

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 578.834;578.832;542.8

Криоэлектронная микроскопия оболочечных вирусов на базе усовершенствованного просвечивающего электронного микроскопа: вирусы гриппа типа А, В и коронавирус SARS-CoV-2

Л.В. Кордюкова^{1, *, #} , А.В. Моисеенко^{2, #} , Т.А. Тимофеева³ , И.Т. Федякина³ 

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;

²Общественная лаборатория электронной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 32;

³Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Россия, г. Москва, 123098, ул. Гамалеи, д. 16

*e-mail: kord@belozersky.msu.ru

#Равный вклад

Методы криоэлектронной микроскопии незаменимы в области структурных исследований оболочечных вирусов – опасных патогенов человека и животных, но требуют высокоспециализированного оборудования, а также тщательной пробоподготовки. В настоящей работе использованы возможности просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100, дополненного скрининговым держателем, и представлены предварительные данные криоэлектронной микроскопии для штаммов вирусов гриппа А и В, а также SARS-CoV-2, инактивированного бета-пропиолактоном. Анализ изображений позволяет: (1) отличить «пустые» вирусные частицы от «полных» (содержащих нуклеокапсид); (2) визуализировать липидный бислой оболочки вириона; (3) у вирионов вируса гриппа идентифицировать поверхностные антигены и слой белка М1 в комплексе с внутренним монослоем липидной мембраны; (4) различить S-шпы разной морфологии на поверхности инактивированных вирионов SARS-CoV-2. Разработанный подход обеспечивает хорошее качество изображений для исследований как фундаментального, так и прикладного характера.

Ключевые слова: вирусы гриппа А и В, гемагглютинин, матриксный белок М1, SARS-CoV-2, S-белок, бета-пропиолактон, криоЭМ

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-4

Среди оболочечных РНК-содержащих вирусов много опасных патогенов человека и животных. Вирусы гриппа принадлежат к семейству Orthomyxoviridae. Наибольшее значение для эпидемиологического процесса в человеческой популяции играют штаммы вируса гриппа А и В. Геном представлен восемью сегментами (-)РНК в комплексе с нуклеопротеином и белками полимеразного комплекса. В липопротеиновую оболочку, окружающую нуклеокапсид, интегрированы три трансмембранных вирусных белка: мажорный гемагглютинин (НА), формирующий гомотримерные цилиндрические «шпы»; менее представленная нейраминидаза (НА) – тетрамерные структуры с гибкой тонкой ножкой и большой «головой»; минорный белок М2. Основной структурный белок вириона М1 образует

матриксный слой, по разным гипотезам либо примыкающий к липидной мембране вириона изнутри, либо частично в нее интегрированный [1, 2]. Морфология вирионов вируса гриппа полиморфна. Помимо сферических и эллипсоидных, в вирусной суспензии (чаще в первичных изолятах, реже в лабораторных штаммах) могут присутствовать филаментозные частицы, длина которых превосходит ширину в 3–4 раза и более [3]. Такие частицы обладают преимуществами при инфицировании верхних дыхательных путей.

Вирус SARS-CoV-2, вызвавший крупнейшую пандемию XXI века, принадлежит к семейству Coronaviridae и имеет несегментированный (+) РНК-геном. Поверхностный антиген коронавируса – S-белок – встроен в оболочку вириона посредством трансмембранного домена. М-белок

имеет трансмембранные домены и не образует матриксный слой под мембраной. После контакта с рецептором гомотримерные S-шипы перестраиваются, запуская процесс слияния мембран, обеспечивающий проникновение вирусного генома в цитоплазму клетки [4]. Особенность S-шипов, в отличие от HA вируса гриппа (обусловленная особенностями жизненного цикла вируса) заключается в том, что S-шипы даже при физиологическом pH = 7,4 могут довольно легко дестабилизироваться [5]. «Преждевременный» переход спайков из префузионной в постфузионную конформацию в составе вакцинных препаратов может не только приводить к снижению выработки нейтрализующих антител, но и вызывать крайне опасное явление антител-зависимого усиления инфекции (АЗУИ) [6]. Ранее было высказано предположение, что нежелательное воздействие на конформацию S-шипов оказывает бета-пропиолактон – реагент, используемый в производстве инактивированных вакцин [7].

