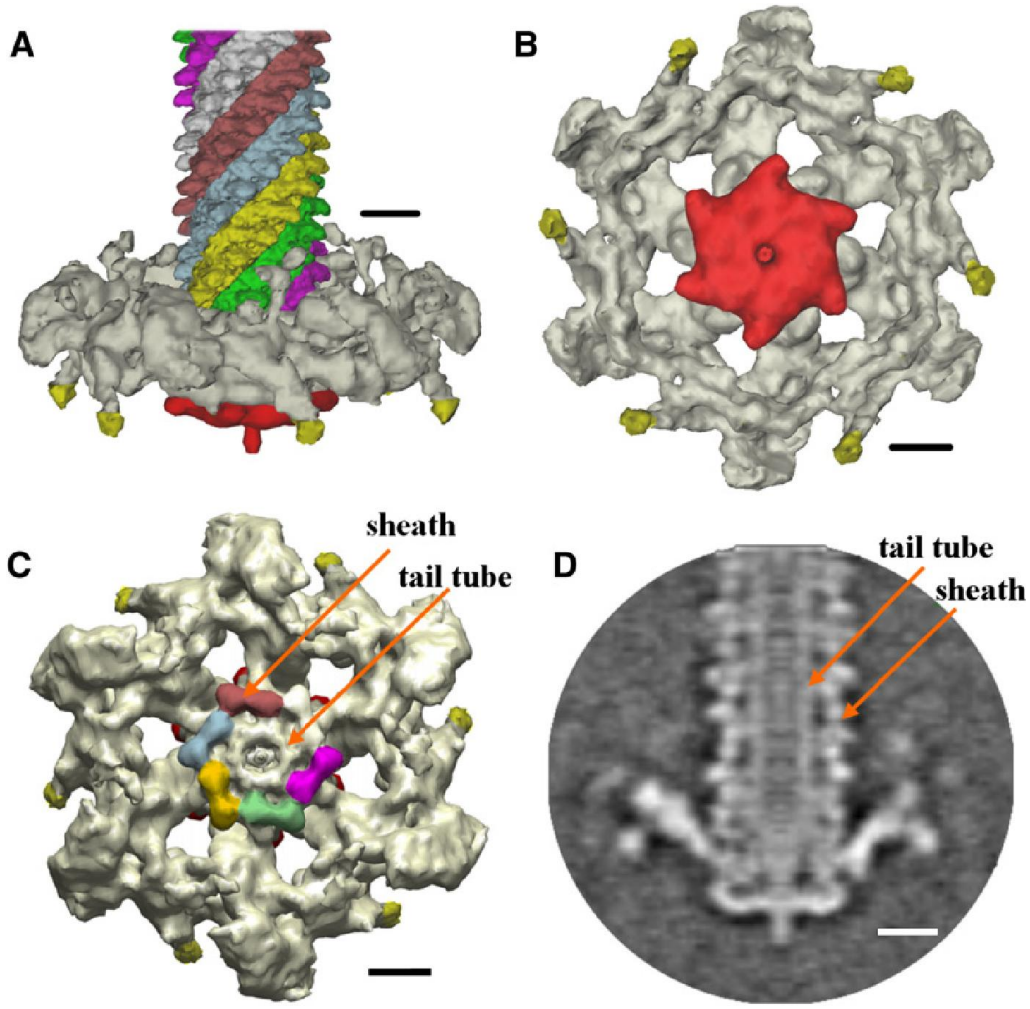


Рисунок 19. Реконструкция хвоста бактериофага phiKZ в районе базальной пластинки. A) Вид сбоку. B) Вид снизу. C) Вид сверху на плоскость базальной пластинки. D) Центральный срез. Белки чехла огранизованы в шестизаходную спираль. Базальная пластинка окрашена в серый. Механизм прокалывания клетки окрашен красным. Места прикрепления фибрилл – желтым. Масштабный отрезок – 10 нм. (Fokine et al., 2007)

У phiKZ, как и у T4 имеются фибриллы ~500 Å длиной, прикрепленные к базальной пластинке (Рисунок 18в) (Fokine et al., 2007). Заражение T4 начинается с прикрепления длинных нитей к внешней мембране клетки и сканирования вирусом поверхности клетки. Когда нужный сайт найден, происходит транформация базальной пластинки из куполобразной формы в звездчатую (Leiman et al., 2004), короткие нити необратимо прикрепляются к поверхности

клетки, хвостовой чехол сокращается и геном впрыскивается в клетку. Шесть нитей прикрепленных к базальной пластинке у phiKZ эквивалентны коротким нитям у T4 и играют главную роль в присоединении к клетке. Наличие длинных фибрилл у phiKZ не установлено (Fokine et al., 2007).

4.2.3 Изучение структуры внутреннего тела

Предполагается, что ДНК в капсиде phiKZ намотана на внутреннее белковое тело (Fokine et al.; 2007, Krylov et al., 1984; Matsko et al., 2001). Оно может служить для организации геномной ДНК внутри капсида гигантских фагов (Thomas et al., 2012). Внутреннее тело исчезает из капсида phiKZ после заражения клетки (Krylov et al., 1984), поэтому предполагают, что оно может участвовать в процессе впрыска ДНК. Спиральная структура внутреннего тела была впервые обнаружена после извлечения его из капсида методом замораживания-оттаивания (Крылов с соавт., 1978, Krylov et al 1984). Предполагается, что структура внутреннего тела стабилизируется намотанной на него ДНК, т.к. при разрушении капсида и вымывании ДНК остаются лишь фрагменты внутреннего тела (Matsko et al., 2001).

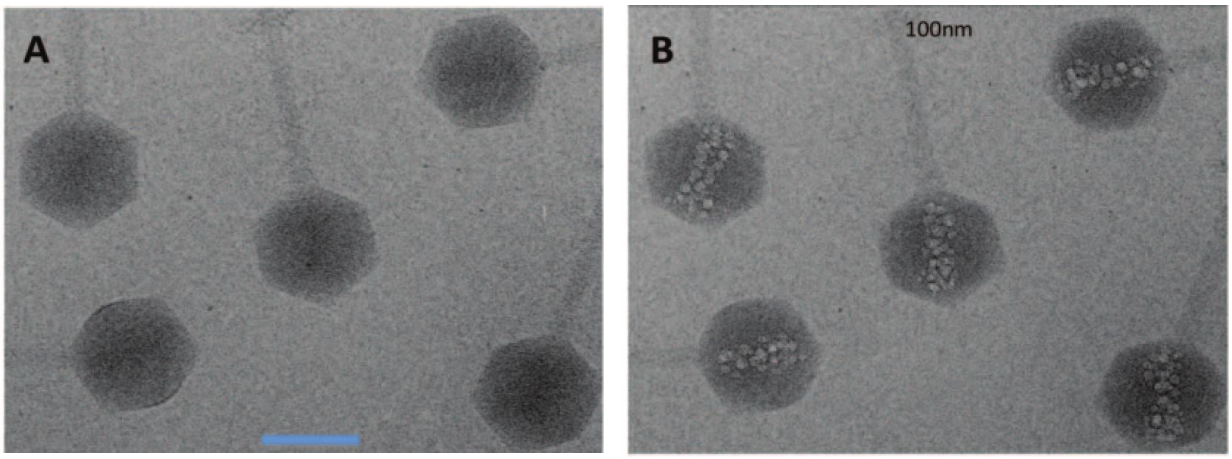


Рисунок 20. Крио-ЭМ изображения бактериофага phiKZ с низкой дозой полученных электронов (A) и с высокой (B) (Wu et al., 2012).

Недавно трехмерная структура внутреннего тела фага phiKZ была определена с помощью криоэлектронной микроскопии методом “bubblegram imaging” (Wu et al., 2012). Этот метод заключается в получении изображений одной и той же вирусной частицы с разными дозами облучения (Рисунок 20).

На изображениях, получивших низкую дозу облучения, внутренее тело не заметно на фоне окружающей его ДНК. На микрофотографиях с большой дозой внутреннее тело начинает “вскипать”, что позволяет определить его размеры и расположение (Рисунок 20б). 3D реконструкция производилась с использованием частиц, снятых с низкой дозой, с использованием параметров, определенных для этих частиц после облучения высокой дозой электронов (Рисунок 21). В результате масса внутреннего тела phiKZ была оценена в 15-20 МДа. Внутреннее тело своими концами закреплено между капсомерами, соседними с противоположными вершинами капсида (Рисунок 21) (Wu et al., 2012).

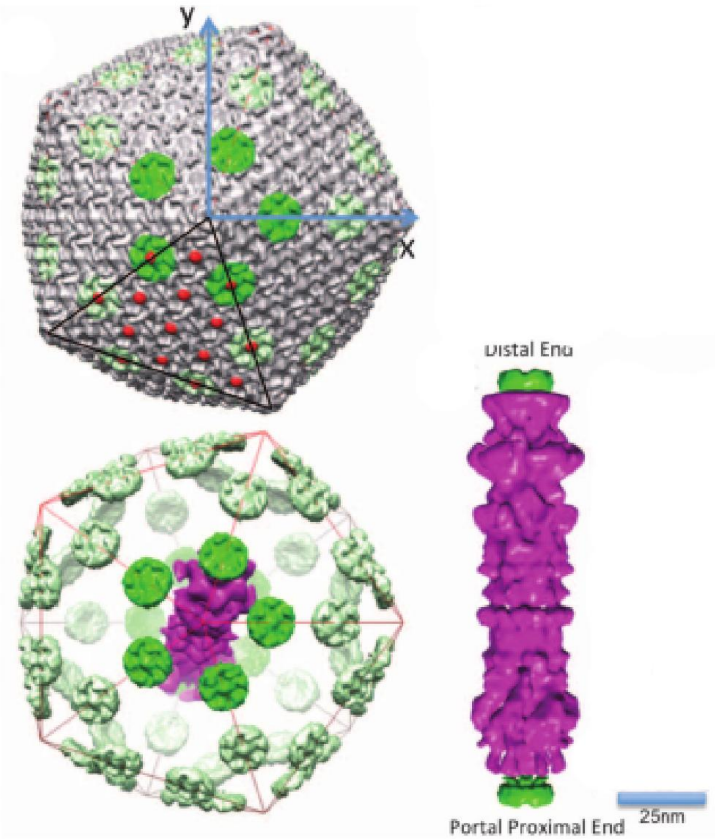


Рисунок 21. Трехмерная реконструкция и расположение внутреннего тела в капсиде phiKZ (Wu et al., 2012)

4.3 Применение крио-электронной микроскопии для изучения структуры спиральных вирусов

4.3.1 Структура вируса табачной мозаики (ВТМ)

Наиболее изученным со структурной точки зрения среди палочкообразных вирусов растений является род *Tobamovirus* и вирус табачной мозаики (ВТМ), в частности. Длина вириона ВТМ - 3000А, диаметр – 180Å, а диаметр центрального канала приблизительно – 40Å. Вирион состоит из РНК и белка оболочки (158 а.к., ~17,500 Да), которые образуют правозакрученную спираль. На 3 оборота спирали приходятся 49 субъединиц БО, и подъем спирали на 1 субъединицу составляет 1,408Å. ВТМ существует в нескольких форма (в виде дисков и в виде спиральной палочки) в зависимости от буфера, pH и ионной силы (Klug, 1999). Эти структурные формы, как предполагается, играют различные роли в развитии вирусной инфекции. Белковые диски были закристаллизованы, и их структура решена (Bhyravbhatla et al., 1998; Bloomer et al., 1978). Спиральную форму вируса изучали с помощью электронной микроскопии (Jeng et al., 1989) и рентгеновского рассеивания на волокнах (Namba et al., 1989). Эксперименты с рентгеновским рассеянием привели к решению структуры с разрешением 2,9Å и построению атомной модели БО в составе спиральной формы. В обеих структурных формах БО в основном состоит из α-спиралей, ориентированных перпендикулярно оси вириона. Для ВТМ было получено с помощью криоэлектронной микроскопии 2 карты электронной плотности с разрешением лучше 5Å (Clare and Orlova, 2010; Sachse et al., 2007 (Рисунок 22)).

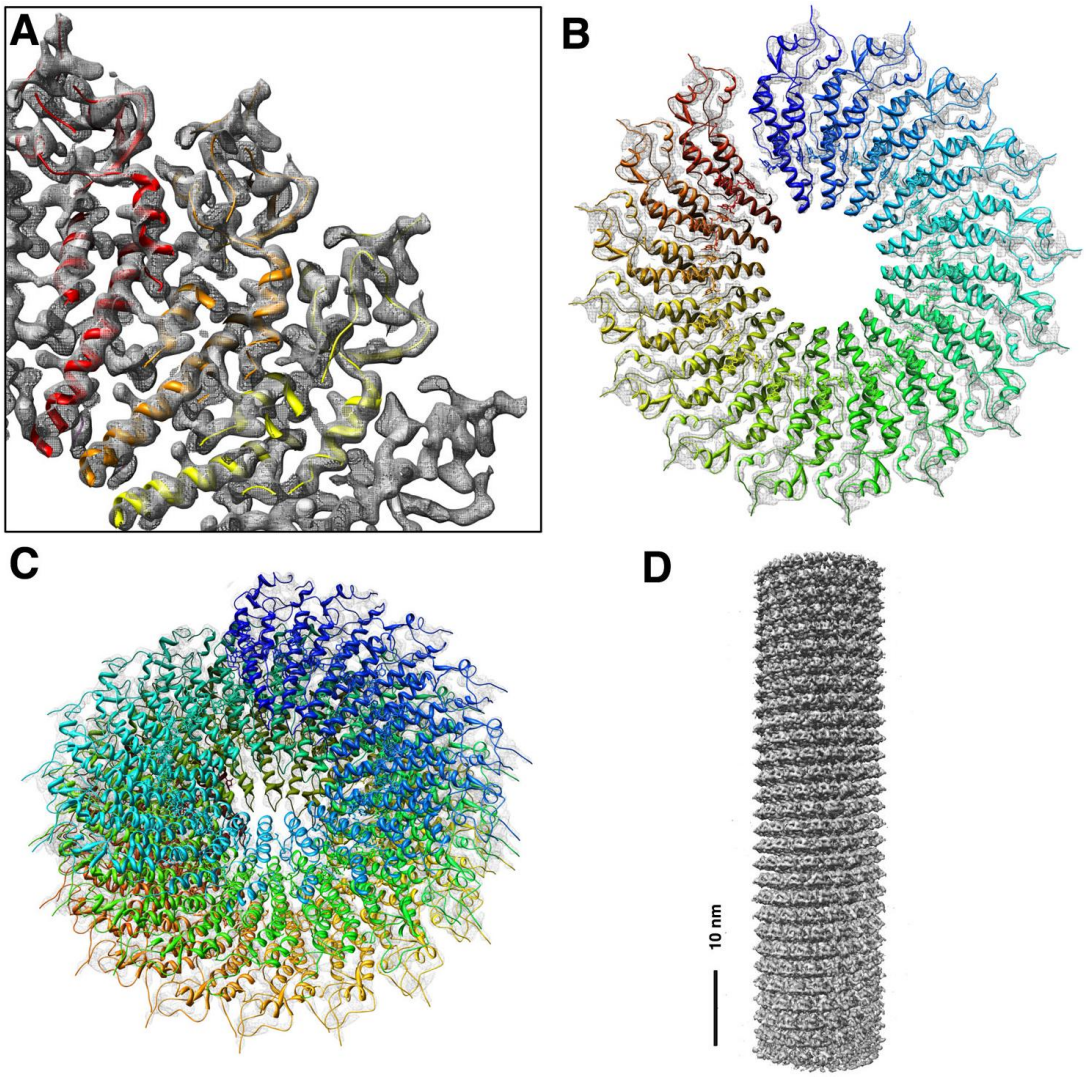


Рисунок 22. Реконструкция ВТМ по данным крио-ЭМ (Sachse et al., 2007)

Полученные с помощью крио-ПЭМ атомные модели (код в PDB – 2OM3 и 2XEA) очень сходны между собой и существенно отличаются от моделей БО ВТМ спиральной формы, полученных методом рентгеноструктурного анализа (Рисунок 23).

Между крио-ПЭМ структурами (PDB ID 2OM3 и 2XEA) существуют лишь незначительные отличия: в петле, выстилающей внутреннюю поверхность вириона и в ориентации боковых цепей некоторых аминокислотных остатков. Это небольшое различие между двумя ПЭМ картами может быть объяснено различными условиями приготовления образцов: ВТМ чувствителен к составу раствора и температуре (Pattanayek

and Stubbs, 1992). Для получения обеих карт был использован буфер с одним pH, но в более поздней работе использовались низкие концентрации KCl и $MgCl_2$, и образец держали при комнатной температуре. А в более ранней работе раствор не содержал солей и хранился при 4 °C. Было показано, что существует небольшая лабильность структуры в ответ на изменение состава внешней среды (Clare and Orlova, 2010).

Рисунок 23. Наложение струтур BTM: зеленая – уточненная структура, полученная на основе крио-ЭМ карты (PDB код 2OM3), синяя: PDB код 2TMV – спиральная структура, полученная по данным рентгеновской диффракции на волокнах , красная: PDB код 1EI7 – дискообразная форма . (Clare and Orlova, 2010)

Различия между крио-ПЭМ структурами и структурами, полученными методом рентгеноструктурного анализа, в основном сосредоточены в области малого радиуса (остатки с 88 по 109). У крио-ПЭМ моделей она более упорядочена и содержит вторичные структуры (Рисунок 23, 24 c,e).

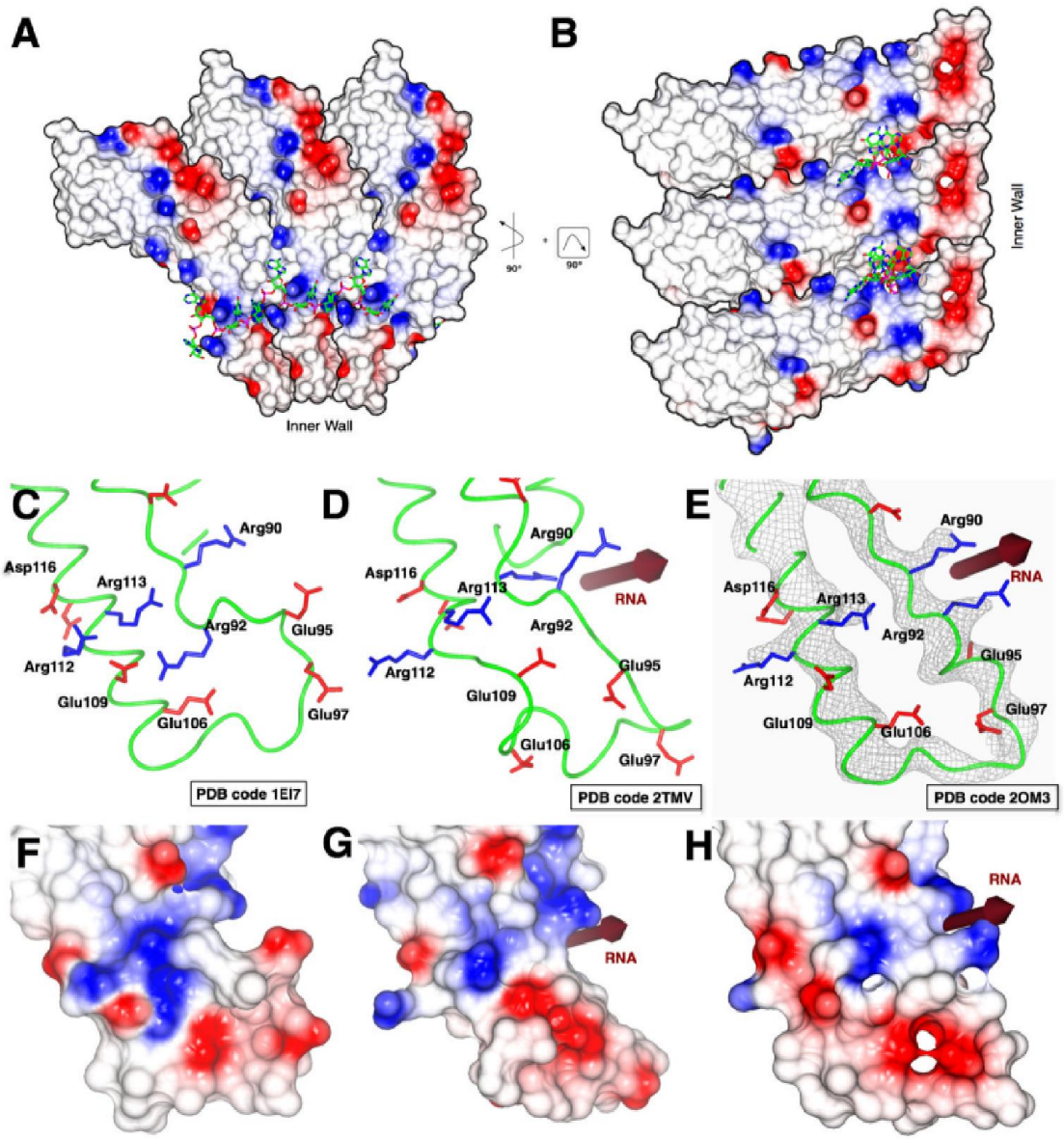


Рисунок 24. A, B) Электростатический потенциал атомной модели, построенной на основе крио-ЭМ структуры, в двух ортогональных видах. Сравнение областей малого радиуса дископодобного агрегата (C) (PDB код 1EI7), (D) спиральной формы ВТМ по данным рассеяния на волокнах (PDB код 2TMV), и (E) спиральной формы ВТМ по данным крио-ЭМ (PDB код 2OM3). Положительно заряженные остатки отмечены синим, а отрицательно заряженные – красным. (E) Экспериментальная карта электронной плотности, наложенная на атомную модель. Увеличенная область малого радиуса с электростатическими потенциалами, посчитанными из атомных моделей дископодобного аггрегата (F), спиральной формы ВТМ по данным рассеяния на волокнах (G), и спиральной формы ВТМ по данным крио-ЭМ (H) (Sachse et al., 2007).

Фосфатная цепочка РНК в крио-ПЭМ структурах зажата между двумя

боковыми цепями аргининов с образованием РНК-аргининового сэндвича, который стабилизирует взаимодействие между белком оболочки и РНК (Рисунок 24e). Две или три карбоксильные группы оказываются погруженными в гидрофобное окружение, которое изолирует их от соседних субъединиц (Рисунок 24 a, b, h). Эти карбоксильные группы называются карбоксилатами Каспара, которые формируют метастабильный “замок”, отвечающий за сборку/разборку вириона (Sachse et al., 2007).

4.3.2 Механизм сборки/разборки BTM

На основании полученных с помощью крио-ПЭМ структурных данных был предложен механизм сборки/разборки вириона BTM (Рисунок 25). Процесс разборки спиральной формы вириона можно разбить на 2 этапа: смена конформации в районе малого радиуса под действием карбоксилатов Каспара и диссоциация РНК и белковых субъединиц и объединение БО в дископодобные агрегаты (Рисунок 25).

