

ОБЗОР



УДК 576.311.348.7:576.311.346.2

Преодоление «разрыва в разрешении»: сочетание микроскопии сверхвысокого разрешения и криоэлектронной томографии для идентификации участков связывания митохондрий с виментином

И.Б. Алиева^{1, 2, *} , А.С. Шахов^{1, 2} , А.С. Чуркина^{1, 2} , А.А. Минин² ¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;²Институт белка, Российская академия наук, Россия, 142290, Московская область, г.о. Серпухов, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4

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

Прогресс в фундаментальных исследованиях напрямую связан с появлением новых методов, которые не просто расширяют устоявшиеся классические представления, но могут дать информацию, меняющую их принципиально. По нашим данным, виментиновые филаменты, связываясь с митохондриями, определяют их распределение и подвижность в клетках, а также влияют на уровень их мембранного потенциала. Кроме того, в N-концевой части молекулы виментина имеется область, отвечающая за взаимодействие виментиновых филаментов с митохондриями, а схожие аминокислотные последовательности обнаружены и в других белках. Поскольку уже было показано прямое взаимодействие филаментов виментина с микротрубочками и филаментами актина, эти факты в совокупности позволили нам предположить, что связь отдельных компонентов цитоскелета друг с другом и с митохондриями не ограничивается взаимодействием через сшивающие и моторные белки. Виментин (а возможно, и другие белки промежуточных филаментов) может регулировать взаимодействие цитоскелета с митохондриями. Инновационное исследование, выполненное с использованием криоэлектронной томографии, принципиально изменившее наши представления о трехмерной структуре филаментов виментина, побудило нас использовать возможности метода криоэлектронной микроскопии, чтобы попытаться идентифицировать сайты связывания виментина с другими компонентами цитоскелета и митохондриями. Решить эту задачу принципиально возможно, если объединить микроскопию сверхвысокого разрешения и криоэлектронную томографию, что позволит преодолеть существующий «разрыв разрешения» и решить сопутствующие проблемы.

Ключевые слова: митохондрии, виментин, микроскопия сверхвысокого разрешения, криоэлектронная томография

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-2

Введение

В последние десятилетия исследования в области биологии клетки активно развиваются во многом благодаря появлению целого ряда инновационных технологий в микроскопии, в том числе методов микроскопии сверхвысокого разрешения, позволяющих наблюдать биологические объекты с разрешением, превышающим дифракционный предел классической оптической микроскопии, а также методик криоэлектронной микроскопии. Сочетание появляющихся

технологий позволяет искать подходы к решению множества неразрешимых ранее задач, например, исследовать взаимодействие внутриклеточных структур различного размерного диапазона. В области наших интересов — взаимодействие митохондрий и компонентов цитоскелета клетки, диаметр филаментов которого лежит в наноразмерном диапазоне. Особенно актуальным в свете накопленных экспериментальных данных представляется взаимодействие митохондрий и промежуточных филаментов. Показано, что

виментиновые филаменты, связываясь с митохондриями, определяют их распределение и подвижность в клетках [1] и влияют на уровень их мембранного потенциала [2]. В N-концевой части молекулы виментина имеется область, отвечающая за взаимодействие виментиновых филаментов с митохондриями [1], а схожие аминокислотные последовательности обнаружены и в других белках, например, в десмине. Поскольку известно, что филаменты виментина способны напрямую взаимодействовать с микротрубочками [3] и филаментами актина [4], можно предположить, что связь отдельных компонентов цитоскелета друг с другом и с митохондриями не ограничивается взаимодействием через сшивающие и моторные белки. Виментин (также как, возможно, и другие белки промежуточных филаментов) способен регулировать взаимодействие цитоскелета с митохондриями [5]. Революционное исследование, выполненное с использованием криоэлектронной томографии и принципиально изменившее наши представления о трехмерной структуре филаментов виментина [6], побудило нас использовать возможности метода криоэлектронной микроскопии, чтобы попытаться идентифицировать сайты связывания виментина с другими компонентами цитоскелета и митохондриями. Решить эту задачу принципиально возможно, если объединить микроскопию сверхвысокого разрешения и криоэлектронную томографию. Задача состоит в том, чтобы идентифицировать и подробно охарактеризовать ультраструктуру участков связывания виментина (и, возможно, других промежуточных филаментов) с митохондриями — в частности, проверить, проходит ли N-конец виментина (десмина) только через внешнюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство или проникает через две мембраны и входит в митохондриальный матрикс. Исторически основной проблемой для решения соответствующих биологических вопросов для флуоресцентной корреляционной световой и электронной микроскопии был так называемый «разрыв разрешения». Мы надеемся, что использование микроскопии сверхвысокого разрешения вместо обычной флуоресцентной микроскопии в сочетании с корреляционным анализом и криоэлектронной томографией позволит нам преодолеть «разрыв разрешения» и решить наши проблемы.

