

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 80 • № 3 • 2025 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ
ПРИЛОЖЕНИЕ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

**Материалы 5-й Российской международной конференции
«Криоэлектронная микроскопия 2025: достижения и перспективы»
(RICSEM-2025), 8–11 июня 2025 г., Москва, Россия**

СОДЕРЖАНИЕ

От редакторов

Станишневa-Конoвалoвa Т.Б., Ярошевич И.А., Кирпичников М.П.,
Соколова О.С. Итоги пятой Российской международной конференции
по криоэлектронной микроскопии (RICSEM-2025) 5

Обзоры

Федоров В.А., Холина Е.Г., Гудимчук Н.Б., Коваленко И.Б. Изучение
гибких элементов структуры микротрубочек с помощью криоэлектронной
микроскопии и молекулярного моделирования: миссия выполнима? 9

Алиева И.Б., Шахов А.С., Чуркина А.С., Минин А.А. Преодоление
«разрыва в разрешении»: сочетание микроскопии сверхвысокого
разрешения и криоэлектронной томографии для идентификации участков
связывания митохондрий с виментином 15

Оригинальные исследования

Паршина Е.Ю., Фролова Л.С., Максимов Г.В. Морфология эритроцитов
указывает на различие механизмов формирования внеклеточных везикул
эритроцитарного происхождения. 23

Григорьева О.А., Басалова Н.А., Виговский М.А., Дьячкова У.Д.,
Багров Д.В., Соколова О.С., Ефименко А.Ю. Мембранно-
ассоциированные везикулы: подходы к выделению и характеристике 31

Трифoнoвa Т.С., Moиceeнкo A.В., Cкрябин Г.О., Имaрaлиев О.Т.,
Чевкина Е.М., Карасев И.А., Ефименко А.Ю., Трифонов С.И.,
Багров Д.В., Соколова О.С. Криоэлектронная микроскопия
демонстрирует полиморфизм малых внеклеточных везикул 38

© Издательство Московского университета,
“Вестник Московского университета”, 2025

| | |
|--|-----|
| Корабейникова В.Н., Феофанов А.В., Некрасова О.В. N- или C-концевое положение флуоресцентного белка mKate2 в составе химеры mKate2-KCa3.1 влияет на мембранную экспрессию канала | 46 |
| Любителей А.В., Багров Д.В., Гераськина О.В., Студитский В.М. Визуализация искусственных полинуклеосомных конструкций методом атомно-силовой микроскопии | 52 |
| Осина Е.В., Моисеенко А.В., Коровина А.Н., Герасимова Н.С., Волох О.И., Студитский В.М., Станишневa-Коновалова Т.Б. Пробоподготовка элонгационного комплекса +39 для криоэлектронной микроскопии. | 59 |
| Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Новичкова А.М., Феофанов А.В., Студитский В.М. PARP1-зависимые изменения нуклеосомной организации: возможное участие р53 | 67 |
| Лобанова А.А., Саулина А.А., Гераськина О.В., Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Феофанов А.В., Студитский В.М. Оценка связывания ингибиторов PARP в режиме реального времени на основе Ni-NTA-агарозных шариков | 73 |
| Волкова Е.А., Коровина А.Н., Малюченко Н.В., Студитский В.М. Оптимизация получения рекомбинантной поли(АДФ-рибоза) полимеразы 3 человека | 81 |
| Сурков М.М., Литовец А.Ю., Мамчур А.А., Станишневa- Коновалова Т.Б., Ярошевич И.А. Структурные особенности каротиноид-связывающих белков | 87 |
| <i>Краткие сообщения</i> | |
| Кравченко О.В., Чесноков Ю.М., Афонина Ж.А., Василенко К.С. Структура трансляционного преинициаторного комплекса из экстракта зародышей пшеницы | 96 |
| Моисеенко А.В., Бубенчиков М.А., Чжан И., Кузнецов А.С., Летаров А.В., Соколова О.С. Реконструкция осевой фибриллы Stx-конвертирующего бактериофага phi24B с помощью криоэлектронной микроскопии. | 101 |
| Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Трифонова Т.С., Ахметова А.И., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Яминский И.В., Файзулов Е.Б. Исследование холодадаптированного ослабленного мутанта SARS-CoV-2 методами просвечивающей, криоэлектронной и атомно-силовой микроскопии | 106 |
| Волох О.И., Сивкина А.Л., Студитский В.М., Соколова О.С. Роль C-концевого домена Rob3 в разворачивании нуклеосом комплексом FACT: данные электронной микроскопии | 113 |
| Казаков Е.П., Чесноков Ю.М., Киреев И.И., Голышев С.А. Анализ архитектуры гетерохроматина с помощью криоэлектронной томографии. | 118 |

Lomonosov Biology Journal

Founded in November 1946

Vol. 80 • No. 3 • 2025 • JULY – SEPTEMBER
SUPPLEMENT

Quarterly

Moscow University Press

**Proceedings of the IV Russian International Conference
on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2025), June 8–11, 2025, Moscow, Russia**

CONTENTS

Editorial

Stanishneva-Konovalova T.B., Yaroshevich I.A., Kirpichnikov M.P.,
Sokolova O.S. Results of the Fifth Russian International Conference
on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2025). 5

Reviews

Fedorov V.A., Kholina E.G., Gudimchuk N.B., Kovalenko I.B. Studying
flexible elements of microtubule structure using cryo-electron microscopy
and molecular modeling: mission possible? 9

Alieva I.B., Shakhov A.S., Churkina A.S., Minin A.A.
Overcoming the “resolution gap”: combination of super-resolution microscopy
and cryo-electron tomography for mitochondria-vimentin binding sites
identification. 15

Research articles

Parshina E.Yu., Frolova L.S., Maximov G.V. The morphology of erythrocytes
reveals differences in the mechanisms of erythrocyte derived extracellular vesicle
formation 23

Grigorieva O.A., Basalova N.A., Vigovskiy M.A., Dyachkova U.D.,
Bagrov D.V., Sokolova O.S., Efimenko A.Yu. Membrane-associated
vesicles: approaches for isolation and characterization 31

Trifonova T.S., Moiseenko A.V., Skryabin G.O., Imaraliev O.T.,
Chevkina E.M., Karasev I.A., Efimenko A.Yu., Trifonov S.I.,
Bagrov D.V., Sokolova O.S. Cryo-electron microscopy demonstrates
polymorphism of small extracellular vesicles 38

Korabeynikova V.N., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. N- or C-terminal
position of the fluorescent protein mKate2 in the mKate2-KCa3.1 chimera
influences membrane expression of the channel 46

© Moscow University Press,
“Lomonosov Biology Journal,” 2025

| | |
|---|-----|
| Lyubitelev A.V., Bagrov D.V., Geraskina O.V., Studitsky V.M. Visualization of artificial polynucleosomal constructs with atomic force microscopy | 52 |
| Osina E.V., Moiseenko A.V., Korovina A.N., Gerasimova N.S., Volokh O.I., Studitsky V.M., Stanishneva-Konovalova T.B. Sample preparation of the elongation complex +39 for cryo-electron microscopy | 59 |
| Koshkina D.O., Maluchenko N.V., Novichkova A.M., Feofanov A.V., Studitsky V.M. PARP1-dependent alterations in nucleosome organization: potential involvement of p53 | 67 |
| Lobanova A.A., Saulina A.A., Geraskina O.V., Koshkina D.O., Maluchenko N.V., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Ni-NTA bead-based real-time monitoring of PARPs inhibitor binding. | 73 |
| Volkova E.A., Korovina A.N., Maluchenko N.V., Studitsky V.M. Optimization of recombinant human poly(ADP-ribose) polymerase 3 production . . . | 81 |
| Surkov M.M., Litovets A.Yu., Mamchur A.A., Stanishneva-Konovalova T.B., Yaroshevich I.A. Structural features of carotenoid-binding proteins | 87 |
| <i>Short communications</i> | |
| Kravchenko O.V., Chesnokov Y.M., Afonina Zh.A., Vassilenko K.S. Structure of the translation pre-initiation complex from a plant extract | 96 |
| Moiseenko A.V., Bubenchikov M.A., Zhang Y., Kuznetsov A.S., Letarov A.V., Sokolova O.S. Cryo-electron microscopy study of the axial fiber of the Stx-converting bacteriophage phi24B. | 101 |
| Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Trifonova T.C., Akhmetova A.I., Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Yaminsky I.V., Faizuloev E.B. Study of a cold-adapted attenuated SARS-CoV-2 mutant using transmission, cryo-electron and atomic force microscopy | 106 |
| Volokh O.I., Sivkina A.L., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Structural role of Pob3 CTD in FACT-mediated nucleosome uncoiling revealed by electron microscopy | 113 |
| Kazakov E.P., Chesnokov Y.M., Kireev I.I., Golyshev S.A. Analysis of heterochromatin mesoscale architecture by cryo-electron tomography | 118 |

ОТ РЕДАКТОРОВ

УДК 577.322.2+577.322.5



Итоги пятой Российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии (RICSEM-2025)

Т.Б. Станишневa-Коновалова¹ , И.А. Ярошевич² ,
М.П. Кирпичников¹ , О.С. Соколова^{1,*}

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

²Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24

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

С 8 по 11 июня 2025 г. на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова прошла 5-я Российская международная конференция «Криоэлектронная микроскопия 2025: достижения и перспективы» (RICSEM-2025). Более 300 исследователей из 11 стран приняли в ней участие в онлайн- и офлайн-формате. В этой статье кратко обсуждается содержание статей специального выпуска журнала «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология», опубликованного по итогам конференции.

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

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-1

Конференция «Криоэлектронная микроскопия 2025: достижения и перспективы» проводится в МГУ уже в 5-й раз. В этом году ее организаторами были биологический факультет МГУ, Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», Московский физико-технический институт, Российская Академия наук. Среди докладчиков особо хочется отметить лекцию Нобелевского лауреата по химии 2017 г., профессора Ричарда Хендерсона. С устными докладами в очном формате выступили проф. Шиксин Йе-Леманн из Университета Париж-Сакле (Франция), проф. Александр Соболевский из Медицинского центра Ирвинга Колумбийского университета (США), д-р. Константин Усачев из Казанского федерального университета (Россия), д-р Элиас Ньето Сарагоса из Национального автономного университета Мексики (Мексика) и многие другие (рисунок).

В данном спецвыпуске опубликованы 17 обзорных и экспериментальных работ, представленных на конференции в виде устных или постерных докладов. Открывает спецвыпуск обзорная статья Федорова и соавт., посвященная применению метода криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) для изучения микротрубочек [1]. Обсуждается прогресс в изучении гибких элементов микротру-

бочек с помощью криоЭМ и томографии, а также роль и потенциал методов компьютерного моделирования этих структур. В обзорной статье Алиевой и соавт. обсуждается сочетание методов микроскопии сверхвысокого разрешения и криоэлектронной томографии для идентификации и подробной характеристики участков связывания виментина с митохондриями [2].

В оригинальных исследованиях этого спецвыпуска метод криоЭМ дополняется различными методами для изучения макромолекулярных комплексов и объектов биологического происхождения. Одним из таких объектов являются внеклеточные везикулы, которые являются как способом межклеточной коммуникации, так и перспективными средствами для адресной доставки лекарств. В статье Паршиной и соавт. при помощи сканирующей электронной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния сравниваются внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения, полученные разными методами [3]. В статье Григорьевой и соавт. приводится протокол для выделения мембранно-ассоциированных везикул, показывающий большую эффективность по сравнению с другими опробованными протоколами, что подтверждается методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) [4]. Трифонова и соавт. в своем исследовании описали

морфологию малых внеклеточных везикул, выделенных из желудочного сока пациентов с аденокарциномой желудка, а также здоровых доноров. Описание проводилось с применением созданной авторами компьютерной программы Veronica для анализа объектов на изображениях, полученных методом криоэлектронной микроскопии [5].

В работе Корабейниковой и соавт. изучается модифицированный калиевый канал KCa3.1, в котором к N- либо к C-концу его α -субъединицы присоединен флуоресцентный белок. При помощи конфокальной микроскопии проанализировано распределение таких химерных каналов в плазматической мембране и сделан вывод о том, что модификация C-конца предпочтительнее. Кроме того, в этой работе был создан флуоресцентный лиганд, состоящий из пептидного блокатора и зеленого флуоресцентного белка, который может использоваться для визуализации каналов в клетках [6].

Несколько оригинальных работ посвящены структурным исследованиям нуклеосом и их комплексов. Любителей и соавт. проводили сборку полинуклеосом на плазмиде и визуализировали полученные конструкции при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) [7]. Осина и соавт. разработали протокол для сборки элонгационного комплекса с положением активного центра РНК-полимеразы в позиции +39 от входа в нуклеосому (ЭК+39). Образование целевых комплексов подтверждалось методами электрофореза и электронной микроскопии с негатив-

ным контрастированием образцов. Ожидается, что разработанные протоколы будут использованы для изучения ЭК+39 методом криоЭМ [8]. Кошкина и соавт. использовали метод электрофоретического сдвига подвижности (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay) с флуоресцентно-меченой ДНК для изучения кооперативного и конкурентного связывания белков p53 и PARP1 с моонуклеосомами. Авторы показали, что порядок добавления белков определяет характер их взаимодействия с нуклеосомой [9].

В работе Лобановой и соавт. была создана платформа для флуоресцентной микроскопии, позволяющая визуализировать динамику взаимодействия лигандов с His-мечеными белками, связывающимися с Ni-NTA-агарозными шариками. Платформа применялась для исследования взаимодействия фактора репарации ДНК PARP2 с нуклеосомой, модулируемого клиническими ингибиторами (талазопарибом, велипарибом) [10]. Волкова и соавт. в своей статье представили новый протокол получения очищенного фактора репарации ДНК PARP3, являющийся более эффективным, чем ранее опубликованные методики [11].

В другом оригинальном исследовании проводился анализ структур каротиноид-содержащих белков, депонированных в базу Protein Data Bank. Основываясь на имеющихся данных, Сурков и соавт. применили метод машинного обучения для создания и тестирования модели, прогнозирующей каротиноид-связывающую активность по первичной структуре белка [12].



Рисунок. Групповая фотография на конференции «RICSEM-2025»

Завершают спецвыпуск несколько кратких сообщений. Кравченко и соавт. получили структуру преинициаторного рибосомного комплекса из экстрактов зародышей пшеницы со средним разрешением 3 Å. Это первая структура инициаторного комплекса растений, и результаты работы указывают на ее отличия от комплексов из клеток млекопитающих [13]. Моисеенко и соавт. впервые представили криоЭМ-структуру осевой фибриллы gp56 из адсорбционного аппарата Stx-конвертирующего фага phi24B [14]. Кордюкова и соавт. применяли методы ПЭМ, криоЭМ и АСМ для изучения температурочувствительного мутанта SARS-CoV-2 в сравнении с родительским штаммом [15]. Волох

и соавт. методом ПЭМ сравнили мутантный и нативный комплекс FАСТ, показав различия в их способности разворачивать нуклеосомы [16]. Казаков и соавт. исследовали возможности применения криоэлектронной томографии для изучения архитектуры хроматина [17].

Конференция проводилась при финансовой поддержке Московского государственного университета, спонсорами также выступили компании «Техноинфо», «Мелитэк», «Bioinnlabs», «Лабтех», «Biosad» и «Микротехпро». Спонсором конкурса лучших презентаций среди студентов и аспирантов выступила компания «Хеликон». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федоров В.А., Холина Е.Г., Гудимчук Н.Б., Коваленко И.Б. Изучение гибких элементов структуры микротрубочек с помощью криоэлектронной микроскопии и молекулярного моделирования: миссия выполнима? *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):9–14.
2. Алиева И.Б., Шахов А.С., Чуркина А.С., Минин А.А. Преодоление «разрыва в разрешении»: сочетание микроскопии сверхвысокого разрешения и криоэлектронной томографии для идентификации участков связывания митохондрией с виментином. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):15–22.
3. Паршина Е.Ю., Фролова Л.С., Максимов Г.В. Морфология эритроцитов указывает на различие механизмов формирования внеклеточных везикул эритроцитарного происхождения. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):23–30.
4. Григорьева О.А., Басалова Н.А., Вигровский М.А., Дьячкова У.Д., Багров Д.В., Соколова О.С., Ефименко А.Ю. Мембранно-ассоциированные везикулы: подходы к выделению и характеристизации. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):31–37.
5. Трифонова Т.С., Моисеенко А.В., Скрыбин Г.О., Имаралиев О.Т., Чевкина Е.М., Карасев И.А., Ефименко А.Ю., Трифонов С.И., Багров Д.В., Соколова О.С. Криоэлектронная микроскопия демонстрирует полиморфизм малых внеклеточных везикул. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):38–45.
6. Корабейникова В.Н., Феофанов А.В., Некрасова О.В. N- или C-концевое положение флуоресцентного белка mKate2 в составе химеры mKate2-KCa3.1 влияет на мембранную экспрессию канала. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):46–51.
7. Любителиев А.В., Багров Д.В., Гераскина О.В., Студитский В.М. Визуализация искусственных полинуклеосомных конструкций методом атомно-силовой микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):52–58.
8. Осина Е.В., Моисеенко А.В., Коровина А.Н., Герасимова Н.С., Волох О.И., Студитский В.М., Станишнев-Коновалова Т.Б. Пробоподготовка элонгационного комплекса +39 для криоэлектронной микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):59–66.
9. Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Новичкова А.М., Феофанов А.В., Студитский В.М. PARP1-зависимые изменения нуклеосомной организации: возможное участие р53. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):67–72.
10. Лобанова А.А., Саулина А.А., Гераскина О.В., Кошкина Д.О., Малюченко Н.В., Феофанов А.В., Студитский В.М. Оценка связывания ингибиторов PARP в режиме реального времени на основе Ni-NTA-агарозных шариков. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):73–80.
11. Волкова Е.А., Коровина А.Н., Малюченко Н.В., Студитский В.М. Оптимизация получения рекомбинантной поли(АДФ-рибоза) полимеразы 3 человека. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):81–86.
12. Сурков М.М., Литовец А.Ю., Мамчур А.А., Станишнев-Коновалова Т.Б., Ярошевич И.А. Структурные особенности каротиноид-связывающих белков. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):87–95.
13. Кравченко О.В., Чесноков Ю.М., Афонина Ж.А., Василенко К.С. Структура трансляционного преинициаторного комплекса из экстракта зародышей пшеницы. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):96–100.
14. Моисеенко А.В., Бубенчиков М.А., Чжан И., Кузнецов А.С., Летаров А.В., Соколова О.С. Реконструкция осевой фибриллы Stx-конвертирующего бактериофага phi24B с помощью криоэлектронной микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):101–105.
15. Кордюкова Л.В., Моисеенко А.В., Трифонова Т.С., Ахметова А.И., Грачева А.В., Корчевая Е.Р., Яминский И.В., Файзулов Е.Б. Исследование холодоадаптированного ослабленного мутанта SARS-CoV-2 методами просвечивающей, криоэлектронной и атомно-силовой микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):106–112.
16. Волох О.И., Сивкина А.Л., Студитский В.М., Соколова О.С. Роль C-концевого домена Rob3 в разворачивании нуклеосом комплексом FАСТ: данные электронной микроскопии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):113–117.
17. Казаков Е.П., Чесноков Ю.М., Киреев И.И., Голышев С.А. Анализ архитектуры гетерохроматина с помощью криоэлектронной томографии. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биол.* 2025;80(3S):118–123.

Поступила в редакцию 30.09.2025

Принята в печать 06.10.2025

EDITORIAL

Results of the Fifth Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2025)

T.B. Stanishneva-Konovalova¹ , I.A. Yaroshevich² ,
M.P. Kirpichnikov¹ , O.S. Sokolova^{1, *} 

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

²Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–24 Leninskie gory, 119234, Moscow, Russia

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

From June 8 to 11, 2025, the 5th Russian International Conference on Cryo-Electron Microscopy (RICCEM-2025) was held at the Faculty of Biology at Moscow State University. More than 300 researchers from 11 countries participated in online and offline formats. This article briefly discusses the contents of the articles in the special issue of the journal “Vestnik Moskovskogo universiteta. Seria 16. Biologia” published following the conference.

Keywords: cryo-electron microscopy, cryo-EM, structural biology, macromolecular structures, conference, RICCEM

Сведения об авторах

Станишневa-Коновалова Татьяна Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8427-8178>

Ярошевич Игорь Александрович — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: iyapromo@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8525-5568>

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>

Кирпичников Михаил Петрович — акад., проф., докт. биол. наук, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, зав. отделом биоинженерии ИБХ РАН, гл. ред. 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 577.32



Изучение гибких элементов структуры микротрубочек с помощью криоэлектронной микроскопии и молекулярного моделирования: миссия выполнима?

В.А. Федоров^{1,*} , Е.Г. Холина¹ , Н.Б. Гудимчук² , И.Б. Коваленко¹

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;

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

*e-mail: xbgth@ya.ru

Микротрубочки являются базовыми элементами цитоскелета эукариотических клеток. Благодаря своей многофункциональности, уникальной структуре и высокой механической жесткости, они остаются излюбленным объектом исследований с использованием различных методов микроскопии, включая криоэлектронную. Несмотря на впечатляющие успехи в визуализации решетки микротрубочек, гибкие элементы их структуры — отдельные протофиламенты на собирающихся или разбирающихся плюс-концах, а также регуляторные неструктурированные пептиды, известные как С-концевые «хвосты», — до сих пор слабо поддаются визуализации. В этой статье мы обсуждаем прогресс в применении криоэлектронной микроскопии и томографии к изучению этих участков, а также роль и потенциал методов молекулярного моделирования для анализа и интерпретации полученных экспериментальных данных.

Ключевые слова: микротрубочки, тубулин, криоэлектронная микроскопия, молекулярная динамика, гибкие элементы структуры

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

Введение

Микротрубочки являются ключевыми элементами цитоскелета всех эукариотических клеток. Они представляют собой полые цилиндры, образованные из α/β -гетеродимеров тубулина, которые, как правило, организованы в тринадцать линейных цепочек — протофиламентов, соединенных между собой боковыми контактами [1]. Такая архитектура обеспечивает высокую изгибную жесткость, позволяя микротрубочкам служить транспортными магистралями внутри клетки, а также придавать стабильность различным внутриклеточным структурам. На плюс-концах микротрубочек, где происходит встраивание и отсоединение субъединиц, протофиламенты могут иметь разную длину и частично или полностью утрачивать латеральные связи [2]. Это приводит к образованию гибких олигомерных участков, которые обладают повышенной подвижностью и сложно визуализируются методами криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), даже несмотря на то, что разрешение в области стабильной ци-

линдрической решетки микротрубочки, вдали от динамических концов, достигает порядка 3 Å.

Другим трудно визуализируемым элементом являются неструктурированные С-концевые участки тубулинов — гибкие и, как правило, сильно заряженные участки, известные как «хвосты». Эти участки играют важнейшую регуляторную роль в цитоскелете [3]. В эукариотических клетках они участвуют в рекрутировании множества белков на поверхность микротрубочек, включая северазы, моторные белки и плюс-концевые белки, ассоциирующиеся с динамическими концами микротрубочек [4]. Эти участки подвергаются множественным посттрансляционным модификациям, включая тирозинирование, полиглутамилирование и полиглицилирование, что позволяет тонко регулировать свойства микротрубочек в различных клетках и на разных стадиях клеточного цикла [5]. Гибкие участки, хотя и отличные по последовательности и длине, обнаруживаются у бактериальных гомологов тубулина, таких как FtsZ и уникальных тубулинов BtubA/B из рода *Prostheobacter* [6].

Несмотря на значительный прогресс в области структурной биологии, достигнутый благодаря криоэлектронной микроскопии и одночастичным методам (“single particle”), гибкость элементов белков и особенно неструктурированных пептидов, таких как С-концевые участки тубулинов остается серьезным препятствием для их прямой визуализации. Поэтому важную роль в исследовании их динамики и взаимодействий продолжают играть методы молекулярного моделирования, позволяющие восполнить недостающую информацию о гибких зонах, невидимых в криоэлектронной микроскопии.

Результаты и обсуждение

1. Успехи и сложности крио-ЭМ в визуализации тубулинов

В 1998 г. методом электронной кристаллографии искусственно индуцированных ионами цинка полимеров тубулина в виде «листов» была получена первая атомарная структура тубулина с разрешением 3,7 Å. Реконструкции естественных полимеров тубулина — микротрубочек — долгое время не удавалось получить с разрешением лучше, чем примерно 8 Å. Основные ограничения были связаны отчасти с техническими характеристиками микроскопов, но также с отсутствием необходимых алгоритмов обработки изображений. В 2014 г. работа Алушиной и соавт. [7] обеспечила качественный прорыв в этой области. Благодаря использованию микроскопа FEI Titan 300 и разработанной авторами стратегии декорирования микротрубочек доменом моторного белка кинезина, который создавал повторяющийся и легко различимый на низком разрешении маркер на каждом димере тубулина, помогая отличать α - и β -субъединицы, удалось впервые добиться высокой степени детализации при реконструкции микротрубочек в двух различных нуклеотидных состояниях. Обе реконструкции имели разрешение лучше 5 Å, чего было достаточно для различения связанных нуклеотидов, а также элементов вторичной структуры, включая отдельные β -цепи и крупные ароматические боковые цепи. Таким образом, эта работа впервые позволила на атомарном уровне проследить структурные изменения микротрубочек в зависимости от нуклеотидного состояния, то есть связанных с ГТФ (гуанозинтрифосфат) или ГДФ (гуанозиндифосфат), и открыла путь к структурному анализу механизмов нестабильности и регуляции микротрубочек. В настоящее время известны структуры решеток микротрубочки, как декорированные, так и не декорированные белками с разрешением около 3 Å [8–13].

В 2023 г. удалось определить структуры отдельных димеров *Drosophila melanogaster* в растворе, полученные в состоянии, связанном как с ГТФ, так с ГДФ [6]. Это долгое время оставалось трудной задачей, по всей видимости, из-за про-

блемы преимущественной ориентации димеров на подложке, что мешало реконструкции с высоким разрешением. Однако визуализация гибких и подвижных элементов структуры микротрубочек до сих пор представляет техническую сложность в связи с тем, что гибкость препятствует получению данных высокого разрешения путем алгоритмов одночастичного анализа, основанных на возможности наблюдать один и тот же объект многократно с различных ракурсов и получать данные высокого разрешения путем усреднения.

2. Примеры успешных визуализаций С-концов при иммобилизации на белках-партнерах

Тем не менее, гибкие С-концевые участки все же могут быть обнаружены методами криоэлектронной микроскопии, по крайней мере, в случаях, когда эти участки хотя бы частично обездвижены при взаимодействии с белками-партнерами. Так, плотность, соответствующая С-концевым хвостам тубулина, была обнаружена при реконструкции взаимодействия микротрубочек с плюсконцевым белком p150(glued) [14]. В более свежей работе еще более четко была аннотирована плотность α - и β -хвостов тубулинов при реконструкции взаимодействия моторного белка кинезина-3 (KIF1A) и микротрубочки [15], рис. 1.

Другим ярким примером визуализации С-концов тубулина в контексте связанных с микротрубочками белков является реконструкция взаимодействия микротрубочек с кинетохорным комплексом NDC80 [16]. На полученной в этой статье карте плотности отчетливо различается С-конец α -тубулина, тянущийся от глобулы тубулина к глобуле субъединицы Nuf2 комплекса NDC80. Этот контакт, вероятно, объясняет парадокс вклада субъединицы Nuf2 в аффинность всего комплекса NDC80 к микротрубочке при отсутствии каких-либо контактов ее с глобулами тубулина [17].

Наконец, в недавней работе, опубликованной в качестве препринта, впервые обнаружены плотности крио-ЭМ С-концов α -тубулинов, взаимодействующих с глобулами соседних тубулинов в решетке [18]. Это наблюдение полностью соответствует предсказаниям молекулярного моделирования о возможных контактах гибких высокозаряженных С-концов тубулина с глобулярными участками и регуляторной роли этих контактов при межтубулиновых взаимодействиях [19].

3. Применение метода криоэлектронной томографии к исследованию гибких элементов структуры микротрубочек

Несмотря на сложность получения данных высокого разрешения одночастичными методами криоэлектронной микроскопии применительно к гибким структурам, методы криоэлектронной томографии позволили визуализировать с низким

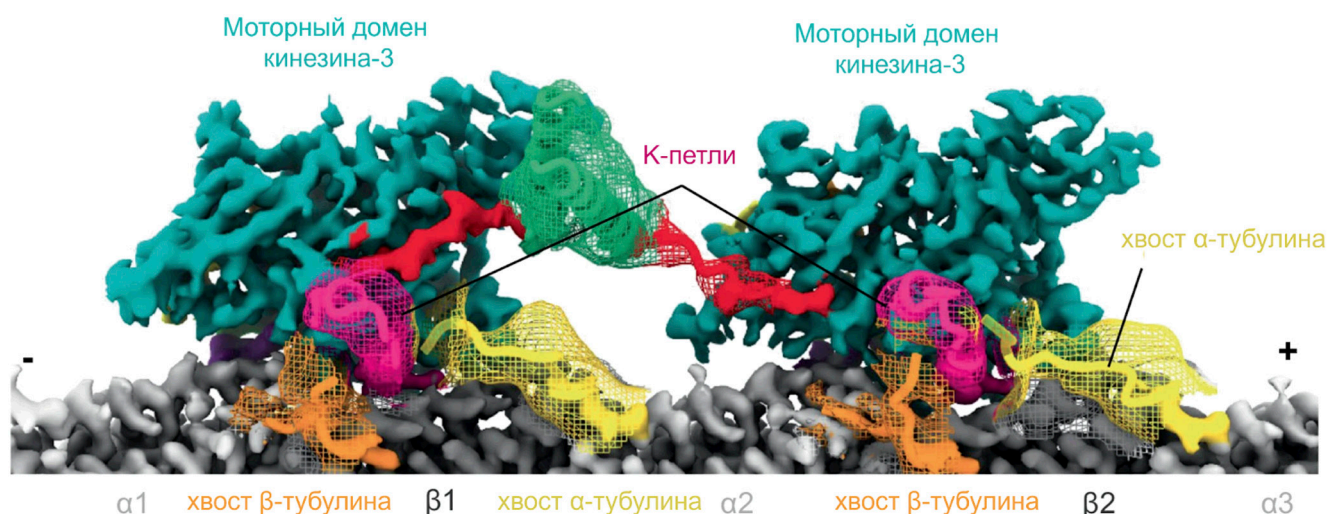


Рис. 1. Пример визуализации С-концов тубулина в крио-ЭМ при взаимодействии кинезина 3 с микротрубочкой. Иллюстрация адаптирована из статьи Бенуа и соавт. [15] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0. Поясняющие надписи переведены на русский язык или опущены. Разными цветами обозначены различные функциональные области белков. С-концы β -тубулинов показаны оранжевым, С-концы α -тубулинов — желтым. Серым изображены глобулярные участки тубулинов, зеленым — глобулярные участки моторных доменов кинезина 3.

разрешением относительно подвижные протофиламенты на динамических концах микротрубочек, как в образцах клеток, замороженных при высоком давлении, так и *in vitro* [20–23]. Благодаря ручной сегментации протофиламентов на тонких виртуальных срезах томограмм, проведенных через плоскость, содержащую ось микротрубочки, удалось изучить формы индивидуальных гибких протофиламентов и выяснить, что они в среднем изогнуты, как при сборке, так и при разборке микротрубочек в различных организмах или в разнообразных экспериментальных условиях, что меняет устоявшиеся представления о механизмах полимеризации микротрубочек [22]. А именно, согласно возникшим на основе этого анализа новым представлениям, подкрепленным моделированием, микротрубочки полимеризуются и деполимеризуются за счет смыкания-размыкания изогнутых протофиламентов на своих динамических концах [24]. Нуклеотидный состав тубулинов (ГТФ и ГДФ), по всей видимости, определяет, будет баланс между смыканием и размыканием протофиламентов смещен в среднем в сторону удлинения или разборки тела микротрубочек, но не равновесную форму протофиламентов тубулина. Различия между ГТФ- и ГДФ-связанными микротрубочками скорее определяются влиянием нуклеотидов на гибкость протофиламентов в этих состояниях и различиями в их латеральных связях.

Структурные данные томографии в основе этой модели, изначально полученные путем сегментации вручную, в последних работах находят подтверждение благодаря развитию методов устранения шума («денойзинга»), таких как метод CryoCARE [25]. Применение этого подхода позволило улучшить соотношение сигнала к шуму

в данных и проводить сегментацию подвижных протофиламентов на концах микротрубочек даже в автоматическом или полуавтоматическом режимах [26, 27], что обеспечило большую надежность и детализацию при визуализации подвижных протофиламентов (рис. 2).

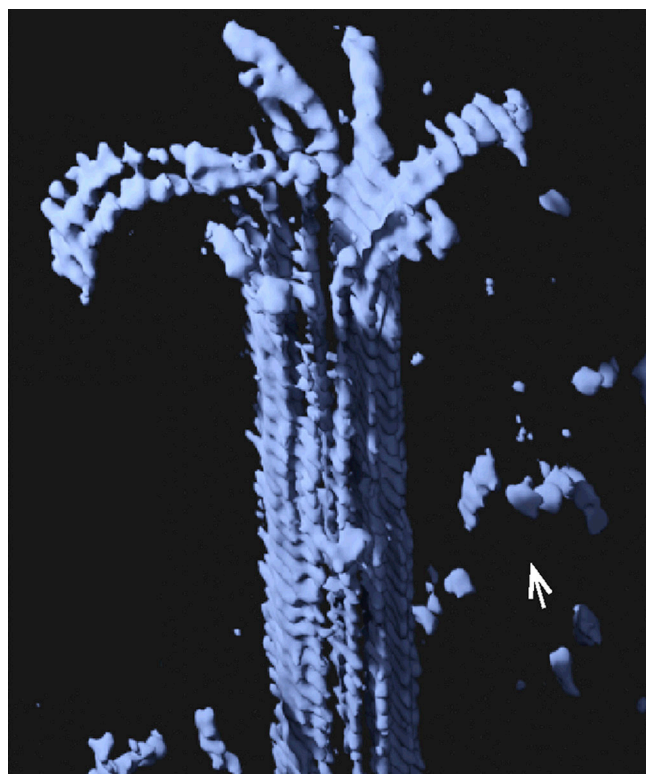


Рис. 2. Пример визуализации подвижных протофиламентов на конце полимеризующейся микротрубочки. Иллюстрация воспроизведена из статьи Айер и соавт. [27] по лицензии Creative Commons Attribution 4.0. Показанная автоматическая сегментация тубулинов произведена после применения алгоритма устранения шума CryoCARE.

Гибкость глобулярных протофиламентов, однако, все же несопоставимо ниже гибкости С-концевых пептидов тубулина. Несмотря на это, в литературе имеются некоторые прецеденты применения томографии и к визуализации этих крайне гибких С-концов микротрубочек. Так, в 2015 г. стало известно о возможности с помощью обычной крио-томографии без использования контрастирующих агентов разрешить участок С-концов тубулинов, непосредственно примыкающий к глобулярной части тубулина [28]. В работе, опубликованной недавно в виде препринта [29] представлены результаты визуализации препарата очищенных микротрубочек, которые были окрашены солями тяжелых металлов, и далее визуализированы с помощью электронной томографии. На виртуальных срезах образцов этого препарата микротрубочек видны характерные «выросты», длиной до $\sim 2,5$ нм и шириной около ~ 1 нм на половине длины, которые выступают из микротрубочки с периодичностью $4 \pm 0,8$ нм, то есть по одному на каждыйномер тубулина. Однако, несмотря на успешную визуализацию, примененный метод негативного контрастирования окрашиванием солями тяжелых металлов, как известно, не лишен артефактов, поэтому задача развития подходов к визуализации гибких хвостов тубулина методами криоэлектронной томографии остается высоко актуальной.

4. Методы молекулярного моделирования как важнейший вспомогательный инструмент при анализе карт плотности крио-ЭМ

Важнейшей задачей структурной биологии является объединение структурных данных, различающихся как методами получения, так и пространственным разрешением, в рамках единой 3D-модели. На помощь в решении этой задачи приходят методы молекулярного компьютерного моделирования, в частности, метод MDFF (Molecular Dynamics Flexible Fitting). Этот метод был специально разработан для совмещения атомных структур высокого разрешения (полученных, например, методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР) и карт плотности крио-ЭМ [30], для получения атомных координат молекулярной системы в конформации, определенной методом крио-ЭМ. В силовое поле вводится дополнительный потенциал, зависящий от карты плотности и налагающий на атомы молекулярной системы дополнительные силы, пропорциональные градиенту плотности. К моменту создания этого метода разрешение метода крио-ЭМ было низким и не превышало $8\text{--}10$ Å, и одна из его задач заключалась в интерпретации данных крио-ЭМ с использованием высокого разрешения, доступного в рентгеновской кристаллографии.

На рубеже десятилетней давности пространственное разрешение метода крио-ЭМ существенно возросло. Метод молекулярной динамики стал

применяться для улучшения крио-ЭМ структур среднего ($4\text{--}6$ Å) и даже высокого (менее 4 Å) разрешения. Один из таких усовершенствованных подходов к определению положений атомов макромолекулы для их оптимального соответствия карте плотности, полученной методом крио-ЭМ, названный «Молекулярная динамика, управляемая корреляцией» (Correlation-Driven Molecular Dynamics, CDMD), предлагается в работе Игаева и соавт. [31]. Так же, как и в предыдущем методе, результат достигается за счет введения дополнительного глобального возмущающего потенциала. Отличие состоит в том, что в итерационном процессе вычисляется корреляционный коэффициент между плотностью крио-ЭМ и плотностью, соответствующей текущим координатам атомов, на основании которого уже вычисляются возмущающие силы. Процесс повторяется много раз и приводит к построению пространственной структуры, которая лучше соответствует экспериментальной карте плотности крио-ЭМ, чем начальная структура.

Метод CDMD применен для определения координат атомов димера ГДФ-тубулина в прямой конформации на основании карты плотности крио-ЭМ среднего разрешения ($4,1$ Å) декорированной кинезином микротрубочки. Для этой карты плотности не было доступной соответствующей пространственной структуры, однако существовали две структуры ГДФ-тубулина высокого разрешения в том же конформационном состоянии, которые были использованы авторами в качестве контроля для подтверждения точности и сходимости метода. В качестве начальной модели использовалась изогнутая структура ГДФ-тубулина в растворе, полученная из ~ 3 мс траектории молекулярной динамики. Несмотря на более высокую точность контрольных структур, полученная методом CDMD модель достигла той же корреляции с полной картой плотности, что и контрольные структуры. Это особенно примечательно, поскольку карта плотности имела более низкое разрешение $4,1$ Å, по сравнению с картами, используемых для генерации контрольных структур ($3,3$ Å и $3,5$ Å).

Аналогичный по духу подход «Density-Restrained MD» был применен в работе Эшун-Уилсон и соавт. [32] для моделирования плотности, соответствующей ансамблю конфигураций гибкой петли ацетилирования тубулина.

Заключение

Таким образом, неуклонное развитие технологий неизбежно приводит к увеличению возможностей, переводя в класс выполнимых даже такие задачи, с которыми структурные методы не могли справиться длительное время. Мы ожидаем, что развитие методов денойзинга, которые уже внесли ощутимый вклад в визуализацию подвижных протофиламентов на конце микротрубочек [26, 27] в комбинации с повышением точности методов

молекулярного моделирования позволят напрямую визуализировать важнейшие регуляторные С-концевые участки тубулинов, как в контексте взаимодействия с белками-эффекторами, так и без них, открывая широкие перспективы понимания механизмов контроля над динамикой тубулинового цитоскелета в клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Desai A., Mitchison T.J. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1997;13:83–117.
- Gudimchuk N.B., McIntosh J.R. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2021;22(12):777–795.
- Roll-Mecak A. The tubulin code in microtubule dynamics and information encoding. *Dev. Cell.* 2020;54(1):7–20.
- McKenna E.D., Sarbanes S.L., Cummings S.W., Roll-Mecak A. The tubulin code, from molecules to health and disease. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2023;39:331–361.
- Janke C., Magiera M.M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2020;21(6):307–326.
- Wagstaff J.M., Planelles-Herrero V.J., Sharov G., Alnami A., Kozielski F., Derivery E., Löwe J. Diverse cytomotive actins and tubulins share a polymerization switch mechanism conferring robust dynamics. *Sci. Adv.* 2023;9(13):eadf3021.
- Alushin G.M., Lander G.C., Kellogg E.H., Zhang R., Baker D., Nogales E. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell.* 2014;157(5):1117–1129.
- Manka S.W., Moores C.A. The role of tubulin–tubulin lattice contacts in the mechanism of microtubule dynamic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018;25(7):607–615.
- Zhang R., LaFrance B., Nogales E. Separating the effects of nucleotide and EB binding on microtubule structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018;115(27):E6191–E6200.
- Zhang R., Alushin G.M., Brown A., Nogales E. Mechanistic origin of microtubule dynamic instability and its modulation by EB proteins. *Cell.* 2015;162(4):849–859.
- Debs G.E., Cha M., Liu X., Huehn A.R., Sindelar C.V. Dynamic and asymmetric fluctuations in the microtubule wall captured by high-resolution cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020;117(29):16976–16984.
- LaFrance B.J., Roostalu J., Henkin G., Greber B.J., Zhang R., Normanno D., McCollum C.O., Surrey T., Nogales E. Structural transitions in the GTP cap visualized by cryo-electron microscopy of catalytically inactive microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022;119(2):e2114994119.
- Estévez-Gallego J., Blum T.B., Ruhnow F., Gili M., Speroni S., García-Castellanos R., Steinmetz M.O., Surrey T. Hydrolysis-deficient mosaic microtubules as faithful mimics of the GTP cap. *Nat. Commun.* 2025;16(1):2396.
- Wang Q., Crevenna A.H., Kunze I., Mizuno N. Structural basis for the extended CAP-Gly domains of p150(glued) binding to microtubules and the implication for tubulin dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111(31):11347–11352.
- Benoit M.P.M.H., Rao L., Asenjo A.B., Gennerich A., Sosa H. Cryo-EM unveils kinesin KIF1A's processivity mechanism and the impact of its pathogenic variant P305L. *Nat. Commun.* 2024;15(1):5530.
- Alushin G.M., Musinipally V., Matson D., Tooley J., Stukenberg P.T., Nogales E. Multimodal microtubule binding by the Ndc80 kinetochore complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012;19(11):1161–1167.
- Ustinov N.B., Korshunova A.V., Gudimchuk N.B. Protein complex NDC80: properties, functions, and possible role in pathophysiology of cell division. *Biochemistry (Mosc.)*. 2020;85(4):448–462.
- Zehr E.A., Roll-Mecak A. Cryo-EM structures of human $\alpha 1\beta / \beta 1 + \beta IV \beta$ microtubules shed light on isoform specific assembly. *BioRxiv*. 2023:2023.12.01.569594.
- Chen J., Kholina E., Szyk A., Fedorov V.A., Kovalenko I., Gudimchuk N., Roll-Mecak A. α -tubulin tail modifications regulate microtubule stability through selective effector recruitment, not changes in intrinsic polymer dynamics. *Dev. Cell.* 2021;56(14):2016–2028.e4.
- McIntosh J.R., Grishchuk E.L., Morphew M.K., Efremov A.K., Zhudenzov K., Volkov V.A., Cheeseman I.M., Desai A., Mastroratte D.N., Ataullakhanov F.I. Fibrils connect microtubule tips with kinetochores: a mechanism to couple tubulin dynamics to chromosome motion. *Cell.* 2008;135(2):322–333.
- Höög J.L., Huisman S.M., Sebö-Lemke Z., Sandblad L., McIntosh J.R., Antony C., Brunner D. Electron tomography reveals a flared morphology on growing microtubule ends. *J. Cell Sci.* 2011;124(Pt. 5):693–698.
- McIntosh J.R., O'Toole E., Morgan G., Austin J., Ulyanov E., Ataullakhanov F., Gudimchuk N.B. Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. *J. Cell Biol.* 2018;217(8):2691–2708.
- Atherton J., Stouffer M., Francis F., Moores C.A. Microtubule architecture in vitro and in cells revealed by cryo-electron tomography. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* 2018;74(Pt. 6):572–584.
- Gudimchuk N.B., Ulyanov E.V., O'Toole E., Page C.L., Vinogradov D.S., Morgan G., Li G., Moore J.K., Szczesna E., Roll-Mecak A., Ataullakhanov F.I., McIntosh J.R. Mechanisms of microtubule dynamics and force generation examined with computational modeling and electron cryotomography. *Nat. Commun.* 2020;11(1):3765.
- Buchholz T.-O., Jordan M., Pigino G., Jug F. Cryo-CARE: content-aware image restoration for cryo-transmission electron microscopy data. *2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019)*. IEEE; 2019:502–506.
- Kalutskii M., Grubmüller H., Volkov V.A., Igaev M. Microtubule dynamics are defined by conformations and stability of clustered protofilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2025;122(22):e2424263122.
- Iyer S.S., Chen F., Ogunmolu F.E. et al. Centriolar cap proteins CP110 and CPAP control slow elongation of microtubule plus ends. *J. Cell Biol.* 2025;224(3):e202406061.
- Garnham C.P., Vemu A., Wilson-Kubalek E.M., Yu I., Szyk A., Lander G.C., Milligan R.A., Roll-Mecak A. Multivalent microtubule recognition by tubulin tyrosine ligase-like family glutamylases. *Cell.* 2015;161(5):1112–1123.