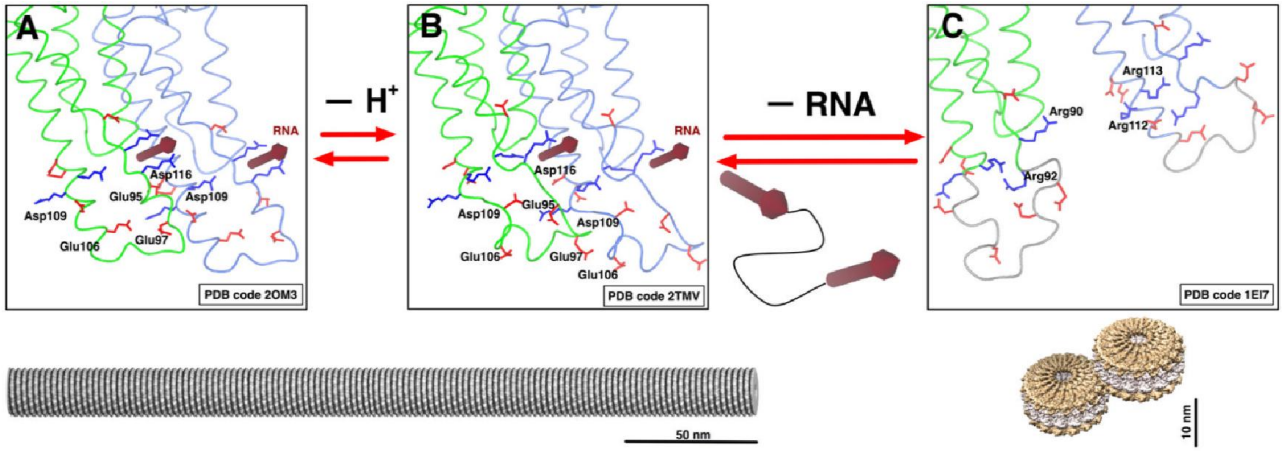


Рисунок 25. Схема предполагаемого механизма сборки/разборки BTM. Представлены атомные модели субъединиц из соседних слоев всех трех форм BTM. Отрицательно заряженные остатки помечены красным, а положительно заряженные – синим. (A) Крио-ЭМ структура (PDB код 2OM3), (B) Структура BTM, возможно, представляющая переходную форму между спиральной и дископодобной. (C) Структура 1EI7 дископодобного агрегата. (Sachse et al., 2007).

Этап 1) Конформационные изменения в области малого радиуса.

Отсутствие РНК в дископодобных агрегатах является наибольшим отличием таких агрегатов от спиральных форм вириона. Добавление РНК к дископодобным агрегатам вызывает инициацию образования спиральных структур. Сравнение структур БО в дисках с крио-ПЭМ структурой показывает сильное отличие положения боковой цепи Arg92 (Рисунок 24 c и e).

Предполагается, что боковая цепь участвует в “переключении”, которое изменяет конформацию белка, и белок, связанный с РНК (РНК-аргининовый “сэндвич”), переходит в конформацию с высвобожденной РНК. Такое изменение запускается высвобождением протонов из карбоксилатов Каспара. Высвобождение двух протонов на субъединицу было зарегистрировано при pH 7,5 в условиях денатурации вириона, вызванной детергентами (Koshland et al., 1958). Это приводит к электростатическому отталкиванию карбоксильных групп внутри кластера. Что может приводить к частичному распаду вторичной структуры белка в спиралях в области малого радиуса. Такой распад может переключать систему из неактивного положения в активное, и приводить к высвобождению РНК.

В крио-ПЭМ структуре, опубликованной Саксе с соавторами (Sachse et al., 2007), хорошо разрешена вся область малого радиуса, в т.ч. хорошо различимо продолжение вторичной структуры в этой области, которое больше, чем в структуре 2TMV. Это говорит о большей степени упорядоченности этой области в крио-ПЭМ структуре.

Этап 2) Диссоциация.

Переход области малого радиуса из упорядоченного состояния в неупорядоченное запускается через карбоксильные группы Glu97/Glu106. 3_{10}-спираль (с остатка 92 по 97), которая продолжает RR спираль, формирует основную часть “переключателя” предположительно из-за меньшей стабильности, чем α-спираль. Когда 3_{10}-спираль распадается из-за отталкивания между отрицательно заряженными группами, разрушается и кластер между РНК, Arg90 и Arg92 (Sachse et al., 2007).

Отделение РНК от белковых субъединиц необходимо для перехода вируса из

спиральной формы в дископодобную. Потеря вторичной структуры также сказывается на гидрофобной поверхности между субъединицами, и нарушение этого гидрофобного взаимодействия может способствовать дальнейшему распаду. Электростатическое отталкивание внутри карбоксилатного кластера, расположенного между субъединицами (Glu95, Glu116 и, возможно, Asp109) разделяет субъединицы, как только спиральная структура дестабилизируется в достаточной мере. Отталкивание между субъединицами может также усиливаться и другими карбоксильными группами, например, из распавшейся карбоксильной клетки (Glu97 и Glu106), а также Glu50 и Asp77 из спиральной области (Culver et al., 1995).

Таким образом, три вышеописанные структурных формы БО ВТМ (спиральная структура из крио-ПЭМ, спиральная труктура из рассеяния на волокнах и дискообразная структура) могут быть представителями различных этапов разборки вириона. Крио-ПЭМ структура (Рисунок 24 e) представляет стабильную спиральную форму, обладающую наибольшей упорядоченностью. Спиральная структура 2TMV (Рисунок 24 d), полученная методом рентгеновской дифаракции на волокнах, - переходное состояние, когда структурная упорядоченность уже частично утрачивается. А форма дисков (Рисунок 24c) представляет собой конечный этап разборки. Однако надо отметить, что вторичная структура, потерянная спиралью в 2TMV структуре по сравнению с крио-ЭМ структурой, восстанавливается в структуре БО в дископодобных агрегатах. Возможно, по завершению разборки происходит реупорядочивание белковой структуры (Sachse et al., 2007).

4.3.3 Структура ВШМЯ

Исследования структуры вируса штриховатой мозаики ячменя были начаты в 60-е годы прошлого века. В ходе этих исследований удалось установить форму и приблизительные размеры капсида (жесткая палочка длиной 100-150 нм и диаметром 22 нм со спиральной организацией белка оболочки) (Chiko, 1975; Harrison et al., 1965), а также рассчитать приблизительные параметры спирали капсида (шаг спирали 2,5-2,6 нм с примерно 24 субъединицами на 1 оборот)

(Finch, 1965). Также были исследованы структуры, получающиеся при реагрегировании белка оболочки ВШМЯ: палочковидные структуры со спиральной организацией белка, дископодобные структуры, которые могут существовать как свободно, так и в виде различных агрегатов (Atabekov et al., 1968; Киселев с соавт., 1966; Kiselev et al., 1969; Veerisetty, 1978).

В дальнейшем исследования ВШМЯ были сфокусированы на описании биохимических и молекулярно-биологических особенностей вируса, структуры и экспресии генома, функций кодируемых белков в развитии инфекции. Однако информация о структуре капсида стала появляться только 2 года назад. В 2013 году вышли сразу 2 статьи, посвященные структуре ВШМЯ (Kendall et al., 2013; Makarov et al., 2013).

При исследовании стуктуры ВШМЯ методами дифракции на волокнах и электронной криомикроскопии с последующей обработкой изображений было посчитано, что подъем спирали за один оборот составляет 25,8±0,2 Å (Kendall et al., 2013). При индексации рентгеновского дифракцтонного паттерна было подсчитано приблизительное число субъединиц на 1 оборот - ~23, эти данные были использованы в дальнейшем для расчета точных параметров спирали. Параметры спирали уточняли методом итеративной реконструкции в реальном пространстве (IHRSR) (Egelman, 2000). Таким образом, были определены параметры спирали: 23,2 субъединиц и подъем спирали ~25,6 Å на виток. В итоге получили карту электронной плотности с разрешением ~18 Å (Рисунок 26). Было показано, что радиус основной части вируса приблизительно равен 100 Å, а «выросты» отстоят от поверхности вируса еще на 11 Å. Диаметр центрального канала не был определен однозначно из крио-ПЭМ данных, т. к. карта в области малых радиусов была очень шумная (Kendall et al., 2013). На расстоянии 50 Å от центра была обнаружена расположенная по спирали область повышенной электронной плотности. На расстоянии от 60 до 80 Å от центра располагалось пространство, разделяющее соседние витки спирали (Рисунок 26).

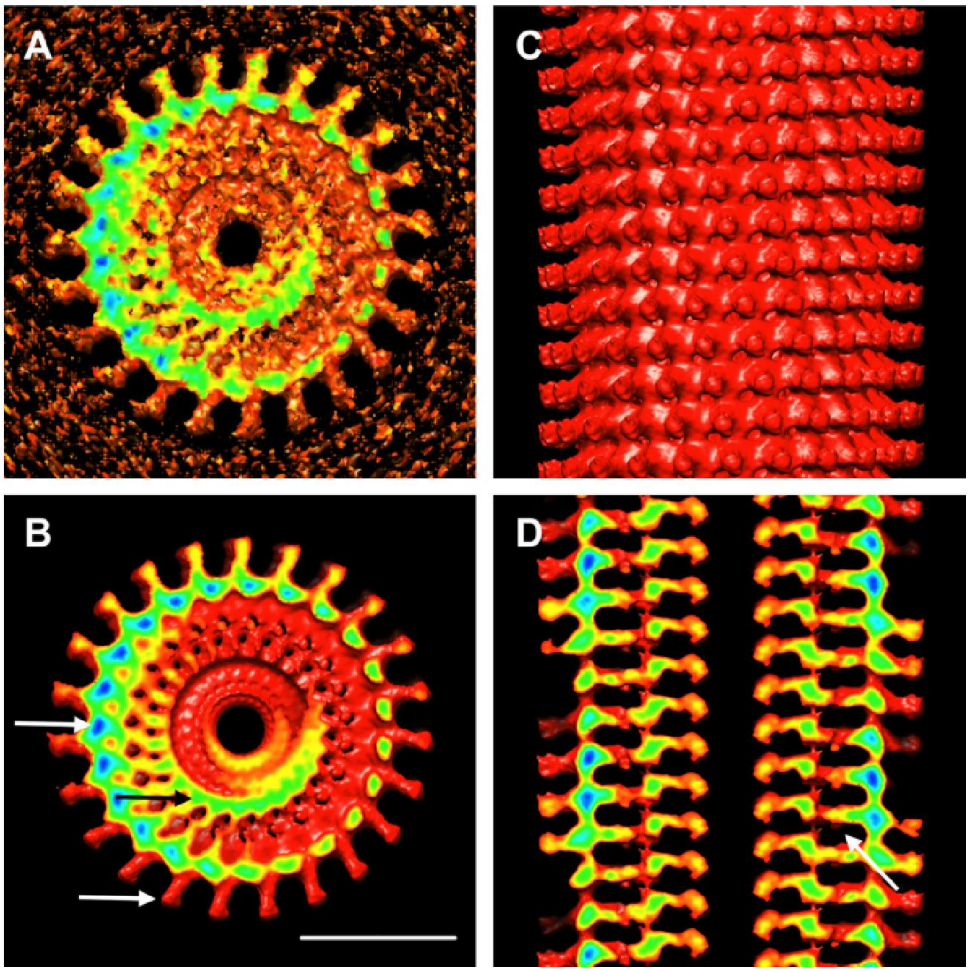


Рисунок 26. Реконструкция ВШМЯ с низким разрешением. Цвета отражают плотность: красный — низкая плотность, синий — высокая.

а) Поперечный срез модели без учета симметрии.

в) Поперечный срез модели с учетом симметрии. Белые стрелки — плотность, расположенная на расстоянии 91 Å от центра и выросты на поверхности. Черная стрелка - плотность, расположенная на расстоянии 50 Å от центра. Отрезок равен 100 Å.

с) Внешняя поверхность.

d) Вертикальный срез. Стрелкой показан канал между субъединицами (Kendall et al., 2013).

Таким образом, были сделаны выводы о том, что симметрия ВШМЯ сильно отличается от симметрии тобамовирусов (23,2 и 16,3 субъединицы на виток, соответственно). Однако, поперечный срез полученной низкоразрешенной модели ВШМЯ (Рисунок 26) напоминает срез ВТМ. Спирально расположенная на расстоянии 50 Å от центра плотность, скорее всего, образована РНК вириона. Наличие сплошной щели между субъединицами, расположенной на расстоянии

от 60 до 80 Å от центра капсида, объясняет, почему величина подъема спирали за 1 оборот у ВШМЯ (25,8 Å) больше такового у ВТМ (22,9 Å), а также предполагает различие в аксиальных взаимодействиях между субъединицами ВШМЯ и ВТМ (Kendall et al., 2013).

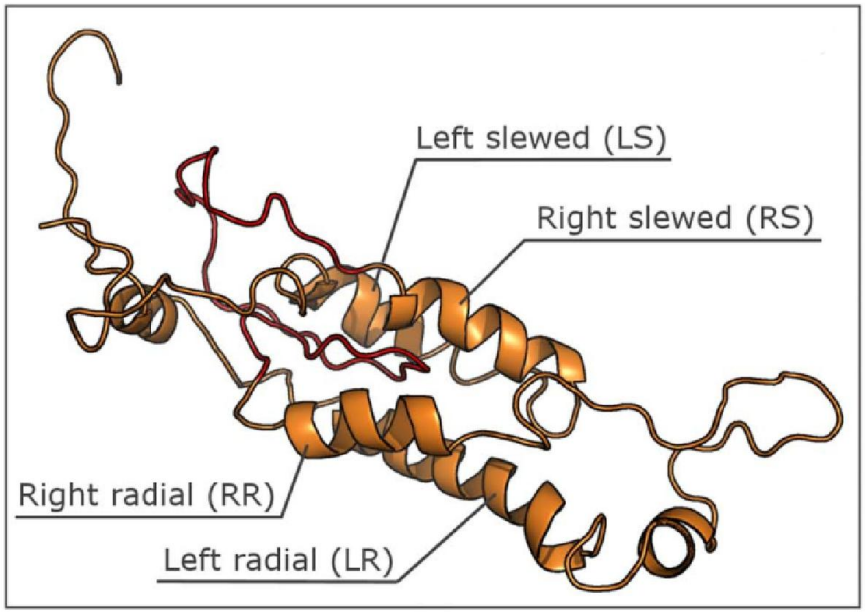


Рисунок 27. Модель БО ВШМЯ, полученная с помощью моделирования по гомологии. (Makarov et al., 2013).

Предполагаемое сходство способа сворачивания БО ВШМЯ и ВТМ подтверждается и моделированием по гомологии (Рисунок 27) (Makarov et al., 2013). Однако, предложенная модель БО ВШМЯ отличается от БО ВТМ наличием длинной неструктурированной N-концевой последовательности и петли между α-спиралью-2 и α-спиралью-3 (остатки 69-100), расположенной у поверхности. Предполагается, что этот участок белковой цепи ответственен за большую лабильность вириона ВШМЯ по сравнению с ВТМ, у которого этого участка нет (Makarov et al., 2013).

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ РАБОТЫ

Целью данной диссертационной работы является изучение структуры палочковидного вируса ВШМЯ и гигантских бактериофагов с применением криоэлектронной микроскопии высокого разрешения.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получение трехмерных структур спиральных вирусных частиц ВШМЯ и трехмерных структур капсидов бактериофагов EL и Lin68 с применением крио-ПЭМ и обработки ПЭМ изображений;
2. Разработка методики детекции белковых структур, находящихся в контакте с нуклеиновыми кислотами, с помощью облучения повышенной дозой электронов в сочетании с крио-ПЭМ;
3. Построение молекулярных моделей вирусных белков ВШМЯ на основе моделирования по гомологии и фиттинга и определение контактов субъединиц вирусной частицы ВШМЯ друг с другом и с РНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Очистка и выделение вируса ВШМЯ

Препарат ВШМЯ штамма ND18 (Petty et al., 1989) получали по методу, описанному в (Makarov et al., 2013). Работа проводилась в сотрудничестве с А.Г.Соловьевым и Е.В. Скуратом из Института Физико-химический биологии им. А.Н.Белозерского. кДНК вируса были субклонированы под промотором Act2 и терминатором NOS, перенесены в агробактериальный вектор pCambia, которым трансформировали *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV3101. Трансформированные агробактерии были ресуспендированы в буфере (10 mM MES pH 5.6, 10 mM MgCl2 и 150 μM ацетосирингона) и инфильтрованы в листья *Nicotiana benthamiana*. Через 2 недели листья собирали для выделения вирусных частиц. Их гомогенизировали в блендере с 3-кратно превышающим по объему 0,5 М боратном буфере с pH 9,0. Гомогенат 20 мин. инкубировали с 0,5% Тритон X-100, экстрагировали с 0,25 объемами хлороформа и центрифугировали 20 мин. при 10000 g. Вирус осаждали из супернатанта путем инкубации с 4% PEG-6000 и 1.2% NaCl в течение 2 часов при комнатной температуре. Смесь центрифугировали еще раз при 10000 g, осадок ресуспендировали в 50мМ боратном буфере, pH 9,0. После просветления вирус осаждали при ультрацентрифугировании (2 часа при 100000g) через 20% сахарозу, переносили в 5 мМ фосфатный буфер pH 7,5 и хранили при +4°C.

Конструкция рекомбинантного вируса ВТМ:ВШМЯ-БО основывалась на векторе TMV-M2e-ala (Petukhova et al., 2013), модифицированном вставкой сайта XhoI между геном белка движения весом 30 кДа и геном белка оболочки (Рисунок 28) и сайта XbaI непосредственно перед 3'-нетранслируемой областью в геноме ВТМ. Ген белка оболочки ВШМЯ был амплифицирован с парой специфических праймеров и клонирован в качестве фрагмента XhoI/XbaI в модифицированный TMV-M2e-ala.

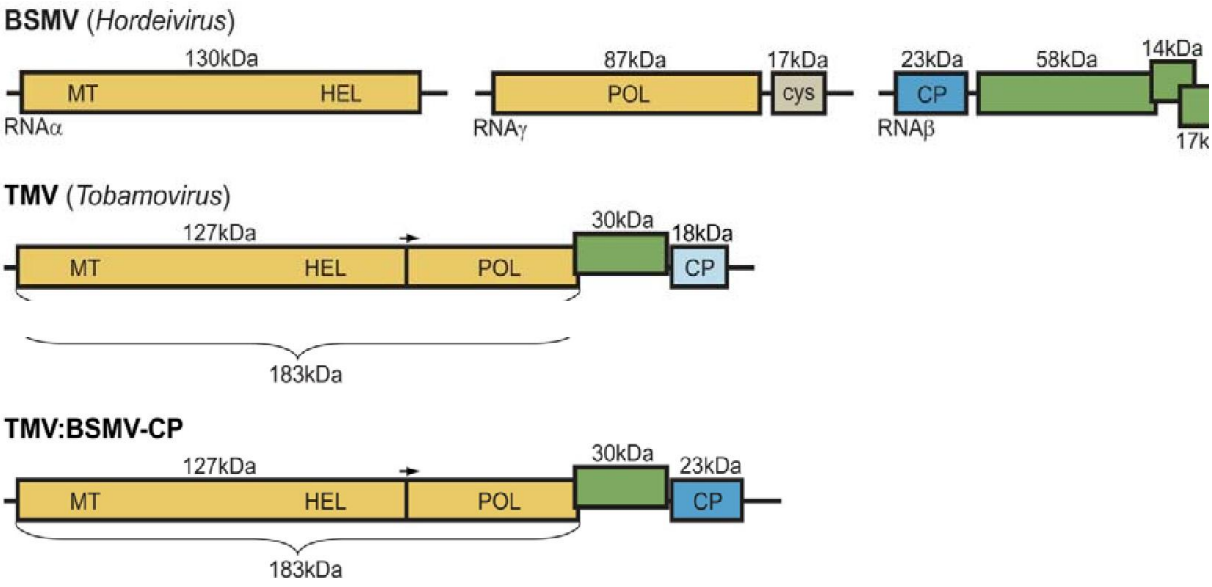


Рисунок 28. Схема строения геномов ВШМЯ (BSMV), ВТМ (TMV) и конструкции ВТМ:ВШМЯ-БО (рекВШМЯ) (TMV:BSMV-CP) (Clare, Pechnikova et al., 2015)

Получившаяся в результате конструкция ВТМ:ВШМЯ-БО представляла собой бинарный вектор pBin19, содержащий рекомбинантный вирусный геном под контролем промотора Actin-2 и нопалин-синтазного терминатора из *Arabidopsis thaliana*. Культуру *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101), содержащая конструкцию ВТМ:ВШМЯ-БО, инфильтровали в листья *Nicotiana benthamiana* для запуска системного заражения вирусом. Частицы ВТМ:ВШМЯ-БО были выделены так же, как ВШМЯ дикого типа.

2. Выделение бактериофагов

Бактериофаги размножали в культуре *P. aeruginosa* штамма PAO1, инкубируя ее на поверхности LB агара в чашках Петри в течение ночи при 37°C (Adams and Anderson, 1959). Фаговые частицы очищали путем центрифугирования в градиенте хлорида цезия (Sambrook et al., 2001). Работа проводилась в сотрудничестве с В.Н.Крыловым и О.В.Шабуровой из НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, РАМН.

3. Негативное контрастирование

Суспензию вирусов разводили до конечной концентрации 3 мг/мл в 50 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 50 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$. 3,5 мкл разведенной суспензии

наносили на медную сетку для электронной микроскопии, покрытую слоем аморфного углерода (предварительно сетку гидрофилизировали и очищали в устройстве, создающем тлеющий разряд), окрашивали 1%-ным раствором уранил-ацетата, высушивали на воздухе. Просматривали в электронном микроскопе Tecnai 200kV FEG (FEI, Netherlands) при увеличении 62000.

4. Крио-микроскопия

Суспензию вирусов наносили на сетку для криоэлектронной микроскопии C-flat (r2/2, Protochips Inc., USA), покрытую слоем аморфного углерода, содержащего периодически расположенные круглые отверстия. Излишки жидкости убирали с помощью фильтровальной бумаги. Сетку с образцом быстро погружали в жидкий этан для образования аморфного льда. ВШМЯ просматривали на крио- электронном микроскопе FEI Polara при увеличении x150000 в режиме низкой дозы (20–25 $e^{-}/Å^{2}$) при увеличении 150000 с дефокусом 0,7-3 мкм. Фаги EL просматривали в криоэлектронном микроскопе Titan Krios (FEI) при увеличении x33000, фаги phiKZ и Lin68 просматривали в криоэлектронном микроскопе Tecnai G12 Tween (FEI) при увеличении x26000.

5. Обработка изображений.

Обработку изображений производили с помощью программного обеспечения Imagic (van Heel et al., 1996), Spider (Shaikh et al., 2008), Bsoft (Ludtke et al., 1999). Для каждой микрофотографии определяли параметры частотно-контрастной характеристики (ЧКХ) изображения. Изображения частиц разбивали на квадратные сегменты и для каждого сегмента корректировали влияние ЧКХ.

5.1. Икосаэдрическая реконструкция капсидов фагов EL и Lin68

Для сокращения времени расчётов изображения бактериофагов огрубляли в 2 раза, т.о. размер пикселя для EL стал 5,36 Å, для Lin68 и phiKZ – 8,48 Å. При помощи программы BOXER (Ludtke et al., 1999) было вырезано 469 отдельных изображений EL, 512 - Lin68 and 315 - phiKZ, которые подвергли процедуре предварительной обработки (полосовой фильтрации, центрирования).

