

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 578.32

Стабилизация полноразмерного S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в полимере SMA для исследования в электронном микроскопе

Н.Ю. Мамаева¹, Н.И. Деркачева², Д.А. Гасанова³, О.С. Соколова¹ , Г.С. Глухов^{4,*}

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 73;

²Кафедра биологической химии, Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Россия, г. Москва, 127006, ул. Долгоруковская, д. 4;

³Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 11;

⁴Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Китай, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, 518172, район Лунган, Даюньсиньчэн, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1

*e-mail: gluhovg@gmail.com

Разработан бездетергентный протокол очистки префузионного S-белка коронавируса с использованием сополимера стирола и малеиновой кислоты (styrene maleic anhydride, SMA). Экспрессия S-белка осуществлялась в клетках HEK293T. Для очистки и подготовки к микроскопированию S-белка использовали два способа солюбилизации: в детергенте NP-40 и в составе SMA. Полученные препараты были исследованы в электронном микроскопе, частицы очищенных S-белков были классифицированы. Анализ двумерных проекций частиц показал, что применение липодисков для солюбилизации приводит к меньшей подвижности очищенного белка на подложке, по сравнению с белком в детергенте, что в дальнейшем может способствовать получению более высоких разрешений при изучении структуры мембранных белков.

Ключевые слова: электронная микроскопия, структурная биология, анализ единичных частиц, SARS-CoV-2, солюбилизация, детергент, SMA

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-5

Введение

Вirus SARS-CoV-2, появившись в 2019 г., продолжает эволюционировать, возникают его новые штаммы, способные избегать антител [1], выработанных как во время болезни, так и в ответ на вакцинацию и при применении лекарственных препаратов на их основе [2].

Гликозилированный мембранный S-белок вируса, который располагается на поверхности оболочки вируса в виде тримера, состоит из эктодомена, трансмембранного домена (transmembrane domain, TM) и короткого внутриклеточного цитоплазматического фрагмента (C-terminal domain, CTD). Эктодомен в свою очередь включает сигнальный пептид (аминокислоты 1–13), N-концевой домен, а также субъединицы S1 и S2, между которыми находится сайт расщепления фурином. В состав субъединицы S1 входит рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), который и опосредует проникновение вируса в клетки при взаимодействии с рецепторами ангиотензинпревращающего фермента

2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) [3]. Связывание рецептора дестабилизирует S-белок, находящийся в префузионной конформации, что приводит к отщеплению субъединицы S1 и переходу субъединицы S2 в стабильную постфузионную конформацию [4].

В нативных условиях мембранные S-белки встроены в липидный бислой, окружающий нуклеокапсид, участвующий в поддержании стабильности их структуры [5]. Недавно структура нативного полноразмерного S-белка была получена с низким разрешением в составе вирусной мембраны методом электронной томографии, была продемонстрирована гибкость участка, соединяющего эктодомен с TM [6]. Однако для более подробных структурных и функциональных исследований S-белки приходится изолировать от липидной мембраны, сохраняя при этом их стабильность и активность. Эта задача требует специальных подходов, позволяющих сохранить конформацию белка близкой к нативной [7]. В настоящее время существует множество способов

солюбилизации мембранных белков. Классический метод — использование детергентов [8]. Однако при этом некоторые мембранные белки подвергаются деградации или утрачивают свою функцию при включении в мицеллы детергентов [9]. В последнее время активно начали использоваться подходы, включающие замену детергентов стабилизирующими агентами, такими как амфиполы [10], бицеллы и липидные везикулы [11], нанодиски [12], что способствует выделению мембранных белков в комплексе с липидами или позволяет смоделировать липидное окружение изучаемого белка. Особо стоит отметить использование для этих целей сополимера стирола и малеиновой кислоты (styrene maleic anhydride, SMA), образующих т.н. липодиски [7, 13]. В отличие от детергентов, которые, удаляют большую часть липидов в непосредственной близости от мембранного белка, SMA позволяет выделять белки, сохраняя часть мембранного окружения [14]. В ходе данной работы мы разработали протокол для очистки полноразмерного S-белка коронавируса с помощью SMA.