Методы криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) и томографии (криоЭТ) на сегодняшний день являются ведущими в структурной биологии оболочечных вирусов [2, 3, 7, 8]. Негативное контрастирование препаратов может приводить к искажению формы вирионов из-за поверхностного натяжения при высушивании на сетке. КриоЭМ позволяет избегать таких побочных эффектов и выявляет тонкую внутреннюю структуру вириона. Однако для исследований требуется высокоспециализированное дорогостоящее оборудование и тщательная пробоподготовка. В настоящей работе мы использовали модельные объекты – вирусы гриппа А, В и SARS-CoV-2, инактивированный бета-пропиолактоном, с целью оптимизации условий приготовления препаратов и получения предварительных данных о морфологии и структуре вирионов на базе просвечивающего электронного микроскопа, дополненного скрининговым держателем.

Материалы и методы

Лабораторный штамм вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) и референсный штамм В/Пхукет/3073/13 («Ямагатская» эволюционная линия) выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при 37°C (48 ч) и 34°C (72 ч) соответственно. Аллантоисную жидкость освобождали от фрагментов клеток («осветляли») низкоскоростным центрифугированием, вирусную суспензию осаждали на ультрацентрифуге Beckman (ротор JA-25.50, 23500 об./мин, 75 мин, 4°C), осадок вируса суспендировали в буфере STE (100 mM NaCl, 10 mM Трис-HCl, 1 mM ЭДТА, pH = 7,4) и очищали через 20%-ную (w/v) сахарозу в STE (ротор SW41, 24000 об./мин, 90 мин, 4°C). Осадок суспендировали в буфере STE до концентрации ~4–5 мг/мл по белку.

Штамм коронавируса hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI_ISL_572398) пассировали в клетках перевиваемой линии Vero-E6. Вирус культивировали в течение 96 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂, контролируя лизис клеток, «осветляли» при 6000 об./мин (40 мин, 4°C) и очищали на ультрацентрифуге через 20%-ную (w/v) сахарозу в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4) (ротор Beckman SW28, 28000 об./мин, 90 мин, 4°C). Очищенный вирус в фосфатно-солевом буфере инактивировали бета-пропиолактоном (AlfaAesar/Thermo Fisher Scientific, CAS 57-57-8; 1:1000) и пропускали через фильтры Amicon Ultra 100 до достижения концентрации вируса ~1–3 мг/мл по белку.

Препарат (3 мкл) наносили на медные сеточки с дырчатой углеродной подложкой Lacey (TedPella, США), предварительно обработанные тлеющим разрядом в установке EasyGlow (TedPella, США). При нанесении препарат поддерживался при температуре 4°C в атмосфере с относительной влажностью 95%. Заморозка в жидком этане выполнена на установке EM GP2 (Leica Microsystems, Германия).

КриоЭМ-анализ проводили на микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ и источником LaB₆. Изображения получены с помощью детектора прямого обнаружения электронов DE-20 (Direct Electron, США) и криотрансферного держателя Gatan Elsa. Исследования проводились на базе центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» при Московском государственном университете (Уникальная научная установка «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия», ID RFMEFI61919X0014).

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены данные криоЭМ-анализа штаммов А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (А) и В/Пхукет/3073/13 (Б). Обе популяции вируса преимущественно включали сферические или овальные частицы, со средним диаметром 80–120 нм. В препаратах лабораторного штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) изредка встречались филаментозные частицы, что согласуется с данными Фуджиэши [2].

На поверхности вирионов вируса гриппа видна плотная «шуба» шипов гликопротеинов (рис. 1А, Б), среди которых легко идентифицировать цилиндрические гомотримерные структуры HA, собранные в кластеры (рис. 1А, Б – черные стрелки; В, Г – контур). Можно также предположить наличие единичных тонких шипов нейраминидазы (рис. 1А, Б, белые стрелки) и «смешанных» кластеров HA и NA (рис. 1А, Б, белые дуги). Однако убедительно шипы NA визуализируются только методами криоЭТ [3].