29. Fera A., Reese T., Zimmerberg J., Sackett D. Radial carboxyterminal peptides of tubulin directly imaged in microtubules by electron microscopy tomography exploiting amplitude contrast. *ResearchGate preprint*. 2021;10.21203/rs.3.rs-409249/v1.

30. Trabuco L.G., Villa E., Schreiner E., Harrison C.B., Schulten K. Molecular dynamics flexible fitting: A practical guide to combine cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Methods*. 2009;49(2):174–180.

31. Igaev M., Kutzner C., Bock L.V., Vaiana A.C., Grubmüller H. Automated cryo-EM structure refinement

using correlation-driven molecular dynamics. *Elife*. 2019;8:e43542.

32. Eshun-Wilson L., Zhang R., Portran D., Nachury M.V., Toso D.B., Löhr T., Vendruscolo M., Bonomi M., Fraser J.S., Nogales E. Effects of α -tubulin acetylation on microtubule structure and stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019;116(21):10366–10371.

Поступила в редакцию 29.06.2025

После доработки 27.07.2025

Принята в печать 02.08.2025

REVIEW

Studying flexible elements of microtubule structure using cryo-electron microscopy and molecular modeling: mission possible?

V.A. Fedorov^{1,*} , E.G. Kholina¹ , N.B. Gudimchuk² , I.B. Kovalenko¹ 

¹Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–24 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Biophysics, School of Physics, Lomonosov Moscow State University, 1–2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: xbgth@yandex.ru

Microtubules are the basic elements of the cytoskeleton of eukaryotic cells. Due to their multifunctionality, unique structure and high mechanical rigidity, they remain a favorite object of research using various microscopy techniques, including cryo-electron microscopy. Despite impressive advances in visualizing the microtubule lattice, flexible elements of their structure – individual protofilaments at the assembling or disassembling ends, as well as regulatory unstructured peptides known as C-terminal “tails” – are still poorly visualized. In this paper, we discuss progress in the application of cryo-electron microscopy and tomography to the study of these structural elements, as well as the role and potential of molecular modeling methods for the analysis and interpretation of the obtained experimental data.

Keywords: microtubules, tubulin, cryo-electron microscopy, molecular dynamics, flexible structural elements

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 24-74-00002 (<https://rscf.ru/project/24-74-00002/>).

Сведения об авторах

Федоров Владимир Андреевич – канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: xbgth@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9397-1548>

Холина Екатерина Георгиевна – канд. биол. наук, ст. преп. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: tenarra@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5918-5084>

Гудимчук Никита Борисович – докт. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-06; e-mail: nikita_gb@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7283-8959>

Коваленко Илья Борисович – докт. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: ikovalenko78@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4949-6591>

ОБЗОР



УДК 576.311.348.7:576.311.346.2

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

И.Б. Алиева^{1, 2, *} , А.С. Шахов^{1, 2} , А.С. Чуркина^{1, 2} , А.А. Минин² 

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;

²Институт белка, Российская академия наук, Россия, 142290, Московская область, г.о. Серпухов, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4

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

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

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

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

Введение

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

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

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

Цитоскелет клетки — динамичный ансамбль из трех компонентов

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

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

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

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

Виментин — уникальный белок промежуточных филаментов

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

Взаимодействие виментиновых филаментов с митохондриями

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

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

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

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

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

Революция в исследовании структуры виментиновых филаментов

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

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

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

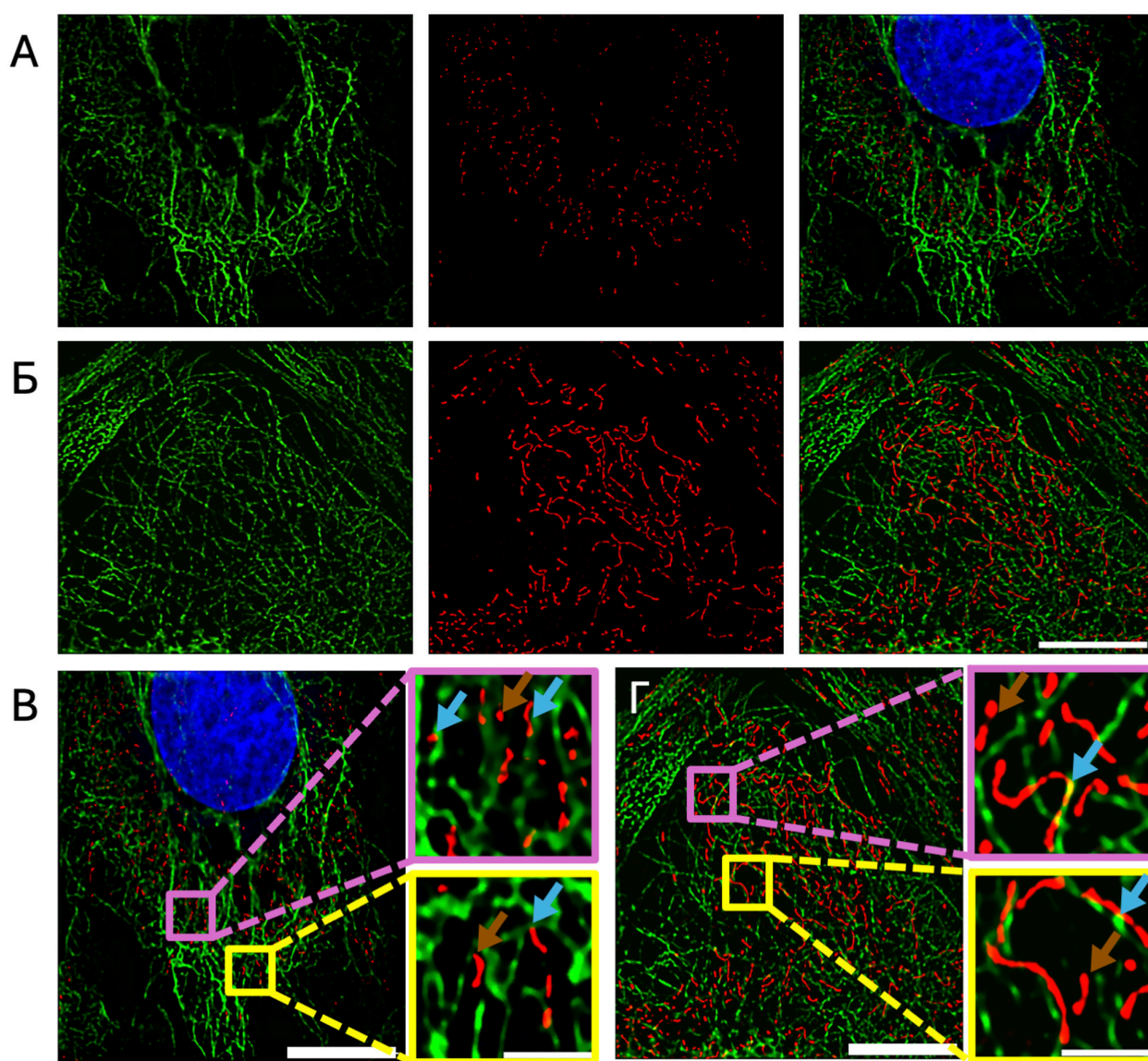


Рис. 1. Анализ колокализации митохондрий (средние фото панелей А и Б, окрашены красным цветом) с компонентами цитоскелета (левые фото панелей А и Б, окрашены зеленым цветом) на изображениях, полученных с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения. А (правое фото), В — взаимное расположение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

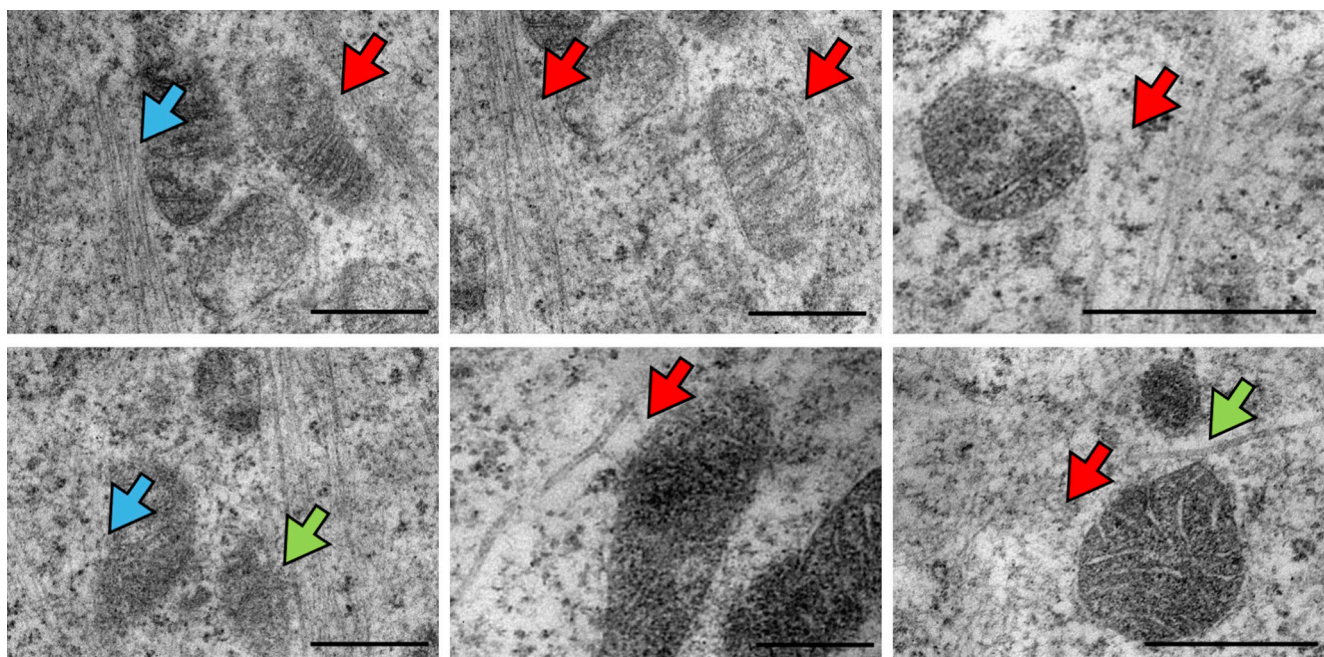


Рис. 2. Исследование взаимодействия митохондрий с различными элементами цитоскелета методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Несмотря на высокое разрешение, ТЭМ не всегда позволяет сделать однозначный вывод о наличии или отсутствии взаимодействия между митохондриями и компонентами цитоскелета.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

Возможно ли преодолеть «разрыв в разрешении»?

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

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

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

Заключение

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

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

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

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

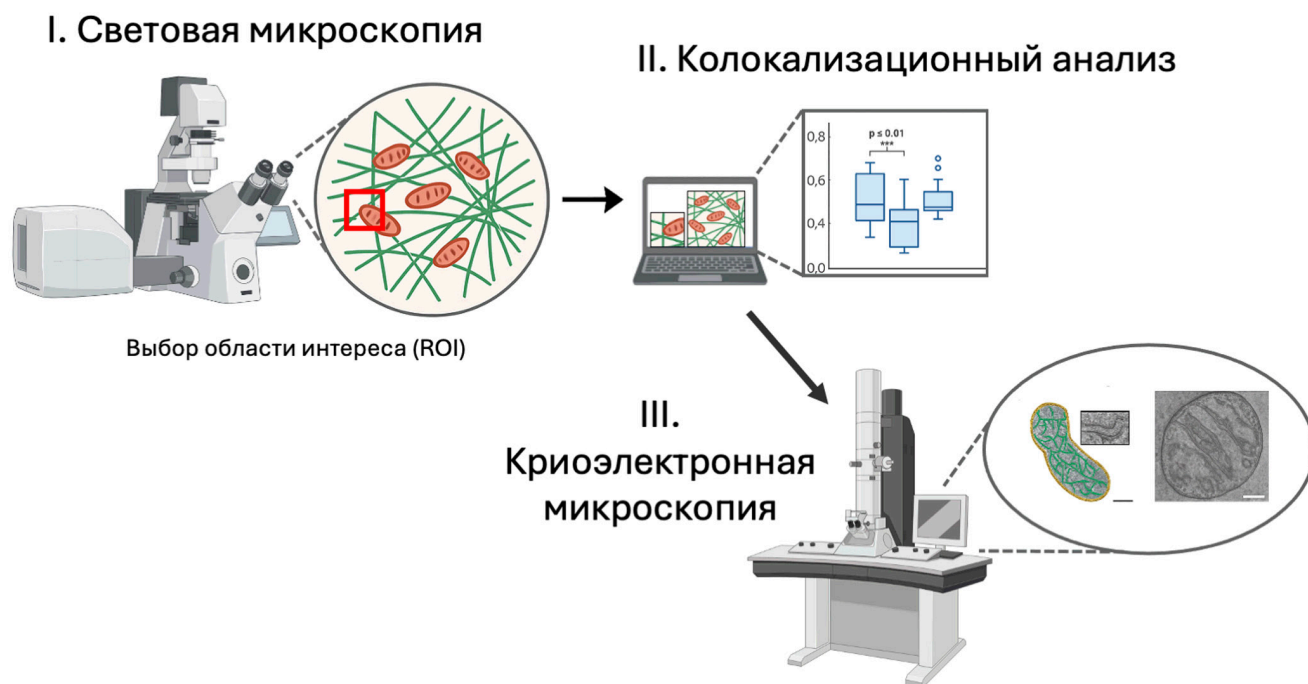


Рис. 3. Предлагаемая схема исследования, позволяющая выявлять участки колокализации митохондрий с компонентами цитоскелета. На первом этапе по изображениям, полученным методом флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, определяются области взаимодействия митохондрий с отдельными компонентами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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

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

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

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

Поступила в редакцию 14.07.2025

После доработки 10.09.2025

Принята в печать 11.09.2025

REVIEW

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

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

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

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

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

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

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

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

Сведения об авторах

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

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

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

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

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.352.3

Морфология эритроцитов указывает на различие механизмов формирования внеклеточных везикул эритроцитарного происхождения

Е.Ю. Паршина^{1, *} , Л.С. Фролова², Г.В. Максимов¹ 

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;

²Department of Chemistry, Irving K. Barber Faculty of Science, University of British Columbia Okanagan, 3247 Research Road, Kelowna, BC V1V 1V7, Canada

*e-mail: parshinae@gmail.com

Внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения (ЭВ) являются перспективным средством «адресной доставки лекарств», в связи с чем целью работы стало сравнение ряда методов получения ЭВ из эритроцитов *in vitro*. С помощью сканирующей электронной микроскопии установлено, что при ряде воздействий (кальциевый ионофор A23187, додецилсульфат натрия, лизофосфатидная кислота и инкубация при 50°C) эритроциты отщепляют ЭВ. Различие в морфологии эритроцитов, подвергнутых воздействиям, стимулирующим выделение ЭВ, указывает на различие механизмов формирования ЭВ. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния показано, что ЭВ, полученные методом термической обработки, могут содержать гемоглобин, в то время как при воздействии додецилсульфата натрия образуются везикулы без гемоглобина. Полученные данные позволят целенаправленно выбирать метод получения ЭВ в соответствии с требованиями к их составу.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения, сканирующая электронная микроскопия, эритроцит

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-4

Внеклеточные везикулы (ВВ) и внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения (эритроцитарные везикулы, ЭВ), в частности, обладают множеством важных характеристик, которые подходят для применения в биомедицине, в частности для доставки лекарств. Во-первых, как побочный продукт функционирования клеток организма ВВ биосовместимы и не вызывают иммунной реакции [1]. Во-вторых, благодаря малым размерам (как правило, менее 200 нм) ВВ могут преодолевать гематоэнцефалический барьер [1–3], а благодаря наличию рецепторов на поверхности проникать через клеточные мембраны, что идеально для доставки лекарств на основе РНК (siRNA и miRNA) [4]. В-третьих, ВВ способны обходить систему комплемента и факторов свертывания крови, благодаря чему обеспечивается их высокая стабильность в крови [4]. В-четвертых, способность ВВ сохранять некоторые компоненты мембраны исходной клетки может быть использована для формирования вектора при доставке лекарств [4]. Для доставки лекарств важно, что гидрофильные вещества могут быть локализованы в водной полости ВВ, в то

время как гидрофобные/липофильные вещества могут быть локализованы в липидном бислое [5].

Эритроциты являются легкодоступным источником ВВ, при использовании эритроцитов для производства ВВ нет необходимости культивировать клетки, что устраняет риск мутаций [6]. В отличие от ядерных клеток, эритроциты не содержат ДНК, и, следовательно, ВВ, полученные из эритроцитов, не представляют риска горизонтального переноса генов при доставке лекарств [6]. Кроме того, эритроциты для производства ЭВ могут быть получены от самого пациента, таким образом обеспечивается полная биосовместимость.

В то же время, ЭВ имеют некоторые особенности, отличающие их от остальных типов ВВ. В физиологических условиях внеклеточные везикулы эритроцитарного происхождения составляют около 7,3% всех ВВ, обнаруженных в крови [7]. Эритроциты могут высвобождать только эктосомы — везикулы, отщепляющиеся наружу от клеточной мембраны, поскольку у них отсутствует механизм для производства экзосом, который существует в ядерных клетках [8]. В процессе развития в костном мозге незрелые эритроциты — ретикулоциты —

могут высвобождать экзосомы, однако после накопления гемоглобина и утраты ядра эритроциты производят только эктосомы [9]. Что касается апоптотических телец, которые тоже относят к ВВ, поскольку запрограммированная смерть эритроцитов, эриптоз, отличается от апоптоза, эритроциты не могут высвобождать апоптотические тельца.

В настоящее время известны следующие механизмы образования ЭВ. Повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} запускает процессы, приводящие к отпочкованию ЭВ от поверхности мембраны [7, 9–11]. Этот механизм высвобождения тесно связан с эриптозом [7, 10]. Увеличение концентрации кальция в цитозоле приводит к активации Ca^{2+} -чувствительного K^+ -канала и потере катионов калия эритроцитом, что в свою очередь стимулирует выход Cl^- [11, 12], а следом выход воды под действием сил осмоса, что приводит к сжатию эритроцита [11, 13]. Кроме того, повышение внутриклеточного Ca^{2+} в эритроцитах активирует скрамблазу и флоппазу, и ингибирует флиппазу, ферменты, поддерживающие асимметрию распределения фосфолипидов во внутреннем и внешнем монослоях мембраны [7, 14]. В покоящихся клетках флоппаза и скрамблаза неактивны, но после активации флоппаза экстернализует фосфатидилсерин (phosphatidylserine, PS), а скрамблаза не специфически перераспределяет отрицательно заряженные фосфолипиды к внутреннему и внешнему листкам мембраны [7]. В результате PS, который обычно находится во внутреннем монослое мембраны, экспонируется на поверхности клеток, а асимметрия распределения фосфолипидов в мембране нарушается [15], что приводит к увеличению площади внешнего монослоя мембраны и способствует формированию выпячивания наружу плазматической мембраны эритроцита [16, 17]. При значительной разнице в соотношении площадей монослоев мембраны такое выпячивание может отпочковываться наружу в виде везикулы [16]. Увеличение цитозольного Ca^{2+} активирует фермент кальпаин, разрушающий белки подмембранного цитоскелета эритроцитов, что приводит к освобождению мембраны и также способствует образованию везикул [11, 12, 18].

Несмотря на значительный потенциал для биомедицинских применений, методы производства ЭВ для доставки лекарств остаются недостаточно разработанными. В большинстве исследований используют гемолиз эритроцитов для получения эритроцитарных теней с последующей экструзией теней через пористые мембраны для производства ЭВ [19–22], либо за счет увеличения внутриклеточного Ca^{2+} для индукции везикуляции в эритроцитах [6, 23, 24]. В то же время, метод получения ЭВ может напрямую влиять на их состав и функциональные свойства. Учитывая важность изучения ЭВ с точки зрения их потенциала для доставки лекарств, целью настоящей работы

стала разработка нескольких методов индукции высвобождения ЭВ из эритроцитов *in vitro* и характеристика полученных ЭВ с точки зрения их размера, биогенеза и содержания гемоглобина.

Материалы и методы

Получение ЭВ. Везикулы были получены из эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров в пластиковые пробирки с гепарином (30 Ед./мл; кровь предоставлена НМИЦ кардиологии имени академика А.Е. Чазова). Эритроцитарную массу получали трехкратным центрифугированием в изотоническом буфере Аллена (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ CaCl_2 , 1 мМ MgSO_4 , 4 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 1 мМ $\text{NaN}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 10 мМ глюкоза; pH 7,2–7,4) при 1300 g, 4°C в течение 7 мин. В работе использовали эритроцитарную массу с гематокритом 3–5%.

Для получения внеклеточных везикул из эритроцитов использовали следующие методы.

Инкубирование с кальциевым ионофором A23187 в кальций-содержащем буфере. Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 5 мкМ ионофора A23187. Контрольный образец инкубировали при 37°C в течение 30 мин с эквивалентным количеством растворителя (диметилсульфоксид, ДМСО) [8].

Инкубирование эритроцитов с анионным амфифилом додецилсульфатом натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS). Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 50 мкМ SDS [25].

Инкубирование эритроцитов с анионным амфифилом лизофосфатидной кислотой (lysophosphatidic acid, LPA). Эритроцитарную массу инкубировали при 37°C в течение 30 мин в присутствии 20 мкМ LPA. Контрольный образец для второго и третьего методов представлял собой эритроцитарную массу, инкубированную при 37°C в течение 30 мин с добавлением эквивалентного количества дистиллированной воды [26].

Термическая обработка. Для индукции везикуляции эритроцитов эритроцитарную массу инкубировали при 50°C в течение 10 мин. Контрольный образец инкубировали при комнатной температуре [27].

После инкубации отбирали 10 мкл суспензии эритроцитов для морфологического анализа. Затем все образцы центрифугировали при 3500 g, 4°C в течение 20 мин для осаждения эритроцитов. Надосадочную жидкость собирали и повторно центрифугировали при 3500 g, 4°C в течение 5 мин для удаления оставшихся крупных частиц, белковых агрегатов и эритроцитов (везикулы оставались в супернатанте). Полученный супернатант снова центрифугировали при 16000 g, 4°C в течение 60 мин. Осадок внеклеточных везикул ресуспендировали в 150 мкл буфера Аллена и хранили при –80°C в течение суток.

Сканирующая электронная микроскопия. Суспензию эритроцитов, подвергавшуюся воздействию, вызывающим везикуляцию и в контроле, фиксировали 0,5%-ным раствором глutarового альдегида в буфере Аллена в течение 1 ч и отмывали дистиллированной водой путем четырехкратного центрифугирования (2 мин при 4500 g). Осажденные эритроциты наносили в виде мазка на стекло и высушивали на воздухе. Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на образцы напыляли слой золота или платины толщиной 20 нм. Образцы изучали на сканирующих электронных микроскопах KYKY-EM6200 (KYKY TECHNOLOGY, Китай) и TESCAN VEGA 3 SBH (TESCAN GROUP, Чехия).

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Для исследования спектров комбинационного рассеяния использовали фиксированные и высушенные на стеклах образцы эритроцитов, полученные для оптической микроскопии. Спектры регистрировали на комбинированном микроспектрометре Ntegra-Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия) с использованием 100× объектива, длины волны возбуждения 532 нм и мощности 5 мВт. Время регистрации одного спектра составляло 60 с. Обработку спектров и коррекцию базовой линии проводили с помощью оригинальной программы Raman.

Результаты и обсуждение

С использованием кальциевого ионофора, анионных амфифилов и термической обработки были получены ЭВ из эритроцитов человека. Оценочные эксперименты по измерению содержания белка по методу Лоури показали, что наибольшее количество везикул (в пересчете на белок) выделяется при действии ионофора A23187 в кальций-содержащем растворе, а определенный методом динамического светорассеяния диаметр ЭВ во всех

случаях составляет от 300 до 500 нм (данные не представлены).

Исследование морфологии методом СЭМ показало, что эритроциты, подвергшиеся обработке, индуцирующей высвобождение ЭВ, существенно меняют свою морфологию во всех исследованных случаях (рис. 1). При этом кальциевый ионофор A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере, додецилсульфат натрия и лизофосфатидная кислота вызывают образование выростов (спикул) на поверхности эритроцитов, которые превращаются в эхиноциты, в то время как инкубация при температуре 50°C приводит к тому, что эритроциты принимают сферическую форму и от них отщепляются сферические или каплеобразные фрагменты.

Важной особенностью является то, что форма эхиноцитов при различных воздействиях существенно различается между собой, что указывает на различие изменения, происходящих в клетках, и в механизме формирования отщепляющихся везикул. Повышение содержания Ca^{2+} в эритроците меняет активность ферментов, которые регулируют асимметрию фосфолипидов [7, 14]. Активация Ca^{2+} -чувствительного K^+ -канала [11, 12] и последующий выход ионов хлора Cl^- приводит к потере клеткой воды и сжатию эритроцита [11, 13]. На рис. 1Б видно, что клетки принимают компактную сферическую форму и несут тонкие, иногда нитевидные выросты. Такие выросты могут отпочковываться, формируя ЭВ, если изменения активности ферментов значительны [16], или с помощью кальпаина, который разрушает белки, прикрепляющие мембрану к цитоскелету [11, 12, 18]. Известно также, что ЭВ, продуцируемые стимуляцией A23187- Ca^{2+} , обогащены диацилглицерином, возможно, что диацилглицерин выполняет важную роль в образовании спикул [28]. Предполагается, что при увеличении цитозольного Ca^{2+} в эритроцитах диацилглицерин образуется во внутреннем

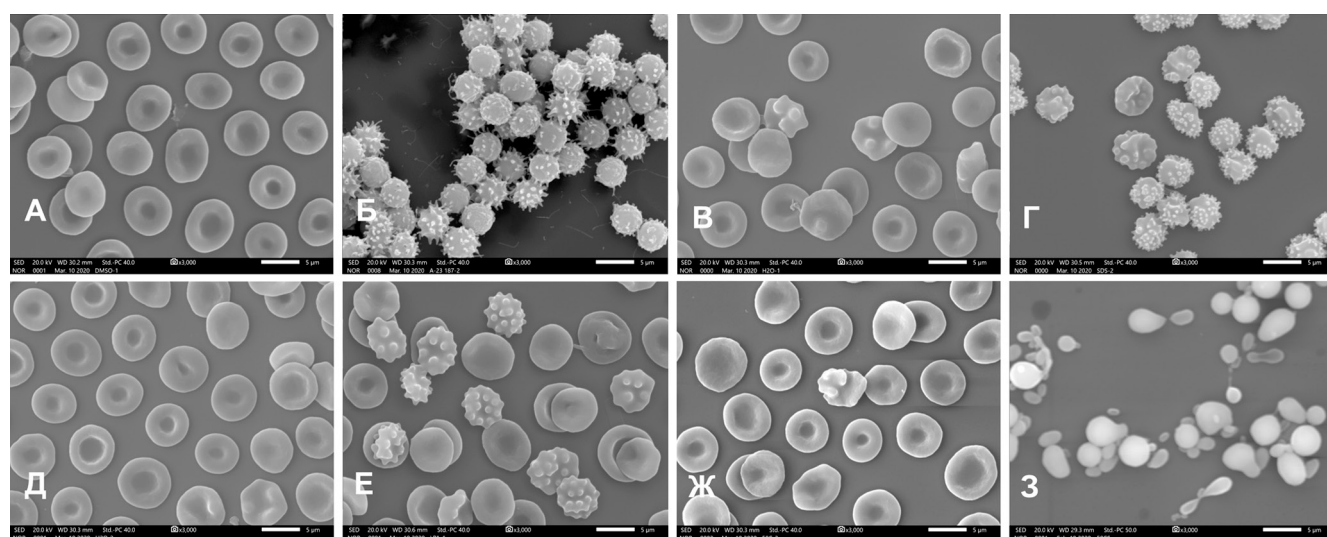


Рис. 1. Изображения эритроцитов, полученные методом СЭМ в контроле (А, В, Д, Ж) и при действии кальциевого ионофора A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере (Б), додецилсульфата натрия (SDS) (Г), лизофосфатидной кислоты (LPA) (Е) и термической обработки при 50°C (З). Размер масштабного отрезка 5 мкм, увеличение $\times 3000$.

листке мембраны стимулированной Ca^{2+} фосфолипазой C, и это нарушает асимметрию мембраны, вызывая искривление и сокращение, необходимые для почкования. Кроме того, диацилглицерол обладает фузогенными свойствами и может вызывать слияние мембран на цитоплазматической поверхности спикул, что необходимо для их почкования и высвобождения в качестве ЭВ [28]. Независимо от объяснения их образования, спикулы, показанные на рис. 1Б, являются предшественниками ЭВ и были названы «протоветукулами» [29]. В работах других авторов [30, 31] с помощью электронной микроскопии наблюдали остатки таких спикул в виде характерных «хвостов» на самих ЭВ, полученные при обработке A23187- Ca^{2+} . Отщепление ветукул приводит к потере мембраны клетки, что снижает соотношение площади мембраны к объему клетки и приводит к формированию сфероцитов [26, 29, 30].

Инкубация с SDS, анионным амфифильным соединением, также приводит к образованию выростов на клетках и формированию эхиноцитов. Однако эритроциты после обработки SDS имеют менее сферическую форму, а выступы на их поверхности не имеют нитевидной формы, как при действии A23187- Ca^{2+} . При этом формируются выступы двух типов — гладкие крупные выросты, как в случае обычных эхиноцитов, которые наблюдаются в малом количестве в нормальной крови (см. контрольный образец на рис. 1В) и более мелкие выросты, покрывающие иногда часть клетки. SDS имеет отрицательный заряд и распределяется во внешнем монослое мембраны, поскольку в норме внутренний монослой богат PS и сам заряжен отрицательно, способствуя проникновению во внутренний монослой положительных, но не отрицательных амфифильных молекул. Встраиваясь во внешний монослой, SDS увеличивает его площадь и за счет разности в площадях внешнего и внутреннего монослоев создает повышенную кривизну мембраны, образование выступов и переход от формы дискоцита к форме эхиноцита [17, 32]. Встраивание молекулы в мембрану может вызывать также образование пор, индуцирующее механизм ветукуляции, подобный эриптозу, который защищает клетку от гемолиза [33–35].

Инкубация с LPA приводит к трансформации части клеток в форму эхиноцитов 2–3-го типов. В отличие от A23187- Ca^{2+} и SDS, в этом случае наблюдаются крупные выросты, как у обычных эхиноцитов, присутствующих в нормальной крови. Образование таких выростов при действии LPA показано ранее [36]. Важно отметить, что хотя амфифильная молекула LPA также отрицательно заряжена, как и SDS, однако изменения морфологии существенно отличаются. Это можно объяснить тем, что жирнокислотный хвост SDS включает 12 атомов углерода, тогда как LPA — как правило, 18, также жирная кислота в составе LPA

может быть ненасыщенной. Короткая молекула SDS имеет форму перевернутого треугольника с относительно большой полярной головкой, в то время как в случае LPA скорее форму трапеции с суженным нижним основанием, поскольку наличие цис-двойной связи делает молекулу нелинейной и увеличивает латеральное пространство, занимаемое жирнокислотным остатком. Таким образом, различие формы амфифильных молекул влияет на изменения, производимые ими в мембране. LPA, по-видимому, также встраивается во внешний монослой, однако за счет длины гидрофобного хвоста, совпадающей с длиной других фосфолипидов, изменения кривизны поверхности наблюдаются в меньшей степени.

Не исключено, что включение как молекул SDS, так и LPA в мембрану приводит к образованию локальных дефектов мембраны и проникновению ионов кальция в цитоплазму [26]. Однако возможны и кальций-независимые механизмы, например, LPA активирует кальций-независимую РКС ζ , активность которой приводит к экспонированию PS во внешний монослой [26]. LPA также ингибирует флиппазу, которая отвечает за транспорт PS с внешней поверхности на цитозольную поверхность мембраны против градиента концентрации [26]. Нарушение асимметрии мембраны приводит к образованию внешних выступов, которые позже отпочковываются, образуя ветукулы [16]. Также, сходство морфологических трансформаций эритроцитов при действии SDS и LPA (отсутствие нитевидных выростов, которые образуются при действии A23187- Ca^{2+}) можно объяснить образованием пор в мембране при встраивании молекул LPA и SDS [15, 34, 35]. Наконец, возможно, что LPA в концентрации, использованной в настоящем исследовании (20 мкМ), оказывает более мягкое воздействие на эритроциты по сравнению с A23187- Ca^{2+} или SDS (концентрация 50 мкМ). В связи с этим на рис. 1Е меньше эхиноцитов и они не имеют игольчатых или нитевидных выступов.

Очевидные изменения в морфологии эритроцитов можно наблюдать после инкубации при 50°C в течение 10 мин (рис. 13). В то время как большинство необработанных эритроцитов сохранили свою форму дискоцитов (рис. 1Ж), эритроциты, подвергнутые воздействию температуры, трансформировались в сфероциты, окруженные более мелкими ветукулами различной формы (рис. 13). Подобные изменения описаны ранее [37–39]. При этом термическая обработка не вызывает образования эхиноцитов в отличие от других исследованных нами воздействий, что указывает на различие механизмов процессов ветукуляции. Известно, что при температуре 49–50°C денатурирует спектрин, основной белок цитоскелета в эритроцитах, образует матрицу на внутреннем мембранном листке, который связан с белком

полосы 3 в мембране через анкирин [40]. Ряд авторов предполагают, что повышение температуры индуцирует эриптоз [13, 27], который приводит к блеббину мембраны и высвобождению ЭВ через Ca^{2+} -зависимый механизм [7, 10]. Однако, в отличие от других случаев кальций-зависимого образования везикул, повышение температуры не вызывает образования эхиноцитов. В нашей работе [41] методом атомно-силовой микроскопии показано увеличение перепадов рельефа поверхности эритроцитов с характерными латеральными размерами около 200 нм при инкубации при 50°C, при этом эритроциты так же принимали сферическую форму и образовывали везикулы. Возможно, увеличение перепадов рельефа является предпосылкой формирования ЭВ.

Часть ЭВ, производимых эритроцитами, может содержать гемоглобин [42, 43], в других случаях сообщается об отсутствии гемоглобина в ЭВ [44]. Для определения наличия гемоглобина в ЭВ был использован метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия), который позволяет оценить химический состав образца [45, 46].

На рис. 2А представлены спектры цельной интактной крови (1) и фиксированных эритроцитов и везикул. Видно, что спектр крови соответствует спектру гемопорфирина гемоглобина (стрелками отмечены характерные для гемопорфирина полосы [46]). В случае фиксированных эритроцитов без обработки и инкубированных при повышенной температуре спектр отличается, что, по-видимому, связано с денатурацией гемоглобина в процессе фиксации глutarовым альдегидом, однако характерные полосы сохраняют свое положение и могут служить индикатором

присутствия гемоглобина. При инкубации при температуре 50°C спектр соответствует контрольному. В ЭВ, полученных в результате термической обработки эритроцитов, также регистрируется характерный спектр гемоглобина, однако с разной интенсивностью, что указывает на различное содержание гемоглобина, связанное, возможно, с различным размером везикул. При действии SDS в контрольном и обработанном SDS эритроцитах также регистрируется спектр гемоглобина, однако в везикулах спектр гемоглобина отсутствует. Возможно, это связано с меньшим размером везикул, полученным методом инкубации с SDS. Однако не исключено, что при таком механизме выделения ЭВ получаются ЭВ без гемоглобина. Таким образом, мы показали, что состав ЭВ зависит от метода выделения и, по-видимому, связан с механизмом образования везикул.

Заключение

Обобщая результаты работы, можно сказать, что полученные данные указывают на важную роль метода получения ЭВ, определяющего их состав, размер и свойства. В процессе выделения ЭВ эритроциты подвергаются морфологическим трансформациям, которые напрямую связаны с механизмами выделения везикул. Наиболее распространенный метод получения ЭВ с целью их дальнейшего использования в качестве транспортеров лекарственных препаратов — добавление кальциевого ионофора A23187 в Ca^{2+} -содержащем буфере. Везикулы в этом случае образуются в результате отщепления от спикул или нитевидных выростов, формирующихся на поверхности эритроцита. Другие способы получения ЭВ не демонстри-

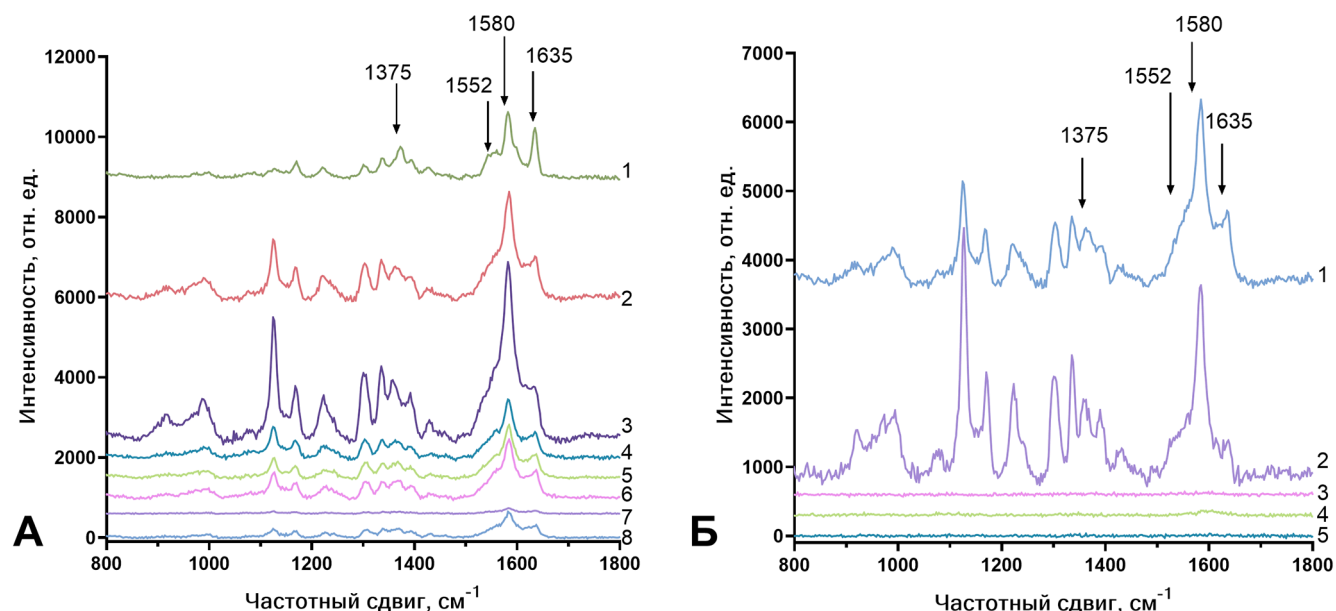


Рис. 2. Спектры КР эритроцитов и ЭВ при инкубации при температуре 50°C (А) и при добавлении SDS (50 мкМ) (Б). А — спектр цельной интактной крови (1), фиксированного эритроцита, инкубированного при комнатной температуре (2), фиксированного эритроцита, инкубированного при 50°C (3), отдельных ЭВ (4–8). Б — спектр фиксированного эритроцита без добавления SDS (1), спектр фиксированного эритроцита при добавлении SDS (50 мкМ) (2), спектры отдельных ЭВ (3–5).

руют образования такого рода структур, что указывает на возможность образования везикул другого состава. Везикулы, полученные методом термической обработки эритроцитов, могут иметь большие размеры и содержать гемоглобин, в отличие от везикул, полученных инкубацией с анионным детергентом SDS. Данные результаты указывают на важность выбора метода получения ЭВ в зависимости от целей их дальнейшего использования.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-74-

00006). Исследование было выполнено на базе отдела легочной гипертензии и заболеваний сердца Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени ак. Е.И. Чазова Минздрава России. Исследование было одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института клинической кардиологии имени А.Л. Мясникова Национального медицинского исследовательского центра кардиологии имени ак. Е.И. Чазова Минздрава России (протокол № 83 заседания Комитета от 31 октября 2022 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shahjin F., Chand S., Yelamanchili S.V. Extracellular Vesicles as Drug Delivery Vehicles to the Central Nervous System. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020;15(3):443–458.
2. Matsumoto J., Stewart T., Sheng L., Li N., Bullock K., Song N., Shi M., Banks W.A., Zhang J. Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathol. Commun.* 2017;5(1):71.
3. You Y., Ikezu T. Emerging roles of extracellular vesicles in neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 2019;130:104512.
4. Kim O.Y., Lee J., Gho Y.S. Extracellular vesicle mimetics: Novel alternatives to extracellular vesicle-based therapeutics, drug delivery, and vaccines. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2017;67:74–82.
5. Lai R.C., Yeo R.W.Y., Tan K.H., Lim S.K. Exosomes for drug delivery – a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol. Adv.* 2013;31(5):543–551.
6. Usman W.M., Pham T.C., Kwok Y.Y., Vu L.T., Ma V., Peng B., Chan Y.S., Wei L., Chin S.M., Azad A., He A.B.-L., Leung A.Y.H., Yang M., Shyh-Chang N., Cho W.C., Shi J., Le M.T.N. Efficient RNA drug delivery using red blood cell extracellular vesicles. *Nat. Commun.* 2018;9(1):2359.
7. Tissot J.-D., Canellini G., Rubin O., Angelillo-Scherer A., Delobel J., Prudent M., Lion N. Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Transl. Proteomics.* 2013;1(1):38–52.
8. Jank H., Salzer U. Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils. *Sci. World J.* 2011;11(1):173–185.
9. Kuo W.P., Jia S., editors. *Extracellular Vesicles: Methods and Protocols*. N.Y.: Springer New York; 2017. doi:10.1007/978-1-4939-7253-1
10. Harisa G.I., Badran M.M., Alanazi F.K. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach. *Saudi Pharm. J.* 2017;25(1):8–17.
11. Lang E., Qadri S.M., Lang F. Killing me softly – Suicidal erythrocyte death. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012;44(8):1236–1243.
12. Lang F., Gulbins E., Lang P.A., Zappulla D., Föller M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 2010;26(1):21–28.
13. Föller M., Kasinathan R.S., Koka S., Lang C., Shumilina E., Birnbaumer L., Lang F., Huber S.M. TRPC6 contributes to the Ca^{2+} leak of human erythrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 2008;21(1–3):183–192.
14. Daleke D.L. Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr. Opin. Hematol.* 2008;15(3):191–195.
15. Nguyen D.B., Wagner-Britz L., Maia S., Steffen P., Wagner C., Kaestner L., Bernhardt I. Regulation of phosphatidylserine exposure in red blood cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011;28(5):847–856.
16. Kalra H., Adda C.G., Liem M., Ang C., Mechler A., Simpson R.J., Hulett M.D., Mathivanan S. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics.* 2013;13(22):3354–3364.
17. Sheetz M.P., Painter R.G., Singer S.J. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J. Cell Biol.* 1976;70(1):193–203.
18. Pant H.C., Virmani M., Gallant P.E. Calcium-induced proteolysis of spectrin and band 3 protein in rat erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983;117(2):372–377.
19. Ak G., Hamarat Şanlıer Ş. Erythrocyte membrane vesicles coated biomimetic and targeted doxorubicin nanocarrier: Development, characterization and *in vitro* studies. *J. Mol. Struct.* 2020;1205:127664.
20. AlQahtani S.A., Harisa G.I., Badran M.M., Al-Ghamdi K.M., Kumar A., Salem-Bekhit M.M., Ahmad S.F., Alanazi F.K. Nano-erythrocyte membrane-chaperoned 5-fluorouracil liposomes as biomimetic delivery platforms to target hepatocellular carcinoma cell lines. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 2019;47(1):989–996.
21. Hu C.-M.J., Zhang L., Aryal S., Cheung C., Fang R.H., Zhang L. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(27):10980–10985.
22. Malhotra S., Dumoga S., Sirohi P., Singh N. Red blood cells-derived vesicles for delivery of lipophilic drug camptothecin. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019;11(25):22141–22151.
23. Chang M., Hsiao J.-K., Yao M., Chien L.-Y., Hsu S.-C., Ko B.-S., Chen S.-T., Liu H.-M., Chen Y.-C., Yan C.-S., Huang D.-M. Homologous RBC-derived vesicles as ultrasmall carriers of iron oxide for magnetic resonance imaging of stem cells. *Nanotechnology.* 2010;21(23):235103.
24. Wang L.-Y., Shi X.-Y., Yang C.-S., Huang D.-M. Versatile RBC-derived vesicles as nanoparticle vector of photosensitizers for photodynamic therapy. *Nanoscale.* 2013;5(1):416–421.