Изображения частиц разбивали на классы: в один класс определяли изображения, полученные от частиц со сходными углами Эйлера. Все изображения, входящие в один класс суммировали. Лучшие суммы (с более четкими очертаниями) служили эталонами для выравнивания исходного набора данных. Выровненный набор данных еще раз разбивали на классы. Для лучших полученных класс-сумм проводили процедуру восстановления углов (van Heel et al., 1997). После определения углов для нескольких класс-сумм проводили процедуру обратного проецирования с применением икосаэдрической симметрии. Полученная реконструкция была использована для получения репроекций, и дальше применялась процедура сравнения проекций с получением уточненной реконструкции вирусных капсидов.

5.2. Обработка изображений ВШМЯ

Определение частотно-контрастной характеристики.

Изображения дтВШМЯ и рекВШМЯ с помощью программы Boxer (Ludtke et al., 1999) были разбиты на квадратные сегменты размером 512x512 пикселей с перекрытием в 350 пикселей. ЧКХ определялась для каждой микрофотографии с помощью CTFFIND3 (Mindell and Grigorieff, 2003). Коррекция влияния ее была проведена в программе SPIDER (Shaikh et al., 2008) для каждого вырезанного сегмента. Изображения сегментов отфильтровали между 250 и 2 Å, нормировали к среднему значению 0 и стадартному отклонению 0,2 и собрали в стеки по 10918 частиц для дтВШМЯ и 6072 частицы для рекВШМЯ.

Определение параметров спирали.

Определение параметров спирали производили по изображениям негативно-контрастированного дтВШМЯ. Сегменты размером 600x600 пикселей были собраны с помощью программы BOXER (Ludtke et al., 1999). Для них была проведена коррекция влияния ЧКХ и они были отфильтрованы между 250 и 4 А. Все частицы были выровнены относительно вертикального прямоугольника, потом проведены несколько раундов, состоящих из статистического анализа (MSA), классификации, выравнивания относительно лучших сумм классов. Затем

частицы были разбиты на 200 классов (~5 частиц на класс), и для сумм классов было произведено преобразование Фурье. Лучшими дифракционными паттернами считались те, которые имели видимую вторую околомиридианильную слоевую линию (Рисунок 29).

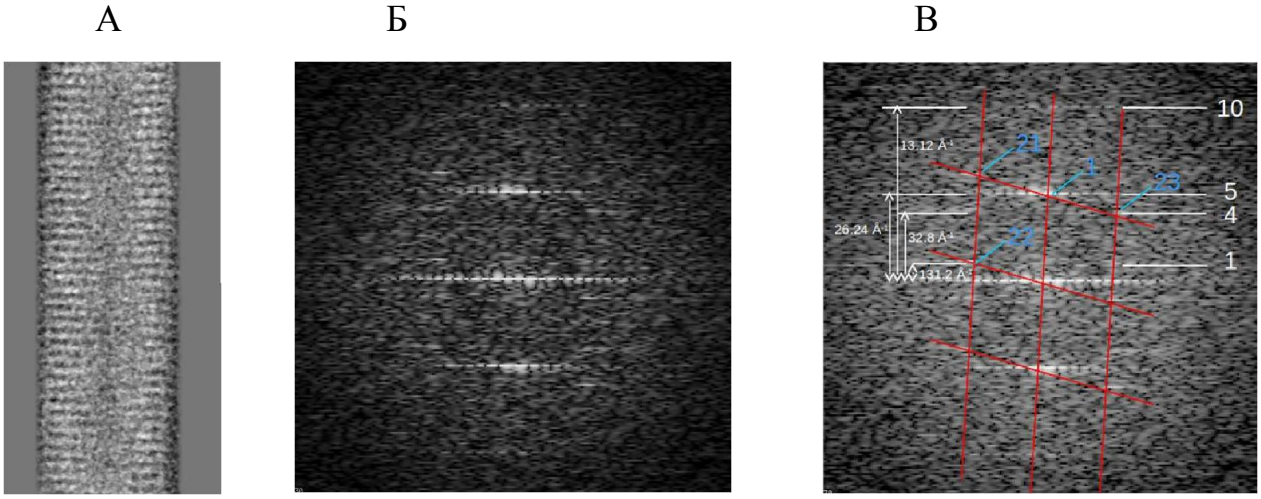


Рисунок 29. Индексация дифракционного паттерна для определения параметров спирали ВШМЯ. А) Изображение лучшей класс-суммы; на ее трансформанте присутствует вторая околомеридианальная слоевая линия. Б) Трансфрманта Фурье от нее (показана центральная часть) В) Индексация слоевых линий (Clare, Pechnikova et al., 2015).

Такие паттерны были проиндексированы для расчета параметров спирали. Были выделены видимые рефлексы, относящиеся к одной стороне решетки. Для каждого рефлекса находили следующие параметры: номер слоевой линии и порядок функции Бесселя, которой описывается распределение интенсивностей вдоль данной слоевой линии. Если номер слоевой линии – это номер слоевой линии по порядку от экватора (учитывая невидимые слоевые линии), то порядок Бесселя определяется исходя из расстояния R от первого максимума интенсивности на слоевой линии до меридиана и радиуса вирусной частицы r. Распределение интенсивностей вдоль слоевой линии описывается функцией Бесселя порядка n: $J_n(2\pi Rr)$, (Stewart, 1988), и первый максимум этой функции $J_n(x)$ располагается на расстоянии $x = n + 2$ от меридиана.

Найдя эти параметры для нескольких слоевых линий и подставив эти значения в уравнение, описывающее правило отбора спиральной симметрии, можно определить параметры спирали вирусного капсида (Stewart, 1988).

Уравнение правила отбора:

(9) l=t x n + u x m

где l – номер слоевой линии, t – количество оборотов спирали на период, n – порядок функции Бесселя слоевой линии, u – количество субъединиц на период спирали, m - +/- целое число.

Для уточнения параметров спирали были сделаны трехмерные реконструкции при различных параметрах (различными углами и подъемами между субъединицами). Для этого собранные частицы из изображений крио-препарата были переведены в формат IMAGIC, и реконструкция проводилась согласно протоколу, описаному в (Clare and Orlova, 2010). Сегменты выравнивали относительно вертикального прямоугольника с мягкими краями и производили описанный ранее цикл классификации и выравниваний. При построении 3D моделей использовались углы от 10º до 22º с шагом в 1º и различные значения подъема спирали за 1 оборот – от 25 до 27 Å. Качество полученных реконструкций оценивалось по стандартному отклонению на центральном горизонтальном срезе каждой реконструкции. Полученные параметры спирали соответствовали реконструкции с наибольшим стандартным отклонением в карте электронной плотности: 5 оборотов спирали и 111 субъединиц на период и подъем спирали за 1 оборот – 26,24Å, угол между субъединицами составил ~16,216º, а подъем спирали между соседними субъединицами ~1,182Å.

Реконструкция.

Лучшей класс-сумме были приписаны углы Эйлера: 0, 90, 0. Из этой суммы были получены проекции, связанные спиральной симметрией: каждое последующее изображение сдвигалось относительно предыдущего на 1,182 Å, что изменяло приписываемый угол гамма на 16,216° (данная процедура производилась со сдвигами 55 раз вниз и 55 раз вверх). Из таких связанных симметрией проекций получали первую реконструкцию, из которой получали репроекции, далее использованные в качестве новых эталонов для новых раундов выравнивания (Рисунок 30).

Сначала репроекции получали под углами от 80° до 100° по углу β с шагом в

2° и от 0° до 16,216° по α с шагом 2°. Эти репроекции использовали в качестве эталонов для выравнивания частиц. Выровненные частицы подвергнуты статистическому анализу и классифицированы. Плохо выровненные и некачественные изображения были исключены из общего набора данных, т.о. в стеке осталось 10918 изображений.

Для начального выравнивания изображений рекВШМЯ в качестве эталонов использовали репроекции с улучшенной карты дтВШМЯ, далее эти изображения также классифицировали и исключали “плохие” частицы, т.ч. в конечном наборе данных рекВШМЯ осталось 6072 изображения.

Трехмерные карты электронной плотности дтВШМЯ и рекВШМЯ улучшали раздельно посредством проведения раундов сравнения проекций. При этом шаг изменения углов при получении репроекций через несколько раундов был снижен до 1°.

Через несколько раундов выравнивание частиц перестало улучшаться: после статистического анализа выровненных частиц на собственных изображениях отображалась латеральная (по оси, перпендикулярной длинной оси вириона) недовыровненность. Для исправления этого дефекта после каждой процедуры выравнивания частицы классифицировали на основании тех собственных изображений, которые отвечали за описанную недовыровненность. Латерально выравнивались суммы полученных классов и для всех частиц, входящих в какой-либо класс, применялся боковой сдвиг, найденный для данной класс-суммы. После этого для всех частиц проводилось сравнение проекций без трансляционных сдвигов.

Все изображения, выровненные относительно какой-либо проекции суммировались и этому суммарному изображению приписывали те углы, под которыми была получена данная проекция. Из каждого такого суммарного изображения получали 111 изображений, связанных симметрией. Из набора таких симметризованных изображений получали трехмерную реконструкцию путем обратного проецирования. Из такой реконструкции получали репроекции и цикл повторялся.

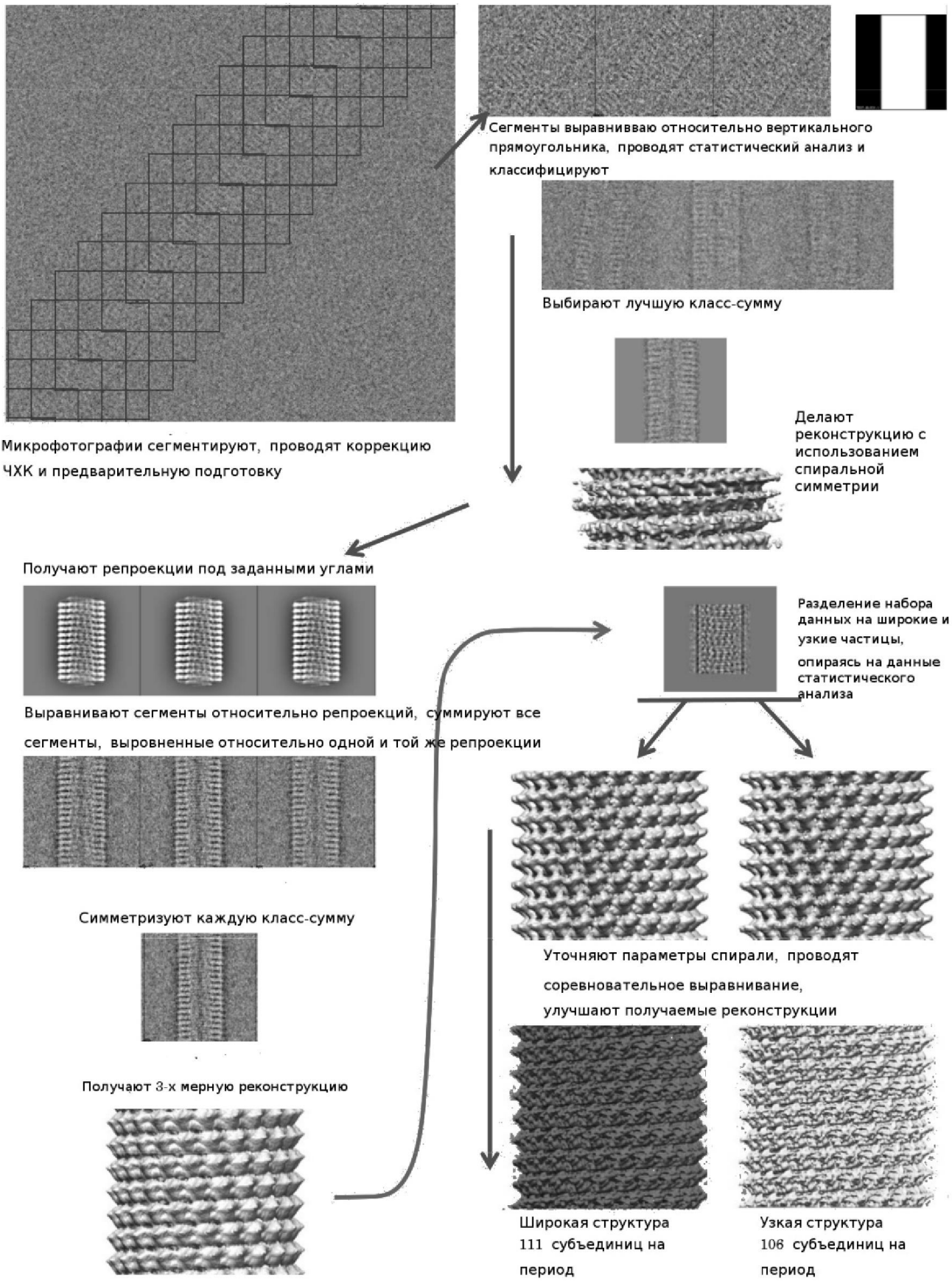


Рисунок 30. Блок-схема процесса обработки крио-изображений ВШМЯ.

После нескольких таких циклов качество получаемых реконструкций перестало улучшаться как для дтВШМЯ, так и для рекВШМЯ. Статистический анализ выровненных изображений показал наличие в наборе данных различий по ширине (Рисунок 31).

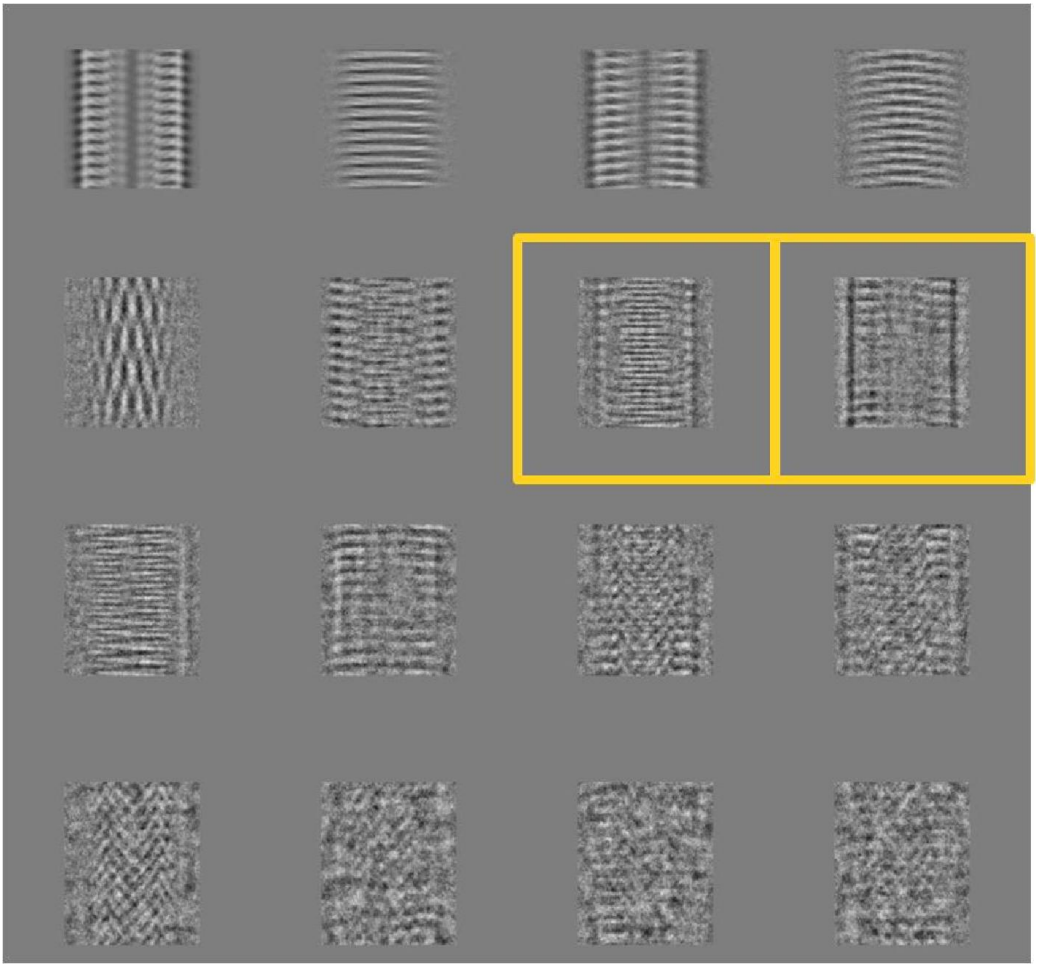


Рисунок 31. Собственные изображения набора данных сегментов ВШМЯ. Желтым отмечены собственные изображения, отображающие неоднородность набора данных по ширине (Clare, Pechnikova et al., 2015).

Была произведена классификация на основании собственных изображений, отвечающих за разницу по ширине, на 2 класса: широкий и узкий. Найденные ранее параметры спирали (22,2 субъединицы на оборот и 5 оборотов на период), характеризовали только широкий класс. Для узкого класса параметры спирали подбирали отдельно, и было выяснено, что он имеет 21,2 субъединицы на оборот и 5 оборотов на период.

Широкие и узкие наборы данных использовались для улучшения

соответствующих реконструкций независимо. И после нескольких раундов было проведено соревновательное выравнивание всего начального набора данных относительно репроекций от этих двух реконструкций. Таким образом, было произведено более тщательное разделение частиц из набора данных по ширине. Эти две реконструкции продолжали улучшать независимо. На более поздних раундах реконструкции фильтровали между 12 и 6 Å, а получаемые от них репроекции, используемые в качестве эталонов для выравнивания, были ограничены в плотности пикселей между -0,4 и 0,4.

После того, как углы, приписываемые частицам в процессе сравнения проекций, перестали меняться от раунда к раунду, было подсчитано разрешение для полученных карт. Разрешение считалось путем определения корреляции Фурье-оболочек между 2 независимыми реконструкциями. Это реконструкции получали путем разбивания симметризованных частиц на 2 группы (четные и нечетные), из которых получали реконструкции. Достоверным считалось разрешение, на которой корреляция составляла 0,5.

Карты фильтровали, подавляя частоты, ниже 10 Å и выше 3,8 Å.

Гибкий фиттинг

Моделирование по гомологии было произведено в программе I-TASSER (Roy et al., 2010). Был произведен гибкий фиттинг модели по гомологии в отфильтрованную карту электронной плотности узкой и широкой частиц рекВШМЯ с помощью Flex-EM (Topf et al., 2008). После проведения гибкого фитинга модель правили вручную в программе Coot (Emsley and Cowtan, 2004), а затем исправляли автоматически в программе PHENIX (Adams et al., 2009). Ошибки автоматического исправления дополнительно убирали в Coot. Эта последовательность действий продолжалась до того момента, пока не было достигнуто наилучшее соответствие между координатами атомов и электронной плотностью. Визуализацию карт плотности производили в Chimera (Goddard et al., 2007).

5.3. Методика получения картин электронно-лучевого повреждения (СВР) внутреннего тела в капсидах бактериофагов

Для визуализации внутреннего тела в капсидах фагов EL и Lin68, один и тот же замороженный образец снимали 2 раза – сначала с низкой дозой электронов (10-20 e - /Å^2); после следующей экспозиции доза достигала 40-60 e - /Å^2 . При этом в месте потенциального расположения внутреннего тела появлялись картины электронно-лучевого повреждения (СВР), имевшие на проекционных изображениях вытянутую или круглую форму (Рисунок 32)

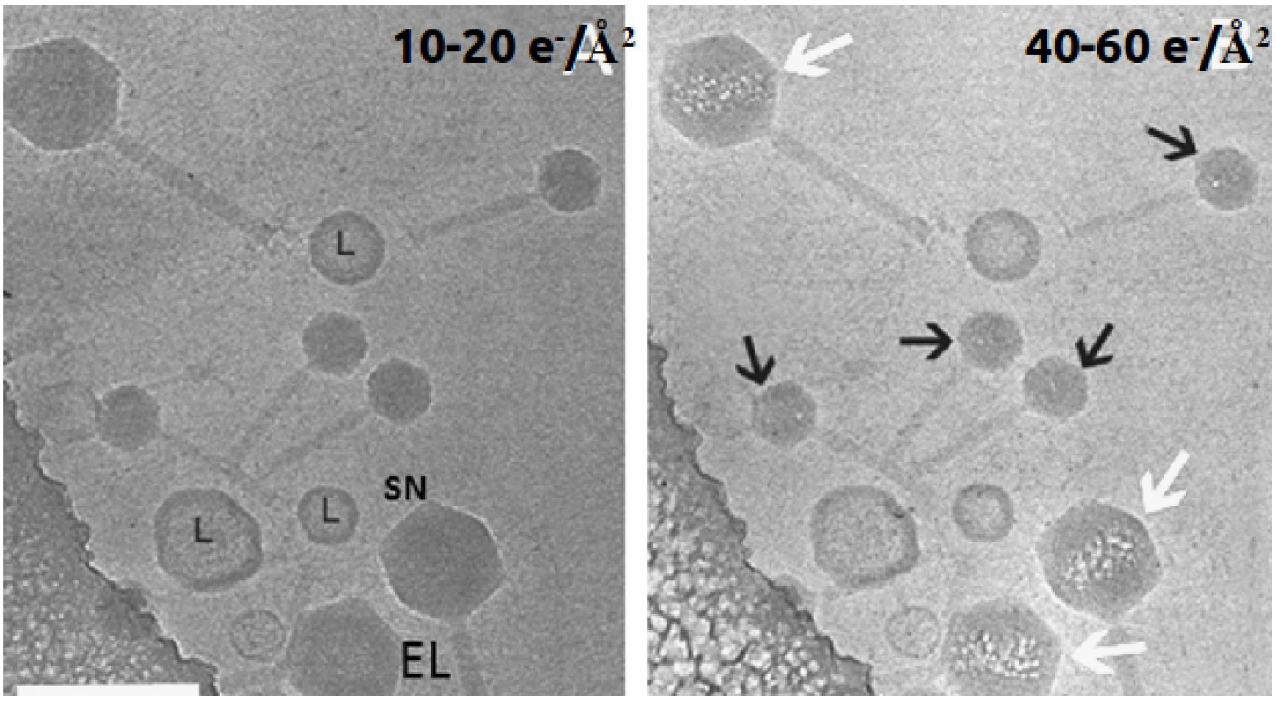


Рисунок 32. Крио-ЭМ изображение EL в условиях низкой (A) и высокой (B) дозы облучения(O.S.Sokolova, O.V.Shaburova, E.V. Pechnikova et al., 2014).

Изображения отдельных частиц центрировали и разбивали на классы (van Heel et al., 1996). В один класс входили изображения со сходным положением СВР. Направление проекции СВР в основном соответствовало положению длинной оси внутреннего тела, она была использована для оценки положения и размеров внутренних тел в капсидах бактериофагов. Степень электроннолучевого повреждения зависит от количества полученных электронов, поэтому ко всем фагам применялась одна и та же доза.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Морфология и трехмерная организация бактериофагов EL и Lin68

Крио-условия позволяют белковым частицам оставаться в нативной форме. Мы измерили размеры капсида фага EL (Рисунок 33A), и показали, что они имеют размеры 145 нм, так же, как и фаг phiKZ (Рисунок 33B) (Fokine et al., 2005).