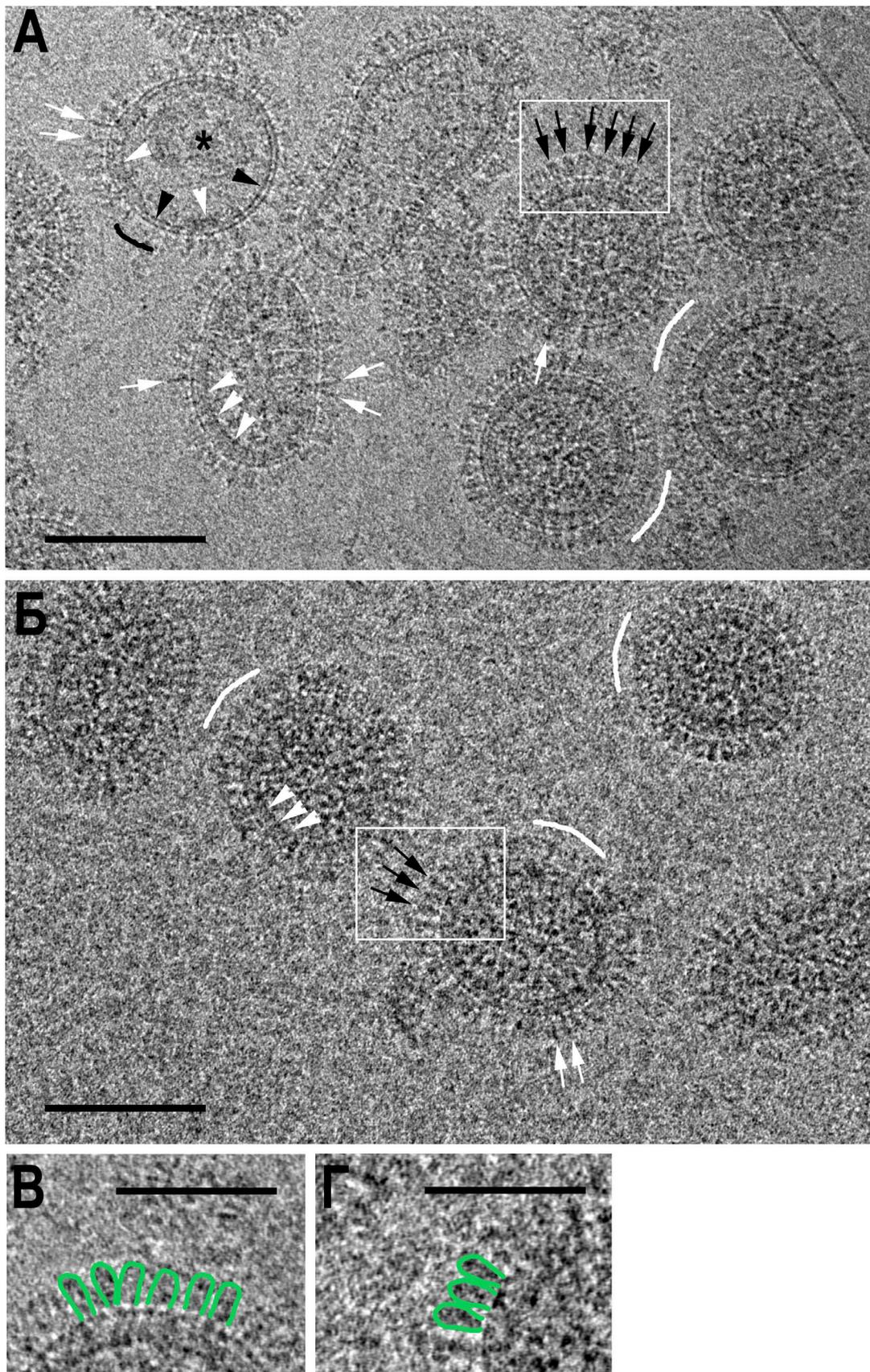


Рис. 1. КриоЭМ анализ вируса гриппа штаммов А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (А; В) и В/Пхукет/3073/13 (Б; Г). В, Г – увеличенные фрагменты, выделенные рамками на панелях А и Б соответственно. Черные стрелки – гемагглютинин (НА); белые стрелки – предположительно нейраминидаза (NA); белые дуги – смешанные кластеры НА и NA; черная дуга – шипы гликопротеинов отсутствуют; звездочка – дефектная вирусная частица; белые наконечники стрел – слой белка М1 вместе с внутренним монослоем липидной мембраны; черные наконечники стрел – бислоидная липидная мембрана в отсутствие белка М1. Вспомогательным контуром на панелях В, Г выделены гомотримерные «шипы» НА. Масштабный штрих: 100 нм (А, Б), 50 нм (В, Г).