Материалы и методы

Конструкция плазмиды. В работе была использована плазида pcDNA3.1-SARS2-Spike (Addgene plasmid #145032), кодирующая ген полноразмерного S-белка с C9-тагом на С-конце (GenBank: QHD43416.1, штамм Wuhan-Hu-1) (рис. 1). Для выделения белка с применением аффинной хроматографии в последовательность данной плазмиды были внесены следующие изменения: аффинный C9-таг был заменен на 1D4-таг, который располагается также на С-конце последовательности. Правильность внесенных изменений и отсутствие нуклеотидных замен в последовательности полноразмерного S-белка были проверены секвенированием. Плазмиду нарабатывали в штамме *Escherichia coli* XL10. Для выделения плазмидной ДНК использовали коммерческий набор Maxiprep (Quagen, Германия).

Экспрессия белка. Для транзientной экспрессии полноразмерного гликозилированного S-белка SARS-Cov-2 использовали линию эукариотических клеток HEK293T. Клетки культивировали с использованием питательной среды DMEM (ПанЭко, Россия) с высоким содержанием глюкозы, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Клетки трансформировали кальций-фосфатным методом с использованием плазмиды pcDNA3.1-SARS2-Spike. После трансфекции клетки культивировали в течение 72 ч при 37°C

и уровне CO₂ 5%. В дальнейшем все процедуры проводили на льду или при 4°C в присутствии ингибиторов протеаз PIC (Roche, Германия).

Иммуноокрашивание эукариотических клеток антителами. Иммуноокрашивание проводили через 72 ч после трансфекции по протоколу, описанному на сайте Abcam (<https://www.abcam.com/kits/immunostaining-in-ihc>). В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела против 1D4-тага (ab98887 Abcam, США) и RBD (PA-114451, Invitrogen, Тайвань). Все первичные антитела использовались в разведении 1:500. В качестве проявляющих применяли антитела, конъюгированные с красителями Alexa488 или Alexa555. Ядра окрашивали красителем DAPI. Регистрацию флуоресцентного сигнала проводили на микроскопе Axio lab.A1 (Zeiss, Германия).

Солюбилизация и очистка S-белка с использованием детергента NP-40. К клеткам HEK293T, экспрессирующим S-белок, добавляли лизирующий буфер А (около 5 мл буфера на 1 г клеточного осадка), содержащий 100мМ Трис-НСl pH 8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 1% NP-40 и ингибиторы протеаз. Лизирование и солюбилизацию проводили в течение 1 ч на льду. Далее отделяли ядерную фракцию центрифугированием при 1000g в течение 10 мин при +4°C. Супернатант отбирали в чистую пробирку и проводили солюбилизацию в 1% NP-40 в течение 2–3 ч на льду.

Очистку белка проводили с помощью аффинной хроматографии на активированной N-гидроксисукцинимидом агарозе (NHS Act Sepharose® 4 Fast Flow, Cytiva) с конъюгированными 1D4 антителами по протоколу, описанному ранее [14]. Образцы элюций отбирали для анализа методом иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг. После электрофореза гель инкубировали в Semi-dry Transfer Buffer (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 20% этанол) на качалке в течение 15 мин. Отдельно инкубировали нитроцеллюлозную мембрану и ватман в том же буфере. Перенос проводили на приборе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США), используя следующие характеристики — время переноса 45 мин, 1 А, 25 V. После переноса мембрану окрашивали пунцовым красным, после чего отмывали фосфатно-солевым буфером (phosphate-buffered saline, PBS). Далее проводили блокирование в забивочном буфере (5% бычьего сывороточного альбумина в PBST — PBS с Tween 20) в течение 1 ч при комнатной температуре на качалке, после чего мембрану промывали буфером PBST 3 × 1 мин. Далее производили окрашивание первичными



Рис. 1. Схема генетической конструкции, кодирующей S-белок.

антителами в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашивание вторичными антителами также проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембрану отмывали сначала 3 раза в PBST, а затем 1 раз в PBS. Далее мембрану инкубировали в растворе для проявки (1706431, Bio-Rad, США) в течение 5 мин. Регистрацию хемилюминесцентного сигнала производилась на ChemiDoc XRS+ с использованием программного обеспечения ImageLab (BioRad, США).

