#### КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.322.54



# Структура бычьего шаперонина TRiC/CCT в открытой конформации по данным криоэлектронной микроскопии

## Т.Б. Станишнева-Коновалова<sup>1, \*, #</sup>, Е.Б. Пичкур<sup>2, #</sup>, С.С. Кудрявцева<sup>3</sup>, И.А. Ярошевич<sup>4</sup>, А.Н. Семенов<sup>5</sup>, Е.Г. Максимов<sup>5</sup>, А.В. Моисеенко<sup>6</sup>, О.И. Волох<sup>1</sup>, В.И. Муронец<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Отдел структурной биологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

Россия, г. Москва, 123182, пл. Академика Курчатова, д. 1;

<sup>3</sup>Научно-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;

<sup>4</sup>Кафедра биофизики и <sup>5</sup>Лаборатория физико-химии биомембран, биологический факультет,

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>6</sup>Общефакультетская лаборатория электронной микроскопии, биологический факультет,

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,

Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 32

\*email: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru

<sup>#</sup>Равный вклад

В этой работе были подобраны условия для получения образца эукариотического шаперонина TRiC, пригодного для изучения методом криоэлектронной микроскопии. С помощью метода дифференциальной сканирующей (время-разрешенной) флуориметрии была охарактеризована температурная стабильность образцов белка при разных концентрациях соли и глицерина, а затем выбранные условия использовались для подготовки образца для микроскопии. В результате съемки и обработки изображений получена структура бычьего TRiC в открытой конформации с разрешением 4,42 Å.

Ключевые слова: шаперонин, TRiC, CCT, криоэлектронная микроскопия, четвертичная структура белков, дифференциальная сканирующая (время-разрешенная) флуориметрия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-7

#### Введение

Эукариотический шаперонин TRiC (от англ. «tailless complex polypeptide 1 ring complex») или ССТ (от англ. «chaperonin containing tailless complex polypeptide 1») необходим для сворачивания до 10% клеточных белков [1, 2]. Он представляет собой гетероолигомерный бочкообразный комплекс размером 14 на 16 нм, состоящий из двух уложенных друг на друга октамерных колец. В каждом кольце есть центральная полость, где происходит АТФ-зависимое сворачивание белка. Белковые субъединицы, обозначаемые ССТ1-ССТ8, обладают молекулярной массой около 60 кДа каждая, вместе образуя комплекс ~1 МДа. Все субъединицы являются структурными гомологами, каждая занимает определенное положение в кольце и состоит из АТФ-связывающего экваториального, промежуточного и субстрат-связывающего апикального доменов [3–5]. Каждая субъединица содержит апикальный сегмент, который образует крышку над полостью. Конформационный цикл, управляемый АТФ, связывает TRiCопосредованное сворачивание с открытием и закрытием крышки, инкапсулируя субстрат в полости [6–10].

Акт распознавания субстрата шаперонином TRiC имеет медицинское значение [11], его нарушения приводят к различным патологиям, связанным с неправильным сворачиванием белков [12–16]. Несмотря на структурную гомологию, субъединицы TRiC имеют различные функции [6] и формируют асимметричную трехмерную структуру с особым распределением электростатических зарядов [17].

<sup>©</sup> Станишнева-Коновалова Т.Б., Пичкур Е.Б., Кудрявцева С.С., Ярошевич И.А., Семенов А.Н., Максимов Е.Г., Моисеенко А.В., Волох О.И., Муронец В.И, 2023

Молекулярные шапероны поддерживают гомеостаз благодаря их роли не только в сворачивании, но и в деградации белков и предотвращении их агрегации [18]. Было показано, что TRiC/CCT действует как модулятор амилоидогенеза при некоторых амилоидопатиях посредством механизмов, специфичных для амилоидных белков. Он может подавлять агрегацию и токсичность удлиненного полиглутаминового мутанта хантингтина при болезни Хантингтона [19-22]. Также ССТ может ингибировать сборку амилоидных волокон α-синуклеина, ответственных за болезнь Паркинсона. Способность ССТ сворачивать белковые субстраты зависит от связывания АТФ и последующего гидролиза, тогда как в присутствии АДФ шаперонин может взаимодействовать с субстратами, но не сворачивать их [23, 24].

