

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 78 • № 3 • 2023 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ
ПРИЛОЖЕНИЕ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

Материалы IV международной конференции «Криоэлектронная микроскопия 2023: достижения и перспективы» (RISSEM-2023), 4–7 июня 2023 г., Москва, Россия

СОДЕРЖАНИЕ

От редакторов

Соколова О.С., Станишневa-Коновaлова Т.Б., Кирпичников М.П.
Успехи структурных исследований методом электронной микроскопии
в России (итоги четвертой международной конференции RISSEM-2023) . . . 5

Обзоры

Шайтан К.В. Как биополимер (белок) сворачивается в уникальную
3D-структуру? 9

Краткие сообщения

Миронов П.А., Шенкарев З.О. Схемы замыкания дисульфидных связей
в токсинах пауков семейства Stenidae. Сравнение с предсказаниями
нейросети AlphaFold 2.0 13

Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Тимофеева Т.А., Федякина И.Т.
Криоэлектронная микроскопия оболочечных вирусов на базе
усовершенствованного просвечивающего электронного микроскопа:
вирусы гриппа типа А, В и коронавирус SARS-CoV-2 21

Мамаева Н.Ю., Деркачева Н.И., Гасанова Д.А., Соколова О.С.,
Глухов Г.С. Стабилизация полноразмерного S-белка коронавируса
SARS-CoV-2 в полимере SMA для исследования в электронном микроскопе . . 27

Демьянова И.В., Акулина Е.А., Жаркова И.И., Воинова В.В.,
Чеснокова Д.В., Хоссаин А.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А.,
Куликовская В.И., Николайчук В.В., Мухортова Ю.Р., Прядко А.С.,
Сурменева М.А., Сурменев Р.А., Шайтан К.В., Бонарцев А.П.
Рост мезенхимальных стволовых клеток на ориентированных
микроструктурированных пленках и электроформованных скаффолдах . . . 33

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2023

Станишневa-Коновaловa Т.Б., Пичкур Е.Б., Кудрявцевa С.С., Ярошевич И.А., Семенов А.Н., Максимов Е.Г., Моисеенко А.В., Волох О.И., Муронец В.И. Структура бычьего шаперонина TRiC/CCT в открытой конформации по данным криоэлектронной микроскопии	40
Атамас А.А., Гуськов А.И., Рогачев А.В. Структурное исследование рибосомы <i>Candida auris</i>	47
Моисеенко А.В., Егоров А.М., Шайтан К.В., Соколова О.С. Криоэлектронная микроскопия на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова	51
Градов О.В. Криоконвейерные протоколы в корреляционной световой и электронной микроскопии: от многоуровневой визуализации до моделирования биофизических эффектов и «криотераностики»	57
Молчанов В.С., Глухова С.А., Филиппова О.Е. Реологические свойства полисахаридных гидрогелей альгината с малыми добавками нанотрубок галлуазита для экструзионной 3D-печати	63

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 78 • No. 3 • 2023 • JULY — SEPTEMBER
SUPPLEMENT

Quarterly

Moscow University Press

Proceedings of the IV Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2023), June 4–7, 2023, Moscow, Russia

CONTENTS

Editorial

- Sokolova O.S., Stanishneva-Konovalova T.B., Kirpichnikov M.P.
Advances in structural research using electron microscopy in Russia
(results of the fourth international conference RICCEM-2023) 5

Reviews

- Shaitan K.V. How does a biopolymer (protein) fold into a unique
3D structure? 9

Short communications

- Mironov P.A., Shenkarev Z.O. Disulfide bond patterns in the toxins of spiders
of the Ctenidae family. Comparison with AlphaFold 2.0 predictions 13
- Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Timofeeva T.A., Fedyakina I.T.
Cryo-electron microscopy of enveloped viruses using upgraded transmission
electron microscope: Influenza type A, B viruses and SARS-CoV-2 21
- Mamaeva N.Yu., Derkacheva N.I., Gasanova D.A., Sokolova O.S.,
Glukhov G.S. Stabilization of full-length S-protein of SARS-Cov-2
coronavirus in SMA polymer for electron microscopy study 27
- Demianova I.V., Akoulina E.A., Zharkova I.I., Voinova V.V.,
Chesnokova D.V., Hossain A.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A.,
Kulikouskaya V.I., Nikolaichuk V.V., Mukhortova Yu.R., Pryadko A.S.,
Surmeneva M.A., Surmenev R.A., Shaitan K.V., Bonartsev A.P.
Growth of mesenchymal stem cells on oriented microstructured films
and electrospun scaffolds 33

Stanishneva-Konovalova T.B., Pichkur E.B., Kudryavtseva S.S., Yaroshevich I.A., Semenov A.N., Maksimov E.G., Moiseenko A.V., Volokh O.I., Muronets V.I. Cryo-EM structure of bovine chaperonin TRiC/CCT in open conformation	40
Atamas A.A., Guskov A.I., Rogachev A.V. Structural study of the <i>Candida</i> <i>auris</i> ribosome	47
Moiseenko A.V., Egorov A.M., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Cryo-electron microscopy at the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University . . .	51
Gradov O.V. Cryoconveyor protocols in correlation light and electron microscopy: From multilevel imaging to modeling of biophysical effects and “cryotheranostics”	57
Molchanov V.S., Glukhova S.A., Philippova O.E. Rheological behavior of polysaccharide hydrogels of alginate reinforced by small amount of halloysite nanotubes for extrusion 3D printing	63

ОТ РЕДАКТОРОВ



УДК 577.322.2+577.322.5

Успехи структурных исследований методом электронной микроскопии в России (итоги четвертой международной конференции RICSEM-2023)

О.С. Соколова* , Т.Б. Станишневa-Коновалова , М.П. Кирпичников

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

IV международная конференция «Криоэлектронная микроскопия 2023: достижения и перспективы» (RICSEM-2023) прошла на биологическом факультете МГУ в гибридном (онлайн- и оффлайн-) формате и собрала более 250 исследователей из 10 стран. По итогам конференции был издан специальный выпуск журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология». В этой статье кратко обсуждаются основные результаты конференции и содержание опубликованных в спецвыпуске работ.

Ключевые слова: криоэлектронная микроскопия, криоЭМ, структурная биология, структуры макромолекул, конференция, RICSEM

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-1

С 4 по 7 июня 2023 г. в Москве проходила IV международная конференция «Криоэлектронная микроскопия 2023: достижения и перспективы» (IV Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy, RICSEM-2023) (рисунок). Первый день начался с выступления академика В.О. Попова. В приветственной речи он отметил, что за последние годы криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) достигла выдающихся успехов, и этот метод взяли на вооружение фармакологи, химики-органики, физики, специалисты в области наук о материалах. Завершился первый день уже традиционной экскурсией по Ботаническому саду МГУ. Далее началась работа конференции:

пленарные заседания, секционные заседания, постерные сессии.

Биологический факультет МГУ стал в эти дни площадкой для активных научных дискуссий. Работа конференции проходила в гибридном формате, совмещая онлайн- и оффлайн-доклады. Второй день конференции открыл нобелевский лауреат по химии 2002 г. Курт Вютрих. За четыре дня работы конференции в ней приняли участие более 250 исследователей. Около 40 ведущих специалистов в области структурной биологии из 10 стран выступили с лекциями. 15 лекций, включая часовую лекцию Курта Вютриха, прошли онлайн.



Рисунок. Участники конференции после ее закрытия, перед аудиторией М-1 на биологическом факультете МГУ.

© Соколова О.С., Станишневa-Коновалова Т.Б., Кирпичников М.П., 2023

Метод криоЭМ, позволивший ученым расшифровать структуру многих макромолекул, в последние годы развивается особенно быстро. Разрешение метода с 2015 г. существенно возросло и в 2020 г. оно впервые сравнялось с кристаллографическим [1, 2]. Стало возможно отслеживать изменения пространственной структуры биологических молекул, а также положение ионов и молекул воды. Такие структурные данные необходимы для разработки новых лекарственных средств и рекомбинантных вакцин против появляющихся заболеваний. Российскими исследователями из Москвы, Казани, Гатчины были получены реконструкции белковых молекул с околотоновым разрешением. Некоторые неопубликованные результаты были представлены на конференции RICSEM-2023. Мы можем с уверенностью утверждать, что у нас есть молодые мотивированные ученые, которые прошли европейские школы и обучились методам криоЭМ. Основное препятствие для развития метода в России — количество качественных криомикроскопов, имеющих в распоряжении русских ученых; единственный высокоразрешающий микроскоп находится в НИЦ «Курчатовский институт».

По итогам конференции впервые в истории RICSEM издан специальный выпуск журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология». Он в какой-то мере является уникальным, так как собрал статьи, посвященные достижениям в области структурной биологии и электронной микроскопии в России и за рубежом. Авторами сборника являются ученые различных факультетов МГУ, институтов РАН, МГУ-ППИ в Шэньчжэне (Китай) и других научных учреждений. Наиболее распространенными темами, над которыми работают биологи, использующие электронную микроскопию, являются строение вирусов и вирусных белков, мембранных белков, рибосом. Это, очевидно, связано с перспективами применения криоЭМ для получения атомных реконструкций и дальнейшего дизайна лекарственных средств.

Спецвыпуск открывает теоретическая работа проф. К.В. Шайтана [3]. Теоретические исследования позволяют заложить физическую основу для развития теории фолдинга в направлении интерпретации разнообразных экспериментальных наблюдений и выяснения принципов формирования аминокислотного кода для 3D-структур белков. Для моделирования 3D-структур белков *de novo* часто используются нейросети, например, AlphaFold 2.0 [4]. Авторы П.А. Миронов и З.О. Шенкарев провели моделирование структур ктениотоксинов (многокомпонентных ядов пауков-бегунов *Ctenidae*) и сравнили свои результаты с предсказаниями программы AlphaFold 2.0 [5]. Выяснилось, что эта нейронная сеть все еще не

всегда корректно предсказывает структуры цистеин-богатых пептидов, особенно если моделируются структуры зрелых молекул без лидерных последовательностей.

Методы криоЭМ незаменимы в области структурных исследований оболочечных вирусов — опасных патогенов человека и животных. В работе Л.В. Кордюковой и соавт. продемонстрированы возможности просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 (входящего в состав уникальной научной установки «3D-ЭМС» МГУ имени М.В. Ломоносова), дополненного криодержателем, для визуализации штаммов вирусов гриппа А и В, а также вирионов SARS-CoV-2, инактивированных бета-пропиолактоном [6]. Получены изображения, позволяющие сделать выводы о сохранности вирусных частиц. Еще одна работа молодых ученых биологического факультета Н.Ю. Мамаевой и соавт. посвящена исследованию S-белка коронавируса [7]. Авторы разработали протокол очистки полноразмерного S-белка с использованием сополимера стирола и малеиновой кислоты (липидисков). Полученные препараты были исследованы в электронном микроскопе уникальной научной установки «3D-ЭМС» и показали, что применение липидисков помогает улучшить разрешение реконструкций за счет стабилизации мембранной части белка. В работе И.В. Демьяновой и соавт. с помощью сканирующей электронной микроскопии были визуализированы пленки и скаффолды из поли-3-оксибутирата [8]. Было показано, что различная микроструктура поверхности не влияет на рост мезенхимальных стволовых клеток на пленках и скаффолдах в течение недели, однако оказывает влияние на морфологию прикрепленных клеток.

Одним из преимуществ метода криоЭМ является возможность построения реконструкций молекул в разных конформациях. Т.Б. Станишнев-Коновалова и соавт. использовали криоЭМ для расчета трехмерной структуры бычьего шаперона TRiC в открытой конформации с разрешением 4,4 Å [9]. А.А. Атамас и соавт. с помощью криоЭМ и анализа изображений получили структуру рибосомы патогенного грибка *Candida auris* с разрешением 2,8 Å [10]. Авторы описали архитектуру субъединиц рибосомы и их взаимодействие, что поможет в дальнейшем для разработки антимикотических лекарств.

Нужно отметить, что всплеск публикаций атомных структур по данным криоЭМ стал результатом ряда методологических и технических достижений. Несколько оригинальных технологических инноваций представлены в данном выпуске. В работе А.В. Моисеенко и соавт. продемонстрирован успешный пример модернизации аналитического просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 до криоэлектронного

микроскопа субнанометрового разрешения, предназначенного для решения задач пробоподготовки и оценки качества препарата [11]. В результате модернизации прибор позволяет получать разрешение реконструкций белковых молекул в пределах 8 Å. В статье О.В. Градова разработан подход для коррелятивной микроскопии и предложен протокол для анализа биологических образцов в единой микрокувете, последовательно перемещаемой от неразрушающих инструментов оптической микроскопии низкого разрешения и оптического сверхразрешения на уровень CryoSEM/CryoESEM (в программируемых средах и атмосферах) [12]. Преимущество данного протокола состоит в обеспечении сохранности образца на протяжении всего цикла. В работе В.С. Молчанова и соавт. показано, что добавление малого количества нанотрубок природной глины галлуазита в гели альгината натрия позволяет создавать более прочные гели [13]. В перспективе подобные гели могут применяться в качестве чернил для экструзионной 3D-печати, а также использоваться для инкапсулирования различных веществ в полости нанотрубок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakane T., Kotecha A., Sente A., et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*. 2020;587(7832):152–156.
2. Yip K.M., Fischer N., Paknia E., Chari A., Stark H. Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*. 2020;587(7832):157–161.
3. Шайтан К.В. Как биополимер (белок) сворачивается в уникальную 3D-структуру? *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):9–12.
4. Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–589.
5. Миронов П.А., Шенкарев З.О. Схемы замыкания дисульфидных связей в токсинах пауков семейства Ctenidae. Сравнение с предсказаниями нейросети AlphaFold 2.0. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):13–20.
6. Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Тимофеева Т.А., Федякина И.Т. Криоэлектронная микроскопия оболочечных вирусов на базе усовершенствованного просвечивающего электронного микроскопа: вирусы гриппа типа А, В и коронавируса SARS-CoV-2. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):21–26.
7. Мамаева Н.Ю., Деркачева Н.И., Гасанова Д.А., Соколова О.С., Глухов Г.С. Стабилизация полноразмерного S-белка коронавируса SARS-CoV-2 в полимере SMA для исследования в электронном микроскопе. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):27–32.
8. Демьянова И.В., Акулина Е.А., Жаркова И.И., и др. Рост мезенхимальных стволовых клеток на ориентированных микроструктурированных пленках и электроформованных скаффолдах. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):33–39.
9. Станишневa-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. Структура бычьего шаперонина TRiC/CCT в открытой конформации по данным криоэлектронной микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):40–46.
10. Атамас А.А., Гуськов А.И., Рогачев А.В. Структурное исследование рибосомы *Candida auris*. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):47–50.
11. Моисеенко А.В., Егоров А.М., Шайтан К.В., Соколова О.С. Криоэлектронная микроскопия на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):51–56.
12. Градов О.В. Криоконвейерные протоколы в корреляционной световой и электронной микроскопии: от многоуровневой визуализации до моделирования биофизических эффектов и «криотераностики». *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):57–62.
13. Молчанов В.С., Глухова С.А., Филиппова О.Е. Реологические свойства полисахаридных гидрогелей альгината с малыми добавками нанотрубок галлуазита для экструзионной 3D-печати. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2023;78(3S):63–68.

Поступила в редакцию 01.09.2023

Принята в печать 20.09.2023

EDITORIAL

Advances in structural research using electron microscopy in Russia (results of the fourth international conference RICCEM-2023)

O.S. Sokolova , T.B. Stanishneva-Konovalova , M.P. Kirpichnikov 

*Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia*

**e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

The IV Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2023) was held at the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University in a hybrid (offline and online) format and brought together more than 250 researchers from 10 countries. Following the conference, a special issue of the journal “Lomonosov Biology Journal” (“Vestnik Moskovskogo universiteta. Seria 16. Biologia”) was published. This article briefly summarizes the main results of the conference and the content of the works published in the special issue.

Keywords: *cryo-electron microscopy, cryo-EM, structural biology, structures of macromolecules, conference, RICCEM*

Funding: Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow Lomonosov University “Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology.”

Сведения об авторах

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>

Станишнев-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>

Кирпичников Михаил Петрович — акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН, главный редактор журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология». Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8170-1607>

ОБЗОР



УДК 577:541.124

Как биополимер (белок) сворачивается в уникальную 3D-структуру?

К.В. Шайтан 

*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: shaytan49@yandex.ru*

Обсуждается современное состояние проблемы фолдинга белков и других биополимеров. Детализируется понятие многомерной поверхности потенциальной энергии и поверхности свободной энергии для линейных полимеров с учетом топологии конфигурационного пространства и наличия элементов симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев. Наличие кинематических связей для конформационных движений в вязкой среде приводит к тенденции формирования спиральных структур линейных полимеров. Динамические эффекты вязкости приводят также к практически равномерному распределению скоростей диссипации энергии по узлам цепи. Сочетание топографии поверхности свободной энергии и эффектов вязкости дает физическую основу для развития теории фолдинга в направлении интерпретации разнообразных экспериментальных наблюдений и выяснения принципов формирования аминокислотного кода для 3D-структур белков. Анализируется связь между температурой денатурации свернутого состояния биополимера и энергией невалентных взаимодействий между мономерами в цепи.

Ключевые слова: теория фолдинга, 3D-структуры, скрытые симметрии в биополимерах, динамические эффекты вязкости, температура денатурации, поверхность потенциальной энергии

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-2

Проблеме фолдинга уже более 60 лет [1]. Но до сих пор нет четких физических представлений о закономерностях аминокислотного кода, который лежит в основе наблюдаемых пространственных структур белков. Со времен работ Анфинсена [2] считается установленным, что при сворачивании полипептидная цепь переходит в состояние термодинамического равновесия в глобальный минимум свободной энергии. Это утверждение отчасти оспаривалось Левинталем [3], который заметил, что при случайном тепловом движении времени жизни Вселенной не хватит для поиска глобального минимума энергии. Наличие такого парадокса привело к выводам о необходимости специфической топографии для поверхности потенциальной энергии (ППЭ) полипептидной цепи. Основные идеи здесь заключались в специальном устройстве этой ультрамногомерной потенциальной поверхности, которая должна быть устроена относительно гладким образом в виде энергетической воронки (это называется принцип минимальной фрустрации энергетической воронки) [4] и должна существовать (по энтропийным соображениям) энергетическая щель, которая отделяет нативную конфигурацию

цепи от ближайших конформаций [5]. В последствии было выполнено множество экспериментальных и теоретических работ с целью понять физические механизмы фолдинга и разгадать загадку аминокислотного кода [1, 6]. Имеющиеся на данный момент концепции и представления носят в значительной мере общий описательный характер. На наш взгляд это связано с отсутствием определенных математических инструментов, которые были бы адекватны данной задаче. Ниже мы посмотрим, что можно сделать (и уже сделано) в этом направлении.

Первое, на что мы хотим обратить внимание — это динамическая роль среды, в которой происходит процесс сворачивания полимерной цепи. Как это ни странно, но вязкость среды играет существенную организующую роль в этом процессе. Прицельное исследование методами молекулярной динамики сворачивания полипептидной цепи из 150 остатков в вязкой среде [7, 8] показало, что в среде с вязкостью порядка вязкости воды двугранные углы «фи» и углы «пси» вращаются преимущественно в направлении напротив друг к другу. В результате формируется спиральная структура и далее характерный бел-

ковый фолд. Если вязкость уменьшить ниже определенного предела, то наблюдается разрушение корреляции поворотов по двугранным углам и формирование стохастической глобулы [7, 8].

Наблюдаемая закономерность не случайна. При правильном подходе возможен анализ уравнений механики для движения линейной полимерной цепи в вязкой среде, который приводит к четким выводам [9, 10]. Сама задача очень сложная и ранее сводилась только к компьютерным симуляциям. Но если задаться вопросом, а какие ограничения накладываются на динамическое поведение цепи в вязкой среде, то оказывается возможным получить конструктивный ответ. Ключом к решению проблемы является рассмотрение эффектов вязкого трения и диссипации энергии при движении узлов цепи. При вращении вокруг связей в однородной вязкой среде сохраняется суммарный нулевой момент сил вязкого трения, что приводит к тенденции формирования спиральных структур [9, 10].

Этим не исчерпываются эффекты вязкости для механики конформационных движений полимерной цепи. Отталкиваясь от уравнений движения и вводя функции суммарной скорости диссипации энергии за счет сил вязкого трения и скорости изменения потенциальной энергии цепи (которые в сумме равны 0), мы можем получить весьма интересные результаты [9, 10]. При этом удастся воспользоваться методами многомерной геометрии. Решение системы уравнений движения в вязкой среде можно представить в виде вращения многомерной сферы, которая описывает закон сохранения энергии внутри гиперсферы диссипации энергии.

Оказывается, на механической траектории выполняются два экстремальных принципа [9]. Первый состоит в том, что скорость убыли потенциальной энергии на каждом шаге будет максимальной по сравнению с иными виртуальными движениями репрезентативной точки по многомерной ППЭ. При этом строение этой поверхности не имеет значения. Во-вторых, скорость диссипации энергии на механической траектории будет минимальной по сравнению с иными виртуальными движениями узлов цепи.

Более того, в случае, если число узлов цепи велико (соответственно, размерность пространства конфигураций цепи также очень большая), то можно воспользоваться асимптотическими свойствами многомерных сфер [11] и показать, что скорость диссипации энергии при движении цепи практически равномерно «размазана» по узлам цепи [9]. Плотность вероятности для скорости движения узлов цепи имеет гауссовский вид. И что очень важно, распределение скорости диссипации энергии не зависит от номера узла цепи. Равномерность распределения скоростей диссипации, а значит и скоростей изменения потенци-

альной энергии по степеням свободы имеет очень важное значение. Это означает, что репрезентативная точка выбирает на ППЭ гладкие траектории, на которых изменение потенциальной энергии максимально равномерно «размазано» по степеням свободы. Численное моделирование динамики сворачивания полимерной цепи из 50 звеньев подтверждает эти выводы [12]. В этом отношении, принцип минимальной фрустрации ППЭ как бы теряет свой смысл. Не нужно специальных ухищрений, чтобы сделать полимер с относительно гладкой ППЭ. Если сворачивание происходит в вязкой среде, то гладкость траекторий практически обеспечивается автоматически.

Таким образом, динамические эффекты вязкости при сворачивании линейного полимера приводят к тенденции формирования спиральных структур, а также к выбору гладких динамических траекторий на многомерной потенциальной поверхности. Заметим, что динамически доступные области конфигурационного пространства полимерной цепи составляют при этом ничтожно малую часть от энергетически доступного объема пространства конфигураций при обычно используемых температурах. Это должно принципиально сказываться на калибровке параметров силовых полей [13]. То есть калибровка потенциалов должна проводиться по-разному для систем, динамика которых моделируется в вакууме и в вязкой среде. Неправильный выбор протоколов молекулярной динамики с этой точки зрения будет обесценивать результат.

Обсудим далее вопрос, что делать с самой потенциальной поверхностью. Больших размерностей обычно стараются избегать. В данной ситуации избежать этого невозможно. В сложных случаях общий подход состоит в том, чтобы четко следовать первым принципам, отталкиваться от топологии пространства, на котором задана многомерная ППЭ, искать симметрии и инварианты на этой поверхности.

Что дает топология? Во-первых, нужно принять во внимание топологию конфигурационного пространства линейного полимера. Она определяется поворотами вокруг связей и представляет собой многомерный тор [14]. Функции, заданные на торе можно и нужно раскладывать в многомерный ряд Фурье [15]. При этом для ППЭ сразу возникает различие между хиральными и зеркально симметричными структурами. Оказывается, единственный глобальный минимум может систематически возникать только у хиральных структур [16].

Далее вопрос о симметрии. Это не та привычная пространственная симметрия как у кристаллов, а симметрия ППЭ. Если полимер или биополимер построен из одинаковых или почти одинаковых мономерных звеньев, то возникает симметрия относительно перестановки одинаковых

звеньев в цепи. Рассмотрим, например, участок полипептидной цепи. Воспользуемся С-альфа представлением этой цепи — псевдосвязи длиной $3.8 \text{ \AA}$ с псевдовалентным углом 131° . Потенциальная энергия зависит от парных расстояний между атомами. Эти расстояния изменяются при поворотах вокруг связей. Можно усмотреть, что, во всяком случае, в пределах радиуса обрезания взаимодействий изменения расстояний симметрично относительно перестановки одинаковых типов торсионных углов. Это приводит к симметрии ППЭ относительно перестановки углов.

Столь удачное стечение обстоятельств может привести к очень хорошей топографии многомерной поверхности потенциальной энергии с точки зрения фолдинга. Воспользуемся теорией Морса [17], которая позволяет анализировать топографии поверхностей любой размерности по их поведению в окрестности критических точек (или точек, где все первые производные равны 0). Не вдаваясь в детали, отметим, что для симметричных относительно перестановки координат поверхностей вне зависимости от их размерности в окрестности критической точки можно ввести две обобщенные координаты [10], суть которых состоит в том, что одна есть радиус гиперболы описанной вокруг критической точки, а вторая есть расстояние от критической точки до некоторой гиперплоскости. Это сильно упрощает изучение топографии таких поверхностей и позволяет развить привычные нам наглядные образы поверхностей в трехмерном пространстве.

Обсуждаемые эффекты симметрии немедленно сказываются также на общем виде коэффициентов разложения ППЭ в многомерный ряд Фурье. В силу симметрии относительно перестановки углов коэффициенты разложения должны зависеть от инвариантов векторов номеров гармоник [10, 18]. Ниже мы используем гауссовское приближение для этой зависимости. В этом случае можно точно вычислить сумму ряда Фурье и получить типичные топографии ППЭ [10, 16, 18], которые связаны с симметрией цепи относительно перестановки одинаковых или почти одинаковых мономерных звеньев. В простейшем варианте возникает относительно гладкая энергетическая воронка, а в более реалистическом варианте система вложенных воронок, отделенных друг от друга потенциальными барьерами. Самая глубокая воронка — центральная, дно которой и отвечает нативному состоянию свернутой цепи. Топография ППЭ в виде системы вложенных воронок приводит к эф-

фекту зависимости результата фолдинга от множества начальных конформаций цепи, которые находятся в области притяжения одной из потенциальных воронок [10, 16, 18]. С этим эффектом может быть связан механизм котрансляционного фолдинга и невозможность рефолдинга после быстрого силового разворачивания цепи.

В обсуждаемом варианте ППЭ вычисляется энтропия и поверхность свободной энергии (ПСЭ) [19]. Топография ПСЭ также представлена в виде системы вложенных воронок. И вот, что принципиально важно. Вводя понятие характеристической температуры T_0 , которая пропорциональна выигрышу потенциальной энергии при сворачивании, которое приходится на одну конформационную степень свободы в мономере, можно показать, что свернутое (нативное) состояние стабильно при T меньше $0,26T_0$. Если T денатурации 60°C , то это означает, что энергия стабилизации на одну степень свободы в мономере составляет порядка $2,5 \text{ ккал/моль}$. Если в мономере две степени свободы, то для стабилизации нужно 5 ккал/моль (порядка H -связи) [19]. Белки построены из альфа-аминокислот, где в мономере две степени свободы и энергии порядка H -связи достаточно для стабилизации при T меньше 60°C . Однако, если бы Природа использовала бета-аминокислоты, где три степени свободы в мономере, то формирование уникальных пространственных структур потребовало бы большую энергию стабилизации при тех же температурных условиях. В этом случае существование стабильных структур при тех же энергиях стабилизации на мономер порядка 5 ккал/моль было бы возможно только при температурах порядка -100°C . Картину тепловой денатурации можно представить на профилях ПСЭ. При нагревании происходит расширение распределения конфигураций цепи [19]. Эта картина весьма похожа, на то, что обычно приводят в статьях на данную тему, основываясь на общих рассуждениях.