25. Hägerstrand H., Isomaa B. Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 1992;1109(2):117–126.
26. Chung S.-M., Bae O.-N., Lim K.-M., Noh J.-Y., Lee M.-Y., Jung Y.-S., Chung J.-H. Lysophosphatidic acid induces thrombogenic activity through phosphatidylserine exposure and procoagulant microvesicle generation in human erythrocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27(2):414–421.
27. Vodyanoy V. Thermodynamic evaluation of vesicles shed by erythrocytes at elevated temperatures. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2015;133:231–238.
28. Allan D., Billah M.M., Finean J.B., Michell R.H. Release of diacylglycerol-enriched vesicles from erythrocytes with increased intracellular $[Ca^{2+}]$. *Nature.* 1976;261(5555):58–60.
29. Pompeo G., Girasole M., Cricenti A., Boumis G., Bellelli A., Amiconi S. Erythrocyte death *in vitro* induced by starvation in the absence of Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 2010;1798(6):1047–1055.
30. Allan D., Thomas P., Limbrick AR. The isolation and characterization of 60 nm vesicles ('nanovesicles') produced during ionophore A23187-induced budding of human erythrocytes. *Biochem. J.* 1980;188(3):881–887.
31. Shukla S.D., Berriman J., Coleman R., Finean J.B., Michell R.H. Membrane protein segregation during release of microvesicles from human erythrocytes. *FEBS Lett.* 1978;90(2):289–292.
32. Bütikofer P., Brodbeck U., Ott P. Modulation of erythrocyte vesiculation by amphiphilic drugs. *Biochim. Biophys. Acta BBA—Biomembr.* 1987;901(2):291–295.
33. Chernitsky E.A., Senkovich O.A., Rozin V.V. Dependence of erythrocyte vesiculation and hemolysis parameters on the concentration of sodium dodecyl sulfate. Vesicular-competitive hemolysis. *Membr. Cell Biol.* 2001;14(5):629–636.
34. Senkovich O.A., Chernitsky E.A. On the size of pores arising in erythrocytes under the action of detergents. *Membr. Cell Biol.* 1998;11(5):679–689.
35. Shalel S., Streichman S., Marmur A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. *J. Colloid Interface Sci.* 2002;252(1):66–76.
36. Moolenaar W.H., Van Meeteren L.A., Giepmans B.N.G. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *BioEssays.* 2004;26(8):870–881.
37. Baar S. Mechanisms of delayed red cell destruction after thermal injury. An experimental *in vitro* SEM study. *Br. J. Exp. Pathol.* 1974;55(2):187–193.
38. Baar S., Arrowsmith D.J. Thermal damage to red cells. *J. Clin. Pathol.* 1970;23(7):572–576.
39. Christel S., Little C. Morphological changes during heating of erythrocytes from stored human blood. *J. Therm. Biol.* 1984;9(3):221–228.
40. Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Manchenko E., Moroz V., Kozlov A. Conformational distortions of the red blood cell spectrin matrix nanostructure in response to temperature changes *in vitro*. *Scanning.* 2019;2019:8218912.
41. Parshina E.Yu., Yusipovich A.I., Platonova A.A., Grygorczyk R., Maksimov G.V., Orlov S.N. Thermal inactivation of volume-sensitive K^{+} , Cl^{-} cotransport and plasma membrane relief changes in human erythrocytes. *Pflug. Arch.—Eur. J. Physiol.* 2013;465(7):977–983.
42. Bosman G.J.C.G.M., Lasonder E., Groenen-Döpp Y.A.M., Willekens F.L.A., Werre J.M. The proteome of erythrocyte-derived microparticles from plasma: new clues for erythrocyte aging and vesiculation. *J. Proteomics.* 2012;76:203–210.
43. Thangaraju K., Neerukonda S.N., Katneni U., Buehler P.W. Extracellular vesicles from red blood cells and their evolving roles in health, coagulopathy and therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;22(1):153.
44. Huisjes R., Bogdanova A., Van Solinge W.W., Schiffelers R.M., Kaestner L., Van Wijk R. Squeezing for life — properties of red blood cell deformability. *Front. Physiol.* 2018;9:656.
45. Kitahama Y., Ozaki Y. Surface-enhanced resonance Raman scattering of hemoproteins and those in complicated biological systems. *The Analyst.* 2016;141(17):5020–5036.
46. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancheri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;387(5):1691–1703.

Поступила в редакцию 29.06.2025

После доработки 16.07.2025

Принята в печать 19.07.2025

ORIGINAL RESEARCH

The morphology of erythrocytes reveals differences in the mechanisms of erythrocyte derived extracellular vesicle formation

E.Yu. Parshina^{1,*} , L.S. Frolova², G.V. Maximov¹ 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–24 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Chemistry, Irving K. Barber Faculty of Science, University of British Columbia Okanagan, 3247 Research Road, Kelowna, BC V1V 1V7, Canada

*e-mail: parshinae@gmail.com

Erythrocyte-derived extracellular vesicles (EDEVs) are a promising tool for “targeted drug delivery,” and this study aimed to compare several methods of obtaining EDEVs from erythrocytes *in vitro*. Scanning electron microscopy revealed that under certain treatments (calcium ionophore A23187, SDS, LPA, and incubation at 50°C), erythrocytes shed EDEVs.

The differences in the morphology of erythrocytes subjected to EDEVs-stimulating treatments suggest distinct mechanisms of EDEVs formation. Raman spectroscopy showed that EDEVs obtained by heat treatment may contain hemoglobin, while SDS-induced treatment produces hemoglobin-free vesicles. The data obtained will allow for a targeted selection of EDEVs production methods based on their required composition.

Keywords: erythrocyte-derived extracellular vesicles, scanning electron microscopy, erythrocyte

Funding: This research was funded by Russian Science Foundation, project number 23-74-00006.

Сведения об авторах

Паршина Евгения Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: parshinae@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7072-0693>

Фролова Любовь Сергеевна — аспирант химического факультета Университета Британской Колумбии, Оканеган, Канада. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: fr.liubov@gmail.com

Максимов Георгий Владимирович — докт. биол. наук, проф. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-66; e-mail: gmaksimov@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7377-0773>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.54

**Мембранно-ассоциированные везикулы:
подходы к выделению и характеристике****О.А. Григорьева^{1,*} , Н.А. Басалова¹ , М.А. Виговский¹ , У.Д. Дьячкова¹ ,
Д.В. Багров² , О.С. Соколова² , А.Ю. Ефименко¹** ¹*Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, корп. 10;*²*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: grigorievaooa@my.msu.ru*

Межклеточная коммуникация является критически важной составляющей поддержания гомеостаза ткани. Одним из способов коммуникации является перенос широкого спектра биологически активных молекул — белков, нуклеиновых кислот (в первую очередь, некодирующих РНК) и липидов — в составе внеклеточных везикул (ВВ). Это позволяет клеткам-продуцентам ВВ изменять метаболическую и транскрипционную активность отдельных популяций клеток-мишеней в широком диапазоне и «настраивать» ее в соответствии с потребностями ткани. Большинство имеющихся работ сконцентрированы на изучении состава и функций секретируемых во внешнюю среду ВВ, тогда как изучение подкласса везикул, ассоциированного с мембраной (мембранно-ассоциированные везикулы, МАВ) затрудняется из-за отсутствия общепринятых методов их выделения из разных типов клеток, в том числе культивируемых, и характеристики. В данной работе мы приводим протокол, позволяющий выделять фракцию МАВ культивируемых мезенхимных стромальных/стволовых клеток с сохранением морфологии и жизнеспособности самих клеток с помощью обработки гиалуронидазой. Данный протокол показал наиболее высокую эффективность по сравнению с другими протестированными методами и позволяет получить фракцию, значимо обогащенную везикулами, что показано методами анализа траекторий наночастиц и просвечивающей электронной микроскопии. Проведенный сравнительный анализ характеристик МАВ и ВВ, секретируемых в среду, показал, что предлагаемый протокол выделения МАВ позволяет получить фракцию со сходной концентрацией частиц, однако они обладают меньшим размером по сравнению с ВВ. Таким образом описанный нами метод выделения позволяет получить фракцию МАВ для дальнейшего анализа их состава и функциональных особенностей.

Ключевые слова: *внеклеточные везикулы, мембранно-ассоциированные везикулы, мезенхимные стромальные/стволовые клетки, межклеточная коммуникация*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-5

Введение

В последние несколько лет использование внеклеточных везикул (ВВ), продуцируемых мезенхимными стромальными/стволовыми клетками (МСК), рассматриваются в качестве перспективного терапевтического подхода в лечении и разрешении различных патологических процессов: стимуляции регенерации тканей [1], регуляции иммунной системы [2], лечения фибротических, онкологических и инфекционных заболеваний [3] и др.

Термин «внеклеточные везикулы» относится к частицам, которые высвобождаются из клеток, разграничены липидным бислоем и не могут само-

стоятельно реплицироваться (т.е. не содержат функционального ядра) [4]. В настоящее время выделяют несколько подтипов ВВ (экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца и др). Однако точное разделение ВВ на подтипы осложнено рядом ограничений, прежде всего связанных с техническими возможностями методов разделений и отсутствием четких молекулярных маркеров различных подтипов (Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles, MISEV 2023). На поверхности многих животных клеток существуют мембранные везикулоподобные частицы, размер которых варьируется от сотен нанометров до одного микрона. Эти частицы долгое время рассматри-

вались как предшественники ВВ (в частности, микровезикул или экзосом), которые прикреплены к мембране до момента высвобождения в межклеточное пространство [5]. В настоящее время не существует научного термина для обозначения этой структуры на русском языке. Группа исследователей под руководством Йон Чена, в исследованиях которой был впервые описан данный класс ВВ, предложила термин «cell-bound membrane vesicles». Ранее нами было предложено использование термина «мембранно-ассоциированные везикулы» (МАВ) [6]. Было показано, что МАВ достоверно являются отдельным классом ВВ, так как у них отсутствует солокализация с поверхностными маркерами ВВ, они устойчивы к обработке детергентами, но растворимы в органических соединениях, а также не высвобождаются с поверхности клеток [5]. На сегодняшний день, однако, структура, белковые/липидные компоненты и функции МАВ остаются малоизученными.

В литературе описаны данные о составе и функциональной активности МАВ, продуцируемых эндотелиальными клетками [5] и лейкоцитами [7]. Однако практически ничего не известно о МАВ стромальных клеток, в том числе МСК. Изучение потенциально нового класса везикул затрудняется отсутствием протоколов их выделения и характеристики для культивируемых стромальных клеток.

Известно, что МАВ плохо выделяются при помощи ряда детергентов, таких как сапонин или SDS (sodium dodecyl sulfate) [8], однако могут быть выделены с помощью обработки Тритон X-100 в низких концентрациях [5, 8, 9]. Кроме того, ранее совместно с коллегами из Новосибирского государственного университета нами была показана возможность выделения МАВ с поверхности клеток крови при помощи последовательной обработки растворами ЭДТА и трипсином [10]. Проанализировав литературу, мы предположили механизмы, которые могли бы удерживать МАВ на поверхности клеток. Поскольку выделение МАВ возможно осуществлять с помощью трипсина можно предположить, что везикулы могут удерживаться на поверхности клеток с помощью белок-белковых (например, через рецепторы), взаимодействий. Поскольку для удаления белковых компонентов непосредственно с поверхности ВВ используют протеиназу К — сериновую протеазу, обладающую широким спектром специфичности [11], мы предположили, что данный фермент также может использоваться для выделения МАВ. Другим возможным компонентом, удерживающим МАВ на поверхности клетки, могут стать компоненты внеклеточного матрикса, в частности гиалуроновая кислота. Известно, что гиалуроновая кислота секретируется стромальными клетками в большом количестве, в том числе при развитии ряда патологий, например при развитии

фиброза и канцерогенезе. Кроме того доказано, что поверхность большого числа секреторируемых ВВ покрыта гиалуронатом [12–14]. Интересно отметить, что последние работы показывают, что гиалуроновая кислота способна к накоплению и формированию кластеров ВВ на поверхности клеток в области филоподий и ламеллоподий [14]. Нами при окрашивании стромальных клеток липофильным красителем PKH26 также было отмечено, что на тонких участках мембраны и филоподиях клеток формируется большое число липидных структур, напоминающих МАВ (неопубликованные данные). Поэтому использование гиалуронидазы может стать перспективным подходом для выделения МАВ.

Таким образом, целью работы стала разработка способа получения фракции МАВ, производимых культивируемыми клетками, с сохранением их морфологии и жизнеспособности, и сравнительная характеристика концентрации, морфологии и размера МАВ с ВВ, секреторируемых в среду, выделенных по стандартному протоколу.

Материалы и методы

Клеточные линии. В работе использовали клеточную линию иммортализованных МСК жировой ткани человека ASC52telo (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (Capricorn, Германия) с добавлением 7% фетальной бычьей сыворотки (Ласора, Россия), 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco, США) в стандартных условиях (5% CO₂, 37°C). Для получения МАВ клетки высаживали на чашки Петри диаметром 100 мм в одинаковой концентрации 5 тыс. кл./см², параллельно для всех способов выделения, все клетки выращивали до плотности 70–90% конfluence. Далее объемы приведены для указанной площади и плотности клеток. Параллель экспериментов повторяли трижды, для каждой точки делали два технических повтора.

На основании анализа литературы для выделения МАВ [5, 8–14] были разработаны и протестированы описанные ниже протоколы. Каждый из протоколов включал в себя предварительную обработку раствором Хэнкса (ПанЭко, Россия) 10 мл 3 раза по 10 мин при 37°C при покачивании. В качестве контроля чашку аналогично инкубировали с 5 мл раствора Хэнкса:

1) *обработка 0,1%-ным раствором Тритона X-100.* Чашку инкубировали в 5 мл 0,1%-ного раствора Тритона X-100 (Sigma, США) на фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C в течение 10 мин, собирали раствор.

2) *обработка 5мМ ЭДТА/0,25% TrypLE.* Чашку инкубировали в 1 мл раствора Версена (5 мМ раствор ЭДТА; ПанЭко, Россия) в течение 5 мин, собирали раствор для обработки в центрифужную пробирку, затем добавляли 1 мл TrypLE (Gibco, США) на 5 мин при покачивании при комнатной

температуре, собирали раствор в ту же центрифужную пробирку. Проводили дополнительные 3 промывки 1 мл раствора Версена, добавляя использованный раствор к образцу. После чего открепившиеся клетки осаждали центрифугированием при 200 g в течение 5 мин, супернатант дополнительно центрифугировали при 300 g 10 мин, чтобы осадить клеточный дебрис.

3) обработка гиалуронидазой, 40 ед/мл. Чашку инкубировали в 5 мл раствора гиалуронидазы (40 ед./мл; Sigma, США) в ФСБ в течение 15, 30 или 45 мин при 37°C на качалке.

4) обработка протеиназой К, 100 мкг/мл. Чашку инкубировали в 5 мл раствора протеиназы К (100 мкг/мл; Sigma, США) в ФСБ в течение 2 ч при 37°C на качалке.

Все пробы центрифугировали при 1000 g в течение 10 мин, чтобы избавиться от клеточного дебриса, переносили около 4,5 мл супернатанта в новую пробирку. Хранили при –20°C. Схема эксперимента приведена на рис. 1А.

Для визуализации клеточных линий использовали прижизненную фазово-контрастную микроскопию. Для сравнения характеристик готови-

ли образцы секретируемых в среду ВВ, как было описано ранее [15].

Измерение размера и концентрации ВВ МСК методом анализа траекторий наночастиц (NTA). Измерения проводили с помощью ZetaView® Particle Metrix (Германия), регистрирующем броуновское движение частиц в растворе, освещенном лазером, и позволяющем оценить их размер и концентрацию в каждой пробе.

Измерение проводилось в режиме «бокового светорассеяния» при 25°C. Для измерения использовали лазер с длиной волны 488 нм, объектив 10× и высокочувствительную камеру с матрицей КМОП-типа (Tracelength = 30; разведение образцов до диапазона 25–200 частиц на поле зрения). Для дальнейших расчетов использовали образцы, в которых было детектировано не менее 1500 трэков. В качестве контроля случайных частиц использовался образец того же раствора, в котором происходила инкубация клеток для отделения МАВ, аликвоту которого отбирали до добавления к клеткам. Такие параметры, как концентрация частиц, а также диаметр концентрации частиц на пике анализировали в каждом из образцов и сравнивали друг с другом.

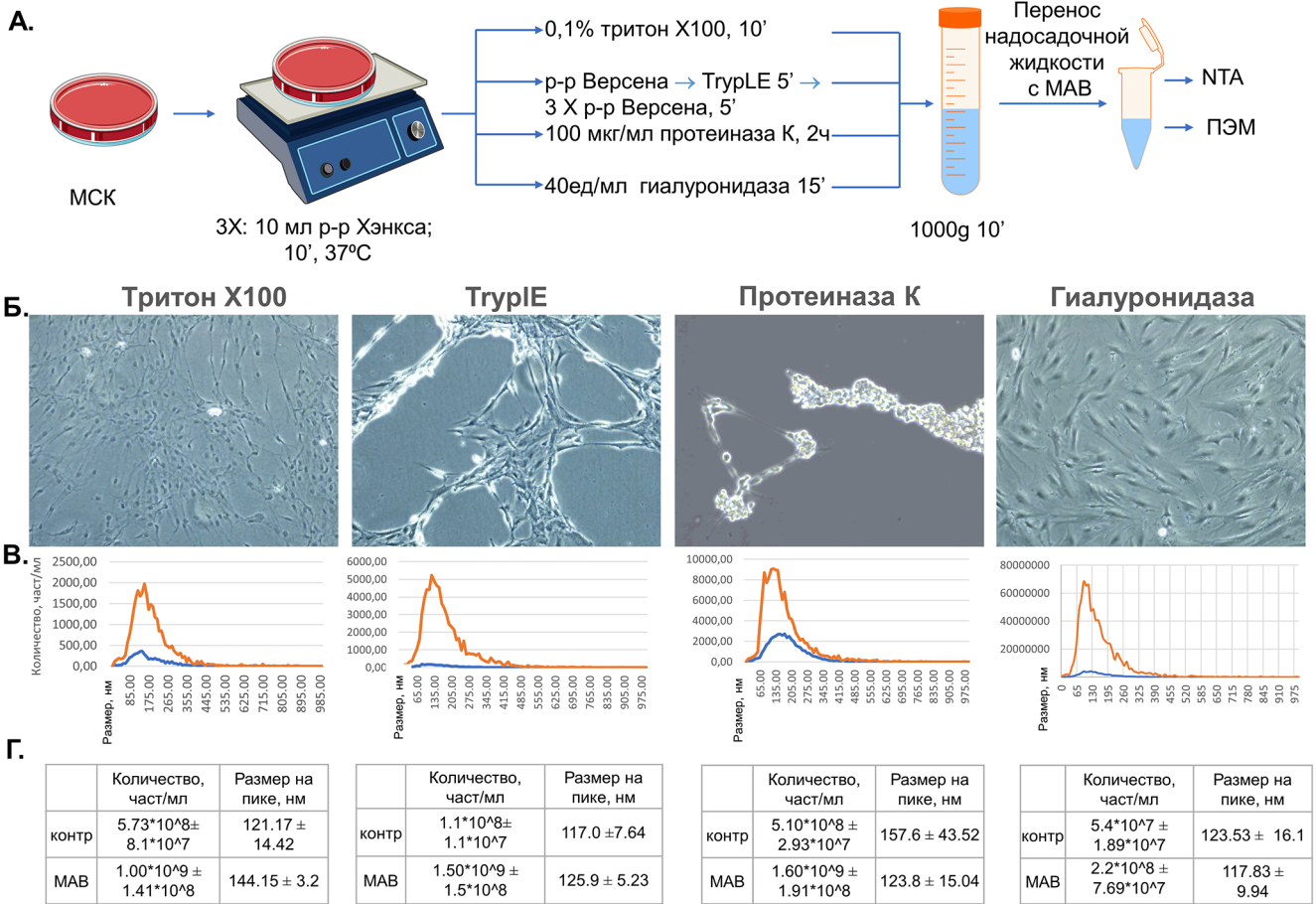


Рис. 1. Характеристика МСК и частиц, полученных с помощью соответствующих протоколов для выделения МАВ. **А.** Схема получения фракции МАВ в помощью разных протоколов. **Б.** Репрезентативные изображения клеток после обработки, фазово-контрастная микроскопия, общее увеличение 100×. **В.** Графики распределения количества частиц в зависимости от их размера, NTA. Оранжевый – образец, предположительно содержащий МАВ, синий – контроль. **Г.** Таблицы, описывающие количество частиц и их размер на пике, NTA.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием. Покрывые углеродом ПЭМ-сетки (Ted Pella, США) обрабатывали с помощью прибора тлеющего разряда Emitech K100X (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) при токе 25 мА в течение 45 с. Такая обработка делала поверхность углерода гидрофильной и увеличивала адсорбцию везикул. Образцы МАВ ($n = 3$) или ВВ ($n = 3$) в объеме примерно 15 мкл наносили на сетку на 2–3 мин, затем жидкость промакивали фильтровальной бумагой. В качестве контроля наносили чистую среду культивирования DMEM (для ВВ) или раствор гиалуронидазы (для МАВ) Сетки быстро переносили в капли 1%-ного уранилацетата, окрашивали в течение 1–2 мин, промакивали и высушивали. Изображения получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенного камерой Rio-9 (Gatan Inc., США). Диапазон увеличения составлял от $30000\times$ до $150000\times$, ускоряющее напряжение составляло 120 кВ.

Результаты и обсуждение

Выбор метода получения МАВ. Были протестированы как описанные в литературе, так и предложенные нами на основе знания о биогенезе и локализации ВВ методы выделения МАВ с помощью Тритона X-100, ЭДТА/ТриPLE, протеиназы К и гиалуронидазы.

На первом этапе отработки протоколов мы проводили визуальную оценку морфологии клеточной линии МСК во время обработки соответствующими растворами с помощью прижизненной фазово-контрастной микроскопии. Помимо этого, мы оценивали количество отделяемых от клеток частиц в неконцентрированных образцах методом анализа траектории наночастиц NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). В качестве контроля для исследуемых образцов, предположительно содержащих МАВ (далее «МАВ»), использовали растворы, применяемые для отделения МАВ от поверхности клеток (далее «контроль»). Полученные результаты проиллюстрированы на рис. 1.

Так, мы показали, что при использовании достаточно хорошо описанного в литературе протокола с использованием Тритона X-100 [5, 8, 9], клетки разрушаются (рис. 1Б). Через 10 мин действия раствора мы наблюдали в микроскоп остатки прикрепленных клеток. Количество частиц на порядок отличалось от контрольного образца, распределение частиц по размеру (пик 144,3 нм) было похоже на распределение в образцах секретируемых ВВ для данной культуры (пик $\approx 144,1$ нм). Однако обнаруживаемые частицы, вероятно, представляли мелкий клеточный дебрис и апоптотические тельца. В протоколе с использованием протеиназы К также не удавалось сохранить клетки прикрепленными с неизменной морфологией. При обработке протеиназой К уже через 15 мин после начала инкубации

мы наблюдали открепление клеток от поверхности пластика и сбивание их в группы (рис. 1Б).

Далее были протестированы протоколы с последовательной обработкой раствором Версена (ЭДТА) и триPLE (аналог трипсина, действующий при комнатной температуре). Также была предложена модифицированная версия данного протокола, заключающаяся том, что солевой раствор, использованный для промывки, собирали на всех этапах воздействия. Клетки при такой обработке откреплялись от поверхности чашек, но оставались жизнеспособными. Количество частиц также на порядок отличается от контрольного образца. Следует отметить, что в случае использования как раствора Версена-триPLE, так и протеиназы К пик распределения частиц смещен влево в среднем на 20 нм (пик $\approx 124,5$ нм), по сравнению со стандартным распределением секретируемых ВВ (пик ≈ 149 нм).

В протоколе с использованием гиалуронидазы клетки оставались прикрепленными к чашке и не меняли морфологию на протяжении всех отмывок и действия фермента (рис. 1Б).

Таким образом, было показано, что при использовании всех протоколов, кроме обработки гиалуронидазой, клетки открепляются от субстрата, что в дальнейшем может быть препятствием для изучения МАВ и клеток, свободных от МАВ в исследованиях.

Оптимизация протокола выделения МАВ с помощью гиалуронидазы. Для оптимизации протокола была протестирована обработка с использованием гиалуронидазы в более высокой концентрации (80 ед./мл), а также различное время обработки клеток (для концентрации 40 ед./мл – 15, 30 и 45 мин). Во всех случаях мы не наблюдали изменения морфологии культивируемых клеток. Для определения оптимального протокола мы проводили сравнение концентрации и размеров получаемых частиц.

Так, мы показали, что оптимальным протоколом для выделения МАВ является обработка гиалуронидазой в концентрации 40 ед./мл в течение 15 мин. Именно при такой обработке выделяется количество частиц, сопоставимое по концентрации со свободно секретируемыми в среду культивирования ВВ. Интересно отметить, что размер выделяемых МАВ существенно меньше размера ВВ и сопоставим с размером МАВ, полученных другими методами на предыдущем этапе работы. Увеличение времени обработки, как и увеличение концентрации фермента приводит к снижению концентрации получаемых частиц и к увеличению их размера, что, вероятно, может говорить об их агрегации.

Полученные МАВ были частично охарактеризованы согласно критериям MISEV 2023. В качестве контроля были использованы образцы ВВ, выделенные по стандартному протоколу [15]. Описание размеров и морфологии частиц было выполнено с помощью методов NTA (рис. 2А, таблица), а также ПЭМ (рис. 2Б). Полученные

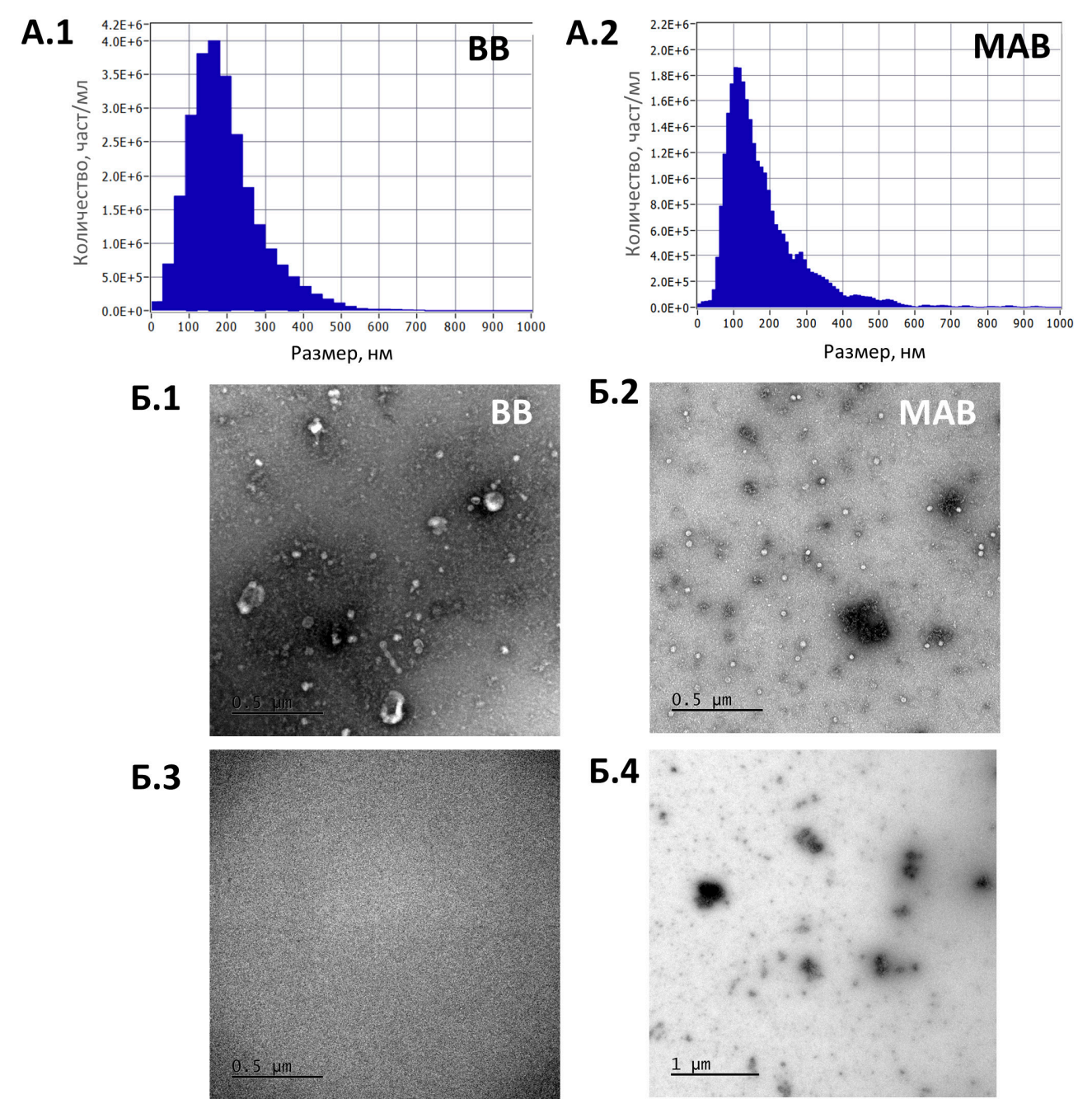


Рис. 2. А. Репрезентативные графики распределения количества частиц в зависимости от их размера, NTA. А.1 – ВВ, полученные из среды культивирования. А.2 – МАВ, полученные с помощью гиалуронидазы 40 ед./мл, 15 мин. **Б.** Репрезентативные изображения частиц, ПЭМ с негативным контрастированием. Б.1 – ВВ, полученные из среды культивирования. Б.2 – МАВ, полученные с помощью гиалуронидазы 40 ед./мл, 15 мин. Б.3 – контроль получения ВВ. Б.4 – контроль получения МАВ.

Таблица 1

Характеристика количества частиц и их размера на пике, полученных по протоколу выделения МАВ с помощью обработки МСК гиалуронидазой в различной концентрации, NTA ($n \geq 3$)

| Метод выделения | Время инкубации | Концентрация частиц/мл | Размер частиц на пике, нм |
|--|-----------------|---|---------------------------|
| Стандартный протокол для выделения ВВ-МСК [15] | — | $1,3 \times 10^8 \pm 2,36 \times 10^7$ | $149,08 \pm 30,74$ |
| Гиалуронидаза 40 ед./мл | 15 мин | $2,2 \times 10^8 \pm 7,69 \times 10^7$ | $117,83 \pm 9,94$ |
| Гиалуронидаза 40 ед./мл | 30 мин | $2,06 \times 10^8 \pm 1,43 \times 10^7$ | $116,75 \pm 7,85$ |
| Гиалуронидаза 40 ед./мл | 45 мин | $1,5 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^7$ | $129,48 \pm 14,92$ |
| Гиалуронидаза 80 ед./мл | 15 мин | $1,1 \times 10^8 \pm 5,96 \times 10^7$ | $153,80 \pm 16,68$ |

данные указывают на то, что используемый протокол позволяет получить везикулярную фракцию, морфологически сходную с хорошо описанной фракцией секретируемых ВВ, однако получаемые МАВ имеют в среднем меньший размер по сравнению с секретируемыми ВВ.

Заключение

Таким образом, протокол с воздействием на клетки гиалуронидазы в концентрации 40 ед./мл в течение 15 мин при 37°C позволяет получить везикулярную фракцию, которая предположительно соответствует МАВ. При этом такая обработка сохраняет морфологию культивируемых адгезионных клеток и не приводит к откреплению их от пластика, что позволяет изучать клетки после открепления МАВ методами микроскопии. МАВ обладают размерными и морфологическими харак-

теристиками, присущими ВВ, однако имеют свои особенности в виде меньших размеров. Требуется дальнейшая характеристика выделяемой данным способом фракции, чтобы оценить состав и функциональные характеристики МАВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» (№24-Ш04-14). Работа выполнена с использованием уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия» биологического факультета МГУ. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Williams T., Salmanian G., Burns M., Maldonado V., Smith E., Porter R.M., Song Y.H., Samsonraj R.M. Versatility of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair and regenerative applications. *Biochimie*. 2023;207:33–48.
- van Griensven M., Balmayor E.R. Extracellular vesicles are key players in mesenchymal stem cells' dual potential to regenerate and modulate the immune system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2024;115203.
- Manzoor T., Saleem A., Farooq N., Dar L.A., Nazir J., Saleem S., Ismail S., Gugjoo M.B., Shiekh P.A. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells – a novel therapeutic tool in infectious diseases. *Inflamm. Regener.* 2023;43(1):17.
- Welsh J.A., Goberdhan D.C.I., O'Driscoll L., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J. Extracell. Vesicles*. 2024;13(2):e12404.
- Zhou Y., Qin Y., Sun C., Liu K., Zhang W., Gaman M.A., Chen Y. Cell-bound membrane vesicles contain antioxidative proteins and probably have an antioxidative function in cells or a therapeutic potential. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 2023;81:104240.
- Моисеенко А.В., Басалова Н.А., Багров Д.В., Трифонова Т.С., Виговский М.А., Дьячкова У.Д., Григорьева О.А., Новоселецкая Е.С., Ефименко А.Ю., Соколова О.С. Прямая визуализация внеклеточных везикул на мембране мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека методом криоэлектронной микроскопии. *Наноиндустрия*. 2024;14(7–8):434–443.
- Konoshenko, Zamakhov I.M., Anashkin V.A., Moiseenko A.V., Orlov V.N., Vorobyeva N.N., Sokolova O.S., Baykov A.A. The structure and nucleotide-binding characteristics of regulated cystathionine β -synthase domain-containing pyrophosphatase without one catalytic domain. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(24):17160.
- Tang Q., Zhang X., Zhang W., Zhao S., Chen Y. Identification and characterization of cell-bound membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2017;1859(5):756–766.
- Zhang Y., Liu Y., Zhang W., Tang Q., Zhou Y., Li Y., Rong T., Wang H., Chen Y. Isolated cell-bound membrane vesicles (CBMVs) as a novel class of drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol.* 2020;18(1):69.
- Tamkovich S., Tutanov O., Efimenko A., Grigoreva A., Ryabchikova E., Kirushina N., Vlassov V., Tkachuk V., Laktionov P. Blood circulating exosomes contain distinguishable fractions of free and cell-surface-associated vesicles. *Curr. Mol. Med.* 2019;19(4):273–285.
- Petrova T., Kalinina O., Aquino A., Grigoryev E., Dubashynskaya N.V., Zubkova K., Kostareva A., Golovkin A. Topographic distribution of miRNAs (miR-30a, miR-223, miR-let-7a, miR-let-7f, miR-451, and miR-486) in the plasma extracellular vesicles. *ncRNA*. 2024;10(1):15.
- Rilla K., Siiskonen H., Tammi M., Tammi R. Hyaluronan-coated extracellular vesicles—a novel link between hyaluronan and cancer. *Adv. Cancer Res.* 2014:121–148.
- Ragni E., Perucca Orfei C., De Luca P., Lugano G., Viganò M., Colombini A., Valli F., Zacchetti D., Bollati V., de Girolamo L. Interaction with hyaluronan matrix and miRNA cargo as contributors for in vitro potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of human osteoarthritic synoviocytes. *Stem Cell Res. Ther.* 2019;10(1):109.
- Härkönen K., Oikari S., Kyykallio H., Capra J., Hakkola S., Ketola K., Thanigai Arasu U., Daaboul G., Malloy A., Oliveira C., Jokelainen O., Sironen R., Hartikainen J.M., Rilla K. CD44s assembles hyaluronan coat on filopodia and extracellular vesicles and induces tumorigenicity of MKN74 gastric carcinoma. *Cells*. 2019;8(3):276.
- Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Akopyan Z., Kalinina N., Efimenko A. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles. *Cells*. 2020;9(5):1272.

Поступила в редакцию 07.07.2025

После доработки 01.09.2025

Принята в печать 05.09.2025

RESEARCH ARTICLE

Membrane-associated vesicles: approaches for isolation and characterization

O.A. Grigorieva^{1,*} , N.A. Basalova¹ , M.A. Vigovskiy¹ , U.D. Dyachkova¹ ,
D.V. Bagrov² , O.S. Sokolova² , A.Yu. Efimenko¹ 

¹Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University,
27–10 Lomonosovsky Prospect, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: grigorievaoa@my.msu.ru

Intercellular communication is a critical component of maintaining tissue homeostasis. One of the communication methods is the transfer of a wide range of biologically active molecules – proteins, nucleic acids (primarily non-coding RNA) and lipids – in extracellular vesicles (EV). This allows EV-producing cells to change the metabolic and transcriptional activity of individual target cell populations over a wide range and “tune” it in accordance with tissue needs. Most of the existing studies are focused on the composition and functions of EVs secreted into the external environment, while the study of the membrane-associated vesicle subclass (membrane-associated vesicles, MAV) is hampered by the lack of generally accepted methods for their isolation from different cell types, including cultured ones, and characterization. In this paper, we present a protocol for isolating the MAV fraction of cultured mesenchymal stromal/stem cells while preserving the morphology and viability of the cells themselves using hyaluronidase treatment. This protocol demonstrated the highest efficiency compared to other tested methods and allows one to obtain a fraction significantly enriched in vesicles, as demonstrated by nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy. A comparative analysis of the characteristics of MAV and EV secreted into the medium showed that the proposed MAV isolation protocol allows one to obtain a fraction with a similar particle concentration, but they are smaller in size compared to EV. Thus, the isolation method we described allows one to obtain a MAV fraction for further analysis of their composition and functional features.

Keywords: extracellular vesicles, membrane-associated vesicles, mesenchymal stromal/stem cells, intercellular communication

Funding: The research was funded with the financial support of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow State University “Molecular Technologies of Living Systems and Synthetic Biology” (#24-Sh04-14). The research was carried out using the unique scientific installation “Three-dimensional electron microscopy and spectroscopy” of the Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University.

Сведения об авторах

Григорьева Ольга Александровна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: grigorievaoa@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2954-2420>

Басалова Наталья Андреевна – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: basalovana@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2597-8879>

Виговский Максим Александрович – лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: vigovskiy_m.a@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2103-8158>

Дьячкова Ульяна Денисовна – лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Центра регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, e-mail: dyachkovauliana@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6119-8976>

Багров Дмитрий Владимирович – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@live.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>

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/0000-0003-3408-3660>

Ефименко Анастасия Юрьевна – докт. мед. наук., зав. лаб. репарации и регенерации тканей, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77, доб. 3159; e-mail: efimenkoay@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 576.54

Криоэлектронная микроскопия демонстрирует полиморфизм малых внеклеточных везикул**Т.С. Трифонова¹ , А.В. Моисеенко¹ , Г.О. Скрыбин² , О.Т. Имаралиев² , Е.М. Чевкина² , И.А. Карасев² , А.Ю. Ефименко³ , С.И. Трифонов⁴, Д.В. Багров^{1, 2} , О.С. Соколова^{1, 5, *}** ¹*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина Минздрава России, 115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23;*³*Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 10;*⁴*ООО «Пайрус», Россия, 125080, г. Москва, ул. Сурикова, д. 24;*⁵*Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Китай, 518172, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1***e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru*

В рамках данного исследования была создана компьютерная программа Veronica — специализированная среда для разметки изображений, полученных методом криоэлектронной микроскопии. Она позволяет выделять контуры замкнутых и незамкнутых объектов и сохранять их в удобном для анализа формате, а также определять заданные метрики для исследования морфологии. С помощью программы Veronica была охарактеризована морфология образцов малых внеклеточных везикул, выделенных из желудочного сока пациентов с аденокарциномой желудка, а также условно здоровых доноров. Предложен подход к разметке изображений и расчета показателей для описания везикул, основанный на измерении параметров вложенности (меры количества частиц, вложенных друг в друга) и ветвистости (меры количества расположенных рядом частиц, окруженных общей мембраной).

Ключевые слова: малые внеклеточные везикулы, криоэлектронная микроскопия, обработка изображений, рак желудка

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-6

Введение

Внеклеточные везикулы (ВВ) — это окруженные мембраной частицы, секретируемые клетками во внеклеточное пространство и содержащиеся в биологических жидкостях. Их ключевая функция — межклеточная коммуникация. Они могут переносить между клетками нуклеиновые кислоты, белки, липиды и различные метаболиты. Молекулярный состав ВВ, в том числе липидно-белковая композиция, в значительной степени определяет судьбу секретируемых ВВ в жидкостях организма, а также их функциональную активность [1]. Анализ ВВ применяется в диагностике многих заболеваний, включая злокачественные новообразования [2], также они могут использоваться для доставки лекарств [3].

Криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) является наиболее современным и актуальным методом для описания ВВ [4]. Долгое время считалось, что большинство ВВ представляют собой протеолипосомы, загруженные сложным содержимым, однако с помощью криоЭМ было показано, что количество и расположение липидных слоев в составе ВВ может быть вариабельным. Для ВВ различного происхождения был выявлен полиморфизм. Были обнаружены вложенные многослойные частицы, окруженные множеством липидных мембран, вытянутые липидные частицы, группы малых везикул, заключенных в общую мембрану, везикулы с включениями повышенной электронной плотности и другие необычные структуры. Именно метод криоЭМ позволил уви-

деть и описать это многообразие, благодаря возможности визуализации липидных мембран ВВ после их заморозки в аморфном льду [5–7].

Для автоматизации обработки изображений, полученных методом криоЭМ, часто применяют нейросети [8–10]. Для их обучения используют изображения, размеченные в ручном или полуавтоматическом режиме, причем от аккуратности разметки напрямую зависит процесс обучения нейросети и ее эффективность. В рамках данного исследования была создана компьютерная программа Veronica – специализированная среда для разметки криоЭМ изображений, которая позволяет выделять контуры замкнутых и незамкнутых объектов нанометровых размеров и сохранять их в удобном для анализа формате, а также включает в себя аналитический блок для расчета количественных характеристик.