Распознавание субстрата TRiC представляет собой сложный поэтапный процесс. Считается, что апикальные домены каждой субъединицы TRiC распознают разные мотивы в субстратах. Диверсификация субъединиц TRiC, таким образом, обеспечивает модульную структуру специфичности связывания, которая позволяет комбинаторное распознавание белковых субстратов [10].

К настоящему времени методом криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) было получено несколько структур эндогенного TRiC из разных организмов и на разных стадиях функционального цикла. Наилучшее разрешение удалось получить для комплексов в закрытой конформации: 2,99 Å – для дрожжевого [25], 4 Å – для бычьего [26] и 3,1 Å – для TRiC из клеточной линии НЕК293F [27]. Асимметричность комплекса и его конформационная подвижность являются лимитирующими факторами для получения структур открытой конформации с высоким разрешением. Так, разрешение опубликованных структур бычьего TRiC в открытой конформации составило от 10,5 Å до 13,9 Å [9]. Кроме того, сложность представляет подбор условий для получения образца TRiC, пригодного для работы методом криоЭМ. В первой части данной работы с помощью метода дифференциальной сканирующей (время-разрешенной) флуориметрии оценивалось влияние концентраций глицерина и соли на стабильность образца бычьего TRiC. Во второй части работы подобранные условия использовались для получения криоЭМ структуры бычьего TRiC в открытой конформации с разрешением 4,42 Å.

#### Материалы и методы

Дифференциальная сканирующая (время-разрешенная) флуориметрия. В методе дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ) для возбуждения флуоресценции был использован пикосекундный лазер PLS-500-50 (InTop, Pocсия), длина волны возбуждения 500 нм, длительность импульса 26 пс, частота следования импульсов 25 МГц. Время-разрешенное измерение флуоресценции было реализовано на базе системы время-коррелированного счета единичных фотонов (time-correlated single photon count, TCSPC), собранной из следующих компонентов (производство Becker&Hickl, Германия): гибридный детектор НМР-100-07С в комплексе с платой счета единичных фотонов SPC-130EM и молулем питания DCC-100. Детектирование флуоресценции осуществлялось на длине волны 560 нм с помощью монохроматора ML-44 (Solar Laser Systems, Беларусь). Дополнительно, сразу после кюветы с образцом и перед монохроматором располагали длиннопропускающий оптический фильтр с отсечкой на 550 нм (FEL0550, Thorlabs, США) чтобы отсечь возбуждающий дазерный свет при детектировании.

Все флуоресцентные измерения образцов белков в объеме 1 мл производились в кварцевых кюветах, помещенных в термостатируемый держатель Qpod 2e (Quantum Northwest, США), температура которого контролировалась с помощью специализированного программного обеспечения. В качестве флуоресцентной метки был использован гидрофобный краситель Nile Red (Sigma Aldrich, США), являющийся чувствительным сенсором структурных изменений белкового окружения и белкового сворачивания в частности [28]. Непосредственно перед проведением измерений, флуоресцентный краситель Nile Red добавлялся в кювету с образцом в соотношении 1:1000, так, чтобы концентрация красителя в пробе составила 1 мкМ. Такая концентрация метки, с одной стороны, обеспечивает достаточный уровень флуоресцентного сигнала и оптимальную длительность экспозиции (60 с), с другой стороны – позволяет пренебречь возможным влиянием на белок со стороны DMSO, в котором был растворен Nile Red. Мечение белковых структур с помощью Nile Red является быстрым процессом [29], поэтому время инкубации в эксперименте составило 15 мин при комнатной температуре.