Цитоскелет клетки — динамичный ансамбль из трех компонентов

История развития клеточной биологии, как и большинства естественных наук, напрямую связана с появлением новых методов исследования, позволяющих не только получать принципиально новые знания, но и фундаментальным образом пересматривать уже накопленные фак-

ты, расширяя сложившиеся классические представления и давая информацию, меняющую их кардинальным образом. Прекрасным примером, подтверждающим этот тезис, являются исследования цитоскелета клетки, отдельные компоненты которого — микротрубочки — были описаны как «нити веретена деления» во время митоза еще в 70-х гг. XIX в. [7–9] исследователями, использовавшими простейший световой микроскоп.

Позднее выдающийся российский и советский биолог Николай Константинович Кольцов (1872–1940) впервые ввел в обращение термин «цитоскелет», само значение которого указывало на то, что составляющие его компоненты — видимые в световой микроскоп «нити», расположенные в цитоплазме клетки — являются механически прочными и неизменными структурами, представляют собой своеобразный внутриклеточный каркас, подобный скелету человеческого тела. Появившийся позднее метод электронной микроскопии позволил с точностью до нанометров определить толщину филаментов и сделать вывод о том, что в составе цитоскелета обнаруживаются три типа «нитей» — микротрубочки (структуры диаметром 25 нм), актиновые микрофиламенты (тонкие фибриллы толщиной около 6 нм) и промежуточные филаменты (диаметр которых составляет 9–10 нм — то есть, по толщине эти филаменты занимают промежуточное положение между двумя упомянутыми выше).

Прогресс в биохимии и иммуноцитохимии позволил не только установить различия в химическом составе трех типов фибрилл, но и описать их поведение в живой клетке — оказалось, что компоненты цитоскелета не статичны, это динамично изменяющиеся структуры. Основным белком микротрубочек является белок тубулин, микрофиламенты образует белок актин (поэтому их часто называют актиновыми филаментами), эти компоненты мономерные. А вот промежуточные филаменты крайне вариативны по белковому составу в зависимости от типа клеток и тканей, в которых они располагаются. Оказалось, что динамическое поведение, функции этих компонентов, а также механизм осуществления этих функций заметно различаются [5]. При этом, все три компонента функционируют взаимосвязано, делая цитоскелет клеток животных одной из наиболее сложноорганизованных и функционально универсальных внутриклеточных систем, участвующих в целом комплексе процессов; от деления клеток и внутриклеточного транспорта до обеспечения клеточной подвижности и реакции клеток на внешние воздействия. Компоненты цитоскелета образуют высокоструктурированную и динамичную сеть, эффективно реагирующую на внешние и внутренние сигналы быстрой (в минутной шкале) реорганизацией.

Виментин — уникальный белок промежуточных филаментов

Дальнейший прогресс, связанный с появлением новых молекулярно-биологических и клеточных подходов к исследованиям, а также микроскопических методов прижизненных наблюдений, обеспечил бурный рост исследований динамики и функциональных особенностей микротрубочек и актиновых филаментов. Промежуточные филаменты исследовались не столь активно, интерес к их изучению возрос в связи с успехами медицинской генетики. Оказалось, что мутации белков промежуточных филаментов связаны с тяжелыми заболеваниями человека — кожными болезнями (вызываются мутациями кератинов), нервными патологиями (связаны с нарушениями нейрофиламентов), мышечными дистрофиями (результат мутаций десмина) и кардиомиопатиями (вызываемыми дефектами десмина и виментина) [10–13]. Данные о белковом разнообразии промежуточных филаментов свидетельствуют об их индивидуальной функциональной роли в физиологии различных клеток. При этом белок виментин, характерный для промежуточных филаментов мезенхимальных клеток, стоит особняком, являясь уникальным и важным компонентом, вовлеченным в функционирование многих типов клеток [5]. Виментин гораздо чаще других белков промежуточных филаментов вступает во взаимодействие с другими белками — количество белков-партнеров виментина составляет около 300, тогда как в среднем каждый другой белок промежуточных филаментов взаимодействует с пятьюдесятью другими белками [14]. Описанные мутации белков промежуточных филаментов приводят, как правило, к генетическим заболеваниям различной степени тяжести, но не приводят к летальному исходу, в то же время известны лишь единичные случаи заболеваний взрослых людей, причиной которых является мутация в гене виментина [15], а нарушение регуляции экспрессии виментина является ключевым событием целого ряда заболеваний человека [16, 17]. Без участия виментина другие промежуточные филаменты не способны формировать нормальную сеть, без его участия не могут нормально идти процессы регенерации и восстановления тканей после повреждения.