В качестве объектов исследования были выбраны образцы малых внеклеточных везикул (мВВ), выделенные из желудочного сока. Эти везикулы содержат белки, липиды, мРНК, микроРНК и другие биомолекулы, потенциально отражающие состояние желудочно-кишечного тракта. Выделенные из желудочного сока мВВ обладают диагностическим потенциалом, особенно в аспекте ранней диагностики онкологических заболеваний и оценки их прогноза [1]. С помощью программы Veronica охарактеризована морфология образцов мВВ, выделенных из желудочного сока пациентов с аденокарциномой желудка (АКЖ), а также условно здоровых доноров (УЗД).

Материалы и методы

Забор клинического материала. Образцы желудочного сока получали в период с 1 февраля по 20 декабря 2024 г. в ходе планового эндоскопического обследования в отделении эндоскопии Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина по протоколу, описанному ранее [12]. В опытной группе были пациенты с АКЖ, в контрольной группе – УЗД. Все участники эксперимента предоставили письменное согласие, протокол был одобрен этическим комитетом исследовательского центра (протокол №1 от 25 января 2024 г.). Забор желудочного сока проводили до начала химиотерапевтического или хирургического лечения. Объем желудочного сока составлял от 2,5 до 10 мл. Сразу после сбора образцы разбавляли 5 мл охлажденного фосфатно-солевого буфера (PBS, Phosphate-Buffered Saline). В течение часа после сбора их очищали центрифугированием при 2000 g (30 мин при температуре 4°C), осадок отбрасывали. Затем супернатант разбавляли до 35 мл охлажденным PBS и дополнительно очищали центрифугированием при 12000 g (45 мин при 4°C). Полученный супернатант отбирали и хранили при -80°C до выделения ВВ.

Выделение ВВ из желудочного сока. Процедура выделения ВВ включала многоступенчатое центрифугирование. Пробу размораживали, доводили охлажденным PBS (Gibco, США) до 35 мл и центрифугировали при 110000 g (3 ч при 4°C) с использованием ротора с подвесными стаканами SW-28 (коэффициент $k = 245,5$; Beckman Coulter, США). Полученные осадки, содержащие преимущественно мВВ, ресуспендировали в 5 мл охлажденного PBS, переносили в малые пробирки для ультрацентрифугирования (Beckman Coulter, США) и повторно центрифугировали при 110000 g (90 мин, 4°C) с использованием ротора SW-50.1 (коэффициент $k = 154,5$; Beckman Coulter, США).

Очищенные осадки ресуспендировали в 120 мкл охлажденного PBS, разделяли на аликваты в пробирки Protein LoBind (Eppendorf, Германия), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до использования.

Подготовка образцов к исследованию методом криоЭМ. Медную сеточку диаметром 3 мм с поддерживающей подложкой из аморфного углерода толщиной 10–15 нм (EMCN, Китай) обрабатывали тлеющим разрядом на установке EasyGlow (TedPella, США) при остаточном давлении воздуха 0,26 мбар и токе 0,25 мА в течение 30 с. 3 мкл исследуемой суспензии наносили на поверхность углеродной подложки и инкубировали 45 с при комнатной температуре при относительной влажности воздуха 95%, поддерживаемой в климатической камере установки EM GP2 (Leica Microsystems, Германия). Сеточку однократно промакивали фильтровальной бумагой Whatman #1 в течение 14 с и моментально окунали в жидкий этан при температуре -180°C. Сетки хранились в жидком азоте до момента исследования в криоэлектронном микроскопе.

КриоЭМ. Для съемки изображений мВВ использовали микроскоп JEOL2100 (JEOL, Япония), оснащенный детектором прямого обнаружения электронов (Direct Electron DE-20, США), и программное обеспечение SerialEM [13], предназначенное для автоматизации экспериментов криоЭМ. Для минимизации радиационных повреждений, вызванных воздействием электронного пучка, суммарная электронная доза, которую получает единица площади образца за время съемки одного кадра, была ограничена до $40 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$. Использованное увеличение оптической системы микроскопа соответствовало размеру пикселя $4,6 \text{ \AA}$. Для увеличения фазового контраста на крио-изображениях применялась дефокусировка объективной линзы до -10 мкм.

Программа для разметки крио-изображений. Для проведения разметки крио-изображений, полученных в электронном микроскопе, была разработана компьютерная программа Veronica. Основной задачей программы в настоящий момент является проведение ручной разметки серийных

изображений и аккуратное и надежное сохранение результатов. Принцип единого хранения (используется сервис MongoDB) дает возможность распределять работу по разметке между различными сотрудниками, и зафиксировать результаты этой работы. Сохраняемая разметка в перспективе может быть уточнена, метрики по разметке могут быть обновлены и пересчитаны.

Программа поддерживает построение случайных выборок по сериям изображений, каждая из которых соответствует различным образцам, поддерживает процесс разметки этих выборок и готовит отчеты, содержащие значения автоматически вычисленных метрик. Состав и характеристики вычисляемых метрик могут изменяться, в зависимости от конкретной исследовательской задачи. Общий смысл использования различных метрик в совокупности – выявить и объективизировать характеристики, существенно различающие серии изображений, полученных по различным образцам.

В контексте разметки каждого изображения с везикулами предоставляется возможность размечать следующие графические элементы:

– везикула: замкнутая сплайн-кривая, отображается синим;

– сегмент везикулы: незамкнутая сплайн-кривая, отображается фиолетовым.

Разметка элементов выполняется указанием точек, контролирующего поведение сплайна. Точность разметки графических элементов определяется требованиями конкретной исследовательской задачи.

Процедура разметки изображений трудоемка, и принцип использования случайных выборок по-

зволяет получать достаточно надежные оценки изображений, минимизируя эти затраты. Сбор и обобщение информации, собранной по малой случайной выборке (в данном случае порядка 20 изображений из каждой серии) позволяет получить предварительные оценки, которые могут быть впоследствии уточнены при увеличении объема выборок.

Расчет метрик, характеризующих везикулы.

В контексте настоящей работы в компьютерной программе Veronica по сериям изображений, соответствующим исследуемым образцам, автоматически рассчитывались следующие метрики: эффективный диаметр везикул, вложенность и ветвистость.

1) За эффективный диаметр в данном исследовании принимается диаметр круга с площадью, эквивалентной везикуле.

2) Для характеристики «вложенности везикул» (рис. 1):

– считается среднее число везикул в гнезде;

– отдельная везикула, не включенная ни в одно гнездо, считается при подсчете «единичным гнездом» и дает вклад 1;

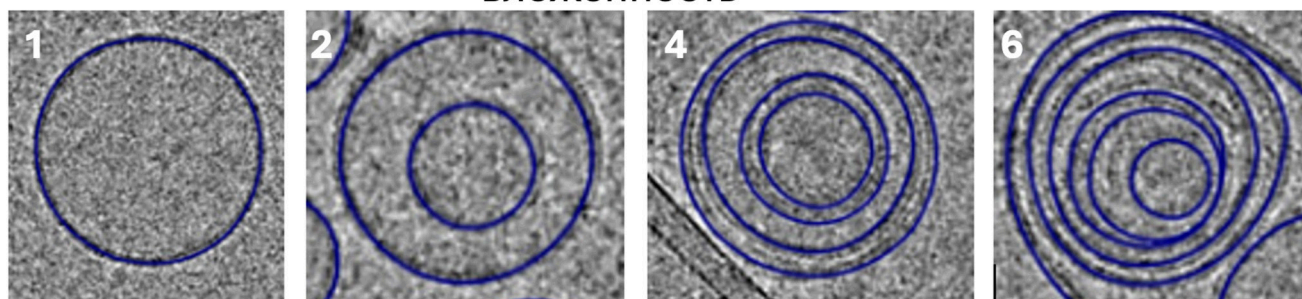
– для полноценного гнезда (внешняя везикула содержит хотя бы одну внутреннюю везикулу) вклад – число везикул в объемлющем гнезде.

Если значения вложенности каждой частицы известны, то с их помощью можно вычислить характеристики образца, а именно:

– среднее число везикул – усреднение числа везикул (в единичных и полноценных гнездах);

– число и долю полноценных гнезд (по отношению к числу как полноценных, так и единичных гнезд).

ВЛОЖЕННОСТЬ



ВЛОЖЕННОСТЬ/ВЕТВИСТОСТЬ

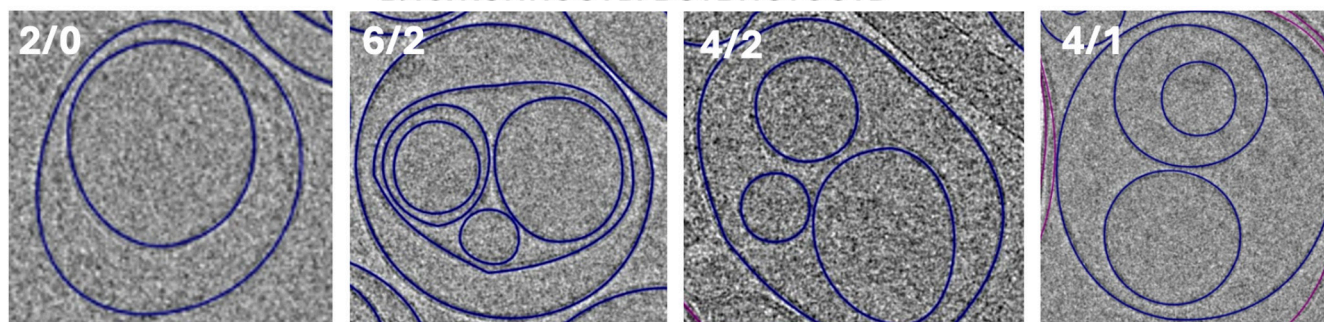


Рис. 1. Примеры характеристики везикул по параметрам «вложенность» и «ветвистость». Белые цифры сверху обозначают число вложенных друг в друга везикул; внизу – вложенность/ветвистость.

3) Характеристика «ветвистость» (рис. 1): описывает сложность структуры вложенности везикул в (полноценном) гнезде;

— последовательность вложенных друг в друга по одной везикул — «простая вложенность» — имеет ветвистость 0, одиночным везикулам была формально приписана отрицательная ветвистость -1;

— если везикула внутри себя содержит K везикул, $K \geq 2$ следующего уровня вложенности, эта везикула дает вклад в ветвистость гнезда, равный $K - 1$;

— по гнезду вклады каждой везикулы складываются; таким образом, ветвистость гнезда равна числу отклонений (усложнений) структуры вложенности везикул в гнезде в сравнении с гнездом с тем же числом везикул, но расположенных по принципу «простой вложенности».

Ветвистость гнезд усредняется по всем полноценным гнездам, присутствующим на изображениях. В результате можно охарактеризовать «рас-

пределение гнезд по числу везикул» и вычислить долю гнезд, которым соответствует определенное значение ветвистости.

Статистическая обработка. Для проверки различий медиан выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса [14].

Результаты и обсуждение

Нами были исследованы шесть образцов мВВ, выделенных из желудочного сока. Три из этих образцов получены от пациентов с АКЖ, три — от людей без онкологических заболеваний в анамнезе (УЗД). Были получены крио-изображения мВВ (рис. 2А, Б), которые показали, что большинство мВВ имеют типичную морфологию, т.е. представляют собой округлые частицы, окруженные бислойной липидной мембраной. Дополнительно наблюдались неканонические везикулы: многослойные, вытянутые, имеющие выпячивания или электронно-плотные включения.

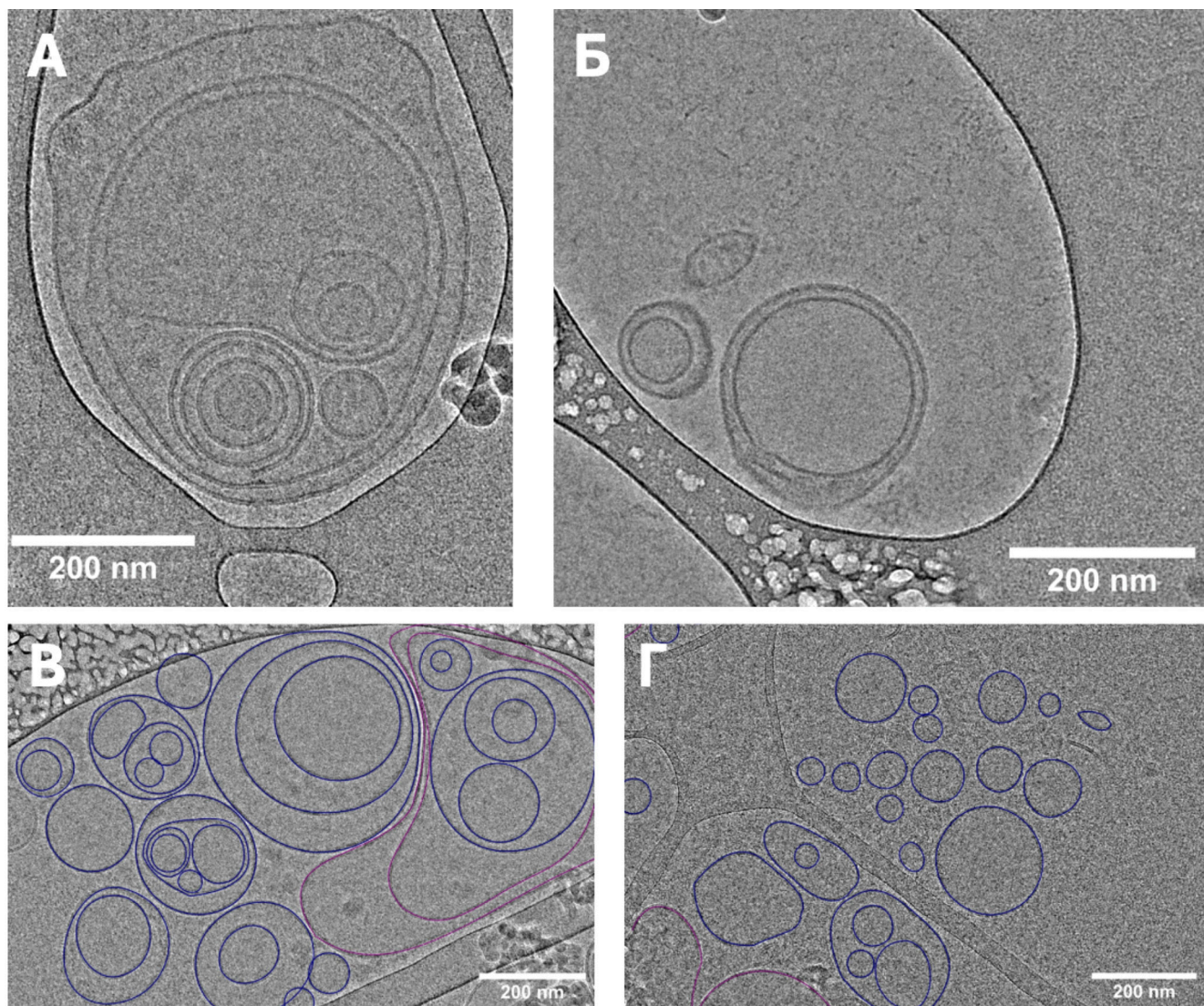


Рис. 2. Крио-ЭМ-изображения, полученные с препаратов мВВ, выделенных из желудочного сока: (А) препарат, полученный от УЗД; (Б) от пациента с АКЖ; (В) Размеченные крио-ЭМ-изображения мВВ из желудочного сока УЗД; (Г) Размеченные крио-ЭМ-изображения мВВ из желудочного сока пациента с АКЖ. Синим размечены целые везикулы, попавшие в область изображения; фиолетовым — части везикул и поврежденные везикулы. Масштабные отрезки — 200 нм.

Применение алгоритма, имплементированного в программе Veronica, позволило провести разметку изображений для двух наборов криоЭМ-изображений мВВ: из желудочного сока УЗД (рис. 2В) и пациентов с АКЖ (рис. 2Г). Для каждой из серий изображений, соответствующих отдельному пациенту, были построены и размечены случайные выборки по ~20 изображений. Всего отдельно пациентам с патологией, отдельно контрольным образцам УЗД, соответствуют по ~60 размеченных изображений.

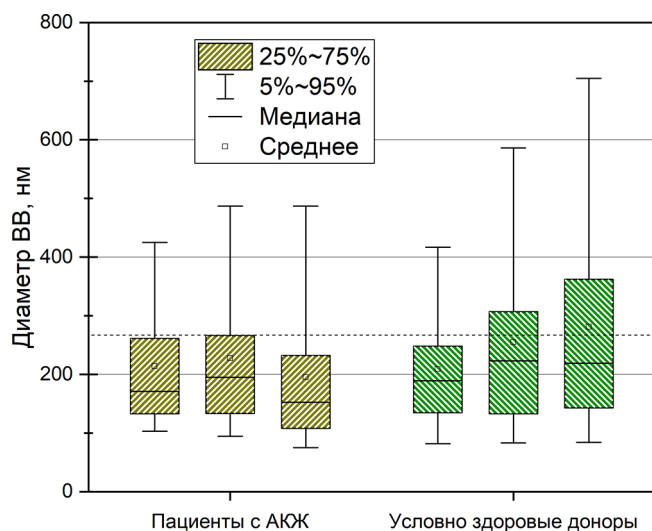


Рис. 3. Сравнение эффективных диаметров везикул в исследованных образцах. Горизонтальная пунктирная линия соответствует 266 нм.

Для каждой выборки были автоматически определены эффективные диаметры везикул (рис. 3), вложенность и ветвистость (рис. 4). Мы проверили качество автоматического измерения, сравнив его с результатами ручного измерения везикул в программе Fiji [15]. Значения эффективных диаметров, полученные с помощью Fiji и Veronica, совпали с точностью до 1–2 пикселей; вариации, очевидно, зависят от того, как эксперт по обработке изображений устанавливает границу везикулы.

Сравнение эффективных диаметров для шести выборок (три пациента с АКЖ и три – УЗД) представлено на рис. 3. У пациентов с АКЖ эффективный диаметр ВВ оказался значительно меньше, чем у УЗД, в соответствии с критерием Краскела-Уоллиса. Этот вывод противоречит указанному в работе Саадельдина и соавт. [16]. Расхождение может быть связано с тем, что в работе коллег [16] измеряли средние диаметры ВВ с помощью анализа траекторий наночастиц (NTA, Nanoparticle Tracking Analysis), т.е. определялся только диаметр внешней частицы, и не учитывались вложенные везикулы.

Биологическая роль вложенных везикул на настоящий момент неизвестна, но является предметом активного изучения [17]. Нами был впервые введен математический формализм для описания ВВ по параметрам вложенности (рис. 4А) и ветвистости (рис. 4Б). Эти параметры вычисляли только для внешних везикул, содержащих другие везикулы внутри себя. Показано, что ВВ, полученные от УЗД имеют более явную тенденцию к формированию вложенных частиц (средняя доля частиц, имеющих

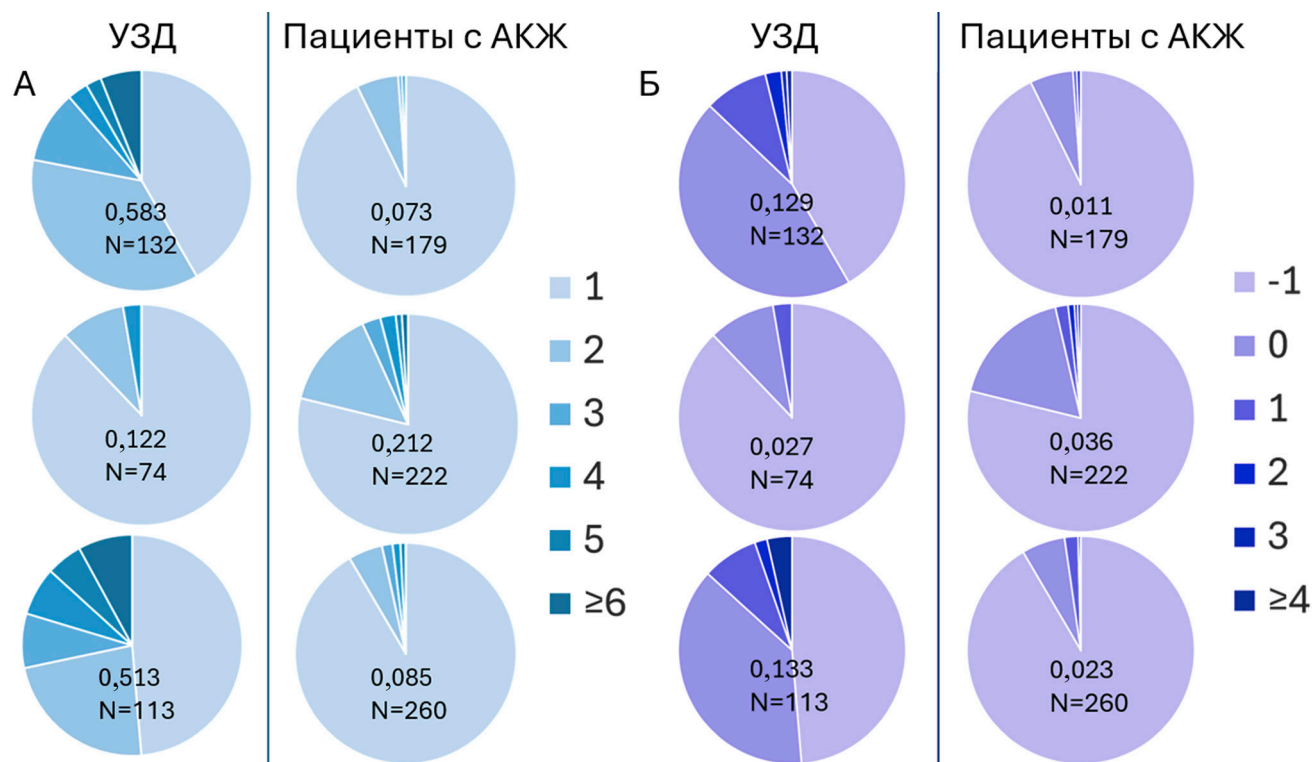


Рис. 4. Распределения частиц, полученных от индивидуальных доноров, по параметрам вложенности (А) и ветвистости (Б). Числами указаны объемы выборок и доли необычных частиц (вложенность > 1 или ветвистость ≥ 1).

вложенность больше 1, составляла 0,406 и 0,123 для УЗД и пациентов с АКЖ соответственно) и разветвленных «гнезд» (доля частиц, имеющих вложенность 1 или больше, составляла 0,096 и 0,023 для УЗД и пациентов с АКЖ соответственно). Таким образом, предложенный нами подход позволил выявить даже на небольшой выборке ряд определенных отличий в морфометрических показателях ВВ, выделенных из желудочного сока пациентов с онкологическим заболеванием, по сравнению с образцами от относительно здоровых доноров. Это может косвенно отражать разницу между типами клеток, продуцирующих ВВ, а также особенности их биогенеза, которые могут существенно различаться по механизму и скорости секреции при нормальном обновлении тканей желудочно-кишечного тракта и в случае развития опухолевого процесса. По критерию Краскела-Уоллиса разница между индивидуальными субъектами в данном случае значима, т.е. доля везикул с нетривиальной структурой сильно зависит от индивидуальных особенностей (рис. 4). Следовательно, для того чтобы обсуждать возможность применения параметров вложенности и ветвистости для диагностики, требуются дальнейшие эксперименты.

Заключение

Разработанная в рамках данного исследования программа Veronica показала высокую эффективность как инструмент для полуавтоматической разметки изображений, полученных методом криоЭМ. Она обеспечивает выделение и хранение контуров объектов, а также автоматический расчет морфометрических метрик везикул: их диаметров, вложенности и ветвистости. Такой подход открывает возможности для объективного описания полиморфизма везикул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brent A., Shirmast P., McMillan N.A.J. Extracellular vesicle lipids and their role in delivery. *J. Extracell. Biol.* 2025;4(6):e70064.
2. Lamorte D., De Luca L., Tartarone A., Trino S., Giulivo I., De Stradis A., Maietti M., Caivano A., Laurenzana I. Serum extracellular vesicle microRNAs as potential biomarkers to predict pembrolizumab response and prognosis in metastatic non-small cell lung cancer patients. *Front. Immunol.* 2025;16:1540906.
3. Pan R., Chen D., Hou L., Hu R., Jiao Z. Small extracellular vesicles: a novel drug delivery system for neurodegenerative disorders. *Front. Aging Neurosci.* 2023;15:1184435.
4. Моисеенко А.В., Басалова Н.А., Багров Д.В., Трифонова Т.С., Виговский М.А., Дьячкова У.Д., Дьячкова У.Д., Григорьева О.А., Новоселцкая Е.С., Ефименко А.Ю., Соколова О.С. Прямая визуализация внеклеточных везикул на мембране мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека методом криоэлектронной микроскопии. *Наноиндустрия.* 2024;17(7–8):434–443.

Проведенный морфологический анализ изображений мВВ, выделенных из желудочного сока пациентов с АКЖ, показал уменьшенный диаметр по сравнению с мВВ из желудочного сока УЗД. В дальнейшем, программу Veronica можно будет использовать для анализа изображений ВВ различного происхождения и выявления структурных особенностей, связанных с их биологическими функциями. Полученный методический задел будет полезен для дальнейшего исследования полиморфизма ВВ различного происхождения и, в частности, исследования ВВ, имеющих сложную вложенную структуру.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Научно-образовательной Школы МГУ «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология» (проект № 24-Ш04-14). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. От пациентов было получено письменное информированное согласие на исследование. Исследование проводилось в соответствии с рекомендациями Хельсинской декларации и одобрено Комитетом по этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина (Разрешение комитета по этике, протокол №1 от 25 января 2024 г.). Изображения мВВ получали с использованием Уникального комплекса оборудования «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия» биологического факультета МГУ. О.С. Соколова руководит группой по разработке инновационных лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в Шэньчжэньском университете МГУ-ППИ, Китай (2022KCXTD034).

5. Emelyanov A., Shtam T., Kamyshinsky R., Garaeva L., Verlov N., Miliukhina I., Kudrevatykh A., Gavrilov G., Zabrodskaya Y., Pchelina S., Konevega A. Cryo-electron microscopy of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227949.
6. Miroshnikova V.V., Dracheva K.V., Kamyshinsky R.A., Yastremsky E.V., Garaeva L.A., Pobozheva I.A., Landa S.B., Anisimova K.A., Balandov S.G., Hamid Z.M., Vasilevsky D.I., Pchelina S.N., Konevega A.L., Shtam T.A. Cryo-electron microscopy of adipose tissue extracellular vesicles in obesity and type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2023;18(2):e0279652.
7. Kapoor K.S., Kong S., Sugimoto H., Guo W., Boominathan V., Chen Y.L., Biswal S.L., Terlier T., McAndrews K.M., Kalluri R. Single extracellular vesicle imaging and computational analysis identifies inherent architectural heterogeneity. *ACS Nano.* 2024;18(18):11717–11731.
8. Wagner T., Merino F., Stabrin M., et al. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Commun. Biol.* 2019;2:218.

9. 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.

10. Schönnenbeck P., Junglas B., Sachse C. CryoVIA: An image analysis toolkit for the quantification of membrane structures from cryo-EM micrographs. *Structure*. 2025;33(4): 808–819.

11. Skryabin G.O., Vinokurova S.V., Galetsky S.A., Elkin D.S., Senkovenko A.M., Denisova D.A., Komelkov A.V., Stilidi I.S., Peregorodiev I.N., Malikhova O.A., Imaraliev O.T., Enikeev A.D., Tchevkina E.M. Isolation and characterization of extracellular vesicles from gastric juice. *Cancers*. 2022;14(14):3314.

13. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 2005;152(1):36–51.

14. Kruskal W.H., Wallis W.A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* 47(260):583–621.

15. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012;9(7):676–682.

16. Skryabin G., Enikeev A., Beliaeva A., Galetsky S., Bagrov D., Moiseenko A., Vnukova A., Imaraliev O., Karasev I., Tchevkina E. Distinctive features of extracellular vesicles present in the gastric juice of patients with gastric cancer and healthy subjects. *Int. J. Mol. Sci.* 2025;26(12):5857.

17. Saadeldin I.M., Seif E., Jongki C. Relevance of multilamellar and multicompartamental vesicles in biological fluids: understanding the significance of proportional variations and disease correlation. *Biomarker Res.* 2023;11(1):77.










Поступила в редакцию 02.07.2025

После доработки 19.08.2025

Принята в печать 24.08.2025

ORIGINAL RESEARCH

Cryo-electron microscopy demonstrates polymorphism of small extracellular vesicles

T.S. Trifonova¹ , A.V. Moiseenko¹ , G.O. Skryabin² , O.T. Imaraliev² ,
E.M. Chevkina² , I.A. Karasev² , A.Yu. Efimenko³ , S.I. Trifonov⁴,
D.V. Bagrov^{1, 2} , O.S. Sokolova^{1, 5, *} 

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

²Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology,
23 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

³Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Russia,
119234, 27–10 Lomonosovsky Prospekt, Moscow, Russia;

⁴Pyrus Ltd., 24 Surikova Str., Moscow, 125080, Russia;

⁵Faculty of Biology, MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, Guangdong Province,
518172, China

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

In this study the computer program Veronica was created – a specialized environment for marking images obtained by cryo-electron microscopy. It allows to highlight the contours of closed and unclosed objects and save them in a convenient format for analysis, as well as to determine the specified metrics for the study of morphology. The Veronica program was used to characterize the morphology of samples of small extracellular vesicles isolated from gastric juice of patients with gastric adenocarcinoma and conditionally healthy donors. An approach to image partitioning and calculation of indices to describe vesicles based on the measurement of nesting (a measure of the number of particles nested within each other) and branching (a measure of the number of adjacent particles surrounded by a common membrane) parameters has been proposed.

Keywords: small extracellular vesicles, cryo-electron microscopy, image processing, gastric cancer

Funding: This work was financially supported by the MSU Scientific and Educational School “Molecular Technologies of Living Systems and Synthetic Biology” (project No. 24-Sh04-14).

Сведения об авторах

Трифонова Татьяна Сергеевна – лаборант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: trf.trifonova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2042-5244>

Моисеенко Андрей Владимирович — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Скрябин Глеб Олегович — мл. науч. сотр. лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Тел.: 8-499-444-24-24; e-mail: go.skryabin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4127-6973>

Имаралиев Оятиддин Турсунович — врач-эндоскопист НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина. Тел.: 8-499-444-24-24; e-mail: o.imaraliev@ronc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5247-3219>

Чевкина Елена Максимовна — докт. биол. наук, зав. лаб. регуляции клеточных и вирусных онкогенов НМИЦ онкологии имени Н.Н. Блохина. Тел.: 8-499-444-24-24; e-mail: tchevkina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Карасев Иван Александрович — канд. мед. наук, доцент, и.о. зав. отделением, ст. науч. сотр., врач-эндоскопист НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Тел.: 8-499-444-24-24; e-mail: i.karasev@ronc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7025-970X>

Ефименко Анастасия Юрьевна — докт. мед. наук, зав. лабораторией репарации и регенерации тканей, Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт МГУ. Тел.: 8-495-531-27-77 доб. 3159; e-mail: efimenkoay@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0696-1369>

Трифонов Сергей Игоревич — канд. физ.-мат. наук, аналитик ООО «Пайрус». Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: trf@ya.ru

Багров Дмитрий Владимирович — канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>

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>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.352.332+577.352.465

N- или C-концевое положение флуоресцентного белка mKate2 в составе химеры mKate2-KCa3.1 влияет на мембранную экспрессию канала

В.Н. Корабейникова^{1, 2, *}, А.В. Феофанов^{1, 2} , О.В. Некрасова¹ 

¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

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

*e-mail: var.kora.3@gmail.com

Активируемый кальцием калиевый канал промежуточной проводимости $K_{Ca}3.1$ способствует Ca^{2+} -зависимой гиперполяризации клеточной мембраны, а нарушения его работы наблюдаются при аутоиммунных и онкологических заболеваниях. Для изучения этого канала и его пептидных блокаторов с использованием флуоресцентного анализа были сконструированы плазмиды, кодирующие α -субъединицу $K_{Ca}3.1$, слитую с флуоресцентным белком mKate2 на N- или C-конце, а также получен флуоресцентный лиганд ChTx-GFP, объединяющий в себе пептидный блокатор харибдотоксин и зеленый флуоресцентный белок. Установлено, что mKate2 на N-конце α -субъединицы блокирует перенос канала в плазматическую мембрану клеток Neuro-2a, тогда как mKate2 на ее C-конце не препятствует эффективному накоплению канала в плазматической мембране и формированию его правильной тетрамерной структуры, способной связывать пептидные блокаторы. Лиганд ChTx-GFP связывается на мембране с каналом $K_{Ca}3.1$ при концентрации 20 нМ и может быть использован для флуоресцентного имиджинга этих каналов в клетках млекопитающих.

Ключевые слова: калиевые каналы, канал $K_{Ca}3.1$, пептидные блокаторы, флуоресценция, конфокальная микроскопия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-7

Введение

Кальций-зависимые калиевые каналы — это белки клеточной мембраны, которые активируются в ответ на увеличение концентрации кальция внутри клетки и осуществляют перенос ионов калия и регулируют потенциал мембраны [1]. Канал промежуточной проводимости $K_{Ca}3.1$, экспрессирующийся в эритроцитах, Т- и В-лимфоцитах, а также сосудином эндотелии, участвует в кальциевой сигнализации и играет роль в регуляции разнообразных физиологических процессов, включая пролиферацию клеток [2, 3], синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов [4], изменение объема клеток [5], миграцию [6] и апоптоз [7]. Поскольку нарушения нормального функционирования $K_{Ca}3.1$ ассоциированы с рядом заболеваний, в первую очередь аутоиммунных и онкологических, канал рассматривается в качестве потенциальной мишени при их лечении [8]. Возможность подавления проли-

ферации с помощью блокаторов канала $K_{Ca}3.1$ продемонстрирована на лимфоцитах, активация которых сопровождается повышением уровня экспрессии канала $K_{Ca}3.1$ [2]. Таким образом, изучение механизмов функционирования $K_{Ca}3.1$ и его взаимодействия с блокаторами является важной медико-биологической задачей.

Большим терапевтическим потенциалом обладают пептидные блокаторы, источником которых являются животные яды, в частности, яды скорпионов [9]. В настоящее время известно лишь небольшое количество пептидных блокаторов канала $K_{Ca}3.1$, среди которых природные токсины харибдотоксин (ChTx) и мауротоксин [10], обладающие наномолярной аффинностью к каналу $K_{Ca}3.1$, а также несколько мутантных и искусственно сконструированных химерных пептидов [11–13]. При этом многие из известных пептидных блокаторов калиевых каналов до сих пор не исследованы в отношении канала $K_{Ca}3.1$.

Изучение канала $K_{Ca}3.1$, а также его пептидных блокаторов требует разработки новых подходов, в том числе с использованием флуоресцентного анализа. В данной работе представлены результаты применения флуоресцентных белков mKate2 и eGFP для создания методами биоинженерии соответственно флуоресцирующего канала mKate2- $K_{Ca}3.1$ (K - $K_{Ca}3.1$) с высокой экспрессией в плазматической мембране клеток млекопитающих и его флуоресцентного лиганда ChTx-GFP на основе ChTx из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus*.

Материалы и методы

Конструирование флуоресцентно-меченых α -субъединиц канала $K_{Ca}3.1$. Ген *KCNN4*, кодирующий α -субъединицу $K_{Ca}3.1$, предоставлен д.б.н. Е.С. Никитиным (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва). Плазмида p*KCNN4*-mKate2, кодирующая α -субъединицу $K_{Ca}3.1$ слитую по С-концу через линкер GGGGSGGLRS с флуоресцентным белком mKate2 ($K_{Ca}3.1$ -K), была получена ранее [14].

Для получения плазмиды pmKate2-KCNN4, ген *KCNN4* был клонирован в плазмиду pmKate2-C (Evrogen, Россия) по сайтам узнавания рестриктаз *Bgl*III и *Hind*III. Амплификацию гена *KCNN4* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров *KCNN4*-f1 5'-TTCAAGTCTGGCGGGGATCTGGTGCTTG-3' и *KCNN4*-r1 5'-TTCAAGCTTCACTTGGACTGCTGGCTGG-3' (последовательности сайтов *Bgl*III и *Hind*III подчеркнуты). Плазмида pmKate2-KCNN4 обеспечивает экспрессию α -субъединицы $K_{Ca}3.1$, к N-концу которой через линкер GGGGSGGLRS присоединен флуоресцентный белок mKate2 (K - $K_{Ca}3.1$).

Нуклеотидная последовательность гена *KCNN4* в плазмиде pmKate2-KCNN4 была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера (Evrogen, Россия).

Получение флуоресцентно-меченого харибдотоксина (ChTx-GFP). Ген, кодирующий последовательность пептидного токсина ChTx (QFTNVSC TTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRYS, 37 а.о.), был синтезирован с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз *Kpn*I и *Bam*HI (подчеркнуты) и последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазы TEV (выделена жирным шрифтом): *Ch*-f1 (5'-TTCTGGTACCGAAAACCTGTATTTCAGCAGTTCCACCAATGTGAGCTGCAC-3'), *Ch*-f2 (5'-GGAGCGTGTCAGCGCCTGCATAACACCAGCCGTGGCAAA TGCATG-3'), *Ch*-r1 (5'-CTGACACACGCTCCAGCATTTCTTTAGACGTGGTGCAGCTCACATT-3') и *Ch*-r2 (5'-TTCTGGATCCGCTATAACAGCGACATTTTTTATTTCATGCAATTTGCCAC-3'). Полученный фрагмент ДНК длиной около 150 пар основа-

ний (п.о.) гидролизировали эндонуклеазами рестрикции *Kpn*I и *Bam*HI, а затем клонировали по сайтам *Kpn*I/*Bam*HI в экспрессионную плазмиду pET23-MalE-AgTx2-L3-GFP [15], заменяя ген пептидного токсина AgTx2 на ген ChTx. В результате была получена плазмида pET23-MalE-ChTx-L3-GFP, обеспечивающая экспрессию гибридного белка MBP-ChTx-GFP, в котором ChTx фланкирован по N-концу мальтозасвязывающим белком (MBP, Maltose-Binding Protein) и сайтом расщепления протеазы TEV, а по С-концу связан с флуоресцентным белком GFP через полипептидный линкер L3 (GSGGSGGSGGTGGAGGATST).

Выделение флуоресцентного харибдотоксина (ChTx-GFP) проводили в соответствии с разработанной ранее методикой [15]. Химерный белок MBP-ChTx-GFP экспрессировали в клетках *E. coli* Rosetta-gamiB(DE3)pLysS (Novagen). Очистку целевого белка из клеточного лизата осуществляли методом Ni-аффинной хроматографии с использованием Ni-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США), полученный белок MBP-ChTx-GFP расщепляли протеазой TEV, а образовавшийся в результате расщепления белок ChTx-GFP отделяли с помощью повторной Ni-аффинной хроматографии (рис. 1А). Очищенный ChTx-GFP хранили при температуре 4°C. Определение концентрации белка проводили спектрофотометрически (рис. 1Б) с использованием молярного коэффициента экстинкции для eGFP ($\epsilon(488 \text{ нм}) = 55\,000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Выход ChTx-GFP составлял около 20 мг на 1 л культуры.

Эксперименты с клетками. Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (Ранесо, Россия), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (PAA Laboratories, Австрия) при 37°C (5% CO_2) с пересевом два раза в неделю.

Для экспериментов клетки высевали на покрытые поли-L-лизинном стекла в 24-луночные планшеты (3×10^4 клеток на лунку). Через 24 ч клетки трансфицировали плазмидными конструкциями K - $K_{Ca}3.1$ или $K_{Ca}3.1$ -K, используя реагент GenJector-U (Молекта, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Исследования проводили через 24 ч после трансфекции.

В исследованиях флуоресцентного лиганда в лунки планшета к трансфицированным клеткам добавляли ChTx-GFP в концентрации 10 нМ и инкубировали в среде с сывороткой 1 ч (37°C, 5% CO_2).

Конфокальная микроскопия. Использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica-SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия), оснащенный водо-иммерсионным объективом с увеличением 63 \times (HCX PL APO, NA = 1,2). Латеральное и аксиальное разрешение в экспериментах было 0,2 и 0,6 мкм соответственно.

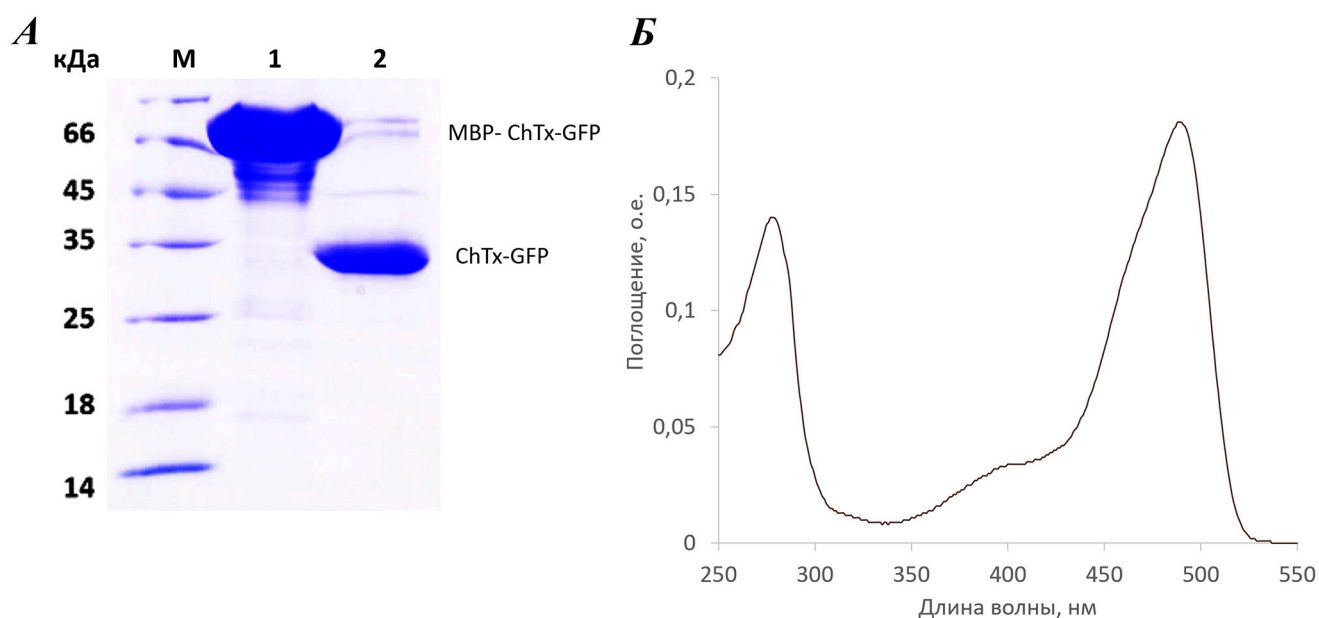


Рис. 1. Выделение ChTx-GFP. **А** – Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия белка MBP-ChTx-GFP после Ni-аффинной хроматографии и обессоливания (дорожка 1) и очищенного белка ChTx-GFP после расщепления белка MBP-ChTx-L3-GFP протеазой TEV (дорожка 2). М – маркеры молекулярных масс белков. **Б** – Спектр поглощения очищенного белка ChTx-GFP.

Флуоресценцию K-K_{Ca}3.1 или K_{Ca}3.1-K возбуждали светом с длиной волны 561 нм, а регистрировали в диапазоне длин волн 600–700 нм. Флуоресценцию лиганда ChTx-GFP возбуждали при 488 нм, а регистрировали в диапазоне 498–550 нм.