В рамках рассматриваемых представлений также хорошо прослеживается вулканообразный профиль энергетической воронки, который был установлен в результате тщательных кинетических экспериментов [1, 6].

Работа поддержана Российским научным фондом (грант 19-74-30003). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dill K.A., MacCallum J.L. The protein-folding problem, 50 years on. *Science*. 2012;338 (6110):1042–1046.
2. Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 1973;181(4096):223–230.
3. Levinthal C. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 1968;65(1):44–45.
4. Onuchic J.N., Wolynes P.G. Theory of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004;14(1):70–75.

5. Sali A., Shakhnovitch E., Karplus M. How does a protein fold? *Nature*. 1994;369(6477):248–251.
6. Finkelstein A.V., Bogatyreva N.S., Ivankov D.N., Garbuzynskiy S.O. Protein folding problem: enigma, paradox, solution. *Biophys. Rev.* 2022;14(6):1255–1272.
7. Шайтан К.В., Попеленский Ф.Ю., Армеев Г.А. Корреляция конформационных движений при формировании вторичной структуры полипептидов в вязкой среде. *Биофизика*. 2017;62(3):443–451.
8. Эрэндженова А.А., Армеев Г.А., Шайтан К.В. Влияние вязкости среды на молекулярную динамику формирования вторичной структуры полипептидов (AlaGly)₂₅ и (AlaGly)₇₅. *Биофизика*. 2020;65(5):860–864.
9. Шайтан К.В. Вариационные принципы в механике конформационных движений макромолекул в вязкой среде. *Биофизика*. 2018;63(1):5–15.
10. Шайтан К.В. Почему белок сворачивается в уникальную 3D-структуру. И не только это... *Хим. физ.* 2023;42(6):40–62.
11. Зорич В.А. Геометрия и вероятность. *Теория вер. примен.* 2017;62(2):292–310.
12. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. Динамика формирования коллективных конформационных степеней свободы при фолдинге макромолекулярной цепи в вязкой среде. *Биофизика*. 2017;62(2):249–257.
13. Wales D.J. *Energy Landscapes*. Cambridge: Univ. Press; 2003. 681 pp.
14. Фоменко А.Т. *Дифференциальная геометрия и топология. Дополнительные главы*. Ижевск: Изд. Удмурдского университета; 1999. 252 pp.
15. Зигмунд А. *Тригонометрические ряды. Т. 2*. М.: Мир; 1965. 537с.
16. Шайтан К.В. Строение энергетических ландшафтов макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру. *Биофизика*. 2018;63(4):629–642.
17. Milnor J. *Morse Theory*. Princeton University Press; 1963. 153 pp.
18. Шайтан К.В. Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров. *Биофизика*. 2022;66(3):492–515.
19. Шайтан К.В. О ландшафтах свободной энергии для макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру. *Биофизика*. 2018;63(5):850–858.

Поступила в редакцию 06.07.2023

Принята в печать 20.07.2023

REVIEW

How does a biopolymer (protein) fold into a unique 3D structure?

K.V. Shaitan 

*Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia
e-mail: shaitan49@yandex.ru*

The current state of the problem of folding proteins and other biopolymers is discussed. The concept of a multidimensional potential energy surface and a free energy surface for linear polymers is detailed, taking into account the topology of the configuration space and the presence of symmetry elements with respect to the permutation of identical monomer units. The presence of kinematic bonds for conformational movements in a viscous medium leads to a tendency to form helical structures of linear polymers. The dynamic effects of viscosity also lead to an almost uniform distribution of energy dissipation rates over the chain nodes. The combination of potential energy surface topography and viscosity effects provides a physical basis for the development of the theory of folding in the direction of interpreting various experimental observations and elucidating the principles for the formation of an amino acid code for 3D protein structures. The relationship between the denaturation temperature of the folded state of the biopolymer and the energy of non-valent interactions between monomers in the chain is analyzed.

Keywords: *folding theory, 3D structures, hidden symmetries in biopolymers, dynamic effects of viscosity, denaturation temperature, potential energy surface*

Funding: The research was supported by the Russian Science Foundation, project number 19-74-30003.

Сведения об авторе

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф., проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-27-76; e-mail: shaitan49@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5137-303X>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.322.4



Схемы замыкания дисульфидных связей в токсинах пауков семейства Ctenidae. Сравнение с предсказаниями нейросети AlphaFold 2.0

П.А. Миронов , З.О. Шенкарев* 

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук,
Россия, г. Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

*e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Пауки блуждающие, или пауки-бегуны (Ctenidae), имеют многокомпонентные яды, в которых идентифицировано более 500 различных пептидов и белков, названных ктенитоксинами. Основными компонентами яда являются цистеин-богатые пептиды, содержащие мотив ингибиторного цистинового узла (inhibitor cystine knot, ICK). Фармакологическое разнообразие ктенитоксинов позволяет рассматривать некоторые из них как прообразы для создания новых лекарств для лечения хронической боли, болезни Хантингтона, эректильной дисфункции и глаукомы. По расположению остатков цистеина в аминокислотной последовательности ктенитоксины разделяют на 14 групп, содержащих от шести до 14 остатков Cys. В настоящее время определена пространственная структура только одного ктенитоксина ω -CNTX-Pn4a ($\text{Ph}\alpha 1\beta$ или Tx3-6) бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer*. Еще 10 структурных групп ктенитоксинов имеют гомологию с известными пространственными структурами токсинов пауков других семейств и других белков, а для трех групп структурные гомологи неизвестны. В данной работе предложены возможные схемы формирования дисульфидных связей для всех групп ктенитоксинов. Сравнение полученных схем с предсказаниями программы AlphaFold 2.0 показывает, что эта нейронная сеть не всегда корректно предсказывает структуры цистеин-богатых пептидов, особенно если моделируются структуры зрелых молекул без лидерных последовательностей.

Ключевые слова: нейротоксины пауков, ктенитоксины, ICK-мотив, цистиновый узел, предсказание пространственной структуры, цистеин-богатые пептиды, AlphaFold 2.0

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

Введение

Семейство Ктениды (Ctenidae, пауки блуждающие, или бегуны) включает 40 родов и более 400 видов крупных ночных пауков, обитающих в тропиках Старого и Нового Света. К этому семейству относятся пауки рода *Phoneutria*, которые считаются одними из самых ядовитых паукообразных на планете. Несмотря на то, что яд *Phoneutria* обладает высокой нейротоксичностью, его количество, вводимое при укусе, слишком мало, чтобы вызвать смертельный исход у взрослого человека. Укус паука вызывает сильную боль, головокружение, озноб, лихорадку, артериальную гипертензию, тахикардию, мышечные спазмы и приапизм.

Ктениды имеют многокомпонентные яды, в которых методами протеомного и транскриптомного анализа идентифицировано более 500 различных пептидов и белков с массой от 1,2 до 27 кДа, включая нейротоксины [1–4]. Основ-

ным компонентом яда являются цистеин-богатые пептиды ($\text{MW} < 15$ кДа, число Cys ≥ 6), названные ктенитоксинами (ctenitoxins или CNTXs), большинство которых содержит пространственный мотив ингибиторного цистинового узла (inhibitor cystine knot, ICK) [2, 4]. По количеству и расположению остатков Cys ктенитоксины можно разделить на 14 групп (рис. 1) [2–4]. Для ктенитоксинов описано действие на натриевые (NaV, обозначаются префиксами β -, δ - и μ -), калиевые (K-), кальциевые (CaV, ω -) каналы, ионотропные глутаматные рецепторы NMDA-субтипа (Γ -) и каналы TRP [5]. Однако мишени большинства ктенитоксинов до сих пор не установлены (префикс U-).

Яд бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer* фармакологически чрезвычайно разнообразен [5]. В нем идентифицировано более 100 ктенитоксинов, и некоторые из них могут служить прообразами для создания новых препаратов против хронической боли, болезни Хантингтона,

эректильной дисфункции и глаукомы [4, 5]. Для дизайна новых препаратов на базе существующих токсинов необходимы знания о химической и пространственной структуре компонентов яда.

В настоящее время определена пространственная структура только одного ктенитоксина, ω-CNTX-Pn4a (Phα1β или Tx3-6) из *P. nigriventer* (структурная группа VII, или 12.1) [6]. Phα1β действует одновременно на кальциевые каналы CaV2

и на канал TRPA1 [7], демонстрируя значительный антиноцицептивный эффект в моделях острой и хронической боли. Ктенитоксины десяти структурных групп имеют гомологию с известными пространственными структурами, обнаруженными в других организмах. Три группы (VI, VIII, IX), предположительно, имеют в своей структуре мотивы ICK или DDH (disulfide-directed β-hairpin), однако структурные гомологи для них неизвестны (рис. 1).

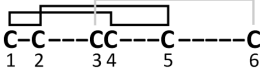
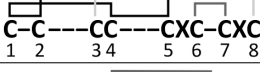
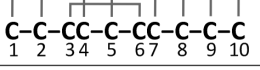
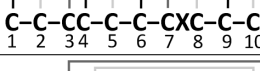
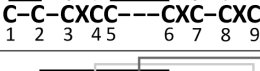
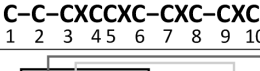
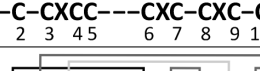
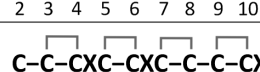
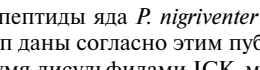
Группа [2,4] [3]	Cys	Схема дисульфидных связей	Фолд / структуры / гомологи в PDB	Актив- ность	S-S схема в UNIPROT/ предсказание AlphaFold 2 без л.п. / с л.п.	Кол-во пептидов [2,4] [3]
I 6.0	6		ICK / 0 / 47	Токс. U	+ / ± / ±	19 123
II 8.0	8		ICK / 0 / 11	Токс. ω, κ, U	+ / ± / +	31 538
III –	10		Элафиноподобный или WAP-домен / 0 / 7	?	+ / ± / ±	6 –
IV –	10		2×DDH, Прокинетицин или домен колипазы / 0 / 13	? не токс.	+ / + / +	10 –
V 10.0	10		ICK / 0 / 1	Токс. Γ, δ, U	+ / – / ±	18 117
– 10.1	10		ICK / 0 / 2	Токс. δ, ω, μ, U	+ / – / –	0 23
VI 12.0	12		ICK / 0 / 0	Токс. ω, U	– / + / +	2 100
VII 12.1	12		ICK / 1 / 0	Токс. ω, U	– / ± / +	5 27
VIII 14.0	14		ICK / 0 / 0	Токс. ω, μ, U	– / ± / ±	11 33
IX –	10		DDH (гр. VI без C1-C5) / 0 / 0	Токс. ω	– / + / +	1 –
X –	12		IGFBP-подобный домен или ингибитор грибковой протеазы-1 / 0 / 1	? Инг. протеаз	– / + / +	9 –
XI –	12		2× Домен тиреоглобулина типа-1 / 0 / 27	? Инг. протеаз	– / + / +	1 –
XII –	12/11		2× Домен тиреоглобулина типа-1 (с/без C1) / 0 / 27	? Инг. протеаз	– / + / +	4/2 –
XIII –	10		Богатый цистеином домен подобный ингибитору трипсина / 0 / 37	? Инг. протеаз	+ / + / +	9 –

Рис. 1. Цистеин-богатые пептиды яда *P. nigriventer* [2, 4] и пептиды содержащие ICK-мотив в ядах Stenidae и родственных семейств [3]. Названия групп даны согласно этим публикациям. На схемах черным цветом выделен цикл, образованный фрагментами основной цепи и двумя дисульфидными ICK-мотива. Светло-серая линия показывает третий дисульфид, проходящий через этот цикл. Остальные дисульфидные связи показаны темно-серым цветом. DDH – мотив disulfide-directed β-hairpin; ICK – мотив ингибиторного цистеинового узла; «структуры» – число известных структур пептидов Stenidae; «гомологи в PDB» – число известных структур гомологичных пептидов с таким расположением дисульфидных связей; «S-S схема в UNIPROT» – наличие правильной аннотации дисульфидных связей в базе данных; «предсказание AlphaFold 2» – наличие правильной схемы дисульфидных связей в структуре предсказанной без лидерной последовательности (л.п.) и с ней.

ICK-мотив обычно содержит β -шпильку, стабилизированную тремя дисульфидными связями со схемой замыкания C1-C4, C2-C5, C3-C6. При этом первые два дисульфида вместе с фрагментами основной цепи пептида, соединяющими цистеины, формируют замкнутый цикл, а третий дисульфид пронизывает этот цикл, образуя «узел» (показано черным и светло-серым цветом на рис. 1 и 2). В токсинах пауков соответствующая первичная структура представлена последовательностью «основного структурного мотива» C1-6-C2-U-C3C4-U-C5-U-C6, где U соответствуют вариабельным последовательностям, а петля C1-C2 чаще всего имеет длину шесть остатков [8]. Большинство ICK-токсинов пауков содержат более шести остатков Cys, и в них часто наблюдается «дополнительный структурный мотив» C5-1-C6-U-C7-1-C8, в котором дисульфидная связь Cys6-Cys7 стабилизирует петлю, расположенную между тяжами β -шпильки ICK-мотива (рис. 1 и 2). Также среди ктенитоксинов встречается мотив DDH, который может рассматриваться как вариант ICK-мотива без первой дисульфидной связи (схема: C2-C5, C3-C6).

Ввиду отсутствия прямых данных о структуре большинства ктенитоксинов большую роль приобретает моделирование по гомологии, с использованием известных пространственных структур, а также расчет структуры *de novo* при помощи таких программ, как Rosetta [9] или PEP-FOLD [10], моделирующих фолдинг белка *in silico* с использованием крупнозернистого представления белковой структуры и специальных силовых полей. Однако применение этих подходов для моделирования структур цистеин-богатых ктенитоксинов встречает ряд трудностей. Как отмечено выше, для многих пептидов этого семейства отсутствуют структурные гомологи, а применение алгоритмов «фолдинга» *in silico* требует априорного знания о системе замыкания дисульфидных связей, которая также во многих случаях неизвестна. В связи с этим особый интерес для предсказания структур цистеин-богатых пептидов вызывает применение глубинных нейронных сетей, опирающихся на известные знания о пространственных структурах, например, AlphaFold 2.0 [11] или RoseTTAFold [12]. Даже в случаях, когда эти алгоритмы не имеют информации о системе замыкания дисульфидных мостиков, они позволяют их уверенно моделировать, пользуясь знаниями о схожих мотивах в других белках. Интересный пример был показан для программы AlphaFold 2.0, которая хорошо предсказала структуру сайта связывания иона цинка в пептидазном домене без априорной информации о наличии такого сайта. При этом в полученной модели ориентация боковых цепей, ответственных за связывание иона, полностью соответствовала экспериментально определенной пространственной структуре комплекса белка с цинком [11].

В данном исследовании на основе экспериментальной структуры Phc1 β мы предлагаем возможные схемы замыкания дисульфидных связей для ктенитоксинов, содержащих ICK и DDH-мотивы и от 6 до 14 цистеинов, и сравниваем полученные схемы с аннотациями дисульфидных связей, приведенными в базе данных UniProt и предсказаниями программы AlphaFold 2.0.

Материалы и методы

Моделирование структур ктенитоксинов. Полные последовательности токсинов и последовательности зрелых пептидов (с лидерными последовательностями и без них) были взяты из базы данных UniProt (www.uniprot.org) и публикаций [2–4]. Расчеты AlphaFold 2.0 выполняли на web-сервере colab.research.google.com [13]. Из групп I–VIII и 10.1 ктенитоксинов было выбрано по 3–5 последовательностей для моделирования пространственной структуры. Из остальных групп (IX–XIII) было взято по одной последовательности для расчетов (таблица). Структуру каждого пептида моделировали как с лидерной последовательностью, так и без нее. В каждом запуске AlphaFold 2.0 было рассчитано по пять моделей. Для определения системы замыкания дисульфидных связей в программе MOLMOL [14] были рассчитаны попарные расстояния между всеми атомами серы в структуре. Дисульфидная связь считалась сформированной, если расстояние между соответствующими атомами было менее 3Å.

Анализ гомологичных структур. Поиск гомологичных белков осуществляли в UniProt, используя данные там аннотации или поиск BLAST. Для определения пептидов, образующих группы, брали данные из дополнительных материалов к статьям [2–4]. Гомологичные пространственные структуры были взяты из базы данных InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/), содержащей классификацию различных белковых семейств и имеющую кросс-ссылки с UNIPROT.

Результаты и обсуждение

Среди известных 14 групп ктенитоксинов, классифицированных по числу и расположению цистеинов в аминокислотной последовательности, можно выделить 8 групп, содержащих ICK или DDH в качестве основных структурных мотивов (рис. 1). Четное число цистеинов (6, 8, 10, 12 или 14) предполагает замыкание всех остатков Cys в дисульфидные связи. Следует отметить, что существует два способа для наименования групп ктенитоксинов. В подходе, предложенном в публикациях [2, 4], группы цистеин-богатых пептидов с MW < 15 кДа из яда *P. nigriventer* нумеруются римскими цифрами. В публикации [3] группы пептидов из ядов пауков семейства Stenidae и родственных ему, содержащих ICK-мотив, нумеруются арабскими цифрами.

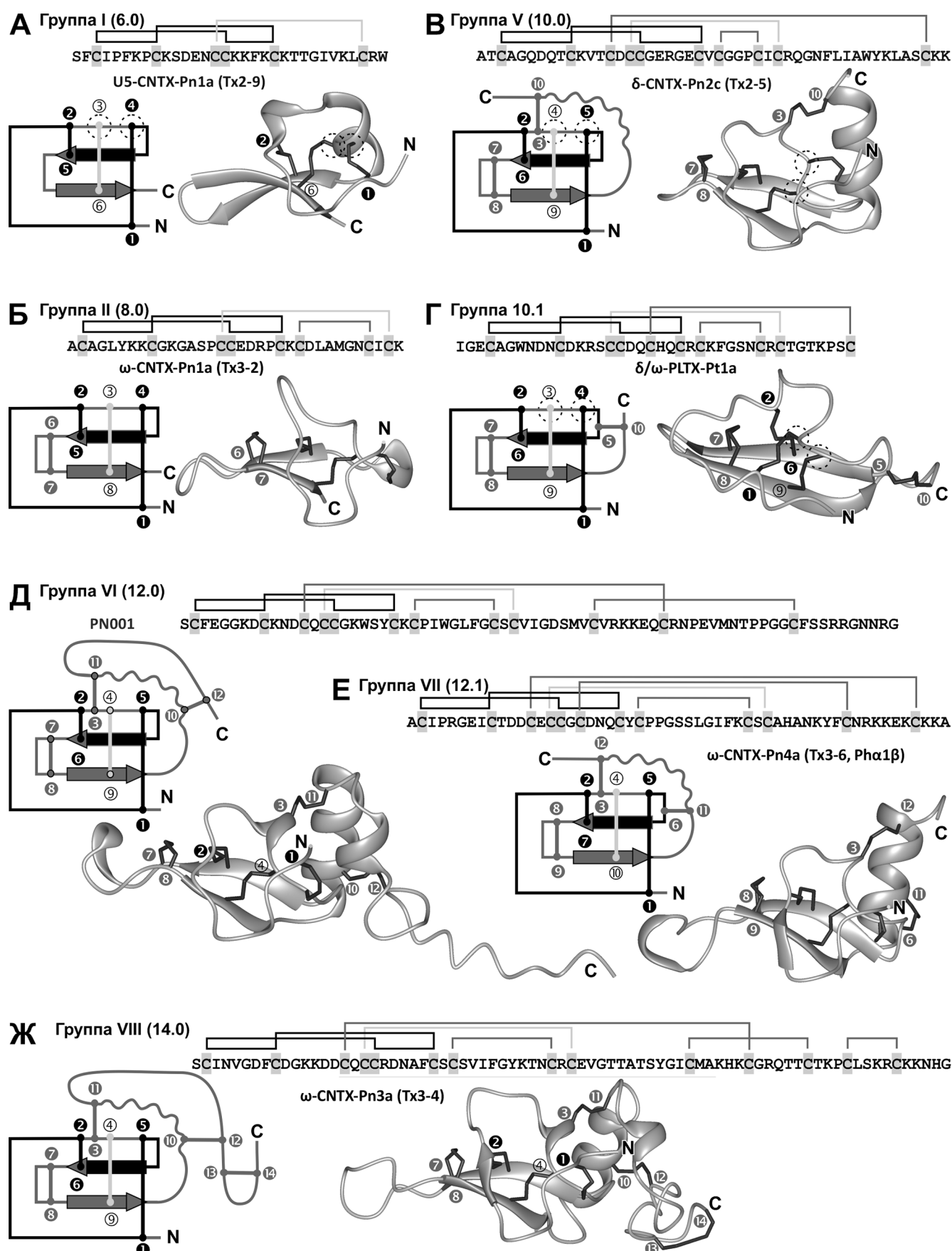


Рис. 2. Схема формирования дисульфидных связей и пространственная структура токсинов из яда *P. nigriventer* и других пауков, содержащих ИСК-мотив. Группы токсинов и схемы дисульфидных связей показаны как на рис. 1. Все приведенные пространственные структуры, кроме Е, предсказаны программой AlphaFold 2.0. Ошибки в предсказании схемы замыкания дисульфидных связей выделены кружками. На панели Е показана экспериментальная структура токсина Ph α 1 β [6].

Таблица

Цистеин-богатые пептиды яда *P. nigriventer* и родственных семейств и результаты расчета их структуры в программе AlphaFold 2.0

Группа	Источник последовательности	BLAST/UniProt Название гомолога	UniProt код гомолога, идентичность	AlphaFold Схема S-S токсин	AlphaFold Схема S-S л.п. + токсин
I 6.0	UP	U5-CNTX-Pn1a	P29426	4+/1–	н.д.
	PN266 [2]	U5-CNTX-Pn1a	P29426 97%	+	5–
	UP	U13-CNTX-Pn1a	P83894	+	н.д.
	PN046 [2]	U13-CNTX-Pn1b	P84017 97%	+	+
	PN086 [2]	U14-CNTX-Pn1a	P83998 100%	+	+
II 8.0	UP	ω-CNTX-Pn1a	O76201	+	+
	UP	α-CNTX-Pn1a	O76200	+	+
	UP	U1-CNTX-Pk1a	P83895	4+/1–	н.д.
	UP	U9-CNTX-Pn1a	P0C2S6	5–	+
III	PN365 [4]	U15-LCTX-Ls1g	B6DD50 47%	5–	1+/4–
	PN346 [2]	U20-LCTX-Ls1d	B6DCY1 44%	+	+
	PN306 [2]	U20-LCTX-Ls1c	B6DD62 40%	+	+
IV	PN123 [2]	U19-CNTX-Pn1a	P83997 93%	+	+
	UP	U19-CNTX-Pn1a	P83997	+	н.д.
	UP	U9-CNTX-Pr1a	P83893	+	н.д.
	PN350 [4]	U3-AATX-Ce1a	Q8MTX1 39%	+	+
V 10.0	UP	U1-CNTX-Pn1a	P61229	5–	+
	UP	γ-CNTX-Pn1a	P59367	3+/2–	+
	UP	δ-CNTX-Pn2c	O76199	4+/1–	+
	UP	δ-CNTX-Pn1a	P59368	2+/3–	4+/1–
– 10.1	#85 DN9510 [3]	δ/ω-PLTX-Pt1a	P0DL38 38%	5–	5–
	#740 DN4598 [3]	U1-PLTX-Pt1d	P36986 55%	5–	5–
	#1157 DN1414 [3]	δ/ω-PLTX-Pt1a	P0DL38 35%	5–	5–
VI 12.0	PN001 [2]	U9-AGTX-Ao1a	Q5Y4U3 64%	+	+
	PN300 [2]	U20-CNTX-Pn1a	P84093 43%	+	+
	UP	U9-AGTX-Ao1a	Q5Y4U3	+	+
VII 12.1	UP	ω-CNTX-Pn4a (Phα1β)	P81792	+	+
	UP	U12-CNTX-Pn1a	P0C2S8	+	+
	UP	U11-CNTX-Pn1a	P0C2S7	+	+
	PN313 [2]	U12-CNTX-Pn1a	P0C2S8 76%	4+/1–	+
VIII 14.0	UP	μ-CNTX-Pn1a	P17727	3+/2–	4+/1–
	UP	ω-CNTX-Pn3a	P81790	4+/1–	3+/2–
	PN319 [2]	ω-CNTX-Pn3a	P81790 96%	4+/1–	3+/2–
IX	PN327 [2]	ω-AGTX-1A	P15969 68%	+	+
X	PN376 [4]	CP8	Q6TUD0 36%	+	+
XI	PN372 [4]	U24-CNTX-Pn1a	P84032 98%	+	+
XII	PN373 [2]	U24-CNTX-Pn1a	P84032 36%	+	н.д.
XIII	PN370 [2]	Venom peptide SjAPI-2	P0DM56 49%	+	+

Примечание: Последовательности пептидов, включая лидерные последовательности (л.п.), были взяты из базы данных UniProt (UP) и из дополнительных материалов к работам Диниз и др. [2], Брюэр и др. [3], Кардосо и др. [4], которые доступны на сайтах изданий. Пептиды, цитируемые по работам Диниз и др. [2] и Кардосо и др. [4], названы как в оригинальных публикациях PNXXX. Для пептидов, цитируемых по работе Брюэр и др. [3], даны ссылки на номера строк в файле с дополнительной информацией (#XXX). Для каждого пептида, не представленного в базе данных UniProt, проведен поиск BLAST для выявления гомологичных пептидов из базы данных. Приведены название ближайшего гомолога, код доступа UniProt и степень идентичности последовательностей зрелых пептидов. В каждом запуске AlphaFold 2.0 было рассчитано пять моделей. Знаком «+» показано число моделей, содержащих правильную схему замыкания дисульфидных связей, знаком «–» – неправильные схемы. «н.д.» – в базе данных или публикации отсутствует информация о лидерной последовательности.

Группа I, или 6.0, включает ктенитоксины с шестью цистеинами, которым соответствует стандартный мотив ICK (рис. 2А). В эту группу входят пептиды, действующие на NaV- и CaV-каналы, например, U5-CNTX-Pn1a (Tx2-9) и ω -CNTX-Pn2a (Tx3-3). Несмотря на сравнительно хорошее описание гомологичных токсинов методами структурной биологии, программа AlphaFold не всегда точно предсказывает их структуру. Так, при моделировании токсина U5-CNTX-Pn1a без лидерной последовательности в одной из пяти моделей получается структура с неправильной схемой дисульфидных связей (C1-C3, C2-C5, C4-C6), не соответствующая ICK-мотиву (рис. 2А), а при моделировании изоформы этого пептида, содержащей замену Phe19Leu (PN266 [2]) с лидерной последовательностью, все пять полученных моделей не соответствуют правильной структуре (таблица).

В группу II, или 8.0, включающую ктенитоксины с восьмью цистеинами, входят пептиды, действующие на каналы Ca_v1, например, ω -CNTX-Pn1a (Tx3-2). Кроме того, к этой группе токсинов относится ω -agatoxin IVA, действующий на каналы Ca_v2.1. В этих токсинах четвертый дополнительный дисульфид стабилизирует удлиненную петлю, выходящую из антипараллельного β -листа ICK-мотива (рис. 2Б). Программа AlphaFold корректно предсказывает структуру пептидов из этой группы при моделировании молекул с лидерными последовательностями. Моделирование зрелых пептидов в некоторых случаях приводит к ошибкам (таблица).