Измерение и обработка кинетик затухания флуоресценции осуществлялись с помощью программы SPCImage (Becker&Hickl, Германия). Кинетики были аппроксимированы с помощью биэкспоненциально затухающей функции:

$$I^{T}(t) = A_{1}e^{-\frac{t}{\tau_{1}}} + A_{2}e^{-\frac{t}{\tau_{2}}},$$

где  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  — короткая (коротко-живущая) и длинная (долго-живущая) временные компоненты затухания флуоресценции,  $A_1$ ,  $A_2$  — амплитуды (вклад) короткой и длинной временных компонент,  $I^T(t)$  интенсивность флуоресценции, измеренная в ходе эксперимента при заданной температуре T. Температурные зависимости параметров затухания флуоресценции  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  и их произведений (в частности,  $\tau_1 \times A_1$  и  $\tau_2 \times A_2$ ) анализировались

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ / LOMONOSOV BIOLOGY JOURNAL. 2023. Т. 78. № 3S

в программе Origin (Origin Lab, США) для определения температуры фазового перехода. Из проанализированных температурных зависимостей параметров флуоресценции наибольшим контрастом характеризуется произведение  $A_2 \times \tau_2$  – амплитуды и среднего времени жизни длительной компоненты кинетики затухания флуоресценции.

Подготовки образиов для криоЭМ. анализ проекций одиночных частиц и построение атомной *модели*. Выделение и очистка TRiC проводились по описанной ранее методике [30]. Перед нанесением образца очищенного белка поддерживающие сетки для электронной микроскопии с периодическими отверстиями в аморфной пленке углерода (Quantifoil R1.2/1.3, Quantifoil, Германия) были обработаны в тлеюшем разряде с помощью установки PELCO easiGlow при стандартных условиях: время обработки образца – 30 с, сила тока – 0,25 мА, остаточное давление в камере – 0,26 мБар. На следующем этапе с использованием обработанных сеток производилась витрификация образцов в камере установки Vitrobot Mark IV (FEI, США) при следующих параметрах: сила сжатия при промакивании – 0 ед., время блоттинга – от 2 до 3 с, температура в камере – 4,5°С, влажность в камере – 95–100%. Подготовленные сетки с аморфным льдом переносились при криогенной температуре в просвечивающий криоэлектронный микроскоп Titan Krios 60-300 (FEI, США), оборудованный высокоэффективным детектором электронов Falcon II. Съемка изображений производилась с использованием программного обеспечения EPU (FEI, США) с номинальным увеличением 59000, что соответствовало размеру пикселя на уровне образца 1,12 Å.

Начальные этапы обработки данных производились с привлечением программного пакета Warp (http://www.warpem.com/warp/) [31]. Предварительная реконструкция структуры выполнялась с использованием программного пакета CryoSPARC (https://cryosparc.com/) [32]. Трехмерная реконструкция и классификация производились в программных пакетах Relion [33] и CisTEM [34].

Для построения атомной модели в качестве исходных данных использовалась ранее опубликованная структура человеческого TRiC [27], построенная с помощью криоЭМ-карты плотности с разрешением 3,1 Å (PDB: 7X7Y). Аминокислотная последовательность в этой модели была изменена для соответствия бычьему варианту TRiC. Модель была гибко вписана в полученную нами карту плотности в ISOLDE [35] с использованием ограничений (restraints) по расстояниям и углам, заданных относительно исходной модели. Дополнительно модель была оптимизирована с помощью PHENIX [36], в нем же произведена валидация полученных результатов.

#### Результаты и обсуждение

Влияние состава буфера на температурную стабильность белка. В опубликованных работах, посвященных исследованиям структуры TRiC методом криоЭМ, значительно различаются условия получения необходимого образца. В частности, концентрации глицерина в образцах варьируются от 5 до 20% [27, 37], а концентрации соли – от 50 до 150 мМ [25, 37]. Для уменьшения эффектов денатурации и агрегации TRiC при работе метом криоЭМ необходим тщательный подбор состава образцов, поэтому на первом этапе работы мы сравнили температурную стабильность белка для следующих проб:

1) контрольная проба (кп): 0,5 мг/мл TRiC в 20 мМ НЕРЕЅ рН 7,2;

- 2) кп + 100 мМ KCl;
- 3) кп + 10% глицерин;
- 4) кп +100 мМ KCl + 10% глицерин.