Взаимодействие виментиновых филаментов с митохондриями

Как уже указывалось, все компоненты цитоскелета взаимодействуют друг с другом: микротрубочки взаимодействуют с виментиновыми филаментами [18], а актиновые и виментиновые филаменты могут быть связаны напрямую при участии С-концевого (хвостового) домена молекулы виментина [4]. Функциональная взаимосвязь между всеми тремя системами призвана поддерживать клеточную структуру и форму, а также ре-

гулировать ее биохимические, механические и пространственные свойства. Компоненты цитоскелета и, особенно, промежуточные филаменты формируют в клетке фибриллярную сеть для организации внутриклеточной архитектуры и транспорта, а кроме того, у них обнаружены дополнительные важные функциональные роли, имеющие ключевое значение для передачи сигналов о физиологических процессах и стрессе. Их способность к взаимодействию с клеточными органеллами, которые влияют на функции, расположение и регуляцию окислительных процессов, привлекли внимание к этим полимерам как к важнейшим платформам для модуляторов белков и органелл. Особенно интересна взаимосвязь между особенностями митохондрий и передачей сигналов (например, их подвижностью и динамикой деления/слияния) и активностью виментиновых филаментов. Известно, что митохондрии в основном находятся в стационарном состоянии благодаря взаимодействиям с цитоскелетом (рис. 1), и лишь небольшая их часть находится в процессе транспорта по микротрубочкам [19–23].

Показано, что митохондрии способны направленно перемещаться в клетке в места наибольшего потребления энергии, и этот транспорт опосредован комплексом моторных белков, связанных с микротрубочками и микрофиламентами [24, 25]. Связь виментиновых филаментов с митохондриями, по-видимому, чрезвычайно важна для обеспечения клеточного митостазиса — совокупности процессов слияния и деления митохондрий, митохондриального транспорта и закрывания митохондрий.

По нашим собственным данным, виментиновые филаменты, связываясь с митохондриями, обеспечивают целую совокупность их важнейших свойств: определяют их распределение и подвижность в клетках [1], а также влияют на уровень их мембранного потенциала [2]. Нами было показано, что между этими клеточными компонентами возможна и прямая связь — в N-концевой части молекулы виментина имеется область, отвечающая за взаимодействие виментиновых филаментов с митохондриями (рис. 2) [1], а схожие аминокислотные последовательности обнаружены и в других белках, например, в десмине.

Поскольку уже было показано прямое взаимодействие филаментов виментина с микротрубочками [3] и филаментами актина [4], эти факты в совокупности позволили нам предположить, что связь отдельных компонентов цитоскелета друг с другом и с митохондриями не ограничивается взаимодействием через сшивающие и моторные белки. Виментин (и, возможно, другие белки промежуточных филаментов), по-видимому, может взаимодействовать с митохондриями напрямую, а также регулировать их взаимодействие с цитоскелетом [5].

Революция в исследовании структуры виментиновых филаментов

Революционное исследование, выполненное в прошлом году методом криоэлектронной томографии, коренным образом изменило ставшее уже классическим представление о трехмерной структуре виментиновых филаментов [6]. Оказалось, что N-концевые фрагменты виментина не локализованы на его поверхности, как предполагалось ранее: они ориентированы внутрь филамента, в просвет обнаруженной авторами работы полости. Таким образом, реконструкция виментинового филамента с помощью криоэлектронной микроскопии поставила перед исследователями целый ряд вопросов — в частности, необходимо понять, каким же образом осуществляется связывание N-концевых участков

виментина с митохондриями, неоднократно описанное ранее и характерное не только для виментина [26], но и для десмина [27].

Данные, полученные авторами методом криоэлектронной микроскопии, мотивировали нас использовать возможности современных методов исследований, чтобы попытаться идентифицировать области связывания виментина с митохондриями и другими компонентами цитоскелета. Для решения этой задачи необходимо идентифицировать на светооптическом уровне участки связывания митохондрий с виментином, определить степень их колокализации и исследовать области с высокой колокализацией с помощью криоэлектронной томографии. На пути к решению поставленной задачи возникает проблема, описанная ранее как «разрыв в разрешении» («resolution gap»).