Группа V, или 10.0, включает ктенитоксины с 10 цистеинами, имеющие характерную последовательность C³-1-C⁴-C⁵ (рис. 1). Эти токсины действуют на Na_v-каналы млекопитающих (например, δ -CNTX-Pn2c, или Tx2-5), насекомых, а также на NMDA-рецепторы (например, Γ -CNTX-Pn1a, или Tx4(5-5)). У этой группы токсинов есть структурный гомолог spiderine-1a [15]. В сравнении с предыдущими группами токсины из группы V имеют удлиненный С-конец, который соединяется с остальной частью пептида пятой дисульфидной связью C³-C¹⁰. Согласно нашим данным, в отсутствие лидерных последовательностей программа AlphaFold некорректно предсказывает структуру этих пептидов (рис. 2В, таблица). Этот факт проиллюстрирован в публикации [4], где были получены модели циклических пептидов, содержащих некорректную дисульфидную связь C¹-C¹⁰.

Группа 10.1 включает пептиды с 10 цистеинами, имеющие дополнительный остаток Cys⁵ между основным и дополнительным структурными мотивами (рис. 1). Такие токсины не встречаются в яде *P. nigriventer*, однако они представлены в ядах других пауков семейства Stenidae и родственных им [3]. Например, к этой группе относятся токсины δ/ω -PLTX-Pt1a, μ -HXTX-Mg2a (Magi3) и Tbo-IT2. Известные пространственные

структуры токсинов Magi3 [16] и Tbo-IT2 [17] показывают, что в токсинах из группы 10.1 пятая дисульфидная связь C⁵-C¹⁰ соединяет С-конец молекулы с ICK-мотивом. Согласно нашим данным, как в отсутствие, так и с лидерными последовательностями программа AlphaFold во многих случаях некорректно предсказывает структуру пептидов этой группы (рис. 2Г, таблица).

Примеры групп V (10.0) и 10.1 показывают, что по мере усложнения строения токсинов происходит удлинение С-концевой части пептида, для стабилизации которой возникают дополнительные дисульфидные связи. В соответствии с этим, группы ктенитоксинов VI (12.0), VII (12.1) и VIII (14.0) с 12 и 14 остатками Cys содержат дополнительные дисульфидные связи либо прикрепляющие С-концевую часть пептидов к ICK мотиву, либо стабилизирующие эту С-концевую часть. Сравнение последовательностей этих токсинов с последовательностями токсинов с известными пространственными структурами (spiderine-1a, Magi3, Tbo-IT2 и Ph α 1 β) позволяет предложить топологию дисульфидных связей первого типа (ICK—С-конец) и по остаточному принципу замкнуть связи второго типа (С-конец—С-конец) (рис. 1 и 2Д, Е, Ж). Следует отметить, что в UniProt приведена неправильная аннотация дисульфидных связей для многих из этих пептидов, но в то же время их структура во многих случаях корректно предсказывается программой AlphaFold, особенно если рассматривается полная последовательность пептида. Исключение составляет группа VIII (14.0), в которой при моделировании трех пептидов в каждом случае были получены модели как с правильной, так и с неправильной системой замыкания дисульфидных связей (таблица).

К группе VI (12.0) относятся высокотоксичные молекулы, блокирующие Ca_v1- и Ca_v2-каналы, например, ω -AGTX-Aa3a (ω -agatoxin IIIA) и U20-CNTX-Pn1a (ω -phonetoxin PNTx22C5). К группе VII (12.1) относятся токсины, имеющие низкую токсичность и действующие на каналы Ca_v2, такие как Ph α 1 β [1]. Для ктенитоксинов группы VIII (14.0) описано антагонистическое действие на каналы Ca_v2 (ω -CNTX-Pn3a, Tx3-4) и Na_v1.2 (μ -CNTX-Pn1a, Tx1).

Группа IX содержит единственный ктениотоксин PN327 [2], гомологичный ω -agatoxin-1A. Предшественник зрелого токсина, по видимому, содержит DDH-мотив, схожий с токсинами из группы VI (12.0), но без первой дисульфидной связи Cys¹-Cys⁵ (рис. 1). Впоследствии эта цепь разрезается на два фрагмента, соединенных дисульфидной связью Cys¹⁰-Cys¹² — основной, включающий девять остатков Cys, и минорный трипептид Ser-Pro-Cys [18].

Остальные шесть групп ктенитоксинов (III, IV, X, XI, XII и XIII) имеют пространственные структуры, отличные от ICK- и DDH-моти-

вов, и, по-видимому, содержат нетоксичные молекулы, например, ингибиторы протеаз. Несмотря на то, что для многих из этих пептидов в UniProt отсутствует или приведена неправильная аннотация дисульфидных связей, программа AlphaFold удовлетворительно предсказывает их структуры. Единственным исключением являются пептиды из группы III, имеющие в своей структуре Elafin-like или WAP (whey acidic protein) домен, некоторые из которых не сворачиваются корректно как в отсутствии, так и с лидерными последовательностями.

В результате мы предложили характерные дисульфидные паттерны для групп ктениотоксинов, содержащих ИСК- и DDH-мотивы, используя

данные о пространственной структуре гомологичных токсинов других организмов. Полученные результаты показали, что программа по сворачиванию полипептидных цепей на основе нейронной сети AlphaFold 2.0 не всегда корректно предсказывает структуры цистеин-богатых пептидов, особенно если моделируются структуры зрелых молекул без лидерных последовательностей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00326). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Richardson M., Pimenta A.M.C., Bemquerer M.P., Santoro M.M., Beirao P.S.L., Lima M.E., Figueiredo S.G., Bloch C. Jr., Vasconcelos E.A.R., Campos F.A.P., Gomes P.C., Cordeiro M.N. Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus *Phoneutria*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2006;142(3–4):173–187.
2. Diniz M.R.V., Paiva A.L.B., Guerra-Duarte C., Nishiyama M.Y., Mudadu M.A., Oliveira U., Borges M.H., Yates J.R., Junqueira-de-Azevedo I.L. An overview of *Phoneutria nigriventer* spider venom using combined transcriptomic and proteomic approaches. *PLoS One*. 2018;13(8):e0200628.
3. Brewer M.S., Cole T.J. Killer knots: Molecular evolution of inhibitor cystine knot toxins in Wandering spiders (Araneae: Ctenidae). *Toxins*. 2023;15(2):112.
4. Cardoso F.C., Walker A.A., King G.F., Gomez M.V. Holistic profiling of the venom from the Brazilian wandering spider *Phoneutria nigriventer* by combining high-throughput ion channel screens with venomomics. *Front. Mol. Biosci.* 2023;10:1069764.
5. Peigneur S., Lima M.E., Tytgat J. *Phoneutria nigriventer* venom: A pharmacological treasure. *Toxicon*. 2018;151:96–110.
6. Lyukmanova E.N., Mironov P.A., Kulbatskii D.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Chernaya E.M., Logashina Y.A., Andreev Y.A., Kirpichnikov M.P., Shenkarev Z.O. Recombinant production, NMR solution structure, and membrane interaction of the Ph α 1 β toxin, a TRPA1 modulator from the Brazilian armed spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxins*. 2023;15(6):378.
7. Tonello R., Fusi C., Materazzi S., Marone I.M., Logu F., Benemei S., Goncalves M.C., Coppi E., Castro-Junior C.J., Gomez M.V., Geppetti P., Ferreira J., Nassini R. The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. *Br. J. Pharmacol.* 2017;174(1):57–69.
8. Kozlov S., Grishin E. Classification of spider neurotoxins using structural motifs by primary structure features. Single residue distribution analysis and pattern analysis techniques. *Toxicon*. 2005;46(6):672–686.
9. Leaver-Fay A., Tyka M., Lewis S.M., et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods in Enzymology. Computer Methods, Part C. Vol. 487*. Eds. M.L. Johnson and L. Brand. Academic Press; 2011:545–574.
10. Shen Y., Maupetit J., Derreumaux P., Tufféry P. Improved PEP-FOLD approach for peptide and miniprotein structure prediction. *J. Chem. Theor. Comput.* 2014;10(10):4745–4758.
11. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–589.
12. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*. 2021;373(6557):871–876.
13. Mirdita M., Schütze K., Moriaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods*. 2022;19(6):679–682.
14. Koradi R., Billeter M., Wüthrich K. MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 1996;14(1):51–55.
15. Nadezhdin K.D., Romanovskaia D.D., Sachkova M.Y., Oparin P.B., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Arseniev A.S., Vassilevski A.A. Modular toxin from the lynx spider *Oxyopes takobius*: Structure of spiderine domains in solution and membrane-mimicking environment. *Protein Sci.* 2017;26(3):611–616.
16. Titau-Delgado G., Carrillo E., Mendoza A., Mayorga-Flores M., Escobedo-González F.C., Cano-Sánchez P., López-Vera E., Corzo G., Del Rio-Portilla F. Successful refolding and NMR structure of rMagi3: A disulfide-rich insecticidal spider toxin. *Protein Sci.* 2018;27(3):692–701.
17. Korolkova Y., Maleeva E., Mikov A., Lobas A., Solovyeva E., Gorshkov M., Andreev Y., Peigneur S., Tytgat J., Kornilov F., Lushpa V., Mineev K., Kozlov S. New insectotoxin from *Tibellus oblongus* spider venom presents novel adaptation of ICK fold. *Toxins*. 2021;13(1):29.
18. Santos A.D., Imperial J.S., Chaudhary T., Beavis R.C., Chait B.T., Hunsperger J.P., Olivera B.M., Adams M.E., Hillyard D.R. Heterodimeric structure of the spider toxin omega-agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 1992;267(29):20701–20705.

Поступила в редакцию 29.08.2023

После доработки 25.09.2023

Принята в печать 26.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Disulfide bond patterns in the toxins of spiders of the Ctenidae family. Comparison with AlphaFold 2.0 predictions

P.A. Mironov , Z.O. Shenkarev* 

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya 16/10, 117997, Moscow, Russia*

**e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru*

Wandering spiders (family Ctenidae) have multicomponent venoms in which more than 500 different peptides and proteins, called ctenitoxins, have been identified. The main components of the venom are cysteine-rich peptides containing an inhibitory cystine knot (ICK) motif. The pharmacological diversity of ctenitoxins allows us to consider some of them as prototypes for the development of new drugs for the treatment of chronic pain, Huntington's disease, erectile dysfunction and glaucoma. According to the location of cysteine residues in the amino acid sequence, ctenitoxins are divided into 14 groups containing from 6 to 14 Cys residues. Currently, the spatial structure of only one ctenitoxin, ω -CNTX-Pn4a (Pha1 β or Tx3-6) from the Brazilian wandering spider *Phoneutria nigriventer*, has been determined. Another 10 structural groups of ctenitoxins have homology with the known spatial structures of spider toxins of other families and other proteins, and for three groups the structural homologues are unknown. In this paper, we proposed possible disulfide bonding patterns for all groups of ctenitoxins. A comparison of the obtained schemes with the predictions of the AlphaFold 2.0 program shows that this neural network does not always correctly predict the structures of cysteine-rich peptides, especially if the structures of mature molecules without leader sequences are modeled.

Keywords: *spider neurotoxins, ctenitoxins, ICK motif, cystine knot, spatial structure prediction, cysteine-rich peptides, AlphaFold 2.0*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 22-14-00326.

Сведения об авторах

Миронов Павел Андреевич — тех.-лаб. лаборатории структурной биологии ионных каналов Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел: 8-495-335-01-00; e-mail: mironov@nmr.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7884-3257>

Шенкарев Захар Олегович — докт. физ.-мат. наук, гл. науч. сотр. лаборатории структурной биологии ионных каналов Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел: 8-495-335-01-00; e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1383-3522>

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-шпики 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 «шпики»; менее представленная нейраминидаза (НА) — тетрамерные структуры с гибкой тонкой ножкой и большой «головой»; минорный белок М2. Основным структурным белком 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 избежать 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 Фуджиеси [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].

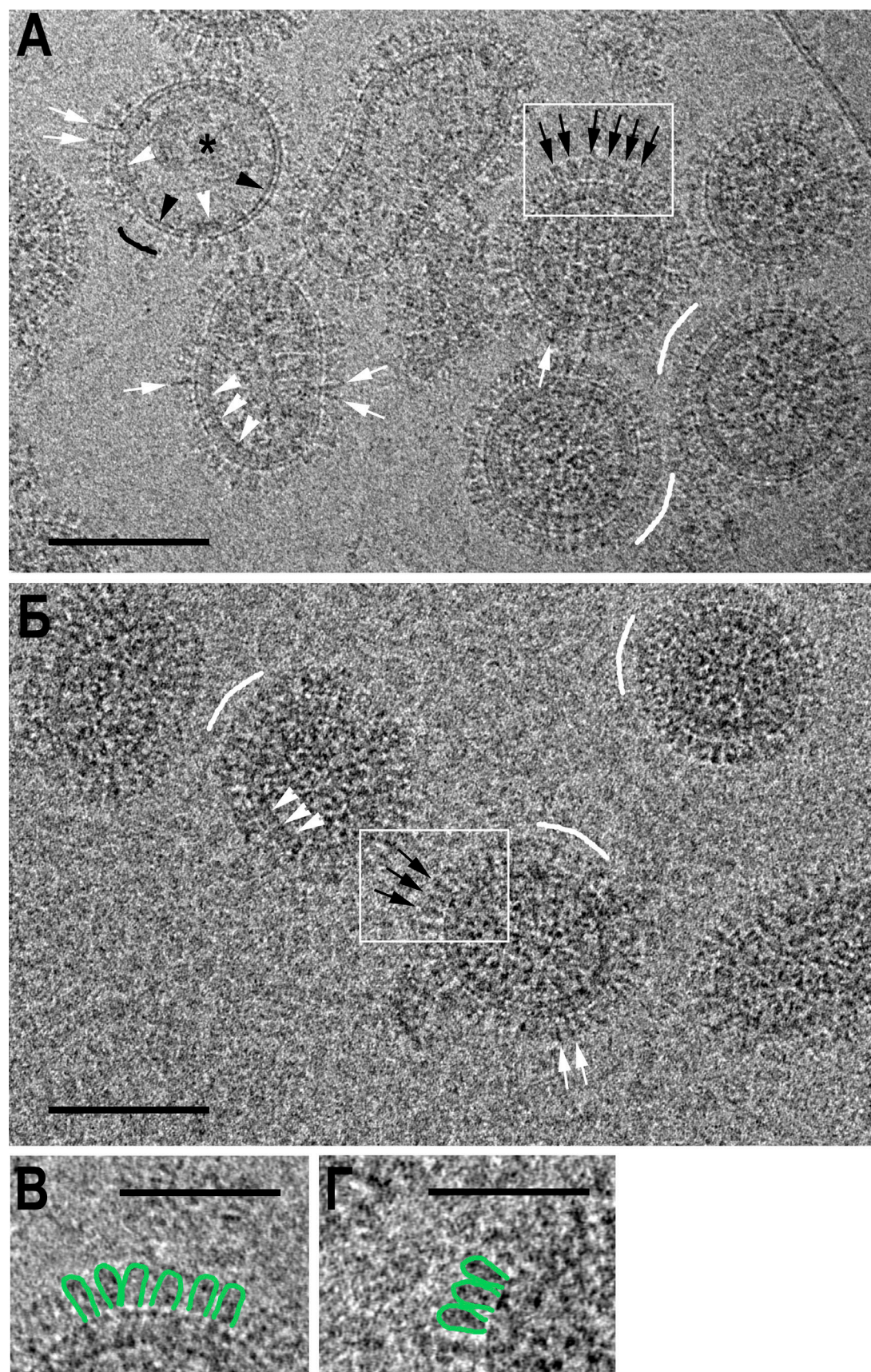


Рис. 1. КриоЭМ анализ вируса гриппа штаммов А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) (А; В) и В/Пхукет/3073/13 (Б; Г). В, Г – увеличенные фрагменты, выделенные рамками на панелях А и Б соответственно. Черные стрелки – гемагглютинин (НА); белые стрелки – предположительно нейраминидаза (NA); белые дуги – смешанные кластеры 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 – бислойная 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

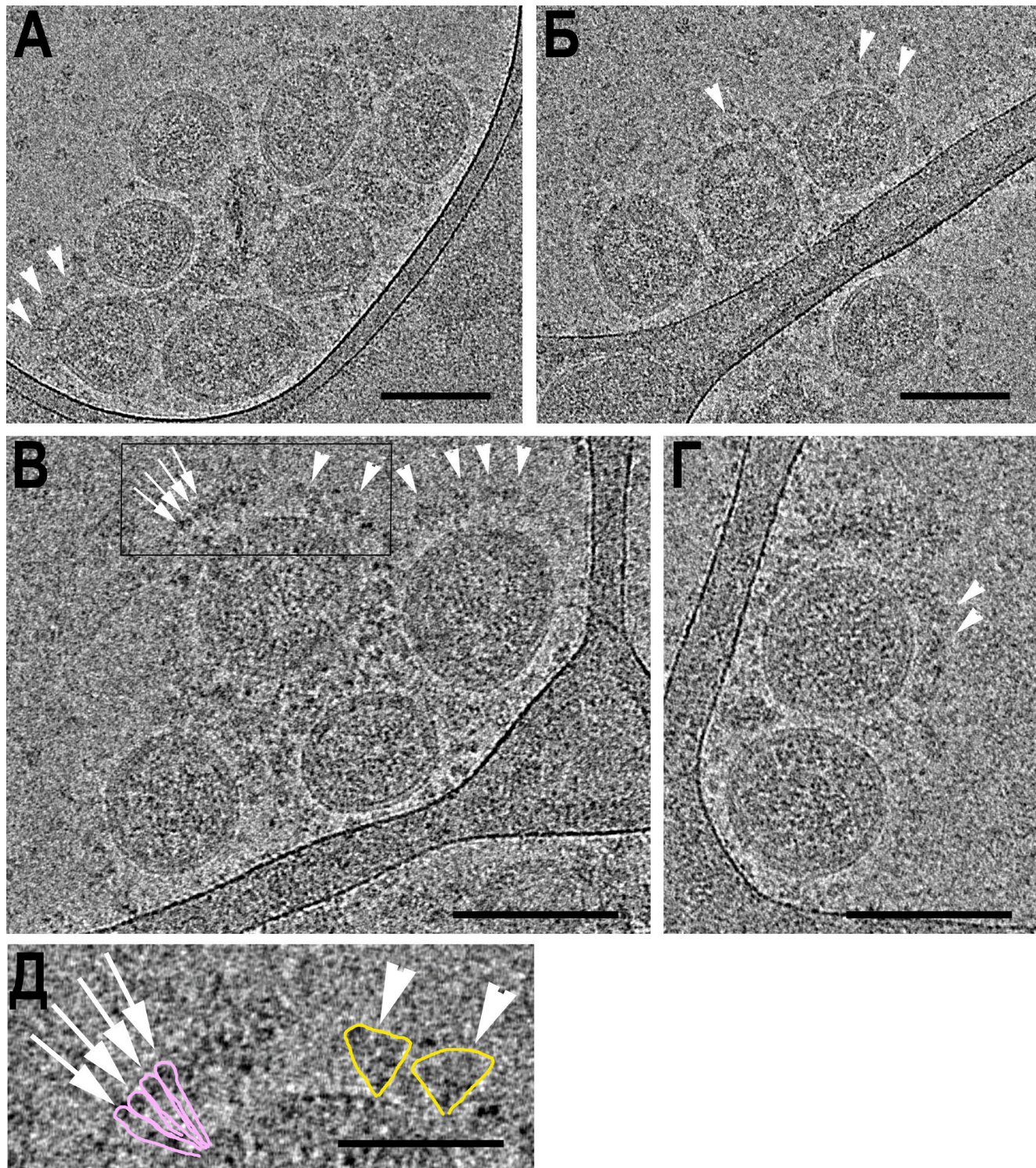


Рис. 2. КриоЭМ анализ коронавируса штамма hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI_ISL_572398), инактивированного бета-пропиолактоном. А–Г – микрофотографии вирионов; Д – увеличенный фрагмент, выделенный рамкой на панели В. Белые наконечники стрел – шипы S-белка предположительно в префузионной конформации (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. Mole-

cular 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 cytoplas-

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., Samoilikov 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. Иванковского 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. Иванковского 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>

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

Вирус 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, удаляя 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 плаزمида 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 В. 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].

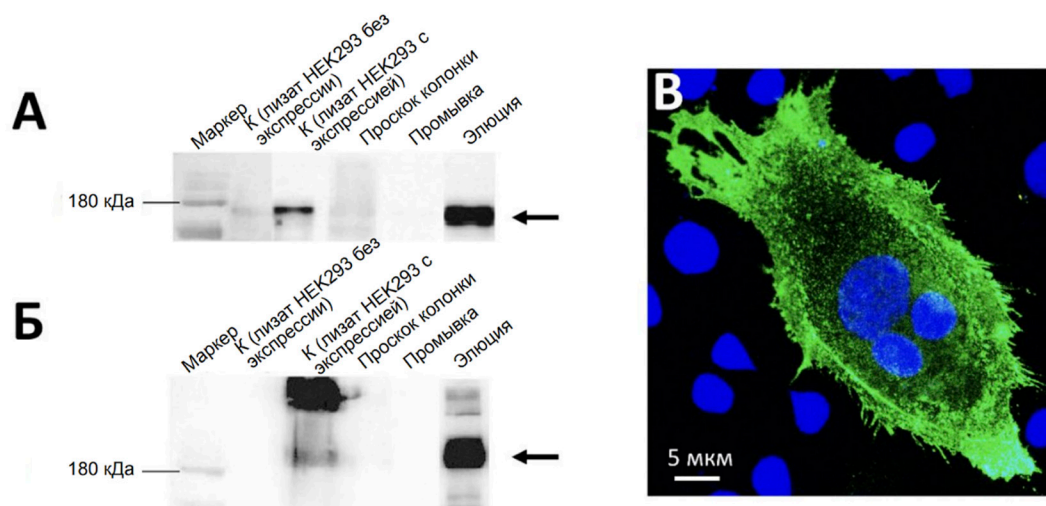


Рис. 2. Результаты экспрессии и очистки S-белка в детергенте и SMA. А – Иммуноблоттинг образцов, собранных в процессе очистки S-белка с использованием детергента NP-40. Б – Иммуноблоттинг образцов, собранных в процессе очистки S-белка с использованием SMA. Стрелками отмечены полосы, соответствующие полноразмерному 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° ,

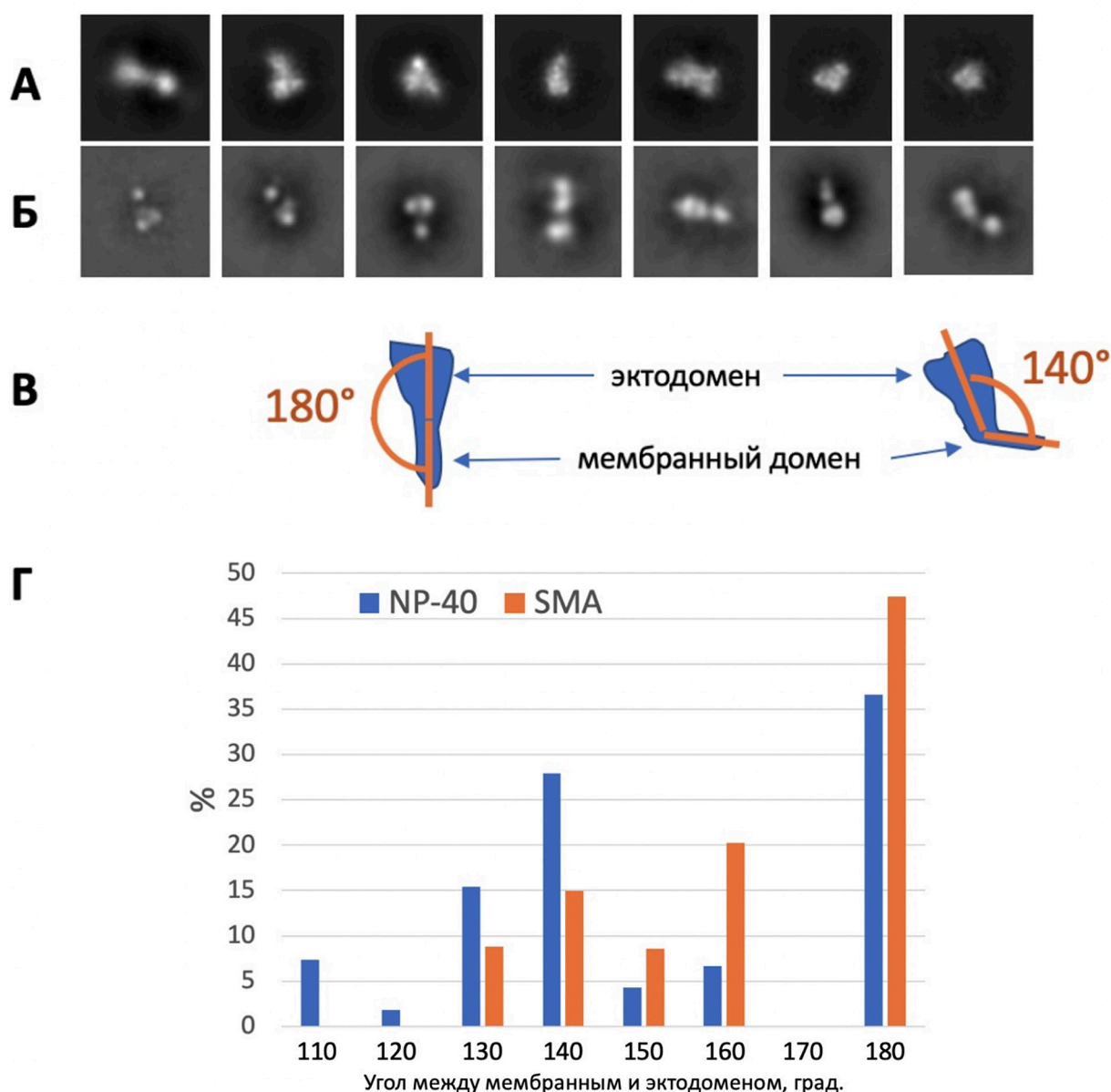


Рис. 3. Сравнение двумерных классов сумм, полученных после обработки изображений S-белков, очищенных двумя способами. А — S-белок, очищенный в детергенте NP-40; Б — S-белок, очищенный с использованием SMA. Масштабный отрезок — 20 нм. В — Схема измерения угла между экто- и мембранным доменами. Г — Распределение 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

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 57.085.23

Рост мезенхимальных стволовых клеток на ориентированных микроструктурированных пленках и электроформованных скаффолдах

И.В. Демьянова¹ , Е.А. Акулина^{1, 2, *} , И.И. Жаркова² , В.В. Воинова² ,
Д.В. Чеснокова² , А.М. Хоссаин², Т.К. Махина³ , Г.А. Бонарцева³ ,
В.И. Куликовская⁴ , В.В. Николайчук⁴, Ю.Р. Мухортова⁵, А.С. Прядко⁵ ,
М.А. Сурменева^{5, 6} , Р.А. Сурменев^{5, 6} , К. В. Шайтан² , А.П. Бонарцев²

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

²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

³Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российская академия наук,
Россия, г. Москва, 119071, Ленинский просп., д. 33, корп. 2;

⁴Институт химии новых материалов, Национальная академия наук Беларуси,
Беларусь, г. Минск, 220141, ул. Скорины, д. 36;

⁵Научно-исследовательский центр «Физическое материаловедение и композитные материалы»
и ⁶Международный научно-исследовательский центр «Пьезо- и магнитоэлектрические материалы»,
Научно-исследовательская школа химии и прикладных биомедицинских наук, Национальный исследовательский
Томский политехнический университет, Россия, г. Томск, 634050, просп. Ленина, д. 43А

*e-mail: akoulinaliza@gmail.com

В работе получены пленки и скаффолды из поли-3-оксибутирата с различной микро-структурой тремя различными методами. Методом электроформования получены скаффолды с ориентированными и хаотично переплетенными волокнами различной толщины в зависимости от используемых параметров. Методами спин-коутинга и самоорганизации получены пленки с различной микроструктурой поверхности, в том числе с ориентированными элементами топографии. Показано, что микроструктура поверхности не влияет на рост мезенхимальных стволовых клеток в течение недели, однако оказывает влияние на морфологию прикрепленных клеток.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, микроструктурированный, спин-коутинг, самоорганизация, ориентированный, мезенхимальные стволовые клетки

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-6

Введение

Микрорельеф поверхности оказывает существенное воздействие на поведение клеток. Например, вогнутые поверхности способствуют контактам между клетками, в то время как выпуклые поверхности вызывают растяжение мембраны [1]. Структурированные подложки изменяют градиент концентрации сигнальных молекул между клетками [2].