У большинства вирионов вируса гриппа видна типичная слоистая структура матрикса на внутренней стороне мембраны [2]: внутренний липидный монослой «сливается» со слоем белка М1, и лишь внешний липидный монослой ярко очерчен. Толщина оболочки (измеренная от наружного контура липидного монослоя до внутреннего

контура матрикса) составляет $\sim 10\text{--}11 \text{ \AA}$, что меньше, чем сумма длины оси молекулы М1 (по данным мало-углового рентгеновского рассеяния, МУРР, в среднем $\sim 10\text{--}11 \text{ нм}$ [9]) и толщины липидного бислоя ($\sim 4 \text{ нм}$). Даже в случае наклона глобулы М1 в составе вирусной оболочки эти параметры указывают на крайне вероятное частичное

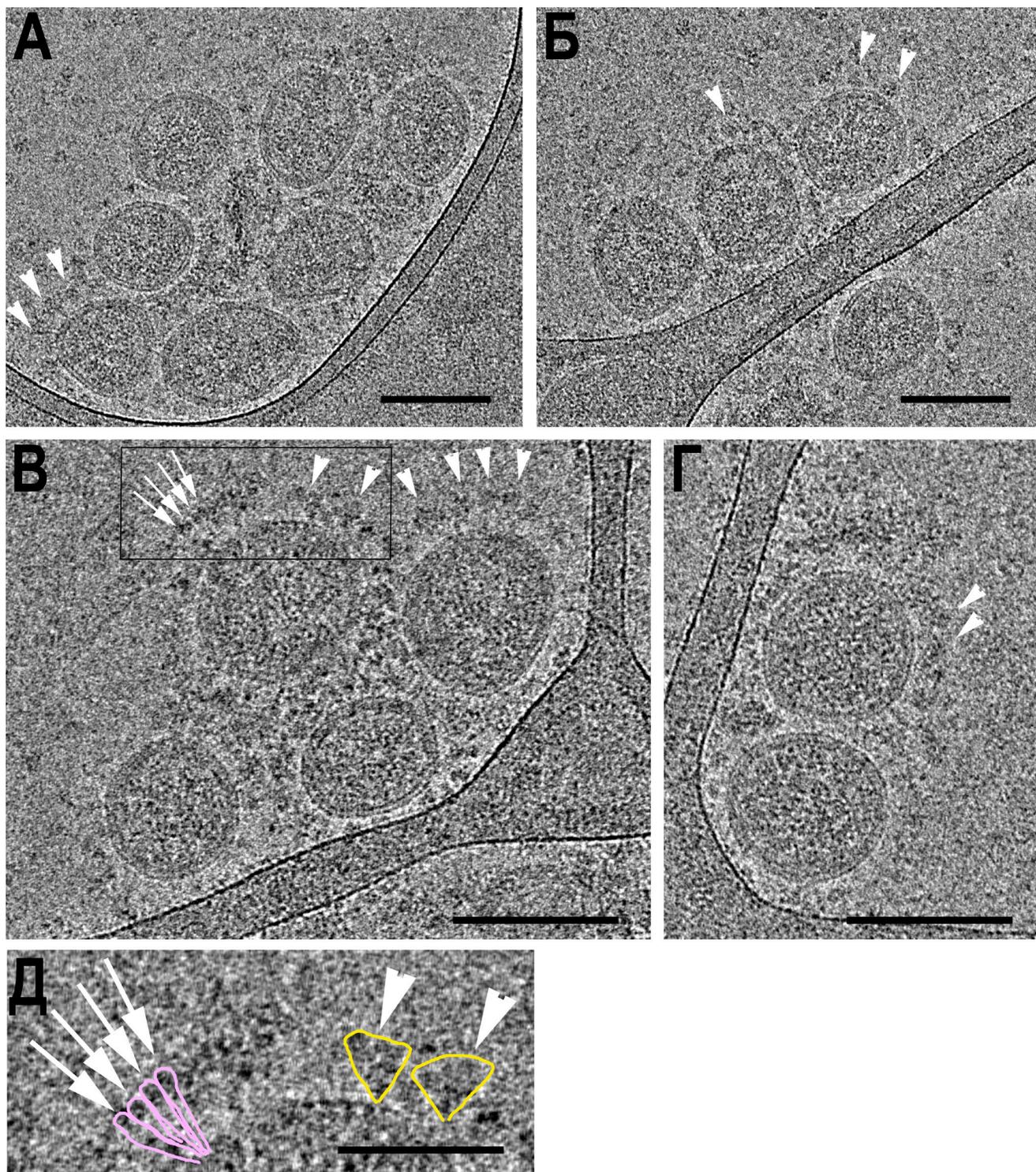


Рис. 2. КриоЭМ анализ коронавируса штамма hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI_ISL_572398), инактивированного бета-пропиолактоном. А–Г – микрофотографии вирионов; Д – увеличенный фрагмент, выделенный рамкой на панели В. Белые наконечники стрел – шипы S-белка предположительно в префузионной конформации (flail-like); белые стрелки – шипы S-белка предположительно в постфузионной конформации (needle-like). Вспомогательными контурами на панели Д выделены S-шипы в конформации «пре-фьюжен» (желтый) и «пост-фьюжен» (розовый). Масштабный штрих: 100 нм (А–Г), 50 нм (Д).

интегрирование М1 в липидную мембрану. Ранее такой же вывод был нами сделан на основании данных МУРР белка М1 после инкубации с липосомами [10].

У некоторых вирионов в матричном слое обнаруживаются «пробелы», или он вовсе отсутствует (рис. 1А). Такие дефектные частицы наглядно демонстрируют структурную и функциональную роль М1-белка – «связующего звена» между поверхностными гликопротеинами, мембраной и нуклеокапсидом [1]. В зонах, где отсутствует М1, хорошо визуализируется двойной контур липидного бислоя, шипов меньше, а нуклеокапсид заполняет не весь внутренний объем.

На рис. 2 (А–Г) представлены изображения вирионов SARS-CoV. По сравнению с «шубой» шипов на поверхности вирионов вируса гриппа, спайки коронавируса немного длиннее и расположены в среднем гораздо реже. Липидный бислой, в отличие от типичных вирионов вируса гриппа, у SARS-CoV-2 всегда визуализируется как четкая двойная линия, что согласуется с отсутствием матричного слоя у коронавирусов.

Анализ криоизображений позволяет выявить S-шипы различной морфологии: крупные треугольные и более тонкие структуры (рис. 2В, Д). Ранее в препаратах вирионов, инактивированных бета-пропиолактоном, после негативного контрастирования мы наблюдали шипы треугольной формы (flail-like), что указывало на нативную конформацию «pre-fusion», но встречались также шипы в виде «иголок» (needle-like) – по-видимому, в конформации «post-fusion» [11]. В отличие от бета-пропиолактона, другие инактивирующие агенты (параформальдегид, ультрафиолетовое излучение) не вызывали существенного изменения морфологии S-шипов [11, 12]. Мы полагаем, что последующий детальный 2D-анализ формы шипов на криоЭМ изображениях с помощью специализированных

пакетов программ (single particle analysis) поможет более достоверно различить конформации и провести их статистическую обработку, что представляется перспективным для контроля качества разрабатываемых инактивированных коронавирусных вакцин.