Капсид соединяется с хвостом посредством шеи. Хвост EL имеет длину примерно 200 нм и 22 нм в диаметре и на конце имеет базальную пластинку. Трехмерная реконструкция капсидов фагов EL и Lin68 показала, что они имеют одинаковые размеры (Рисунок 33 E, F). Шея фага EL гораздо тоньше, чем у Lin68, и не имеет манжеты.

На некоторых криоэлектронных микрофотографиях фага EL были обнаружены участки с гексагональной укладкой ДНК (Рисунок 33 C). Было измерено расстояние между тяжами ДНК (d_s) (Рисунок 33 D), которое оказалось равным 3,09±0,19 нм.

Таким образом, было показано, что размеры и организация капсидов одинаковы у всех изученных представителей phiKZ-подобных фагов. Интерес вызывает то, что бактериофаги вида EL отличаются от фагов phiKZ и Lin68 существенно меньшим размером генома (211 тпн у EL, по сравнению с 280 тпн у Lin68/phiKZ) (Hertveldt et al., 2005). Если принять, что у частиц фагов этих видов одинаковый внутренний объем капсида, то, при условии, что в обоих случаях функционирует head-full механизм упаковки генома при созревании, необходимо найти объяснение тому, как происходит упаковка существенно меньшего по размерам генома у фагов вида EL.

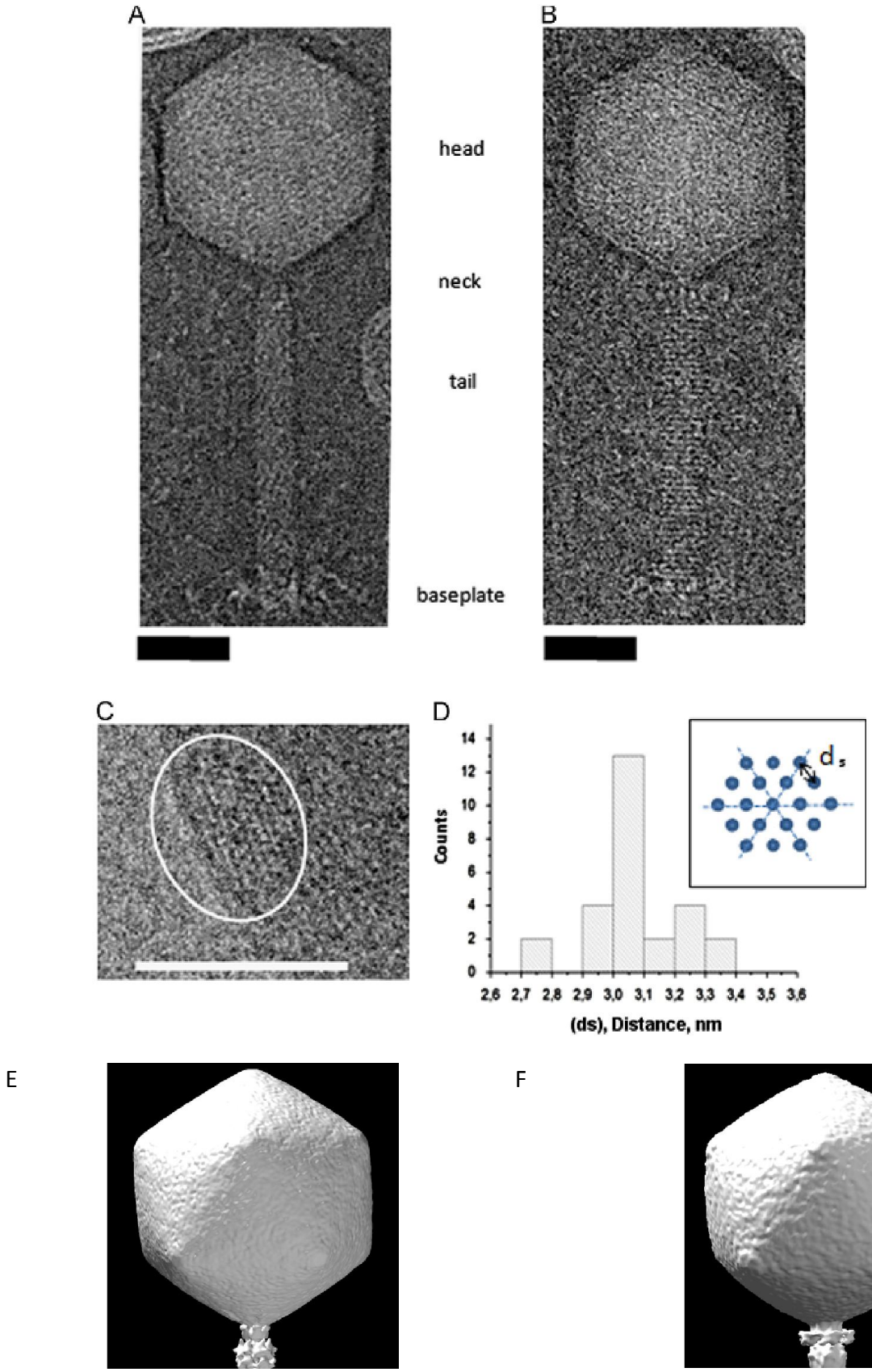


Рисунок 33. Организация бактериофагов phiKZ, EL и Lin68. (A) Криоэлектронная микрофотография частицы фага EL; (B) Криоэлектронная микрофотография частицы фага phiKZ (изображение предоставлено А.Фокиным, Университет Миннесоты); (C) гексагональная упаковка ДНК в капсиде фага EL; (D) Расстояние между нитями ДНК у фага EL, нм. Врезка – схема гексогональной упаковки ДНК. ds – расстояние между нитями (O.S.Sokolova, O.V.Shaburova, E.V. Pechnikova et al., 2014). (E) Реконструкция капсида EL (F) Реконструкция капсида Lin68.

2. Организация генома внутри капсидов гигантских бактериофагов

Мы предположили, что внутреннее тело у фага EL может ограничивать пространство, доступное для упаковки генома. Для оценки положения и размеров внутреннего тела (Рисунок 34) мы использовали генерацию паттернов горения (CBP) (см. Методы). Показано, что CBP значительно различаются у фагов phiKZ, Lin68, и EL. CBP у EL расположен под большим углом наклона по сравнению с phiKZ (Рисунок 34). Проекции CBP в EL никогда не образовывали угол в 22°, характерный для phiKZ, но часто образовывали большие углы (60-90°).

Это дало нам основание предположить, что у EL, в отличие от phiKZ, внутреннее тело крепится между двумя противоположными вершинами икосаэдра. Проекции CBP у EL немного шире (~43 нм) и короче (~90 нм) по сравнению с phiKZ (Рисунок 34).

Такие морфологические различия могут способствовать значительным различиям в упаковке ДНК между EL и phiKZ. Известно, что упаковка ДНК завершается, когда ДНК в капсиде достигает определенной плотности. Мы предположили, что внутреннее тело, если оно имеет больший объем, оставляет меньше места внутри головы для ДНК, в результате чего меньший по размерам геном EL (Крылов и др., 2007;. Mesyanzhinov др, 2002) может быть упакован внутри гигантского (145 нм) капсида.

Для того чтобы проверить данную гипотезу, мы изучили другой гигантский фаг, Lin68. Длина геномных ДНК у Lin68 и phiKZ аналогичны (примерно 280 кб (Hertveldt et al., 2005;. Mesyanzhinov et al., 2002)). Размер капсида Lin68 такой же, как у phiKZ и EL (Рисунок 33 F, 33). С другой стороны, размеры и положение CBP в Lin68 были такими же, как и в phiKZ, но не в EL (Рисунок 34). Это согласуется с нашей гипотезой, что размер генома фага коррелирует с размерами внутреннего тела.

Еще один способ упаковать короткий геном в гигантский капсид – это оставлять большее расстояние между упакованными тяжами ДНК. Этот способ известен для вирусов HCMV и HSV1-B, не имеющих внутреннего тела (Bhella et al., 2000; Butcher et al., 1998).

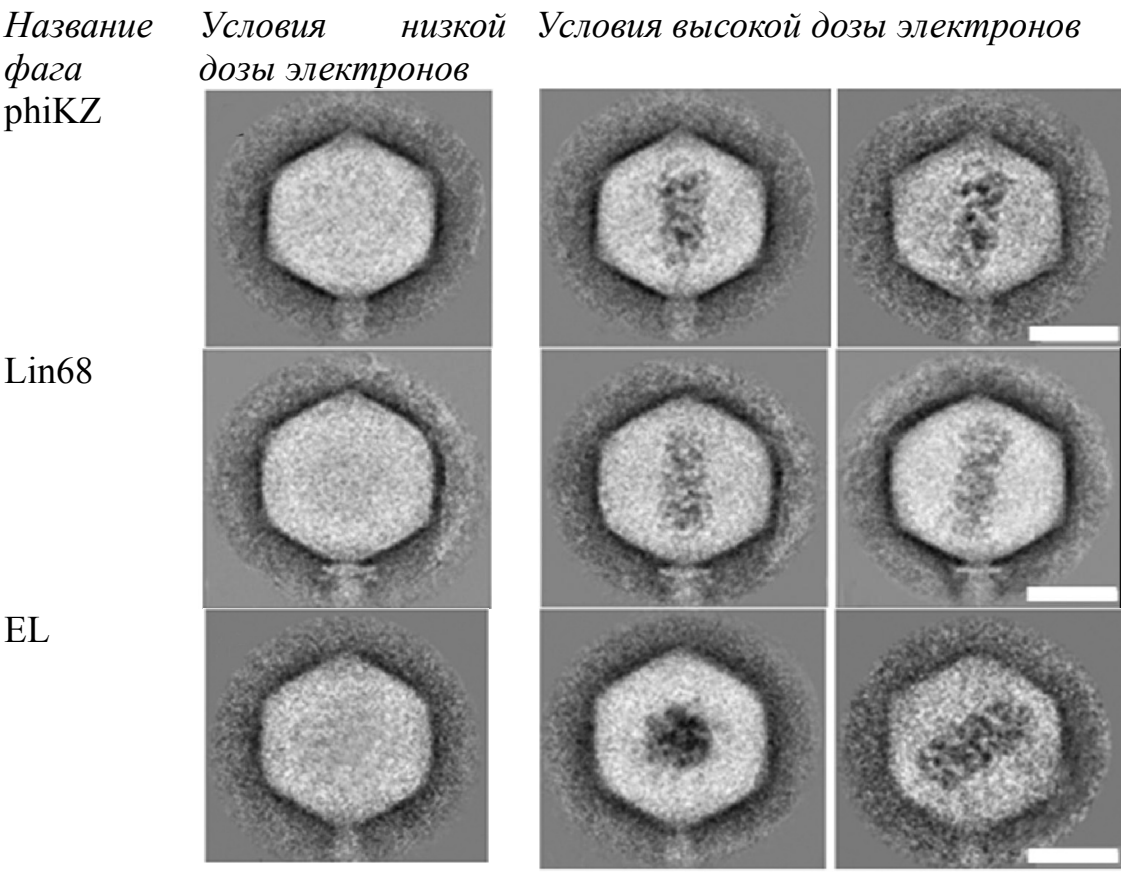


Рисунок 34. Класс-суммы неповреждённых частиц фагов (с низкой дозой электронов, слева) и частиц с СВР (с высокой дозой электронов, справа) (O.S.Sokolova, O.V.Shaburova, E.V. Pechnikova et al., 2014).

Согласно существующим моделям упаковки ДНК в капсиде бактериофага (Petrov and Harvey, 2008; Purohit et al., 2005), ДНК можно считать гибким, но нерастяжимым цилиндрическим стержнем. Это означает, что общая длина ДНК (L), которая может быть размещена в капсиде с объемом (V), должна зависеть от расстояния между нитями ДНК (d S) так, что

(10) L =V/d s

В соответствии с расчетами Пьюрохит с соавторами (Purohit et al., 2005), эффективность упаковки генома

(11) ρ_{pack} = (Ω genome /Ω capsid)

для большинства фагов лежит в диапазоне 0,3–0,4. Мы оценили значения ρ_{pack} для EL (Рисунок 32 D) и phiKZ и показали, что оба значения лежат в этом диапазоне, и ρ_{pack} для EL в 1,2 раза меньше, по сравнению с ρ_{pack} для phiKZ (Таблица 1). Это четко отражает наблюдаемые нами различия в расстояниях

между тяжами ДНК (ds): в нашем исследования фага EL, ds =3,09 нм (Рисунок 36), в то время как расстояние, ранее наблюдаемое для phiKZ с помощью крио-микроскопии, было меньше: ds =2,8 нм (Fokine et al., 2005).

Таблица 1.

Сравнение размеров капсидов и упаковки ДНК у бактериофагов в phiKZ и EL

	phiKZ	EL
Размер капсида, нм	145,5	145,0
Толщена стенки капсида, нм	5 (Fokine et al., 2005)	5
Объем внутренней полости капсида, $нм^3$	744,676	736, 303
Объем внутреннего тела, $нм^3$	47,52	93,876
Объем свободного пространства, $нм^3$	697,156	642,427
Размер генома, тпн	280	211
Расстояние между тяжами ДНК (d_s), нм	2,8 (Fokine et al., 2005)	3,09±0,19
Эффективность упаковки (ρ_{pack}) (Purohit et al., 2005)	0,428	0,351

3. Структура вирионов ВШМЯ по данным крио-ПЭМ

3.1 Структура ВШМЯ дикого типа

Для частиц ВШМЯ дикого типа было установлено (см. Методы), что они различаются по ширине и параметрам спирали. Широкий вирион ВШМЯ имеет диаметр 224 Å, шаг спирали 26,2 Å, 111 субъединиц и 5 оборотов спирали на период (Рисунок 35). Структура широких вирионов была получена с разрешением 5,7 Å. А у узкого вириона – диаметр 216 Å, шаг спирали такой же, как и у широких частиц, 106 субъединиц и 5 оборотов на период (Рисунок 36). Структура узких вирионов была получена с разрешением 5,1 Å.

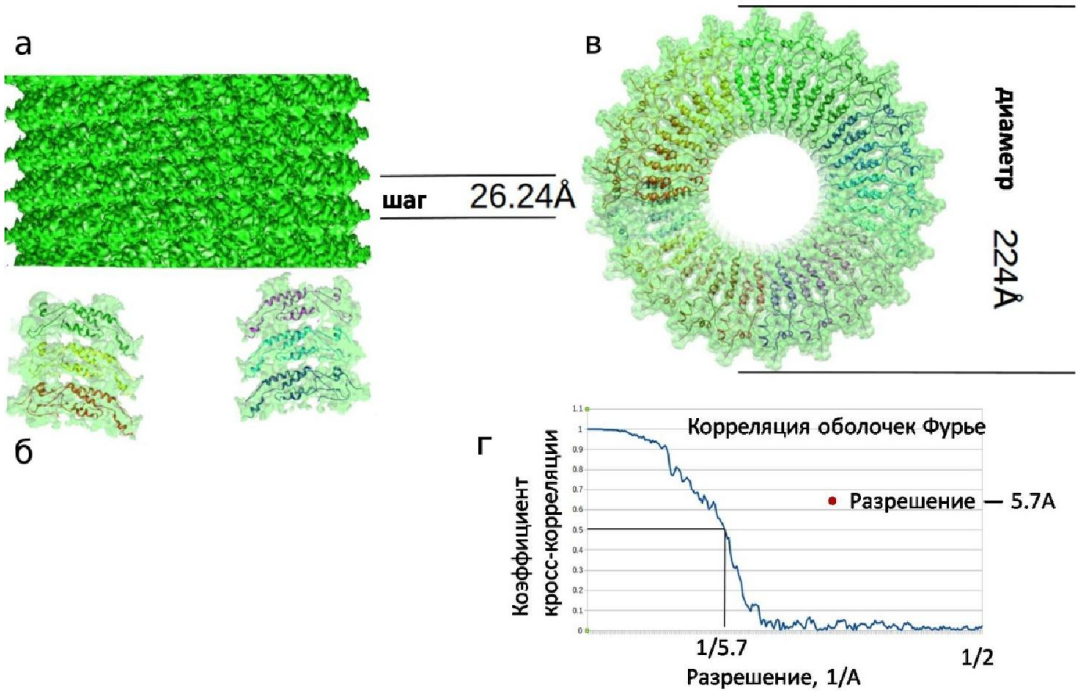


Рисунок 35. Карта электронной плотности широкой частицы дтВШМЯ. а) внешняя поверхность частицы. б) вертикальный срез. в) горизонтальный срез. г) график зависимости корреляции оболочек Фурье от пространственной частоты, за достоверное разрешение принята та пространтвенная частота, где корреляция равна 0,5 (Clare, Pechnikova et al., 2015).

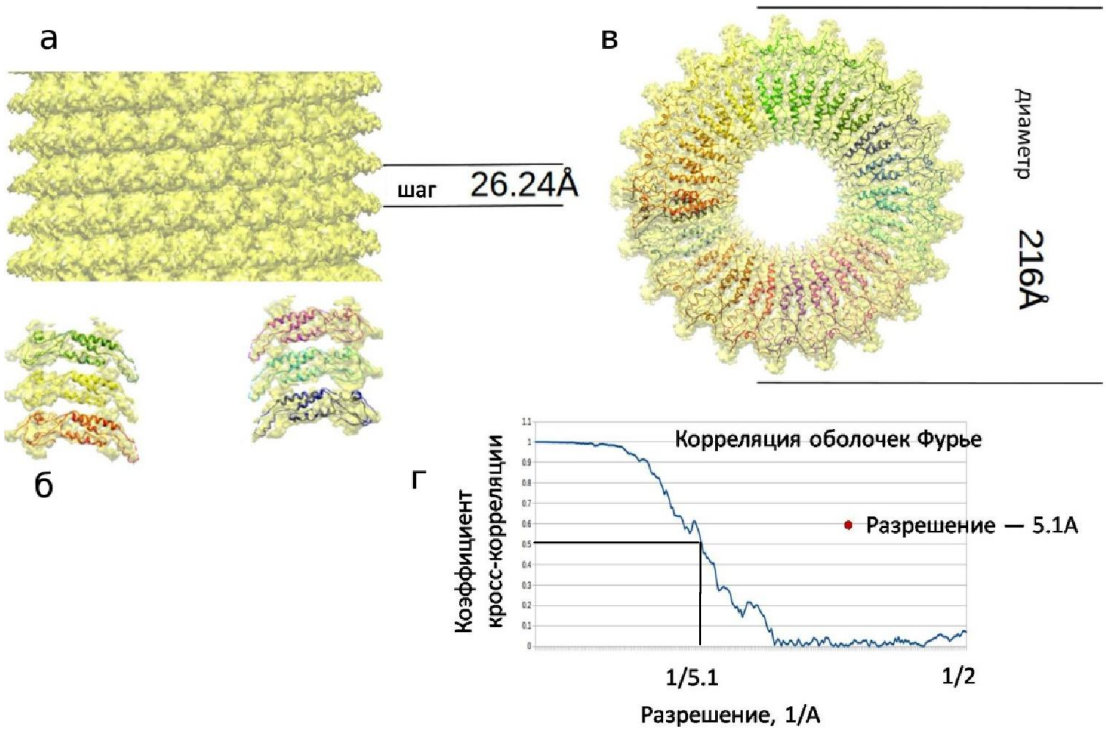


Рисунок 36. Карта электронной плотности узкой частицы дтВШМЯ. а) внешняя поверхность частицы. б) вертикальный срез. в) горизонтальный срез. г) график зависимости корреляции оболочек Фурье от пространственной частоты, за достоверное разрешение принята та пространтвенная частота, где корреляция равна 0,5 (Clare, Pechnikova et al., 2015).

3.2 Структура рекомбинантного ВШМЯ

Была выдвинута рабочая гипотеза, что наличие разных по ширине частиц может быть связано с тем, что вирионы инкапсидируют 3 различные РНК.

Для проверки этой гипотезы нашими соавторами (А.Г.Соловьев и Е.В.Скурат) были созданы капсиды рекомбинантного ВШМЯ. Для этого была создана конструкция TMV:BSMV-CP (Рисунок 28), где геномная РНК ВТМ была модифицирована и вместо гена БО ВТМ содержала ген БО ВШМЯ.

Так же, как и для дикого типа, были получены негативно-контрастированные и крио-изображения рекВШМЯ. Паттерн на трансформантах Фурье не отличался от полученного ранее на дтВШМЯ и давал те же параметры спирали: шаг спирали 26.2 Å и 111 субъединиц на период.

Статистический анализ выровненного набора данных показал различия по ширине вирионов, как и в случае с дтВШМЯ. Набор данных был разбит на 2 класса: широкий с диаметром 224 Å и узкий с диаметром 216 Å. Было выявлено, что частицы из узкого класса рекВШМЯ имеют 106 субъединиц на период так же, как и узкий класс дтВШМЯ.

Разделение широких и узких частиц позволило улучшить разрешение получаемых карт электронной плотности: у дтВШМЯ у широких частиц до 5,7 (Рисунок 35), у узких частиц - до 5,1 Å (Рисунок 36), а у рекВШМЯ у широких и узких частиц до 4,1 Å (Рисунок 37) (анализ рекВШМЯ проводил D.Clare, Birkbeck College, University of London).

Совпадение параметров спирали дтВШМЯ и рекВШМЯ говорит о том, что ширина вирионов не зависит от инкапсидированной РНК.

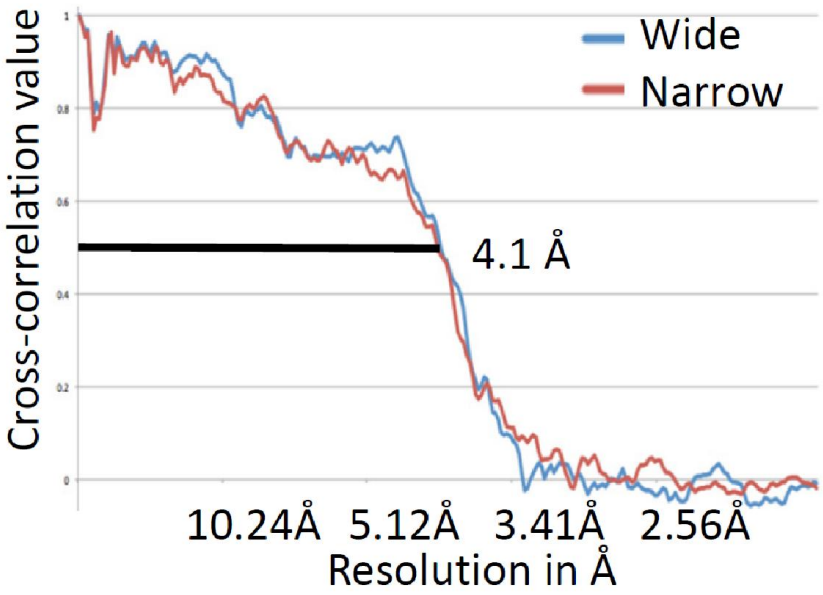


Рисунок 37. График зависимости корреляции оболочек Фурье от пространственной частоты для рекВШМЯ, красным отмечена кривая для узкой частицу, синим – для широких. Разрешение реконструкций – 4,1 Å, за достоверное разрешение принята та пространтвенная частота, где корреляция равна 0,5 (Clare, Pechnikova et al., 2015).