Ориентированные микроструктурированные скаффолды имеют большое значение для контролируемого клеточного роста. Клетки выстраиваются вдоль структур на поверхности подложек [3]. Для создания полимерных подложек с ориентированными микроструктурами используются мето-

ды литографии, микроконтактной печати и спин-коутинга [4–6].

Технология спин-коутинга обеспечивает воспроизводимость тонких пленок с контролируемой микроструктурой поверхности [7]. Метод самоорганизации для создания пленок позволяет получать пористые пленки с упорядоченной микроструктурой поверхности из различных полимеров [8, 9]. Формирование микро топографии поверхности зависит от свойств полимера [10]. Поли-3-оксибутират (ПОБ), является наиболее изученным представителем семейства поли-3-оксикарбоновых, который может быть получен микробиологическим путем микроорганизмами различных типов, в т.ч. бактериями рода *Azotobacter*.

© Демьянова И.В., Акулина Е.А., Жаркова И.И., Воинова В.В., Чеснокова Д.В., Хоссаин А.М., Махина Т.К.,
Бонарцева Г.А., Куликовская В.И., Николайчук В.В., Мухортова Ю.Р., Прядко А.С., Сурменева М.А.,
Сурменев Р.А., Шайтан К.В., Бонарцев А.П., 2023

ПОБ перспективен для использования в биотехнологии и медицине благодаря сочетанию хороших механических, диффузионных свойств и гидрофильности поверхности, высокой биосовместимости и способности к биodeградации [11, 12].

Электроформование — распространенный метод для создания микро- и нановолокнистых подложек для тканевой инженерии [13]. Заряженный полимерный раствор образует стопки волокон со структурой, напоминающей костную ткань [14].

Такие методы как спин-коутинг, самоорганизация и электроформование эффективно используются для создания микроструктурированных поверхностей на биополимерных подложках. Использование этих методов способствует развитию тканевой инженерии и регенеративной медицины применительно к костной, хрящевой, нервной и сердечной тканям.

Материалы и методы

Синтез ПОБ. Применяли метод биосинтеза ПОБ с использованием штамма *Azotobacter chroococcum* 7B (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/OK077566.1>) [15]. Полимер извлекали и очищали из биомассы хлороформом, с последующими стадиями осаждения, растворения-осаждения и сушки. Для изготовления пленок и скаффолдов полимер растворяли в хлороформе.

Электроформованные скаффолды. Использовали специальную установку с автоматизированным устройством для экструзии полимерного раствора через иглы G20 и G27 с оптимальным напряжением. Экструдированный раствор помещали на металлический валик, определяющий характеристики нитей [16]. Скаффолды изготавливали из 5%-ных и 7%-ных растворов ПОБ в хлороформе с оптимальными параметрами. Толщину нитей измеряли с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, США), кото-

рая используется для оцифровки и расчета морфологических параметров изображений, в том числе изображений сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Получение пленок методом спин-коутинга. Для микроструктурированных пленок использовали калибровочные решетки для атомно-силовой микроскопии: TGX1 (TipsNano, Эстония; столбчатые штампы) и TGZ3 (TipsNano, Эстония; полосатые штампы) — таблица [17]. Пленки получали методом центрифугирования с нанесением полимерного раствора на решетки.

Получение пленок методом самоорганизации. Кремниевые субстраты предварительно очищали раствором «piranha» ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ — 1:3) при 120°C, наносили растворы ПОБ с молекулярной массой 350 кДа и 1800 кДа (20 мг/мл) на субстраты, создавая жидкую пленку. Увлажненный воздух (относительная влажность 75%, 37°C) получали пропусканием через насыщенный раствор NaCl. Пленки формировались после испарения хлороформа под действием увлажненного воздуха, контроль — без увлажнения [17].

Контактный угол. Измерения контактного угла проводили путем добавления 20 мкл дистиллированной воды к каждому образцу. Каплю анализировали с помощью ImageJ, точки вдоль капли прорисовывали вручную, угол смачивания вычисляли с помощью алгоритма «B-spline snake» [18].

Рамановская спектроскопия. Измерения проводили с помощью конфокального Рамановского микроскопа (NTEGRA Spectra, NT-MDT, Россия) с лазером, длина волны 633 нм.

Культуры клеток. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были изолированы из костного мозга крыс по стандартному протоколу [19]. Клетки культивировали в среде α -MEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Биолот, Россия) и 1% антибиотика

Таблица

Характеристики микроструктуры поверхности образцов и значения контактного угла

Образец	Размеры шероховатостей	Контактный угол
5% хаотичное (рисунок, А)	Толщина волокон: $2,04 \pm 0,14$ мкм	$102,7^\circ \pm 3,6^\circ$
5% ориентированные (рисунок, Б)	Толщина волокон: $1,81 \pm 0,66$ мкм	$73,1^\circ \pm 3,8^\circ$
7% хаотичное переплетение (рисунок, В)	Толщина волокон: $4,69 \pm 1,53$ мкм	$104,9^\circ \pm 4,3^\circ$
7% ориентированные (рисунок, Г)	Толщина волокон: $3,24 \pm 0,24$ мкм	$82,5^\circ \pm 1,2^\circ$
ПОБ350 Плоская пленка (рисунок, Д)	Шероховатости отсутствуют	$121,3^\circ \pm 3,7^\circ$
ПОБ1800 Плоская пленка	Шероховатости отсутствуют	$118,9^\circ \pm 1,6^\circ$
ПОБ 350 кДа TGX1 столбчатый штамп (рисунок, Е)	Периодичность: $3 \pm 0,05$ мкм, высота: $\sim 0,6$ мкм, ширина столбца: 0,6 мкм	—*
ПОБ 350 кДа TGZ3 полосатый штамп (рисунок, Ж)	Периодичность: $3 \pm 0,05$ мкм, высота ступенек: 520 ± 20 нм	—*
ПОБ350 в объеме 40 мг/мл 300 μ l (рисунок, З)	Средний размер пор: $4,7 \pm 1,5$ мкм размер рамки: $4,4 \pm 1,6$ мкм	$89,6^\circ \pm 4,9^\circ$
ПОБ1800 в объеме 20 мг/мл 300 μ l (рисунок, И)	Сетчатые пленки с ячейками неправильной формы Размер пор очень вариативен: 7–12 μ m	Очень вариативен: 117° до 126°

Примечание: * — рабочая поверхность образцов слишком мала для измерения

(пенициллин + стрептомицин; ПанЭко, Россия). Образцы стерилизовали в этаноле в течение 1 ч. После стерилизации этанолом образцы как микроструктурированных пленок, так и скаффолдов нарезали на фрагменты площадью $0,5 \text{ см}^2$ и помещали каждый на дно лунки в 96-луночный планшет. Клетки подсчитывали в камере Горяева и высевали на образцы при плотности 2500 клеток на лунку в стандартной питательной среде. Пролиферацию клеток определяли с помощью МТТ-анализа (Merck, Германия) и ХТТ-анализа (набор для пролиферации клеток, Biological Industries, Израиль). Исследование проводили в течение 1 нед., количество клеток измеряли на 1-е, 3-е, 5-е и 7-е сут спектрофотометрически с помощью мультидетектора Zenyth 3100 (Anthos Labtec Instruments GmbH, Зальцбург, Австрия).

СЭМ. Пленки обрабатывали стандартно: фиксировали, обезвоживали в этаноле различной концентрации, промывали в смеси этанола и гексаметилдисилазана (HMDS, hexamethyldisilazane), затем оставляли в HMDS до испарения. Образцы, полученные методом спин-коутинга, изучали на сканирующем электронном микроскопе TM3000

(Hitachi, Япония) [21]. Анализ образцов, полученных методом самоорганизации и электроформирования, проведен на сканирующем электронном микроскопе JSM-25S (JEOL, Япония).

Статистический анализ. Результаты представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Для анализа данных применяли тест Манна-Уитни и односторонний критерий Краскела-Уоллиса, уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Структура полимерных подложек, полученных различными методами

Структура скаффолдов, полученных методом электроспиннинга. С использованием высокоскоростного вращения созданы четыре образца скаффолдов с разными узорами волокон. Скорости 200 и 1500 об./мин дали хаотичные и ориентированные узоры.

Для 5%-ного ПОБ при 200 об./мин толщина волокна составила $2,04 \pm 0,14 \text{ мкм}$ (рисунок, А). Ориентированные волокна при 1500 об./мин имели толщину $1,81 \pm 0,53 \text{ мкм}$ (рисунок, Б). Толщина волокон хаотичного и ориентированного

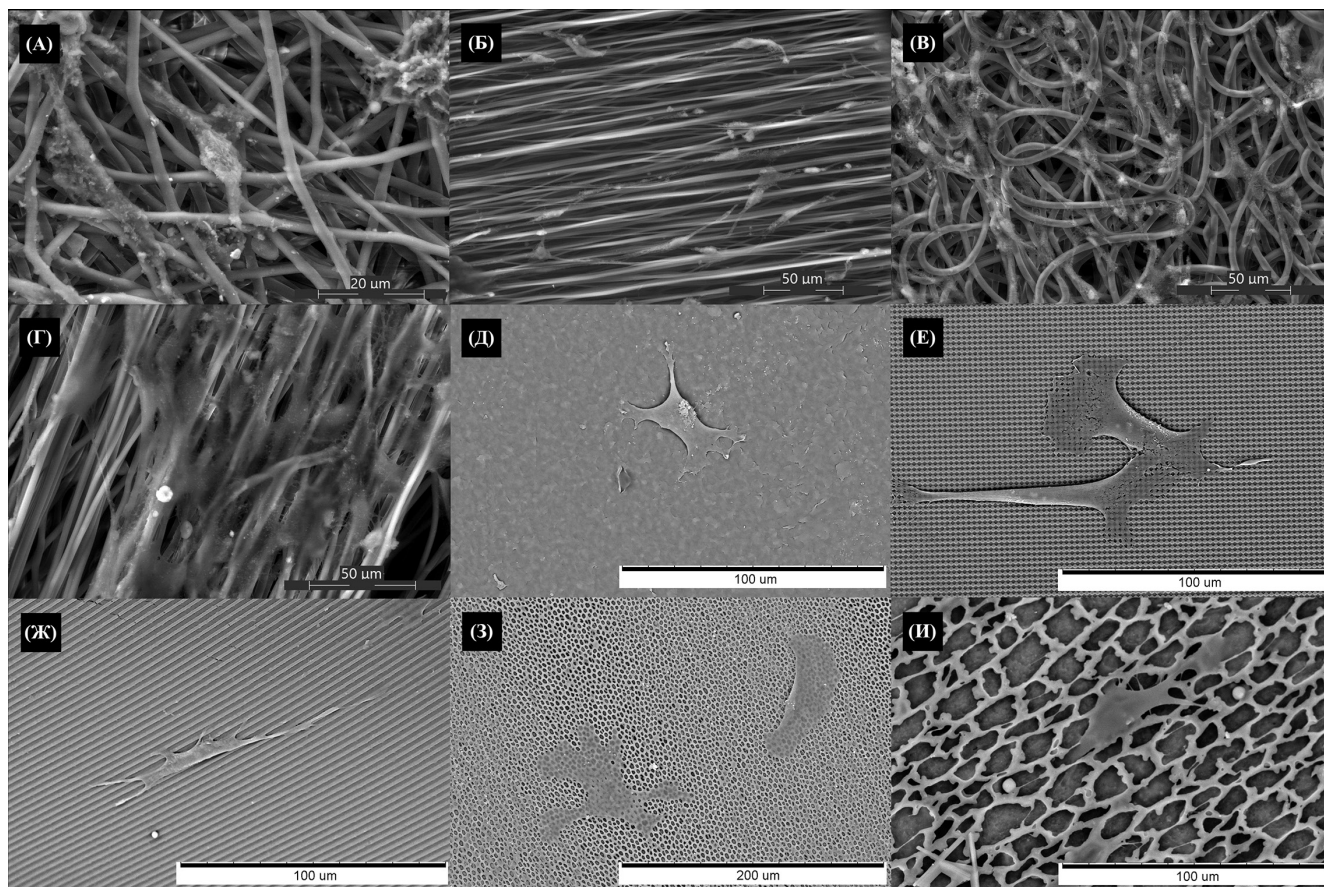


Рисунок. Рост МСК на поверхности скаффолдов в зависимости от топологии поверхности скаффолдов. Сканирующая электронная микроскопия. А – 5% хаотичное переплетение, увеличение $\times 5000$; Б – 5% ориентированные, увеличение $\times 1500$; В – 7% хаотичное переплетение, увеличение $\times 1500$; Г – 7% ориентированные, увеличение $\times 2000$; Д – пленка ПОБ 350 кДа; Е – пленка ПОБ 350 кДа с узором в виде столбиков TGX1; Ж – пленка ПОБ 350 кДа с узором в виде полосок TGZ3; З – рост клеток на пленках из ПОБ 350, полученных из раствора с концентрацией 40 мг/мл и $L = 1 \text{ см}$, объем раствора составляет 300 мкл, увеличение $\times 500$; И – рост клеток на пленках из ПОБ 1800, полученных из раствора с концентрацией 20 мг/мл и $L = 3 \text{ см}$, объем раствора составляет 300 мкл, увеличение $\times 1000$.

узов 7%-ного ПОБ составила $4,69 \pm 1,53$ мкм и $3,24 \pm 0,24$ мкм соответственно (рисунок, В и Г; таблица).

Гидрофильность зависела от узоров, более высокие контактные углы выявлены для хаотичных структур: 5% ориентированных — $73,1^\circ \pm 3,8^\circ$; 5% хаотичных — $102,7^\circ \pm 3,6^\circ$; 7% ориентированных — $82,5^\circ \pm 1,2^\circ$; 7% хаотичных — $104,9^\circ \pm 4,3^\circ$ (таблица). Рамановская спектроскопия показала более высокую кристалличность и характерные кристаллические полосы для ориентированных скаффолдов 7% ПОБ. Аморфные полосы отсутствовали, что указывало на кристаллическую структуру ПОБ [22, 23].

Топография поверхности самоорганизованных пленок ПОБ с разной микроструктурой, полученных методом спин-коутинга и самоорганизации. Исследование направленности топографии поверхности ПОБ пленок, полученных методом самоорганизации, выявило важное влияние молекулярной массы ПОБ на их структуру (рисунок, 3 и И). Пленки из ПОБ 350 кДа (20 мг/мл, объем 150 мкл) обладают трехмерной микропористой структурой с порами размером $4,7 \pm 1,5$ мкм и рамками $4,4 \pm 1,6$ мкм. При повышении молекулярной массы до 1800 кДа (20 мг/мл, объем 300 мкл) наблюдается сетчатая структура с порами размером 7–12 мкм (таблица). МСК (2500 клеток/ $1,5 \text{ см}^2$) на пленках ПОБ 350 кДа плотно распластаны, в то время как на пленках ПОБ 1800 кДа более компактны и образуют псевдоподии для прикрепления. Даже нестрогая топография поверхности оказывает влияние на ориентацию МСК. Эти результаты подтверждают, что структура поверхности влияет на морфологию клеток и показывают важность этого аспекта в тканевой инженерии и биомедицинских исследованиях.

Гидрофобность оценивалась измерением контактного угла. Самоорганизованные пленки ПОБ 350 кДа демонстрировали более низкие контактные углы по сравнению с плоскими пленками. Микроэлементы на поверхности ПОБ 350 кДа снижали угол смачивания в 1,1–1,6 раза. Присутствие сетчатой структуры в пленках ПОБ 1800 кДа практически не влияло на их смачивание. Значения углов смачивания варьировали от 117° до 126° , что соответствовало значениям для плоской пленки ПОБ 1800 кДа ($118,9^\circ \pm 1,6^\circ$) (таблица).

Рост МСК на подложках, полученных различными методами

Рост МСК на электроформованных скаффолдах. МСК успешно прикреплялись и росли на микроструктурированных скаффолдах, полученных методом электроформования. Структуры скаффолдов с полимером в 7%-ной концентрации имели более толстые и выраженные волокна по сравнению со структурами с полимером с 5%-ной

концентрацией. Прикрепление и рост МСК зависели от размера полимерных волокон и микроструктуры скаффолда.

Влияние микротопографии на рост МСК изучали на примере 5%-ных и 7%-ных ПОБ 350 кДа скаффолдов с хаотичной и ориентированной структурой. Первоначальное исследование показало, что клетки имеют тенденцию растягиваться вдоль нитей. На более толстых нитях из 7%-ного полимера клетки имеют тенденцию обволакивать волокно; при уменьшении концентрации полимера до 5%-ного клетки вытягивают псевдоподии вдоль нитей или к соседним нитям, что связано с более плотной упаковкой полимерного волокна.

Рост клеток на микроструктурированных пленках. Исследование роста МСК на пленках, полученных методом спин-коутинга, показало, что тип штампа (столбики или полосы) не влияет на уровень пролиферации клеток. После проведения серии экспериментов по оценке числа жизнеспособных клеток на пленках с помощью тестов МТТ и ХТТ было выявлено, что все типы пленок обеспечивают одинаковый уровень пролиферации клеток, который не отличается значимо от роста на стандартных гладких пленках.

Влияние микроструктуры пленок, полученных на штампах, на прикрепление и рост клеток было оценено с использованием двух типов микроструктур: пленки TGX1 (столбики) и пленки TGZ3 (полосы).

Исследование, проведенное на МСК (рисунок Д, Е, Ж) показало, что изменение структуры поверхности влияет на морфологию прикрепившихся клеток. На плоских пленках клетки не обладают распластанной морфологией. На пленках с анизотропной топографией в виде параллельных борозд, клетки удлиняются вдоль борозд, прикрепляя псевдоподии к выступам поверхности.

Заключение

Использование методов электроформования, спин-коутинга и самоорганизации позволяет создавать полимерные скаффолды и пленки с разнообразной микроструктурой поверхности. Регуляция параметров этих методов позволяет контролировать структуру получаемых изделий, в результате чего можно изготавливать материалы с разной микротопографией поверхности. Исследование выявило сходство поведения клеток на ориентированных подложках, полученных разными методами: клетки вытягиваются вдоль линий ориентации топографических элементов структуры поверхности пленок (бороздок, балок) и скаффолдов (нитей). Ориентация элементов топографии поверхности пленок и скаффолдов напрямую не влияет на рост клеток, но влияет на их прикрепление и морфологию.

Таким образом, направленное изменение микроструктуры поверхности в полимерных скаффолдах и пленках при их изготовлении различными методами дает возможности для контроля поведения клеток. Это включает в себя регуляцию прикрепления, ориентации и морфологии клеток. Полученные нами результаты актуальны для разработки биоматериалов в тканевой инженерии, где контроль взаимодействия клеток с материалами является важным аспектом для достижения необходимых свойств и функциональности тканей.

Оборудование, используемое в данной работе, предоставлено Центром коллективного пользования Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (включая сканирующие электронные микроскопы), Центром пользовательских устройств исследовательского центра биотехнологии Российской академии наук и Институтом химии новых материалов Национальной

академии наук Беларуси. Электронная микроскопия была проведена с использованием специализированной установки «3D-EMS» в Московском государственном университете.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №20-64-47008) — разработка скаффолдов, полученных методом электроформования и изучение их морфологии и биосовместимости *in vitro* (биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова) и Министерства науки и высшего образования (грантовое соглашение №075-15-2021-588 от 1 июня 2021 г.) — исследование и анализ методом спектроскопии комбинационного рассеяния (Томский политехнический университет). Работы проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Werner M., Blanquer S.B.G., Haimi S., Korus G., Dunlop J.W.C., Duda G.N., Grijpma D.W., Petersen A. Surface curvature differentially regulates stem cell migration and differentiation via altered attachment morphology and nuclear deformation. *Adv. Sci.* 2017;4(2):1600347.
2. Van der Flier L.G., Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 2009;71:241–260.
3. Prittinen J., Zhou X., Bano F., Backman L., Danielson P. Microstructured collagen films for 3D corneal stroma modelling. *Connect. Tissue Res.* 2022;63(5):443–452.
4. Kim E.J., Boehm C.A., Mata A., Fleischman A.J., Muschler G.F., Roy S. Post microtextures accelerate cell proliferation and osteogenesis. *Acta Biomater.* 2010;6(1):160–169.
5. Koh L.B., Rodriguez I., Venkataraman S.S. The effect of topography of polymer surfaces on platelet adhesion. *Biomaterials.* 2010;31(7):1533–1545.
6. Li L., Chen C., Li J., Zhang A., Liu X., Xu B., Gao S., Jin G., Ma Z. Robust and hydrophilic polymeric films with honeycomb pattern and their cell scaffold applications. *J. Mater. Chem.* 2009;19(18):2789–2796.
7. Norrman K., Ghanbari-Siahkali A., Larsen N.B. 6 Studies of spin-coated polymer films. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem.* 2005;101:174–201.
8. Dong W., Zhou Y., Yan D., Mai Y., He L., Jin C. Honeycomb-structured microporous films made from hyperbranched polymers by the breath figure method. *Langmuir.* 2009;25(1):173–178.
9. Tokaruk W.A., Molteno T.C.A., Morris S.W. Bénard-Marangoni convection in two-layered liquids. *Phys. Rev. Lett.* 2000;84(16):3590–3593.
10. Wong K.H., Hernández-Guerrero M., Granville A.M., Davis T.P., Barner-Kowollik C., Stenzel M.H. Water-assisted formation of honeycomb structured porous films. *J. Porous Mater.* 2006;13(3):213–223.
11. Bondartsev A.P., Bonartseva G.A., Reshetov I.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Application of polyhydroxyalkanoates in medicine and the biological activity of natural poly(3-hydroxybutyrate). *Acta Naturae.* 2019;11(2):4–16.
12. Sunami H., Ito E., Tanaka M., Yamamoto S., Shimomura M. Effect of honeycomb film on protein adsorption, cell adhesion and proliferation. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2006;284–285:548–551.
13. Xue J., Wu T., Dai Y., Xia Y. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. *Chem. Rev.* 2019;119(8):5298–5415.
14. Demina T.S., Bolbasov E.N., Peshkova M.A., Efremov Y.M., Bikmulina P.Y., Birdibekova A.V., Popyrina T.N., Kosheleva N.V., Tverdokhlebov S.I., Timashev P.S., Akopova T.A. Electrospinning vs. electro-assisted solution blow spinning for fabrication of fibrous scaffolds for tissue engineering. *Polymers.* 2022;14(23):5254.
15. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Voinova V.V., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Potashnikova D.M., Chesnokova D.V., Khaydapova D.D., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells. *3 Biotech.* 2018;8(8):328.
16. Pryadko A.S., Mukhortova Y.R., Chernozem R.V., et al. Electrospun magnetic composite poly-3-hydroxybutyrate/magnetite scaffolds for biomedical applications: Composition, structure, magnetic properties, and biological performance. *ACS Appl. Bio Mater.* 2022;5(8):3999–4019.
17. Kulikouskaya V.I., Nikalaichuk V.V., Bonartsev A.P., Akoulina E.A., Belishev N.V., Demianova I.V., Chesnokova D.V., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Hileuskaya K.S., Voinova V.V. Honeycomb-structured porous films from poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Physicochemical characterization and mesenchymal stem cells behavior. *Polymers (Basel).* 2022;14(13):2671.
18. Stalder A. F., Kulik G., Sage D., Barbieri L., Hoffmann P. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 2006;286(1–3):92–103.
19. Yusop N., Battersby P., Alraies A., Sloan A.J., Moseley R., Waddington R.J. Isolation and characterisation

of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and the endosteal niche: A comparative study. *Stem Cells Int.* 2018;2018:6869128.

20. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2018;2018(6):469–472.

21. Özen A., Gül Sancak İ., Tiryaki M., Ceylan A., Alparslan Pınarlı F., Delibaşı T. Mesenchymal stem cells (Mscs) in scanning electron microscopy (SEM) world. *Niche.* 2013;2:22–24.

22. Furukawa T., Sato H., Murakami R., Zhang J., Noda I., Ochiai S., Ozaki Y. Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly

(hydroxybutyrate)/poly (l-lactic acid) blends. *Polymer.* 2006;47(9):3132–3140.

23. Furukawa T., Sato H., Murakami R., Zhang J., Duan Y.X., Noda I., Shukichi O., Ozaki Y. Structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends studied by FT-IR microspectroscopy and differential scanning calorimetry. *Macromolecules.* 2005;38(15):6445–6454.

Поступила в редакцию 23.08.2023

После доработки 15.09.2023

Принята в печать 25.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Growth of mesenchymal stem cells on oriented microstructured films and electrospun scaffolds

I.V. Demianova¹ , E.A. Akoulina^{1, 2, *} , I.I. Zharkova² , V.V. Voinova² ,
D.V. Chesnokova² , A.M. Hossain², T.K. Makhina³ , G.A. Bonartseva³ ,
V.I. Kulikouskaya⁴ , V.V. Nikolaichuk⁴, Yu.R. Mukhortova⁵, A.S. Pryadko⁵ ,
M.A. Surmeneva^{5, 6} , R.A. Surmenev^{5, 6} , K.V. Shaitan² , A.P. Bonartsev² 

¹Biological Faculty, Shenzhen MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen, 518172, Guangdong Province, P.R. China;

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, 119234 Moscow, Russia;

³Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology,” Russian Academy of Science, 33–2 Leninsky Prospect, 119071, Moscow, Russia;

⁴Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, 36 Skariny st., 220141, Minsk, Belarus;

⁵Physical Materials Science and Composite Materials Research Centre

and ⁶Piezo- and Magnetoelectric Materials Research Centre, Research School of Chemistry & Applied Biomedical Sciences, National Research Tomsk Polytechnic University, 43A Prospect Lenina, 634050, Tomsk, Russia

*e-mail: akoulinaliza@gmail.com

The study involved the fabrication of films with different roughness and scaffolds made of poly(3-hydroxybutyrate) using various methods. Chaotic and oriented scaffolds with varying fiber thickness were obtained through the electrospinning method, depending on the polymer concentration and electrospinning parameters. Films with different surface roughness were obtained using spin coating and self-assembly methods. It was demonstrated that the varying microstructure of the surface does not affect the growth of mesenchymal stem cells over the course of a week; however, it does influence the morphology of the adhered cells.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), microstructured, spin coating, self-assembly, oriented, mesenchymal stem cells

Funding: This research was funded by the Russian Science Foundation, project number. 20-64-47008 (in part of the development of electrospun scaffolds and study of their morphology and biocompatibility in vitro; Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University), and was supported by the Ministry of Science and Higher Education, grant agreement number 075-15-2021-588 dated June 1, 2021 (in part of research and analysis by Raman spectroscopy; Tomsk Polytechnic University).