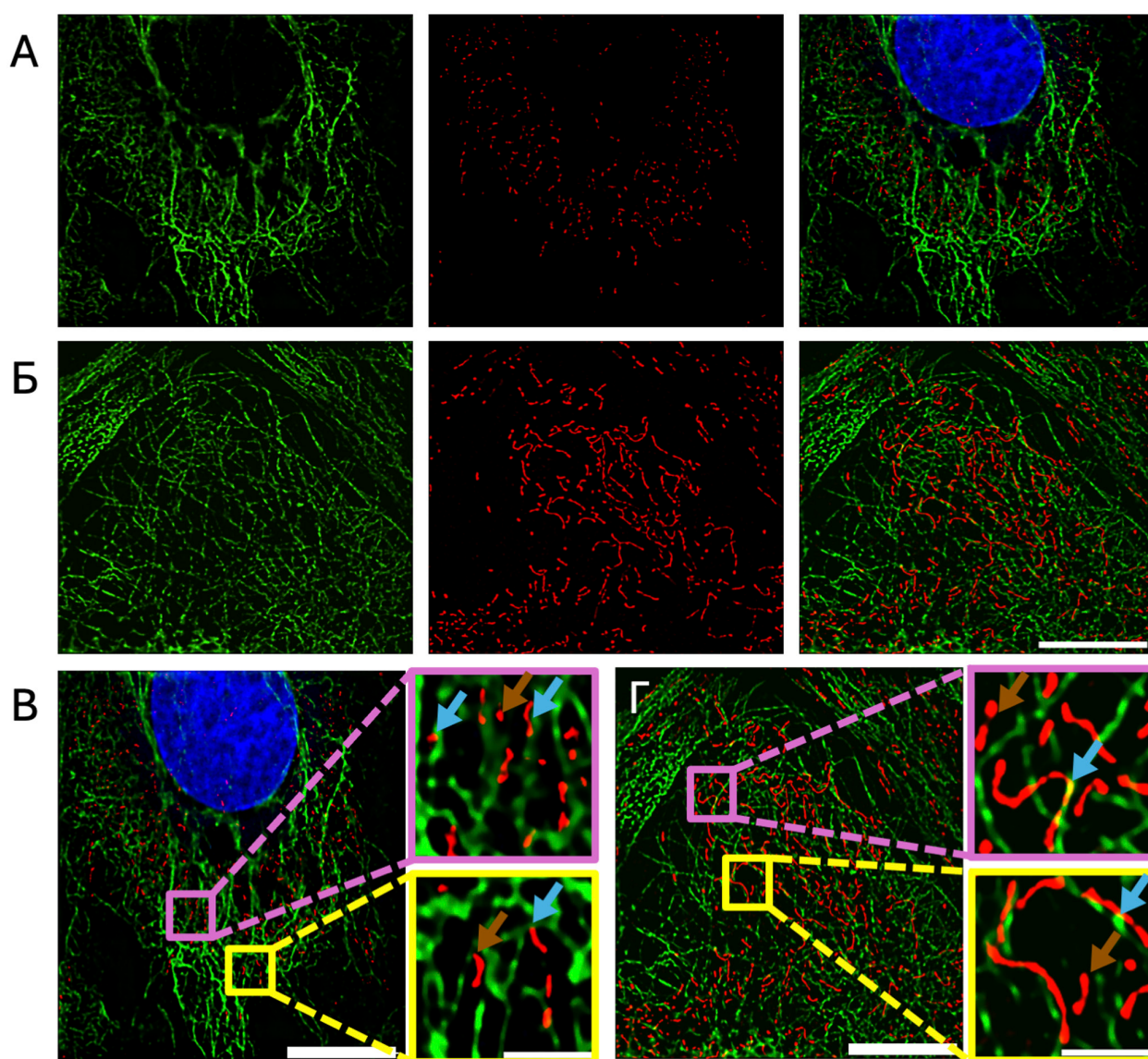


Рис. 1. Анализ колокализации митохондрий (средние фото панелей А и Б, окрашены красным цветом) с компонентами цитоскелета (левые фото панелей А и Б, окрашены зеленым цветом) на изображениях, полученных с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. А (правое фото), В — взаимное расположение митохондрии и виментина. Б (правое фото), Г — взаимное расположение митохондрий и микротрубочек. Голубыми стрелками показаны участки предполагаемой колокализации (окрашены желтым цветом), коричневыми — участки, где колокализация отсутствует. Увеличенные изображения выделенных участков показаны на врезках соответствующим цветом. Масштабные отрезки — 10 мкм и 2 мкм.