4. Характер сворачивания полипептидной цепи БО ВШМЯ

Был проведен гибкий фиттинг (FlexEM, (Topf et al., 2008)) полученной по гомологии модели БО ВШМЯ (Рисунок 38 а, б) (I-Tasser (Roy et al., 2010)) в карты плотности вирионов дтВШМя и рекВШМЯ. Для построения атомной модели фиттинг улучшали вручную и автоматически (Рисунок 38 в, г) в Coot и Phenix (Adams et al., 2009; Emsley and Cowtan, 2004).

В общих чертах характер сворачивания БО ВШМЯ схож и таковым у ВТМ и других тобамовирусов. БО состоит из 4 α-спиралей (Рисунок 39), обозначенных так же, как у ВТМ, RR (правая радиальная (ПР)), RS (правая повернутая (ПП)), LR (левая радиальная (ЛР)), и LS (левая повернутая (ЛП)) (Рисунок 39). Левая радиальная спираль у ВШМЯ короче, чем аналогичная спираль у ВТМ. Также в БО ВШМЯ имеются 3 малые спирали, две из которых расположены во внешней области БО и одна – поблизости от центрального канала вириона. У ВТМ также имеются схожие спирали во внешней области БО, но спираль во внутренней области повернута ближе к основным спиралям (Рисунок 38, 39).

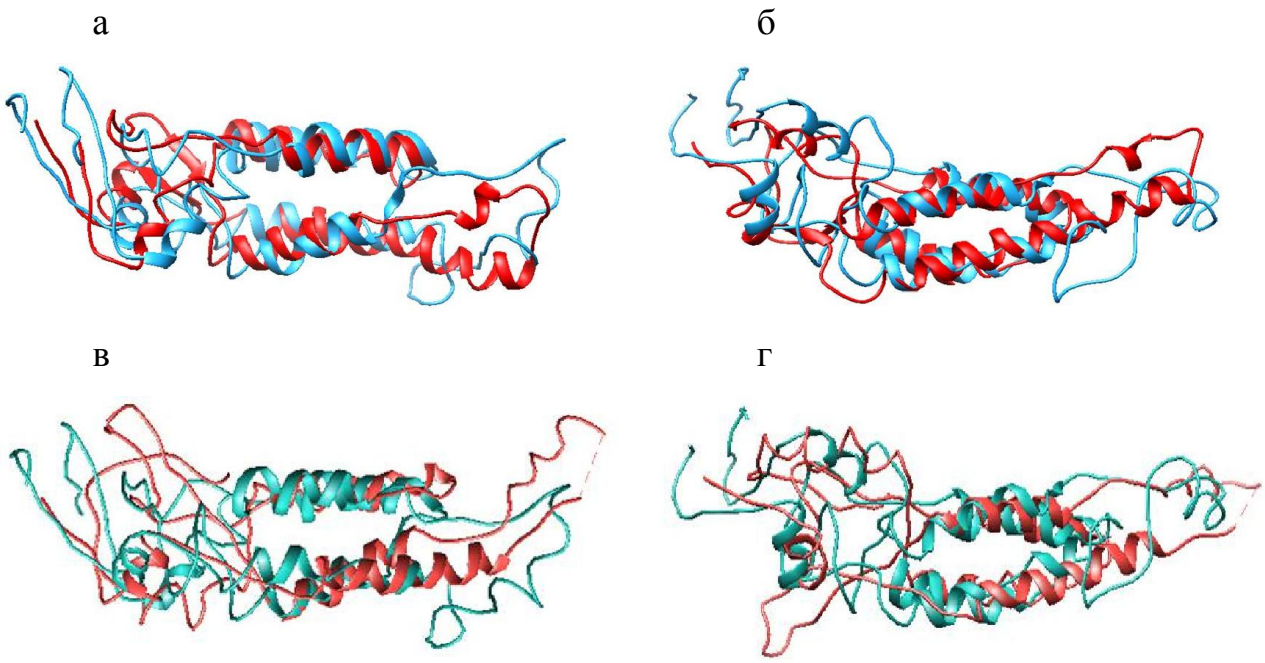


Рисунок 38. Моделирование белка оболочки ВШМЯ по гомологии с ВТМ и улучшение этой модели. Верхний ряд: модель БО ВШМЯ (голубой), полученная по гомологии с БО ВТМ (красный) вид сбоку (а) и сверху (б). Нижний ряд: модель БО ВШМЯ после гибкого фиттинга и улучшения (розовый), модель БО ВШМЯ (голубой), полученная по гомологии с БО ВТМ, вид сбоку (в) и сверху (г).

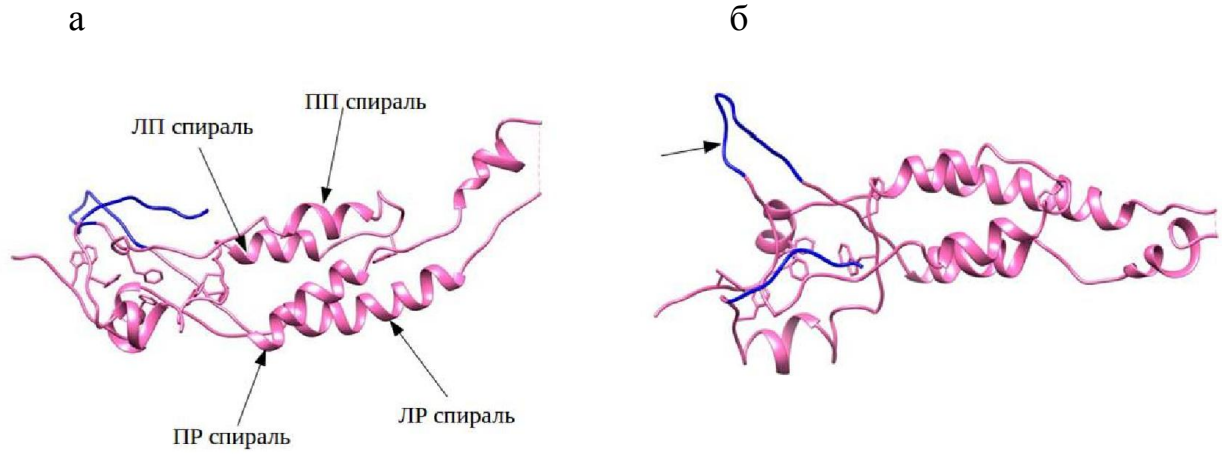


Рисунок 39. БО ВШМЯ после гибкого фиттинга. А) Стрелками показаны основные спирали: ЛП – левая повернутая, ПП-правая повернутая, ЛР – левая радиальная, ПР-правая радиальная. Б) Стрелкой показана петля, которая у ВШМЯ образует латеральный контакт с соседней субъединицей (Clare, Pechnikova et al., 2015).

Выравнивание последовательностей белков оболочки ВТМ- и ВШМЯ-подобных вирусов показало, что между этими группами только небольшое количество остатков консервативно (Рисунок 40). И все аминокислоты, консервативные у *Tobamovirus* and *Hordeivirus*, располагаются в сходных позициях в пространстве при наложении структур ВШМЯ и ВТМ. Это особенно относится к большим ароматическим боковым цепям аминокислот из гидрофобной области, которые консервативны среди большинства палочкообразных вирусов. Среди таких аминокислот присутствуют Tyr14 (ВТМ:Tyr2), Trp33 (ВТМ:Trp17), Phe79 (ВТМ:Phe62), Phe98 (ВТМ:Tyr70 боковая цепь находится в пропивоположном направлении), Phe182 (ВТМ:Phe144), Leu188 (ВТМ:150) и Trp190 (ВТМ:Trp152). Таким образом, даже при небольшом количестве консервативных аминокислотных остатков сохраняется общий план сворачивания белка оболочки. Также есть остатки, которые являются консервативными в структуре гидрофобной области, например, Phe48 (ВТМ:Phe42) и Trp32 (ВТМ:Trp52). Другие стабильные остатки в большинстве своем несут заряд и вовлечены во взаимодействие с РНК, Arg122 и Asp157 (ВТМ: Arg92 и Asp116), или предположительно играют важную роль в стабилизации сворачивания белка (Рисунок 40).

Наибольшие отличия между ВШМЯ и ВТМ заключаются во вставках, присутствующих у ВШМЯ. Две из этих вставок образуют длинные петли: одна располагается в области внутреннего канала (аминокислотные остатки 141-152), а другая выходит из гидрофобной области около внешней поверхности вириона (остатки 84-94) (Рисунок 40). Третья вставка находится на N-конце (остатки 1-10) и расположена сверху гидрофобной области БО ВШМЯ (Рисунок 40).

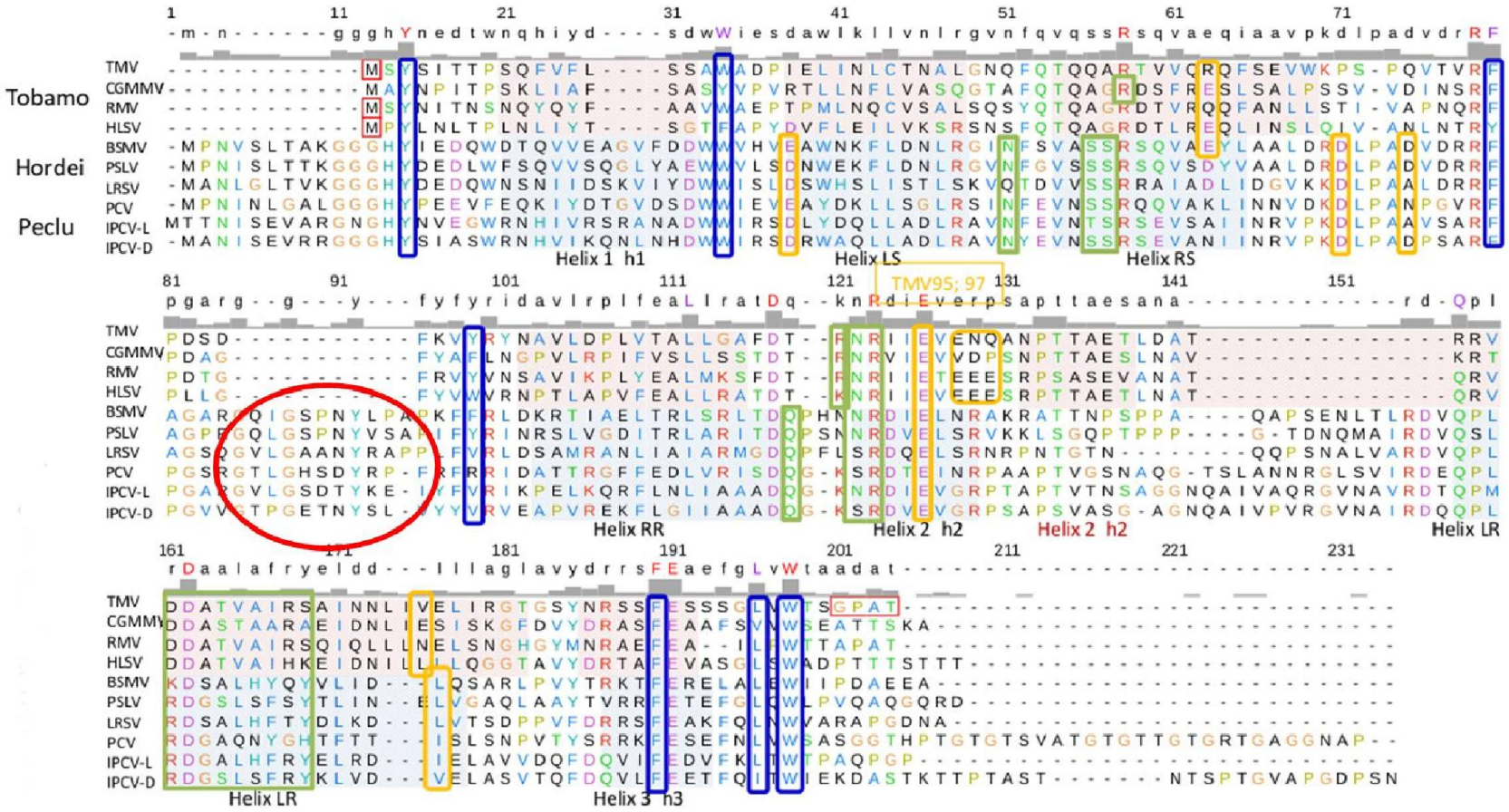
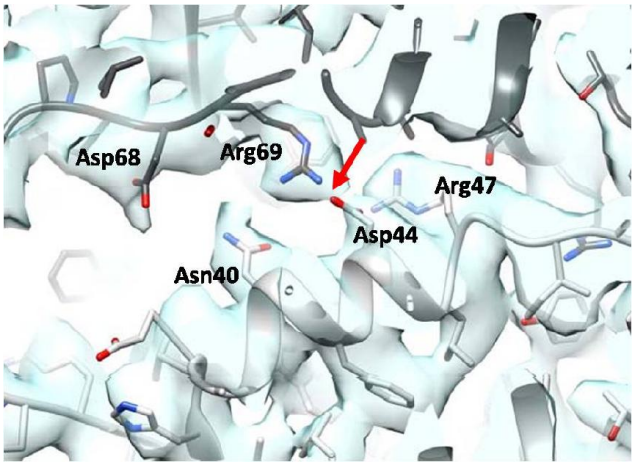


Рисунок 40. Выравнивание аминокислотных последовательностей БО некоторых палочкообразных вирусов. Красным овалом отмечена внутренняя петля, отсутствующая у тобамовирусов, которая у ВШМЯ образует контакт с соседней субъединицей (см. далее).

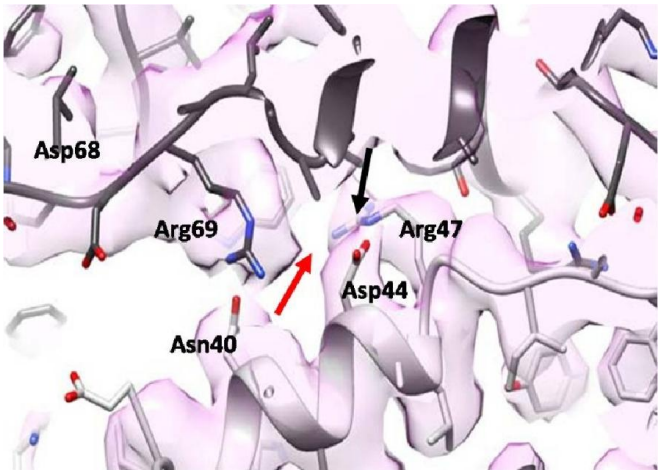
5. Контакты между субъединицами БО ВШМЯ

Структура мономера БО в широких и узких частицах ВШМЯ практически идентична, но контакты между субъединицами отличаются. БО в узкой частице по сравнению с широкой имеет два дополнительных солевых мостика, соединяющих соседние субъединицы (Asp44-Arg69, Glu125-Arg128) (Рисунок 41).

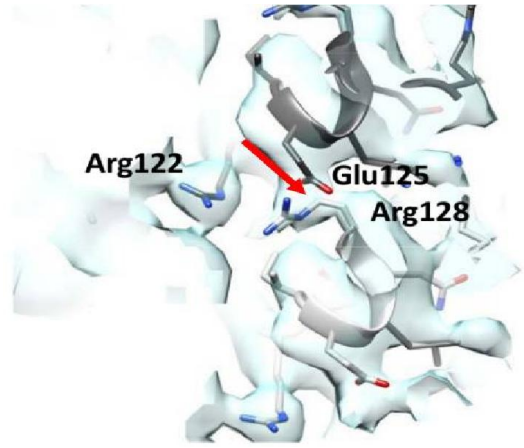
а) узкая частица



б) широкая частица



в) узкая частица



г) широкая частица

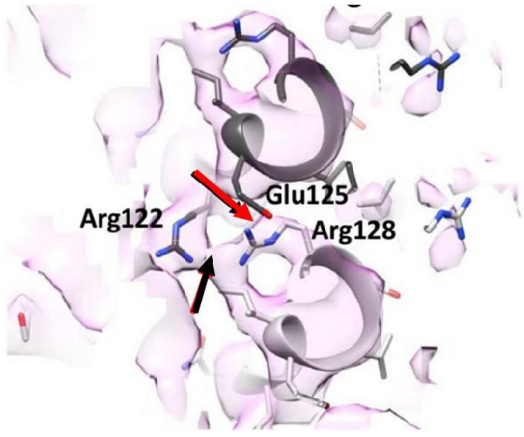


Рисунок 41. Латеральные солевые мостики между соседними субъединицами БО ВШМЯ. Контакт Asp44-Arg69 существует только у узкой частицы (а) показан красной стрелкой; у широкой частицы (б) этот контакт отсутствует (красная стрелка), вместо этого Asp44 образует солевой мостик с Arg47 той же самой субъединицы (черная стрелка). Контакт Glu125-Arg128 также существует только у узких частиц (в), отмечен красной стрелкой; этот контакт отсутствует у широких частиц (г), что отмечено красной стрелкой.

Эти 4 аминокислотных остатка консервативны у вируса ПЛВМ (Solovyev AG et al., 1996), но только пара Glu125-Arg128 консервативна у других, менее близкородственных, вирусов (ВКПЗ и др., (Adams et al., 2011); Рисунок 40). Два латеральных солевых мостика между соседними субъединицами есть в структуре TMV, CGMMV, RMV и HLSV, однако, образующие их ионные пары различаются у разных вирусов (TMV/RMV Arg113-Asp115 and Arg122-Asp88: CGMMV Arg113-Asp115 and Arg77-Glu130: HLSV His122-Asp88 and Arg31-Glu81 (Tewary et al., 2011)).

5.1 Латеральный контакт на внешней поверхности вириона

Петля (остатки 84-94), выходящая из гидрофобной области БО ВШМЯ, формирует своеобразную “руку”, которая образует латеральный контакт (ЛК) с соседней субъединицей вблизи внешней поверхности вириона (Рисунок 42).

ЛК является комбинацией заряженных и гидрофобных остатков: Tyr91, Ile86 из петли и Asp76, His13 и Lys9 из соседней субъединицы. Asp76 образует контакт с ароматическим кольцом Tyr91, Lys9 контактирует с главной цепью Tyr91, а His13 контактирует с Ile86 (Рисунок 43). Однако, эта область разрешилась не так хорошо, как гидрофобная или область α-спиралей

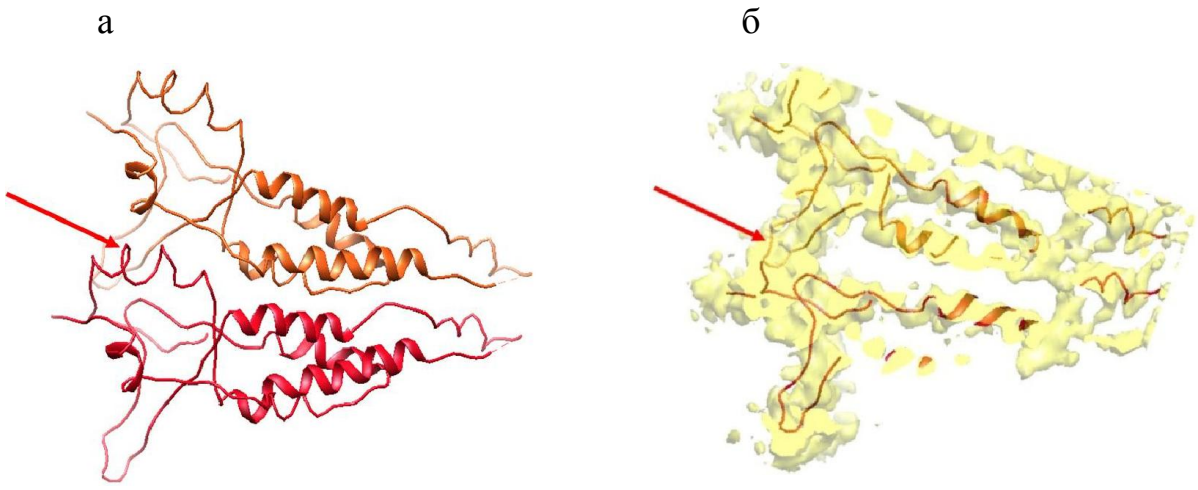


Рисунок 42. Петля (остатки 84-94), показана стрелкой, выходящая из гидрофобной области БО ВШМЯ, формирует ЛК с соседней субъединицей вблизи внешней поверхности вириона.

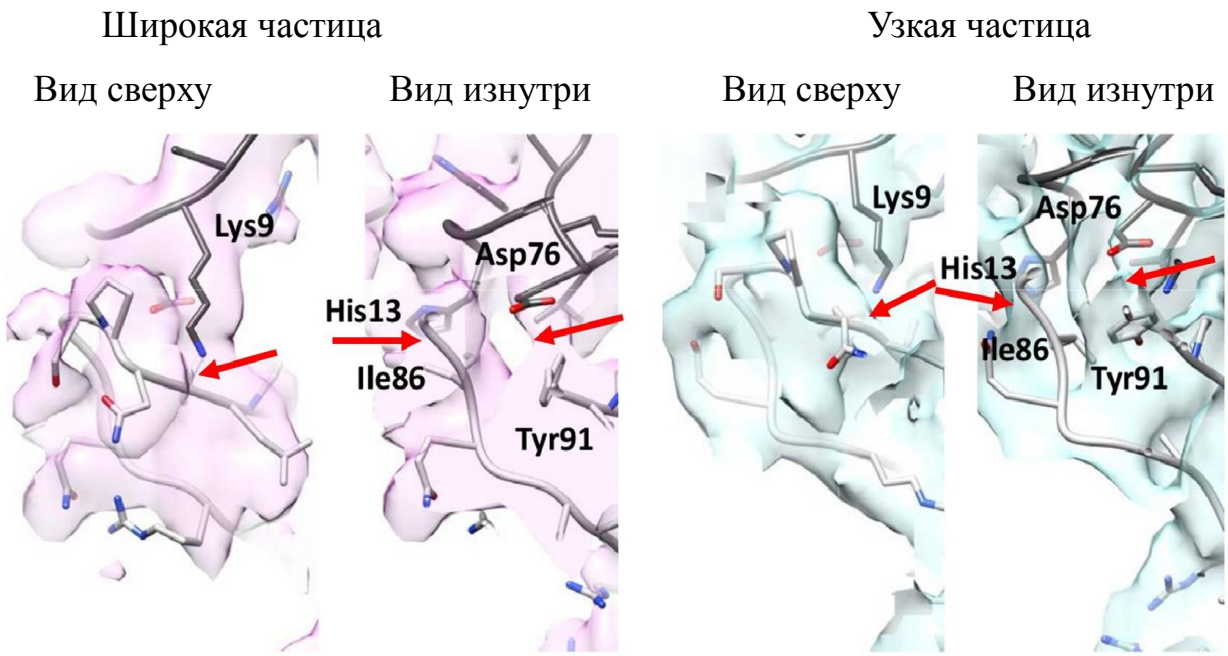


Рисунок 43. ЛК через петлю из гидрофобной сердцевины 84-94: предполагаемые места контактов: Lys9-Tyr91, Asp76-Tyr91, His13-Ile86 показаны стрелками (Clare, Pechnikova et al., 2015).