Результаты и обсуждение

Эффективную экспрессию α -субъединиц K_{Ca}3.1, слитых с флуоресцентным белком mKate2 по N- и C-концу, наблюдали в 40% трансфицированных клеток Neuro-2a. Обнаружено, что характер распределения K-K_{Ca}3.1 и K_{Ca}3.1-K в клетках различается. По данным конфокальной микроскопии для белка K_{Ca}3.1-K характерно интенсивное накопление в плазматической мембране, дополненное неоднородным распределением в цитоплазме (рис. 2А). В свою очередь, белок K-K_{Ca}3.1 распределен неоднородно в цитоплазме клеток, но без выраженной локализации в плазматической мембране (рис. 2Б). Картина распределения K-K_{Ca}3.1 похожа на типичное распределение α -субъединиц калиевых каналов в эндоплазматическом ретикулуме [16, 17].

Лиганд ChTx-GFP был получен в экспрессионной системе *E. coli* в составе гибридного белка MBP-ChTx-GFP. Использование мальтозасвязывающего белка в качестве белка-партнера способствует высокому уровню экспрессии и растворимости гибридного белка в клетках *E. coli*, а наличие сайта расщепления протеазы TEV, прилегающего к N-концу ChTx, обеспечивает сохранение нативного N-конца этого пептида после расщепления гибрида [15]. Полученный гибридный белок MBP-ChTx-GFP и флуоресцентно-меченый лиганд ChTx-GFP соответствовали по молекулярной массе расчетным значениям и не имели признаков деградации (рис. 1А, Б)

Инкубация клеток, экспрессирующих канал K_{Ca}3.1-K, с белком ChTx-GFP сопровождается окрашиванием плазматической мембраны клеток в спектральном диапазоне 498–550 нм, что свидетельствует о взаимодействии флуоресцентно-меченого лиганда ChTx-GFP с таргетными каналами K_{Ca}3.1-K, локализованными в клеточной мембране (рис. 2В, Г). В случае клеток, экспрессирующих K-K_{Ca}3.1, окрашивания мембраны не обнаружено (рис. 2Д, Е), что подтверждает отсутствие канала K-K_{Ca}3.1 в плазматической мембране, выявленное при изучении внутриклеточного распределения канала (рис. 2Б). При трансфекции клеток Neuro-2a плазмидами, экспрессирующими каналы K_{Ca}3.1-K или K-K_{Ca}3.1, в поле зрения микроскопа попадают нетрансфицированные клетки, которые не связывают ChTx-GFP на своей поверхности (рис. 2В, Г, положение клеток указано желтыми стрелками), что указывает на отсутствие неспецифического связывания используемого флуоресцентного лиганда с клеточной мембраной.

Зеленая флуоресценция в цитоплазме клеток, часто имеющая выраженный гранулярный характер, наблюдается в нетрансфицированных клетках и может усиливаться в клетках после трансфекции (рис. 2Г, Е, голубые стрелки). Эта флуоресценция связана с образованием в цитоплазме пигментов старения [18] и не является, в случае инкубации клеток с ChTx-GFP, признаком внутриклеточного накопления этого лиганда.

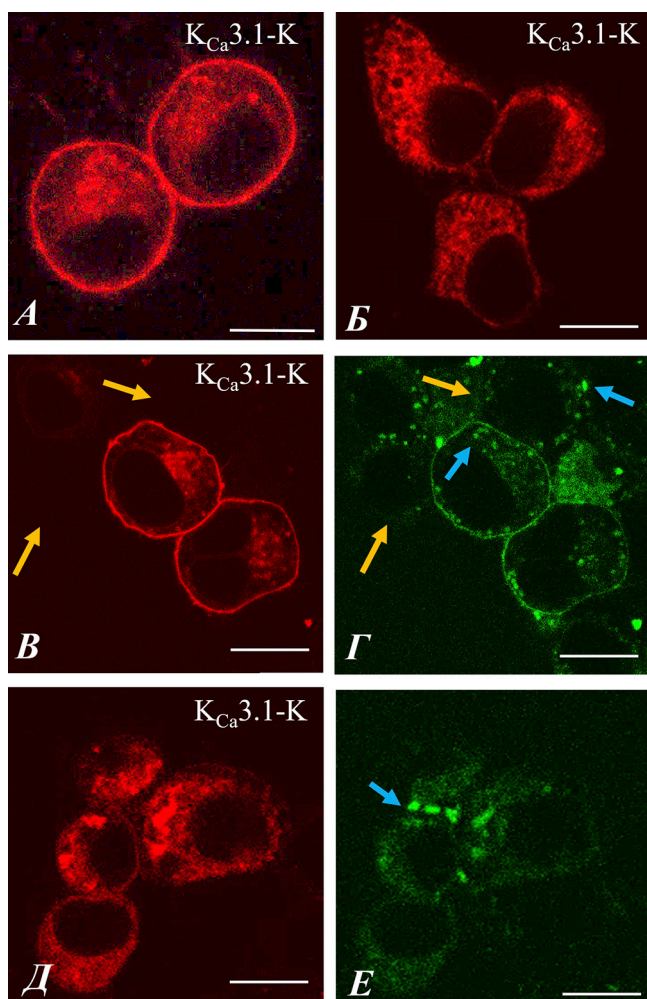


Рис. 2. Конфокальные изображения клеток Neuro-2a, экспрессирующих KCa3.1-K (А, В, Г) и К-КCa3.1 (Б, Д, Е) в отсутствие (А, Б) и в присутствии (В–Е) 20 нМ ChTx-GFP. Типичные распределения KCa3.1-K (А, В) и KCa3.1-K (Б, Е) в клетках Neuro-2a. Распределения флуоресценции в спектральном диапазоне 498–550 нм после инкубации клеток с 20 нМ ChTx-GFP (Г, Е). Желтыми стрелками указаны не-трансфицированные клетки, голубыми – пигменты старения. Метки масштаба – 20 мкм.

Известно, что ChTx блокирует токи ионов калия через канал $K_{Ca3.1}$, связываясь в области внешнего вестибуля поры с константой диссоциации 5 нМ [10]. Во взаимодействии пептидных блокаторов с порой участвуют аминокислотные остатки нескольких α -субъединиц при их правильной сборке в функционально активный канал [16, 18]. Очевидно, что мембранная флуоресценция ChTx-GFP отражает связывание данного белка с $K_{Ca3.1}$ -К на плазматической мембране, что свидетельствует о следующем: $K_{Ca3.1}$ -К в мембране находится в составе каналов; ChTx, входящий в химерный белок ChTx-GFP, сохраняет способность взаимодействовать с каналом $K_{Ca3.1}$.

Использование флуоресцентных белков для мечения пептидных блокаторов, как правило, не приводит к появлению неспецифического связывания с компонентами плазматической мембры-

ны, но снижает их аффинность (в ряде случаев очень значительно) и может менять профиль взаимодействия с каналами [15, 16, 19]. В случае ChTx-GFP интенсивное взаимодействие с каналом $K_{Ca3.1}$ наблюдалось при концентрации лиганда 20 нМ и больше, что отражает снижение аффинности пептидного токсина ChTx к каналу в составе химерного белка, содержащего флуоресцентный белок eGFP. Образование комплексов между ChTx-GFP и каналом $K_{Ca3.1}$ не сопровождалось заметным изменением распределения канала на мембране клеток Neuro-2a (рис. 2А, В).

Отсутствие накопления K - $K_{Ca3.1}$ в плазматической мембране, подтвержденное отсутствием связывания с ChTx-GFP (рис. 2Б, Д, Е), свидетельствует о негативном влиянии mKate2, присоединенного к N-концу α -субъединицы, на транспорт K - $K_{Ca3.1}$ из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану.

На N-конце α -субъединицы $K_{Ca3.1}$ находится так называемая «лейциновая молния» (застежка), которая определяет не только тетрамеризацию α -субъединиц, но и транспорт канала в плазматическую мембрану [20]. В составе канала N-концы α -субъединиц сближены с С-концами, которые в свою очередь участвуют в связывании кальмодулина [21]. Эффективное взаимодействие между кальмодулином и С-концевой областью α -субъединицы критически важно для сборки канала в эндоплазматическом ретикулуме и его дальнейшего переноса в плазматическую мембрану [21]. Возможно, что mKate2 на N-конце α -субъединицы стерически мешает связыванию кальмодулина С-концевой областью α -субъединицы. В свою очередь, mKate2, присоединенный к С-концу α -субъединицы $K_{Ca3.1}$, по-видимому, не влияет на взаимодействие канала с кальмодулином. Отметим, что для эффективной экспрессии на мембране клеток Neuro-2a канала $K_{Ca3.1}$ не потребовалось вводить в аминокислотную последовательность α -субъединицы дополнительных мутаций, способствующих транспорту канала в мембрану, в отличие, например, от ранее исследованных каналов Kv1.1 и Kv1.2 [16, 17]. Это свойство канала $K_{Ca3.1}$ может быть связано как с присутствием в составе α -субъединицы сильных сигнальных аминокислотных последовательностей, направляющих транспорт канала в мембрану [21], так и с эндогенной экспрессией в клетках Neuro-2a необходимых вспомогательных белков-переносчиков.

Заключение

Наличие флуоресценции у калиевых каналов при их экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих существенно облегчает изучение этих каналов методами флуоресцентной микроскопии и электрофизиологии [14, 16, 17, 22–26]. При конструировании флуоресцирующего канала $K_{Ca3.1}$ обнаружено, что транспорт в плазматическую

мембрану канала $K_{Ca}3.1$, α -субъединицы которого слиты с флуоресцентным белком mKate2, критически зависит от положения mKate2 в составе химерной белковой конструкции. Белок mKate2 на N-конце α -субъединицы $K_{Ca}3.1$ не мешает экспрессии $K-K_{Ca}3.1$ в клетках Neuro-2a, но блокирует его транспорт в плазматическую мембрану. Белок mKate2 на C-конце α -субъединицы $K_{Ca}3.1$ сохраняет способность к интенсивному встраиванию флуоресцирующего канала в мембрану и его взаимодействию с пептидными блокаторами, в том числе с флуоресцентно-мечеными.

ChTx-GFP расширяет видовое разнообразие флуоресцентных лигандов калиевых каналов на основе пептидных блокаторов слитых с флуорес-

центными белками для имиджинга каналов на мембране клеток млекопитающих. ChTx-GFP и $K_{Ca}3.1$ -K могут быть использованы в качестве компонентов аналитической клеточной системы для изучения канала $K_{Ca}3.1$ и поиска эффективных пептидных блокаторов этого канала, как это показано ранее на примере потенциал-зависимых калиевых каналов Kv1 [16, 17].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-1400406П). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orfali R., Albanyan N. Ca^{2+} -sensitive potassium channels. *Molecules*. 2023; 28(2):885.
2. Ghanshani S., Wulff H., Miller M.J., Rohm H., Neben A., Gutman G.A., Cahalan M.D., Chandy K.G. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 2000;275(47):37137–37149.
3. Calderón Artavia C.G., Arvelo Álvarez F.A. Kca3.1-related cellular signalling involved in cancer proliferation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2024;58(2):107–127.
4. Cahalan M.D., Chandy K.G. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 2009;231(1):59–87.
5. Deutsch C., Chen L.Q. Heterologous expression of specific K^+ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(21):10036–10040.
6. Cruse G., Duffy S.M., Brightling C.E., Bradding P. Functional KCa3.1 K^+ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax*. 2006;61(10):880–885.
7. Szabò I., Zoratti M., Gulbins E. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. *FEBS Lett.* 2010;584(10):2049–2056.
8. Chou C.C., Lunn C.A., Murgolo N.J. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008;8(2):179–187.
9. Brown B.M., Shim H., Christophersen P., Wulff H. Pharmacology of small-and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2020;60(1):219–240.
10. Visan V., Sabatier J.M., Grissmer S. Block of maurotoxin and charybdotoxin on human intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (hIKCa1). *Toxicol.* 2004;43(8):973–980.
11. Pimentel C., M'Barek S., Visan V., Grissmer S., Sampieri F., Sabatier J.M., Darbon H., Fajloun Z. Chemical synthesis and 1H-NMR 3D structure determination of AgTx2-MTX chimera, a new potential blocker for Kv1.2 channel, derived from MTX and AgTx2 scorpion toxins. *Protein Sci.* 2008;17(1):107–118.
12. M'Barek S., Chagot B., Andreotti N., Visan V., Mansuelle P., Grissmer S., Marrakchi M., El Ayeb M., Sampieri F., Darbon H., Fajloun Z., De Waard M., Sabatier J.M. Increasing the molecular contacts between maurotoxin and Kv1.2 channel augments ligand affinity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2005;60(3):401–411.
13. Rauer H., Lanigan M.D., Pennington M.W., Aiyar J., Ghanshani S., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca^{2+} -activated over voltage-gated K^+ channels. *J. Biol. Chem.* 2000;275(2):1201–1208.
14. Bal N.V., Oblasov I., Ierusalimsky V.N., Shvadchenko A.M., Fortygina P., Idzhilova O.S., Borodinova A.A., Balaban P.M., Feofanov A.V., Nekrasova O.V., Nikitin E.S. Potassium KCa3.1 channel overexpression deteriorates functionality and availability of channels at the outer cellular membrane. *Sci. Rep.* 2025;15(1):4928.
15. Primak A.L., Orlov N.A., Peigneur S., Tytgat J., Ignatova A.A., Denisova K.R., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. AgTx2-GFP, fluorescent blocker targeting pharmacologically important Kv1.x (x = 1, 3, 6) channels. *Toxins*. 2023;15(3):229.
16. Ignatova A.A., Kryukova E.V., Novoseletsky V.N., Kazakov O.V., Orlov N.A., Korabeynikova V.N., Larina M.V., Fradkov A.F., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. New high-affinity peptide ligands for Kv1.2 channel: Selective blockers and fluorescent probes. *Cells*. 2024;13(24):2096.
17. Orlov N.A., Kryukova E.V., Efremenko A.V., Yakimov S.A., Toporova V.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Interactions of the Kv1.1 channel with peptide pore blockers: a fluorescent analysis on mammalian cells. *Membranes*. 2023;13(7):645.
18. Porta E.A. Pigments in aging: An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;959(1):57–65.
19. Nekrasova O.V., Volyntseva A.D., Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Yu.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of peptide blockers with Kv1.6 pore domain: Molecular modeling and studies with KcsA-Kv1.6 channel. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2017;12(2):260–276.
20. Denisova K.R., Orlov N.A., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. Atto488-agitoxin 2—a fluorescent ligand with increased selectivity for Kv1.3 channel binding site. *Bioengineering*. 2022;9(7):295.
21. Jones H.M., Hamilton K.L., Papworth G.D., Syme C.A., Watkins S.C., Bradbury N.A., Devor D.C. Role

of the NH2 terminus in the assembly and trafficking of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel hIK1. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):15531–15540.

22. Lee C.H., MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science*. 2018;360(6388):508–513.

23. Balut C.M., Hamilton K.L., Devor D.C. Trafficking of intermediate (KCa3.1) and small (KCa2.x) conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a novel target for medicinal chemistry efforts? *ChemMedChem*. 2012;7(10):1741–1755.

24. Jiménez-Pérez L., Ciudad P., Álvarez-Miguel I., Santos-Hipólito A., Torres-Merino R., Alonso E., de la Fuente M.Á., López-López J.R., Pérez-García M.T. Molecular determinants of Kv1.3 potassium channels-induced proliferation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(7):3569–3580.

25. Spear J.M., Koborssy D.A., Schwartz A.B., Johnson A.J., Audhya A., Fadool D.A., Stagg S.M. Kv1.3 contains an alternative C-terminal ER exit motif and is recruited into COPII vesicles by Sec24a. *BMC Biochem.* 2015;16(1):16.

26. Vicente R., Escalada A., Villalonga N., Texidó L., Roura-Ferrer M., Martín-Satué M., López-Iglesias C., Soler C., Solsona C., Tamkun M.M., Felipe A. Association of Kv1.5 and Kv1.3 Contributes to the major voltage-dependent K^{+} channel in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2006;281(49):37675–37685.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 18.09.2025

Принята в печать 19.09.2025

RESEARCH ARTICLE

N- or C-terminal position of the fluorescent protein mKate2 in the mKate2-KCa3.1 chimera influences membrane expression of the channel

V.N. Korabeynikova^{1, 2, *}, A.V. Feofanov^{1, 2} , O.V. Nekrasova¹ 

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya Str., Moscow, 117997, Russia;

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

*e-mail: var.kora.3@gmail.com

The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ promotes calcium-dependent hyperpolarization of the cell membrane. Its malfunction has been observed in autoimmune and oncological diseases. To study this channel and its peptide blockers using fluorescence analysis, plasmids encoding the α -subunit $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ fused with the fluorescent protein mKate2 at the N- or C-terminus were constructed, and the fluorescent ligand ChTx-GFP was obtained, which is a combination of the peptide blocker charybdotoxin and the green fluorescent protein. It was found that mKate2 at the N-terminus of the α -subunit blocks the transport of the channel into the plasma membrane of Neuro-2a cells, while mKate2 at its C-terminus does not interfere with the efficient accumulation of the channel in the plasma membrane and the formation of a regular tetrameric structure capable of binding peptide blockers. The ligand ChTx-GFP binds to the KCa3.1 channel on the membrane at a concentration of 20 nM and can be used for fluorescent imaging of these channels in mammalian cells.

Keywords: potassium channels, channel $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$, peptide blockers, fluorescence, confocal microscopy

Funding: The research was supported by the Russian Science Foundation, project no. 22-1400406P.

Сведения об авторах

Коробейникова Варвара Николаевна — инженер лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: var.kora.3@gmail.com

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук., гл. науч. сотр., зав. лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН; проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Некрасова Оксана Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории инженерии белка ИБХ РАН. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: okatja@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7216-1618>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.212

**Визуализация искусственных полинуклеосомных конструкций
методом атомно-силовой микроскопии****А.В. Любительев^{1,*} , Д.В. Багров¹ , О.В. Гераськина² , В.М. Студитский^{1,3}** ¹*Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;*³*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA***e-mail: varanus-salvator@yandex.ru*

Генетический материал клетки в интерфазном ядре представлен в виде плотной ДНК-белковой структуры, называемой хроматином. Строение и динамика отдельных нуклеосом, представляющих собой первый уровень компактизации ДНК, в настоящее время хорошо изучена, тогда как сведения о структурно-функциональной организации более высоких уровней организации хроматина все еще ограничены. В настоящей работе предложен метод визуализации полинуклеосомных конструкций при помощи атомно-силовой микроскопии. Продемонстрирована сборка полинуклеосом на плазмиде с применением октамеров рекомбинантных гистонов. Установлено, что при применении глутарового альдегида для фиксации препарата перед нанесением на подложку, нуклеосомы сохраняются, а их ширина и высота хорошо соответствует литературным данным. При этом сами плазмиды выглядят расправленными, что может помочь в изучении ДНК-белковых взаимодействий.

Ключевые слова: *хроматин, нуклеосома, ДНК-белковые комплексы, атомно-силовая микроскопия*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-8

Введение

В интерфазных ядрах эукариотических клеток ДНК организована в сложную ДНК-белковую структуру, называемую хроматином. Базовой структурной единицей хроматина является нуклеосома, представляющая собой октамер гистоновых белков, вокруг которого обернуто ~1,7 витка ДНК [1]. Следующим уровнем компактизации является так называемая 10-нм фибрилла, представляющая собой цепь нуклеосом, сформированных на хромосомной ДНК [2]. В присутствии низких концентраций катионов такая фибрилла формирует более компактную структуру, получившую название 30-нм фибриллы [3], для которой было предложено несколько альтернативных моделей организации [4, 5]. Долгое время считалось, что один из вариантов укладки ДНК в 30-нм фибриллу соответствует следующему уровню иерархической организации генетического материала *in vivo* [6], однако обнаружить подобные структуры *in vivo* удалось лишь для очень ограниченного числа объектов [7]. В большинстве же интерфазных клеточных ядер иерархической организации укладки хроматина не наблюдалось [8–10]. В соответствии

с этим в настоящее время считается, что интерфазный хроматин в диапазоне от сотен до тысяч п. н. не имеет четкой структуры [11, 12], а следующим уровнем иерархической укладки являются топологически ассоциированные домены (Topologically Associating Domain, TAD), возникающие в результате экструзии петель 10-нм фибриллы когезинами или конденсинами [13, 14]. В рамках этих представлений хроматин в масштабе единиц тысяч п. н. представляет собой плотно упакованные полинуклеосомные цепочки, не имеющие четкой структуры и проявляющие свойства жидкой или гелеобразной фазы [15, 16]. Отдельные нуклеосомы при этом могут взаимодействовать как с ближайшими соседями, так и с фрагментами других TAD [17, 18]. Подобная организация интерфазного хроматина обуславливает необходимость учета межинуклеосомных взаимодействий и конформационных ограничений при моделировании структур, участвующих в регуляции генетического аппарата клетки. Еще одним процессом, обуславливающим структурную и функциональную организацию хроматина, является формирование крупных надмолекулярных структур нечет-

кого состава [19], происходящее за счет разделения жидких фаз и взаимодействия между белковыми доменами со внутренней неупорядоченностью [20]. Указанные особенности ограничивают информативность моонуклеосомных моделей, традиционно применяемых для анализа динамики и регуляции работы хроматина. Экспериментальные подходы с применением ди- и тринуклеосом позволяют учесть некоторые свойства высших уровней компактизации хроматина, такие, как присутствие соседних нуклеосом и ограничение подвижности линкерной ДНК, однако, в силу небольших размеров ДНК-матриц, их применение ограничено в основном изучением сайт-специфических взаимодействий [21]. Полинуклеосомные матрицы с регулярным расположением нуклеосом моделируют межнуклеосомные взаимодействия и, в сочетании с криоэлектронной микроскопией высокого разрешения, могут применяться для визуализации взаимодействия с хроматином белков, содержащих участки со внутренней неупорядоченностью, таких, как линкерные гистоны [22]. Тем не менее, регулярные полинуклеосомные матрицы в подобных экспериментах свернуты в фибриллоподобные структуры, отсутствующие в большинстве клеточных ядер. Экспериментальные подходы, обеспечивающие визуализацию нерегулярных или квазирегулярных полинуклеосомных матриц и их комплексов с регуляторными белками могут позволить моделировать структуры, которые при помощи текущих модельных систем воспроизвести не удастся. В настоящей работе предлагается метод визуализации искусственных полинуклеосомных конструкций при помощи атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

Сборка полинуклеосом. Плазмида рYP05, содержащая 13 tandemных повторов нуклеосом-позиционирующей последовательности S601 [23], была сконструирована ранее [24]. Для амплификации плазмиды применили штамм *E. coli* XL10 Gold. Клетки бактерий трансформировали электропорацией и выращивали на среде LB в течение 12 ч при 37°C. Выделение плазмиды производили при помощи набора Plasmid midiprep 2.0 (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Октамеры рекомбинантных гистонов *Xenopus laevis* были получены с применением ранее опубликованной методики [25]). Для реконституции нуклеосом плазмиду смешивали с октамерами гистонов в буфере для диализа (2 М NaCl, 10 мМ HEPES, 0,1% NP40, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанол). Полученную пробу диализовали против буферов с последовательно уменьшающейся концентрацией NaCl, аналогично описанной ранее процедуре [26].

Рестрикционный анализ препаратов полинуклеосом. Для оценки качества получаемых полину-

клеосом применяли метод удлинения праймера, описанный ранее [24]. Препараты полинуклеосом обрабатывали рестриктазами AluI и EcoRI (Сибзеним, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образовавшиеся фрагменты ДНК экстрагировали из раствора с помощью смеси фенола и хлороформа. Очищенную ДНК использовали в качестве матрицы для реакции удлинения праймеров с олигонуклеотидом, меченым флуорофором Cy5 (Lumiprobe, Россия), комплементарным участку плазмидной ДНК выше последовательности S601, наиболее удаленной от сайта узнавания рестриктазы EcoRI. Полученную смесь оцДНК, несущих флуорофоры Cy5, анализировали при помощи секвенирующего электрофореза в полиакриламидном геле с мочевиной. Визуализацию полос в геле производили с помощью флуоресцентного сканера Typhoon (Amersham, США).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Для измерений методом АСМ образцы полинуклеосом фиксировали с помощью 1%-ного глутарового альдегида. Фиксацию проводили в буфере (10 мМ HEPES, pH 7,5) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы разводили до концентрации ДНК ~1–3 мкг/мл и добавляли раствор MgCl₂ до концентрации 2–3 мМ. Этот раствор наносили на сколотую поверхность слюды и инкубировали в течение 1 мин. После этого каплю раствора удаляли фильтровальной бумагой и отмывали поверхность слюды водой в течение 3–5 мин. В конце слюду высушивали потоком азота.

Сканирование проводили на микроскопе Интегра Прима (ООО «Нова СПб», Россия) в полу-контактном режиме. Использовали кантилеверы НА_HR (характерная жесткость 17 Н/м, типичный радиус кривизны менее 10 нм). Обработку изображений проводили с помощью программ Nova (ООО «Нова СПб», Россия) и FemtoScan Online [27].

Результаты и обсуждение

Получение препаратов полинуклеосом. Для получения препаратов необходимого качества проводили сборку полинуклеосом на плазмиде рYP05 с разным массовым соотношением ДНК и октамеров гистонов. Долю сформировавшихся нуклеосом относительно числа позиционирующих последовательностей оценивали при помощи реакции удлинения праймера (рис. 1А). При соотношении ДНК и октамеров 5:1 наблюдалось преобладание коротких рестрикционных фрагментов в пробе при практически полном отсутствии длинных, что соответствует полинуклеосомам, на которых более одной свободной позиционирующей последовательности. При соотношении ДНК:октамер 1:1 коротких рестрикционных фрагментов практически не наблюдается, что свидетельствует о достижении концентрации, близкой к насыщающей. Соотношения ДНК:октамер, равные 2,5:1 и 1,67:1 характеризуются присутствием

полного набора рестрикционных фрагментов. При этом количество коротких и длинных рестрикционных фрагментов одинаковое в случае соотношения 2,5:1, или сдвинуто в пользу длинных фрагментов в случае соотношения 1,67:1 (рис. 1Б). Подобная картина соответствует концентрации октамера гистонов ниже насыщающей и формированию нуклеосом не менее чем на 12 позиционирующих последовательностей из 13.

Разработчики плазмиды rYP05 использовали ее для сборки полинуклеосомы с применением донорного хроматина [28]. Описанная ими методика была нами модифицирована — вместо донорного хроматина мы использовали октамеры рекомбинантных гистонов. Такой подход позволяет сформировать на ДНК-матрице одинаковые по своему составу нуклеосомы. Донорный хроматин, получаемый из клеточных ядер, включает множество вариантов гистонов, несущих трудно-характеризуемые посттрансляционные модификации. Использованный в данной работе подход позволяет получить препараты с высокой плотностью нуклеосом на последовательностях S601 и в широком диапазоне соотношений концентраций ДНК и октамера. При этом состав применяемых для сборки октамеров может быть выбран в соответствии с решаемой задачей и включать заданные варианты гистонов или миметики посттрансляционных модификаций. Для экспериментов по визуализации полинуклеосом был выбран препарат с соотношением ДНК-октамер 1,67:1, поскольку он характеризуется более высокой плотностью нуклеосом на позиционирующих последовательностях по сравнению с препаратами с меньшей концентрацией октамеров. При этом концентрация октамеров в этом препарате все еще ниже насыщающей, что снижает вероятность формирования агрегатов.

Визуализация полинуклеосом Для контроля структуры полинуклеосом использовали метод АСМ. Типичные изображения, полученные с его помощью, представлены на рис. 2А–Г. Полинуклеосомы, как и следовало ожидать, выглядели как наборы гранул, соединенных тонкими нитями ДНК. Высота ДНК над подложкой составляла 0,4–0,7 нм, как это часто бывает при нанесении молекул ДНК на слюду в присутствии ионов двухвалентных металлов [29]. Гранулы, связанные с ДНК, могут быть интерпретированы как отдельные нуклеосомы или их группы, если они расположены очень близко.

Данные о высоте и ширине отдельных гранул собраны на рис. 2Д. На графике разная форма символов соответствует разным полинуклеосомам. Видно, что высота гранул лежала в диапазоне 1,3–6,2 нм, а ширина в диапазоне 11–26 нм (ее измеряли на половине высоты, располагая линию сечения преимущественно поперек молекулы ДНК). При этом, если рассматривать взаимное расположение точек, оказывается, что гранулы можно условно разделить на «мелкие» (высота 1,3–3,5 нм, ширина 11–18 нм) и «крупные» (высота 2,0–6,2 нм, ширина 18–23 нм). Область диаграммы, в которой сосредоточены точки, соответствующие «мелким» частицам, обведена пунктирной линией, в этой области расположены 43 частицы из 67. Можно предположить, что «мелкие» частицы представляют собой отдельные нуклеосомы, а «крупные» представляют собой группы, т.е. близко расположенные пары и тройки нуклеосом. Они вариативны по размерам, потому что они могут существенно различаться по взаимному расположению нуклеосом, входящих в группу. Данные о размерах «мелких» гранул хорошо соответствуют данным о размерах отдельных нуклеосом, получаемых методом АСМ [30–32].

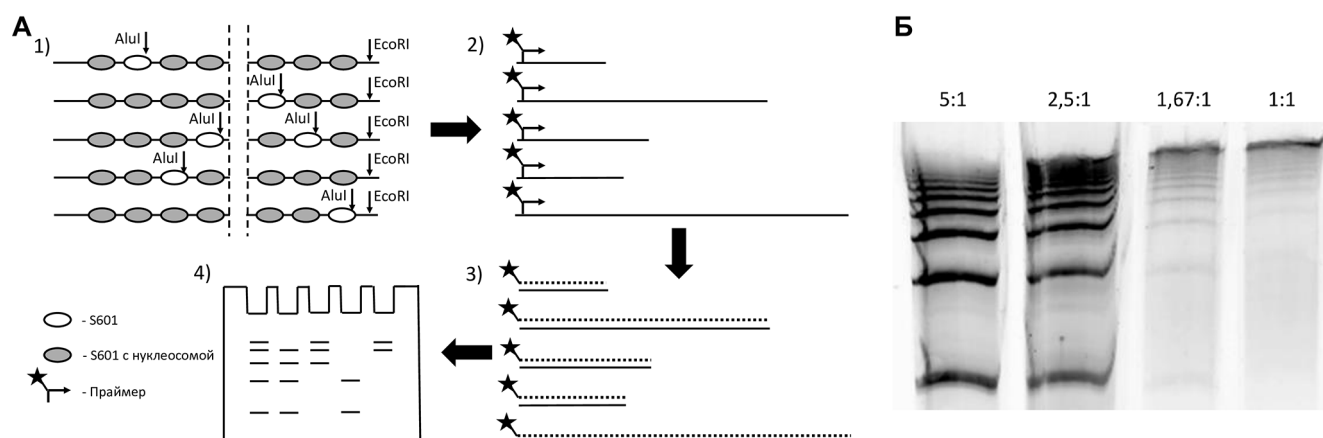


Рис. 1. Рестрикционный анализ препаратов полинуклеосом. А — Схема рестрикционного анализа и реакции удлинения праймеров. 1 — Обработка препарата полинуклеосом эндонуклеазами. 2 — Очистка получившихся фрагментов ДНК и гибридизация с праймерами, содержащими флуоресцентную метку. 3 — Удлинение праймеров полимеразой до сайта расщепления эндонуклеазой. 4 — Секвенирующий электрофорез фрагментов оцДНК с флуоресцентными метками. Б — Результаты электрофореза продуктов реакции удлинения праймеров для препаратов полинуклеосом с разным массовым соотношением ДНК и октамеров (указано над дорожками).

Характеристики кантилевера, а также параметры сканирования могут влиять на значения измеряемых характеристик — и ширины объектов, и их высоты над подложкой. Это влияние показано как для ДНК [33], так и для белков [34], и оно создает очевидные метрологические сложности. Они усугубляются тем, что кантилеверы из одной упаковки могут значительно различаться по основным характеристикам (прежде всего, по жесткости и радиусу кривизны). В данном случае возможные искажения размеров, связанных с процессом и параметрами сканирования, уже учтены на этапе построения диаграммы (рис. 2Д). На ней присутствуют точки, соответствующие гранулам, изображения которых получены разными кантилеверами (все они были одного и того же типа НА_{HR}) и при разных настройках АСМ.

При подготовке образцов ожидалось, что нуклеосомы преимущественно формируются на позиционирующих последовательностях, входящих в состав плазмиды, при этом избыток октамеров будет неспецифически связываться с оставшейся плазмидной ДНК. Оказалось, что при выбранном соотношении ДНК:октамер (1,67:1) нуклеосомы практически равномерно распределены по плазмиде, без явного сгущения в одной области. В совокупности с данными анализа методом удлинения праймеров это демонстрирует высокое неспецифическое связывание гистонов с ДНК. Оно позволяет регулировать плотность нуклеосом на плазмиде за пределами последовательностей S601 при помощи изменения концентрации октамера в пробе, однако снижает информативность оценки качества сборки препаратов полинуклео-

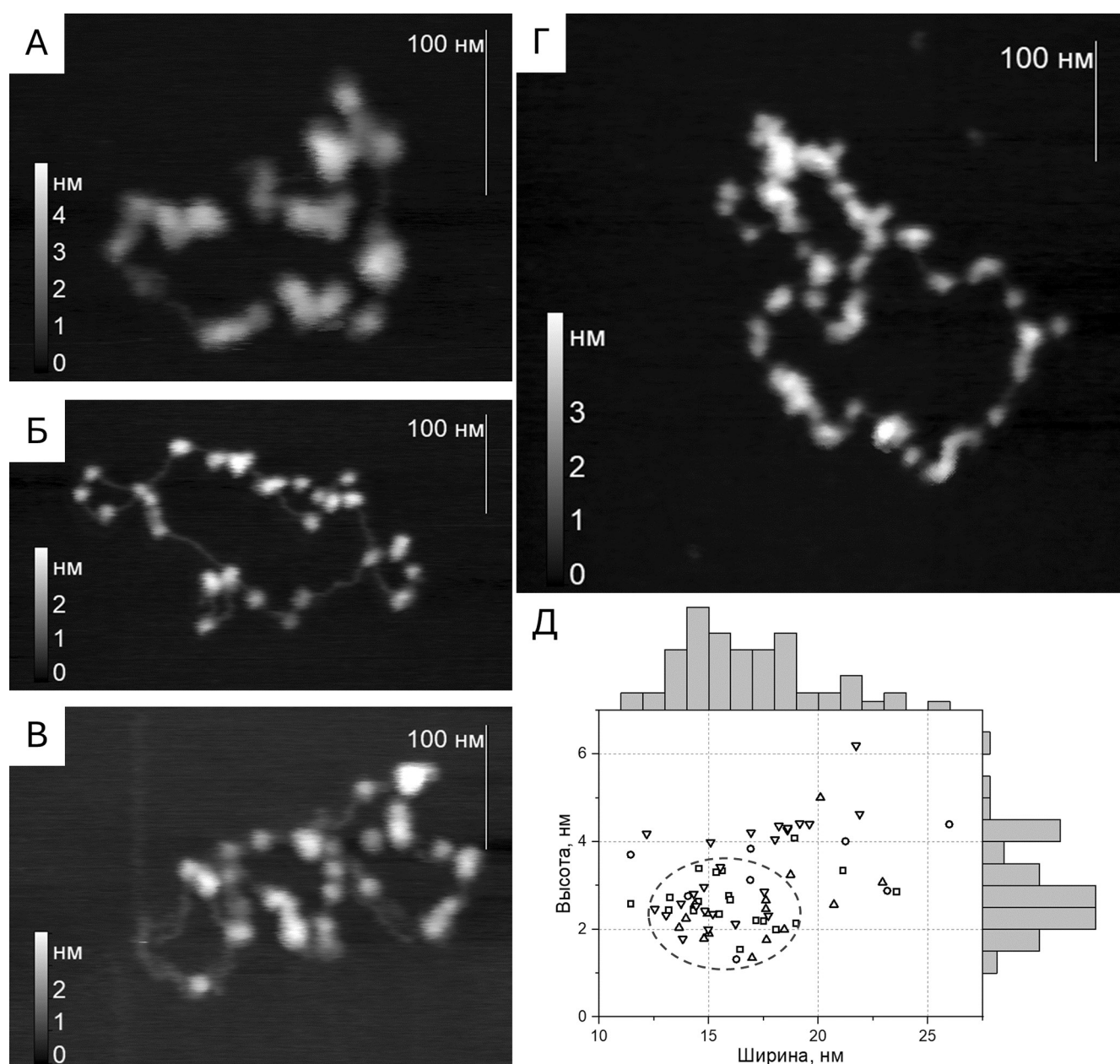


Рис. 2. Исследование полинуклеосом методом АСМ. Соотношение ДНК:октамер — 1,67:1. А–Г — изображения полинуклеосом, Д — взаимосвязь между высотой и шириной отдельных объектов, связанных с ДНК. Количество объектов на диаграмме N = 67.

сом методом удлинения праймера в силу невозможности прямого сопоставления изображений полинуклеосом с картиной распределения рестрикционных фрагментов.

Применяемые методы нанесения препарата на подложку обеспечивают фиксацию большинства плазмид в расправленном виде, что позволяет хорошо различать отдельные нуклеосомы и оценивать расстояния между ними. Релаксированная конформация ДНК, по-видимому, объясняется ее поверхностной диффузией после адсорбции на подложку [35].

Заключение

В данной работе описана методика формирования полинуклеосом с помощью плазмиды рΥР05 и рекомбинантных гистонов. Получены полинуклеосомы с высокой загрузкой октамеров на нуклеосом-позиционирующие последовательности — это показано реакцией удлинения праймеров. Методом АСМ получены изображения полинуклеосом на подложке: индивидуальные нуклеосомы имели высоту 1,3–3,5 нм и ширину 11–18 нм, что хорошо соответствует литературным данным.

АСМ является приемлемым методом визуализации, но с ним связан ряд ограничений. Например, из-за ограничения разрешения, связанного с конечным радиусом кривизны кантилевера, и соответствующего уширения объектов, не всегда удается описать близко расположенные пары и тройки нуклеосом. Чтобы предотвратить вытеснение гистонов с ДНК, полинуклеосомы фиксировали глutarовым альдегидом [36]). В данной работе фикса-

цию проводили при низкой концентрации моновалентных катионов, что препятствовало формированию межнуклеосомных взаимодействий и укладке 10-нм фибриллы в компактные структуры. Фиксация стабилизирует нуклеосомы и значительно облегчает измерения, но в общем случае может приводить к артефактам и, в том числе, гипотетически может приводить к ковалентной сшивке близко расположенных нуклеосом. Поэтому в дальнейшем мы планируем более детально проанализировать влияние условий фиксации и нанесения образца на подложку на конформацию полинуклеосом, видимую с помощью АСМ.

Изображения, получаемые методом АСМ, позволяют оценивать среднее число нуклеосом на плазмиде и проследить возможные изменения этого параметра под влиянием условий эксперимента. При таком расположении полинуклеосом также потенциально можно визуализировать молекулы белков, связывающихся с межнуклеосомными участками ДНК, и это может быть использовано для определения закономерностей регуляции активности и структурных перестроек хроматина. В то же время могут быть сложности с тем, чтобы отличить нуклеосому от крупного глобулярного белка, связанного с ДНК.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-64-00001-П). Настоящая работа не содержит собственных исследований с использованием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251–260.
2. Olins D.E., Olins A.L. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(10):809–814.
3. Finch J.T., Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1976;73(6):1897–1901.
4. Wu C., Bassett A., Travers A. A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep.* 2007;8(12):1129–1134.
5. Robinson P.J.J., Fairall L., Huynh V.A.T., Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(17):6506–6511.
6. Grigoryev S.A., Woodcock C.L. Chromatin organization — the 30 nm fiber. *Exp. Cell Res.* 2012;318(12):1448–1455.
7. Scheffer M.P., Eltsov M., Frangakis A.S. Evidence for short-range helical order in the 30-nm chromatin fibers of erythrocyte nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011;108(41):16992–16997.
8. Eltsov M., Maclellan K.M., Maeshima K., Frangakis A.S., Dubochet J. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes *in situ*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(50):19732–19737.
9. Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis A.S., Imamoto N., Ishikawa T., Maeshima K. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.* 2012;31(7):1644–1653.
10. Hsieh T.H.S., Weiner A., Lajoie B., Dekker J., Friedman N., Rando O.J. Mapping nucleosome resolution chromosome folding in yeast by micro-C. *Cell*. 2015;162(1):108–119.
11. Razin S.V., Gavrillov A.A. Chromatin without the 30-nm fiber: Constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics*. 2014;9(5):653–657.
12. Maeshima K. The shifting paradigm of chromatin structure: from the 30-nm chromatin fiber to liquid-like organization. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2025;101(6):339–356.
13. Schwarzer W., Abdennur N., Goloborodko A., Pekowska A., Fudenberg G., Loe-Mie Y., Fonseca N.A., Huber W., Haering C.H., Mirny L., Spitz F. Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal. *Nature*. 2017;551(7678):51–56.
14. Bintu B., Mateo L.J., Su J.H., Sinnott-Armstrong N.A., Parker M., Kinrot S., Yamaya K., Boettiger A.N., Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science*. 2018;362(6413):eaau1783.

15. Gibson B.A., Blaukopf C., Lou T., Chen L., Doolittle L.K., Finkelstein I., Narlikar G.J., Gerlich D.W., Rosen M.K. In diverse conditions, intrinsic chromatin condensates have liquid-like material properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2023;120(18):e2218085120.
16. Zidovska A. Chromatin: Liquid or solid? *Cell.* 2020;183(7):1737–1739.
17. Maeshima K., Rogge R., Tamura S., Joti Y., Hikima T., Szerlong H., Krause C., Herman J., Seidel E., DeLuca J., Ishikawa T., Hansen J.C. Nucleosomal arrays self-assemble into supramolecular globular structures lacking 30-nm fibers. *EMBO J.* 2016;35(10):1115–1132.
18. Farr S.E., Woods E.J., Joseph J.A., Garaizar A., Collepardo-Guevara R. Nucleosome plasticity is a critical element of chromatin liquid-liquid phase separation and multivalent nucleosome interactions. *Nat. Commun.* 2021;12(1):2883.
19. Miron E., Oldenkamp R., Brown J.M., Pinto D.M.S., Xu C.S., Faria A.R., Shaban H.A., Rhodes J.D.P., Innocent C., de Ornellas S., Hess H.F., Buckle V., Schermelleh L. Chromatin arranges in chains of mesoscale domains with nanoscale functional topography independent of cohesin. *Sci. Adv.* 2020;6(39):eaba8811.
20. Watson M., Stott K. Disordered domains in chromatin-binding proteins. *Essays Biochem.* 2019;63(1):147–156.
21. Dias J.K., D'Arcy S. Beyond the mono-nucleosome. *Biochem. Soc. Trans.* 2025;53(1):BCJ20240452.
22. Li W., Hu J., Song F., et al. Structural basis for linker histone H5-nucleosome binding and chromatin fiber compaction. *Cell Res.* 2024;34(10):707–724.
23. Thåström A., Lowary P.T., Widlund H.R., Cao H., Kubista M., Widom J. Sequence motifs and free energies of selected natural and non-natural nucleosome positioning DNA sequences. *J. Mol. Biol.* 1999;288(2):213–229.
24. Polikanov Y.S., Studitsky V.M. Analysis of distant communication on defined chromatin templates *in vitro*. *DNA-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology*, vol. 543. Eds. B. Leblanc and T. Moss. Humana Press; 2009:563–576.
25. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Academic Press; 1999:3–19.
26. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. Preparation and analysis of uniquely positioned Mononucleosomes. *Chromatin Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol. 523. Ed. S.P. Chellappan. Totowa: Humana Press; 2009:109–123.
27. Yaminsky I., Akhmetova A., Meshkov G. Femtoscan online software and visualization of nano-objects in high-resolution microscopy. *NanoRus.* 2018;(6):414–416.
28. Utley R.T., Owen-Hughes T.A., Juan L.J., Côté J., Adams C.C., Workman J.L. *In vitro* analysis of transcription factor binding to nucleosomes and nucleosome disruption/displacement. *RNA Polymerase and Associated Factors, Part B. Methods in Enzymology*, vol. 274. Ed. S. Adhya. Academic Press; 1996:274:276–291.
29. Moreno-Herrero F., Colchero J., Baró A.M. DNA height in scanning force microscopy. *Ultramicroscopy.* 2003;96(2):167–174.
30. Krzemien K.M., Beckers M., Quack S., Michaelis J. Atomic force microscopy of chromatin arrays reveal non-monotonic salt dependence of array compaction in solution. *PLoS One.* 2017;12(3):e0173459.
31. Nazarov I., Chekharova I., Rychkov G., Ilatovskiy A.V., Crane-Robinson C., Tomilin A. AFM studies in diverse ionic environments of nucleosomes reconstituted on the 601 positioning sequence. *Biochimie.* 2016;121:5–12.
32. Leuba S.H., Yang G., Robert C., Samori B., Van Holde K., Zlatanova J., Bustamante C. Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(24):11621–11625.
33. Klinov D.V., Neretina T.V., Prokhorov V.V., Dobrynina T.V., Aldarov K.G., Demin V.V. High-resolution atomic force microscopy of DNA. *Biochemistry (Mosc).* 2009;74(10):1150–1154.
34. Chen X., Roberts C.J., Zhang J., Davies M.C., Tendler S.J.B. Phase contrast and attraction–repulsion transition in tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science.* 2002;519(1–2):L593–L598.
35. Dubrovin E.V., Schächtele M., Schäffer T.E. Nanotemplate-directed DNA segmental thermal motion. *RSC Adv.* 2016;6(83):79584–79592.
36. Hizume K., Yoshimura S.H., Takeyasu K. Atomic force microscopy demonstrates a critical role of DNA superhelicity in nucleosome dynamics. *Cell Biochem. Biophys.* 2004;40(3):249–262.





Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 05.08.2025

Принята в печать 13.08.2025

RESEARCH ARTICLE

Visualization of artificial polynucleosomal constructs with atomic force microscopy

A.V. Lyubitelev^{1,*} , D. V. Bagrov¹ , O. V. Geraskina² , V. M. Studitsky^{1,3} 

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

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, Pennsylvania, 19111, USA

*e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Genetic material of the cell in interphase nucleus is present in a form of a dense DNA-protein structure named chromatin. Structure and dynamics of single nucleosome, which is the basic unit of DNA compactization, is currently well-studied, although the data about the structural

and functional organization of higher-level chromatin folding, is still scarce. In the present work, a method of visualization of polynucleosomal constructs using atomic force microscopy is proposed. Polynucleosome assembly on a plasmid with the use of recombinant histone octamers was demonstrated. It was established that glutaraldehyde treatment of polynucleosome sample before its immobilization on a surface preserves nucleosomes, and their height and width corresponds well with previously obtained data. Plasmids themselves were predominantly in extended conformation, which may help studying DNA-protein interactions.

Keywords: *chromatin, nucleosome, DNA-protein complexes, atomic force microscopy*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project no. 21-64-00001P.

Сведения об авторах

Любителиев Александр Викторович — вед. инж. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-57-38; e-mail: varanus-salvator@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0768-9309>

Багров Дмитрий Владимирович — канд. физ-мат. наук., вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dbagrov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6355-7282>

Гераськина Ольга Вячеславовна — мл. науч. сотр. Института биологии гена РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: olgsamsonova@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1624-7054>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.214.32

Пробоподготовка элонгационного комплекса +39 для криоэлектронной микроскопии

Е.В. Осина¹ , А.В. Моисеенко¹ , А.Н. Коровина¹ , Н.С. Герасимова¹ ,
О.И. Волох¹ , В.М. Студитский^{1, 2} , Т.Б. Станишнева-Коновалова^{1, *}

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

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: stanishneva-konvalova@mail.bio.msu.ru

Транскрипция в клетке осуществляется специализированными ферментами – РНК-полимеразы. РНК-полимеразы транскрибируют ДНК с образованием элонгационных комплексов (ЭК), в том числе участвующих в регуляции транскрипции. Криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) позволяет определять структуры этих комплексов и выяснять механизмы транскрипции хроматина. Однако подготовка образцов ЭК, пригодных для изучения методом криоЭМ, представляет определенные сложности. В данной работе проведена разработка протоколов для подготовки образцов ЭК с положением активного центра РНКП в позиции +39 от входа в нуклеосому (ЭК+39). Образование комплексов подтверждалось методами электрофореза и электронной микроскопии негативного контрастирования. Разработанные методы могут быть использованы для изучения ЭК+39 методом криоЭМ.

Ключевые слова: элонгационный комплекс, полимеразы, нуклеосома, хроматин, криоэлектронная микроскопия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-9

Введение

Транскрипция является одним из основных процессов, определяющих реализацию генетической информации в клетке. Она осуществляется посредством синтеза молекул РНК специализированными ферментами – ДНК-зависимыми РНК-полимеразы (РНКП).

У эукариот ядерная ДНК упакована в хроматин – ДНК-белковый комплекс, минимальной структурной единицей которого является нуклеосома. Эукариотическая РНКП II транскрибирует нуклеосомную ДНК с характерными остановками элонгационных комплексов (ЭК). Остановки РНКП не являются случайными и имеют регуляторное значение [1].

Активное развитие криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) последних лет позволило использовать этот метод для изучения механизмов транскрипции хроматина путем определения структур ЭК в различных положениях РНКП внутри нуклеосомы. В 2018 г. была опубликована криоЭМ структура ЭК РНКП II *Saccharomyces cerevisiae* с нуклеосомой с разрешением 4,4 Å [2]. В том же году были получены структуры ЭК со

спонтанными остановками РНКП II в четырех суперспиральных положениях внутри нуклеосомной ДНК: SHL(-6), SHL(-2), SHL(-5) и SHL(-1) [3]. Эти структуры проиллюстрировали последовательные этапы откручивания ДНК от поверхности гистоновых октамера в процессе транскрипции *in vitro*. Создание специальных нуклеосомных ДНК-матриц позволило получить структуры ЭК, в которых РНКП II была остановлена в положениях 42, 49, 58 и 115 пар оснований от входа в нуклеосому (соответствуют SHL(-1), SHL(0), SHL(+1) и SHL(+6)) [4]. Также с помощью криоЭМ была получена структура промежуточного продукта прохождения через нуклеосому – комплекса РНКП II с транскрипционными факторами и гексасомой, в которой отсутствует проксимальный димер H2A–H2B [5]. В 2023 г. была опубликована структура ЭК РНКП II в положении SHL(-3,5) в комплексе с Rad26 – белком, необходимым для репарации ДНК [6]. Также криоЭМ структуры ЭК позволили прояснить механизм промотор-проксимального паузирования (остановки РНКП II между началом транскрипции и первой нуклеосомой) [7] и транскрипции РНКП II ядерного хро-

матина клеток человека (HeLa) [8]. Таким образом, изучение ЭК с помощью криоЭМ является актуальной темой исследований. Наша работа посвящена изучению элонгационного комплекса, где активный центр РНКП находится в позиции +39 от входа в нуклеосому (ЭК+39).

С помощью метода молекулярного докинга было показано, что в ЭК+39 за счет изгиба ДНК может происходить образование небольшой петли — петли нулевого размера или Ø-петли [9]. Предположительно, это структурное образование способствует сохранению положения гистоновых октамеров на матрице ДНК после прохождения РНКП и сохранению эпигенетической информации [9]. В данной работе используется РНКП *E. coli*, которая часто применяется в системах *in vitro*, воспроизводящих важные особенности транскрипции хроматина *in vivo*. Биохимическими методами показано, что этот фермент воспроизводит механизм прохождения эукариотической РНКП II через нуклеосому [10]. В данной работе применяется протокол получения ЭК на модифицированной ДНК-матрице в условиях дефицита определенного типа нуклеотидов, описанный ранее [10, 11]. Полученный при таком подходе препарат содержит значительное количество активных ЭК [12]. Таким образом, РНКП остаются интактными и при добавлении недостающего рибонуклеотида способны продолжать процесс продуктивного удлинения транскрипта РНК, т.е. элонгации. Паузирование РНКП является универсальным процессом, регулирующим длину транскрипта как у бактерий [13], так и у эукариот [14]. Недавно было показано, что статистическое сокращение длины транскрипта у человека коррелирует с возрастом [15]. Изучение транскрипционных нарушений важно также для понимания генезиса и иммунорезистентности рака [16]. Более того, исследование механизма прохождения РНКП через нуклеосому важно в связи с процессом сохранения нуклеосом при транскрипции и его влиянием на эпигенетический «гистоновый код» [9, 17].

Целью данной работы является создание протокола получения препарата ЭК+39, пригодного для изучения методом криоЭМ.

Материалы и методы

Получение рекомбинантной ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step. Фрагменты ДНК-матриц, полученные из матрицы T7A1-s603-40A [10] в результате сайт-направленного мутагенеза были амплифицированы, очищены из агарозного геля с помощью коммерческого набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и вставлены в плазмиду pGEM 3zf(+). Отбор плазмид с целевой вставкой T7A1-s603-40A-One_step осуществлялся с помощью селекции в клетках *E. coli* (XL1-Blue) и секвенирования полученной ДНК (выполнено в центре коллективного пользования «Геном», Россия).

Последовательность ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step от сайта старта транскрипции до +39 положения от входа в нуклеосому:

TCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTA
TAGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACG
GCGAAAAGCCAAACCCAAGCGACACCGGCACA
GGGGCCCAGAACGCGCGCCCAACCAACCGAG
AGAAGACGACACATGGGCTTCTAAGTACGCT
TAGGCCACGGTAGAGGGCAATCCAAGCTAAC
CACCGTGCATCGATGTTGAAAGAGGCCCTCC
GTCCTTATTCTTC.

После проверки того, что последовательность ДНК-матрицы T7A1-s603-40A-One_step не содержит оснований цитозина до 11-ого положения и оснований тимина до 89-ого положения относительно старта транскрипции (отмечены жирным шрифтом), данная матрица была наработана методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью Taq ДНК-полимеразы (Евроген, Россия) в амплификаторе Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) и очищена из агарозного геля, как описано выше. Поскольку эффективность ПЦР с плазмиды pGEM 3zf(+)-T7A1-s603-40A-One_step была очень низка, целевой фрагмент вставили в плазмиду pTZ57R и повторно секвенировали (центр коллективного пользования «Геном», Россия). Для представленного в статье эксперимента транскрипционная матрица была получена методом ПЦР с плазмиды pTZ57R-T7A1-s603-40A-One_step с использованием Q5 Hot Start High-Fidelity ДНК-полимеразы (NEB, Великобритания) и праймеров 282_For_whst (5' – CCG GGA TCC AGA TCC CGA AAA TTT A – 3'), 282_Rev_whst (5' – CGT CGG ATC CGT ACC CCA GGG ACT T – 3') в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). ПЦР-продукт очищали из агарозного геля с использованием коммерческого набора, как описано выше.

Получение и очистка РНК-полимеразы *E. coli*.

Клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали методом электропорации экспрессионной плазмидой pSV10, кодирующей субъединицы корового фермента РНК-полимеразы *E. coli* (альфа (α), бета (β), бета-штрих (β') и омега (ω)) и гексагистидиновый фрагмент (His₆) [18]. Культуру клеток наращивали при температуре 32°C в течение 8 ч в термостатируемом шейкере New Brunswick™ Excella E24 (Eppendorf, Германия) до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6 (спектрофотометр Biophotometer plus (Eppendorf, Германия)). Далее для аутоиндукции экспрессии 0,5 мл культуры переносили в 500 мл среды LB, содержащей 150 мкг/мл ампицилина и инкубировали в течение 16–18 ч при 32°C до итогового значения OD₆₀₀ = 4–5. Затем культуру осаждали в центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия) на 6000 об./мин при 4°C в течение 10 мин и промывали клеточный осадок охлажденным 10 мМ фосфатно-солевым буфером (PBS, Phosphate-Buffered Saline). Выделе-

ние проводили с помощью хроматографической системы АКТА Purifier 10 в три стадии: металл-аффинная хроматография (колонка для хроматографии с Ni-NTA сефарозой (Seпах, Китай)), хроматография на гепариновом носителе (колонка для хроматографии со смолой Heparin Huper D (набита самостоятельно)) и анионообменная хроматография (колонка MonoQ (Cytiva, США)) [18]. Концентрацию белка измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). В данной статье использовали фракцию холофермента РНКП *E. coli* с концентрацией 6,27 мкМ.

Сборка нуклеосом на ДНК-матрице и октамерах рекомбинантных гистонов *Homo sapiens*. Сборка нуклеосом проводилась в объеме 50 мкл с 8,5 мкг очищенной ДНК-матрицы T7A1s603-40A ($M_w = 173731,12$ г/моль). Реконституция нуклеосом проводилась методом ступенчатого диализа против буферов с убывающей концентрацией NaCl, начиная с 2 М, при температуре 4°C, как показано Люгер и соавт. [19]. Для сборки нуклеосом в качестве донора гистонов использовали препарат октамеров гистонов человека (hOct) с концентрацией 2 мг/мл, полученный на основе описанных ранее протоколов [19, 20]. После этого проводили электрофорез полученных комплексов в нативных условиях в полиакриламидном геле (ПААГ; 4% АА:БА (39:1)) в 1× NEPERES-буфере (5 мМ NEPERES pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) в вертикальной камере для электрофореза Mini-Protean Tetra (Bio-Rad, США). ПААГ окрашивали флуоресцентным красителем для нуклеиновых кислот SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific, США), что позволило производить детекцию в канале флуоресценции Cy3 с помощью флуоресцентного ридера Amersham Imager 680 (GE, США). Молярное соотношение ДНК-матрица:hOct составило 1:1. Итоговая концентрация образца нуклеосом составила 170 нг/мкл в расчете на ДНК.

Получение ЭК+39 на нуклеосоме методом *in vitro* транскрипции РНК-полимеразой *E. coli*. Для сборки ЭК+39 методом транскрипции *in vitro* использовали образец нуклеосомы с концентрацией 170 нг/мкл и холофермент РНКП *E. coli* с концентрацией 6,27 мкМ, полученные ранее. Транскрипцию *in vitro* проводили в стерильных безнуклеазных пробирках с низкой адгезией к белкам и нуклеиновым кислотам (НК) (USA Scientific, США). Для получения открытого комплекса в 5 мкл реакционной смеси на льду добавляли РНКП *E. coli* до концентрации 0,125 мкл на 100 нг (примерное молярное соотношение моонуклеосом: РНКП *E. coli* = 1:2) и 0,25 мкл на 100 нг (примерное молярное соотношение моонуклеосом: РНКП *E. coli* = 1:4) в 1× буфере НТВ40 (20 мМ NEPERES-HCl pH 8,0, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ β-меркаптоэтанол, 40 мМ KCl). ЭК+39 с РНКП *E. coli*, остановленной в -39 положении матрицы относительно входа в нуклеосому, получали путем

добавления 20 мкМ РНК-затравки 5'-ArUpC (гAUC, АУЦ), 40 мкМ АТФ, 40 мкМ ГТФ. Для получения комплекса ЭК+39 концентрацию KCl в пробе, содержащей ЭК+39, доводили до 150 мМ, а затем добавляли 20 мкг/мл рифампицина и 5 мкМ ЦТФ. Открытый комплекс получали в течение 5 мин при 37°C в термостате Термит (ДНК-технология, Россия), а получение ЭК+39 и +39 проводили в течение 10 минут при 20°C и 25°C соответственно.

Очистка и анализ длины РНК-продуктов. РНК-продукты были очищены из препаратов ЭК с использованием реагента для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Россия). К пробам добавляли по 165 мкл реагента, инкубировали 5 мин при 25°C, добавляли по 35 мкл хлороформа, встряхивали и центрифугировали при температуре 4°C в течение 10 мин при максимальных оборотах в настольной центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия). Супернатант отбирали, для осаждения НК добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,2), 1 мкл гликогена 20 мг/мл и 3 объема 96%-ного этилового спирта; пробы инкубировали при -20°C, затем НК осаждали центрифугированием при температуре 4°C в течение часа в центрифуге с охлаждением 5810R (Eppendorf, Германия) при максимальных оборотах. Осадок промывали 80%-ным охлажденным этанолом, высушивали и растворяли в 3 мкл безнуклеазной воды. Распределение транскриптов по длине анализировали методом денатурирующего электрофореза в ПААГ (8% АА:БА (38:2), 8 М мочевины, 1× Трис-боратный буфер, TBE – Tris-Borate-EDTA) в системе для секвенирующего электрофореза Sequi-Gen GT System (Bio-Rad, США). Перед нанесением к пробам добавляли равный объем денатурирующего буфера (95% (v/v) формамид, 0,1%-ный додецилсульфат натрия, 1× TBE) и прогревали в термостате Термит (ДНК-технология, Россия) при 98°C в течение 5 мин. Электрофорез прогретых проб проводили при 60 Вт в 1× буфере TBE в геле, предварительно разогретом в ходе предварительного электрофореза до 60–70°C. Визуализацию флуоресцентно-окрашенных транскриптов проводили на сканере Typhoon RGB (Cytiva, США).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с негативным контрастированием. Для исследования с использованием ПЭМ образцы комплексов наносились на поверхность медной сеточки, покрытой подложкой из аморфного углерода (EMCN, Китай), предварительно гидрофилизированной с помощью тлеющего разряда на установке EasyGlow (TedPella, США). Негативное контрастирование производилось 1%-ным раствором уранилацетата в течение 30 с. ПЭМ-изображения получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ, при дефокусировке объективной линзы -1,8 мкм,

при увеличении, соответствующем калиброванному размеру пикселя 1,4 Å на камере DE-20 (Direct Electron, США). Автоматизированная съемка больших наборов изображений производилась с помощью программного обеспечения SerialEM версии 3.8 [21]. Структура комплексов анализировалась с помощью кластерного анализа большого количества проекций отдельных наблюдаемых на изображениях объектов (частиц). Для этого в программном обеспечении Relion 3.1 [22] определялись координаты таких объектов на исходных изображениях и вырезались соответствующие им фрагменты. Затем производились последовательные двумерные классификации, а получаемые классовые суммы оценивались визуально.

Результаты и обсуждение

Сборка ЭК+39 методом транскрипции *in vitro*.

Протокол транскрипции *in vitro* был аналогичен представленному ранее с некоторыми изменениями [23]. Получение ЭК+39 проводилась при 20°C, с увеличенной в два раза концентрацией рНТФ (40 мкМ АТФ, 40 мкМ ГТФ) с целью увеличения доли популяции продуктивных ранних иницирующих комплексов [24, 25]. Ранее ЭК+39 был получен с использованием нуклеосом, собранных с использованием донорного хроматина, лишённого H1 [23, 26]. В данной работе для получения более гомогенных нуклеосом вместо донорного хроматина из куриных эритроцитов использовали рекомбинантные очищенные октамеры гистонов человека (human Oct, hOct). Реконституцию hOct-нуклеосом проводили на ДНК-матрице T7A1-s603-40A-OneStep, позволяющей достигать

положения +39 без дополнительной остановки в положении –5 в процессе элонгации. Получение ЭК+39 без промежуточной элонгационной паузы и смены набора нуклеотидов после достижения положения –5 позволяет увеличить концентрацию ЭК в итоговом образце [23]. В результате сборка ЭК+39 осуществлялась с одной остановкой при ранней элонгации в положении –39 относительно входа в нуклеосому, которая требуется для синхронного старта РНКП во всех ЭК, и одной элонгационной целевой остановкой в положении +39 (рис. 1А).

Получение проб ЭК+39 при разных молярных соотношениях нуклеосома:РНКП. Для подтверждения сборки ЭК+39 путем *in vitro* транскрипции и оценки ее эффективности использовалась визуализация РНК-транскриптов целевой длины методом электрофореза в денатурирующих условиях (рис. 1В). Для ЭК+39 характерная длина транскрипта составляет 89 нуклеотидов. 89-нуклеотидные транскрипты получены для подтверждения сборки ЭК+39 как на нуклеосоме, так и на интактной ДНК в качестве контроля (рис. 1В).

С учетом образования динуклеосом (комплексов с двумя октамерами гистонов) как побочных продуктов реконституции концентрация целевых комплексов с одним октамером гистонов, или мононуклеосом, составила примерно половину от общей концентрации, добавленной ДНК (рис. 1Б). Исходя из этого, ЭК+39 собирали при двух эмпирически подобранных молярных соотношениях мононуклеосома:РНКП (1:4 и 1:2), не изменяя другие условия. Так, открытый комплекс (ОК) и ЭК+39 в обоих случаях были получены при

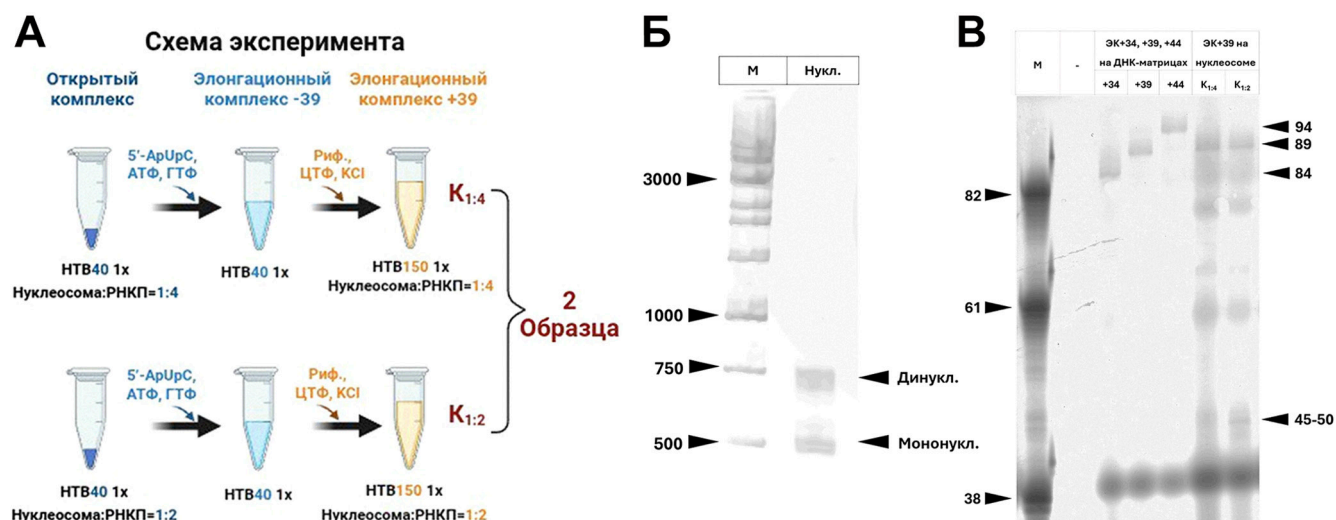


Рис. 1. Транскрипция hOct-нуклеосомы *in vitro*. **А** – схема эксперимента. $K_{1:4}$ – ЭК+39, полученный при соотношении мононуклеосома:РНКП равном 1:4 и при концентрации KCl 150 мМ; $K_{1:2}$ – ЭК+39, полученный при соотношении мононуклеосома:РНКП равном 1:2 и при концентрации KCl 150 мМ. **Б** – нативный гель-электрофорез нуклеосом, используемых для сборки ЭК+39. М – ДНК-маркер Thermo Scientific GeneRuler 1kb DNA Ladder, Нукл. – проба, полученная после реконституции нуклеосом; Динукл. – динуклеосома (комплекс ДНК-матрицы и двух октамеров гистонов), Мононукл. – мононуклеосома (комплекс ДНК-матрицы и одного октамера гистонов). Черными стрелками с цифрами отмечены положения и длины характерных фрагментов ДНК-маркера. **В** – анализ РНК-транскриптов, полученных в результате сборки ЭК+39, в денатурирующих условиях. +34, +39, +44 – ЭК с активным центром РНКП в положениях ДНК-матрицы +34, +39, +44 соответственно; $K_{1:4}$, $K_{1:2}$ – см. рис. 1А. Черными стрелками с цифрами отмечены положения и длины характерных фрагментов РНК-маркера.

концентрации 40 мМ KCl, а ЭК+39 — при концентрации 150 мМ KCl, как и в использованном ранее протоколе [23]. Контрольный образец ($K_{1:4}$), полученный при соотношении 1:4, продемонстрировал наиболее высокое относительное содержание ЭК+39 в денатурирующих условиях (рис. 1В). Для контрольного образца с соотношением моноклеосома:РНКП равном 1:2 ($K_{1:2}$) эффективность образования транскрипта ЭК+39 оказалась ниже в сравнении с $K_{1:4}$. Также для этого образца наблюдалась дополнительная остановка в области $-(5-0)$ нуклеотидов от входа в нуклеосому, которой соответствуют РНК-транскрипты длиной 45–50 нт, что скорее всего обусловлено популяцией ЭК, не преодолевших нуклеосомный барьер (рис. 1В).

Структурное исследование ЭК+39 методом ПЭМ с негативным контрастированием. Для анализа структуры комплексов использовалась ПЭМ в негативном контрасте. На изображениях, полученных с образцов $K_{1:2}$ и $K_{1:4}$, были обнаружены как свободные РНКП и нуклеосомы, так и ЭК. Для повышения соотношения сигнал-шум и визуализации структуры транскрипционных ЭК была произведена двумерная классификация. С помощью 2D-классификации удалось выявить характерные усредненные проекции РНКП, нуклеосом и ЭК, представленные на рис. 2, а также оценить долю ЭК среди общего числа частиц. РНКП, нуклеосомы и ЭК входят в состав образца $K_{1:2}$ в процентных соотношениях 48%, 32% и 20%; а в состав образца $K_{1:4}$ — в соотношениях

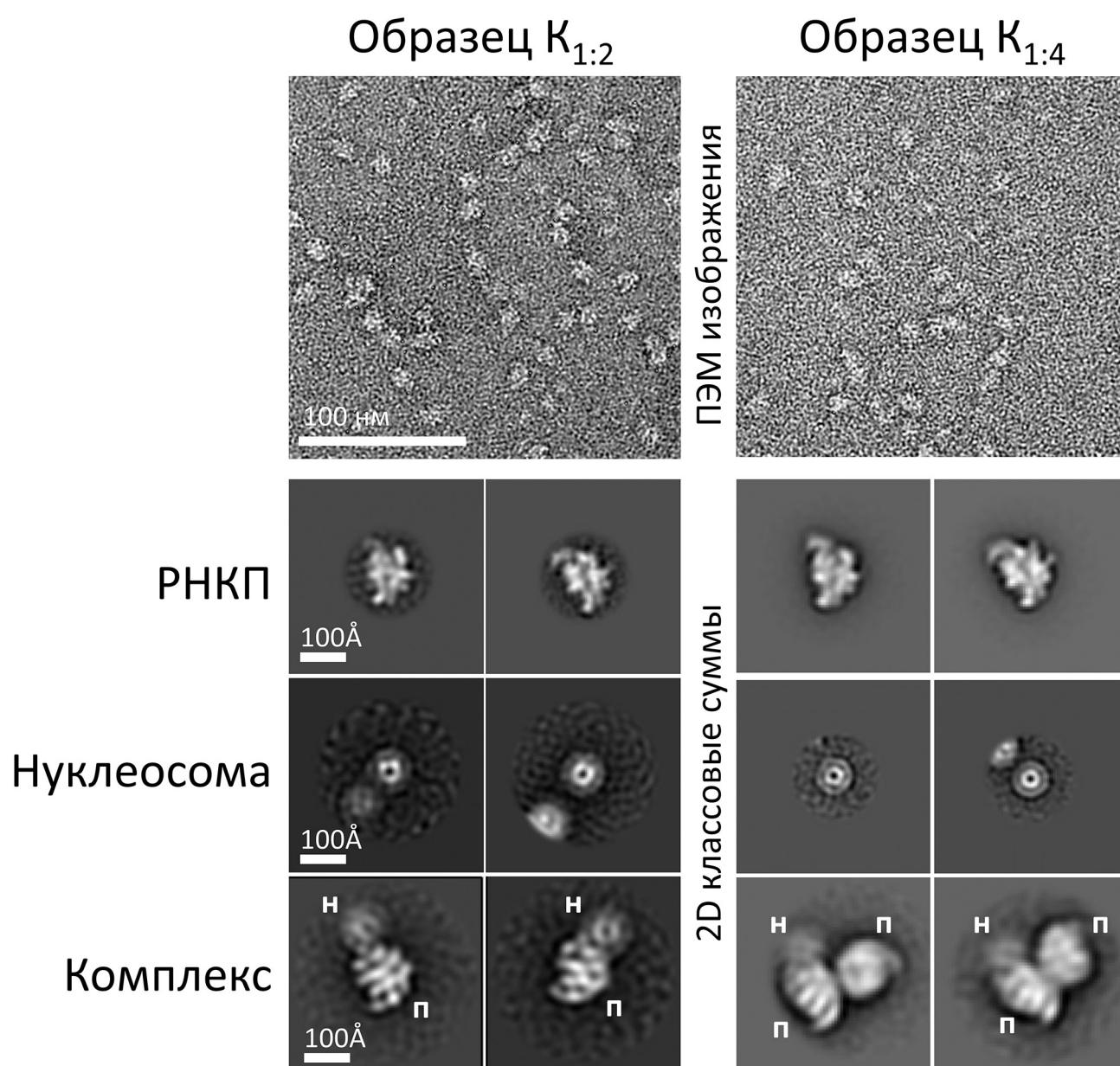


Рис. 2. Анализ структуры комплексов с помощью просвечивающей электронной микроскопии в негативном контрасте. 2D-классовые суммы получены в результате усреднения большого количества проекций отдельных объектов, представленных на ПЭМ-изображениях. Буквами отмечены: «н» — нуклеосома, «п» — РНК-полимераза.

88%, 7% и 5% соответственно. На классовых суммах образца $K_{1:2}$ видно, что РНКП с нуклеосомой образуют комплекс, при этом оба этих компонента одинаково четко разрешены, что свидетельствует о конформационной стабильности комплексов. Структура комплексов в образце $K_{1:4}$ включает в состав две РНКП и нуклеосому, при этом плотность, соответствующая нуклеосоме, разрешена слабо, что означает высокую подвижность нуклеосомы в таком комплексе. Наличие двух РНКП объясняется недостаточной инактивацией свободных РНКП рифампицином в условиях повышенной концентрации фермента и посадкой на нуклеосомную ДНК второй РНКП на стадии образования ЭК+39. На основании этих данных можно сделать выводы, что биохимические условия, использованные для сборки $K_{1:2}$ являются наиболее подходящими для исследования ЭК+39 методом ПЭМ из изученных. Наблюдаемые в обоих образцах комплексы гомогенны с точки зрения их состава и обладают высокой степенью чистоты, что делает возможным их дальнейшее исследование методами криоЭМ. Следующим этапом является оптимизация пробоподготовки, в частности витрификации в аморфном льду. Известно, что при витрификации макромолекулярные комплексы могут диссоциировать вследствие взаимодействия с границей раздела фаз жидкость–газ. Полученные в данной работе комплексы продемонстрировали стабильность при контакте с углеродной подложкой, поэтому имеются высокие шансы на сохранение их целостности и в условиях криоЭМ. Планируется проведение контрольных экспериментов с одновременной подготовкой проб для криоЭМ и для

микроскопии в негативном контрасте, что позволит оценить возможную диссоциацию комплексов и при необходимости скорректировать условия пробоподготовки. Применение криоэлектронной микроскопии откроет возможность более детального исследования структуры ЭК+39, в том числе в присутствии противораковых интеркаляторов.

Заключение

В данной работе сравнивалась эффективность сборки ЭК+39 при различном соотношении концентраций моонуклеосом и РНКП (1:2 или 1:4). Образцы были проанализированы методами денатурирующего электрофореза и просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием. Результаты указывают на то, что наиболее подходящими условиями для изучения ЭК методом электронной микроскопии являются соотношение моонуклеосом:РНКП равное 1:2. При увеличении этого соотношения наблюдается образование комплексов, в состав которых входят две РНКП и нуклеосома.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-00111 (<https://rscf.ru/project/24-24-00111/>). Исследования методом просвечивающей электронной микроскопии проводились на базе центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» с использованием уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия». Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landick R. The regulatory roles and mechanism of transcriptional pausing. *Biochem. Soc. Trans.* 2006;34(Pt. 6):1062–1066.
2. Farnung L., Vos S.M., Cramer P. Structure of transcribing RNA polymerase II-nucleosome complex. *Nat. Commun.* 2018;9(1):5432.
3. Kujirai T., Ehara H., Fujino Y., Shirouzu M., Sekine S.I., Kurumizaka H. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science*. 2018;362(6414):595–598.
4. Ehara H., Kujirai T., Shirouzu M., Kurumizaka H., Sekine S. ichi. Structural basis of nucleosome disassembly and reassembly by RNAPII elongation complex with FACT. *Science*. 2022;377(6611):eabp9466.
5. Farnung L., Ochmann M., Garg G., Vos S.M., Cramer P. Structure of a backtracked hexasomal intermediate of nucleosome transcription. *Mol. Cell*. 2022;82(17):3126–3134.e7.
6. Osumi K., Kujirai T., Ehara H., Ogasawara M., Kinoshita C., Saotome M., Kagawa W., Sekine S.I., Takizawa Y., Kurumizaka H. Structural basis of damaged nucleotide recognition by transcribing RNA polymerase II in the nucleosome. *J. Mol. Biol.* 2023;435(13):168130.
7. Naganuma M., Kujirai T., Ehara H., Uejima T., Ito T., Goto M., Aoki M., Henmi M., Miyamoto-Kohno S., Shirouzu M., Kurumizaka H., Sekine S. ichi. Structural insights into promoter-proximal pausing of RNA polymerase II at +1 nucleosome. *Sci. Adv.* 2025;11(10):eadu0577.
8. Kujirai T., Kato J., Yamamoto K., Hirai S., Fujii T., Maehara K., Harada A., Negishi L., Ogasawara M., Yamaguchi Y., Ohkawa Y., Takizawa Y., Kurumizaka H. Multiple structures of RNA polymerase II isolated from human nuclei by ChIP-CryoEM analysis. *Nat. Commun.* 2025;16(1):4724.
9. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;16(12):1272–1278.

10. Walter W., Kireeva M.L., Studitsky V.M., Kashlev M. Bacterial polymerase and yeast polymerase II use similar mechanisms for transcription through nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 2003;278(38):36148–36156.
11. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Pestov N.A., Hsieh F.K., Studitsky V.M. Experimental analysis of the mechanism of chromatin remodeling by RNA polymerase II. *Nucleosomes, Histones and Chromatin Part A. Methods in Enzymology*, vol. 512. Eds. C. Wu and C.D. Allis. Academic Press; 2012:293–314.
12. Saba J., Chua X.Y., Mishanina T.V., Nayak D., Windgassen T.A., Mooney R.A., Landick R. The elemental mechanism of transcriptional pausing. *eLife*. 2019;8:e40981.
13. Song E., Hwang S., Munasingha P.R., Seo Y.S., Kang J.Y., Kang C., Hohng S. Transcriptional pause extension benefits the stand-by rather than catch-up Rho-dependent termination. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(6):2778–2789.
14. Gromak N., West S., Proudfoot N.J. Pause sites promote transcriptional termination of mammalian RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26(10):3986–3996.
15. Stoeger T., Grant R.A., McQuattie-Pimentel A.C., et al. Aging is associated with a systemic length-associated transcriptome imbalance. *Nat. Aging*. 2022;2(12):1191–1206.
16. Modur V., Singh N., Mohanty V., et al. Defective transcription elongation in a subset of cancers confers immunotherapy resistance. *Nat. Commun.* 2018;9(1):4410.
17. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J., Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(3):1619–1627.
18. Artsimovitch I., Svetlov V., Murakami K.S., Landick R. Co-overexpression of *Escherichia coli* RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions. *J. Biol. Chem.* 2003;278(14):12344–12355.
19. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Eds. P.M. Wassarman and A.P. Wolffe. Academic Press. 1999;304:3–19.
20. Klinker H., Haas C., Harrer N., Becker P.B., Mueller-Planitz F. Rapid purification of recombinant histones. *PLoS One*. 2014;9(8):e104029.
21. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 2005;152(1):36–51.
22. Scheres S.H.W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 2012;180(3):519–530.
23. Chertkov O.V., Karlova M.G., Gerasimova N.S., Sokolova O.S. Purification of RNA polymerase elongation complexes for cryoelectron microscopy investigation. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2018;73(3):142–145.
24. Kubori T., Shimamoto N. A branched pathway in the early stage of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 1996;256(3):449–457.
25. Plaskon D.M., Henderson K.L., Felth L.C., Molzahn C.M., Evensen C., Dyke S., Shkel I.A., Record M.T. Temperature effects on RNA polymerase initiation kinetics reveal which open complex initiates and that bubble collapse is stepwise. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2021;118(30):e2021941118.
26. Chertkov O.V., Karlova M.G., Studitsky V.M., Sokolova O.S. The three-dimensional structure of (+39) RNA-polymerase elongation complex determined by cryo-electron microscopy. *Microsc. Microanal.* 2019;25(S2):1332–1333.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 19.08.2025

Принята в печать 23.08.2025

RESEARCH ARTICLE

Sample preparation of the elongation complex +39 for cryo-electron microscopy

**E.V. Osina¹ , A.V. Moiseenko¹ , A.N. Korovina¹ , N.S. Gerasimova¹ , O.I. Volokh¹ ,
V.M. Studitsky^{1, 2} , T.B. Stanishneva-Konovalova^{1, *} **

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

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

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

Transcription in the cell is carried out by specialized enzymes – RNA polymerases. RNA polymerases transcribe DNA with the formation of elongation complexes (EC), which have a regulatory significance. Cryo-electron microscopy (cryo-EM) allows obtaining the structures of these complexes and clarifying the mechanisms of transcription stages. However, the preparation of

EC samples suitable for cryo-EM studies presents certain challenges. In this work, a selection of protocols for the preparation of EC+39 samples was carried out. The formation of complexes is confirmed by the results of electrophoresis and negative stain electron microscopy. The results obtained can be used to study EC+39 by the cryo-EM method.

Keywords: *elongation complex, polymerase, nucleosome, chromatin, cryo-electron microscopy*

Funding: This research was supported by the Russian Science Foundation (project no. 24-24-00111).

Сведения об авторах

Осина Елизавета Васильевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: osina.elizaveta00@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0617-9019>

Моисеенко Андрей Владимирович — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Коровина Анна Николаевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9240-9054>

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: shordome@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5048-0378>

Волох Олеся Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2261-9587>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Станишнев-Коновалова Татьяна Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: stanishneva-konovalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8427-8178>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.22

PARP1-зависимые изменения нуклеосомной организации: возможное участие p53

Д.О. Кошкина^{1,2,*} , Н.В. Малюченко¹ , А.М. Новичкова¹,
А.В. Феофанов^{1,2} , В.М. Студитский^{1,3}

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

²Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*email: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Хроматин эукариот представляет собой высокоорганизованную и динамичную структуру, состоящую из ДНК и ассоциированных белков. Эти белки обеспечивают точную регуляцию ключевых процессов, включая экспрессию генов, репликацию и репарацию ДНК. Важнейшими регуляторами архитектуры хроматина из негистоновых белков, являются p53 и PARP1, которые участвуют в ответе клетки на повреждения ДНК. В настоящей работе проведено исследование кооперативного и конкурентного связывания ДНК-связывающего домена (DBD, DNA-Binding Domain) белка p53, и фермента PARP1 с моонуклеосомами, реконструированными на основе последовательности Widom 603 с встроенным сайтом связывания p53. Для детекции взаимодействий использован метод электрофоретического сдвига подвижности (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay) с флуоресцентно меченными нуклеосомами. Комплексы формировали двумя способами: предварительно инкубировали нуклеосомами с p53 DBD и затем добавляли PARP1, либо сначала получали комплекс нуклеосома–PARP1 и затем вносили p53 DBD. Результаты показали, что порядок добавления белков определяет характер их взаимодействия с нуклеосомой: при низких концентрациях p53 наблюдается вытеснение этого белка PARP1, тогда как при повышении концентрации p53 формируются стабильные комплексы нуклеосома–p53, не нарушенные белком PARP1. Стабильных тройных комплексов нуклеосома–p53–PARP1 не обнаружено.

Ключевые слова: PARP1, p53, нуклеосома, EMSA, хроматин

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-10

Введение

В эукариотических клетках хроматин образует динамичную и сложно устроенную систему, включающую ДНК и взаимодействующие с ней белки. Архитектура хроматина крайне динамична: она постоянно подвергается ремоделированию, что необходимо для регуляции экспрессии генов, репликации и репарации ДНК [1]. К ключевым белкам хроматина относят гистоны и негистоновые белки. Гистоны – это высококонсервативные белки, ответственные за формирование базовой повторяющейся единицы хроматина – нуклеосомы. Она состоит из примерно 147 пар оснований, и гистонового октамера, который содержит два димера H2A/H2B и тетрамер H3/H4 [2, 3]. Между собой нуклеосомы соединены свободной линкерной ДНК, с которой могут связываться линкерные гистоны H1-типа, способствуя формированию структур более высокого порядка. Дальнейшая

компактизация хроматина обеспечивается плотной упаковкой рядов нуклеосом [4].

Существует два основных состояния хроматина: эухроматин – менее конденсированный транскрипционно активный материал и гетерохроматин – плотно конденсированный и обычно транскрипционно менее активный [5]. Организация хроматина и его динамическое состояние связаны с различными факторами, такими как: модификации гистонов и ДНК, варианты формы гистонов, а также взаимодействия с ним различных белков и белковых комплексов. Эти условия влияют на доступность хроматина для ремоделирующих и регуляторных белков в ответ на клеточные сигналы или повреждение ДНК [6]. Нарушение структуры хроматина может привести к aberrантной экспрессии генов и связано с различными заболеваниями, включая онкозаболевания.

PARP1 известен прежде всего как белок, детектирующий разрывы ДНК (включая одно- и двуцепочечные). Его активация приводит к привлечению репарационного комплекса через механизм, опосредованный поли(АДФ-рибозилированием) (PAR, Poly(ADP-ribosyl)ation) [7, 8]. Помимо этого, PARP1 способен регулировать архитектуру и динамику хроматина. PARP1 способен предотвращать деметилование H3K4me3 путем связывания с промоторами ряда генов, таких как TMSL8, SCN1A, NELL2, ITPR1, а также прямого связывания с деметилазой KDM5B [9]. Каталитическая активность PARP1 приводит к вытеснению деметилазы KDM5B из хроматина, что способствует поддержанию транскрипционно активного состояния хроматина за счет сохранения активирующих гистоновых меток. Данные о воздействии PARP1 на организацию хроматина противоречивы. Взаимодействуя с нуклеосомами, PARP1 вызывает структурные изменения хроматина, модулируя его пространственную организацию. Этот процесс может приводить к конденсации и инактивации хроматина, что, вероятно, играет ключевую роль в обеспечении репарации ДНК при повреждениях [10]. Однако в других случаях PARP1 проявляет противоположный эффект – его взаимодействие с хроматином приводит к удалению линкерного гистона H1, снижению плотности упаковки ДНК и облегчению транскрипционного процесса [11, 12]. Эти данные указывают на способность PARP1 функционировать в качестве активатора хроматина. В целом, наблюдаемые эффекты зависят от каталитической активности PARP1, эпигенетического ландшафта и взаимодействия с другими регуляторными системами. Ранее было показано, что PARP1 способен непосредственно кооперировать с рядом белков, например p53 [8, 10], который известен как белок-супрессор опухолей, обладающий способностями контролировать клеточный цикл и регулировать апоптоз [13]. Помимо этого, p53 вовлечен в регуляцию окислительного стресса и активацию антиоксидантного ответа, а также в дифференциацию клеток. Кроме того, он участвует в регуляции метаболизма, репарации ДНК, активации и регуляции аутофагии, регуляции окислительного стресса и антиоксидантного ответа, контроле дифференцировки клеток, эпигенетических состояний и плюрипотентности [12, 14–16]. Он также проявляет пионерную активность, поскольку взаимодействует с хроматином, обогащенным нуклеосомами, открывает недоступные участки хроматина [17, 18].