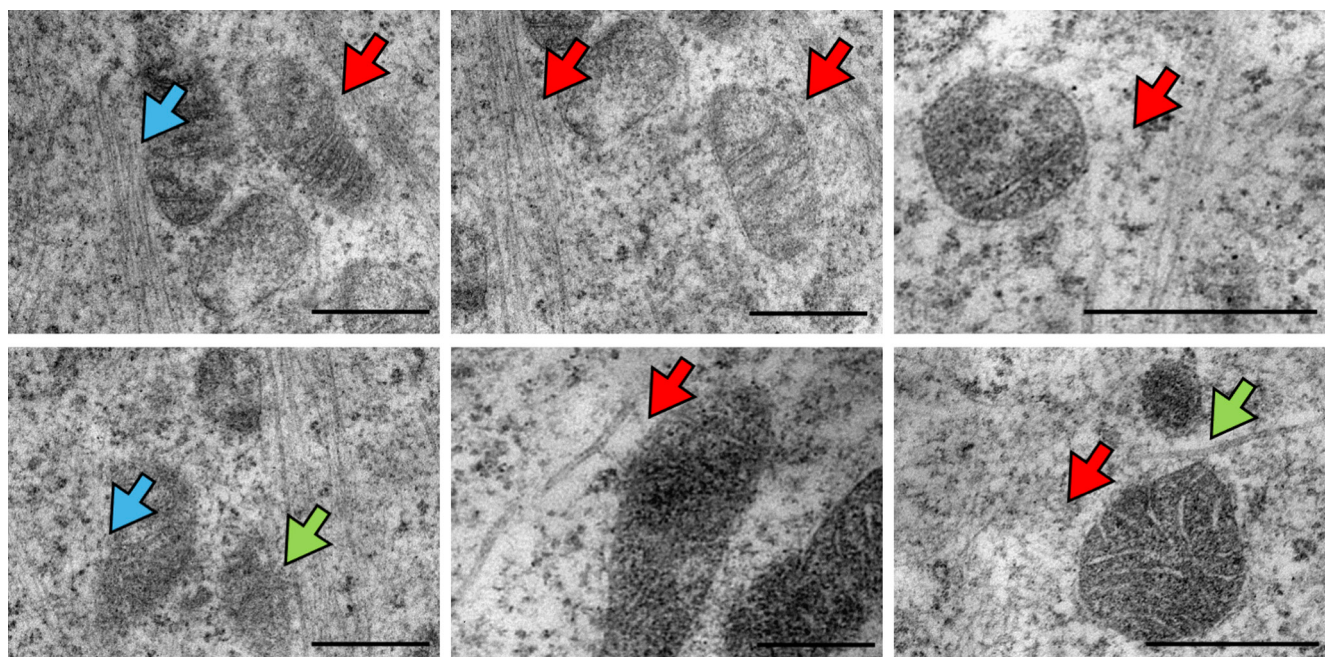


Рис. 2. Исследование взаимодействия митохондрий с различными элементами цитоскелета методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Несмотря на высокое разрешение, ТЭМ не всегда позволяет сделать однозначный вывод о наличии или отсутствии взаимодействия между митохондриями и компонентами цитоскелета. Синими стрелками показано возможные области взаимодействия митохондрий с виментиновыми промежуточными филаментами, зелеными – возможные области взаимодействия митохондрий с микротрубочками, красными – области, где взаимодействие митохондрий с компонентами цитоскелета отсутствует. На фото – клетки культуры REF52 (Rat Embryo Fibroblast 52), ТЭМ, масштабный отрезок – 500 нм.

Возможно ли преодолеть «разрыв в разрешении»?

Основной проблемой при решении задач корреляционной микроскопии, совмещающей результаты флуоресцентной светооптической микроскопии с электронной микроскопией (CLEM, Correlative Light-Electron Microscopy), был так называемый «разрыв в разрешающей способности». В то время как разрешение обычного флуоресцентного микроскопа составляет около 200 нм из-за дифракции света, электронная микроскопия имеет примерно на два порядка более высокое разрешение (~1 нм). Эта разница в разрешении («разрыв в разрешении») затрудняет сопоставление экспериментальной информации, полученной на основе флуоресцентных изображений с помощью светового микроскопа, и электронных изображений. Другими словами, неопределенность в локализации конкретных молекул по отношению к точным деталям ультраструктуры ограничивает интерпретацию корреляции. Попыткой преодолеть разрыв в разрешающей способности метода CLEM стало использование давно распространенного в электронной микроскопии подхода – применение ультратонких криосрезов (криосекционирование) для получения изображений [28]. При использовании ультратонких криосрезов эффективное осевое разрешение флуоресцентной микроскопии может быть увеличено до ~50 нм, в зависимости от толщины среза, что примерно на порядок превышает обычное

осевое разрешение в флуоресцентной микроскопии (~800 нм) [29]. Этот принцип был применен, например, при описании ультраструктуры гранул в нейтрофилах [30], а также структурных деталей сайтов транскрипции [31]. Однако наиболее важным достижением в области уменьшения разрыва в разрешении стало применение технологии сверхразрешения в световой микроскопии для анализа флуоресцентно-меченных структур в клетке. В 2006 г. были опубликованы две революционные статьи, описывающие совершенно новые методы – PALM (Photo-Activated Localization Microscopy) [32] и STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [33], которые позволили повысить разрешение флуоресцентной микроскопии до ~10–20 нм. Разумеется, методы сверхвысокого разрешения имеют свои ограничения: необходимость использования флуоресцентных меток и высокие требования к качеству образца, ограниченное время наблюдения для живых объектов, риск повреждения образца в результате его девитрификации, вызванный интенсивностью лазерного излучения, необходимой для получения изображений сверхвысокого разрешения. Для получения адекватных данных требуется тщательный подбор условий для съемки образцов, а полученные результаты требуют грамотной интерпретации. Однако эти сложности не останавливают исследователей, поскольку с помощью этих методов стало возможным точно определять локализацию конкретных молекул в ультраструк-

турном контексте, то есть адекватно совмещать изображение, полученное с помощью STORM (разрешение ~20 нм) и электронномикроскопическое изображение того же объекта. Использование метода STORM позволило напрямую сопоставлять молекулярную локализацию с ультраструктурой внутриклеточных органоидов и фибриллярных структур. Методы, совмещающие суперразрешение и электронную микроскопию, развиваются, появляются работы, где исследователи сосредоточены на улучшении визуализации и сочетают флуоресцентную микроскопию с криоэлектронной томографией или другими методами криоэлектронной микроскопии, что позволяет идентифицировать даже отдельные молекулы [34–37].