Следует отметить, что Tyr91, Ile86 (или Leu) и His13 являются консервативными у всех вирусов, обладающих подобной петлей, тогда как Lys9 и Asp76 консервативны только у ПЛВМ и ВКПЗ (Рисунок 40; Lys9 заменен на Arg у ИВРА). Сравнение аминокислотных последовательностей БО у 6 родов, входящих в семейство *Virgaviridae* показало, что все вирусы, кроме представителей рода *Tobamovirus* имеют вставку, которая потенциально может образовывать ЛК (Рисунок 40).

Для определения функциональной важности ЛК А.Г.Соловьевым и Е.В.Скуратом были созданы 2 мутанта по БО: у одного (BSMV-del10) удалили 10 аминокислот, входящих в состав петли, у другого (BSMV-IY/GG) - Ile86 и Tyr91, контактирующие с соседней субъединицей, заменили на остатки глицина (Рисунок 44а). Рекомбинантные вирусы, несущие мутантные гены БО, могли развивать системную инфекцию у растений *N. benthamiana* и накапливались в тех же количествах, что и обычный рекВШМЯ. Однако, в тканях зараженных растений не были обнаружены вирионы recBSMV-del10 и recBSMV-IY/GG

(Рисунок 44в, г), что говорит о том, что данные мутанты не способны образовывать стабильный вирион.

Следовательно, ЛК играет важнейшую роль в образовании и поддержании структуры вирионов ВШМЯ.

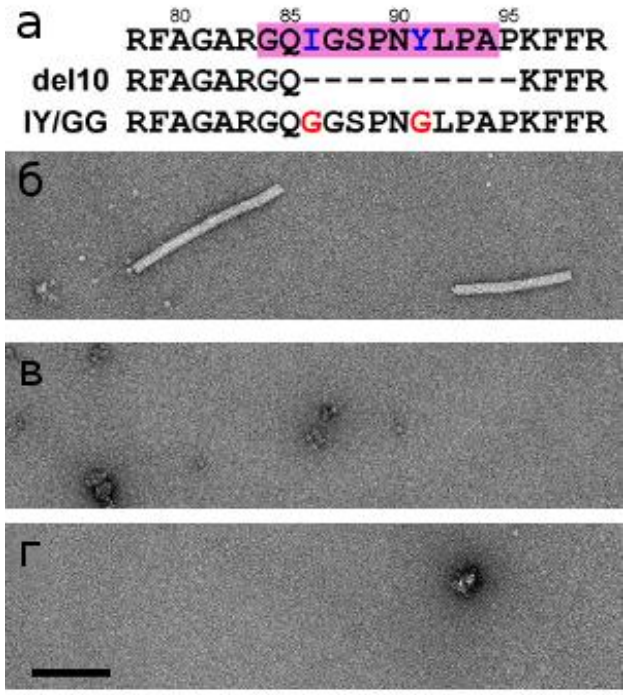


Рисунок 44. Делеционный анализ роли петли 84-94 в формировании вириона. А) Последовательность района петли в рекВШМЯ, с удаленной петлей и с двойной точечной мутацией; Б) рекВШМЯ с немодифицированным БО; В) recBSMV-del10, рекВШМЯ с удаленной петлей; Г) recBSMV -IY/GG, рекВШМЯ с мутациями в петле (Clare, Pechnikova et al., 2015).

5.2 Аксиальные контакты

У ВШМЯ можно предполагать наличие одного аксиального контакта между субъединицами (Tyr63-Arg103), однако электронная плотность для этого контакта выражена не явно (Рисунок 45).

Tyr63 консервативен в ВШМЯ и ПЛВМ, а Arg103 не консервативен ни у одного из родственных вирусов. У ВШМЯ меньше аксиальных контактов по сравнению с BTM, CGMMV и HLSV, которые имеют по 2 аксиальных солевых мостика. Однако, у представителей *Tobamovirus* аминокислоты, образующие

подобные контакты, различаются (Tewary et al., 2011). Это не дает возможности предсказать, имеют ли близкородственные к ВШМЯ вирусы аксиальные контакты между субъединицами.

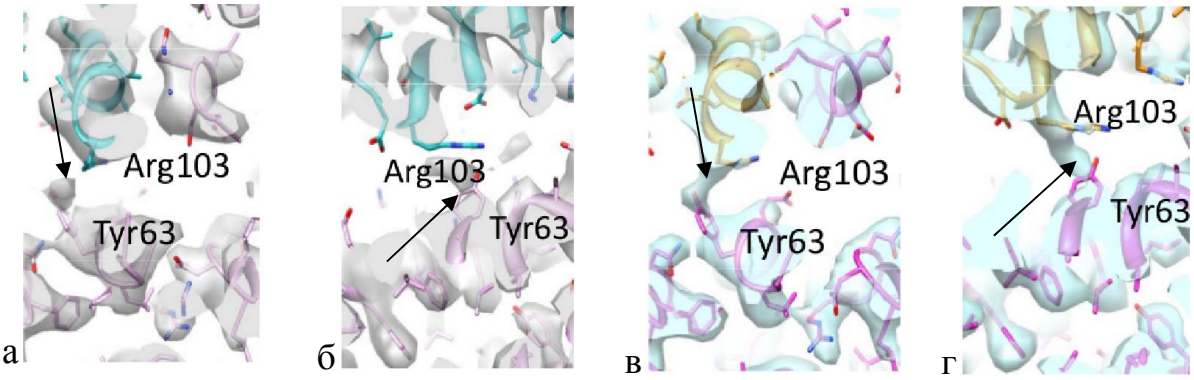


Рисунок 45. Предполагаемый аксиальный контакт между субъединицами БО ВШМЯ Tyr63-Arg103. а) Узкий класс, вид изнутри; б) узкий класс, вид сбоку; в) широкий класс, вид изнутри; г) широкий класс, вид сбоку (Clare, Pechnikova et al., 2015).

6. Взаимодействие БО ВШМЯ с РНК

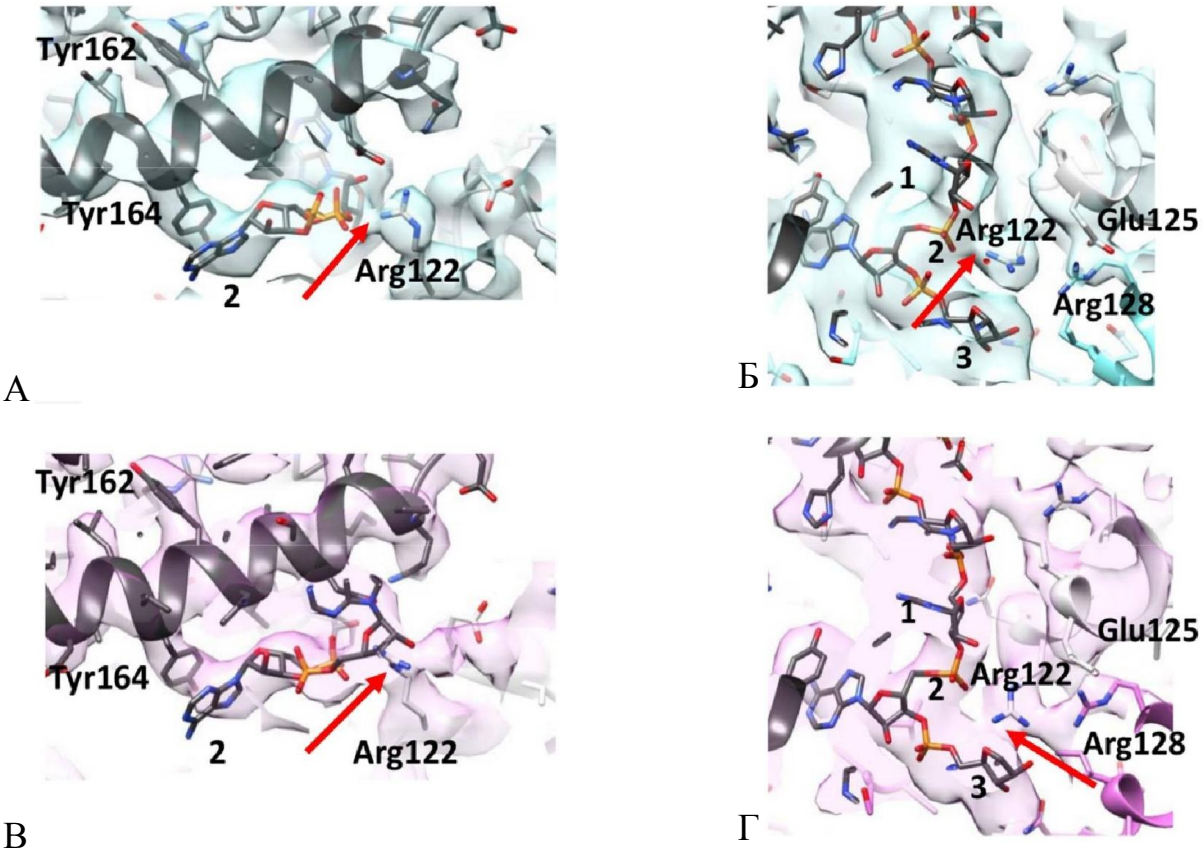
С РНК взаимодействуют сразу несколько аминокислотных остатков. Arg122 контактирует с фосфатным остовом РНК и у широкой и у узкой частиц ВШМЯ, что эквивалентно контакту Arg92 с РНК у ВТМ. Этот контакт несколько различается у широкой и узкой структур. В широкой частице Arg122 образует слабый контакт с фосфатным остовом нуклеотида 2 и более сильный контакт с кислородом сахарного остатка нуклеотида 3, и стабилизуруется Arg128 и Glu125 (Рисунок 46 в, г).

В узкой частице Arg122 располагается ближе к фосфатному остову нуклеотида 2, чем к сахарному остатку нулеотида 3, образуя сильный контакт с РНК (Рисунок 46 а, б). В узкой частице Arg128 и Glu125 не участвуют в стабилизации этого контакта и образуют солевой мостик между собой (Рисунок 41 г, в).

У ВШМЯ нет эквивалентов Arg90 ВТМ, который у ВТМ также взаимодействует с фосфатным остовом РНК (это видно только на структурах, полученных с использованием криоэлектронной микроскопии).

Следует заметить, что у ВШМЯ присутствует такое же удлинение RR (правой

радиальной) спирали, как у BTM, которое помогает стабилизировать взаимодействие белка с РНК (Sachse et al., 2007). Однако, т.к. у ВШМЯ нет эквивалентных Arg90 у BTM остатков, то образование РНК-аргининового сэндвича невозможно.



А Б

В Г

Рисунок 46. Контакт БО ВШМЯ с РНК.А-Б)Узкий класс: Arg122 контактирует с 2-ым фосфатом РНК, Arg128-Glu125 образуют солевой мостик между собой. В-Г) Широкий класс: Arg122 контактирует с 2-ым фосфатом РНК, Arg128-Glu125 образуют солевой мостик между собой.

Asp157 располагается под фосфатным остовом РНК (ближайшим является фосфат нуклеотида 2) и имеет плотный контакт с азотистым основанием нуклеотида 3 (Рисунок 47 а, г). Asp157 эквивалентен Asp116 BTM, который осуществляет похожий контакт, и консервативен у всех палочкообразных вирусов.

Leu160 образует у ВШМЯ гидрофобный контакт с азотистым основанием нуклеотида 1 (Рисунок 47 б, д). Аминокислоты с небольшой гидрофобной боковой цепью наблюдаются в этой позиции у большинства спиральных вирусов, что

может говорить о консервативности этого контакта. His161, расположенный на противоположной от Leu160 стороне спирали, взаимодействует с азотистым основанием нуклеотида 3 (Рисунок 47 б,д). Гистидин также присутствует у HLSV, ВКПЗ, но не у ПЛВМ, где он заменен на серин (Рисунок 40).

Tyr164 образует стэкинг с азотистым основанием нуклеотида 2 (Рисунок 47 в, е). Такое взаимодействие ранее не наблюдалось у палочкообразных вирусов. Тирозин в этой позиции консервативен у других гордеивирусов, а также у BPA. Стэкинг тирозина с азотистым основанием наблюдается в белке оболочки бактериофагов (Rumnieks and Tars, 2014).

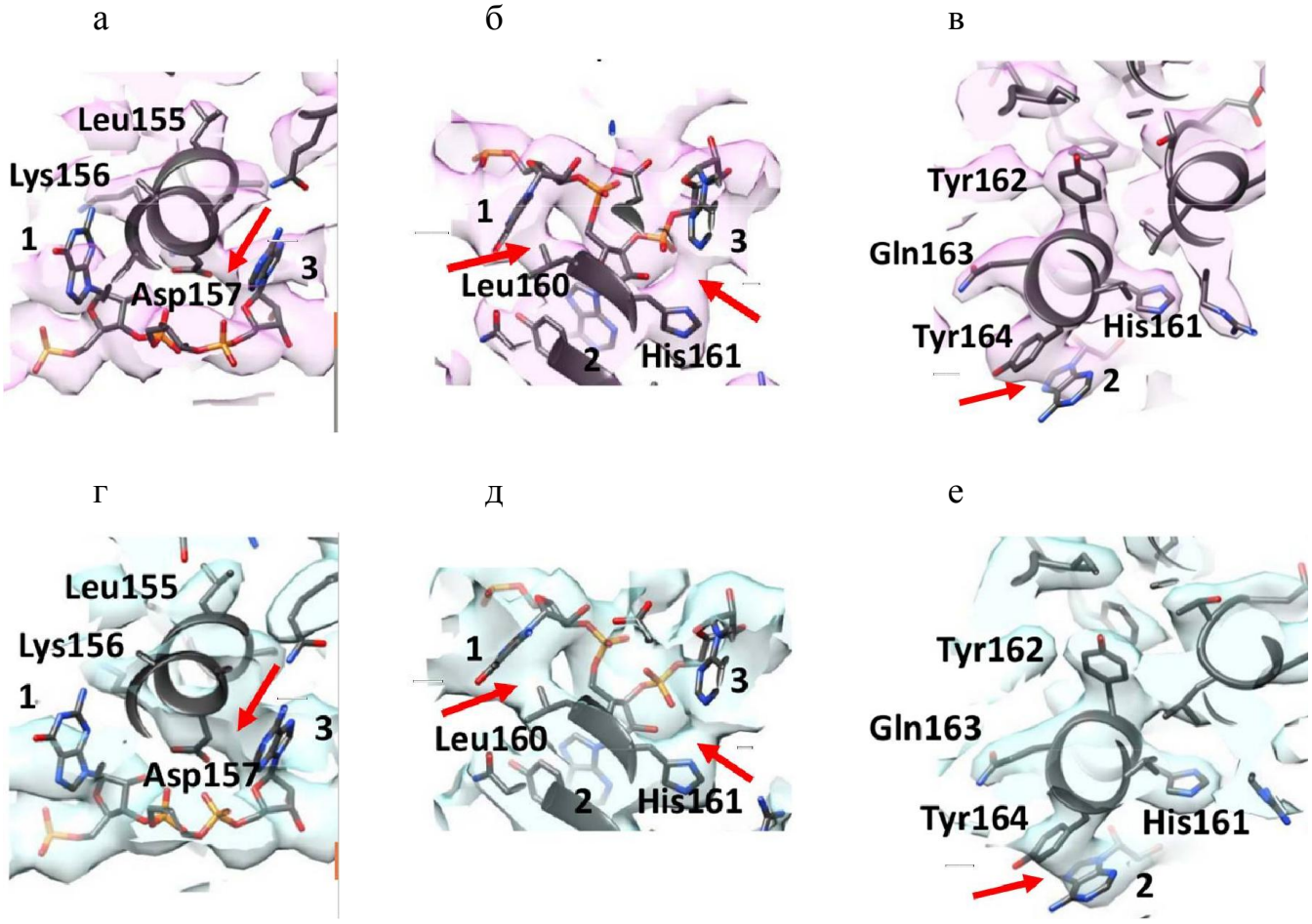


Рисунок 47. Контакты БО ВШМЯ с РНК. А-В) широкий класс. Г-Е) узкий класс (Clare, Pechnikova et al., 2015).

Эти взаимодействия стабилизируют РНК-связывающую область у ВШМЯ. Leu46 довольно консервативен у близкородственных вирусов, а Phe51 – у всех, кроме ВКПЗ. Leu111 консервативен у большинства палочкообразных вирусов, а

Leu166 – консеравтивен у ВШМЯ-подобных вирусов, но заменен на изолейцин у ВТМ-подобных (Рисунок 40). Ile49 и Leu114 не консервативны, но могут замещаться аминокислотами с небольшими гидрофобными боковыми цепями. Tyr162 представлен Tyr или Phe у других гордеивирусов, но заменен малыми гидрофобными остатками у тобамовирусов.

Вокруг РНК расположено некоторое количество гидрофильных/заряженых остатков. На той же субъединице, на которой расположена а.к. Arg122 (снизу от РНК), в непосредственной близости к РНК находятся Asn50, Ser55, Ser56 и Asn121. На субъединице, где контакт с РНК осуществляется за счет Asp157, Leu160, His161 и Tyr164, также располагаются Gln117, Lys156, Gln 153 и Gln163. Эти остатки образуют гидрофильное окружение для РНК в капсиде. Среди этих остатков некоторые консервативны у родственников ВШМЯ, или, как Aln50, Ser55, Ser56, Gln117, Gln153 и др., имеют консервативные замещения такие, как Lys156 на Arg. Asn121 консервативен и у ВТМ-подобных вирусов и представлен Asn91 у ВТМ; только Gln163 не консервативен.

7. Возможный механизм диссоциации капсида ВШМЯ

У ВТМ сбрасывание оболочки происходит за счет нарушения контактов с РНК в областях малого и большого радиуса вириона (Wang et al., 1998) в следствие образования дестабилизирующих карбоксилатов Каспара (КК) (Caspar and Namba, 1990) (подробно см. Глава 1, п. 4.3.2).

Потенциально у ВШМЯ кластер КК, сходный с таковым у ВТМ, может образовываться в области большого радиуса между Glu37 и Asp70 (расстояние между ними в широкой цастице 4.8 А) и между Glu37 и Asp74 (расстояние у широкой частицы 5.3 А) (Рисунок 48). Glu37 и Asp70 консервативны у ПЛВМ, ВКПЗ, ВРА и ИВРА, а Asp74 встречается только у ВШМЯ и ПЛВМ. Эти потенциальные КК находятся в непосредственной близости от солевого мостика Asp44-Agr69 и могут его нарушать. В узкой частице Glu37 расположен дальше от Asp70 и 74. Однако определить точное положение этой боковой цепи сложно, т.к. на картах (как узкой, так и широкой структур) нет плотности для боковой цепи

Glu37. Отсутствие электронной плотности боковых цепей отрицательно заряженых аминокислот является общим недостатком крио-ПЭМ карт, т.к. эти боковые цепи очень чувствительны к облучению (Sachse et al., 2007).

а б

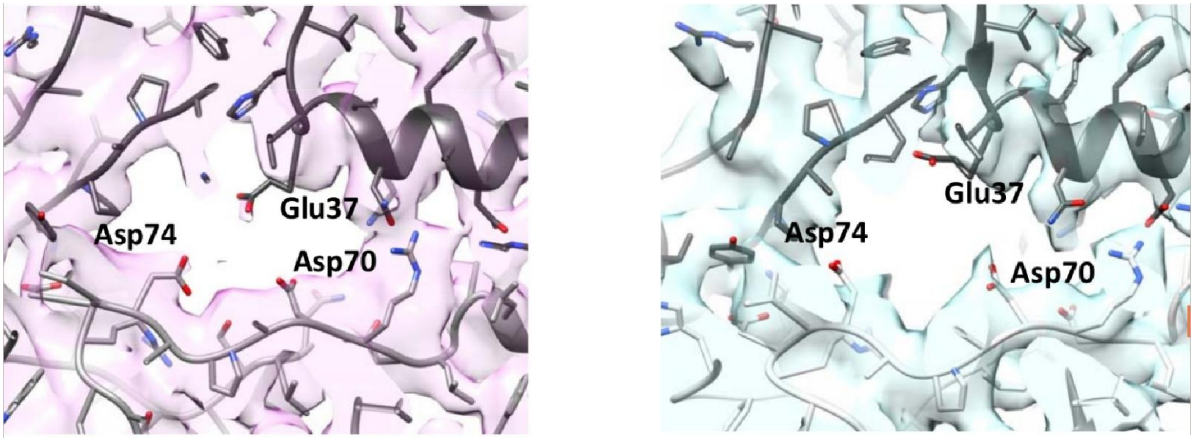


Рисунок 48. Возможные карбоксилаты Каспара в БО ВШМЯ. а) широкая частица. Б) узкая частица (Clare, Pechnikova et al., 2015).

У ВТМ КК присутствуют в области малого радиуса (Glu95, Glu97, Glu98, Glu99, Glu106, Glu46 и Glu130), но эти остатки не неконсервативны у ВШМЯ. Единственный консервативный остаток - Glu125 (ВТМ Glu95), и он образует солевой мостик с Arg128 в узкой частице. Arg128 консервативен у гордеивирусов, и можно предполагать, что подобный контакт присутствует у всех этих вирусов.

Таким образом, можно предполагать, что КК в области малого радиуса у ВШМЯ и его близких родственников отсутствуют, что говорит о том, что механизм диссоциации капсидау палочкообразных вирусов различается.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. ***Разработана методика получения круговых паттернов горения путем облучения белковых молекул высокой дозой электронов***. С помощью этой методики в капсидах бактериофагов EL и Lin68 было впервые обнаружено внутреннее тело. Показано, что внутренее тело фага EL по своим размерам и расположению отличается от внутреннего тела фагов phiKZ (Wu et al., 2012) и Lin68. Больший диаметр внутреннего тела, большее расстояние между нитями ДНК и, возможно, какие-либо неизвестные сигнальные факторы позволяют упаковать значительно меньший по размеру (по сравнению с phiKZ и Lin68) геном EL в капсид, равный по размерам у всех phiKZ-подобных бактериофагов.

Таким образом, у фага EL существует уникальная структура, которая организует значительно более короткую (по сравнению с phiKZ и Lin68) ДНК EL так, чтобы она заполняла весь капсид, что, скорее всего, также способствует растяжению прокапсида. Скорее всего, эту роль выполняет не только внутреннее тело, но также задействованы некоторые дополнительные факторы. Так, у многих бактериофагов упаковка ДНК зависит от портального белка (Johnson and Chiu, 2007; Tavares et al.,2012). Так что в будущем будет полезно исследовать структуру портального белка EL, и сравнить его с такими структурами у phiKZ, и других родственных фагов.

Следовательно, фаг EL, хотя и значительно отличается от фагов phiKZ и Lin68 полным отсутствием гомологии ДНК, меньшим размером генома и исмененными структурными белками, обладает важной сходной структурной особенностью - внутренним телом. Его наличие определенно доказывает родство phiKZ и EL. Другие общие существенные черты phiKZ и EL, а именно: идентичная морфология, отсутствие известных ДНК-полимераз и способность индуцировать псевдолизогенное состояние в зараженных бактериях, показывают, что EL следует рассматривать, как ранее и постулировалось (Крылов и Жазыков, 1978), в качестве члена рода "phiKZ-подобных" фагов. Уникальные особенности этого и других phiKZ-подобных фагов требуют продолжения структурных исследований.