Результаты представлены на рис. 1. Из проанализированных температурных зависимостей параметров флуоресценции наибольший контраст имела зависимость параметра  $A_2 \times \tau_2(T)$  – произведения амплитуды и времени жизни длинной компоненты кинетики затухания флуоресценции. График температурной зависимости первой производной указанной величины от температуры ( $\Delta(A_2 \times \tau_2)/\Delta T$ ) имеет характерный колоколообразный профиль, положение максимума которого соответствует температуре фазового перехода.



**Рис. 1.** Графики температурных зависимостей первой производной кривых плавления  $A_2 \times \tau_2(T)$  для проб TRiC различного состава буферного раствора.  $A_2 \times \tau_2$  – произведение амплитуды  $A_2$  и времени жизни длинной компоненты  $\tau_2$  кинетики затухания флуоресценции красителя Nile Red.

Проведенный эксперимент показывает различную температурную стабильность белка в исследованных пробах – положения экстремумов ( $T_{\Delta(A_2\tau_2)/\Delta T}$  max) на рис. 1 соответствуют точкам перегиба на кривых плавления соответствующих проб. Полученные данные указывают, что температурная стабильность убывает в ряду проб 3 ( $T_{\Delta(A_2\tau_2)/\Delta T}^{\text{образен 3}}$  max = 59,6°C), 1 ( $T_{\Delta(A_2\tau_2)/\Delta T}^{\text{образен 3}}$  max = 56,4°C), 2 ( $T_{\Delta(A_2\tau_2)/\Delta T}^{\text{образен 4}}$  max = 56,4°C), Таким образом, наибольшую стабильность показала проба 3 состава 0,5 мг/мл TRiC, 20 мМ HEPES pH 7,2, 10% глицерина.

Получение структуры TRiC по данным крио ЭМ. Для этого этапа работы был выбран образец следующего состава: 1,3 мг/мл TRiC в 20 мМ HEPES, pH 7,2, 10% глицерина, 1 мМ АТФ-гамма-S. Для борьбы с приоритетными ориентациями частиц после обработки сеток в тлеющем разряде на них добавлялся 0,1%-ный раствор полилизина. Автоматизированный набор экспериментальных данных позволил получить 2512 стеков изображений. При помощи программного пакета Warp была произведена коррекция дрейфа, оценка параметров функции передачи контраста, а также выбор на изображениях одиночных проекций объекта исследования. После пре-процессинга выбранные проекции частиц экспортировались в программный пакет CryoSPARC. На следующем этапе была проведена двухмерная классификация проекций, после которой 74000 частиц были выбраны для дальнейшего анализа. Также для борьбы с приоритетными ориентациями частиц производилась съемка сеток с наклоном 15° и 45°, что позволило получить 28000 проекций, не представленных ранее при получении данных без наклона образца. На последнем этапе частицы, полученные без наклона, а также с наклоном 15° и 45°, были сгруппированы и использовались для трехмерной классификации и реконструкции в сгуоSPARC. В результате была получена карта плотности TRiC с разрешением 4,42 Å (рис. 2).

Полученная структура представляет собой открытую конформацию TRiC. Локальное разрешение падает от экваториальных к более подвижным апикальным доменам, что характерно для шаперонинов (рис. 2А, Б). Кроме вариаций локального разрешения между доменами у полученной структуры также наблюдается различие между кольцами: при высоких пороговых значениях в одном из колец видима только его экваториальная часть (рис. 2В, Г), а второе кольцо проявляется при понижении порога (рис. 2Д, Е). Подобный результат был ранее получен для кристаллографической структуры TRiC в открытой конформации,



**Рис. 2.** Открытая конформация бычьего шаперонина TRiC, полученная по данным криоэлектронной микроскопии с разрешением 4,42 Å. **А** – Вариации локального разрешения реконструкции. **Б** – срез через экваториальные домены. **В**, **Г** – вид со стороны апикальных доменов (**B**) и с боковой стороны (**Г**) на карту плотности со вписанной в нее атомной моделью при пороговом значении 1,5  $\sigma$ . **Д**, **Е** – вид со стороны апикальных доменов (**Д**) и с боковой стороны (**Г**) на карту плотности при пороговом значении 0,6  $\sigma$ .