Заключение

Таким образом, все вышесказанное позволяет надеяться на возможность использования комплекса современных методов для преодоления «разрыва в разрешении», что дает нам теоретическое основание рассчитывать на успешное решение вопросов, связанных с идентификацией и ультраструктурным описанием потенциальных мест связывания промежуточных филаментов и митохондрий, а значит, позволит разрешить вопрос о том, каким образом осуществляется связь N-концевых участков виментина (расположенных, согласно последним данным, внутри проме-

жуточного филамента) и митохондрий. Анализируя преимущества и ограничения имеющихся в современном арсенале методов микроскопии сверхвысокого разрешения, возможно подобрать оптимальный для решения поставленной задачи метод и далее использовать микроскопию сверхвысокого разрешения в сочетании с корреляционным анализом для определения мест связывания и последующей криоэлектронной томографией (рис. 3), что позволит нам преодолеть «разрыв разрешения» и решить поставленные задачи.

Сочетая выбранный метод микроскопии высокого разрешения и криоэлектронную томографию, мы надеемся идентифицировать и детально описать ультраструктуру сайтов связывания виментиновых филаментов (а, возможно, и других промежуточных филаментов) с митохондриями — в частности, проверить, проходит ли N-конец виментина (десмина) через наружную мембрану митохондрий в межмембранное пространство, или он проникает через две мембраны и локализован в матриксе митохондрий.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-74-00036). Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