Несмотря на вышесказанное, достаточных сведений о их совместном взаимодействии с нуклеосомой не представлено. Таким образом целью настоящей работы было исследование кооперативного/конкурентного связывания PARP-1 и p53 с нуклеосомами.

Материалы и методы

Список реактивов и оборудования. Смесь нуклеотидтрифосфатов для полимеразной цепной реакции (ПЦР), 10 мМ каждого (Евроген, Россия); буфер для ПЦР 10× (Евроген, Россия); Taq ДНК-полимераза (Евроген, Россия); плазмида pGEM-T easy, содержащая NPS 603 Widom и сайт связывания p53 (любезно предоставлено Бондаренко Е.А.); коммерческий набор Cleanup St PCR для очистки ДНК из реакционных смесей (Евроген, Россия); акриламид (Gibco, США); бис-акриламид (Amresco, США); Trizma Base (Sigma, США); ЭДТА (AppliChem, Германия); дитиотреитол (Sigma, США); NP-40 (Sigma, США); poly(I:C) (Sigma Aldrich, США); β-меркаптоэтанол (ICN Biomedicals Ltd., Великобритания); NaCl (Sigma, США); HEPES, pH 8,0 (Sigma Aldrich, США); TCEP (Sigma Aldrich, США); ZnCl₂ (Fluka, Швейцария); флуоресцентно меченные олигонуклеотиды с метками Cy3, Cy5 (Lumiprobe, Россия). В работе использовались следующие приборы и оборудование: источник тока PowerPac Basic (Bio-Rad, США); гель-сканер Amersham Typhoon (Cytiva, Великобритания); термальный циклер C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США); программное обеспечение для обработки изображений ImageJ (NIH, США).

Для работы готовили моонуклеосомы на основе последовательности Widom 603 [19] со встроенным сайтом связывания p53 «GAACATGTCCCAACATGTTG» в область входа/выхода нуклеосомы. Длина нуклеосом-позиционирующей последовательности 145 пар оснований, удлиненная с обеих сторон на 20 нуклеотидов. В представленной матрице подчеркнуты линкерные участки с обеих концов последовательности, а также сайт связывания внутри.

CAAGCGACACTGGCACTGGGCCGGTTCG
CGCGCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCTCTCTC
GGGCGTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGA
GCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGAT
GTTGAAAGAGGCCCTCCGAACATGTCCCAACA
TGTTGCTGGGGCCAGTGCCTATCATGGTTC

Для последующей детекции нуклеосом вносили флуоресцентные метки методом ПЦР с помощью флуоресцентно меченых олигонуклеотидов (Люмипроб, Россия; флуоресцентно-меченые тимидины указаны в квадратных скобках с названием меток Cy3 и Cy5):

GAACCATGAT[**Cy5-dT**]**GGCACTGGGCCCCAG**
CAACATGTTGGGACATGTTTCGGAGGGCCTCT
TTC

CAAGCGACAC[**Cy3-dT**]**GGCACTGGGCCGGT**
TCGCGCGCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCTCTC
TCTCGGGCGT

Реконструкцию нуклеосом проводили ступенчатым диализом с использованием полученной флуоресцентно меченой ДНК, а также кано-

нического октамера гистонов человека (любезно предоставленный А.Н. Коровиной). Смесь ДНК и гистонного октамера в соотношении 1,1:1 инкубировали в буфере, содержащем 2 М NaCl, с последующим постепенным снижением концентрации до 0,1 М при 4°C. Качество сборки и наличие меток проверяли методом электрофореза в 4,5%-ном нативном полиакриламидном геле (ПААГ; 0,2-кратный буфер Tris-Borate-EDTA – TBE: 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) (рис. 1).

p53DBD хранили в буферах следующего состава: 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис pH 7,5, 10 мМ DTT, 10%-ный глицерин. PARP1 хранили в буферах следующего состава: 20 мМ HEPES pH 8,0; 150 мМ NaCl (Sigma Aldrich, США), 0,1 мМ TCEP (Sigma Aldrich, США), 0,15 мМ ZnCl₂ (Fluka, Швейцария), 25%-ный глицерин (Fisher Scientific, США).

Белки PARP1 и ДНК-связывающий домен p53 были очищены методом аффинной хроматографии с использованием никель-содержащей колонки.

Для изучения кооперативного взаимодействия PARP1 и p53DBD комплексы с нуклеосомами формировали двумя способами. Первый – к предварительно полученному комплексу нуклеосома-p53 добавляли PARP1, второй – к предварительно полученному комплексу нуклеосома-PARP1 добавля-

ли p53DBD. Для формирования комплексов был использован буфер следующего состава: 2,5 мМ Трис (pH 8,0), 0,25 мМ β-меркаптоэтанола, 0,125 мМ ЭДТА, 10 мМ KCl. Такие концентрации оптимальны для поддержания специфичных комплексов нуклеосома-p53DBD. При предварительном формировании комплексов нуклеосома-p53 и последующим добавлением PARP1 комплексы с p53 готовили следующим образом: в реакционный буфер добавляли 5 нг poly(I:C) (в качестве неспецифического полинуклеотида-компетитора, контрольные эксперименты, демонстрирующие его влияние, представлены на рис. A1, приложение) и 1,2 мкМ p53DBD и оставляли на 5 мин при 25°C. Далее к образцу добавляли 2 нМ нуклеосом и инкубировали в течение 30 мин при 25°C. Далее добавляли 20 нМ PARP1 и инкубировали 30 мин. Если сначала формировался комплекс нуклеосома-PARP1, то в реакционный раствор добавляли 20 нМ PARP1 и 2 нМ нуклеосом и инкубировали 30 мин. За 5 мин до конца первой инкубации готовили смесь poly(I:C) и p53DBD, которую по истечении времени добавляли к комплексу нуклеосома-PARP1. Готовые образцы помещали в нативный 4,5%-ный ПААГ и проводили электрофорез в течение 30 мин. Полученный гель сканировали на Amersham Typhoon (Cytiva, США) с использованием лазеров для Cy3 – 532 нм, Cy5 – 633 нм и для Cy2 – 488 нм (рис. 1, 2).

Результаты

Основным центром взаимодействия PARP1 и p53 является С-терминальный домен p53 (аминокислоты 356–393) [20]. Поли(АДФ)-рибозилирование этого участка усиливает взаимодействие PARP1 и p53. Таким образом, при наличии p53DBD мы можем исключить возможность непосредственного связывания и наблюдать кооперативность или конкуренцию при формировании комплексов с нуклеосомой. Следует отметить, что такая система имеет статус модельной и преимущественно нацелена на уточнение фундаментальных механизмов взаимодействий этих белков с нуклеосомой. Полученные результаты не в полной мере отражают физиологические процессы.

После определения фундаментальных механизмов взаимодействия данных белков с хроматином, в дальнейших исследованиях планируется детально изучить ферментативную активность PARP1 в аналогичных условиях. Предполагается, что при PAR-илировании такой системы p53DBD не будет модифицирован поли(АДФ-рибозой) и сохранит свою связь с нуклеосомой, поддерживая индуцированные конформационные изменения.

Для более детального анализа использовали p53DBD в концентрации, частично переводящей нуклеосомы в комплекс (1,2 мкМ), и в концентрации PARP1, приводящей к формированию комплексов со всеми нуклеосомами в образце (20 нМ).

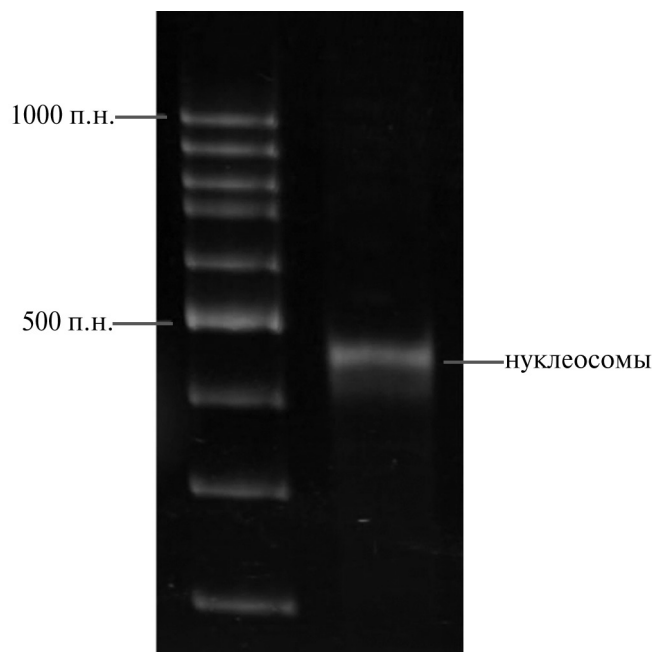


Рис. 1. Проверка качества сборки нуклеосом, 4,5%-ный ПААГ. Визуализацию нуклеосом методом FRET (Förster Resonance Energy Transfer) осуществляли с помощью сканирующего прибора Amersham Typhoon (Cytiva, США). Для регистрации сигнала производилось лазерное возбуждение в канале Cy3 (532 нм) с детекцией флуоресценции в соответствующем спектральном диапазоне. Дополнительно фиксировали флуоресценцию акцептора (Cy5, 670 нм) при возбуждении Cy3 и регистрации в канале Cy5. Полученные изображения геля обрабатывались и совмещались с помощью программного обеспечения ImageJ.

С помощью такого подхода проверяли гипотезу о кооперации PARP1 с ДНК-связывающим доменом p53, возможно, по механизму, сходному с облегчением доступа SOX2 к хроматину при связывании PARP1 с нуклеосомными структурами [21]. Кооперативные эффекты могут проявляться в виде образования мультимолекулярных комплексов либо в виде изменений эффективности формирования комплексов, благодаря специфическому влиянию одного белка на доступность или динамику связывания другого компонента системы.

Помимо нуклеосом в пробе также присутствует свободная ДНК, которая также влияет на визуализацию комплексов. При формировании комплекса нуклеосома-PARP1 происходит изменение сдвига в ПААГ (рис. 2). Комплексы с PARP1 представляют собой совокупность полос на изображении геле-электрофореза: он способен формировать мультисоставные комплексы с нуклеосомой, а также эффективно связывать свободную ДНК. Молекулярный вес p53DBD меньше PARP1, поэтому комплекс нуклеосома-p53DBD быстрее мигрирует в геле, чем комплекс нуклеосома-PARP1 (рис. 2).

P53DBD, являясь ДНК-связывающим белком, эффективно связывается и со свободной, и с нуклеосомной ДНК. Образуется два типа комплексов: нуклеосома-p53, более тяжелый и высокий идущий комплекс, и ДНК-p53, занимающий место между интактными нуклеосомами и комплексом нуклеосома-p53.

При предварительном формировании комплекса нуклеосома-p53 и последующем добавлении PARP1 происходит формирование отдельных комплексов нуклеосома-p53 и нуклеосома-PARP1. Вероятно, это связано со слабой способностью p53 в низких концентрациях взаимодействовать с нуклеосомами, и наоборот высокой способностью

у PARP1. При обратной последовательности формирования комплекса также наблюдается формирование отдельных комплексов с p53 и PARP1, но общая совокупность комплексов претерпевает ряд следующих изменений. На дорожке превалируют низкомолекулярные комплексы как с PARP1 так и с p53DBD. Вероятно, это связано с тем, что PARP1 индуцирует реорганизацию хроматина, способствуя освобождению сайта связывания p53 на нуклеосомной ДНК. Однако вследствие стерических ограничений нуклеосомной структуры и ограниченной гибкости канонической нуклеосомы эффективность образования высокомолекулярных комплексов нуклеосома-PARP1 снижается.

Обсуждение

В целом, результаты наших исследований демонстрируют, что порядок добавления PARP1 и p53DBD к нуклеосомам определяет кооперативность или конкуренцию. Последовательное связывание белков с нуклеосомами может создавать партнерские эффекты: предыдущее связывание одного белка изменяет конформацию нуклеосомы, что влияет на эффективность связывания последующих белков. Известно, что оба белка реагируют на участки ДНК, содержащие одно- или двунитевые разрывы [8, 22, 23]. PARP1 распознает повреждения ДНК и рекрутирует репарационные белки [24], тогда как p53 активируется при повреждении ДНК и действует как транскрипционный фактор [25]. С биологической точки зрения, наблюдаемые эффекты могут отражать процессы в хроматине, когда происходит выбор между процессом репарации и апоптозом и с ключевой ролью p53 в этом выборе. p53 — критический регулятор клеточного ответа на стресс. Его взаимодействие с PARP1 и нуклеосомами может определять судьбу клетки: p53 усили-

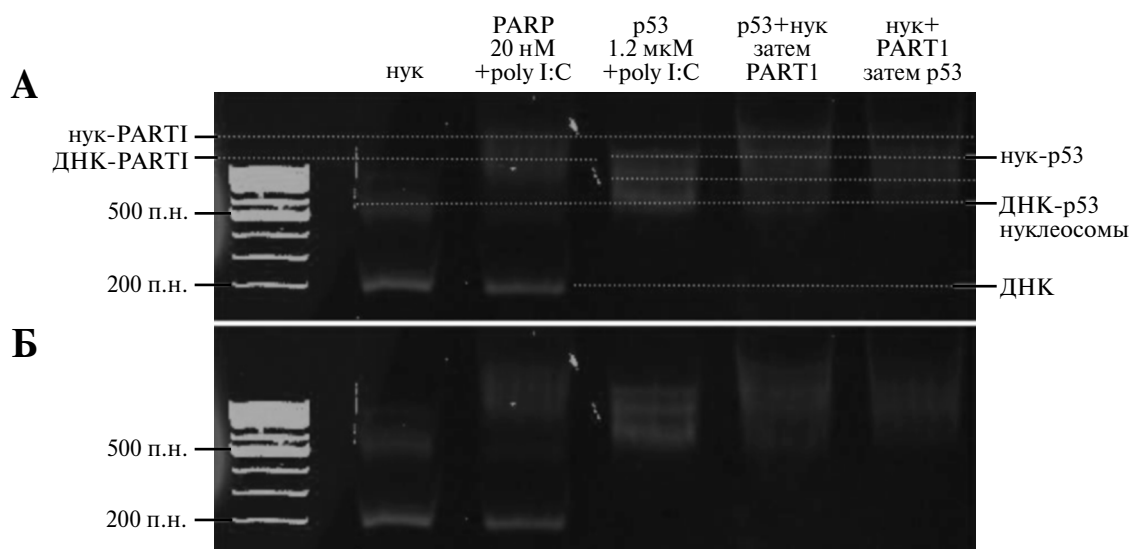


Рис. 2. Анализ взаимодействия PARP1 и p53 с нуклеосомами методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ). Комплексы инкубировали с нуклеосомами (нук), PARP1 20 нМ и p53DBD 1,2 мкМ. Справа указаны позиции миграции: свободные нуклеосомы (нижняя полоса), комплекс ДНК-p53, нук-p53 и комплексы ДНК-PARP1, нук-PARP1. Слева показаны маркеры молекулярного веса (п.н. — пары нуклеотидов). В последних двух дорожках представлены комплексы нуклеосом с белками p53 и PARP1.

вает связывание PARP1 с нуклеосомами, способствуя эффективной репарации [23, 26], в то же время при определенных условиях, например, при сильном генотоксическом стрессе доминирование p53 может подавлять PARP1-зависимую репарацию, способствуя апоптозу в сильно поврежденных клетках. Таким образом конкуренция и кооперативность между p53 и PARP1 отражает сложный баланс между репарацией ДНК и программируемой гибелью клетки. Это важно для понимания ре-

зистентности к терапии (например, ингибиторам PARP) и разработки комбинированных методов лечения рака.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (проект № 21-64-00001-П). Данная работа не содержала экспериментов с участием людей или животных. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Hansen J.C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005;15(2):188–196.
2. Bavykin S.G., Usachenko S.I., Zalensky A.O., Mirzabekov A.D. Structure of nucleosomes and organization of internucleosomal DNA in chromatin. *J. Mol. Biol.* 1990;212(3):495–511.
3. Luger K. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251–260.
4. Bednar J., Horowitz R.A., Grigoryev S.A., Carruthers L.M., Hansen J.C., Koster A.J., Woodcock C.L. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(24):14173–14178.
5. Luger K., Dechassa M.L., Tremethick D.J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012;13(7):436–447.
6. Mishra L.N., Thiriet C., Vasudevan D. Editorial: Chromatin structure and function. *Front. Genet.* 2023;14:1140534.
7. Ko H.L., Ren E.C. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules.* 2012;2(4):524–548.
8. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017;18(10):610–621.
9. Nakamoto M.Y., Rudolph J., Wuttke D.S., Luger K. Non-specific binding of RNA to PARP1 and PARP2 does not lead to catalytic activation. *Biochemistry.* 2019;58(51):5107–5111.
10. Muthurajan U.M., Hepler M.R.D., Hieb A.R., Clark N.J., Kramer M., Yao T., Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014;111(35):12752–12757.
11. Zhang S., Sun X., Jing Z., Qu F. Spectroscopic analysis on the resveratrol-DNA binding interactions at physiological pH. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011;82(1):213–216.
12. Labuschagne C.F., Zani F., Vousden K.H. Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2018;1870(1):32–42.
13. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88(3):323–331.
14. Borrero L.J.H., El-Deiry W.S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2021;1876(1):188556.
15. Sui X., Han W., Pan H. p53-induced autophagy and senescence. *Oncotarget.* 2015;6(14):11723–11724.
16. Wang X., Simpson E.R., Brown K.A. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *Cancer Res.* 2015;75(23):5001–5007.
17. Fischer M., Schwarz R., Riege K., Förste S., Schwab K., Wiechens E., van Bömmel A., Hoffmann S. p53 reveals principles of chromatin remodeling and enhancer activation. *Nucleic Acids Research.* 2025;53(11):gkaf465.
18. Yu X., Buck M.J. Defining TP53 pioneering capabilities with competitive nucleosome binding assays. *Genome Res.* 2019;29(1):107–115.
19. Widom J. A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(3):1095–1099.
20. Okorokov A.L., Sherman M.B., Plisson C., Grinkevich V., Sigmundsson K., Selivanova G., Milner J., Orlova E.V. The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *EMBO J.* 2006;25(21):5191–5200.
21. Liu Z., Kraus W.L. Catalytic-independent functions of PARP-1 determine Sox2 pioneer activity at intractable genomic loci. *Molecular Cell.* 2017;65(4):589–603.e9.
22. Nozaki T., Masutani M. p53-dependent cell cycle checkpoint after DNA damage and its relevance to PARP1. *Res. Rev. Insights.* 2018;2(2):1–5.
23. Süsse S., Scholz C.J., Bürkle A., Wiesmüller L. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(2):669–680.
24. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(21):6170–6182.
25. Reinhardt H.C., Schumacher B. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet.* 2012;28(3):128–136.
26. Malanga M. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J. Biol. Chem.* 1998;273(19):11839–11843.

Поступила в редакцию 01.07.2025

После доработки 19.09.2025

Принята в печать 03.10.2025

ORIGINAL RESEARCH

PARP1-dependent alterations in nucleosome organization: potential involvement of p53

D.O. Koshkina^{1,2,*} , N.V. Maluchenko¹ , A.M. Novichkova¹,
A.V. Feofanov^{1,2} , V.M. Studitsky^{1,3} 

¹*School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*

²*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;*

³*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA*

*e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Chromatin of eukaryotic organisms is a complexly organized and dynamic complex. Chromatin proteins provide proper regulation of gene expression, DNA replication, and DNA repair. Among the most important regulators of chromatin architecture among non-histone proteins are p53 and PARP1, which are involved in the cellular response to DNA damage. In the present study, we investigated the cooperative and competitive binding of the DNA-binding domain (DBD) of p53 and the enzyme PARP1 to mononucleosomes reconstituted on the Widom 603 sequence with an embedded p53 binding site. To detect interactions, the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method with fluorescently labeled DNA. Complexes were formed in two ways: nucleosomes were pre-incubated with p53 DBD and then PARP1 was added, or the nucleosome–PARP1 complex was formed first and then p53 DBD was introduced. The results showed that the order of protein addition determines the nature of their interaction with the nucleosome: at low p53 concentrations, displacement of this protein by PARP1 is observed, while at higher p53 concentrations, stable nucleosome–p53 complexes are formed, undisturbed by PARP1. No stable ternary nucleosome–p53–PARP1 complexes were detected.

Keywords: *PARP1, p53, nucleosome, EMSA, chromatin*

Funding: This research was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-64-00001-P).

Сведения об авторах

Кошкина Дарья Олеговна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; ст. лаборант-исследователь отдела клеточной геномики группы динамики хроматина ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8137-4685>

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

Новичкова Антонина Михайловна — студентка кафедры молекулярного биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; tonya.novichkova@bk.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; вед. науч. сотр. отдела клеточной геномики группы динамики хроматина ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-60-89; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.22

Оценка связывания ингибиторов PARP в режиме реального времени на основе Ni-NTA-агарозных шариков

А.А. Лобанова^{1,*}, А.А. Саулина¹, О.В. Гераськина², Д.О. Кошкина¹ ,
Н.В. Малюченко¹ , А.В. Феофанов^{1,2} , В.М. Студитский³ 

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

²Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

В исследовании была создана платформа для флуоресцентной микроскопии, которая позволяет в режиме реального времени визуализировать динамику взаимодействия лиганда с белками, помеченными His-tag, связывающимися с Ni²⁺ на NTA-агарозных шариках. Эта методология преодолевает критические ограничения традиционных методов, таких как поверхностный плазмонный резонанс или гель-электрофорез, за счет сохранения кинетики фазы раствора и обеспечения субминутного временного разрешения в физиологических буферах. Мы применили эту платформу для исследования действия ингибиторов в системе нуклеосом, которая является более физиологически подходящей моделью, чем свободная ДНК. Изучая взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в присутствии и в отсутствие клинических ингибиторов (талазопариба и велипариба), а также реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования в присутствии НАД⁺, мы смогли продемонстрировать прямое пространственное и временное разрешение динамики хроматин-белок. Практически неограниченная совместимость платформы с буферами, возможность мониторинга в режиме реального времени и устранение артефактов ковалентной иммобилизации обеспечивают новое понимание механизмов взаимодействия лекарственных средств и хроматина.

Ключевые слова: Ni-NTA-агарозные шарики, PARP2, ингибиторы PARP, нуклеосомы

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-11

Введение

Современные методологии анализа биомолекулярных взаимодействий сталкиваются с фундаментальными ограничениями, которые не дают возможности полноценно и функционально исследовать хроматин-ассоциированные мишени [1]. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Surface Plasmon Resonance) требует ковалентной иммобилизации белка посредством соединения аминов или стрептавидин-биотиновых связей, что приводит к появлению конформационных артефактов, которые изменяют доступность ДНК-связывающего домена и ферментативную функцию [2, 3]. Такой подход по своей сути ограничивает совместимость буфера, исключая физиологически важные компоненты. Поляризация флуоресценции, хотя и совместима с раствором, страдает от усреднения по ансамблю, которое скрывает пространственную неоднородность при

формировании комплекса [4]. Метод микроскопии, отслеживающий резонансный перенос Ферстеровской энергии от единичных молекул (spFRET, single pair Förster Resonance Energy Transfer) является одним из ключевых методов, позволяющих проводить точечные исследования межмолекулярных взаимодействий [5–7]. Однако он не обеспечивает прямую визуализацию исследуемых объектов в режиме реального времени. Электрофоретический анализ сдвига подвижности (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay) дают только конечные снимки состояний равновесия, не позволяя выявить переходные промежуточные соединения или каталитические процессы (поскольку этот метод включает воздействие электрического поля на образцы, а также механические препятствия и ограничения, нестабильные комплексы становятся невозможно визуализировать с помощью такого метода) [8, 9]. Эти ограни-

чения становятся особенно существенными для изучения белков поли(АДФ-рибоза)полимераз (PARPs), где наблюдение за НАД⁺-зависимой диссоциацией в режиме реального времени имеет важное значение для характеристики механизмов ингибирования в биологически значимом контексте. PARPs являются ядерными белками и важными компонентами системы репарации ДНК [10–13]. Эти ферменты одни из первых обнаруживают место повреждения ДНК, активируются и синтезируют из субстрата НАД⁺ поли(АДФ-рибозу), которая является маркером для факторов репарации ДНК [14].

Важно отметить, что для понимания взаимодействия PARP с хроматином необходимо использовать именно нуклеосомы, а не свободную ДНК [5–7]. Нуклеосомы являются фундаментальными функциональными единицами хроматина, состоящими из ~147 п.н. ДНК, обернутой вокруг октамеров гистонов [15–17]. Чтобы воспроизвести физиологическую компактизацию ДНК, стерические ограничения и эпигенетические ландшафты, можно использовать моонуклеосомы. Изучая взаимодействия белков с моонуклеосомами, мы можем установить прямые параллели с организацией хроматина более высокого порядка и клеточными процессами, что позволяет экстраполировать механистические выводы из экспериментов *in vitro* на ядерную среду [5]. Традиционные методы (такие как EMSA) дестабилизируют нуклеосомы или игнорируют их структурное воздействие, что ставит под вопрос возможность данными методами исследовать процессы в физиологических условиях [1].

Для преодоления некоторых технологических трудностей мы разработали платформу для флуоресцентной микроскопии, использующую иммобилизацию гексагистидиновой метки (His₆-tag) на агарозных гранулах из никельнитрилтриуксусной кислоты (Ni-NTA, Ni-Nitrilotriacetic Acid). Эта методология сохраняет фазовую динамику раствора за счет привязки к определенной ориентации с помощью координационной химии между ионами His₆-tag и Ni²⁺, поддерживая гидратацию нативного белка и свободу вращения [18, 19]. Трехмерная гранулярная матрица (диаметр 45–165 мкм) обеспечивает оптимальное соотношение поверхности к объему для обеспечения доступности лиганда и в то же время поддерживает различные физиологические буферы, включая системы стабилизации нуклеосом на основе Tris, физиологический раствор с фосфатным буфером и 10-миллиметровым дитиотреитолом (DTT, dithiothreitol), а также условия с высоким содержанием соли, имитирующие ядерную среду. Важно отметить, что система достигает субсекундного временного разрешения за счет конфокального детектирования, что позволяет напрямую визуализировать кинетику связывания и каталитические переходы, недоступные для многих других методов [20].

Методология возникла в результате попыток охарактеризовать домен PARP2 WGR, нуклеосомные комплексы которого не обнаруживаются EMSA из-за быстрой диссоциации при электрофоретическом разделении [6]. Более того, мы стремились преодолеть ограничения spFRET-микроскопии, которая обычно используется для изучения PARP-нуклеосомных взаимодействий [7], разработав методологию, позволяющую отслеживать динамические биомолекулярные процессы в режиме реального времени. Устраняя артефакты миграции супрамолекулярных комплексов в геле, наша платформа выявляет взаимодействия, которые не могут быть зафиксированы некоторыми другими подходами. Этот метод позволяет исследовать механизмы, лежащие в основе функционирования ингибиторов; в данной работе исследовалось влияние на ДНК-связывающую и каталитическую активность PARP2 ингибитора типа I (талазопариб), который стабилизирует комплексы PARP-ДНК за счет повышения сродства к ДНК, и ингибитора типа III (велипариб), который ослабляет связывание с ДНК [21]. Возможность визуализировать эти различные эффекты в режиме реального времени поможет устранить сохраняющиеся пробелы в характеристике терапевтического воздействия на пути репарации ДНК, связанные с активностью белков PARP.

Материалы и методы

Экспрессия и очистка белка. Рекомбинантный PARP2 человека экспрессировали с His₆-tag в составе, в *E. coli* в соответствии с описанным ранее протоколом [22, 23].

Сборка нуклеосом. Меченную Су5 ДНК длиной 187 п.о., содержащую последовательность позиционирования 603, амплифицировали с использованием праймеров:

Forward: 5'-AAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGT-3'

Reverse: 5'-AACCATGATGGGCACTGGGTA CCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]GGTTAG-3' (Lumiprobe, Россия)

Октамеры гистонов были выделены из эритроцитов цыплят в соответствии с описанным ранее протоколом [7]. Моонуклеосомы были собраны с помощью солевого диализа и их качество было проверено с помощью нативного гелеэлектрофореза в соответствии с описанным ранее протоколом [7, 24].

Подготовка шариков и флуоресцентная микроскопия. Для изучения связывания белков с нуклеосомами, меченными Су5, использовали суспензию агарозных шариков диаметром от 45 до 165 мкм, поверхность которых была модифицирована Ni²⁺-NTA (Qiagen, Германия). В среднем бусины имеют примерно одинаковую форму

и размер, а расхождения составляют небольшой процент от общего количества бусин.

Процедура. К пяти объемам буферного раствора, в котором должна была протекать реакция, добавили небольшой объем (приблизительно 50 мкл) агарозных шариков и тщательно перемешали смесь. Затем гранулы осаждали центрифугированием при 100 об./мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость удалили и к гранулам добавили два объема свежего буфера, которые тщательно перемешали, чтобы предотвратить их высыхание. Поскольку гранулы хранились в 20%-ном этаноле, этот этап помог снизить концентрацию этанола перед добавлением белка. Важно, чтобы используемый буфер не препятствовал взаимодействию His-tag с Ni-NTA.

Добавили PARP2 к гранулам, тщательно перемешали и выдержали на льду в течение 5–10 мин. Мы использовали наномолярные и микромолярные концентрации белка. Связывающая способность гранул составляет до 50 мкг белка на 1 мг гранул. Представляющий интерес белок должен содержать аффинную метку с шестью или более остатками гистидина, чтобы избирательно связываться со смолой Ni-NTA.

После инкубации гранулы центрифугировали в течение 1 мин при 1 об./мин. Удалили надосадочную жидкость, содержащую несвязанный белковый буфер. Сразу же добавили в гранулы в 1,5 раза больше буфера и тщательно перемешали.

Для изучения взаимодействия между белком и нуклеосомами добавляли 10–100 нМ флуоресцентно меченых нуклеосом к суспензии шариков, содержащих белок. Затем смесь тщательно перемешали и выдержали на льду в течение 5–10 мин.

Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия), оснащенного объективом C-Apochromat 40×/1,2 Вт М27 (Zeiss, Германия), как в конфокальном, так и в проходящем свете. Для возбуждения флуоресценции использовался гелий-неоновый лазер (He-Ne) длиной волны 633 нм, а флуоресценция Су5 регистрировалась в диапазоне от 655 до 750 нм с помощью лавинного фотодиода (APD, Avalanche Photodiode). Размер конфокальной апертуры соответствовал одному воздушному диску.

Реагенты, совместимые с Ni-NTA, включают различные денатурирующие вещества (Gu HCl — 6 М, мочевины — 8 М), детергенты (Triton X-100 — 2%, Tween 20 — 2%, CHAPS — 1%), восстановители (β -меркаптоэтанол — 20 мм, дитиотреитол (DTT, dithiothreitol) — 10 мм, трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (TCEP, tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride) — 20 мм), глицерин — 50%, этанол — 20%, имидазол — 20 мМ, а также соли ($MgCl_2$ — 4 мМ, $CaCl_2$ — 5 мМ, NaCl — 2 М).

Для экспериментов с ингибиторами PARP2 (концентрация белка — 100 мкМ) образцы (объемом 10 мкл) предварительно инкубировали с тала-

зопарибом (100 нМ) или велипарибом (100 нМ) (Selleck, США) в течение 20 мин. Для инициирования реакции поли(АДФ-рибозилирования) к образцу добавляли 100 мкМ НАД⁺ (Merck, Германия).

Результаты и обсуждение

Ni-NTA-агарозные шарики. Платформа из агарозных шариков Ni-NTA (рис. 1А) обеспечивала трехмерное связывание белка при сохранении нативной конформационной динамики. His₆-tag-опосредованное ориентационно-специфическое связывание практически не влияет на активные участки белка (как ДНК-связывающий, так и каталитический домены), что подтверждается сохранением ферментативной активности. Контрольные эксперименты показали минимальное неспецифическое связывание Су5-нуклеосом с шариками без белка, в то время как анализы на фотообесцвечивание подтвердили стабильность Су5 в условиях визуализации (рис. S1А).

Визуализация взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в режиме реального времени. Метод флуоресцентной микроскопии позволил получить прямое пространственное отображение молекулярных взаимодействий с помощью визуализации распределения и интенсивности флуоресценции (рис. 1Б; рис. 2). Контрольные образцы, содержащие только белок (PARP2, связанный с гранулами), не демонстрировали заметной флуоресценции вокруг гранул (рис. 2А), что подтверждает отсутствие автофлуоресценции или неспецифического накопления флуорофора. Полная темнота (отсутствие флуоресцентного сигнала) вокруг шариков служила основой для определения специфического связывания. Контрольные образцы, содержащие только нуклеосомы, показали, что флуоресцентный сигнал равномерно распределен по всему полю с заметными темными пустотами, соответствующими расположению шариков (рис. 2Б). Этот паттерн продемонстрировал две важные особенности: свободные Су5-нуклеосомы в растворе генерировали диффузные сигналы флуоресценции; отсутствие ореолов флуоресценции вокруг гранул подтверждало незначительную неспецифическую адгезию к поверхности Ni-NTA. Специфические белково-нуклеосомные комплексы образовывали характерные ореолы флуоресценции вокруг гранул. Взаимодействие PARP2 с нуклеосомами приводило к интенсивной равномерной флуоресценции, охватывающей гранулы, в течение 2 мин после добавления нуклеосом (рис. 2В), что также отображает изменение накопления сигнала флуоресценции во времени (рис. S1В). Этот непрерывный ореол указывал на гомогенное присоединение нуклеосом к ДНК-связывающим доменам PARP2, что согласуется с высокоаффинным взаимодействием фермента с хроматином.

Влияние агентов на взаимодействие PARP2 с нуклеосомами. Мониторинг в режиме реального времени фиксировал динамические реакции на НАД⁺ и ингибиторы (рис. 1Б; рис. 2В–Е).

ПАРилирование и диссоциация комплексов, вызванные добавлением НАД^+ . Добавление 100 мкМ НАД^+ к предварительно сформированным комплексам PARP2-нуклеосома вызывало постепенное затухание флуоресценции в течение 40 мин (рис. 2Г). Это соответствует автопарилированию PARP2, при котором накапливающиеся отрицательно заряженные цепи PAR создают электростатическое отталкивание, что приводит к диссоциации нуклеосом обратно в раствор. Это спровоцированное постепенное затухание флуоресценции в течение 40 мин было визуализировано с помощью покадрового анализа в реальном времени, который зафиксировал полную траекторию диссоциации (рис. S1Б, S1Д). Важно отметить, что наблюдаемый профиль затухания отличался от незначительных артефактов фотообесцвечивания при идентичных условиях получе-

ния изображения (рис. S1А, S1Г). После добавления НАД^+ определенная область образца сканируется с регулярными интервалами (каждую минуту (рис. S1Д); на рис. S1Б показаны результаты измерения через каждую пятую минуту). Поскольку гранулы тяжелые, они могут постепенно перемещаться в объеме раствора, но достаточно медленно, чтобы можно было отслеживать одну частицу в течение длительного времени (не менее 1 ч).

Таким образом, эта платформа может определять временную кинетику активации PARP в различных биохимических условиях (рН, температура, ионная сила). Чтобы подтвердить его полезность для определения профиля ингибиторов, мы выбрали два клинически протестированных ингибитора с различными механизмами влияния на PARP2 — талазопариб и велипариб.

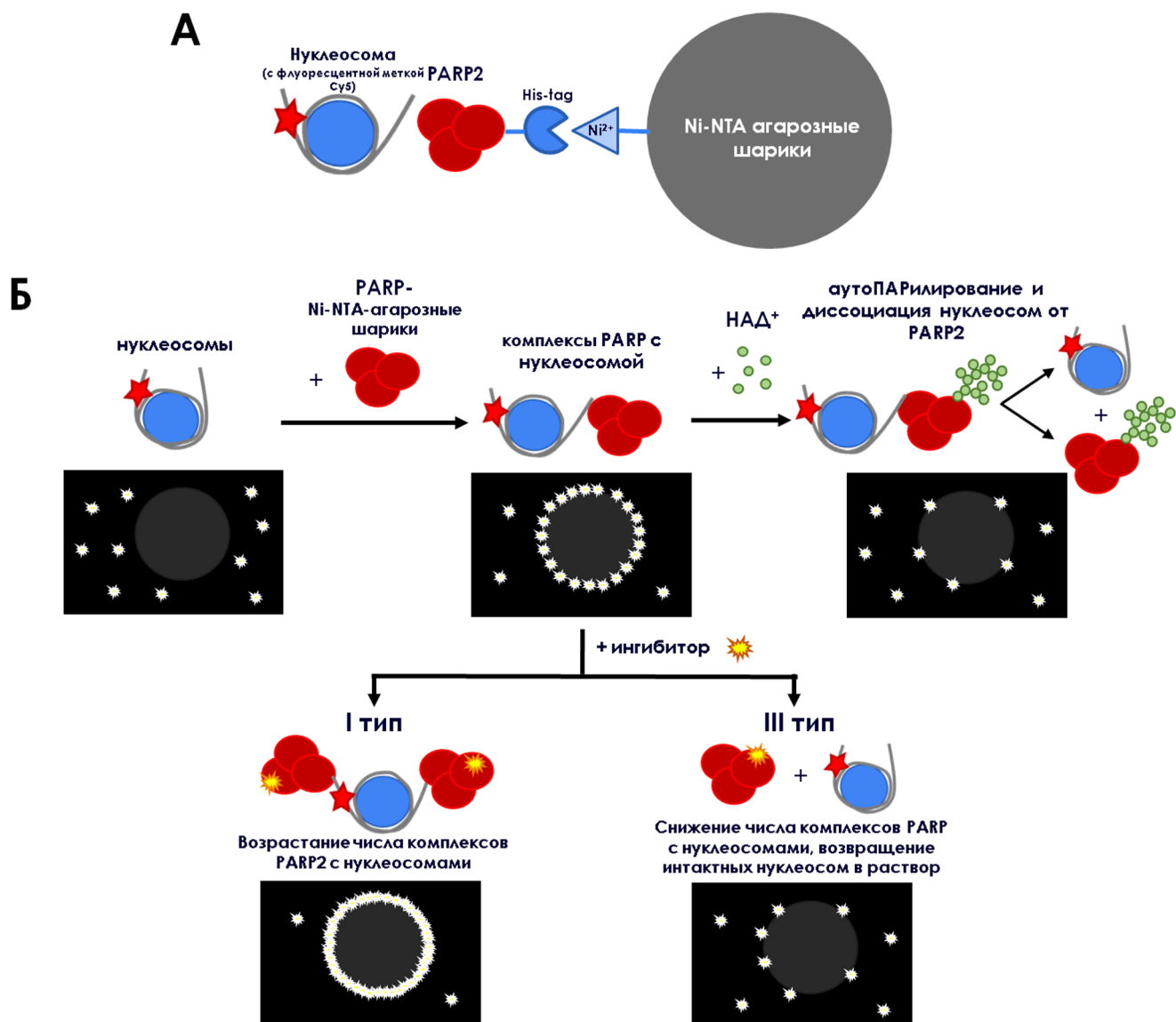


Рис. 1. Схема визуализации результатов флуоресцентной микроскопии в реальном времени. (А) Поверхность агарозного шарика модифицирована Ni^{2+} -NTA, который избирательно связывается с белками, несущими His-tag. Если интересующий белок способен связываться с нуклеосомой, поверхность гранул будет флуоресцировать из-за флуоресцентных меток на нуклеосомах. (Б) Экспериментальная схема показывает взаимодействие между нуклеосомами и PARP2, связанным с гранулами, в отсутствие или в присутствии НАД^+ и ингибиторов.

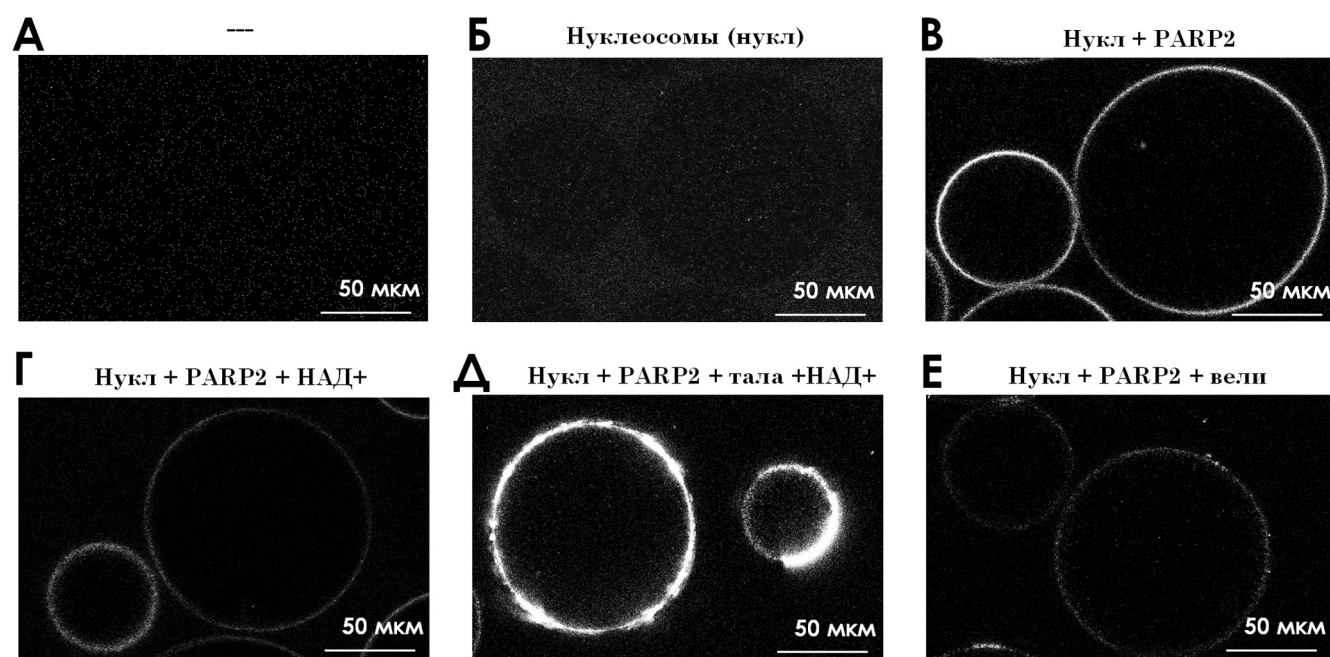


Рис. 2. Визуализация динамики взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в режиме реального времени. (А) Немеченый PARP2 с His-tag сам по себе связывается с гранулами, но это связывание не приводит к флуоресценции гранул в отсутствие флуоресцентно меченых нуклеосом. (Б) Сами по себе флуоресцентно меченые нуклеосомы специфически не связываются с гранулами в отсутствие His-меченого PARP2. (В) Исходное связывание нуклеосом с PARP2, ассоциированного с гранулами. (Г) Диссоциация комплексов PARP2-нуклеосома при добавлении НАД⁺ и автопарилерования PARP приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции. (Д) Ингибирование I типа: усиление флуоресценции, вызванное талазопарибом, и гетерогенное перераспределение гало. (Е) Ингибирование III типа: ослабление сигнала флуоресценции, вызванное велипарибом, из-за снижения эффективности связывания PARP2 с нуклеосомами.