Заключение

Нативная морфология и структура вирионов оболочечных вирусов разных семейств изучена «в первом приближении» с помощью простейшего варианта криоЭМ – на просвечивающем микроскопе, усиленном дополнительными возможностями скринингового держателя. Мы смогли (1) отличить «пустые» вирусные частицы от «полных» (содержащих нуклеокапсид); (2) визуализировать липидный бислой оболочки вириона; (3) у вирионов вируса гриппа идентифицировать шипы гликопротеинов и матричный слой – М1-белок в комплексе с внутренним монослоем липидной мембраны; (4) различить у вирионов SARS-CoV-2 шипы S-белка разной морфологии, предположительно находящихся в префузионной или постфузионной конформации. Таким образом, качество изображений вирионов в целом сопоставимо с данными криоЭМ, полученными на высоко специализированном оборудовании, хотя, безусловно, гибкие структуры (например, шипы NA вируса гриппа) требуют криоЭТ-анализа [2, 3, 7]. Примененный подход целесообразно использовать для отработки протоколов пробоподготовки и получения предварительных данных криоЭМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-54-14006). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kordyukova L.V., Shtykova E.V., Baratova L.A., Svergun D.I., Batishchev O.V. Matrix proteins of enveloped viruses: a case study of Influenza A virus M1 protein. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019;37(3):671–690.
2. Fujiyoshi Y., Kume N.P., Sakata K., Sato S.B. Fine structure of influenza A virus observed by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* 1994;13(2):318–326.
3. Calder L.J., Wasilewski S., Berriman J.A., Rosenthal P.B. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(23):10685–10690.
4. Benton D.J., Wrobel A.G., Xu P., Roustan C., Martin S.R., Rosenthal P.B., Skehel J.J., Gamblin S.J. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature.* 2020;588(7837):327–330.
5. Kordyukova L.V., Shanko A.V. COVID-19: Myths and reality. *Biochemistry (Mosc.)*. 2021;86(7):800–817.
6. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., Zhou Y., Du L., Li F. Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of coronavirus entry. *J. Virol.* 2020;94(5):e02015-19.
7. Liu C., Mendonça L., Yang Y., et al. The architecture of inactivated SARS-CoV-2 with postfusion spikes revealed by Cryo-EM and Cryo-ET. *Structure.* 2020;28(11):1218–1224.e4.
8. Yao H., Song Y., Chen Y., et al. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell.* 2020;183(3):730–738.e13.
9. Shtykova E.V., Baratova L.A., Fedorova N.V., Radyukhin V.A., Ksenofontov A.L., Volkov V.V., Shishkov A.V., Dolgov A.A., Shilova L.A., Batishchev O.V., Jeffries C.M., Svergun D.I. Structural analysis of influenza A virus matrix protein M1 and its self-assemblies at low pH. *PLoS One.* 2013;8(12):e82431.
10. Kordyukova L.V., Konarev P.V., Fedorova N.V., Shtykova E.V., Ksenofontov A.L., Loshkarev N.A., Dadinova L.A., Timofeeva T.A., Abramchuk S.S., Moiseenko A.V., Baratova L.A., Svergun D.I., Batishchev O.V. The cytoplasmic