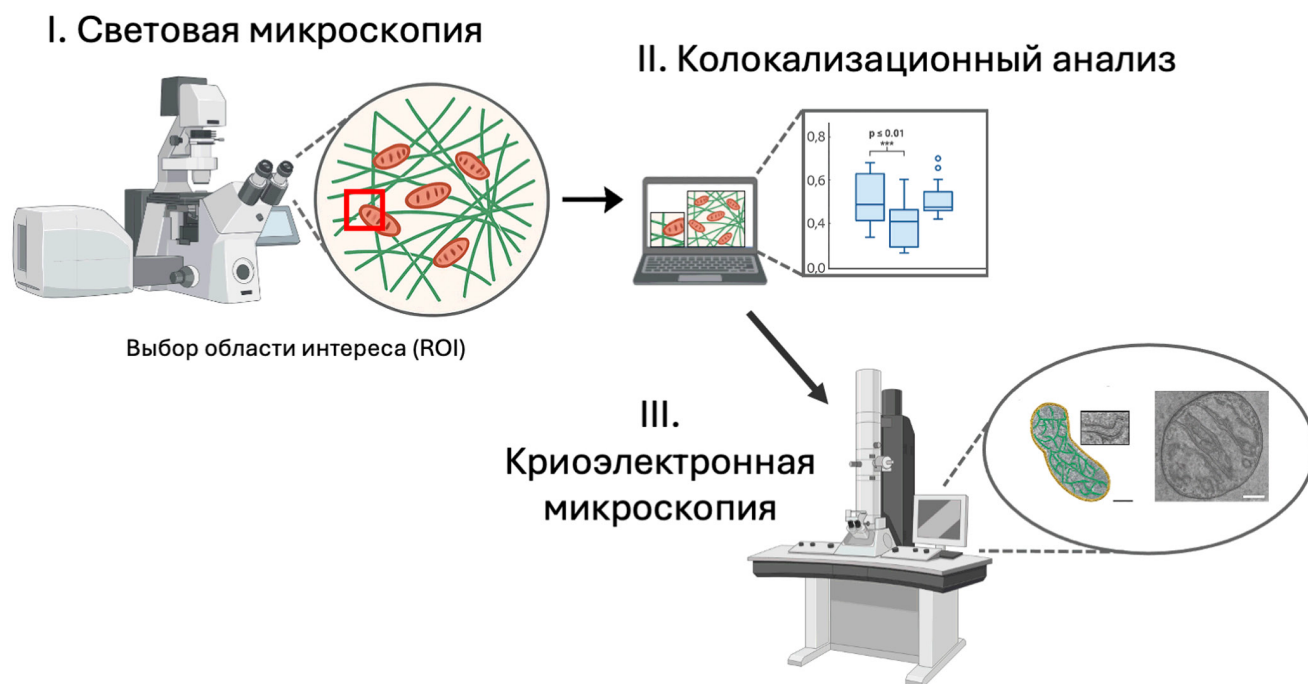


Рис. 3. Предлагаемая схема исследования, позволяющая выявлять участки колокализации митохондрий с компонентами цитоскелета. На первом этапе по изображениям, полученным методом флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, определяются области взаимодействия митохондрий с отдельными компонентами цитоскелета. На втором этапе по полученным композитным изображениям митохондрий и одного из компонентов цитоскелета проводится анализ их колокализации в выбранных областях посредством плагинов программы ImageJ (Fiji). Далее выбранные для анализа участки с высокой степенью колокализации митохондрий с компонентами цитоскелета исследуются при помощи криоэлектронной томографии, позволяющей точно установить наличие взаимодействия между органеллами и детально описать области их взаимодействия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nekrasova O.E., Mendez M.G., Chernoiivanenko I.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Kuczmarski E.R., Gelfand V.I., Goldman R.D., Minin A.A. Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 2011;22(13):2282–2289.
2. Chernoiivanenko I.S., Matveeva E.A., Gelfand V.I., Goldman R.D., Minin A.A. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB J.* 2015;29(3):820–827.
3. Schaedel L, Lorenz C, Schepers AV, Klumpp S, Köster S. Vimentin intermediate filaments stabilize dynamic microtubules by direct interactions. *Nat. Commun.* 2021;12(1):3799.
4. Esue O., Carson A.A., Tseng Y., Wirtz D. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. *J. Biol. Chem.* 2006;281(41):30393–30399.
5. Alieva I.B., Shakhov A.S., Dayal A.A., Churkina A.S., Parfenteva O.I., Minin A.A. Unique role of vimentin in the intermediate filament proteins family. *Biochemistry (Mosc.)*. 2024;89(4):726–736.
6. Eibauer M., Weber M.S., Kronenberg-Tenga R., Beales C.T., Boujemaa-Paterski R., Turgay Y., Sivagurunathan S., Kraxner J., Köster S., Goldman R.D., Medalia O. Vimentin filaments integrate low-complexity domains in a complex helical structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2024;31(6):939–949.
7. Flemming W. Studien in der entwicklungsgeschichte der najaden. *Sitzungsber. Akad. Wissensch. Wien.* 1875;71:81–147.
8. Hertwig O. Beiträge zur kenntnis der bildung, befruchtung und theilung des thierischen eies. *Morphol. Jb.* 1875;1:347–434.
9. Van Beneden E. Recherches sur les Dicyemides, survivants actuels d'un embranchement des Mésozoaires. *Bull. Acad. Roy. Méd. Belg.* 1876;41:1160–1205.
10. Cheng J., Syder A.J., Yu Q.C., Letal A., Paller A.S., Fuchs E. The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: A disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. *Cell.* 1992;70(5):811–819.
11. Chipev C.C., Korge B.P., Markova N., Bale S.J., Di-Giovanna J.J., Compton J.G., Steinert P.M. A leucine→proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis. *Cell.* 1992;70(5):821–828.
12. Côté F., Collard J.F., Julien J.P. Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell.* 1993;73(1):35–46.
13. Di Somma S., De Divitiis O., Marotta M., Salvatore G., Cudemo G., Cuda G., De Vivo F., Di Benedetto M.P., Ciaramella F., Caputo G., de Divitiis O. Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: An in vivo study in humans. *Heart.* 2000;84(6):659–667.
14. Battaglia R.A., Delic S., Herrmann H., Snider N.T. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research.* 2018;7:1796.
15. Müller M., Bhattacharya S.S., Moore T., Prescott Q., Wedig T., Herrmann H., Magin T.M. Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18(6):1052–1057.
16. Kim S.Y., Cho W., Kim I., Lee S.H., Oh G.T., Park Y.M. Oxidized LDL induces vimentin secretion by macrophages and contributes to atherosclerotic inflammation. *J. Mol. Med.* 2020;98(7):973–983.
17. Zeisberg M., Neilson E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 2009;119(6):1429–1437.
18. Eckes B., Dogic D., Colucci-Guyon E., Wang N., Maniotis A., Ingber D., Merckling A., Langa F., Aumailley M., Delouvé A., Kotliansky V., Babinet C., Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J. Cell Sci.* 1998;111(Pt. 13):1897–1907.
19. Kulik A.V., Gioeva F.K., Minin A.A. Videomicroscopic studies of the movement of mitochondria. *Russ. J. Dev. Biol.* 2002;33(5):299–305.
20. Некрасова О.Е., Минин А.А., Кулик А.В., Минин А.А. Регуляция фибронектином формы и внутриклеточного распределения митохондрий. *Биол. мемб.* 2005;22(2):58–65.
21. Кулик А.В., Некрасова О.Е., Минин А.А. Фибриллярный актин регулирует подвижность митохондрий. *Биол. мемб.* 2006;23(1):33–42.
22. Minin A.A., Kulik A.V., Gyoeva F.K., Li Y., Goshima G., Gelfand V.I. Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins. *J. Cell Sci.* 2006;119(Pt. 4):659–670.
23. Некрасова О.Е., Кулик А.В., Минин А.А. Протеинкиназа С регулирует подвижность митохондрий. *Биол. мемб.* 2007;24(2):126–131.
24. Morris R.L., Hollenbeck P.J. The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J. Cell Sci.* 1993;104(Pt. 3):917–927.
25. Chada S.R., Hollenbeck P.J. Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J. Exp. Biol.* 2003;206(Pt. 12):1985–1992.
26. Dayal A.A., Medvedeva N.V., Minin A.A. N-terminal fragment of vimentin is responsible for binding of mitochondria *in vitro*. *Biochemistry (Mosc.), Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* 2022;16(2):151–157.
27. Dayal A.A., Medvedeva N.V., Nekrasova T.M., Duhalin S.D., Surin A.K., Minin A.A. Desmin interacts directly with mitochondria. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(2):8122.
28. Tokuyasu K.T. A technique for ultracyotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* 1973;57(2):551–565.
29. Robinson J.M., Takizawa T., Pombo A., Cook P.R. Correlative fluorescence and electron microscopy on ultrathin cryosections: bridging the resolution gap. *J. Histochem. Cytochem.* 2001;49(7):803–808.
30. Takizawa T., Suzuki K., Robinson J.M. Correlative microscopy using FluoroNanogold on ultrathin cryosections. Proof of principle. *J. Histochem. Cytochem.* 1998;46(10):1097–1102.
31. Pombo A., Hollinshead M., Cook P.R. Bridging the resolution gap: Imaging the same transcription factories in cryosections by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1999;47(4):471–480.
32. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lipincott-Schwartz J., Hess H.F. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 2006;313(5793):1642–1645.
33. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods.* 2006;3(10):793–795.
34. Kaufmann R., Schellenberger P., Seiradake E., Dobbie I.M., Jones E.Y., Davis I., Hagen C., Grünwald K.