Выделение мембранной фракции, солюбилизация и очистка S-белка с использованием SMA. Клетки размораживали на льду, после чего ресуспендировали в буфере А с добавлением ингибиторов протеаз. Для эффективного лизиса, клетки инкубировали в буфере А в течение 1–2 ч и прогоняли через иглу 29G. Далее осаждали ядерную фракцию центрифугированием на 1000g при +4°C в течение 10 мин. Солюбилизацию супернатанта проводили в 2,5% SMA (SMALP200, Orbiscope, Нидерланды) в течение 2–3 ч на качалке при +4°C. Для отделения солюбилизированной фракции проводили центрифугирование при 100000g 10 мин. Супернатант связывали с аффинной смолой в течение ночи. Не связавшийся образец собирали в отдельную пробирку, а смолу промывали трижды буфером А с добавлением ингибиторов протеаз. Элюирование буфером, содержащим 500 мМ 1D4 пептида (16201, CubeBiotech, США) и ингибиторы протеаз в буфере А, проводили в течение 1 ч на качалке при +4°C.

Электронная микроскопия. Образцы очищенного белка (3 мкл) наносили на гидрофилизованные в приборе (PELCO easiGlow™) медные сетки, покрытые подложкой из формвара стабилизированной углеродом (300 mesh формвар/углеродное покрытие) (Ted Pella, США). Анализ сеток с полученными образцами производился с ис-

пользованием аналитического просвечивающего электронного микроскопа Jem2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Размер микрографий составлял 4864 × 3648 пикселей, разрешение – 1,9 Å/пикс.

Анализ изображений. Сбор частиц S-белка производили в полуавтоматическом режиме с использованием нейронной сети в программе crYOLO [24]. Координаты частиц импортировали в CryoSparg [15], где проводилась двумерная классификация. После этапа 2D-классификации производили отбор классовых сумм, содержащих проекции целевых белков.

Результаты и обсуждение

Очистка S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в детергенте и SMA. Клеточную линию HEK293T трансфицировали плазмидой, кодирующей ген полноразмерного S-белка. Эффективность трансфекции оценивали методом иммуноокрашивания клеток с использованием антител к аффинному тагу (1D4). Эффективность трансфекции составила около 80%. Очистку S-белка проводили в соответствии с двумя протоколами (см. материалы и методы). Результативность очистки белка подтверждали методом иммуноблоттинга (рис. 2А, Б). Полученные данные говорят об эффективности использованного протокола очистки S-белка при солюбилизации в 1% NP-40, предложенного ранее [17], а также разработанного нами протокола с использованием SMA (рис. 2Б). Следует отметить, что при использовании SMA, выход целевого белка был выше (рис. 2Б).

Иммуноокрашивание показало, что S-белок равномерно распределен в мембране клеток (рис. 2В). Подобные данные хорошо согласуются со способностью S-белка экспрессироваться в эмбриональных клетках (HEK293) [16].

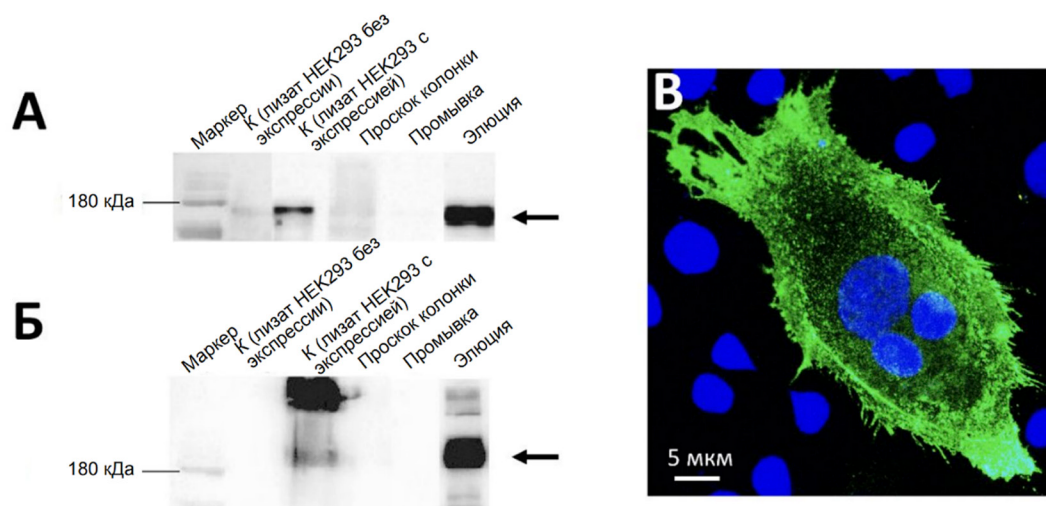


Рис. 2. Результаты экспрессии и очистки S-белка в детергенте и SMA. **А** – Иммуноблоттинг образцов, собранных в процессе очистки S-белка с использованием детергента NP-40. **Б** – Иммуноблоттинг образцов, собранных в процессе очистки S-белка с использованием SMA. Стрелками отмечены полосы, соответствующие полноразмерному S-белку SARS-CoV-2. **В** – Иммуноокрашивание клеток HEK293T, экспрессирующих полноразмерный S-белок.