Сведения об авторах

Демьянова Ирина Валерьевна — аспирантка биологического факультета Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Тел.: +86-755-28-70-80-15; e-mail: irinydem@yandex.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5208-8775>

Акулина Елизавета Александровна — канд. биол. наук, постдок биологического факультета Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэне. Тел.: +86-755-28-70-80-15; e-mail: akoulinaliza@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2560-624X>

Жаркова Ирина Игоревна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-930-63-06; e-mail: iblkr@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5601-2850>

Воинова Вера Владимировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биохимии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-55; e-mail: veravoinova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5137-303X>

Чеснокова Дарьяна Владимировна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-930-63-06; e-mail: daryana8@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1148-7988>

Хоссаин Мухаммад Асиф — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-930-63-06; e-mail: asifhossain38@yahoo.com

Махина Татьяна Константиновна — науч. сотр. лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-954-40-08; e-mail: tat.makhina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3842-7491>

Бонарцева Гарина Александровна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Институт биохимии имени А.Н. Баха ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН. Тел.: 8-495-954-40-08; e-mail: bonar@inbi.ras.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0701-2402>

Куликовская Виктория Игоревна — канд. хим. наук, доц., зам. директора Института химии новых материалов НАН Беларуси. Тел.: +375-17-300-65-92; e-mail: kulikouskaya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6505-3929>

Николайчук Виктория Викторовна — магистрант, мл. науч. сотр. Института химии новых материалов НАН Беларуси. Тел.: +375-17-253-64-75; e-mail: vica10bcn@gmail.com

Мухортова Юлия Руслановна — науч. сотр. Международного научно-исследовательского центра «Пьезо- и магнитоэлектрические материалы», науч. сотр. Научно-исследовательского центра «Физическое материаловедение и композитные материалы» Томского политехнического университета. Тел.: 8-3822-70-17-77; phenics100@gmail.com

Прядко Артем Сергеевич — инженер-исследователь Научно-исследовательского центра «Физическое материаловедение и композитные материалы» Томского политехнического университета. Тел.: 8-3822-70-17-77; vilajer@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9395-1902>

Сурменева Мария Александровна — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. Международного научно-исследовательского центра «Пьезо- и магнитоэлектрические материалы», доц. Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, вед. науч. сотр. Научно-исследовательского центра «Физическое материаловедение и композитные материалы» Томского политехнического университета. Тел.: 8-3822-70-17-77; surmenevamaria@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5644-4781>

Сурменев Роман Анатольевич — докт. техн. наук, проф. Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий, вед. науч. сотр. Международного научно-исследовательского центра «Пьезо- и магнитоэлектрические материалы», директор Научно-исследовательского центра «Физическое материаловедение и композитные материалы» Томского политехнического университета. Тел.: 8-3822-70-17-77; rsurmenev@mail.ru, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8061-3047>

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5137-303X>

Бонарцев Антон Павлович — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-930-63-06; e-mail: ant_bonar@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5894-9524>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.322.54

Структура бычьего шаперонина TRiC/ССТ в открытой конформации по данным криоэлектронной микроскопии**Т.Б. Станишневa-Коновaлова^{1, *, #}, Е.Б. Пичкур^{2, #}, С.С. Кудрявцева³, И.А. Ярошевич⁴, А.Н. Семенов⁵, Е.Г. Максимов⁵, А.В. Моисеенко⁶, О.И. Волох¹, В.И. Муронец³**¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Отдел структурной биологии, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, г. Москва, 123182, пл. Академика Курчатова, д. 1;*³*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;*⁴*Кафедра биофизики и ⁵Лаборатория физико-химии биомембран, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*⁶*Общешаперонная лаборатория электронной микроскопии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 32***email: stanishneva-konvalova@mail.bio.msu.ru**#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, ССТ, 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 TRiC-опосредованное сворачивание с открытием и закрытием крышки, инкапсулируя субстрат в полость [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].

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 CCT может ингибировать сборку амилоидных волокон α -синуклеина, ответственных за болезнь Паркинсона. Способность CCT 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 HEK293F [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, Россия), длина волны возбуждения 500 нм, длительность импульса 26 пс, частота следования импуль-

сов 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 HMP-100-07C в комплексе с платой счета единичных фотонов SPC-130EM и модулем 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 отсеять возбуждающий лазерный 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 τ_1 , τ_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 τ_1 , τ_2 , A_1 , A_2 и их произведений (в частности, $\tau_1 \times A_1$ и $\tau_2 \times A_2$) анализировались

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 образцов 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 тлеющем 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°C, 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 методом 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 HEPES pH 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.

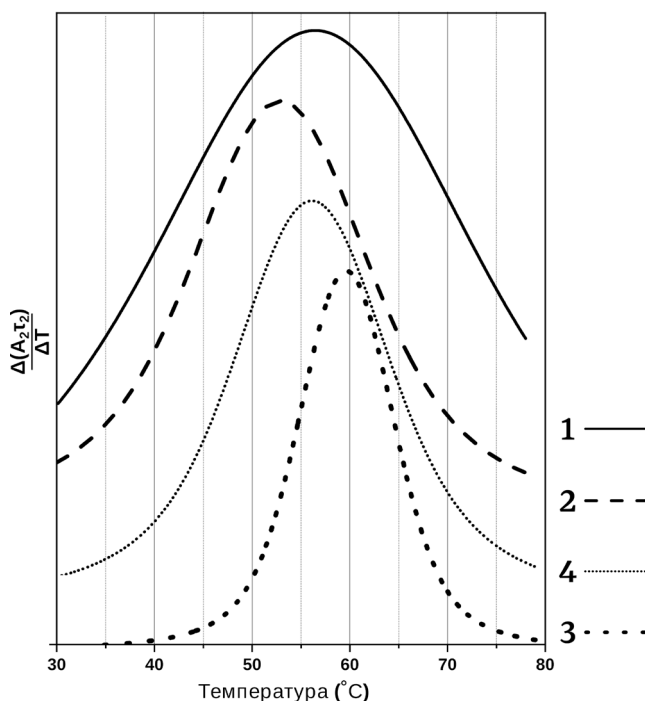


Рис. 1. Графики температурных зависимостей первой производной кривых плавления $A_2 \times \tau_2(T)$ для проб TRiC различного состава буферного раствора. $A_2 \times \tau_2$ — произведение амплитуды A_2 и времени жизни длинной компоненты τ_2 кинетики затухания флуоресценции красителя Nile Red.

Проведенный эксперимент показывает различную температурную стабильность белка в исследованных пробах — положения экстремумов ($T_{\Delta(A_2T_2)/\Delta T \text{ max}}$) на рис. 1 соответствуют точкам перегиба на кривых плавления соответствующих проб. Полученные данные указывают, что температурная стабильность убывает в ряду проб 3 ($T_{\Delta(A_2T_2)/\Delta T \text{ max}} = 59,6^\circ\text{C}$), 1 ($T_{\Delta(A_2T_2)/\Delta T \text{ max}} = 56,4^\circ\text{C}$), 4 ($T_{\Delta(A_2T_2)/\Delta T \text{ max}} = 56,1^\circ\text{C}$), 2 ($T_{\Delta(A_2T_2)/\Delta T \text{ max}} = 52,9^\circ\text{C}$). Таким образом, наибольшую стабильность показала проба 3 состава 0,5 мг/мл TRiC, 20 mM HEPES pH 7,2, 10% глицерина.

Получение структуры TRiC по данным криоЭМ.

Для этого этапа работы был выбран образец следующего состава: 1,3 мг/мл TRiC в 20 mM HEPES, pH 7,2, 10% глицерина, 1 mM 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 программ-

ный 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 cryoSPARC. В результате была получена карта плотности TRiC с разрешением $4,42 \text{ \AA}$ (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,

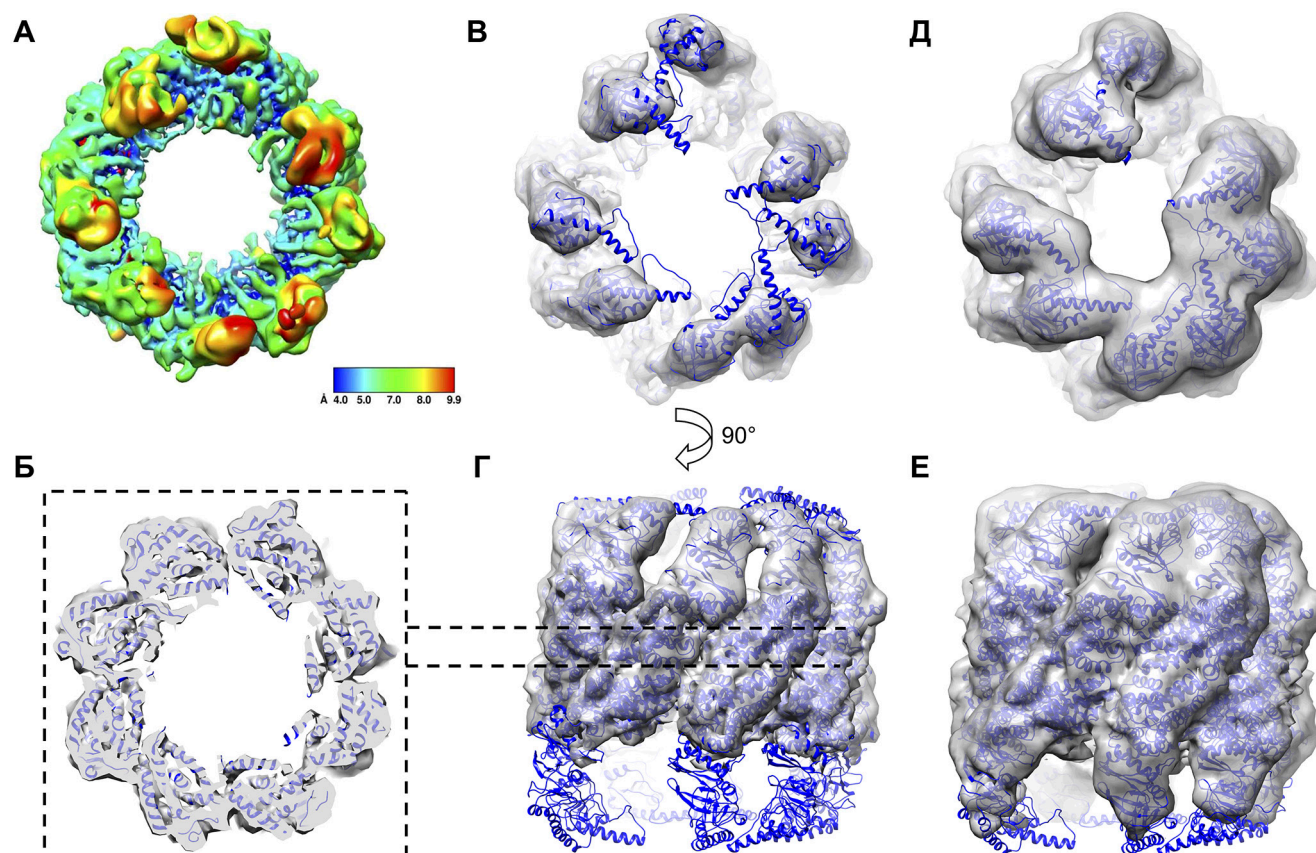


Рис. 2. Открытая конформация бычьего шаперонина TRiC, полученная по данным криоэлектронной микроскопии с разрешением $4,42 \text{ \AA}$. А — Вариации локального разрешения реконструкции. Б — срез через экваториальные домены. В, Г — вид со стороны апикальных доменов (В) и с боковой стороны (Г) на карту 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 (Е) на карту плотности при пороговом значении $0,6 \sigma$.

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 негидролизруемыми аналогами.

Заключение

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

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.

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 newly-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.
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., Klejnnot 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., Kretschmar 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 α -synuclein amyloid fibrils by a specific, conformation-dependent 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-Å 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, user-friendly 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^{1,*}, E.B. Pichkur^{2,#}, S.S. Kudryavtseva³, I.A. Yaroshevich⁴, A.N. Semenov⁵, E.G. Maksimov⁵, A.V. Moiseenko⁶, O.I. Volokh¹, V.I. Muronetz³

¹Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

²Department of Structural Biology, National Research Centre “Kurchatov institute,” 1 Kurchatov Square, 123182, Moscow, Russia;

³Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russia;

⁴Department of Biophysics and ⁵Laboratory of Physical Chemistry of Biomembranes, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

⁶Electron 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

Станишинева-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: sofia.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 — докт. 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

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.217

Структурное исследование рибосомы *Candida auris*

А.А. Атамас*, А.И. Гуськов, А.В. Рогачев

¹Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
Московский физико-технический университет,
Россия, Московская область, 141701, г. Долгопрудный, Институтский пер., 9
*e-mail: atamas.aa@phystech.edu

Candida auris — патогенный грибок, вызывающий инфекции у людей с ослабленной иммунной системой. Он устойчив к антимикробным препаратам, что усложняет лечение. *C. auris* представляет серьезную угрозу для здоровья населения, так как имеет высокую резистентность и контагиозность. Поскольку рибосома играет ключевую роль в жизнедеятельности организмов, поиск ингибиторов рибосомы *C. auris* имеет большое практическое значение. Мы использовали криоэлектронную микроскопию и анализ отдельных частиц для получения трехмерной структуры рибосомы *C. auris*. Мы описываем особенности рибосомальной РНК *C. auris*, что предоставляет ценную информацию для разработки лекарственных средств для борьбы с данным патогеном.

Ключевые слова: *Candida auris*, рибосома, инфекции, резистентность, криоэлектронная микроскопия, структурная биология

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-8

Введение

Candida auris является патогенным грибом, способным вызывать инфекции у людей, особенно у пациентов с ослабленной иммунной системой. Одной из особенностей *C. auris* является его устойчивость к широкому спектру антимикробных препаратов, что влечет за собой сложности в лечении инфекций, обусловленных данным патогеном. В связи с его резистентностью и высокой контагиозностью, *C. auris* представляет серьезную угрозу для здоровья населения [1]. Рибосома, как одна из ключевых молекулярных мишеней, критически необходима для выживания и развития этой инфекции. В связи с этим поиск видоспецифичных низкомолекулярных ингибиторов рибосомы *C. auris* является клинически-значимой задачей. Для определения уникальных сайтов связывания ингибиторов рибосомы необходима трехмерная атомарная модель.

Используя криоэлектронную микроскопию и метод анализа отдельных частиц мы впервые получили трехмерную структуру рибосомы *C. auris* с разрешением 2,8 Å. Детальный анализ структуры с использованием UCSF Chimera позволил обнаружить ранее неизвестные конформационные изменения в рибосоме *C. auris*, которые могут быть связаны с механизмами резистентности к антибиотикам. Мы описываем архитектуру рибосомальной РНК, а также ее интересные особенности. Эти находки предоставляют ценную информацию

для разработки более эффективных стратегий борьбы с *C. auris* и улучшения прогноза заболеваний, связанных с этим патогеном.

Наше исследование подчеркивает важность электронной микроскопии в изучении структурных и функциональных характеристик рибосомы *C. auris*. Полученные результаты способствуют дальнейшему пониманию этого патогена и могут быть использованы в разработке новых стратегий лечения инфекций, вызванных *C. auris*.

Материалы и методы

Очистка рибосом. 80S-рибосомы *C. auris* очищали, следуя ранее опубликованному протоколу [2]. Клетки растили в колбах в среде дрожжевой экстракт-пептон-декстроза (yeast extract peptone dextrose, YPD) при 30°C. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали с YPD и инкубировали в колбах при интенсивном встряхивании (250 об./мин) в течение 10 мин. Клетки осаждали и трижды промывали в буфере М (30 мМ HEPES-КОН (pH 7,5), 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 8,5% маннит, 2 мМ дитиотреитола (ДТТ) и 0,5 мМ ЭДТА). Суспензию клеток механически разрушали стеклянными шариками (Sigma-Aldrich, США) на вортексе с частотой 40 Гц в течение 1 мин с 1-минутными перерывами на льду между каждым встряхиванием. Стеклянные шарики удаляли быстрым центрифугированием (20 000 г в течение 2 мин), а лизат

дополнительно очищали более длительным центрифугированием (30 000 g в течение 9 мин). Затем добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) 20000 (Hampton Research, США) до конечной концентрации 4,5% (масса/объем), и раствор оставляли стоять на льду в течение 5 мин. Раствор осветляли центрифугированием (20 000 g, 5 мин). Затем концентрацию ПЭГ 20000 доводили до 8,5% и раствор оставляли на 10 мин на льду. Рибосомы осаждали (17 500 g в течение 10 мин) затем суспендировали в буфере М+ (буфер М, содержащий KCl в концентрации 150 mM, с добавлением ингибиторов протеаз и гепарина).

Далее рибосомы очищали в градиенте сахарозы от 10 до 30%, а после отбирали соответствующие фракции и добавляли ПЭГ 20000 до конечной концентрации 7% (масса/объем). Рибосомы осаждали (17 500 g в течение 10 мин.) и суспендировали в буфере G (10 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 50 mM KOAc, 10 mM NH₄OAc, 2 mM DTT и 5 mM Mg(OAc)₂).

Криоэлектронная микроскопия: замораживание сеток и обработка изображений. Образец очищенной рибосомы с концентрацией ~1 мг/мл по 2,7 мкл наносили на углеродные сетки (Quantifoil Cu R1.2/1.3 с ультратонкой углеродной подложкой, 200 меш; Quantifoil, Германия), избыток жидкости удаляли в течение 3–5 с помощью FEI Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США), и замораживали погружением в жидкий этан. Подготовленные сетки переносили в микроскоп Talos Arctica 200 кэВ (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный детектором прямых электронов K2. Изображения с нулевыми потерями записывались полуавтоматически с использованием скрипта UCSF Image. Квантовый энергетический фильтр GIF был настроен на ширину щели 20 эВ. Изображения были получены при различном номинальном увеличении с размером пикселя от

0,413 до 1,012 Å и с диапазоном дефокуса от -0,5 до -3,0 мкм. Видеоизображения были собраны с 24 кадрами, фракционированными по дозе в течение 18 с.

Обработка данных. После выполнения процедур коррекции подвижек и оценки функции переноса контраста в программном комплексе CryoSPARC [3], была произведена отбраковка микрографов по значениям функции переноса контраста и общей величины подвижек. Выборка частиц наилучшего качества производилась путем генерации двумерных классов. Дальнейшая отфильтровка производилась путем генерации трехмерной реконструкции с разделением на два пространственных объекта. Финальная реконструкция была произведена по протоколу Non-uniform refinement в программном комплексе CryoSPARC с финальным разрешением 2,8 Å.

Моделирование. Структура рибосомы 80S *Candida albicans* использовалась в качестве шаблона для построения модели. Сопоставление модели с картой было выполнено в Chimera [4]. Субъединицы 60S и 40S были уточнены отдельно в их соответствующих сфокусированных картах с использованием уточнения Phenix [5] в прямом пространстве. Цепи белков и рРНК визуально проверяли в Coot и при необходимости корректировали вручную.

Результаты и обсуждение

При создании модели рибосомы *C. auris* использовалась ранее полученная модель *C. albicans* (7PZY), что позволило выявить ряд интересных особенностей полученной структуры рибосомы. Биоинформатический анализ рибосомальных белков *C. albicans* и *C. auris* показал, что они не имеют значительных отличий и обладают высокой гомологией. Однако, несмотря на ожидаемую высокую консервативность рибосомальной РНК в пределах

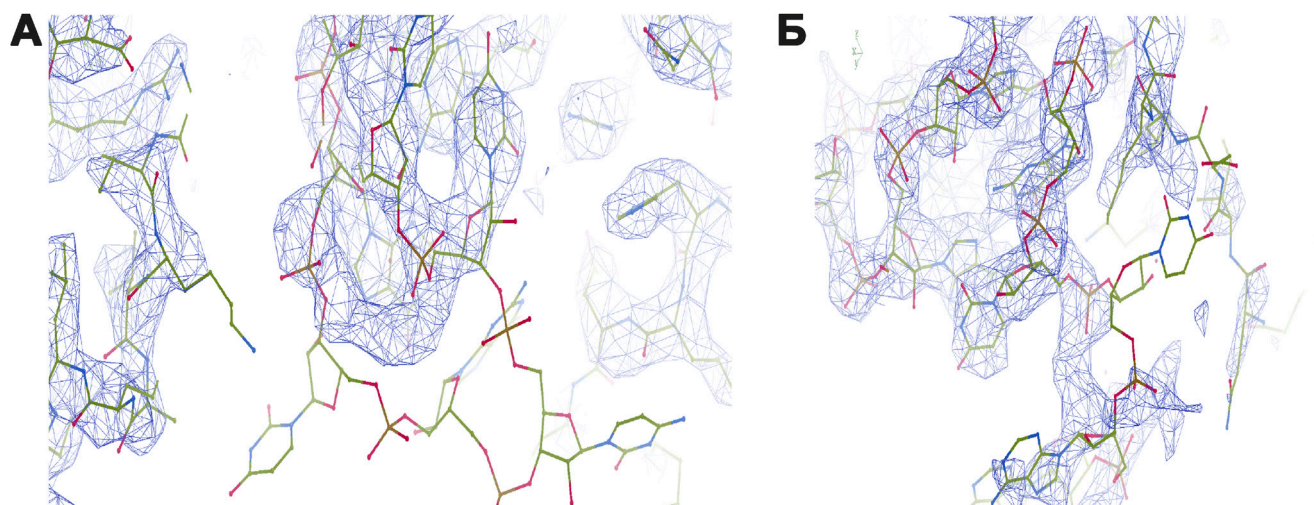


Рисунок. Сравнение 25S рРНК *Candida albicans* с картой плотности для рРНК *Candida auris*. А — отсутствие плотности для некоторых нуклеотидов, указывающая на делецию в цепи рРНК *C. auris*; Б — плотность, несоответствующая геометрии цепи РНК, указывающая на изменение конфигурации цепи рРНК *C. auris*.

одного вида, сравнение рРНК *C. albicans* с картой плотности для рРНК *C. auris* выявило наличие некоторых отличающихся участков.

Значительных отличий у 5.8S и 5S рРНК у *C. albicans* и *C. auris* не выявлено, но 25S рРНК у *C. auris* имеет некоторые особенности (рисунок). Наблюдается отсутствие плотности для некоторых нуклеотидов (рисунок, А), из чего можно предположить, что последовательность рРНК *C. auris* короче таковой у *C. albicans*. Так же было выявлено изменение геометрии некоторых участков (рисунок, Б), что может влиять на взаимодействие рРНК с рибосомальными белками или химическими соединениями, играющими роль ингибиторов рибосомы.

На данный момент рибосомальная РНК *C. auris* не была полностью расшифрована, что ограничивает наши возможности сделать окончательные выводы о характеристиках и влиянии найденных особенностей рРНК на резистентность этого патогена. Изучение и расшифровка рибосомальной РНК *C. auris* может предоставить более глубокое понимание ее структурных и функциональных особенностей, а также позволить прояснить причины устойчивости этого патогена к противогрибковым препаратам.

Дальнейшие исследования рибосом *C. auris*, включая полное расшифрование его рибосомной

РНК, анализ его белковых компонентов и сравнение с рибосомами других видов *Candida*, могут пролить свет на механизмы устойчивости *C. auris* и помочь развить эффективные стратегии борьбы с этим патогеном.

Заключение

Исследование структуры рибосомы *C. auris* с использованием криоэлектронной микроскопии и анализа отдельных частиц позволило обнаружить конформационные изменения, которые возможно связаны с резистентностью к антибиотикам. Описание архитектуры рибосомы и ее субъединиц предоставляет ценную информацию для борьбы с *C. auris* и улучшения прогноза заболеваний, вызванных этим патогеном. Полученные результаты подчеркивают важность электронной микроскопии для изучения аппарата трансляции этого патогена и могут привести к разработке новых стратегий лечения и предотвращения инфекций, вызванных *C. auris*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-47041). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lockhart S.R., Etienne K.A., Vallabhaneni S., et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):134–140.
2. Zgadzay Y., Kolosova O., Stetsenko A., Wu C., Bruchlen D., Usachev K., Validov S., Jenner L., Rogachev A., Yusupova G., Sachs M.S., Guskov A., Yusupov M. E-site drug specificity of the human pathogen *Candida albicans* ribosome. *Sci. Adv*. 2022;8(21):eabn1062.
3. Punjani A., Rubinstein J., Fleet D., Brubaker M. CryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* 2017;14(3):290–296.
4. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem*. 2004;25(13):1605–1612.
5. Liebschner D., Afonine P.V., Baker M.L., et al. Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol*. 2019;75(10):861–877.

Поступила в редакцию 29.05.2023

После доработки 16.08.2023

Принята в печать 17.08.2023

SHORT COMMUNICATION

Structural study of the *Candida auris* ribosome

A.A. Atamas*, A.I. Guskov, A.V. Rogachev

¹Center for Research on Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases, Moscow University of Physics and Technology, 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, 141701, Moscow region, Russia

*e-mail: atamas.aa@phystech.edu

Candida auris is a pathogenic fungus that causes infections in people with weakened immune systems. It is resistant to antimicrobial drugs, which complicates treatment. *C. auris* poses a serious threat to public health, as it has a high resistance and contagiousness. The ribosome plays an important role in the survival and development of this infection, and the search for inhibitors

of the *C. auris* ribosome is of great importance. We used cryoelectron microscopy and single particle analysis to obtain the three-dimensional structure of the *C. auris* ribosome. We describe the architecture of the ribosome subunits and their interactions, providing valuable information for the development of novel anti-fungals against *C. auris*.

Keywords: *Candida auris*, ribosome, infections, resistance, cryo-electron microscopy, structural biology

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 20-64-47041.

Сведения об авторах

Атамас Анастасия Алексеевна — аспирантка, мл. науч. сотр. Центра исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: atamas.aa@phystech.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7884-7653>

Гуськов Альберт Игоревич — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией структурной электронной микроскопии биологических систем. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: a.guskov@rug.nl

Рогачев Андрей Вячеславович — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр., зам. директора центра молекулярных механизмов старения. Тел.: 8-495-408-45-54; e-mail: rogachev.av@phystech.edu

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.322.54

Криоэлектронная микроскопия на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова

А.В. Моисеенко¹ , А.М. Егоров², К.В. Шайтан³ , О.С. Соколова^{3,*}

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

²Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 11;

³Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 73

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Продемонстрирован пример успешной модернизации аналитического просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 до криоэлектронного микроскопа низкого разрешения, предназначенного для решения задач отработки пробоподготовки и оценки качества препарата. В результате модернизации прибор позволяет получать субнанометровое разрешение реконструкций белковых молекул (в пределах 8 Å). Обсуждается влияние подложек из графена и аморфного углерода для предотвращения эффекта преимущественной ориентации белковых частиц в замороженном образце.