Super-resolution microscopy using standard fluorescent proteins in intact cells under cryo-conditions. *Nano Lett.* 2014;14(7):4171–4175.

35. Liu B., Xue Y., Zhao W., Chen Y., Fan C., Gu L., Zhang Y., Zhang X., Sun L., Huang X., Ding W., Sun F., Ji W., Xu T. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci. Rep.* 2015;5:13017.

36. Hoffman D.P., Shtengel G., Xu C.S., et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face elec-

tron microscopy of whole vitreously frozen cells. *Science.* 367(6475):eaaz5357.

37. van den Dries K., Fransen J., Cambi A. Fluorescence CLEM in biology: historic developments and current super-resolution applications. *FEBS Lett.* 2022;596(19):2486–2496.

Поступила в редакцию 14.07.2025

После доработки 10.09.2025

Принята в печать 11.09.2025

REVIEW

Overcoming the “resolution gap”: combination of super-resolution microscopy and cryo-electron tomography for mitochondria-vimentin binding sites identification

I.B. Alieva^{1, 2, *} , A.S. Shakhov^{1, 2} , A.S. Churkina^{1, 2} , A.A. Minin² 

¹A.N. Belozersky Institute of Physical and Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, 119992, Moscow, Russia;

²Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 4 Institutskaya Str., Pushchino, Serpukhov, Moscow Region, 142290, Russia

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

Progress in fundamental research is directly related to the emergence of new research methods that not only expand the established classical concepts, but can provide information that fundamentally changes them. According to our data, vimentin filaments, binding to mitochondria, determine their distribution and mobility in cells, affect the level of their membrane potential, there is a region responsible for the interaction of vimentin filaments with mitochondria in the N-terminal part of the vimentin molecule and similar amino acid sequences are found in other proteins, for example, in desmin. Since direct interaction of vimentin filaments with microtubules and actin filaments has already been shown, these facts together allowed us to assume that the connection of individual cytoskeleton components with each other and with mitochondria is not limited to interaction through cross-linker and motor proteins. Vimentin (and possibly other intermediate filament proteins) can regulate cytoskeletal interactions with mitochondria. A revolutionary study performed using cryo-electron tomography and fundamentally changing our understanding of the three-dimensional structure of vimentin filaments motivated us to use the capabilities of the cryo-electron microscopy method to try to identify the binding sites of vimentin with other cytoskeletal components and mitochondria. To meet this challenge is fundamentally possible if we combine super-resolution microscopy and cryo-electron tomography, which will bridge the existing “resolution gap” and solve associated problems.

Keywords: mitochondria, vimentin, super-resolution microscopy, cryo-electron tomography

Funding: The research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 23-74-00036).

Сведения об авторах

Алиева Ирина Борисовна — докт. биол. наук, зав. лабораторией клеточной подвижности отдела Электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел: 8-495-939-55-28; e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5726-4889>

Шахов Антон Сергеевич — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной подвижности отдела Электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел: 8-495-939-55-28; e-mail: sh.anton90@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9778-2656>

Чуркина Александра Сергеевна — мл. науч. сотр. лаборатории клеточной подвижности отдела Электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел: 8-495-939-55-28; e-mail: chur_aleks@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5902-108X>

Минин Александр Александрович — канд. биол. наук, зам. директора Института белка РАН. Тел: 8-499-135-21-47; e-mail: alexminin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-3647>