Анализ электронномикроскопических изображений S-белка. После очистки в детергенте и SMA полноразмерный S-белок был исследован методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастом. Всего было собрано 111852 частиц с 426 микрографий для белка в детергенте и 48214 частиц с 436 фотографий для белка в SMA. На рис. 3А и Б изображены примеры двумерных классов сумм, представляющих собой усредненные проекции исследуемых белков в различных мембранных миметиках и по-разному ориентированные на подложке. Размеры частиц составляют около 15 нм, что соответствует префузионному состоянию S-белка [18].

Полноразмерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2 является очень гибкой молекулой [19, 20], что необходимо для его взаимодействия с клеточными рецепторами ACE2. На подложке он также располагается в разных конформациях. Мы измерили угол между экто- и мембранным доменом у разных классов (рис. 3В) для того, чтобы проверить наличие стабильных конформаций. Так как классы представляют собой усредненное изображение многих идентичных молекул, то, измерив угол для одного класса, можно получить соответствующую величину для набора частиц. Обнаружено, что частицы S-белка, выделенные в липодисках, имеют преимущественно угол между экто- и мембранным доменами 180° ,

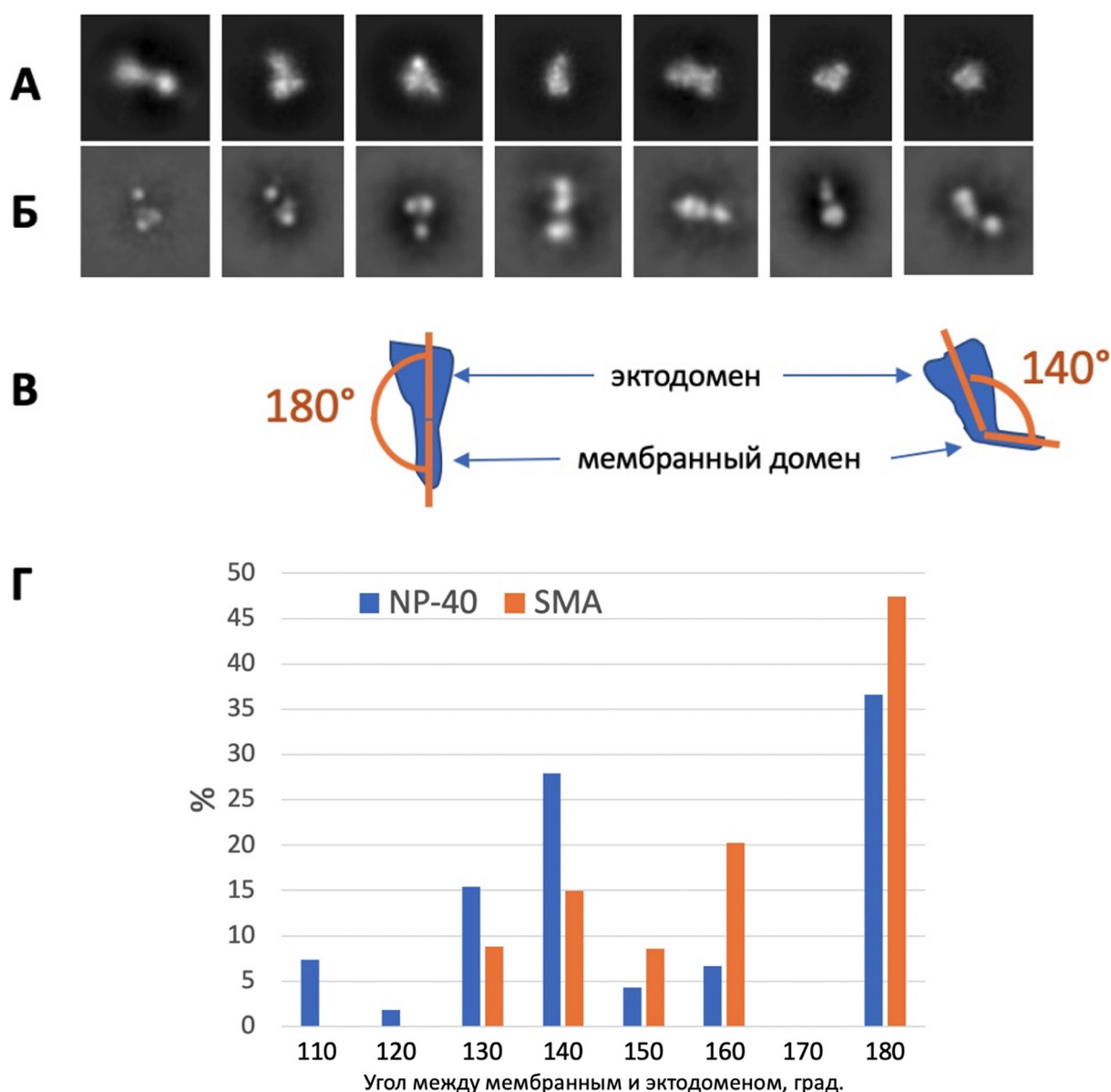