Ключевые слова: криоэлектронная микроскопия, структурная биология, анализ единичных частиц, модернизация оборудования, структура, вирус, нуклеосома

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-9

Введение

Криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) наряду с рентгеноструктурным анализом и спектроскопией ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) является одним из основных методов в структурной биологии. На сегодняшний момент криоЭМ позволяет получать экспериментальные данные о трехмерной организации биологических макромолекул с атомным разрешением [1, 2]. КриоЭМ интенсивно развивается с 2013 г. благодаря появлению быстрых детекторов прямой регистрации электронов (Direct Detector). Количество атомных структур в Protein Data Bank, получаемых ежегодно с помощью криоЭМ, растет в геометрической прогрессии [3], а в 2017 г. создатели основных методов криоЭМ были удостоены Нобелевской премии [4]. КриоЭМ позволяет исследовать макромолекулы, комплексы макромолекул, вирусные частицы и клеточные структуры в нативном состоянии, в то время как другие методы имеют в этой области серьезные ограничения [5].

Для получения экспериментальных данных с высоким разрешением в криоЭМ необходим

просвечивающий криоэлектронный микроскоп, обладающий следующими особенностями. Прежде всего, такой микроскоп должен иметь возможность непрерывно поддерживать температуру образца ниже -170°C в течение всего эксперимента [6]. В противном случае, в аморфном льду начнется кристаллизация, в результате которой рассеяние электронов на кристаллах льда затруднит получение изображений исследуемых объектов, а сами объекты могут потерять нативную структуру. Также в течение всего эксперимента образец должен быть изолирован от атмосферной влаги во избежание ее конденсации на поверхности холодного препарата. Для этого вся пробоподготовка проводится либо в жидком азоте, либо вблизи его поверхности, а вакуумная система микроскопа должна поддерживать давление ниже 10^{-5} Па в течение всего эксперимента [7]. Дополнительно для предотвращения конденсации вблизи объекта в криоэлектронном микроскопе расположены криосорбционные пластины, охлаждаемые жидким азотом до более низкой температуры, чем образец.

Второй особенностью высокоразрешающего криоэлектронного микроскопа является быстрый детектор электронов в сочетании с системой контроля дозы облучения образца [8]. Биологические препараты чрезвычайно чувствительны к облучению электронами, поэтому даже небольшая электронная доза приводит к существенным радиационным повреждениям [9–11]. Эти повреждения выражаются как в ухудшении потенциально возможного разрешения трехмерной реконструкции за счет разрушения макромолекул, так и в смещениях образца во время съемки изображений. Детекторы прямого обнаружения электронов (Direct Electron Detectors) позволяют решить обе эти проблемы, снимая с каждого поля зрения последовательности изображений в режиме низкой дозы с очень короткой выдержкой и последующей коррекцией смещений. Специальное программное обеспечение, сочетая управление микроскопом и детектором, позволяет автоматизировать эксперимент для получения больших наборов данных [12].

Для получения данных с высоким разрешением микроскоп должен быть оснащен источником электронов с полевой эмиссией: холодным катодом или катодом Шоттки для обеспечения высокой пространственной и энергетической когерентности электронного пучка, для возможности снимать изображения при типичных для криоЭМ значениях дефокуса от $-0,5$ до $-3,0$ мкм. Также микроскоп должен иметь высокое ускоряющее напряжение: 200 или 300 кВ [13].

Подготовка препаратов для криоЭМ может представлять существенные сложности, требующие специальной пробоподготовки для получения требуемого результата [14]. В связи с этим высокоразрешающий микроскоп целесообразно использовать для получения финального набора данных, в то время как отработку пробоподготовки и оценку качества препарата можно производить на более простом приборе. В настоящей работе продемонстрирован пример успешной модификации аналитического просвечивающего электронного микроскопа до криоэлектронного микроскопа низкого разрешения, предназначенного для решения такого класса задач.

Материалы и методы

Модификация просвечивающего электронного микроскопа

Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Japan) с ускоряющим напряжением 200 кВ и источником электронов на основе катода из гексаборида лантана (LaB_6) был модифицирован для работы в качестве криоэлектронного микроскопа. Вакуумная система этого микроскопа удовлетворяет минимальным требованиям для криоЭМ: поддерживает вакуум $5 \cdot 10^{-6}$ – 10^{-5} Па

с помощью ионно-геттерного насоса и оснащена криосорбционной ловушкой, что существенно ограничивает темпы нежелательной конденсации на поверхности холодного образца.

Микроскоп в процессе модификации был оснащен криотрансферным объектодержателем Elsa (Gatan, США) позволяющим работать с образцами, охлажденными до криотемператур. Образец закрепляется в атмосфере холодного азота для уменьшения контаминации конденсируемой влагой и безопасно переносится внутрь электронного микроскопа, избегая контакта с атмосферным воздухом и нежелательного нагрева. В процессе эксперимента автоматический контроллер поддерживает температуру образца ниже -170°C для предотвращения девитрификации, перекристаллизации льда.

К микроскопу присоединен детектор прямого обнаружения электронов DE-20 (Direct Electron, США). Он позволяет использовать для записи изображений крайне низкую дозу облучения образца, а также имеет возможность сохранять серии изображений – фреймов – с частотой 32 Гц для последующей коррекции дрейфа. Управление детектором и микроскопом, автоматизация сбора данных в режиме низкой дозы осуществляется с помощью программного обеспечения SerialEM [15].

Прибор дополнен минимальным набором оборудования для пробоподготовки: установкой для витрификации образцов в жидком этане EM GP2 (Leica Microsystems, Германия), а также установкой для обработки подложек тлеющим разрядом EasyGlow (Pelco, США).

Получение криоЭМ изображений и построение реконструкций

Для всех представленных ниже препаратов использовался стандартный подход к витрификации: 3 мкл препарата наносились на стандартную медную сеточку, предварительно обработанную тлеющим разрядом 25 мА в остаточной атмосфере в течение 30 с в приборе EasyGlow (Pelco, США). Для препаратов вирусных частиц AR9 и инаktivированного вируса клещевого энцефалита использовались сеточки 300 mesh с дырчатой углеродной подложкой Lacey. Для препаратов нуклеосом были использованы сеточки с дырчатой подложкой Quantifoil R1.2/1.3 (Quantifoil, Германия), а также сеточки с дополнительно нанесенным слоем оксида графена по описанной ранее методике [16]. Для препаратов РНК-полимеразы использовались сеточки 300 mesh Lacey со слоем ультратонкого углерода толщиной 3–5 нм.

После нанесения образец инкубировался 30 с в климатической камере установки для витрификации EM GP2 при температуре 4°C и относительной влажности 95%. Затем каплю необходимо было промокнуть фильтровальной бумагой

Whatman #1 и немедленно заморозить в жидком этане при температуре -180°C . После переноса (криотрансфера) в криоэлектронный микроскоп JEM-2100 производилась серийная съемка с дефокусом в диапазоне от $-0,5$ до $-3,0$ мкм, с суммарной дозой на изображение в диапазоне $50\text{--}100\text{ е/Å}^2$.

Результаты и обсуждение

С помощью метода криоЭМ были получены несколько наборов данных, характеризующих возможности модифицированного микроскопа. Эти наборы включают в себя как отдельные микрографии, позволяющие изучать морфологические особенности препаратов в нативном виде, так и серии изображений для анализа единичных частиц и трехмерной реконструкции.

Для препаратов гигантского бактериофага AR9 были получены отдельные микрографии, позволившие подтвердить сохранность вирионов перед проведением эксперимента на высокоразрешающем криомикроскопе. Подтверждено наличие отдельных штопорообразных фибрилл (рис. 1А), что позволит сравнить их структуру с опубликованной ранее реконструкцией с низким разрешением [17].

Построена трехмерная реконструкция инактивированных вирионов вируса клещевого энцефалита, используемых в качестве вакцины (рис. 1Б). Произведен анализ гетерогенности препарата, подтверждена сохранность более чем 95% вирусных частиц [18]. Разрешение карты плотности, полученной из 5 тыс. проекций отдельных ча-

стиц, составляет 8 Å , что позволило встроить в плотность атомные модели для Е и М белков — структурных компонентов оболочки вируса (PDB5O6A) [19]. Таким образом визуализирована общая структурная организация оболочек инактивированных вирионов, которая в данном случае не отличается от нативных вирусов.

Продемонстрирована возможность использования микроскопа для скрининговых исследований отдельных белковых частиц. В частности, получены трехмерные реконструкции для нуклеосомы (рис. 2А) и для РНК-полимеразы *Escherichia coli* (рис. 2В), в которые вписаны модели PDB 3LZ0 и 7МКР соответственно [20, 21]. Реконструкции построены из 13 тыс. проекций отдельных частиц в случае нуклеосомы и из 35 тыс. проекций в случае РНК-полимеразы. В обоих случаях построение трехмерной реконструкции позволило выявить особенности при подготовке образцов и оптимизировать параметры витрификации. Одной из серьезнейших проблем для получения высоко разрешающих реконструкций в криоЭМ является предпочтительная ориентация [22]. В случае заморозки нуклеосом их адгезия к границе раздела жидкость-газ приводит к появлению предпочтительной ориентации, в результате которой в наборе данных оказываются представлены проекции только вдоль оси сверхспирали. Для решения этой проблемы были изготовлены поддерживающие подложки из оксида графена и оптимизированы параметры заморозки. Большинство нуклеосом электростатически закрепля-

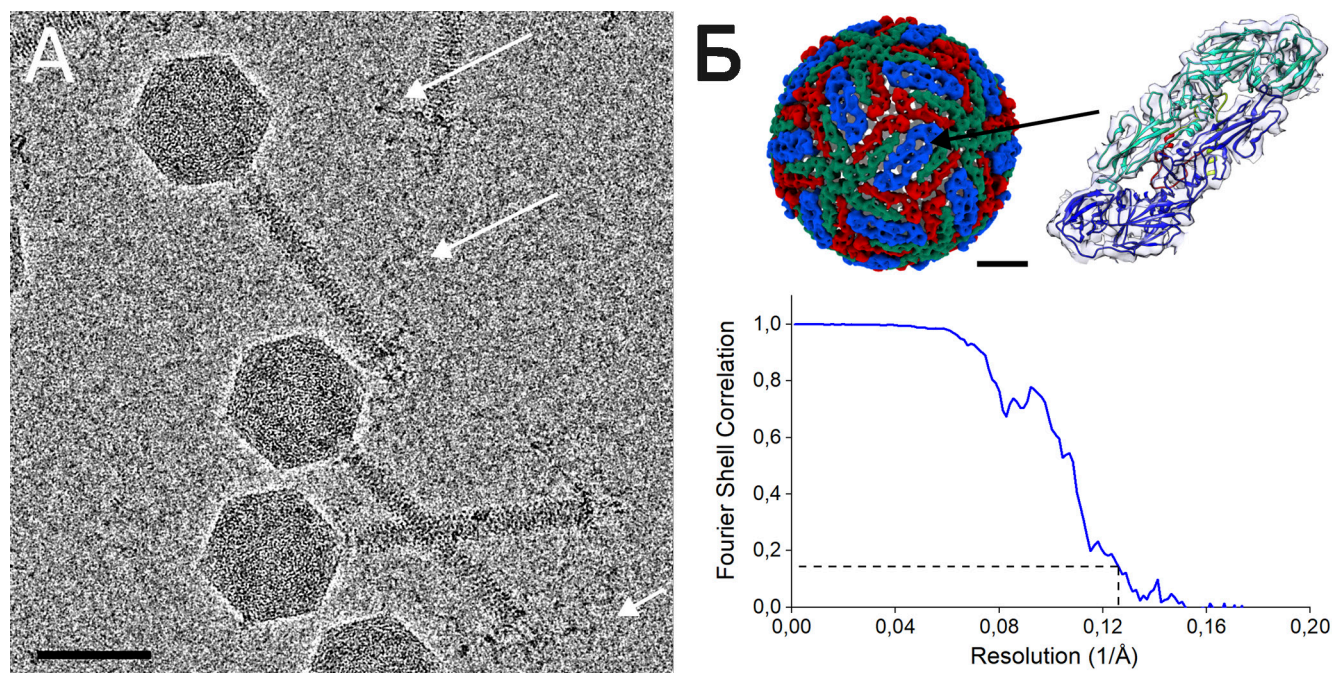


Рис. 1. Изображения и трехмерные реконструкции вирусных частиц, полученные с использованием модифицированного криомикроскопа. А — визуализация штопороподобных фибрилл гигантского бактериофага AR9 (стрелки), масштабный отрезок 100 нм. Б — трехмерная реконструкция (слева) и атомная модель (справа) частицы инактивированной вакцины против вируса клещевого энцефалита [18] (сверху). Масштабный отрезок 10 нм. Кривая оценки разрешения реконструкции по Фурье-корреляции с отсечкой 0,143 (снизу).

ются на поверхность графена, при этом предпочтительная ориентация исчезает (рис. 2Б). Аналогичный эффект наблюдается для препаратов РНК-полимеразы, однако в этом случае витрификация с использованием дополнительных подложек не уменьшает влияние предпочтительной ориентации (рис. 2Г).

Заключение

В настоящей работе продемонстрированы возможности модифицированного микроскопа JEM-2100 для проведения экспериментов с помощью метода криоЭМ. Микроскоп может использоваться для получения изображений широкого спектра витрифицированных биологических препаратов: от крупных вирусных частиц до отдельных белков. Автоматизированные методы сбора и обработки данных позволяют не только анализировать микроморфологию препарата по отдель-

ным изображениям, но и проводить статистическую обработку данных методами анализа единичных частиц, а также строить трехмерные реконструкции белковых комплексов с разрешением до 8 Å.

Модернизация микроскопа проводилась в рамках проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Анализ образцов и получение трехмерных структур вируса клещевого энцефалита выполнен при финансовой поддержке Программы развития МГУ (проект №23А-Ш04-01). Разработка методик измерений нуклеосом производилась при поддержке Российского научного фонда (проект №19-74-30003). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

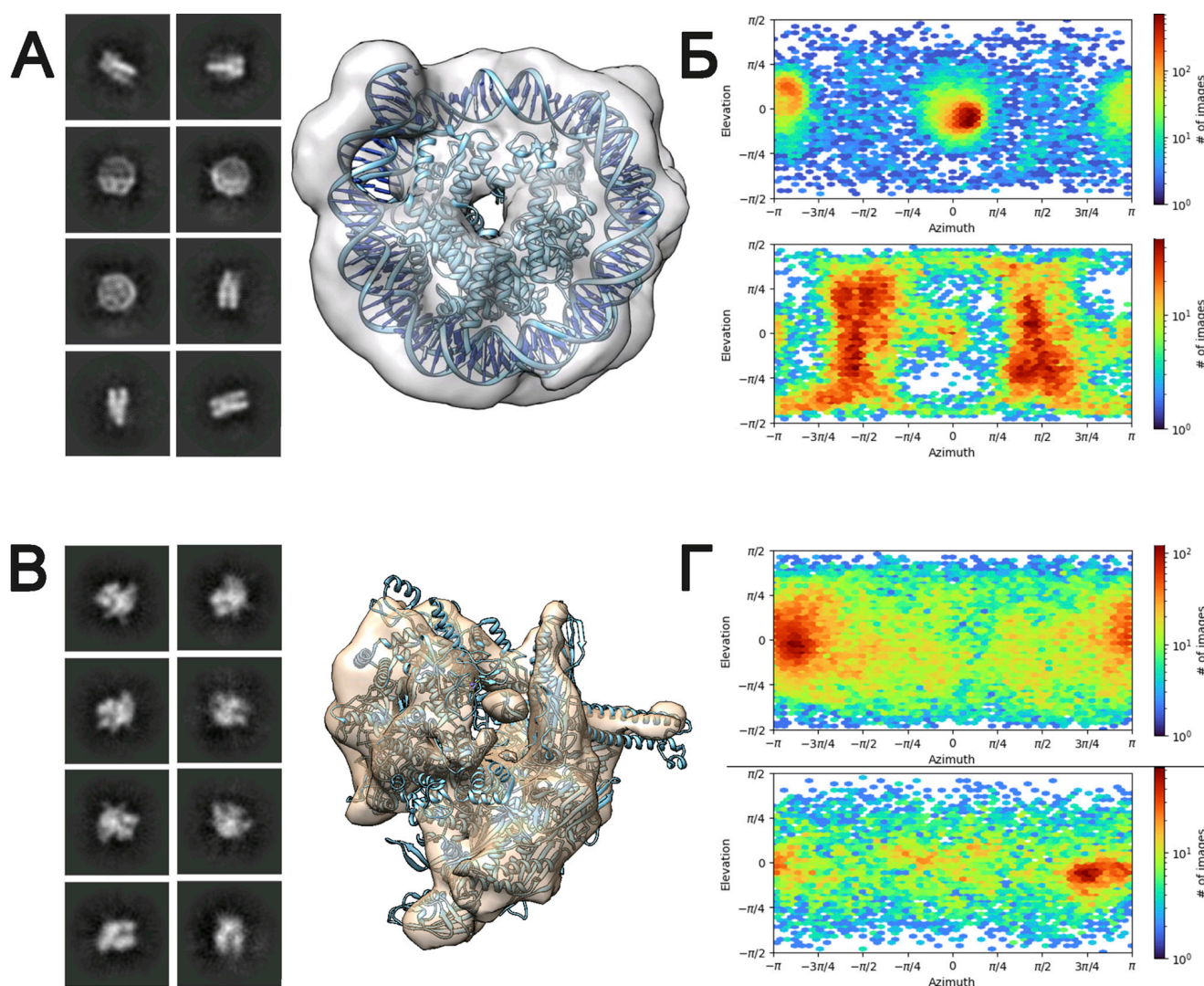


Рис. 2. Реконструкции отдельных частиц, полученные с использованием модифицированного криоэлектронного микроскопа. А — двумерные классовые суммы и трехмерная реконструкция нуклеосомы. Б — распределение проекций нуклеосом по углам Эйлера для препарата, витрифицированного на стандартных подложках Quantifoil (сверху) и на подложках из оксида графена (снизу). В — трехмерная реконструкция и модель РНК-полимеразы *Escherichia coli*. Г — распределение проекций РНК-полимеразы по углам Эйлера на стандартных подложках (сверху) и на ультратонком углероде (снизу).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakane T., Kotecha A., Sente A., et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*. 2020;587(7832):152–156.
2. Yip K.M., Fischer N., Paknia E., Chari A., Stark H. Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*. 2020;587(7832):157–161.
3. Number of Released PDB Structures per Year [Electronic resource]. 2023. URL: <https://www.rcsb.org/stats/all-released-structures> (accessed: 05.07.2023).
4. Cressey D., Callaway E. Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel. *Nature*. 2017;550(7675):167.
5. Glaeser R.M., Nogales E., Chiu W. Single-particle cryo-EM of biological macromolecules. IOP Publishing; 2021. 120 pp.
6. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quart. Rev. Biophys.* 1988;21(2):129–228.
7. Frederik P.M., Busing W.M. Cryo-transfer revised. *J. Microsc.* 1986;144(2):215–221.
8. McMullan G., Faruqi A.R., Henderson R. Chapter one – Direct electron detectors. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:1–17.
9. Glaeser R.M. Retrospective: Radiation damage and its associated “Information Limitations.” *J. Struct. Biol.* 2008;163(3):271–276.
10. Glaeser R.M. Specimen behavior in the electron beam. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:19–50.
11. Campbell M.G., Cheng A., Brilot A.F., Moeller A., Lyumkis D., Veasles D., Pan J., Harrison S.C., Potter C.S., Carragher B., Grigorieff N. Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy. *Structure*. 2012;20(11):1823–1828.
12. Cheng A., Tan Y.Z., Dandey V.P., Potter C.S., Carragher B. Strategies for automated CryoEM data collection using direct detectors. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:87–102.
13. Koh A., Khavnekar S., Yang W., Karia D., Cats D., Van Der Ploeg R., Grollios F., Raschdorf O., Kotecha A., Němeček D. Routine collection of high-resolution cryo-EM datasets using 200 KV transmission electron microscope. *J. Vis. Exp.* 2022;(181):e63519.
14. Passmore L.A., Russo C.J. Specimen preparation for high-resolution Cryo-EM. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Elsevier; 2016:51–86.
15. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 2005;152(1):36–51.
16. Palovcak E., Wang F., Zheng S.Q., Yu Z., Li S., Betegon M., Bulkley D., Agard D.A., Cheng Y. A simple and robust procedure for preparing graphene-oxide cryo-EM grids. *J. Struct. Biol.* 2018;204(1):80–84.
17. Nazarov S. Structure of viral membrane-penetrating machines by electron cryo-microscopy and tomography. 2015; URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/206115> (accessed: 04.07.2023).
18. Moiseenko A.V., Bagrov D.V., Vorovitch M.F., Uvarova V.I., Veselov M.M., Kashchenko A.V., Ivanova A.L., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Size distribution of inactivated tick-borne encephalitis virus particles revealed by a comprehensive physicochemical approach. *Biomedicine*. 2022;10(10):2478.
19. Füzik T., Formanová P., Růžek D., Yoshii K., Niedrig M., Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun.* 2018;9(1):436.
20. Vasudevan D., Chua E.Y.D., Davey C.A. Crystal structures of nucleosome core particles containing the ‘601’ strong positioning sequence. *J. Mol. Biol.* 2010;403(1):1–10.
21. Qayyum M.Z., Molodtsov V., Renda A., Murakami K.S. Structural basis of RNA polymerase recycling by the Swi2/Snf2 family of ATPase RapA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2021;297(6):101404.
22. Glaeser R.M., Han B.G. Opinion: hazards faced by macromolecules when confined to thin aqueous films. *Biophys. Rep.* 2017;3(1–3):1–7.

Поступила в редакцию 06.07.2023

После доработки 11.09.2023

Принята в печать 19.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Cryo-electron microscopy at the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University

A.V. Moiseenko¹ , A.M. Egorov², K.V. Shaitan³ , O.S. Sokolova^{3,*} 

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

²*Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 1–11 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;*

³*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–73 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia*
*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

This paper demonstrates an example of a successful upgrade of a JEOL JEM-2100 analytical transmission electron microscope to a low-resolution cryo-electron microscope designed for routine tasks of sample preparation and quality evaluation. As a result of the upgrade, the

instrument allows the subnanometer resolution of protein molecule reconstructions (within 8 Å). The influence of graphene and amorphous carbon support films to prevent the effect of preferred orientation of protein particles in the frozen sample is discussed.

Keywords: *Cryo-electron microscopy, structural biology, single particle analysis, equipment upgrading, structure, virus, nucleosome*

Funding: The modernization of the microscope was carried out as part of a project of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. The analysis of samples and the acquisition of three-dimensional structures of the tick-borne encephalitis virus were performed with financial support from the Development Program of Moscow State University, project number 23A-SH04-01. The development of nucleosome measurement techniques was conducted with the support of the Russian Science Foundation, project number 19-74-30003.

Сведения об авторах

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>

Егоров Алексей Михайлович — докт. биол. наук, академик РАН, гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: aegorov@enz.chem.msu.ru

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan49@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5137-303X>

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>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 57.086.8

Криоконвейерные протоколы в корреляционной световой и электронной микроскопии: от многоуровневой визуализации до моделирования биофизических эффектов и «криотераностики»

О.В. Градов^{1, 2} 

¹Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова,
Российская академия наук, Россия, 119991, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4;

²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, Российская академия наук,
Россия, 119334, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

*e-mail: o.v.gradov@gmail.com

Данная статья может рассматриваться как технико-методическая заметка, целью которой является внедрение в практику биологических исследований методов криомикроскопии в конвейерном режиме, начиная с малых увеличений и заканчивая пределами увеличения/разрешения сканирующей электронной криомикроскопии (scanning electron cryomicroscopy, CryoSEM). Описываемый протокол может быть применен на образцах с малой сложностью пробоподготовки, без ультратомии и проводки, свойственной методам просвечивающей криоэлектронной микроскопии. В рамках данного протокола анализ образцов производится в единой микрокювете (чипе), последовательно перемещаемой от инструментов оптической микроскопии низкого разрешения (таких, как безлинзовые криомикроскопы) на уровень CryoSEM/CryoESEM (environmental scanning electron microscope – криоэлектронной микроскопии в программируемых средах/атмосферах). Были внедрены и апробированы методы: корреляционной безлинзовой криомикроскопии и CryoSEM (в том числе, с последовательным переходом к микроанализу на волнодисперсионном рентгеновском спектрометре на круге Роуланда); микроскопии и микроинтерферометрии в диапазонах от инфракрасного до дальнего ультрафиолетового. Преимущество протокола криоконвейерного анализа состоит в: обеспечении сохранности образца в единой переносимой кювете при возможности установления пространственной колокализации данных оптической и электронной микроскопии с использованием программного обеспечения для распознавания образов (вплоть до индексирования в лабораторной информационной системе – laboratory information system, LIS) при проведении полного комплекса криомикроскопических изысканий. При этом предоставляется возможность обеспечения комплексного неразрушающего анализа при последовательном исследовании микроскопических систем с возможностью варьирования последующих стадий микроскопии высокого разрешения, в зависимости от результатов, полученных на предшествующих стадиях микроскопии (более низкого разрешения).

Ключевые слова: *CryoSEM, CLEM, CryoCLEM, ESEM, CryoESEM, ASEM, безлинзовая криомикроскопия*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-10

Основной фокус методов исследований в современной структурной биологии смещен в сторону просвечивающей криоэлектронной микроскопии (cryoTEM, transmission electron cryomicroscopy) и электронной криотомографии (cryo-ET, cryogenic electron tomography) на уровень одиночных макромолекул, кристаллов и супрамолекулярных ансамблей, но это не умаляет значения других методов криомикроскопии в науках о жизни (*sensu lato*).

В связи с этим необходимо обеспечение стабильности поддержания температуры в этих методах или сериях методов, связанных в отдельные протоколы криомикроскопии (даже в случаях, когда до криоэлектронной микроскопии сверхвысокого разрешения протоколы не доходят, в силу ограниченности задачи исследований и визуализации более крупными масштабами, свидетельствующими о клеточных изменениях на микроструктурном

уровне, элементарно достигавшемся более 30 лет назад [1]).

К таким методам можно отнести как методы сканирующей криоэлектронной микроскопии (CryoSEM, scanning electron cryomicroscopy), в том числе – с программируемой средой или атмосферой (cryoESEM, cryogenic environmental scanning electron microscopy / cryoASEM, cryogenic atmospheric scanning electron microscopy [2, 3]), так и различные методы оптической криомикроскопии. В качестве примеров широкого распространения и высокой (параллельной или последовательной) интегрируемости методов оптической криомикроскопии, представляющих, по нашему мнению, широкий интерес для биологов [4, 5], можно привести:

1) рамановскую криомикро(спектро)скопию и конфокальную рамановскую криомикроскопию [6, 7];

2) интегрированные методы инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR, fourier-transform infrared spectroscopy) и оптической или лазерной конфокальной сканирующей криомикроскопии [8, 9];

3) многофотонную криомикроскопию [10];

4) интегрированные синхротронные криопротоколы с анализом дифракции синхротронного излучения [11];

5) методы криомикроскопии неоптического спектрального диапазона, в том числе в ультрафиолетовом и вакуумном ультрафиолетовом диапазонах (UV/VUV) [12, 13];

6) криомикроскопию, интегрированную с дифференциальной сканирующей калориметрией (DSC, differential scanning calorimetry) [14];

7) интегрированную криопресервацию в различных средах и криоосмометрию данных сред, в том числе – с картированием состояния образца в данной среде [15–17];

и др.