2. ***Определена структура спирального вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) с субнанометровым разрешением***. Показано, что характер сворачивания белка оболочки ВШМЯ сходен с таковым у ВТМ, и некоторые важные остатки консервативны и находятся в одинаковых позициях. Это согласуется с определенной схожестью последовательностей БО ВШМЯ и ВТМ и тем, что их вирионы имеют сходный палочкообразный вид. БО ВШМЯ и ВТМ контактируют с РНК посредством боковых цепей консервативных аминокислот (Arg122 и Asp157 у ВШМЯ соответствуют Arg92 и Asp116 у ВТМ). Исходя из этого, можно предполагать, что рода *Hordeivirus* и *Tobamovirus* имеют общего предка, и относятся к одному семейству *Virgaviridae*.

Однако в структуре этих вирусов есть различия. Если вирион ВТМ стабилизируют латеральные и аксиальные солевые мостики между субъединицами (Tewary et al., 2011), то у ВШМЯ меньше (если имеются) аксиальных контактов, а латеральные солевые мостики существуют только у одной из 2 найденных структур вируса (обсуждается ниже).

3. ***Впервые показана способность вируса растений ВШМЯ образовывать две структурно различные формы вирионов***. Эти формы различаются по диаметру (216 Å узкая и 224 Å широкая частицы) и по количеству контактов между субъединицами. Ширина вирионов не зависит от инкапсидированной РНК. Основное различие между широким и узким вирионами - это наличие у узкой структуры двух латеральных солевых мостиков между остатками Asp44-Arg69 и Glu125-Arg128. В этом плане узкая частица более похожа на ВТМ и других тобамовирусов, т.к. большинство из них имеют два латеральных солевых мостика (Tewary et al., 2011). ЛК у узкой частицы также является более сильным, чем у широкой частицы. Arg122 взаимодействует с РНК по-разному у широкой и узкой структур. У широкой структуры, по-видимому, это взаимодействие слабее. Эти факторы приводят к тому, что узкая частица более стабильна, чем широкая.

4. ***У ВШМЯ открыт новый латеральный контакт (ЛК) в области внешней поверхности вириона, образованный гидрофобной петлей (остатки 84-94), одной субъединицы, и соседней субъединицей.*** Такой тип контакта не встречается у ВТМ, т.к. петля, осуществляющая контакт, отсутствует в его последовательности. Данный способ взаимодействия между субъединицами объясняет полученные раннее данные о том, что структура ВШМЯ более лабильна по сравнению с ВТМ (Makarov et al., 2013). Гидрофобные взаимодействия, которые участвуют в ЛК между субъединицами, объясняют также обнаруженную ранее большую чувствительность вирионов ВШМЯ к гидрофобным детергентам, например, SDS (Dobrov et al., 1972).

Делеция 10 нуклеотидов, удаляющая ЛК, а также мутация 2 аминокислот в составе ЛК блокируют образование вирионов, что подтверждает исключительную важность ЛК для сборки и/или стабилизации вирионов ВШМЯ. Сходный тип взаимодействия межу субъединицами недавно был обнаружен у вируса мозаики папайи (PapMV), гибкого нитчатого вируса из рода *Potexvirus*: БО PapMV имеет выдающееся “лассо”, образующее несколько гидрофобных контактов с соседней субъединицей (Yang et al., 2012). Сходство взаимодействий ВШМЯ и PapMV является только механическим, т.к. характер сворачивания белков оболочки этих вирусов сильно различен, а также взаимодействующее “лассо” образовано N-концом белка, в то время, как у ВШМЯ ЛК образован внутренней петлей БО. Тем не менее, принцип взаимодействия между субъединицами, открытый у ВШМЯ и PapMV, возможно, является общим для палочкообразных и нитчатых вирусов растений. В пользу этой гипотезы выступает то, что все из семейства *Virgaviridae*, за исключением рода *Tobamovirus*, имеют внутреннюю петлю, которая у ВШМЯ образует ЛК, и, возможно, этот район выполняет ту же самую функцию. Можно предположить также, что тобамовирусы потеряли петлю, соответствующую ЛК в процессе эволюции, и взамен выработали другой механизм стабилизации вирионов.

Существование общих принципов взаимодействия между субъединицами среди палочкообразных и гибких вирусов, которые состоят из структурно разных

БО с различным характером сворачивания белка, можно рассматрить как пример конвергенции в эволюции. Наличие ЛК у ВШМЯ может приводить к быстрой перестройке вируса в процессе активации трансляции или межклеточного транспорта.

5. ***Выдвинута гипотеза образования переходной формы вириона в процессе сбрасывания оболочки.*** Можно предположить, что широкая частица ВШМЯ является промежуточной формой на пути между стабильной узкой частицей и полным отделением белка оболочки и высвобождением РНК. У ВТМ существуют дестабилизирующие карбоксилаты Каспара (КК), ответственные за освобождение РНК в областях малого и большого радиуса (Wang et al., 1998). У ВШМЯ КК отсутствуют в районе малого радиуса, но потенциально могут присутствать в районе большого радиуса. Следовательно, ВШМЯ мог выработать альтернативный механизм сбрасывания белка оболочки, который включает образование промежуточной структуры вириона. Следует отметить, что структурный переход между двумя формами возможен за счет недостатка аксиальных контактов между субъединицами, в то время, когда у ВТМ форма вириона жестко зафиксирована двумя аксиальными солевыми мостиками. Также можно передоложить, что одновременное сосуществование двух форм вириона ВШМЯ является адаптивным преимуществом для вируса: одновременно в популяции вируса присутствуют и готовые для сбрасывания БО широкие частицы, и стабильные узкие частицы для переживания неблагоприятных условий. Для определения конкретных условий при которых может происходить переход между двумя формами вирионов ВШМЯ потребуются дальнейшие исследования.

ВЫВОДЫ

1. С помощью крио-ПЭМ и анализа изображений получены трехмерные структуры капсида ВШМЯ с разрешением 5,1-5,7Å; капсидов бактериофагов Lin68 и EL с разрешением 25Å.

2. Впервые показана способность ВШМЯ к образованию двух структурных форм вирионов. Открыт новый латеральный контакт в области внешней поверхности вириона, показана его необходимость для образования стабильных вирионов ВШМЯ.

3. Разработана методика детекции белков в контакте с нуклеиновыми кислотами с помощью облучения повышенной дозой электронов. Детектировано белковое внутреннее тело в капсиде гигантских phiKZ-подобных бактериофагов EL и Lin68. Линейные размеры внутреннего тела коррелируют с размерами генома гигантских бактериофагов.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атабеков, И.Г., Новиков, В.Н. (1966). Некоторые свойства нуклеопротеида вируса мозаики ячменя и его структурных компонентов. Биохимия. *31*, 157–166.

2. Буркальцева, М.В., Крылов, В.Н., Плетнева, Е.А., Шабурова, О.В., Крылов, С.В., Волкарт, Г., Сыкилинда, Н.Н., and Курочкина, Л.П. (2002). Феногенетическая характеристика группы гигантских фKZ подобных бактериофагов Pseudomonas aeruginosa. Генетика *38*, 1470–1479.

3. Джусупова, А.Б., Плотникова, Т.Г., and Крылов, В.Н. (1982). Выявление трансдукции вирулентным бактериофагом ФKZ хромосомальных маркеров Pseudomonas aeruginosa в присутствии плазмиды RMS148. Генетика *18*, 1799–1802.

4. Киселев Н.А., Кафтанова А.С., Новиков В.К., Атабеков И.Г. (1966). Исследование реполимеризации и ресинтеза вирусного белка некоторых палочковидных вирусов. Биохимия. *31*, 670–678.

5. Крылов, В.Н. (2003). Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий. Генетика *39*, 595–620.

6. Крылов, В.Н., Жазыков, И.Ж. (1978). Бактериофаг ФKZ Pseudomonas aeruginosa – возможная модель для изучения генетического контроля морфогенеза. Генетика *14*, 678–685.

7. Крылов, В.Н., Буркальцева, М.В., Сыкилинда, Н.Н., Плетнева, Е.А., Шабурова, О.В., Кадыков, В.А., Миллер, С., and Библ, М. (2004). Сравнение геномов новых гигантских фагов Pseudomonas aeruginosa из природных популяций разных регионов. Генетика *40*, 462–468.

8. Крылов, В.Н., Мирошников, К.А., Крылов, С.В., Вейко, В.П., Плетнева, Е.А., Шабурова, О.В., and Буркальцева, М.В. (2010). Межвидовая миграция и

эволюция бактериофагов рода phiKZ - цель и критерии поиска новых phiKZ-подобных бактериофагов. Генетика *46*, 159–167.

9. Крылов *В.Н.,* Смирнова *Т.А.,* Ребентиш. *Б.А.,* Миненкова *И.Б.* (1978). Структура частиц бактериофага phiKZ. Вопр. Вирусологии. *1*, 568–571.

10. Орлов, С.С. (1975) Теория трехмерной реконструкции. I. Условия полноты набора проекций. Кристаллография, *20, №3*, 511-515

11. Орлов, С.С. (1975) Теория трехмерной реконструкции. II. Оператор восстановления. Кристаллография*, 20, №4*, с.701-709

12. Плетенева Е.А., Крылов С.В., Шабурова О.В., Буркальцева М.В., Мирошников К.А., Крылов В.Н. (2010). Псевдолизогения бактерий Pseudomonas aeruginosa, инфицированных φKZ-подобными фагами. Генетика. *46, № 1*, 26-32.

13. Хренова, Е.А., Ахвердян, В.З., and Крылов, В.Н. (1984). Родство бактериофагов ФKZ и 21 Pseudomonas aeruginosa, обладающих уникальной нуклеопротеидной структурой в головке. Молекулярная Генетика, Микро-Биология и Вирусология 31–34.

14. Шабурова, О.В., Хертвелдт, К., де ла Круз, Д.М.А., Крылов, С.В., Плетенева, Е.А., Буркальцева, М.В., Лавиньи, Р., Волкарт, Г., and Крылов, В.Н. (2006). Сравнение новых гигантских бактериофагов ОВР и LU11 почвенных псевдомонад с бактериофагами супергруппы фKZ *Pseudomonas aeruginosa*. Генетика *42*, 1065–1074.

15. Ackermann, H.W., Cartier, C., Slopek, S., and Vieu, J.F. (1988). Morphology of Pseudomonas aeruginosa typing phages of the Lindberg set. Ann. Inst. Pasteur Virol. *139*.

16. Adams, M., Heinze, C., Jackson, A., Kreuze, J., Macfarlane, S., and Torrance, L. (2011). Family Virgaviridae. In Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, (USA: Elsevier), pp. 1139–1162.

17. Adams, M.H., and Anderson, E.S. (1959). Bacteriophages. [By] M.H. Adams. With chapters by E.S. Anderson [and others], etc. [With a bibliography.]. (Interscience Publishers: New York).

18. Adams, P.D., Mustyakimov, M., Afonine, P.V., and Langan, P. (2009). Generalized X-ray and neutron crystallographic analysis: more accurate and complete structures for biological macromolecules. Acta Crystallogr. Sect. D *65*, 567–573.

19. Agirrezabala, X., Martin-Benito, J., Caston, J.R., Miranda, R., Valpuesta, J.M., and Carrascosa, J.L. (2005). Maturation of phage T7 involves structural modification of both shell and inner core components. EMBO J. *24*, 3820–3829.

20. Agranovsky AA, Dolja VV, Kagramanova VK, and Atabekov JG (1979). The presence of a cap structure at the 5′-end of BSMV RNA. Virology *95*, 208.

21. Al-Amoudi, A., Chang, J.-J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L.M., Norlen, L.P.O., Richter, K., Blanc, N.S., Studer, D., and Dubochet, J. (2004). Cryo-electron microscopy of vitreous sections. EMBO J. *23*, 3583–3588.

22. Amos, L.A. (1975). Combination of data from helical particles: correlation and selection. J Mol Biol *99*, 65.

23. An H, Melcher U, Doss P, Payton M, Guenzi AC, and Verchot-Lubicz J (2003). Evidence that the 37 kDa protein of soil-borne wheat mosaic virus is a virus movement protein. J Gen Virol *84*, 3153.

24. Atabekov, J., Nikitin, N., Arkhipenko, M., Chirkov, S., and Karpova, O. (2011). Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. J. Gen. Virol. *92*, 453–456.

25. Atabekov, J.G., Novikov, V.K., Kiselev, N.A., Kaftanova, A.S., and Egorov, A.M. (1968). Stable intermediate aggregates formed by the polymerization of barley stripe mosaic virus protein. Virology *36*, 620–638.

26. Bair, C.L., and Black, L.W. (2007). A type IV modification dependent restriction

nuclease that targets glucosylated hydroxymethyl cytosine modified DNAs. J. Mol. Biol. 366, 768–778.

27. Bair, C.L., Rifat, D., and Black, L.W. (2007). Exclusion of glucosyl-hydroxymethylcytosine DNA containing bacteriophages is overcome by the injected protein inhibitor IPI*. J. Mol. Biol. 366, 779–789

28. Baker, T.S., and Cheng, R.H. (1996). A model-based approach for determining orientations of biological macromolecules imaged by cryoelectron microscopy. J Struct Biol *116*, 120.

29. Balcht, A., and Smith, R. (1994). Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment.

30. Beroukhim, R., and Unwin, N. (1997) Distortion correction of tubular crystals: improvements in the acetylcholine receptor structure.. Ultramicroscopy *70*, 57.

31. Bhushan, S., Hoffmann, T., Seidelt, B., Frauenfeld, J., Mielke, T., Berninghausen, O., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2011). SecM-stalled ribosomes adopt an altered geometry at the peptidyl transferase center. PLoS Biol. *9*.

32. Bhyravbhatla, B., Watowich, S.J., and Caspar, D.L. (1998). Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4-A resolution. Biophys. J. *74*, 604–615.

33. Black, L.W., and Thomas, J.A. (2012). Condensed genome structure. Adv. Exp. Med. Biol. *726*, 469–487.

34. Bloomer, A.C., Champness, J.N., Bricogne, G., Staden, R., and Klug, A. (1978). Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 A resolution showing the interactions within and between subunits. Nature *276*, 362–368.

35. Boisset, N., Penczek, P., Taveau, J.C., You, V., De Haas, F., and Lamy, J. (1998) Overabundant single-particle electron microscope views induce a three-dimentional reconstruction artifact. Ultramicroscopy *74*, 201.

36. Bracewell, R.N. (1956) Strip Integration in Radioastronomy. Aust J Phys *9*, 198.

37. Bragg, J.N., and Jackson, A.O. (2004). The C-terminal region of the barley stripe mosaic virus γb protein participates in homologous interactions and is required for suppression of RNA silencing. Mol Plant Pathol *5*, 465.

38. Carragher, B., Whittaker, M., and Milligan, R.A. (1996) Helical processing using PHOELIX.. J Struct Biol *116*, 107.

39. Carroll TW (1980). Barley stripe mosaic virus: its economic importance and control in Montana. Plant Dis *64*, 136.

40. Caspar, D.L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. *27*.

41. Caspar, D.L., and Namba, K. (1990). Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. Adv. Biophys. *26*, 157–185.

42. Cerritelli, M.E., Cheng, N., Rosenberg, A.H., McPherson, C.E., Booy, F.P., and Steven, A.C. (1997). Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. Cell *91*, 271–280.

43. Cheng, N., Wu, W., Watts, N.R., and Steven, A.C. (2014). Exploiting radiation damage to map proteins in nucleoprotein complexes: the internal structure of bacteriophage T7. J. Struct. Biol. *185*, 250–256.

44. Chiko, A.W. (1975). Evidence of multiple virion components in leaf-dip preparations of barley stripe mosaic virus. Virology *63*, 115–122.

45. Chiu, W., and Glaeser, R.M. (1977 Factors affecting high resolution fixed-beam transmission electron microscopy. Ultramicroscopy *2*, 207.

46. Clare, D.K., and Orlova, E.V. (2010). 4.6A Cryo-EM reconstruction of tobacco mosaic virus from images recorded at 300 keV on a 4k x 4k CCD camera. J. Struct. Biol. *171*, 303–308.

47. D. Clare, E. Pechnikova, E. Skurat, V. Makarov, O.S. Sokolova, A.G. Solovyev, E.V. Orlova. Novel inter-subunit contacts in Barley Stripe Mosaic Virus revealed by cryo-EM. – Structure 23: 1–12 (2015).

48. Crowther, R.A. (1971) Procedures for three-dimensional reconstruction of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. Philos Trans R Soc B *261*, 221.

49. Crowther, R.A., DeRosier, D.J., and Klug, A. (1970) The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. Proc R Soc Lond. Ser A *317*, 319.

50. Culver, J.N., Dawson, W.O., Plonk, K., and Stubbs, G. (1995). Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. Virology *206*, 724–730.

51. DeRosier, D.J., and Klug, A. (1968) Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. Nature *217*, 130.

52. DeRosier, D.J., and Moore, P.B. (1970) Reconstruction of threedimensional images from electron micrographs of structures with helical symmetry. J Mol Biol *52*, 355.

53. Dobrov, E.N., Kust, S.V., and Tikchonenko, T.I. (1972). The structure of single-stranded virus RNA in situ. A study of absorption spectra and optical rotatory dispersion of tobacco mosaic virus and potato virus X preparations. J. Gen. Virol. *16*, 161–172.

54. Donald RG, and Jackson AO (1996). RNA-binding activities of barley stripe mosaic virus γb fusion proteins. J Gen Virol *77*, 879.

55. Donald RG, Lawrence DM, and Jackson AO (1997). The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton βb protein is a multifunctional RNA binding protein. J Virol *71*, 1538.

56. Driedonks, R.A., Engel, A., tenHeggeler, B., and Driel, van (1981). Gene 20 product of bacteriophage T4 its purification and structure. J. Mol. Biol. *152*, 641–662.

57. Dube, P., Tavares, P., Lurz, R., and van Heel, M. (1993) The portal protein of bacteriophage SPP1: a DNA pump with 13-fold symmetry. EMBO J *12*, 1303.

58. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., Homo, J.C., Lepault, J., McDowall, A.W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. Q. Rev. Biophys. *21*.

59. Egelman, E.H. (2000). A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. Ultramicroscopy *85*, 225.

60. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *60*, 2126–2132.

61. Erickson, H.P., and Klug, A. (1971) Measurement and compensation of defocusing and aberrations by Fourier processing of electron micrographs. Philos Trans R Soc B *261*, 105.

62. Faruqi, A.R. (2009) Principles and prospects of direct high resolution electron image acquisition with CMOS detectors at low energies. J Phys Condens Matter *21*, 314004.

63. Finch, J.T. (1965). Preliminary X-ray diffraction studies on tobacco rattle and barley stripe mosaic viruses. J. Mol. Biol. *12*, 612–IN2.

64. Fokine, A., Battisti, A.J., Bowman, V.D., Efimov, A.V., Kurochkina, L.P., Chipman, P.R., Mesyanzhinov, V.V., and Rossmann, M.G. (2007). Cryo-EM study of the Pseudomonas bacteriophage phiKZ. Struct. Lond. Engl. 1993 *15*, 1099–1104.

65. Fokine, A., Chipman, P.R., Leiman, P.G., Mesyanzhinov, V.V., Rao, V.B., and Rossmann, M.G. (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 6003–6008.

66. Fokine, A., Kostyuchenko, V.A., Efimov, A.V., Kurochkina, L.P., Sykilinda, N.N., Robben, J., Volckaert, G., Hoenger, A., Chipman, P.R., Battisti, A.J., et al. (2005b). A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ

head. J. Mol. Biol. *352*, 117–124.

67. Fokine, A., Leiman, P.G., Shneider, M.M., Ahvazi, B., Boeshans, K.M., Steven, A.C., Black, L.W., Mesyanzhinov, V.V., and Rossmann, M.G. (2005a). Structural and functional similarities between the capsid proteins of bacteriophages T4 and HK97 point to a common ancestry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 7163–7168.

68. Frank, J. (2002). Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. *31*, 303–319.

69. Frank, J. (2006). Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies.

70. Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. J. Struct. Biol. *116*, 190–199.

71. Glaeser, R.M., and Taylor, K.A. (1978) Radiation damage relative to transmission electron microscopy of biological specimens at low temperature: a review. J Microsc *112*, 127.

72. Goddard, T.D., Huang, C.C., and Ferrin, T.E. (2007). Visualizing density maps with UCSF Chimera. J. Struct. Biol. *157*, 281–287.

73. Gonen, T., Cheng, Y., Sliz, P., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Harrison, S.C., and Walz, T. (2005) Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. Nature *438*, 633.

74. Gustafson G, and Armour SL (1986). The complete nucleotide sequence of RNA β from the type strain of barley stripe mosaic virus. Nucl Acids Res *14*, 3895.

75. Gustafson G, Armour SL, Gamboa GC, Burgett SG, and Shepherd JW (1989). Nucleotide sequence of barley stripe mosaic virus RNA α: RNA α encodes a single polypeptide with homology to corresponding proteins from other viruses and to the BSMV βb protein. Virology *170*, 370.

76. Gustafson G, Larkins BA, and Jackson AO (1981). Comparative analysis of polypeptides synthesized in vivo and in vitro by two strains of barley stripe mosaic virus. Virology *111*, 579.

77. Hagborg WAF (1954). Dwarfing of wheat and barley by the barley stripe mosaic (false stripe) virus. Can J Bot *32*, 24.

78. Halic, M., Becker, T., Pool, M.R., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Frank, J., and Beckmann, R. (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome.. Nature *427*, 808.

79. Hanszen, K.J. (1971) The optical transfer theory of the electron microscope: fundamental principles and applications. Adv Opt Microsc *4*, 1.

80. Harauz, G., and Van Heel, M.B. (1986) Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. Optik *73*, 146.

81. Harris, J.R., and Scheffler, D. (2002). Routine preparation of air-dried negatively stained and unstained specimens on holey carbon support films: a review of applications. Micron Oxf. Engl. 1993 *33*, 461–480.

82. Harrison, B.., Nixon, H.., and Woods, R.. (1965). Lengths and structure of particles of barley stripe mosaic virus. Virology *26*, 284–289.

83. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K.H. (1990a). An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. Biochem. Soc. Trans. *18*.

84. Henderson, R., Baldwin, J.M., Ceska, T.A., Zemlin, F., Beckmann, E., and Downing, K.H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-Resolution Electron Cryo-microscopy. J Mol Biol *213*, 899.

85. Herman, G.T. (1981). Image Reconstruction from Projections: The Fundamentals of Computerized Tomography.

86. Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2005). Genome comparison of Pseudomonas aeruginosa large phages. J. Mol. Biol. *354*, 536–545.

87. Heymann, J.B., Cheng, N., Newcomb, W.W., Trus, B.L., Brown, J.C., and Steven, A.C. (2003) Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. Nat Struct Biol *10*, 334.

88. Hud, N.V., and Downing, K.H. (2001). Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: the fine structure of DNA toroids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 14925–14930.

89. Hunter BG, Heaton LA, Bracker CE, and Jackson AO (1986). Structural comparison of poa semilatent virus and barley stripe mosaic virus. Phytopathology *75*, 322.

90. Hunter BG, Smith J, Fattouh F, and Jackson AO (1989). Relationship of lychnis ringspot virus to barley stripe mosaic virus and poa semilatent virus. Intervirology *30*, 18.

91. Ishii, T., and Yanagida, M. (1977). The two dispensable structural proteins (soc and hoc) of the T4 phage capsid; their purification and properties, isolation and characterization of the defective mutants, and their binding with the defective heads in vitro. J. Mol. Biol. 109.