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ / LOMONOSOV BIOLOGY JOURNAL. 2023. Т. 78. № 3S

что, как предполагалось, могло быть следствием кристаллографических контактов с соседними комплексами в элементарной ячейке [38]. Поскольку аналогичная картина наблюдается и в криоЭМ-структуре, причиной могут быть не артефакты кристаллизации, а наличие нескольких конформаций и/или высокая подвижность субъединиц второго кольца. Сравнение того кольца, где видны все субъединицы, с ранее опубликованными структурами указывает на сходство полученной нами структуры с комплексами TRiC с АТФ или его негидролизуемыми аналогами.

#### Заключение

В работе были оптимизированы протоколы для подготовки образца бычьего шаперонина TRiC, получения его изображений методом криоЭМ

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gestaut D., Limatola A., Joachimiak L., Frydman J. The ATP-powered gymnastics of TRiC/CCT: an asymmetric protein folding machine with a symmetric origin story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019;55:50–58.

2. Yam A.Y., Xia Y., Lin H.T.J., Burlingame A., Gerstein M., Program B. Defining the TRiC/CCT interactome links chaperonin function to stabilization of new-ly-made proteins with complex topologies. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008;15(12):1255–1262.

3. Bigotti M.G., Clarke A.R. Chaperonins: The hunt for the Group II mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008;474(2):331–339.

4. Spiess C., Meyer A.S., Reissmann S., Frydman J. Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol.* 2004;14(11):598–604.

5. Skjærven L., Cuellar J., Martinez A., Valpuesta J.M. Dynamics, flexibility, and allostery in molecular chaperonins. *FEBS Lett.* 2015;589(19):2522–2532.

6. Reissmann S., Joachimiak L.A., Chen B., Meyer A.S., Nguyen A., Frydman J. A Gradient of ATP affinities generates an asymmetric power stroke driving the chaperonin TRIC/CCT folding cycle. *Cell Rep.* 2012;2(4):866–877.

7. Reissmann S., Parnot C., Booth C.R., Chiu W., Frydman J. Essential function of the built-in lid in the allosteric regulation of eukaryotic and archaeal chaperonins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14(5):432–440.

8. Meyer A.S., Gillespie J.R., Walther D., Millet I.S., Doniach S., Frydman J. Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell*. 2003;113(3):369–381.

9. Cong Y., Schröder G.F., Meyer A.S., Jakana J., Ma B., Dougherty M.T., Schmid M.F., Reissmann S., Levitt M., Ludtke S.L., Frydman J., Chiu W. Symmetry-free cryo-EM structures of the chaperonin TRiC along its ATPase-driven conformational cycle. *EMBO J.* 2012;31(3):720–730.

10. Joachimiak L.A., Walzthoeni T., Liu C.W., Aebersold R., Frydman J. The structural basis of substrate recognition by the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Cell*. 2014;159(5):1042–1055.

11. Balch W.E., Morimoto R.I., Dillin A., Kelly J.W. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 2008;319(5865):916–919.

и построения трехмерной реконструкции. Результатом стала структура TRiC в открытой конформации с разрешением 4,42 Å. Вариации локального разрешения структуры указывают на значительное различие конформаций между двумя кольцами TRiC.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20055). Исследования с помощью криоЭМ были выполнены на оборудовании ресурсного центра Зондовой и электронной микроскопии НИЦ «Курчатовский институт». Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

12. Bouhouche A., Benomar A., Bouslam N., Chkili T., Yahyaoui M. Mutation in the epsilon subunit of the cytosolic chaperonin-containing t-complex peptide-1 (Cct5) gene causes autosomal recessive mutilating sensory neuropathy with spastic paraplegia. *J. Med. Genet.* 2006;43(5):441–443.

13. Kasembeli M., Lau W.C.Y., Roh S.H., Eckols T.K., Frydman J., Chiu W., Tweardy D.J. Modulation of STAT3 folding and function by TRiC/CCT chaperonin. *PLoS Biol.* 2014;12(4):e1001844.

14. Trinidad A.G., Muller P.A.J., Cuellar J., Klejnot M., Nobis M., Valpuesta J.M., Vousden K.H. Interaction of p53 with the CCT complex promotes protein folding and wild-type p53 activity. *Mol. Cell.* 2013;50(6):805–817.