Учитывая разнообразие и распространение методов оптической микроскопии и их интегрируемость с CryoSEM, как в случае корреляционной световой и электронной криомикроскопии (CryoCLEM, cryogenic correlative light and electron microscopy), так и в последовательных реализациях, нами предложена и позднее испытана система «Криоконвейер» (данное название было новым, так как первая работа с подобным названием для другой системы появилась позже [18]). В рамках данного протокола анализ образцов производится в единой микрокювете-криочипе (в перспективе – «лаборатории на чипе» для ESEM), индексируемой лабораторной информационной системой (LIS, laboratory information system) и последовательно перемещаемой от неразрушающих инструментов оптической микроскопии низкого разрешения (таких, как безлинзовые криомикроскопы) и оптического сверх-

разрешения (некоторые микроинтерферометры и микроскопы типа МИМ с криостолом) на уровень CryoSEM/CryoESEM (в программируемых средах и атмосферах).

В период до 2019 г. был осуществлен ряд попыток реализации этого принципа как по последовательной, так и по параллельной схеме (CryoCLEM). Последняя включала в себя совмещение CryoSEM с оптической микроскопией на микроскопах с криосистемами путем модификации оптической схемы встроенного в колонну оптического микроскопа для позиционирования рентгеновского микроанализатора (какие встраивались также и на полноценных микрозондовых рентгеноспектральных анализаторах Camebax до 1990-х гг.). В частности, были внедрены методы корреляционной безлинзовой криомикроскопии и сканирующей электронной микроскопии (в том числе, с последовательным переходом к микроанализу и YMD (modulated detection methods) – методу трехмерной визуализации на принципах Y-модулированного детектирования); методы криогенной корреляционной электронной и оптической микроскопии в ультрафиолетовом В и С (CryoCUEM – cryogenic correlative ultraviolet and electron microscopy) и инфракрасном (CryoCIEM – cryogenic correlative infrared and electron microscopy) диапазонах соответственно, однако последние оказались малоинформативными для охлаждаемых биологических систем; методы интерферометрии с использованием многолучевого интерферометра отраженного света (на платформе микроинтерферометра МИИ-11 с конструктивными изменениями; разработка не была завершена); инициирована разработка систем CryoCDICEM (схема криогенной корреляционной оптической и электронной микроскопии с использованием оптики Номарского, метод дифференциального интерференционного контраста) на основе оптического тракта инвертированного металлографического микроскопа с приставкой для дифференциального интерференционного контраста и доступным спектрально-светодиодным излучателем (опытно-конструкторские работы не завершены, вследствие уничтожения инфраструктуры, связанного с реорганизацией институтов и передачей площадей) [19].

Преимущество протоколов криоконвейерного микроанализа состоит в обеспечении сохранности образца в единой кювете и возможности установления пространственной колокализации между данными оптической и электронной микроскопии (в том числе, в CLEM и CryoCLEM-режиме), а также в обеспечении при последовательном исследовании структур неразрушающего анализа микроскопических систем (достигаемого также путем использования низковакуумных ASEM/ESEM принципов организации экспери-

ментальной схемы, в противовес применявшимся с 1980-х гг. высоковакуумным и высоковольтным/сверхвысоковольтным техникам криомикроскопического анализа клеток [20, 21]). При этом реализуется варьирование последующих стадий микроскопии высокого разрешения, в зависимости от результата, полученного на предшествующих стадиях микроскопии более низкого разрешения. Схема серийного протокола «Криоконвейер» представлена на рис. 1.

При криоконвейерных измерениях создается иерархическая система данных с различными ко-локализуемыми физическими (оптическими и неоптическими) дескрипторами, характеризующими образец в ходе его анализа, в том числе – в динамике при воздействии электронного либо оптического (ультрафиолетового) пучка на криостатируемый образец. Последнее позволяет отделить по ходу эксперимента следствия термического и нетермического воздействия на образец. Этот подход явно имеет смысл в биофизике, при-

чем не только для «сверхнизкотемпературного», но и для «высокотемпературного» криобиологического интервала.

В частности, возможны и реализуемы на практике способы подачи в камеру CryoCLEM лазерных пучков с заданными длинами волн через иллюминатор встроенного оптического микроскопа, обеспечивающего позиционирование образца для рентгеновского микроанализа (вместо лампы накаливания), что дает возможность оптического воздействия на криопрепарат в задачах моделирования отклика тканей на фотодинамическую терапию и апробации будущих трендов биофотоники и тераностики на клеточном и тканевом уровне организации (что соответствовало задачам, *de facto*, решавшимся коллективом, в котором работал автор). Пример колокализации/корреляции изображений, полученных с использованием двух лазерных источников и сканирующего электронного микроскопа приводится на рис. 2.

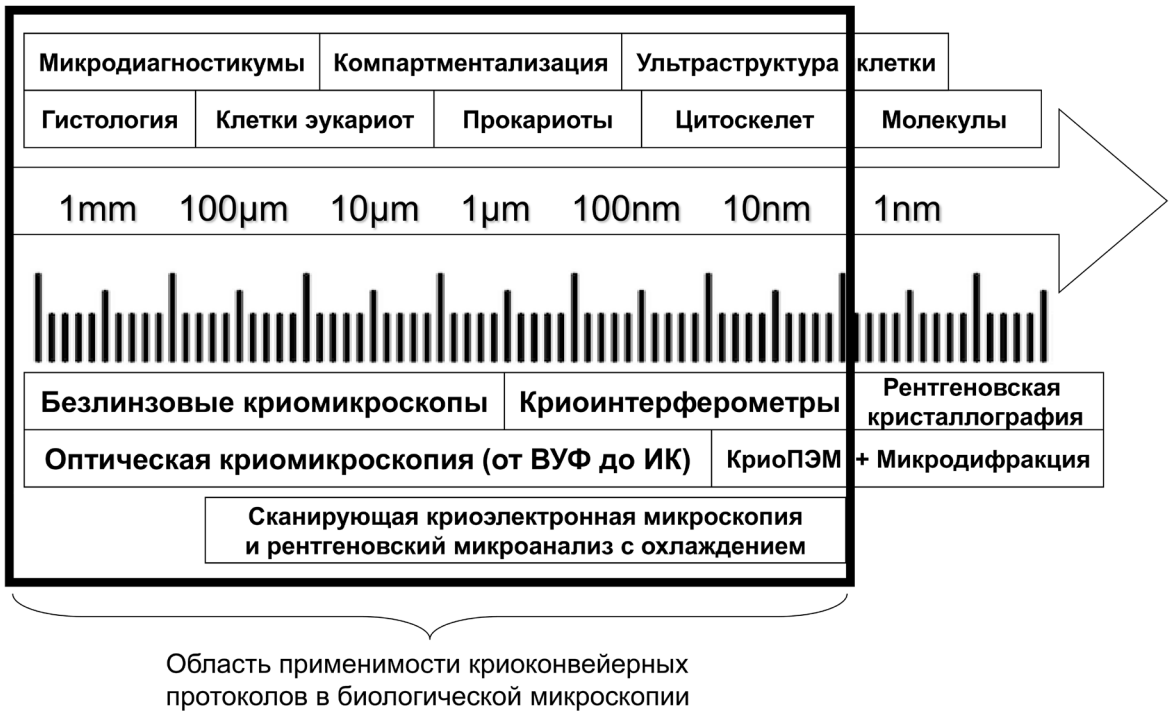


Рис. 1. Применимость различных по пространственному разрешению методов микроскопии в рамках протокола «Криоконвейер», интегрированного с лабораторной информационной системой для обеспечения анализа колокализации и изменений образца во времени и при переносе по линии измерений. Изначально для структур от 1 мм до единиц микрон осуществляется безлинзовая криомикроскопия и обычные криооптические методы микроанализа в охлаждаемой кювете – от инфракрасного до ультрафиолетового диапазона. В диапазоне размеров порядка десятков микрометров и менее становится актуальной SEM (scanning electron microscopy, сканирующая электронная микроскопия)/CryoSEM (включая включая рентгеновский микроанализ с охлаждением – CryoEDX, регистрацию токов, наведенных электронным пучком, с охлаждением – CryoEBIC и трехмерно-отображающий комплекс методов Y-модулированного детектирования, YMD (Y-modulated detection methods) в криогенной микроскопии – CryoYMD), реализуемая на том же образце. В диапазоне много менее микрона целесообразным является коррелирование данных CryoSEM с данными криоинтерференционных техник/«криомикроинтерферометрии», используемыми, например, для анализа поверхностных свойств биологических клеток (например, микрошероховатости и наношероховатости в статическом криофиксированном состоянии, что при сопоставлении с методами YMD/CryoYMD заменяет современные методы профилометрии и зондовой микроскопии). В области перекрытия с диапазоном CryoTEM (transmission electron cryomicroscopy просвечивающей криоэлектронной микроскопии) этот комплекс методов («Криоконвейер») не является актуальным, так как чип, в котором может осуществляться исследование, а также способы пробоподготовки для TEM и SEM качественно отличаются, как и характерные размеры образца.

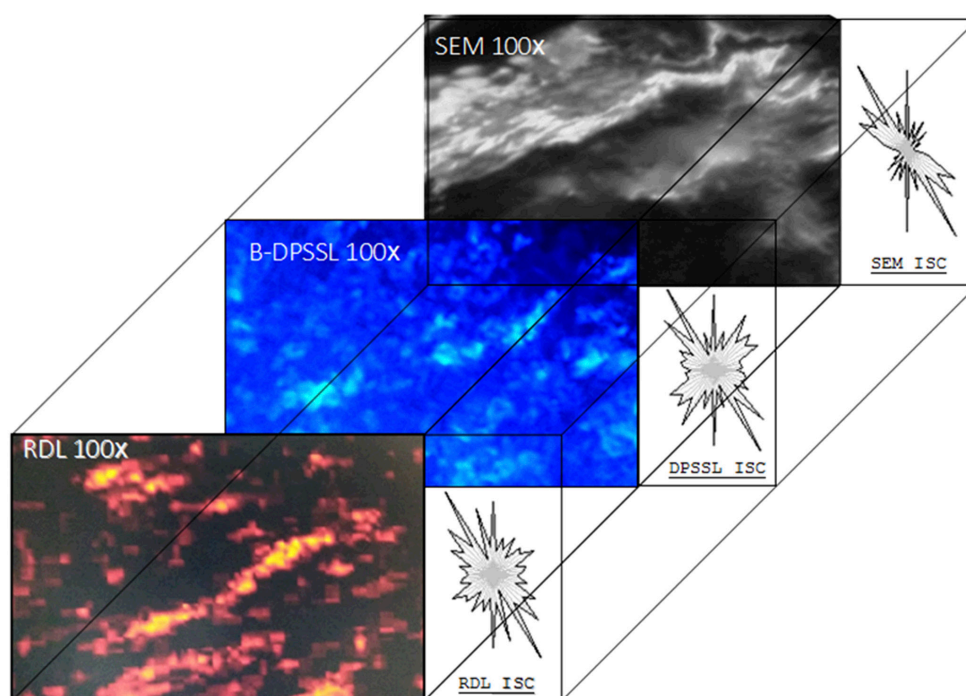


Рис. 2. Пример поиска-выявления идентичных структур и установления колокализации их на электронной микрофотографии и двух оптических изображениях. В отличие от старых лазерных источников, компактные красные диодные лазеры ($\lambda = 635$ нм, на рисунке — RDL) и твердотельные фиолетовые лазеры с диодной накачкой ($\lambda = 405$ нм, на рисунке — B-DPSSL), используемые в флуоресцентных методах визуализации, удобно интегрировать с оптическими микроскопами и камерами в CryoSEM. Для установления соответствия микроизображений сканирующей электронной (SEM) и оптической микроскопии можно пользоваться методами корреляционно-спектрального анализа: рядом с сопоставляемыми микрофотографиями приведены их ISC (integral spatial characteristics, интегральные пространственные характеристики), полученные на основе двумерного преобразования Фурье (2D FFT, 2D fast Fourier transform). Можно видеть, что ориентации структур на данных микрофотографиях подобны, как следует из эмуляции дифракции лазерного пучка на них.

Для установления соответствия микроизображений сканирующей электронной и оптической микроскопии можно пользоваться методами корреляционно-спектрального анализа: рядом с сопоставляемыми микрофотографиями приведены их ISC (integral spatial characteristics, интегральные пространственные характеристики), полученные на основе двумерного преобразования Фурье (2D FFT, 2D fast Fourier transform). Можно видеть, что ориентации структур на микрофотографиях (рис. 2) подобны, как следует из эмуляции дифракции лазерного пучка на них. С позиций многоканального корреляционно-спектрального анализа изображений, это говорит о правдоподобии гипотезы о соответствии структур на коррелируемых таким образом изображениях. Полное соответствие при этом недостижимо, в силу различно-

сти спектральных свойств образцов в используемых спектральных диапазонах.

Более подробное изложение аннотированных в данном кратком сообщении методов и техник планируется в статьях автора ближайших лет.

Работа выполнена без финансовой поддержки от государственных фондов за счет собственных средств автора. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов и благодарит коллег и студентов из МГУ, Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семенова и Института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН за участие в апробации методов корреляционной микроскопии и криомикроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holt W.V., Head M.F., North R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 1992;46(6):1086–1094.
2. Gradov O.V., Gradova M.A. Cryo-electron microscopy as a functional instrument for systems biology, struc-

tural analysis and experimental manipulations with living cells. A comprehensive analytical review of the current works. *Probl. Cryobiol. Cryomed.* 2014;24(3):193–211.

3. Gradov O.V., Gradova M.A. Methods of electron microscopy of biological and abiogenic structures in artificial gas atmospheres. *Surf. Eng. Appl. Electrochem.* 2016;52:117–125.

4. Hauptmann A., Hoelzl G., Loerting T. Optical cryomicroscopy and differential scanning calorimetry of buffer solutions containing cryoprotectants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;163:127–140.
5. Stott S.L., Karlsson, J.O. Visualization of intracellular ice formation using high-speed video cryomicroscopy. *Cryobiology.* 2009;58(1):84–95.
6. Terada N., Ohno N., Saitoh S., Ohno S. Application of “*in vivo* cryotechnique” to detect erythrocyte oxygen saturation in frozen mouse tissues with confocal Raman cryomicroscopy. *J. Struct. Biol.* 2008;163(2):147–154.
7. Yu G., Li R., Hubel A. Raman Cryomicroscopic Imaging and Sample Holder for Spectroscopic Subzero Temperature Measurements. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 2180. Eds.: W.F. Wolters and H. Oldenhof. N.Y.: Humana; 2021:351–361.
8. Tanino K., Liu J., Kobayashi S., Kawamura Y., Borondics F., Uemura M. Using synchrotron FTIR and confocal cryomicroscopy to explore mechanisms of cold acclimation and freezing resistance using a single cell layer of *Allium fistulosum* L. *Plant and Microbe Adaptations to Cold in a Changing World*. Eds. R. Imai, M. Yoshida and N. Matsumoto. N.Y.: Springer; 2013:165–177.
9. Wolters W., Diekmann U., Mueller T., Spindler R., Glasmacher B. Cryomicroscopy and FTIR studies on mouse embryonic fibroblast feeder cells during cryopreservation. *Hum. Gene Ther.* 2009;20(11):1434.
10. König K., Uchugonova A., Breunig H.G. High-resolution multiphoton cryomicroscopy. *Methods.* 2014;66(2):230–236.
11. Buleon A., Bizot H., Le Bail P., Paris M., Putaux J.L. New approaches to starch structure including cryomicroscopy and synchrotron diffraction. *2001 IFT Annual Meeting (New Orleans, Louisiana, U.S.A., June 23–27, 2001). Technical Program & Book of Abstracts*. Institute of Food Technologists. 2001.
12. Rousseau A., Valvin P., Desrat W., Xue L., Li J., Edgar J.H., Cassabo G., Gil B. Bernal boron nitride crystals identified by deep-ultraviolet cryomicroscopy. *ACS Nano.* 2022;16(2):2756–2761.
13. Valvin P., Pelini T., Cassabo G., Zobelli A., Li J., Edgar J.H., Gil B. Deep ultraviolet hyperspectral cryomicroscopy in boron nitride: Photoluminescence in crystals with an ultra-low defect density. *AIP Adv.* 2020;10(7):075025.
14. Mehl P.M. Cryomicroscopy as a support technique for calorimetric measurements by DSC for the study of the kinetic parameters of crystallization in aqueous solutions: Part 1. Nucleation in the water-2-propanediol system. *Thermochim. Acta.* 1992;203:475–492.
15. Müller T., Guggenheim R., Düggelin M., Lüönd G. Online cryopreparation and cryomicroscopy in SEM with SCU 020. *Electron Microscopy 1986. Proc. XIth Congr. Electron Microscopy*. Ed. H. Imura, S. Maruse and T. Suzuki. Japanese Society of Electron Microscopy; 1986:2233–2234.
16. Liu Z. *An integrated finite element modeling / cryomicroscopy investigation of osmotic environment and ice structure during freezing of tissues*. University of Calgary (Canada). 2003. doi: 10.11575/PRISM/21558.
17. Cosman M.D., Toner M., Kandel J., Cravalho E.G. An integrated cryomicroscopy system. *Cryo-Lett.* 1989;10(1):17–38.
18. Katiyar N.K., Biswas K., Tiwary CS. Cryomilling as environmentally friendly synthesis route to prepare nanomaterials. *Int. Mater. Rev.* 2021;66(7):493–532.
19. Gradov O.V. Novel perspectives for CLEM techniques in multiparametric morphology protocols. *Int. J. Biomed.* 2019;9(Suppl. 1):35. <https://ssrn.com/abstract=3457825>
20. O'Toole E., Kremer J., McIntosh J.R. HVEM cryomicroscopy of human blood-platelets. *Mol. Biol. Cell.* 1992;3:A63.
21. O'Toole E., Wray G., Kremer J., McIntosh J.R. High voltage cryomicroscopy of human blood platelets. *J. Struct. Biol.* 1993;110(1):55–66.

Поступила в редакцию 09.07.2023

После доработки 25.09.2023

Принята в печать 26.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Cryoconveyor protocols in correlation light and electron microscopy: From multilevel imaging to modeling of biophysical effects and “cryotheranostics”

O.V. Gradov 

¹N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
4–1 Kosygina, Moscow, 119991, Russia

²Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina st., Moscow, 119334, Russia
*e-mail: o.v.gradov@gmail.com

This paper is a technical and methodological note, the purpose of which is to introduce into the practice of biological research methods of cryomicroscopy in a conveyor mode, starting from small magnifications and ending with the limits of magnification/resolution of scanning electron cryomicroscopy. The protocol described can be applied to the samples with low sample preparation complexity without ultratotomy or the sample processing typical for

transmission electron microscopy methods. According to this protocol samples are analyzed in a single microcuvette (chip) indexed by laboratory information management system and sequentially moved from the non-destructive low-resolution optical microscopy instruments (such as lensless cryomicroscopes) and optical super-resolution methods (some microinterferometers and MIMs with cryotables) to the CryoSEM/CryoESEM level (in programmable environments and atmospheres). Methods of correlation lensless cryomicroscopy and scanning microscopy (including those with the subsequent transition to microanalysis) were introduced; CryoCUEM and CryoCIREM methods in the ultraviolet and infrared range, respectively; microinterferometry methods using a multi-beam reflected light interferometer (based on the MII-11 platform with several changes); the development of CryoCDICEM systems based on the optical path of an inverted metallographic microscope with a DIC attachment and a LED emitter was also initiated. The advantages of cryoconveyor analysis protocols are ensuring the sample safety in a single cuvette-chip and the possibility of establishing spatial colocalization between the data of optical and electron microscopy (including in the CLEM/CryoCLEM mode), as well as providing a comprehensive non-destructive sample analysis in the sequential study of the microscopic systems with the possibility of varying the subsequent stages of high-resolution microscopy, depending on the results obtained at the previous stages of lower resolution microscopic studies.

Keywords: *CryoSEM, CLEM, CryoCLEM, ESEM, CryoESEM, ASEM, lens-less cryomicroscopy*

Funding: This research was completed without financial support of company, organization or foundation.

Сведения об авторах

Градов Олег Валерьевич — ст. науч. сотр. отдела динамики химических и биологических процессов ФИЦ ХФ РАН; инженер Лаборатории физико-химических основ рецепции ИБХФ РАН. Тел.: 8-915-492-29-43; e-mail: o.v.gradov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5118-6261>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 544.777

Реологические свойства полисахаридных гидрогелей альгината с малыми добавками нанотрубок галлуазита для экструзионной 3D-печати

В.С. Молчанов^{*} , С.А. Глухова, О.Е. Филиппова 

Кафедра физики полимеров и кристаллов, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1, стр. 2

**e-mail: molchan@polly.phys.msu.ru*

Исследованы реологические свойства гидрогелей природного полисахарида альгината натрия при наполнении матрицы нанотрубками глины галлуазита в малых концентрациях. Выявлены изменения реологических свойств при переходе от полуразбавленного раствора полимера к гидрогелю при сшивании ионами кальция. В состоянии геля образцы обладают пределом текучести, и их вязкость при течении падает при увеличении скорости сдвига, но реологические свойства достаточно быстро восстанавливаются после снятия нагрузки. Обнаружено, что добавление до 0,3 об.% нанотрубок природной глины галлуазита приводит к увеличению модуля упругости и предела текучести гидрогеля в несколько раз, но при этом сохраняются практически важные свойства псевдопластичности и быстрого восстановления свойств после снятия нагрузки, что делает нанокompозитные гидрогели альгината и нанотрубок галлуазита перспективными для применения в качестве чернил для экструзионной 3D-печати.

Ключевые слова: реология, вязкоупругость, гидрогель, галлуазит, альгинат, сетки

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-11

Введение

Трехмерная (3D) печать, также известная как аддитивное производство или быстрое прототипирование, является передовым способом создания объектов заданной формы для огромного числа приложений [1–4]. Она состоит в послойном управляемом изготовлении 3D-объектов по заранее определенным цифровым моделям путем постепенного добавления материалов (чернил) [5, 6].

Особый интерес представляет 3D-печать с использованием биосовместимых и биоразлагаемых компонентов, например полисахаридных гидрогелей [7–11]. Однако однокомпонентные гидрогели, например на основе альгината натрия, имеют недостаточно высокие значения предела текучести и модуля упругости, ограничивающие их применение [12, 13]. Одним из перспективных способов решения этой проблемы является использование нанокompозитных гелей с небольшой долей наполнителя, который может не только упрочнять гель, но и придавать ему новые функциональные свойства [14, 15]. Например, полый наполнитель — нанотрубки (НТ) природной глины галлуазита — может быть использован как наноконтанер, обеспечивающий инкапсулирова-

ние активных веществ в гидрогель и их пролонгированное выделение [16, 17].

Одним из наиболее доступных способов 3D-печати гидрогелями является экструзионная печать. Для ее успешного применения гидрогели должны обладать определенными реологическими характеристиками. В покое гидрогели должны иметь довольно высокие значения модуля упругости и предела текучести, чтобы из них можно было создавать крупные объекты [5]. При этом при экструзии гидрогель должен переходить в вязкотекучее состояние, чтобы его можно было нанести на поверхность [18]. Однако после нанесения материал должен достаточно быстро восстанавливать исходные свойства, чтобы чернила не растекались [5].

Ранее было описано влияние добавления относительно большого количества НТ галлуазита в сшитые гели альгината, где НТ образовали собственную трехмерную структуру [19]. В данной работе мы опишем влияние добавления малого количества НТ (намного ниже порога перколяции) на реологические свойства гелей «в покое» и при течении, чтобы оценить перспективы их использования в качестве чернил для 3D-печати.

Материалы и методы

Материалы. Альгинат натрия (Sigma-Aldrich, США) использовался без дальнейшей очистки. Ранее показано, что исследуемый альгинат натрия содержит 65 моль% гулурановой кислоты (G) и 35 моль% маннурановой (M) кислоты со следующим содержанием блока: 45 моль% блоков GG, 15 моль% блоков MM, 40 моль% чередующихся блоков GM/MG [20]. Молекулярная масса полимера равна 220000 г/моль [20]. В качестве сшивателя альгината натрия использовали соль CaCl_2 (Sigma-Aldrich, США). Во всех образцах поддерживали $\text{pH} = 7$, чтобы обеспечить наличие заряженных карбоксильных групп альгината, за счет которых происходит сшивание цепей двухвалентными ионами [21].

В качестве наполнителя использовали НТ галлуазита (Sigma-Aldrich, США). Они представляют собой природный алюмосиликатный глинистый минерал в форме НТ, имеющих многослойные стенки и полость в середине [22]. По оценкам, полученным на основе данных просвечивающей электронной микроскопии [20], средний наружный диаметр составляет около 50 нм, а средняя длина — 1000 нм. Плотность НТ составляет 2,53 г/см³ [22].

Метод. Реологические свойства растворов и гелей были исследованы на реометре Anton Paar Physica MCR 301 (Anton Paar, Австрия) с использованием ячейки плоскость-плоскость диаметром 25 мм, зазор 1 мм. В статическом режиме к образцу прикладывали напряжение сдвига от 0,01 до 500 Па и измеряли скорость деформации от 0,0006 до 100 с⁻¹. Предел текучести определяли при аппроксимации кривых течения моделью Гершеля-Балкли. При динамических испытаниях получали

компоненты упругого отклика (модуль накопления G' и неупругого отклика (модуль потерь G''). Измеряли зависимости модулей от амплитуды деформации при фиксированной частоте 10 рад/с и зависимости от частоты при фиксированной амплитуде 1%, соответствующей области линейного вязкоупругого отклика. Для исследования восстановления структуры проводили интервальные измерения вязкости при высокой скорости деформации 100 с⁻¹ в течение минуты, затем при малой скорости деформации 0,1 с⁻¹ в течение минуты. Эксперименты проводили при 25°C.

Результаты и обсуждение

Раствор альгината натрия. Были приготовлены растворы 2,7 вес.% альгината натрия в воде при концентрации выше концентрации перекрывания клубков полимера 1,5 вес.% (полуразбавленный раствор), чтобы создать сетку переплетенных цепей [20]. Из рис. 1А видно, что вязкость такого раствора 0,5 Па·с, т.е. в 500 раз выше вязкости воды, так как зацепления макромолекул препятствуют их течению. Вязкость слабо зависит от скорости сдвига. Также стоит отметить, что уже при небольших напряжениях сдвига ниже 0,1 Па скорость течения раствора значительная, т.е. раствор проявляет типичное ньютоновское поведение (рис. 1А).

При кратковременном гармоническом воздействии с частотой 10 рад/с были получены значения модуля накопления и потерь (рис. 1Б) при разных амплитудах воздействия. Видно, что значения модуля накопления невысокое (0,2–0,4 Па) и на порядок ниже значений модуля потерь. Преобладание модуля потерь указывает на вязкий отклик раствора.