Рис. 3. Сравнение двумерных классов сумм, полученных после обработки изображений S-белков, очищенных двумя способами. А — S-белок, очищенный в детергенте NP-40; Б — S-белок, очищенный с использованием SMA. Масштабный отрезок — 20 нм. В — Схема измерения угла между экто- и мембранным доменами. Г — Распределение углов между мембранным доменом и эктодоменом у S-белка в исследованных наборах данных. Синие столбики — очистка с помощью детергента, оранжевые столбики — с помощью SMA.

тогда как частицы, солюбилизованные с помощью детергента, имеют два пика — 25% частиц согнуты под углом 140°, а 35% — не изогнуты (рис. 3Г). Интересно отметить, что угол 40° показан в недавних работах китайских ученых [21, 22], как наиболее вероятное отклонение от нормали для S-белка в составе инактивированных вирионов.

Таким образом, при использовании липидосков изолированные молекулы S-белков оказываются более стабильными и менее подвержены изгибам, что вероятно, может в дальнейшем способствовать получению реконструкции более высокого разрешения с помощью крио-ПЭМ. Полученные результаты позволяют утверждать, что использование SMA в качестве солюбилизирующего

агента представляет собой перспективный метод очистки мембранных S-белков для получения трехмерных структур с помощью метода электронной микроскопии.