15. Feldman D.E., Thulasiraman V., Ferreyra R.G., Frydman J. Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol. Cell.* 1999;4(6):1051–1061.

16. Feldman D.E., Spiess C., Howard D.E., Frydman J. Tumorigenic Mutations in VHL disrupt folding *in vivo* by interfering with chaperonin binding. *Mol. Cell.* 2003;12(5):1213–1224.

17. Leitner A., Joachimiak L.A., Bracher A., Mönkemeyer L., Walzthoeni T., Chen B., Pechmann S., Holmes S., Cong Y., Ma B., Ludtke S., Chiu W., Hartl F.U., Aebersold R., Frydman J. The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Struct. Lond. Engl.* 1993. 2012;20(5):814–825.

18. Brandvold K.R., Morimoto R.I. The chemical biology of molecular chaperones – implications for modulation of proteostasis. *J. Mol. Biol.* 2015;427(18):2931–2947.

19. Tam S., Spiess C., Auyeung W., Joachimiak L., Chen B., Poirier M.A., Frydman J. The chaperonin TRiC blocks a huntingtin sequence element that promotes the conformational switch to aggregation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(12):1279–1285.

20. Tam S., Geller R., Spiess C., Frydman J. The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat. Cell Biol.* 2006;8(10):1155–1162.

21. Kitamura A., Kubota H., Pack C.G., Matsumoto G., Hirayama S., Takahashi Y., Kimura H., Kinjo M., Morimoto R.I., Nagata K. Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat. Cell Biol.* 2006;8(10):1163–1170.

22. Behrends C., Langer C.A., Boteva R., Böttcher U.M., Stemp M.J., Schaffar G., Rao B.V., Giese A., Kretzschmar H., Siegers K., Hartl F.U. Chaperonin TRiC promotes the assembly of polyQ expansion proteins into nontoxic oligomers. *Mol. Cell.* 2006;23(6):887–897.

23. Sot B., Rubio-Muñoz A., Leal-Quintero A., Martínez-Sabando J., Marcilla M., Roodveldt C., Valpuesta J.M. The chaperonin CCT inhibits assembly of  $\alpha$ -synuclein amyloid fibrils by a specific, conformationdependent interaction. *Sci. Rep.* 2017;7(1):40859.

24. Yébenes H., Mesa P., Muñoz I.G., Montoya G., Valpuesta J.M. Chaperonins: two rings for folding. *Trends Biochem. Sci.* 2011;36(8):424–432.

25. Jin M., Han W., Liu C., Zang Y., Li J., Wang F., Wang Y., Cong Y. An ensemble of cryo-EM structures of TRiC reveal its conformational landscape and subunit specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019;116(39):19513–19522.

26. Cong Y., Baker M.L., Jakana J., Woolford D., Miller E.J., Reissmann S., Kumar R.N., Redding-Johanson A.M., Batth T.S., Mukhopadhyay A., Ludtke S.J., Frydman J., Chiu W. 4.0-A resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010;107(11):4967–4972.

27. Liu C., Jin M., Wang S., Han W., Zhao Q., Wang Y., Xu C., Diao L., Yin Y., Peng C., Bao L., Wang Y., Cong Y. Pathway and mechanism of tubulin folding mediated by TRiC/CCT along its ATPase cycle revealed using cryo-EM. *Commun. Biol.* 2023;6(1):531.

28. Leiske D.L., Shieh I.C., Tse M.L. A method to measure protein unfolding at an air-liquid interface. *Langmuir*. 2016;32(39):9930–9937.

29. Daban J.R. Fluorescent labeling of proteins with Nile red and 2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)-furanone: Physicochemical basis and application to the rapid staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels and Western blots. *Electrophoresis*. 2001;22(5):874–880.

30. Kudryavtseva S.S., Stroylova Y.Y., Kurochkina L.P., Muronetz V.I. The chaperonin TRiC is blocked by native and glycated prion protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 2020;683:108319.