Таким образом, до сшивания полуразбавленный раствор альгината натрия находится в вязко-

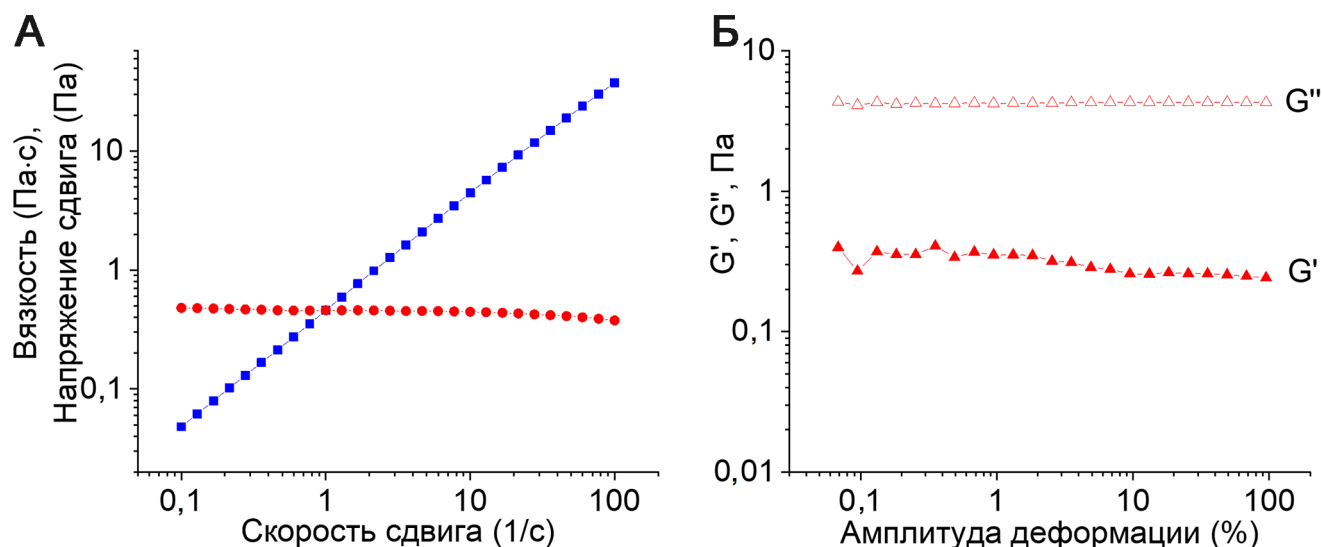


Рис. 1. Реологические свойства растворов альгината натрия без сшивателя. (А) Зависимости вязкости (красные круги) и напряжения сдвига (синие квадраты) от скорости сдвига. (Б) Зависимости модуля накоплений G' (закрашенные символы) и модуля потерь G'' (пустые символы) от амплитуды напряжения сдвига при частоте 10 рад/с для 2,7 вес.% раствора альгината натрия.

текущем состоянии, его вязкость в 500 раз выше вязкости воды (0,5 Па·с) и слабо зависит от скорости сдвига. Далее исследовали сшитые гели в результате добавления двухвалентных ионов Ca^{2+} .

Сшитые гели альгината натрия с добавлением нанотрубок. Для образования гелей в раствор альгината натрия добавляли неорганическую соль CaCl_2 . Необходимая концентрация соли была выбрана на основе литературных данных [19] и составляла 0,56 вес.%.

Из рис. 2А видно, что при приложении напряжения сдвига ниже некоторого критического значения образцы не текут. Эти данные указывают на то, что гель обладает пределом текучести. Значения предела текучести были рассчитаны согласно модели Гершеля-Балкли $\sigma = \sigma_0 + k \cdot \dot{\gamma}^n$, где σ_0 — предел текучести [24]. Такое изменение свойств объясняется кооперативным сшиванием жестких GG-блоков соседних макромолекул ионами кальция по принципу «коробки яиц», который хорошо описан в литературе [21]. Благодаря кооперативности, т.е. сшиванию целого ряда соседних звеньев в GG-блоках, данные сшивки достаточно прочные. Они могут быть разрушены достаточно сильным механическим воздействием (при напряжении выше предела текучести), при котором образец течет. Это необходимое свойство для чернил для экструзионной 3D-печати, так как чернила послойно наносят на поверхность.

При добавлении небольшого количества НТ галлуазита 0,1–0,3 об.% предел текучести значительно возрастает с 30 до 100 Па, т.е. увеличивается прочность геля в покое. Ранее было показано, что цепи альгината адсорбируются на НТ за счет взаимодействия карбоксилатной и гидроксильной групп с галлуазитом [20]. Можно предположить, что адсорбированные на поверхности нанотрубок цепи альгината сшиваются ионами кальция с цепями в растворе, поэтому НТ встраиваются в сетку геля и делают ее более прочной.

При гармоническом воздействии были получены значения модуля накоплений и модуля потерь в широкой области значений амплитуды деформации и частотные зависимости для геля без НТ (рис. 2Б, В). При небольших амплитудах и соответственно небольших напряжениях модуль накоплений имеет значение 1100 Па и на порядок превышает модуль потерь. Значения модулей слабо зависят от частоты. Это типичное гелеподобное поведение сеток альгината, сшитых ионами кальция [18, 21, 25]. Модуль накоплений характеризует упругие свойства геля при напряжениях ниже предела текучести. Переход в состояние вязкого течения $G' = G''$ наблюдается при амплитуде 30%. По мере добавления небольшого количества НТ (от 0,1 до 0,3 об.%) наблюдается рост модуля упругости до 2500 Па. Граница перехода к вязкому течению слабо изменяется от 30 до 35%. Стоит отметить, что рост модуля упругости можно получить

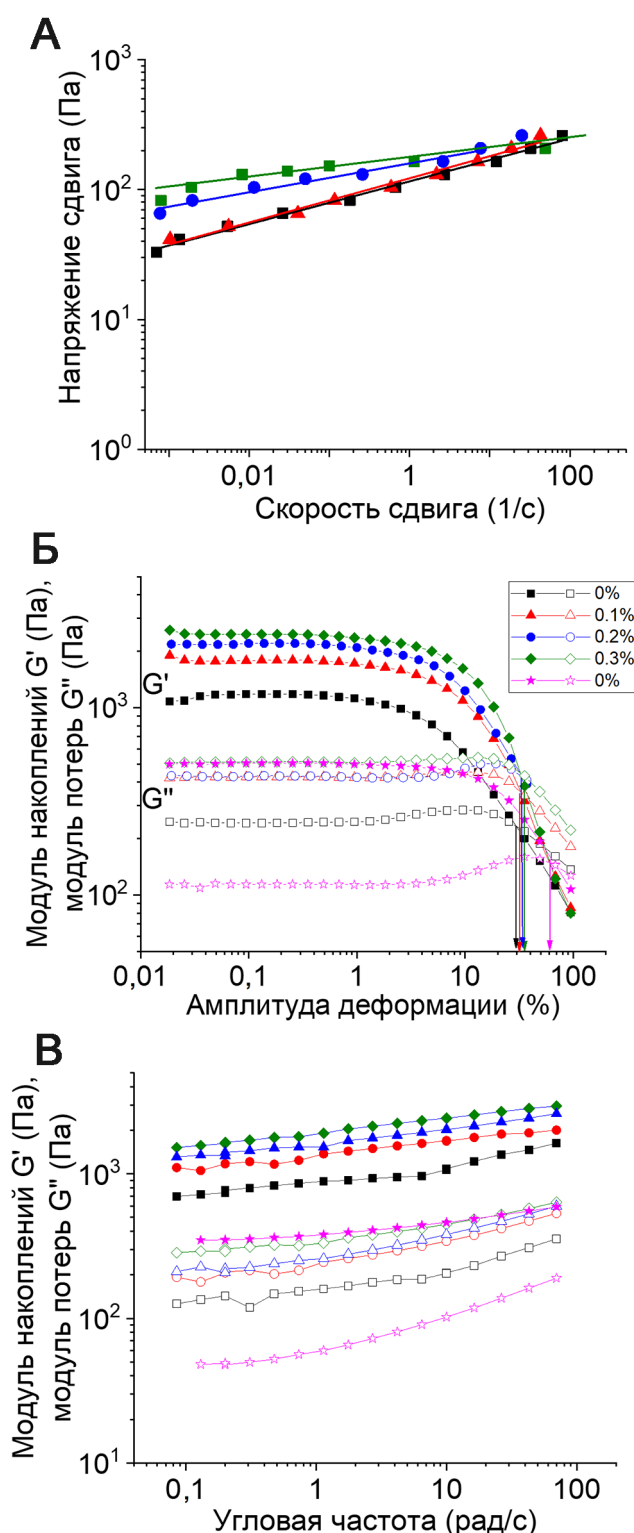


Рис. 2. Реологические свойства гелей альгината натрия, сшитых ионами кальция, в присутствии нанотрубок. (А) Зависимости напряжения сдвига от скорости сдвига (прямые линии — аппроксимация моделью Гершеля-Балкли). Зависимости модуля накоплений G' (закрашенные символы) и модуля потерь G'' (пустые символы) от амплитуды сдвига при частоте 10 рад/с (Б) и от угловой частоты (В) для гелей альгината натрия, содержащих 2,7 вес.% полимера, 0,28 вес.% CaCl_2 (фиолетовые звезды), 0,56 вес.% CaCl_2 (черные квадраты), и разное количество нанотрубок галлуазита: 0,1 об.% (красные треугольники), 0,2 об.% (синие круги), 0,3 об.% (зеленые ромбы). Стрелками отмечены точки перехода гелей к вязкому течению.

при увеличении количества ионов кальция [26]. На рис. 2Б и В показано, что при увеличении количества шшивок в 2 раза (0,28 вес.% и 0,56 вес.% CaCl_2) модуль упругости растет в 2 раза, но уменьшается область амплитуд, где гель проявляет упругие свойства и не течет с 62% до 30%, поэтому добавление НТ оказывается более предпочтительным способом увеличения упругости геля. Таким образом, добавление НТ приводит к увеличению модуля упругости геля без уменьшения диапазона упругого отклика.

Далее были получены зависимости вязкости образцов гелей от скорости сдвига в вязкотекучем состоянии при приложении напряжения сдвига выше предела текучести (рис. 3А). Вязкость геля без НТ при скорости сдвига $0,1 \text{ с}^{-1}$ очень высокая и превышает $1000 \text{ Па}\cdot\text{с}$, но по мере увеличения нагрузки на образец она падает и при 100 с^{-1} уже составляет $3 \text{ Па}\cdot\text{с}$. Такое сильное падение вязкости со скоростью сдвига объясняется разрывом шшивок и выстраиванием цепей вдоль направления течения [5, 27]. Это свойство используется для экструзии геля при 3D-печати. Условия экструзионной печати обычно соответствуют скоростям сдвига $50\text{--}100 \text{ с}^{-1}$ [5, 14, 15]. При добавлении НТ вязкость при малых скоростях растет, что согласуется с увеличением предела текучести за счет дополнительных шшивок альгината с НТ, но при высоких скоростях значения вязкости практически не отличаются от значений для ненаполненного геля, что можно объяснить тем, что эти связи тоже рвутся [28]. Таким образом, показано, что при добавлении НТ сохраняется свойство сильного падения вязкости со скоростью сдвига, а при условиях, соответствующих экструзии, вязкости не изменяются.

На следующем этапе было исследовано восстановление свойств гелей после течения при высоких скоростях сдвига (рис. 3Б). К образцам прикладывали напряжение сдвига, соответствующее скорости деформации 100 с^{-1} , в течение минуты, а затем уменьшали нагрузку на образец до скоростей $0,1 \text{ с}^{-1}$. Измерения вязкости производили в течение нескольких таких циклов. Это стандартный протокол исследования способности к восстановлению свойств гелей для экструзионной 3D-печати [5, 14, 18].

Из рис. 3Б видно, что после уменьшения нагрузки на образец в первые секунды вязкость скачкообразно росла до значений, близких к значениям вязкости при $0,1 \text{ с}^{-1}$, представленным на рис. 3А. Для ненаполненного геля альгината натрия через 3 с после уменьшения нагрузки вязкость возрастает в 200 раз, а через 6 с вязкость восстанавливается на 85%. Для гелей это высокие показатели для экструзионной 3D-печати [5, 15]. При добавлении НТ скорость восстановления остается высокой (рис. 3Б). При добавлении 0,3 об.% НТ через 3 с после уменьшения нагрузки вязкость возрастает в 270 раз, а после 6 с вязкость восстанавливается на 82%. Этот эффект можно объяснить тем, что разрыв нековалентных связей альгината и НТ полностью обратим.

Заключение

В данной работе показано, что добавление небольшого количества (до 0,3 об.%) НТ галлуазита в несколько раз увеличивает модуль упругости и предел текучести геля, т.е. делает его более прочным. При добавлении НТ гели сохраняют

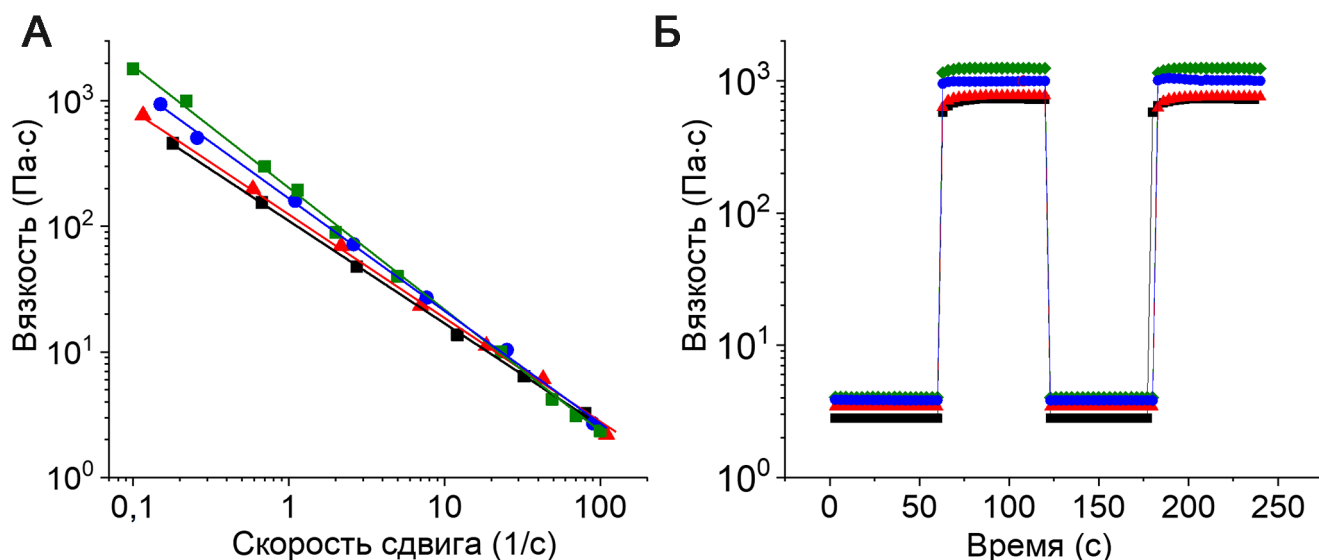


Рис. 3. Свойства гелей альгината натрия с нанотрубками при течении и восстановлении после течения. (А) Зависимости вязкости от скорости сдвига при увеличении напряжения сдвига и (Б) зависимости вязкости от времени при изменении скорости сдвига от 100 с^{-1} до $0,1 \text{ с}^{-1}$ для гелей альгината натрия, содержащих 2,7 вес.% полимера, 0,56 вес.% CaCl_2 и разное количество нанотрубок галлуазита: 0 об.% — черные квадраты, 0,1 об.% — красные треугольники, 0,2 об.% — синие круги, 0,3 об.% — зеленые ромбы.

свойство псевдопластичности при напряжениях выше предела текучести, а также свойство быстрого восстановления вязкости и, соответственно, структуры после снятия нагрузки. Таким образом, добавление малого количества НТ галлуазита в гели альгината натрия позволяет создавать более прочные гели, перспективные для применения в качестве чернил для экструзионной 3D-печати. Более того, такие гели позво-

лят инкапсулировать различные вещества в полость нанотрубок.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-13-00177). Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu J., Sun L., Xu W., Wang Q., Yu S., Sun J. Current advances and future perspectives of 3D printing natural-derived biopolymers. *Carbohydr. Polym.* 2019;207:297–316.
2. Mobaraki M., Ghaffari M., Yazdanpanah A., Luo Y., Mills D.K. Bioprinting and bioprinting: A focused review. *Bioprinting*. 2020;18:e00080.
3. Valentine A.D., Busbee T.A., Boley J.W., Raney J.R., Chortos A., Kotikian A., Berrigan J.D., Durstock M.F., Lewis J.A. Hybrid 3D printing of soft electronics. *Adv. Mater.* 2017;29(40):1703817.
4. Arzhakova O.V., Arzhakov M.S., Badamshina E.R., et al. Polymers for the future. *Russ. Chem. Rev.* 2022;91(12):RCR5062.
5. Li H., Tan C., Li L. Review of 3D printable hydrogels and constructs. *Mater. Des.* 2018;159:20–38.
6. Truby R.L., Lewis J.A. Printing soft matter in three dimensions. *Nature*. 2016;540(7633):371–378.
7. Heinrich M.A., Liu W., Jimenez A., Yang J., Akpek A., Liu X., Pi Q., Mu X., Hu N., Schiffelers R.M., Prakash J., Xie J., Zhang Y.S. 3D bioprinting: from benches to translational applications. *Small*. 2019;15(23):1805510.
8. Stanton M.M., Samitier J., Sánchez S. Bioprinting of 3D hydrogels. *Lab Chip*. 2015;15(15):3111–3115.
9. Rastogi P., Kandasubramanian B. Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*. 2019;11(4):42001.
10. Díaz I., Gallegos C., Brito-de la Fuente E., Martínez I., Valencia C., Sánchez M.C., Díaz M.J., Franco J.M. 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocoll.* 2019;87:321–330.
11. Hu C., Du Z., Tai X., Mao X., Liu X. The property study of sodium dodecyl benzenesulfonate and polyvinylpyrrolidone complexes. *Colloid Polym. Sci.* 2018;335–340.
12. Axpe E., Oyen M.L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(12):1976.
13. Murphy S.V., Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* 2014;32(8):773–785.
14. Dávila J.L., d'Ávila M.A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 2019;101(1–4):675–686.
15. Peak C.W., Stein J., Gold K.A., Gaharwar A.K. Nanoengineered colloidal inks for 3D bioprinting. *Langmuir*. 2018;34(3):917–925.
16. Liu L., Wan Y., Xie Y., Zhai R., Zhang B., Liu J. The removal of dye from aqueous solution using alginate-halloysite nanotube beads. *Chem. Eng. J.* 2012;187:210–216.
17. Del Buffa S., Rinaldi E., Carretti E., Ridi F., Bonini M., Baglioni P. Injectable composites via functionalization of 1D nanoclays and biodegradable coupling with a polysaccharide hydrogel. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2016;145:562–526.
18. Li H., Liu S., Li L. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *Int. J. Bioprinting*. 2016;2(2):58–66.
19. Glukhova S.A., Molchanov V.S., Lokshin B.V., Rogachev A.V., Tsarenko A.A., Patsaev T.D., Kamyshinsky R.A., Philippova O.E. Printable alginate hydrogels with embedded network of halloysite nanotubes: Effect of polymer cross-linking on rheological properties and microstructure. *Polymers*. 2021;13(23):4130.
20. Glukhova S.A., Molchanov V.S., Chesnokov Y.M., Lokshin B.V., Kharitonova E.P., Philippova O.E. Green nanocomposite gels based on binary network of sodium alginate and percolating halloysite clay nanotubes for 3D printing. *Carbohydr. Polym.* 2022;282:119106.
21. Stokke B.T., Dragnet K.I., Smidsrod O., Yuguchi Y., Urakawa H., Kajiura K. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels. *Macromolecules*. 2000;33(5):1853–1863.
23. Cavallaro G., Chiappisi L., Pasbakhsh P., Gradziel-ski M., Lazzara G. A structural comparison of halloysite nanotubes of different origin by small-angle neutron scattering (SANS) and electric birefringence. *Appl. Clay Sci.* 2018;160:71–80.
24. Hernández R., Sacristán J., Mijangos C. Sol/gel transition of aqueous alginate solutions induced by Fe^{2+} cations. *Macromol. Chem. Phys.* 2010;211(11):1254–1260.
25. Li H., Liu S., Li L. Rheological study on 3D printability of alginate hydrogel and effect of graphene oxide. *Int. J. Bioprinting*. 2016;2(2):54–66.
26. Hashemnejad S.M., Kundu S. Rheological properties and failure of alginate hydrogels with ionic and covalent crosslinks. *Soft Matter*. 2019;15(39):7852–7862.
27. Molchanov V.S., Efremova M.A., Kiseleva T.Y., Philippova O.E. Injectable ultra-soft hydrogel with natural nanoclay. *Nanosyst.: Phys. Chem. Math.* 2019;10(1):76–85.
28. Shishkhanova K.B., Molchanov V.S., Baranov A.N., Kharitonova E.P., Orekhov A.S., Arkharova N.A., Philippova O.E. A pH-triggered reinforcement of transient network of wormlike micelles by halloysite nanotubes of different charge. *J. Mol. Liq.* 2023;370:121032.

Поступила в редакцию 27.07.2023

После доработки 18.10.2023

Принята в печать 22.10.2023

SHORT COMMUNICATION

Rheological behavior of polysaccharide hydrogels of alginate reinforced by small amount of halloysite nanotubes for extrusion 3D printing

V.S. Molchanov^{*} , S.A. Glukhova, O.E. Philippova 

*Department of Polymers and Crystals Physics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
1–2 Leninskie Gory, 119991, Moscow, Russia*

^{}e-mail: molchan@polly.phys.msu.ru*

The rheological properties of hydrogels of a natural polysaccharide sodium alginate and small amount of clay nanotubes of halloysite were investigated. Changes of rheological properties during the transition from a semi-dilute polymer solution to a hydrogel upon cross-linking by calcium ions were shown. In the gel state, the samples have a yield stress, and their viscosity decreases with the shear rate, but the properties are quickly recovered after the load removal. It was obtained that the addition of up to 0.3 vol.% nanotubes of natural clay halloysite leads to an increase by several times of a storage modulus and an yield stress of the hydrogels. At the same time, the practically important properties of shear thinning and the rapid recovery of properties after the load removing make the nanocomposite hydrogels of alginate and halloysite nanotubes promising for use as ink for extrusion 3D printing.

Keywords: *rheology, viscoelasticity, hydrogel, halloysite, alginate, networks*

Finding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project number 23-13-00177.

Сведения об авторах

Молчанов Вячеслав Сергеевич — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-64; e-mail: molchan@polly.phys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2846-0784>

Глухова Светлана Анатольевна — аспирантка кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-64; e-mail: glukhova@polly.phys.msu.ru

Филиппова Ольга Евгеньевна — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры физики полимеров и кристаллов физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-64; e-mail: phil@polly.phys.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1098-0255>

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных РИНЦ, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, английская — в Scopus, SCImago, EBSCO Discovery Service, OCLC WorldCat Discovery Service, ProQuest Central, AGRICOLA, EMBiology, Institute of Scientific and Technical Information of China, Japanese Science and Technology Agency (JST), Dimensions, Google Scholar и др. Двухлетний импакт-фактор РИНЦ русскоязычной версии в 2021 г. составляет 0,778, показатель CiteScore 2022 (Scopus) англоязычной версии — 0,9.

После принятия статьи в печать редакция высылает авторам договоры с издателем журнала, которые необходимо заполнить и подписать всем соавторам. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc) и Word 2007 (*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Форматирование: шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полусторонний, отступ — 1,25, выравнивание по ширине (для удобства к правилам прилагается [шаблон статьи](#)). Редакция рекомендует придерживаться следующего объема рукописи: до 4000 слов для экспериментальной статьи, до 7000 слов для обзорной (включая список литературы и резюме на английском языке). Объёмы, значительно отклоняющиеся от рекомендованных, необходимо согласовывать с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (полужирным шрифтом, кегль 14), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

Образец оформления «шапки» статьи:

УДК 577.29

Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера

Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение, список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным

шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где указывается дата отправки рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:

Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹*Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;*

²*Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia*

**e-mail: kolosova@mail.ru*

После ключевых слов приводится информация о финансировании работы (Funding) на английском языке:

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 00-00-00000. (This study was performed under the state assignment of Moscow State University, project number AAAA-A00-000000000000-0).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович – канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков не должно быть избыточным (рекомендуется приводить не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах, предпочтение отдается рисункам. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное реальное (не интерполированное!) разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого его смысл не терялся и все элементы были различимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Список литературы оформляется в соответствии с форматом Vancouver. Указатель литературы к статьям формируется в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту. Мы рекомендуем авторам придерживаться осмысленного соотношения объемов текста статьи и приставленного списка литературы. Как правило, список литературы должен занимать от 20 до 40% общего объема рукописи.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие (в некоторых областях биологии допустимы отклонения от этого правила, которые необходимо согласовывать с редакцией). Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название журнала* (принятый сокращенный вариант). Год;том(номер):страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). *Название книги*. Город: Название издательства (без кавычек); год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи. *Название сборника*. Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Название издательства (без кавычек); год:страницы.

4) **Электронный ресурс.** *Название сайта* [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). [Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана].

5) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс]. *Название источника*. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.*; *Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, *Journal of Biochemistry* — *J. Biochem.* и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Litchfield K., Reading J.L., Puttick C., Thakkar K., Abbosh C., Bentham R., Watkins T.B., Rosenthal R., Biswas D., Rowan A., Lim E. Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition. *Cell*. 2021;184(3):596–614.

Marchena M., Echebarria B. Influence of the tubular network on the characteristics of calcium transients in cardiac myocytes. *PloS One*. 2020;15(4):e0231056.

Гребенкин И.В., Алексеенко А.Е., Гайворонский Н.А., Игнатов М.Г., Казённых А.М., Козаков Д.В., Кулагин А.П., Холодов Я.А. Применение ансамбля нейросетей и методов статистической механики для предсказания связывания пептида с главным комплексом гистосовместимости. *Комп. исслед. моделир.* 2020;12(6):1383–1395.

Книга:

Holliday R. *Aging: the paradox of life: why we age*. Dordrecht: Springer; 2007. 132 pp.

Рязанова Г.И. *Поведение насекомых*. М.: Изд-во Моск. ун-та; 2019. 232 с.

Статья в сборнике:

Mahajan M., Yadav R.K. Labeling and sorting of Arabidopsis SAM cell populations to capture their transcriptome profile. *Plant Stem Cells: Methods and Protocols*, vol. 2094. Eds. M. Naseem and T. Dandekar. N.Y.: Humana; 2020:39–47.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв. *Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.)*. Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии; 2013:174–176.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.03.2021).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.02.2021).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс]. *IUCN Red List of Threatened Species*. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Дополнительные правила оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется редколлегией на соответствие профилю и правилам оформления журнала. На первичное рассмотрение отводится 7–10 дней. Если в оформлении статьи обнаруживаются ошибки, ее рассмотрение занимает больше времени, так как редакторам необходимо составить список недочетов. Если работа совсем не соответствует требованиям, она возвращается авторам без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Рецензирование занимает от двух недель до месяца. Срок рецензирования включает в себя не только непосредственную работу рецензентов с рукописью, но и поиск подходящих специалистов (поиск может занять от двух дней до двух недель). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Возможно несколько раундов рецензирования, если у рецензентов возникают новые замечания или они не согласны с исправлениями и ответами авторов. Далее над рукописью работают редакторы, исправленный текст и замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Важно: если авторы подают статью, написанную на английском языке в русскоязычную версию журнала, она публикуется только в этой версии и не публикуется в переводной версии (Moscow University Biological Science Bulletin). Для подачи статьи в переводную версию, необходимо воспользоваться системой сайта Pleiades Publishing (<https://www.pleiades.online/ru/journal/bbscimgu/>).

Полезные ссылки

Список сокращенных названий журналов можно найти [здесь](#)

Классификатор УДК располагается [здесь](#)

О том, как правильно сокращать общепринятые термины, можно прочитать [здесь](#)