92. Ishii, T., Yamaguchi, Y., and Yanagida, M. (1978). Binding of the structural protein soc to the head shell of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 120, 533–544.

93. J Jensen, G. (2010). Cryo-EM, Part A: sample preparation and data collection. Preface. Methods Enzymol. *481*.

94. Jackson, A., and Lane, L. (1981). Hordeiviruses. In Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis, (Amsterdam: Elsevier), pp. 565–625.

95. Jackson, A., Hunter, B., and Gustafson, G. (1989). Hordeivirus relationships and genome organization. Annu Rev Phytopathol *27*, 95.

96. Jackson, A.O., Lim, H.-S., Bragg, J., Ganesan, U., and Lee, M.Y. (2009). Hordeivirus Replication, Movement, and Pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. *47*, 385–422.

97. Jeng, T.W., Crowther, R.A., Stubbs, G., and Chiu, W. (1989). Visualization of alpha-helices in tobacco mosaic virus by cryo-electron microscopy. J. Mol. Biol. *205*, 251–257.

98. Jensen, G.J. (2010). Methods in Enzymology: Cryo-EM, Part C, Fitting.

99. Jezewska M (2001). Identification of barley stripe mosaic virus in Poland. J Plant Prot Res *41*, 164.

100. Johansen LK, and Carrington JC (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. Plant Phys *126*, 930.

101. Johnson, J.E., and Chiu, W. (2007). DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. Curr. Opin. Struct. Biol. *17*, 237–243.

102. Jolliffe, I.T. (1986). Principal Component Analysis. Springer, New York.

103. Kalinina NO, Rakitina DA, Yelina NE, Zamyatnin AA, and Stroganova TA (2001). RNA binding properties of the 63-kDa protein encoded by triple gene block of poa semilatent hordeivirus. J Gen Virol *82*, 2569.

104. Kalinina, N.O., Rakitina, D.V., Solovyev, A.G., Schiemann, J., and Morozov, S.Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. Virology *296*, 321.

105. Karam, J.D. (1994). Molecular Biology of Bacteriophage T4. (Washington, DC: American Society for Microbiology).

106. Karpova, O.V., Zayakina, O.V., Arkhipenko, M.V, Sheval, E.V., and Kiselyova, O.I. (2006). Potato virus X RNA-mediated assembly of single-tailed ternary “coat

protein-RNA-movement protein" complexes. J Gen Virol *87*, 2731.

107. Kendall, A., Williams, D., Bian, W., Stewart, P.L., and Stubbs, G. (2013). Barley stripe mosaic virus: structure and relationship to the tobamoviruses. Virology *443*, 265–270.

108. Kirkland, A., Chang, L.-Y., Haigh, S., and Hetherington, C. (2008) Transmission electron microscopy without aberrations: Applications to materials science. Curr Appl Phys *8*, 425.

109. Kiselev, N.A., DeRosier, D.J., and Atabekov, J.G. (1969). A double-helical structure found on the re-aggregation of the protein of barley stripe mosaic virus. J. Mol. Biol. *39*, 673–674.

110. Klaholz, B.P., Myasnikov, A.G., and Van Heel, M. (2004) Visualization of release factor 3 on the ribosome during termination of protein synthesis. Nature *427*, 862.

111. Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. *354*, 531–535.

112. Knapek, E., and Dubochet, J. (1980) Beam damage to organic material is considerably reduced in cryo-electron microscopy. J Mol Biol *141*, 147.

113. Koklu G (2004). Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. Phytoprotection *85*, 19.

114. Koonin EV, and Dolja VV (1993). Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. Crit Rev Biochem Mol Biol *28*, 375.

115. Koonin EV, Boyko VP, and Dolja VV (1991). Small cysteine-rich proteins of different groups of plant RNA viruses are related to different families of nucleic acid-binding proteins. Virology *181*, 395.

116. Koshland, D., Simmons, H., and Watson, J. (1958). Absence of Phosphotriester

Linkages in Tobacco Mosaic Virus. J. Am. Chem. Soc. 105–107.

117. Krylov, V.N., Dela Cruz, D.M., Hertveldt, K., and Ackermann, H.-W. (2007). "phiKZ-like viruses", a proposed new genus of myovirus bacteriophages. Arch. Virol. *152*, 1955–1959.

118. Krylov, V.N., Smirnova, T.A., Minenkova, I.B., Plotnikova, T.G., Zhazikov, I.Z., and Khrenova, E.A. (1984). Pseudomonas bacteriophage phi KZ contains an inner body in its capsid. Can. J. Microbiol. *30*, 758–762.

119. Kumari SG, Muharram I, Makkouk KM, Al-Ansi A, and El-Pasha R (2006). Identification of viral diseases affecting barley and bread wheat crops in Yemen. Australasian. Plant Pathol *35*, 563.

120. Lavigne, R., Darius, P., Summer, E.J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A.S., Ackermann, H.W., and Kropinski, A.M. (2009). Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. BMC Microbiol. *9*.

121. Lawrence C. M., Menon S., Eilers B. J., Bohner B., Khayat R., Douglas T., Young M. J.(2009). «Structural and functional studies of archaeal viruses». J. Biol. Chem. 284 (19), 12599–603

122. Lawrence D. M., and Jackson A.O. (2001). Requirements for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus in monocot and dicot hosts. Mol Plant Pathol *2*, 65.

123. Lebart, L., Morineau, A., and Warwick, K.M. (1984). Multivariate Descriptive Statistical Analysis.

124. Lecoutere, E., Ceyssens, P.-J., Miroshnikov, K.A., Mesyanzhinov, V.V., Krylov, V.N., Noben, J.-P., Robben, J., Hertveldt, K., Volckaert, G., and Lavigne, R. (2009). Identification and comparative analysis of the structural proteomes of phiKZ and EL, two giant Pseudomonas aeruginosa bacteriophages. Proteomics *9*, 3215–3219.

125. Leiman, P.G., Chipman, P.R., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V.V., and

Rossmann, M.G. (2004). Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. Cell 118, 419–429.

126. Lin, N.S., and Langenberg, W.G. (1985). Peripheral vesicles in proplastids of barley stripe mosaic virus infected wheat cells contain double-stranded RNA. Virology *142*, 291.

127. Lucic, V., Leis, A., and Baumeister, W. (2008). Cryo-electron tomography of cells: connecting structure and function. Histochem. Cell Biol. *130*, 185–196.

128. Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., and Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. J. Struct. Biol. *128*.

129. Lyumkis, D., Moeller, A., Cheng, A., Herold, A., Hou, E., Irving, C., Jacovetty, E.L., Lau, P.W., Mulder, A.M., Pulokas, J., et al. (2010). Methods Enzym. *483*, 291.

130. Makarov, V.V., Skurat, E.V., Semenyuk, P.I., Abashkin, D.A., Kalinina, N.O., Arutyunyan, A.M., Solovyev, A.G., and Dobrov, E.N. (2013). Structural lability of Barley stripe mosaic virus virions. PloS One *8*.

131. Matsko, N., Manykin, A., Klimenko, S., Klinov, D., Demin, V. (2001) Atomic force microscopy analysis of bacteriophages φKZ and T4. Journal of Electron Microscopy *50(5)*, 417-422.

132. McIntosh, R., Nicastro, D., and Mastronarde, D. (2005). New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. Trends Cell Biol. *15*.

133. McKinney, H. H. (1951). A seed-borne virus causing false-stripe in barley. Phytopathology *41*, 563.

134. McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D., Henderson R. (2014) Comparison of optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. Ultramicroscopy *147*, 156-163

135. McMullan, G., Faruqi, A. R., Clare, D., Henderson R. (2014) Comparison of

optimal performance at 300 keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy. Ultramicroscopy. *147*, 156–163.

136. Melcher U (2000). The “30K” superfamily of viral movement proteins. J Gen Virol *81*, 257.

137. Mesterhazy A, Gaborjanyi R, Papp M, and Fonad P (2002). Multiple virus infection of wheat in South Hungary. Cereal Res Comm *30*, 329.

138. Mesyanzhinov, V.V., Robben, J., Grymonprez, B., Kostyuchenko, V.A., Bourkaltseva, M.V., Sykilinda, N.N., Krylov, V.N., and Volckaert, G. (2002). The genome of bacteriophage phiKZ of Pseudomonas aeruginosa. J. Mol. Biol. *317*.

139. Milazzo, A.C., Moldovan, G., Lanman, J., Jin, L., Bouwer, J.C., Klienfelder, S., Peltier, S.T., Ellisman, M.H., Kirkland, A.I., and Xuong, N.H. (2010) Characterization of a direct detection device imaging camera for transmission electron microscopy.. Ultramicroscopy *110*, 744.

140. Mindell, J.A., and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. J. Struct. Biol. *142*, 334–347.

141. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., and Unwin, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 A resolution: transverse tunnels in the channel wall. J. Mol. Biol. *288*, 765–786.

142. Morais, M.C., Kanamaru, S., Badasso, M.O., Koti, J.S., Owen, B.A.L., McMurray, C.T., Anderson, D.L., and Rossmann, M.G. (2003). Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly. Nat. Struct. Biol. 10, 572–576.

143. Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., and Debarbieux, L. (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. PloS One *6*.

144. Morozov SY, and Solovyev AG (2003). Triple gene block: modular design of a

multifunctional machine for plant virus movement. J Gen Virol *84*, 1351.

145. Namba, K., Pattanayek, R., and Stubbs, G. (1989). Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 A resolution by X-ray fiber diffraction. J. Mol. Biol. *208*, 307–325.

146. Orlova, E.V., and Saibil, H.R. (2010). Methods for three-dimensional reconstruction of heterogeneous assemblies. Methods Enzymol. *482*, 321–341.

147. Orlova, E.V., and Saibil, H.R. (2011). Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. Chem. Rev. *111*, 7710–7748.

148. Orlova, E.V., van Heel, M., Jouffrey, B., and Colliex, C. (1994). Proc. 13th Int. Congress Electron Microsc.

149. Pattanayek, R., and Stubbs, G. (1992). Structure of the U2 strain of tobacco mosaic virus refined at 3.5 A resolution using X-ray fiber diffraction. J. Mol. Biol. *228*, 516–528.

150. Penczek, P. (2010). Methods in Enzymology: Cryo-EM, Part B, 3-D Reconstruction.

151. Penczek, P., Radermacher, M., and Frank, J. (1992) Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. Ultramicroscopy *40*, 33.

152. Penczek, P.A. (2002) Three-dimensional spectral signal-to-noise ratio for a class of reconstruction algorithms. J Struct Biol *138*, 34.

153. Penczek, P.A., Frank, J., and Spahn, C.M. (2006) A method of focused classication, based on the bootstrap 3D variance analysis, and its application to EF-G-dependent translocation. J Struct Biol *154*, 184.

154. Penczek, P.A., Grasucci, R.A., and Frank, J. (1994) The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation renement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles. Ultramicroscopy *53*, 251.

155. Pepin, K.M., Domsic, J., and McKenna, R. (2008). Genomic evolution in a virus under specific selection for host recognition. Infect Genet Evol *8(6)*, 825–834.

156. Petrov, A.S., and Harvey, S.C. (2008). Packaging double-helical DNA into viral capsids: structures, forces, and energetics. Biophys. J. *95*.

157. Petty IT, and Jackson AO (1990). Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA β. Virology *179*, 712.

158. Petty IT, French R, Jones RW, and Jackson AO (1990). Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. EMBO J *9*, 3453.

159. Petty, I., Hunter, B., Wei, N., and Jackson, A. (1989). Infectious barley stripe mosaic virus RNA transcribed from full-length genomic cDNA clones. Virology *171*, 342.

160. Petukhova, N.V., Gasanova, T.V., Stepanova, L.A., Rusova, O.A., Potapchuk, M.V., Korotkov, A.V., Skurat, E.V., Tsybalova, L.M., Kiselev, O.I., Ivanov, P.A., et al. (2013). Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by Tobacco mosaic virus-based vectors. Curr. Pharm. Des. *19*, 5587–5600.

161. Purohit, P.K., Inamdar, M.M., Grayson, P.D., Squires, T.M., Kondev, J., and Phillips, R. (2005). Forces during bacteriophage DNA packaging and ejection. Biophys. J. *88*, 851–866.

162. Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., and Frank, J. (1987) Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli. J Microsc *146*, 113.

163. Radermacher, M.J. (1988) Three-Dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. Electron Microsc Tech *9*, 359.

164. Radon, J. (1917) Berichte der Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften,

Leipzig,. Math Phys Kl. *69*, 262.

165. Ramanchandran, G.N., and Lakshminarayanan, A.V. (1971) Three dimensional reconstruc-tions from radiographs and electron micrographs: Application of convolution instead of fourier transforms. Proc Natl Acad Sci USA *68*, 2236.

166. Rao, V.B., and Black, L.W. (2010). Structure and assembly of bacteriophage T4 head. Virol. J. 7.

167. Reimer, L., and Kohl, H. (2008). Transmission Electron Microscopy – Physics of Image Formation.

168. Rifat, D., Wright, N.T., Varney, K.M., Weber, D.J., and Black, L.W. (2008). Restriction endonuclease inhibitor IPI* of bacteriophage T4: a novel structure for a dedicated target. J. Mol. Biol. 375, 720–734.

169. Roseman, A.M. (2000) Docking structures of domains into maps from cryo-electron microscopy using local correlation. Acta Crystallogr Sect Biol Crystallogr *56*, 1332.

170. Rosenthal, P.B., and Henderson, R. (2003) Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. J Mol Biol *333*, 721.

171. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat. Protoc. *5*, 725–738.

172. Rumnieks, J., and Tars, K. (2014). Crystal structure of the bacteriophage Qbeta coat protein in complex with the RNA operator of the replicase gene. J. Mol. Biol. *426*, 1039–1049.

173. Sachse, C., Chen, J.Z., Coureux, P.-D., Stroupe, M.E., Fandrich, M., and Grigorieff, N. (2007). High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. J. Mol. Biol. *371*, 812–835.

174. Saibil, H.R. (2000). Macromolecular structure determination by cryo-electron microscopy. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *56*, 1215–1222.

175. Sambrook, J., Russell, D.W. (David W., and Cold Spring Harbor Laboratory (2001). Molecular cloning : a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory).

176. Savenkov EI, Solovyev AG, and Morozov SY (1998). Genome sequences of poa semilatent and lychnis ringspot hordeiviruses. Arch Virol *143*, 1379.

177. Saxton, W.O., and Baumeister, W. (1982) The correlation averaging of a regularly arranged bacterial envelope protein. J Microsc *127*, 127.

178. Saxton, W.O., and Frank, J. (1977) Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation. Ultramicroscopy *2*, 219.

179. Scheres, S.H., Gao, H., Valle, M., Herman, G.T., Eggermont, P.P., Frank, J., and Carazo, J.M. (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. Nat Methods *4*, 27.

180. Shaburova, O.V., Pleteneva, E.A., Hertveldt, K., and Krylov, V.N. (2008). Comparison of DNA sizes in a group of giant Pseudomonas aeruginosa phages by the PFGE method. Genetika *44*, 713–716.

181. Shaikh, T.R., Gao, H., Baxter, W.T., Asturias, F.J., Boisset, N., Leith, A., and Frank, J. (2008). SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. Nat. Protoc. *3*, 1941–1974.

182. Shepp, L.S., and Logan, B.F. (1974) The Fourier reconstruction of a head section. IEEE Trans Nucl Sci *NS-21*, 21.

183. Sherman, M.B., Orlova, E.V., Terzyan, S.S., Kleine, R., and Kiselev, N.A. (1981). On the negative straining of the protein crystal structure. Ultramicroscopy *7*, 131–138.

184. Slack SA, Shepherd RJ, and Hall DH (1975). Spread of seed-borne barley stripe

mosaic virus and effects of the virus on barley in California. Phytopathology *65*, 1218.

185. O.S.Sokolova, O.V.Shaburova, E.V. Pechnikova, A.K. Shaytan, S.V. Krylov, N.A. Kiselev, V.N. Krylov. Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of P. aeruginosa. –Virology 468-470:472–478 (2014).

186. Solovyev AG, Savenkov EI, Agranovsky AA, and Morozov SY (1996). Comparisons of the genomic cis-elements and coding regions in RNA beta components of the hordeiviruses barley stripe mosaic virus, lychnis ringspot virus, and poa semilatent virus. Virology *219*, 9.

187. Sorzano, C.O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H., Carazo, J.M., and Pascual-Montano, A. (2004). J Struct Biol *148*, 194.

188. Sousa, D., and Grigorieff, N. (2007) Ab initio resolution measurement for single particle structures. J Struct Biol *157*, 201.

189. Spence, J.C.H. (2003). High Resolution Microscopy. Oxford University Press, 3rd Ed.

190. Stewart, M. (1988). Computer image processing of electron micrographs of biological structures with helical symmetry. J. Electron Microsc. Tech. *9*, 325–358.

191. Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S.J. (2007) EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. J Struct Biol *157*, 38.

192. Tewary, S.K., Oda, T., Kendall, A., Bian, W., Stubbs, G., Wong, S.-M., and Swaminathan, K. (2011). Structure of hibiscus latent singapore virus by fiber diffraction: a nonconserved his122 contributes to coat protein stability. J. Mol. Biol. *406*, 516–526.

193. Thomas, J.A., Rolando, M.R., Carroll, C.A., Shen, P.S., Belnap, D.M., Weintraub, S.T., Serwer, P., and Hardies, S.C. (2008). Characterization of Pseudomonas

chlororaphis myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. Virology *376*, 330–338.

194. Thomas, J.A., Weintraub, S.T., Wu, W., Winkler, D.C., Cheng, N., Steven, A.C., and Black, L.W. (2012). Extensive proteolysis of head and inner body proteins by a morphogenetic protease in the giant Pseudomonas aeruginosa phage phiKZ. Mol. Microbiol. *84*, 324–339.

195. Thon, F., and Valdre, U. (1971). Phase Contrast Electron Microscopy. Electron Microscopy in Materials Science.

196. Timian, R.G., and Sisler, W. (1955). Prevalence, sources of resistance, and inheritance of resistance to barley stripe mosaic (false stripe). Plant Reptr *39*, 550–552.

197. Topf, M., Lasker, K., Webb, B., Wolfson, H., Chiu, W., and Sali, A. (2008). Protein structure fitting and refinement guided by cryo-EM density. Struct. Lond. Engl. 1993 *16*.

198. Toyoshima, C., and Unwin, N. (1988) Contrast transfer for frozen-hydrated specimens: determination from pairs of defocused images. Ultramicroscopy *25*, 279.

199. Unser, M., Trus, B.L., and Steven, A.C. (1987) A new resolution criterion based on spectral signal-to-noise ratio. Ultramicroscopy *23*, 39.

200. Unwin, P.N. (1974) Electron microscopy of the stacked disc aggregate of tobacco mosaic virus protein. II. The influence of electron irradiation on the stain distribution. J Mol Biol *87*, 657.

201. Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., and Frank, J. (2003). Cell *114*, 123.

202. Van Heel, M., and Frank, J. (1981) Locking and unlocking of ribosomal motions. Ultramicroscopy *6*, 187.

203. Van Heel, M., and Schatz, M. (2005) Fourier shell correlation threshold criteria. J Struct Biol *151*, 250.

204. Van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E.V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M., et al. (2000). Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. Q. Rev. Biophys. *33*, 307–369.

205. Van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E.V., Schmidt, R., and Schatz, M. (1996). A new generation of the IMAGIC image processing system. J. Struct. Biol. *116*.

206. Van Heel, M., Orlova, E.V., Harauz, G., Stark, H., Dube, P., Zemlin, F., and Schatz, M. (1997) Angular reconstitution in 3D electron microscopy: practical and technical aspects. Scanning Microsc *11*, 195.

207. Van Heel, M., Portugal, R., Schatz, M., Orlova, E., and Verkleij, A. (2009). Handbook on DVD 3D-EM in Life Sciences.

208. Veerisetty, V. (1978). Relationships among structural parameters of virions of helical symmetry. Virology *84*, 523–529.

209. Wang, G.R., Vianelli, A., and Goldberg, E.B. (2000). Bacteriophage T4 self-assembly: in vitro reconstitution of recombinant gp2 into infectious phage. J. Bacteriol. 182, 672–679.

210. Wang, H., Planchart, A., and Stubbs, G. (1998). Caspar carboxylates: the structural basis of tobamovirus disassembly. Biophys. J. *74*, 633–638.

211. White, H.E., Orlova, E.V., Chen, S., Wang, L., Ignatiou, A., Gowen, B., Stromer, T., Franzmann, T.M., Haslbeck, M., Buchner, J., Saibil, H.R. (2006) Multiple distinct assemblies reveal conformational flexibility in the small heat shock protein Hsp26. Structure *14*, 1197.

212. Wolf, M., Garcea, R.L., Grigorieff, N., and Harrison, S.C. (2010). Subunit interactions in bovine papillomavirus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 6298–6303.

213. Wommack, K. E., Colwell, R. R. (2000) Viroplankton: viruses in aquatic ecosystems. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64 (1)*, 69-114

214. Wright KM, Wood NT, Roberts AG, Chapman S, and Boevink P (2007). Targeting of TMV movement protein to plasmodesmata requires the actin/ER network; evidence from FRAP. Traffic *8*, 21.

215. Wu, W., Thomas, J.A., Cheng, N., Black, L.W., and Steven, A.C. (2012). Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage phiKZ. Science *335*.

216. Yang, S., Wang, T., Bohon, J., Gagne, M.-E.L., Bolduc, M., Leclerc, D., and Li, H. (2012). Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. J. Mol. Biol. *422*, 263–273.

217. Yang, Z., and Penczek, P.A. (2008) Cryo-EM image alignment based on nonuniform fast Fourier transform. Ultramicroscopy *108*, 959.

218. Yu, T.-Y., and Schaefer, J. (2008). REDOR NMR characterization of DNA packaging in bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 382, 1031–1042.

219. Zamyatnin, A. A., Solovyev, A. G., Bozhkov, P. V., Valkonen, J. P.T., Morozov, S. Yu. and Savenkov, E. I. (2006). Assessment of the integral membrane protein topology in living cells. Plant J *46*, 145.

220. Zaneveld, J.R., Nemergut, D.R., and Knight, R. (2008). Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism based studies of HGT patterns. Microbi Ology *154*, 1–15.

221. Zhang, X., Jin, L., Fang, Q., Hui, W.H., and Zhou, Z.H. (2010). 3.3 A cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. Cell *141*, 472–482.

222. Zhou H, and Jackson AO (1996). Expression of the barley stripe mosaic virus RNA β "triple gene block."Virology *216*, 367.

223. Zhou, Z.H., Hardt, S., Wang, B., Sherman, M.B., Jakana, J., and Chiu, W. (1996) CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface. J Struct Biol *116*, 216.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою благодарность моим научным руководителям Ольге Сергеевне Соколовой и Елене Васильевне Орловой за научные консультации при работе над диссертацией и за помощь в освоении методов электронной микроскопии и обработки изображений, моим коллегам Clare D. K., Соловьеву А. Г., Скурату Е. В., Макарову В. В., Шабуровой О. В. за плодотворное сотрудничество, Киселеву Н. А. и всем сотрудникам лаборатории электронной микроскопии ИК РАН за дружескую атмосферу и поддержку.