31. Tegunov D., Cramer P. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp. *Nat. Methods*. 2019;16(11):1146–1152.

32. Punjanji A., Rubinstein J.L., Fleet D.A., Brubaker M.A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*. 2017;14(3):290-296.

33. Zivanov J., Nakane T., Forsberg B.B.O., Kimanius D., Hagen W.J.J.H., Lindahl E., Scheres S.H.W.H. New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife*. 2018;7:e42166.

34. Grant T., Rohou A., Grigorieff N. CisTEM, userfriendly software for single-particle image processing. *eLife*. 2018;7:e35383.

35. Croll T.I. ISOLDE: A physically realistic environment for model building into low-resolution electron-density maps. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 2018;74(6):519–530.

36. Afonine P.V., Poon B.K., Read R.J., Sobolev O.V., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A., Adams P.D. Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* 2018;74(6):531–544.

37. Zang Y., Jin M., Wang H., Cui Z., Kong L., Liu C., Cong Y. Staggered ATP binding mechanism of eukaryotic chaperonin TRiC (CCT) revealed through high-resolution cryo-EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016;23(12):1083–1091.

38. Muñoz I.G., Yébenes H., Zhou M., Mesa P., Serna M., Park A.Y., Bragado-Nilsson E., Beloso A., De Cárcer G., Malumbres M., Robinson C.V., Valpuesta J.M., Montoya G. Crystal structure of the open conformation of the mammalian chaperonin CCT in complex with tubulin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011;18(1):14–20.

> Поступила в редакцию 12.08.2023 После доработки 15.09.2023 Принята в печать 17.09.2023

### SHORT COMMUNICATION

## Cryo-EM structure of bovine chaperonin TRiC/CCT in open conformation

T.B. Stanishneva-Konovalova<sup>1, \*, #</sup>, E.B. Pichkur<sup>2, #</sup>, S.S. Kudryavtseva<sup>3</sup>, I.A. Yaroshevich<sup>4</sup>, A.N. Semenov<sup>5</sup>, E.G. Maksimov<sup>5</sup>, A.V. Moiseenko<sup>6</sup>, O.I. Volokh<sup>1</sup>, V.I. Muronetz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,

1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Department of Structural Biology, National Research Centre "Kurchatov institute," 1 Kurchatov Square, 123182, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,

1–40 Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Department of Biophysics and <sup>5</sup>Laboratory of Physical Chemistry of Biomembranes, Faculty of Biology,

Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

<sup>6</sup>Electron Microscopy Laboratory, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,

1–32 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia

\*e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru

#Equal contribution

In this work, conditions were selected for obtaining a sample of eukaryotic chaperonin TRiC suitable for studying by cryo-electron microscopy. Using the method of differential scanning (time-resolved) fluorimetry, the temperature stability of protein samples at different concentrations

of salt and glycerol was compared, and then the selected conditions were used to prepare the sample for microscopy. As a result, the structure of bovine TRiC in an open conformation was obtained at 4.42 Å resolution.

**Keywords**: chaperonin, TRiC, CCT, cryo-electron microscopy, quaternary protein structure, differential scanning (time-resolved) fluorimetry

Funding: The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 19-74-20055.

#### Сведения об авторах

*Станишнева-Коновалова Татьяна Борисовна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-95; e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-8427-8178

*Пичкур Евгений Борисович* — лаборант-исследователь Отдела структурной биологии НИЦ «Курчатовский институт». Тел.: 8-499-196—95—39; e-mail: eugene.pichkur@gmail.com

*Кудрявцева София Станиславовна* – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-53-59; e-mail: sofiia.kudriavtceva@gmail.com

*Ярошевич Игорь Александрович* — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: iyapromo@gmail.com

Семенов Алексей Николаевич — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории физико-химии биомембран биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: semenov@physics.msu.ru

*Максимов Евгений Георгиевич* – докт. биол. наук, зав. лабораторией физико-химии биомембран биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: emaksimoff@ yandex.ru

*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

*Волох Олеся Игоревна* — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: olesyavolokh@icloud.com

*Муронец Владимир Израилевич* – док. биол. наук, проф., зав. отделом биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-53-59; e-mail: vimuronets@belozersky.msu.ru