Авторы благодарят А.В. Моисеенко за помощь в проведении электронномикроскопических исследований. Исследование выполнено при финансовой поддержке Программы развития МГУ (проект № 23А-Ш04-01) с использованием УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия» МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Novoseletsky V.N., Bozdaganyan M.E., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S. Immune escape associated with RBD Omicron mutations and SARS-CoV-2 evolution dynamics. *Viruses*. 2022;14(8):1603.
2. Bozdaganyan M.E., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Orekhov P.S. Computational analysis of mutations in the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike and their effects on antibody binding. *Viruses*. 2022;14(2):295.
3. Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* 2016;3:237–261.
4. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581(7807):221–224.
5. Palsdottir H., Hunte C. Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2004;1666(1–2):2–18.
6. Dörr J.M., Scheidelaar S., Koorengevel M.C., Dominguez J.J., Schäfer M., van Walree C.A., Killian J.A. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur. Biophys. J.* 2016;45(1):3–21.
7. Turoňová B., Sikora M., Schürmann C., et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science*. 2020;370(6513):203–208.
8. Garavito R.M., Ferguson-Miller S. Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* 2001;276(35):32403–32406.
9. Lichtenberg D., Ahyayauch H., Goñi F.M. The mechanism of detergent solubilization of lipid bilayers. *Biophys. J.* 2013;105(2):289–299.
10. Popot J.L., Althoff T., Bagnard D., Banères J.L., Bazzacco P., Billon-Denis E., Catoire L.J., Champeil P., Charvolin D., Cocco M.J., Cremel G. Amphipols from A to Z. *Annu. Rev. Biophys.* 2011;40:379–408.
11. Rigaud J.L., Lévy D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods in Enzymology. Liposomes, Part B, vol. 372*. Ed. N. Duzgunes. Academic Press; 2003: 65–86.
12. Ritchie T.K., Grinkova Y.V., Bayburt T.H., Denisov I.G., Zolnerciks J.K., Atkins W.M., Sligar S.G. Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods in Enzymology. Liposomes, Part F, vol. 464*. Ed. N. Düzgunes. Academic Press; 2009:211–231.
13. Knowles T.J., Finka R., Smith C., Lin Y.P., Dafforn T., Overduin M. Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* 2009;131(22):7484–7485.
14. Karlova M.G., Voskoboinikova N., Gluhov G.S., Abramochkin D., Malak O.A., Mulkidzhanyan A., Loussouarn G., Steinhoff H.J., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Detergent-free solubilization of human Kv channels expressed in mammalian cells. *Chem. Phys. Lipids*. 2019;219:50–57.
15. Punjani A., Rubinstein J.L., Fleet D.J., Brubaker M.A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*. 2017;14(3):290–296.
16. Zhong F., Zhong Z.Y., Liang S., Li X.J. High expression level of soluble SARS spike protein mediated by adenovirus in HEK293 cells. *World J. Gastroenterol.* 2006;12(9):1452.
17. Cai Y., Zhang J., Xiao T., Peng H., Sterling S.M., Walsh Jr R.M., Rawson S., Rits-Volloch S., Chen B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*. 2020;369(6511):1586–1592.
18. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020;367(6483):1260–1263.
19. Choi Y.K., Cao Y., Frank M., Woo H., Park S.J., Yeom M.S., Croll T.I., Seok C., Im W. Structure, dynamics, receptor binding, and antibody binding of the fully glycosylated full-length SARS-CoV-2 spike protein in a viral membrane. *J. Chem. Theory Comput.* 2021;17(4):2479–2487.
20. Pramanick I., Sengupta N., Mishra S., Pandey S., Girish N., Das A., Dutta S. Conformational flexibility and structural variability of SARS-CoV2 S protein. *Structure*. 2021;29(8):834–845.
21. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., Zhang J., Weng T., Zhang Z., Wu Z., Cheng L. Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*. 2020;183(3):730–738.
22. Song Y., Yao H., Wu N., Xu J., Zhang Z., Peng C., Li S., Kong W., Chen Y., Zhu M., Wang J. In situ architecture and membrane fusion of SARS-CoV-2 Delta variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(18):e2213332120.

Поступила в редакцию 26.07.2023

После доработки 12.09.2023

Принята в печать 13.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Stabilization of full-length S-protein of SARS-Cov-2 coronavirus in SMA polymer for electron microscopy study

N.Yu. Mamaeva¹, N.I. Derkacheva², D.A. Gasanova³, O.S. Sokolova¹ , G.S. Glukhov^{4, *}

¹Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–73 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

²Department of Biochemistry, A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, 4 Dolgorukovskaya st., 127006, Moscow, Russia;

³Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 1–11 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

⁴Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, 518172, Guangdong Province, China

*e-mail: gluhovg@gmail.com

A detergent-free protocol for purification of the coronavirus prefusion S-protein using styrene-maleic acid copolymer (SMA) was developed. Expression of the S-protein was carried out in HEK293T cells. Two solubilization methods were used to purify and prepare the S-protein for microscopy: in NP-40 detergent and as part of SMA. The resulting preparations were examined in an electron microscope, and the particles of purified S-proteins were classified. Analysis of two-dimensional projections of the particles showed that the use of lipodiscs for solubilization leads to lower mobility of the purified protein on the substrate, compared to the protein in the detergent, which may further contribute to obtaining higher resolutions when studying the structure of membrane proteins.

Keywords: *electron microscopy, structural biology, single particle analysis, SARS-CoV-2, solubilization, detergent, SMA*

Funding: The research was supported by MSU Development Program, project number 23A-Sh04-01.

Сведения об авторах

Мамаева Наюда Юсуповна — студентка кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mamaeva19n@gmail.com

Деркачева Надежда Игоревна — канд. биол. наук, проф. кафедры биологической химии Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова. Тел.: 8-495-959-14-75; e-mail: nadya-derk@yandex.ru

Гасанова Дария Алановна — техник кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-53; e-mail: sova-sipuha@hotmail.com

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Глухов Григорий Сергеевич — канд. биол. наук, доц. биологического факультета Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gluhovg@gmail.com