mic tail of influenza A virus hemagglutinin and membrane lipid composition change the mode of M1 protein association with the lipid bilayer. *Membranes*. 2021;11(10):772.

11. Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Serebryakova M.V., Shuklina M.A., Sergeeva M.V., Lioznov D.A., Shanko A.V. Structural and immunoreactivity properties of the SARS-CoV-2 spike protein upon the development of an inactivated vaccine. *Viruses*. 2023;15(2):480.

12. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Yu.I., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., Moiseenko

A.V., Zubarev I.V., Samoilkov R.V., Leneva I.A., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light. *Arch. Virol.* 2022;167(11):2181–2191.

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 24.08.2023

Принята в печать 25.08.2023

SHORT COMMUNICATION

Cryo-electron microscopy of enveloped viruses using upgraded transmission electron microscope: Influenza type A, B viruses and SARS-CoV-2

L.V. Kordyukova^{1,*,#} , A.V. Moiseenko^{2,#} , T.A. Timofeeva³ , I.T. Fedyakina³ 

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russia;*

²*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–32 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;*

³*D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 16 Gamaleya st., 123098, Moscow, Russia*

*e-mail: kord@belozersky.msu.ru

#Equal contribution

Cryo-electron microscopy (cryo-EM) is indispensable for the structural studies of enveloped viruses – dangerous pathogens of humans and animals. Yet, it requires highly specialized equipment as well as careful sample preparation. In this work, the capabilities of transmission electron microscope JEOL JEM-2100 equipped with cryo-transfer holder are used, and preliminary cryo-EM data for influenza A and B virus strains and SARS-CoV-2 inactivated with beta-propiolactone are presented. Image analysis allows: (1) to distinguish “empty” viral particles from “full” ones (containing nucleocapsid); (2) to visualize the lipid bilayer of the viral envelope; (3) identify influenza virus surface antigens and the M1 protein layer combined with the inner lipid monolayer; (4) distinguish different morphology of S-spikes on the surface of inactivated SARS-CoV-2 virions. The developed approach provides good image quality for both fundamental and applied research.

Keywords: *influenza A and B viruses, hemagglutinin, matrix M1 protein, SARS-CoV-2, S-protein, beta-propiolactone, cryo-EM*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-54-14006.

Сведения об авторах

Кордюкова Лариса Валентиновна – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. отдела хроматографического анализа НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-54-08; e-mail: kord@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6089-1103>

Моисеенко Андрей Владимирович – вед. инженер лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Тимофеева Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией физиологии вирусов института вирусологии им. Д.И. Ивановского НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Тел.: 8-499-190-28-13; e-mail: timofeeva.tayana@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Федякина Ирина Тимофеевна – канд. биол. наук, зав. лабораторией экологии вирусов института вирусологии имени Д.И. Ивановского НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Тел.: 8-499-190-30-52; e-mail: irfed2@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>