Талазопариб (ингибитор I типа для PARP2). Добавление талазопариба (100 нМ) к нуклеосомам и PARP2 усиливало первоначальное связывание с нуклеосомами по сравнению с контролем без ингибиторов (рис. 2Д). Важно отметить, что распределение флуоресценции стало заметно более неоднородным, с участками интенсивной флуоресценции, чередующимися с областями более низкой интенсивности, что является морфологическим свидетельством «захваченных» комплексов PARP с нуклеосомами. Добавление НАД⁺ не вызывало диссоциации, что подтверждает полное подавление каталитического высвобождения талазопарибом. Эти результаты подтверждают, что талазопариб является эффективным ингибитором I типа (для PARP2): усиленное связывание демонстрирует повышенное сродство к ДНК, в то время как полное подавление диссоциации, вызванной НАД⁺, подтверждает ингибирование каталитической активности, что согласуется с установленным механизмом захвата [21].

Велипариб (ингибитора III типа). Добавление 100 нМ велипариба снижало первоначальное связывание нуклеосом с PARP2 (в отсутствие НАД⁺) (рис. 2Е) и приводило к появлению характерных фрагментированных паттернов флуоресценции с неравномерным распределением сигнала. Несмотря на гетерогенность, подобно комплексам, обработанным талазопарибом (рис. 2Д), интен-

сивность сигнала была существенно снижена по сравнению с пробами, не содержащими ингибиторов (рис. 2В) и состояния, связанные с талазопарибом (рис. 2Д). Эти визуальные паттерны непосредственно демонстрируют, что велипариб относится к ингибиторам III типа: ослабленное связывание отражает нарушение функции ДНК-связывающего домена [21]. Чтобы точно определить влияние велипариба на эффективность связывания PARP2 с нуклеосомами, в этот образец не добавляли НАД⁺. В таком случае можно отделить действие ингибитора от эффекта, вызванного поли(АДФ-рибозильным) соединением.

Таким образом, была продемонстрирована возможность достижения качественного результата, но возможен и количественный анализ. Поскольку сигнал накапливается в течение заданного времени, путем многократного сканирования определенной области образца можно отследить изменения во времени. Кроме того, сравнивая накопленные сигналы от разных образцов, можно оценить действие реагентов. Эффективность ассоциации нуклеосом с белком может быть определена путем измерения изменения накопленного сигнала от частиц с течением времени. Влияние ингибиторов на связывание нуклеосом с белками можно оценить косвенно, измерив изменение эффективности связывания в присутствии ингибитора.

Заключение

В этом исследовании была создана платформа для флуоресцентной микроскопии, которая позволяет непосредственно визуализировать влияние различных агентов на взаимодействие белок-лиганд в режиме реального времени с помощью His-tag-опосредованного связывания белков с гранулами Ni-NTA. Основное достижение методики заключается в ее способности фиксировать пространственную и временную динамику биомолекулярного связывания без артефактов ковалентной фиксации. Наши визуальные наблюдения дают однозначные доказательства: специфический набор нуклеосом проявляется в виде флуоресцентных ореолов вокруг гранул (рис. 2В), в то время как контрольные эксперименты подтверждают отсутствие неспецифического связывания (рис. 2А, Б). Важно отметить, что ингибиторы PARP I типа усиливают и гетерогенно перераспределяют сигналы флуоресценции (рис. 2Д), в то время как ингибиторы III типа и каталитический субстрат НАД⁺ ослабляют их (рис. 2Г, Е). В будущих исследованиях также возможно аналогичным образом изучить влияние различных типов ингибиторов на ДНК-связывающую и каталитическую активность PARP1 и других белков семейства PARP.

Значимость платформы заключается не только в конкретных результатах, но и в широких методологических преимуществах. Сохраняя фазовую динамику раствора и обеспечивая временное разрешение с точностью до минуты, она преодолевает фундаментальные ограничения других методов, используемых для определения типа ингибитора, а также для других аналогичных целей. Практически неограниченная совместимость с бу-

фером обеспечивает физиологически значимые условия, ранее недоступные для традиционных подходов. Возможности отслеживания в реальном времени позволяют фиксировать промежуточные переходные процессы и динамические переходы, которые не поддаются анализу в конечной точке.

Эти достижения открывают несколько новых областей применения: классификация механизмов ингибирования; скрининг терапевтических средств, нацеленных на хроматин; анализ комплексов репарации ДНК в режиме реального времени; и, в целом, исследования ремоделирования хроматина. Адаптивность платформы к различным флуорофорам и экспериментальным условиям предполагает ее непосредственную пригодность для изучения рецепторов, связанных с G-белком, взаимодействий киназа-субстрат и механизмов проникновения вирусов. Будущее внедрение высокопроизводительных систем визуализации может ускорить разработку лекарств, в то время как адаптация отдельных молекул может выявить гетерогенные свойства связывания, скрытые при комплексных измерениях. Таким образом, эта методология устанавливает важную связь между структурной биохимией и клеточной физиологией, предоставляя универсальный визуальный инструментарий для динамического анализа молекулярных взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-64-00001-п. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Hansen J.C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005;15(2):188–196.
2. Luger K., Dechassa M.L., Tremethick D.J. New insights into nucleosome and chromatin structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012;13(7):436–447.
3. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science*. 2012;336(6082):728–732.
4. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. N.Y.: Springer; 2006. 954 pp.
5. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(22):12127.
6. Maluchenko N., Saulina A., Geraskina O., Kotova E., Korovina A., Armeev G., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Poly(ADP-ribose)polymerase 2 is zinc-dependent enzyme and nucleosome reorganizer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2025;82(1):267.
7. Maluchenko N., Koshkina D., Korovina A., Studitsky V., Feofanov A. Interactions of PARP1 inhibitors with PARP1-nucleosome complexes. *Cells*. 2022;11(21):3343.
8. Hellman L.M., Fried M.G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2007;2(8):1849–1861.
9. Pascal J.M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2018;71:177–182.
10. Riccio AA, Cingolani G, Pascal JM. PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(4):1691–1702.
11. Murai J., Huang S.Y., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshov J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588–5599.
12. Krüger A., Bürkle A., Hauser K., Mangerich A. Real-time monitoring of PARP1-dependent PARylation by ATR-FTIR spectroscopy. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2174.

13. Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity. *Anal. Biochem.* 2018;545:91–97.
14. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7762–7775.
15. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 1997;389(6648):251–260.
16. Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature.* 2003;423(6936):145–150.
17. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Eds. P.M. Wasarman and A.P. Wolffe. Academic Press; 1999:3–19.
18. Wasserberg D., Cabanas-Danés J., Prangsmä J., O'Mahony S., Cazade P.A., Tromp E., Blum C., Thompson D., Huskens J., Subramaniam V., Jonkhøj P. Controlling protein surface orientation by strategic placement of His-tags. *ACS Nano.* 2017;11(9):9350–9361.
19. Wu C.C., Reinhoudt D.N., Otto C., Velders A.H., Subramaniam V. Protein immobilization on Ni(II) ion patterns prepared by microcontact printing and dip-pen nanolithography. *ACS Nano.* 2010;4(2):1083–1091.
20. Castro-Hinojosa C., Del Sol-Fernández S., Moreno-Antolín E., Martín-Gracia B., Ovejero J.G., de la Fuente J.M., Grazú V., Fratila R.M., Moros M. A simple and versatile strategy for oriented immobilization of His-tagged proteins on magnetic nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* 2023;34(12):2275–2292.
21. Zandarashvili L., Langelier M.F., Velagapudi U.K., Hancock M.A., Steffen J.D., Billur R., Hannan Z.M., Wicks A.J., Krastev D.B., Pettitt S.J., Lord C.J., Talele T.T., Pascal J.M., Black B.E. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science.* 2020;368(6486):eaax6367.
22. Lobanova A.A., Korovina A.N., Koshkina D.O., Chernikova P.A., Feofanov A.V., Studitsky V.M., Nilov D.K., Maluchenko N.V. Gel electrophoresis as a method for classifying inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2024;79(4):239–245.
23. Langelier M.F., Steffen J.D., Riccio A.A., McCauley M., Pascal J.M. Purification of DNA damage-dependent PARPs from *E. coli* for structural and biochemical analysis. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Methods in Molecular Biology*, vol 1608. N.Y.: Humana Press; 2017:431–444.
24. Koshkina D., Maluchenko N., Nilov D., Lyubitelev A., Korovina A., Pushkarev S., Armeev G., Kirpichnikov M., Studitsky V., Feofanov A. Non-classical H1-like PARP1 binding to chromatosome. *Cells.* 2025;14(17):1309.

Поступила в редакцию 01.07.2025

После доработки 07.10.2025

Принята в печать 07.10.2025

RESEARCH ARTICLE

Ni-NTA bead-based real-time monitoring of PARPs inhibitor binding

A.A. Lobanova^{1,*}, A.A. Saulina¹, O.V. Geraskina², D.O. Koshkina¹ ,
N.V. Maluchenko¹ , A.V. Feofanov^{1,2} , V.M. Studitsky³ 

¹School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

This study establishes a real-time fluorescence microscopy platform for visualizing ligand binding dynamics to His-tagged proteins bound to Ni-NTA agarose beads. By preserving solution-phase kinetics while enabling sub-minute temporal resolution in physiological buffers, the methodology overcomes critical limitations of surface-based techniques and gel electrophoretic methods. We applied this platform to investigate inhibitor action within a nucleosomal system, a more physiologically relevant context than free DNA. Through studies of PARP2-nucleosome interactions modulated by clinical inhibitors (talazoparib, veliparib) and by reaction of poly(ADP-ribosyl)ation in the presence of NAD⁺, we demonstrate direct spatial and temporal resolution of chromatin-protein dynamics. The platform's virtually unlimited buffer compatibility, real-time monitoring capabilities, and elimination of covalent immobilization artifacts provide transformative insights into drug mechanisms and chromatin engagement processes.

Keywords: Ni-NTA-agarose beads, PARP2, PARP inhibitors, nucleosomes

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 21-64-00001-p.

Информация об авторах

Лобанова Ангелина Андреевна — инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Саулина Александра Александровна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: lys-alex-bio-msu@yandex.ru

Гераськина Ольга Вячеславовна — науч. сотр. Института биологии гена РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olgasamsonova@yandex.ru

Кошкина Дарья Олеговна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8137-4685>

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.112.083

Оптимизация получения рекомбинантной поли(АДФ-рибоза) полимеразы 3 человека

Е.А. Волкова^{1, *}, А.Н. Коровина^{1, **} , Н.В. Малюченко¹ , В.М. Студитский^{1, 2} ¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

**e-mail: anna.korovina@gmail.com

PARP3 (Poly(ADP-ribose) polymerase 3), наряду с другими членами семейства PARP — PARP1 и PARP2, является важным фактором репарации ДНК. Специфические функции и молекулярные механизмы действия этого белка изучены недостаточно. Разработка надежного протокола получения PARP3 с высокой чистотой и выходом представляет собой необходимое условие для всестороннего анализа белка, в том числе изучения его связывания с ДНК, ферментативной активности, взаимодействий с другими белковыми факторами, а также структурных исследований. В данной работе представлен модифицированный протокол экспрессии белка PARP3 человека в клетках *Escherichia coli* и его последующей очистки, позволяющий существенно увеличить выход белка по сравнению с ранее опубликованными методиками.

Ключевые слова: PARP3, рекомбинантный белок, очистка белка, Ni²⁺-сефароза, гепарин-сефароза, хроматография, *E. coli*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-12

На сегодняшний день известно 17 представителей семейства поли(АДФ-рибоза) полимераз (PARP) человека [1, 2], наиболее изученной из них является PARP1. Она имеет наибольшую молекулярную массу среди белков семейства (113 кДа) и отличается наличием трех доменов цинковых пальцев, связывающих ДНК [3]. PARP1 локализуется в ядре и характеризуется высоким уровнем экспрессии — до миллиона копий на клетку. Она участвует в широком спектре клеточных процессов: от базовой эксцизионной репарации оснований до регуляции апоптоза и устойчивости к генотоксическому стрессу [3–5]. Молекулярная масса PARP2 составляет 65 кДа, она не содержит цинковых пальцев и домена BRCT. Ее функции схожи с функциями PARP1, и долгое время она рассматривалась как его функциональный дублер [3]. Оба этих фермента осуществляют модификацию, известную как поли-АДФ-рибозилирование — присоединение длинных цепей АДФ-рибозы к ДНК или белковым мишеням, включая аминокислотные остатки собственной полипептидной цепи [6].

Структура PARP3 близка к структуре белка PARP2. Она включает короткий N-концевой неструктурированный домен, домен WGR (Trp-Gly-

Arg) и C-концевой каталитический домен (CAT), который подразделяется на спиральный домен (HD) и складку АДФ-рибозилтрансферазы (ART) [7]. До недавнего времени PARP3 относили к группе вспомогательных ферментов, дублирующих функции PARP1 и PARP2, но было показано, что она обладает особыми свойствами — осуществляет исключительно моно-АДФ-рибозилирование (МАРилирование) и проявляет высокую специфичность по отношению к определенным структурам ДНК [4].

Все больше данных свидетельствует о том, что PARP3 является необходимым регулятором в ряде клеточных процессов. Недавно было установлено, что PARP3 участвует в регуляции выбора пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК, а именно способствует подавлению гомологичной рекомбинации и направляет клетку по пути классического негомологичного соединения концов (classical non-homologous end joining, c-NHEJ) [8, 9]. Таким образом, PARP3 представляет собой не просто «молекулярный дублер» других белков семейства, а самостоятельный, критически важный регуляторный элемент ответа на повреждение ДНК.

Для формирования более глубокого понимания механизмов действия PARP3, включая его взаимодействие с ДНК и хроматином, необходим высокочистый, стабильный белковый препарат, пригодный для биохимических и структурных исследований. В литературе описаны различные протоколы получения PARP3 человека с выходом не более 2 мг с 1 л клеточной культуры [10, 11]. Настоящая работа посвящена оптимизации протокола экспрессии и очистки рекомбинантного PARP3 человека с целью получения белка с высоким выходом и с сохранением активностей.

Материалы и методы

Данная методика основана на опубликованном ранее методе экспрессии и очистки белка PARP3 с модификациями [10].

Получение экспрессионной плазмиды. Ген PARP3 человека амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, содержащих сайты рестрикции *NdeI* и *XhoI*:

hPARP3 forward *NdeI*: gattaCATATGGCTCCA AAGCCGAAGCCCTGG,

hPARP3 reverse *XhoI*: gccaatCTCGAGTCAGA GGTGGACCTCCAGCAGGTAGCGCAG.

Матрицей служила кДНК, полученная из РНК макрофагов крови человека.

Амплификацию проводили с помощью полимеразы Q5 в следующем режиме ПЦР: 30 с предварительной денатурации при 98°C, 34 цикла: денатурация в течение 10 с при 98°C, отжиг праймеров в течение 10 с при 72°C, элонгация в течение 50 с при 72°C. Дополнительная элонгация длилась 2 мин при 72°C. Продукт реакции был очищен с помощью стандартного коммерческого набора. Концентрация полученного фрагмента ДНК, кодирующего белок PARP3, составляла > 400 нг/мкл.

Вставку и вектор *pET-15b*, кодирующий гексистиридиновый фрагмент на 5'-конце вставки, обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *XhoI*, очищали с помощью коммерческого набора, затем обрабатывали Т4-лигазой в течение ночи при 4°C. Продукт реакции трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL10 Gold.

Селекцию клонов проводили с помощью ПЦР-скрининга с праймерами к плазмиде (T7lac) и целевому гену (hPARP3 reverse *XhoI*). Из клонов, содержащих вставку, выделяли плазмиды с помощью коммерческого набора и секвенировали их по Сэнгеру (центр коллективного пользования «Геном», Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН).

Плазмиду, кодирующую ген PARP3 без изменений относительно описанной в литературе последовательности, использовали для экспрессии белка.

Экспрессия белка PARP3. Для получения белка PARP3 использовали штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

pLysS. Бактерии трансформировали плазмидой pET-15b-PARP3 методом электропорации. Колонии выращивали в течение ночи на чашке с LB-агаром в присутствии 150 мкг/мл ампициллина и 35 мкг/мл хлорамфеникола, далее переносили в жидкую среду LB с теми же антибиотиками и 1% глюкозы и выращивали при 37°C в течение ночи. Полученную культуру переносили в соотношении 1:100 по объему в свежую среду LB с 150 мкг/мл ампициллина и инкубировали до оптической плотности OD₆₀₀ ~ 0,8–0,9. Для подавления аутоМАРилирования PARP3 в питательную среду добавляли ингибитор бензамид. Экспрессию белка индуцировали 0,5 или 1 мМ изопропил-бета-галактопиранозидом при температурах 16°C, 18°C или 30°C в течение 5 или 18 ч. Далее клеточную культуру осаждали центрифугированием при 3400 g в течение 30 мин, промывали фосфатно-солевым буфером и хранили при –80°C.

Для оценки содержания целевого белка в растворимой фракции после экспрессии в разных условиях измеряли оптическую плотность клеточной культуры до и после индукции. Аликвоты клеточной культуры объемом 1 мл осаждали, лизировали в мягких условиях в объеме буфера пропорциональном оптической плотности данного образца, центрифугировали 10 мин при 10000 g и наносили на 10%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) супернатант для определения эффективности выхода белка в раствор.

Выделение и очистка PARP3. Все стадии выделения и очистки проводили при 4°C.

Клеточную культуру размораживали и ресуспендировали в буфере для лизиса (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 М NaCl; 0,5 мМ трихлорэтилфосфат (TCEP); 1 мМ фенилметансульфонилфторид; 10 мМ бензамид; 0,7 мкг/мл пепстатин А; смесь ингибиторов протеаз). Клетки разрушали ультразвуком (импульс:пауза – 1:1,5, 1–20 мин) и гомогенизировали при высоком давлении с помощью френч-пресса. Лизат центрифугировали (18000 g, 1 ч, 4°C), полученный осветленный лизат пропускали через фильтр с диаметром пор равным 0,22 мкм.

Очистку PARP3 проводили в три этапа с использованием хроматографической системы AKTA Purifier (GE, США) методами металл-аффинной хроматографии, хроматографии на гепариновом носителе и гель-фильтрации.

Перед очисткой белка колонку с Ni²⁺-сефарозой для металл-аффинной хроматографии HiTrap Chelating HP (GE Healthcare, США) заполняли буфером для лизиса без бензамида и ингибиторов протеаз (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 М NaCl; 0,5 мМ TCEP). Осветленный лизат пропускали через колонку со скоростью 2,5 мл/мин и далее последовательно промывали ее буфером №1 (25 мМ HEPES pH 8,0; 500 мМ NaCl; 0,5 мМ TCEP; 20 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин А; смесь

ингибиторов протеаз), буфером №2 (25 мМ HEPES pH 8,0; 1 М NaCl; 0,5 мМ TCEP; 20 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин А; смесь ингибиторов протеаз) и повторно буфером №1. PARP3 элюировали буфером, содержащим 250 мМ имидазола (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 М NaCl; 0,5 мМ TCEP; 250 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин А; смесь ингибиторов протеаз). Элюат анализировали в 10%-ном ПААГ, целевые фракции объединяли и разбавляли в 10 раз буфером без соли (50 мМ Tris-HCl, pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА).

Колонку с гепарин-сефарозой HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, США) уравнивали буфером А (50 мМ Tris-HCl pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА; 50 мМ NaCl). Для связывания PARP3 с колонкой использовали циклическое нанесение в течение 14 ч со скоростью 1 мл/мин. Промывку и элюцию белка проводили в градиенте концентрации соли от 50 мМ до 1 М NaCl (буфер А и буфер Б – 50 мМ Tris-HCl pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА; 1 М NaCl) в течение 60 мин со скоростью 2 мл/мин. Содержание целевого белка во фракциях контролировали по поглощению при 280 нм и анализировали с помощью электрофореза в 10%-ного ПААГ. Фракции с белком объединяли и концентрировали до 0,6 мл.

Финальный этап очистки выполнялся с помощью колонки для гель-фильтрации HiPrep Sephacryl S300 HR (Cytiva, США), уравновешенной буфером S (25 мМ HEPES pH 8,0; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 мМ TCEP). Промывку проводили на скорости 0,5 мл/мин, и собирали фракции объемом 4 мл. Чистоту и гомогенность белка PARP3 анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ. Целевые фракции объединяли и концентрировали. Полученный образец хранили в 40%-ном глицерине при –80°C.

ДНК- и нуклеосом-связывающая активность. Для испытаний ДНК-связывающей активности белка использовали фрагмент ДНК длиной 187 п.н., флуоресцентно-меченный Су3, представляющий собой позиционирующую нуклеосому последовательность 603 (147 п.н.) [12] с удаленными аденозинами до положения 42 до входа в нуклеосому (42А) и двумя линкерами длиной 20 п.н. в начале и конце последовательности.

Последовательность s603 42А:

5'-CCCGGTTTCGCGCTCCCGCCTTCCGTG TGTTGTCGTCTCTCGAGCGTCTAAGT ACGCT TAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAA CCACCGTGCATCGATGTTGAAAGAGGCCCTC CGTCCTTATTACTTCAAGTCCCTGGGGT-3'.

ДНК получали с помощью ПЦР с плазмидой, кодирующей нуклеосомную матрицу, с праймерами:

F_Pr20Cy3_42: 5'-CAAGCGACACCGGCACT GGGCCCGGTTTCGCGC[Cy3-dT]CCC GCCTTC CGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGT-3';

R_Pr20Cy5_425'-GAACCATGATGGGCACT GGGTACCCCAAGGGAAGTAA

TAAGGAC GGAGGGCCTCTTTCAACATCGATG CACGGTGGT-3'.

Очистку полученного ПЦР-продукта проводили в 1,5%-ном агарозном геле с помощью коммерческого набора.

Мононуклеосомы получали ступенчатым диализом нуклеосомной матрицы в присутствии октамера рекомбинантных гистонов человека, как описано ранее [13].

К суспензии Ni-NTA-агарозы добавляли 800 нМ PARP3 и инкубировали 10 мин. Затем к смеси добавляли 50 нМ ДНК-матрицы или нуклеосом (концентрация рассчитана по ДНК) инкубировали 10 мин, промывали и детектировали флуоресценцию с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия) при возбуждении длиной волны 514 нм.

Результаты и обсуждение

Получение белка PARP3. В литературе описано два основных подхода к получению белков PARP, в том числе PARP3. Оверэкспрессию этих белков проводят либо в бакуловирусной системе в клетках Sf9 [14], что позволяет получать белок с посттрансляционными модификациями близкими к характерным для человека, либо в прокариотической системе экспрессии в клетках E. coli, что упрощает получение белка и снижает его стоимость [10, 11]. В данной работе за основу был взят протокол экспрессии в E. coli.

Ген, кодирующий PARP3, содержит кодоны, редкие для E. coli (таблица), что может препятствовать эффективному биосинтезу белка, поэтому экспрессию проводили в штамме E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS.

Для выбора оптимальных условий экспрессию PARP3 проводили в трех температурных режимах: при 16°C в течение 18 ч, как описано ранее [10], при 30°C в течение 5 ч и при 18°C в течение 18 ч. Было показано, что температура мало влияет на общий уровень экспрессии белка, хотя при 18°C он несколько выше, чем при 16°C.

Таблица

Содержание кодонов, редких для E. coli, в гене PARP3 человека

| Аминокислота | Кодон | Число в гене | Доля кодона для данной аминокислоты |
|--------------|-------|--------------|-------------------------------------|
| Arg | AGA | 3 | 0,12 |
| Arg | AGG | 4 | 0,16 |
| Arg | CGG | 6 | 0,24 |
| Ile | ATA | 3 | 0,13 |
| Leu | CTA | 2 | 0,04 |
| Gly | GGA | 5 | 0,15 |
| Pro | CCC | 13 | 0,37 |

Информация получена на сайте https://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html

При этом при изменении температуры индукции наблюдалось изменение количества белка в растворимой фракции. По данным денситометрии в результате экспрессии при 30°C в лизате содержалось около 50% целевого белка (рис. 1А). При экспрессии при 18°C содержание PARP3 составляет около 70% (рис. 1Б) что, вероятно, обусловлено более низкой скоростью биосинтеза при этой температуре, что приводит к более корректному фолдингу и более высокому содержанию белка в растворе. Повышение концентрации индуктора изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) в клеточной культуре с 0,5 мМ до 1 мМ не оказывало влияния на уровень экспрессии и растворимость PARP3. Таким образом, оптимальным условием для препаративной экспрессии PARP3 является инкубация клеточной культуры при 18°C в течение 18 ч в присутствии 0,5 мМ ИПТГ.

Основной метод очистки белков PARP — аффинная хроматография. Часто используют металл-аффинную хроматографию белков слияния PARP с гексагистиридиновым фрагментом на носителях с иммобилизованным Ni²⁺. Также используют способность белков PARP связывать никотинамидную группу, которая входит в состав ингибиторов PARP, представляющих собой производные субстрата НАД⁺. Так, 4В-сефароза ковалентно-связанная через длинный линкер 3-аминобензамидом является высокоспецифичным носителем для аффинной хроматографии PARP1-3 [11]. Однако такой метод требует специальной подготовки носителя. В данной работе использовалась более распространенная металл-аффинная хроматография.

Поскольку очистка белков PARP на Ni²⁺-сефарозе не позволяет получить препарат с достаточной чистотой, используют дополнительный этап доочистки методом гель-фильтрации.

Белки PARP являются ДНК-связывающими, и для получения подходящего для экспериментов

с ДНК препарата необходима очистка от неспецифически связанного ДНК-субстрата. Способность этих белков связывать ДНК позволяет также очищать их от нее с помощью гепарин-сефарозы, сочетающей свойства аффинного и катионообменного сорбента. Гепарин — высокосульфатированный гликозаминогликан, полианионная структура которого имитирует нуклеиновые кислоты. При этом замечено, что аффинность гепарина к белкам PARP не очень высока, и на этой стадии очистки происходят довольно большие потери. В данной работе для улучшения связывания PARP3 с гепарин-сефарозой использовали циклическое нанесение на носитель в течение 14 ч при низкой скорости (рис. 1В), что привело к существенному повышению общего выхода белка. Чистота полученного препарата была достаточно высока, однако для получения белка, подходящего для исследования высокочувствительными методами, стадия доочистки с помощью гель-фильтрации в данном протоколе была сохранена (рис. 1Г).

Использование схемы очистки, состоящей из последовательных стадий металл-аффинной хроматографии, хроматографии на гепарин-сефарозе и гель-фильтрации, на основе протокола [10] с увеличением времени нанесения на гепариновую колонку (рис. 2), позволило повысить выход PARP3 на порядок по сравнению с описанным в литературе — с 2 до 23 мг с литра клеточной культуры — и обеспечить высокую чистоту белка (около 99%).

Таким образом, повышение концентрации ИПТГ с 0,5 до 1 мМ не дало видимого эффекта на уровень экспрессии белка, индукция при 18°C приводила к высокому выходу растворимого белка PARP3, а длительное циклическое нанесение на колонку с гепариновым носителем позволило существенно повысить эффективность связывания PARP3, несмотря на его низкую аффинность к гепарину.

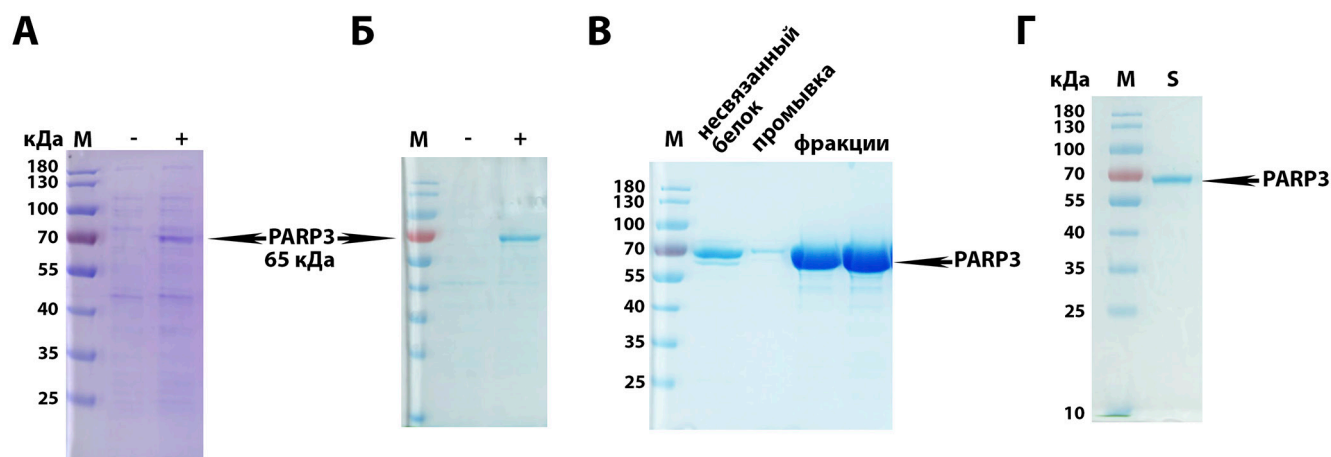


Рис. 1. Получение и очистка белка PARP3: **А** — экспрессия в клетках *E. coli* штамм Rosetta 2 (DE3) pLysS при 30°C, «-» — до добавления ИПТГ, «+» — через 5 ч после добавления ИПТГ, **Б** — экспрессия при 18°C, «-» — до добавления ИПТГ, «+» — через 18 ч после добавления ИПТГ. **В** — хроматография на гепариновом носителе. Количество несвязавшегося с колонкой белка и белка, элюировавшегося при промывке, незначительно. **Г** — финальный препарат PARP3 после гель-фильтрации (S). М — маркер молекулярных весов PageRuler Prestained Protein Ladder.



Рис. 2. Схематическое изображение этапов получения и очистки PARP3 человека.

Связывание PARP3 с ДНК и нуклеосомой.

Функциональная активность полученного препарата была протестирована в экспериментах по связыванию флуоресцентно-меченых СуЗ ДНК и нуклеосом с PARP3, иммобилизованных на по-

верхности Ni-NTA-агарозных микросфер (рис. 3 слева) с помощью флуоресцентной микроскопии. Связывание ДНК (рис. 3 справа сверху) или нуклеосом (рис. 3 справа внизу) с немеченым PARP3 приводит к появлению флуоресцентного сигнала на поверхности частиц носителя.

Заключение

Представлен подробный оптимизированный протокол экспрессии и выделения рекомбинантного PARP3 человека с помощью *E. coli* с использованием металл-аффинной и гепариновой хроматографий, а также гель-фильтрации. Методика обеспечивает высокий выход и качество белка, пригодного для кристаллизации и для структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа и криоЭМ. Полученная PARP3 связывается с ДНК и нуклеосомой, что позволяет использовать ее для детализированных биохимических исследований ее свойств, как элемента хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). Данная работа не содержала экспериментов с участием людей или животных. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

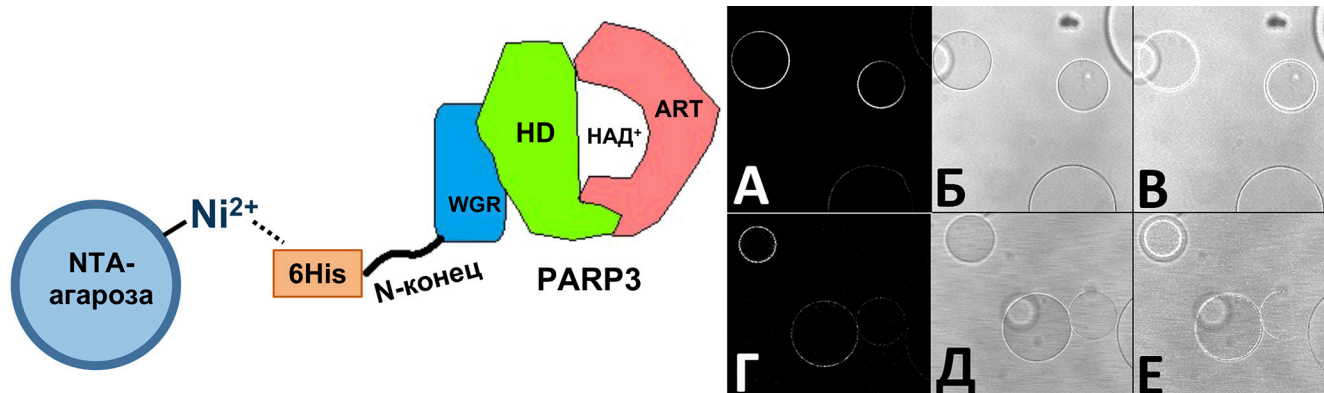


Рис. 3. Связывание PARP3 с ДНК и нуклеосомой. Слева — схема иммобилизации PARP3 на микросферы Ni-NTA-агарозы. Справа — конфокальная микроскопия микросфер с иммобилизованным PARP3: А, Б, В — с ДНК длиной 187 пн (вверху) и Г, Д, Е — с нуклеосомами (внизу). Слева — флуоресценция, в центре — проходящий свет, справа — совмещение двух изображений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Ménessier-de Murcia J., Piel M., Schmit A.C., Apiou F., Vonesch J.L., Kock M., Bornens M., De Murcia G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 2003;116(8):1551–1562.
2. Vyas S., Chesarone-Cataldo M., Todorova T., Huang Y.H., Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat. Commun.* 2013;4(1):2240.
3. Luo X., Kraus W.L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012;26(5):417–432.
4. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA

breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7762–7775.

5. Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z.Q., Schulze-Osthoff K. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: A molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13(3):978–988.
6. Gupte R., Liu Z., Kraus W.L. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.* 2017;31(2):101–126.
7. Van Beek L., McClay É., Patel S., Schimpl M., Spagnolo L., Maia De Oliveira T. PARP Power: A structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(10):5112.

8. Morales J., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2014;24(1):15–28.

9. Rulten S.L., Fisher A.E.O., Robert I., Zuma M.C., Rouleau M., Ju L., Poirier G., Reina-San-Martin B., Caldecott K.W. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell.* 2011;41(1):33–45.

10. Langelier M.F., Steffen J.D., Riccio A.A., McCauley M., Pascal J.M. Purification of DNA damage-dependent PARPs from *E. coli* for structural and biochemical analysis. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Methods in Molecular Biology*, vol. 1608. Ed. A.V. Tulin. N.Y.: Springer New York; 2017:431–444.

11. Amé J.C., Camuzeaux B., Dantzer F., Schreiber V. Purification of recombinant human PARP-3. *Poly(ADP-Ri-*

bose) Polymerase. Methods in Molecular Biology, vol. 1608. Eds. A.V. Tulin. N.Y.: Springer New York; 2017:373–394.

12. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* 1998;276(1):19–42.

13. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Eds. P.M. Wasarman and A.P. Wolffe. Academic Press; 1999:3–19.

14. Grundy G.J., Polo L.M., Zeng Z., Rulten S.L., Hoch N.C., Paomephan P., Xu Y., Sweet S.M., Thorne A.W., Oliver A.W., Matthews S.J., Pearl L.H., Caldecott K.W. PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2BGlu2. *Nat. Commun.* 2016;7(1):12404.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 26.09.2025

Принята в печать 30.09.2025

ORIGINAL RESEARCH

Optimization of recombinant human poly(ADP-ribose) polymerase 3 production

E.A. Volkova^{1,*}, A.N. Korovina^{1,**} , N.V. Maluchenko¹ , V.M. Studitsky^{1,2} 

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

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

*e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

**e-mail: anna.korovina@gmail.com

PARP3 (Poly(ADP-ribose) polymerase 3), like other PARP family members (PARP1 and PARP2), is an important factor in DNA repair. The specific functions and molecular mechanisms of action of this protein remain insufficiently studied. The development of a reliable protocol for obtaining high-purity and yield PARP3 is essential for comprehensive protein analysis, enzymatic activity, including studies of its binding to DNA, interactions with other protein factors, and structural investigations. In this study, we present a modified protocol for the expression of human PARP3 from *Escherichia coli* cells and its subsequent purification, which significantly increases protein yield compared to previously published methods.

Keywords: PARP3, recombinant protein, protein purification, Ni²⁺-sepharose, heparin-sepharose, chromatography, *E. coli*

Сведения об авторах

Волкова Екатерина Александровна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

Коровина Анна Николаевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9240-9054>

Малюченко Наталия Валериевна — канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fcc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.322.4

Структурные особенности каротиноид-связывающих белков

М.М. Сурков¹ , А.Ю. Литовец¹ , А.А. Мамчур¹ ,
Т.Б. Станишневa-Коновалова² , И.А. Ярошевич^{1,*}

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24;

²Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73

*e-mail: iyapromo@gmail.com

Каротиноид-белковые комплексы участвуют в процессах фотосинтеза, фоторецепции, защиты от окислительного стресса, обмена веществ и пигментации. В данной работе проведен детальный анализ доступных структурных данных с атомарным разрешением каротиноид-содержащих белков. В ходе исследования проанализированы молекулярные особенности каротиноид-связывающих областей белков и структурные особенности связанных каротиноидов. Полученные результаты указывают на общие принципы организации белок-каротиноидных взаимодействий, необходимые для разработки новых подходов к их направленной модификации. Методом машинного обучения создана модель для прогноза каротиноид-связывающей активности по первичной структуре белка.

Ключевые слова: каротиноиды, каротинопротеины, белок-лигандные взаимодействия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-13

Введение

Каротиноиды объединяются в самый обширный класс биологических пигментов, который в настоящий момент насчитывает более 1200 представителей, выделенных из семи сотен различных организмов [1]. В природе каротиноиды выполняют разнообразные биологические роли: это эффективные антиоксиданты [1], стабилизаторы фосфолипидных мембран [2], светосборщики и светофильтры [3]. В биотехнологии и медицине они нашли применение в качестве провитаминов [4], предшественников пахучих веществ [5], аллелохимикатов [6], противораковых агентов [7], агентов борьбы с множественной лекарственной устойчивостью [8]. Потенциал использования каротиноидов значительно расширяется при рассмотрении каротиноид-белковых комплексов, особое внимание среди которых уделяется каротинопротеинам — стехиометрическим комплексам каротиноидов и белков, последние характеризуются специфичностью связывания каротиноидов и наличием строго определенного сайта посадки лиганда. На основе таких объектов уже созданы биосовместимые фотопереключателы [9] и температурные сенсоры [10].

Каротиноид-белковые комплексы способны существенно модифицировать физико-химические свойства связанных молекул каротиноидов за счет межмолекулярных взаимодействий [11].

Огромное разнообразие химических структур каротиноидов и широкие возможности направленной модификации белков открывают заманчивые перспективы для синтетической биологии. Однако на данный момент отсутствует общепринятая теория, объясняющая каротиноид-связывающую активность белков. Разработка такой теории могла бы значительно ускорить прогресс в целенаправленной разработке каротинопротеинов и открыть новые возможности для практического применения таких молекул в медицине, сельском хозяйстве, биотехнологии и других сферах.

Предсказать способность белков связывать каротиноиды — сложная задача, поскольку универсальные структурные мотивы, характерные для сайтов связывания, до сих пор не определены. Однако достижения в области вычислительных методов, структурного анализа и понимания белок-лигандных взаимодействий открывают путь к более точным прогнозам. В этой работе на основании структурных данных о каротиноид-связывающих белках, депонированных в международную базу данных RCSB PDB (<http://www.rcsb.org/>) [12], проведен анализ закономерностей их строения, и с помощью методов машинного обучения создана модель для прогнозирования каротиноид-связывающей активности белков по их первичной структуре.

Материалы и методы

Анализ структур PDB. Для формирования набора данных выполнен систематический поиск в базе данных RCSB PDB по списку кодов лигандов, соответствующих каротиноидам (табл. S11). Поиск проводился с использованием API RCSB Search. Для каждой найденной структуры автоматически собрана метаинформация, включая экспериментальный метод, разрешение, таксономические данные и сведения о первичной публикации. Структурные данные для последующего анализа загружены в формате PDBx/mmCIF.

Анализ аминокислотного окружения каротиноидов проводился для двух типов атомов: 1) атомы иононовых колец и их односвязных заместителей (для оценки специфичности вблизи функциональных групп) и 2) все тяжелые атомы лиганда (для оценки общего характера сайта связывания). Атомы шестичленных колец в структуре лиганда идентифицировались автоматически с помощью алгоритмов поиска циклов из библиотеки NetworkX 3.2.1. Аминокислотные остатки белка считались соседними к каротиноиду, если расстояние от любого их атома до соответствующей группы атомов лиганда не превышало 4,5 Å. Поиск соседей осуществлялся с помощью модуля NeighborSearch библиотеки Biopython 1.85.

Для оценки специфичности белкового кармана рассчитана частота встречаемости 20 стандартных аминокислот в окружении лиганда. Далее было вычислено логарифмическое обогащение (Log2) как отношение наблюдаемой частоты встречаемости аминокислоты к фоновой, опубликованной для базы данных Swiss-Prot [13]. Статистическая значимость обогащения/обеднения для каждой аминокислоты оценивалась с помощью точного биномиального теста с последующей поправкой на множественное тестирование по методу Бенджамини-Хочберга (FDR, False Discovery Rate). Общее отклонение аминокислотного состава окружения от фонового распределения проверялось с помощью критерия хи-квадрат (χ^2).

Для детального изучения геометрии π -стекинговых взаимодействий был проведен анализ взаимного расположения иононовых колец каротиноидов и ароматических колец аминокислот (PHE, TYR, TRP). Рассчитывались два ключевых параметра: 1) расстояние между центроидами (геометрическими центрами) колец и 2) угол между нормальными к их плоскостям. Плоскости колец аппроксимировались методом главных компонент (Principal Component Analysis, PCA), где нормаль к плоскости соответствовала вектору, описывающему наименьшую дисперсию координат атомов кольца. Взаимодействия учитывались, если расстояние между центроидами не превышало 7,0 Å.

Все расчеты, обработка данных и статистический анализ были выполнены с использованием

языка программирования Python 3 и библиотек NumPy, pandas, SciPy, NetworkX и Biopython. Для генерации двумерных графиков использовались библиотеки Matplotlib и Seaborn. Трехмерные визуализации сайтов связывания и конформаций лигандов создавались программно с помощью API PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5, Schrödinger, LLC.).

Машинное обучение. В данной работе использовалась дообученная на последовательностях белков модель ProtBERT [14]. В качестве входных данных использована аминокислотная последовательность, в качестве выходных — массив 1024-мерных векторов — по вектору на каждую аминокислоту последовательности. На выходных массивах рассчитаны два вектора для белка в целом: с определением среднего значения и с определением максимального значения. Таким образом, для каждой последовательности получено два 1024-мерных вектора: один отражающий усредненный контекст белка, а другой — отражающий наиболее значимые локальные характеристики. Эти векторы затем использовались для обучения нашей модели.

Для набора позитивных примеров (каротиноид-связывающие цепи) выбраны структуры из Protein Data Bank с разрешенным каротиноидом из целевого списка. Из каждой структуры выделены полипептидные цепи. Цепь обозначалась как каротиноид-связывающая, если хотя бы одна аминокислота в ее составе расположена на расстоянии не более 4,5 Å от каротиноида. Цепи из этих структур, обозначенные как не связывающие каротиноид, использовались нами как «сложные» негативные примеры: зачастую они связывают хлорофиллы и другие гидрофобные молекулы, что хорошо для обучения модели отличать связывание каротиноида от связывания гидрофобных молекул в целом. Из полученного набора данных были исключены последовательности-дубликаты.

В качестве «простых» негативных примеров, необходимых для того, чтобы отличать белки с иной функцией, взяты последовательности белков крысы (*Rattus norvegicus*) из базы SwissProt [15]. Последовательности были кластеризованы с помощью программы CD-HIT [16] с порогом идентичности в 0,9 для дедубликации — из каждого кластера бралась только одна последовательность. Таких последовательностей получилось 3865.

Разделение набора данных на тренировочную и тестовую выборки проведено с учетом артефакта наличия близкородственных последовательностей [17]. Все используемые последовательности кластеризованы программой MMseqs2 [18] с порогом покрытия 0,3 и минимальной идентичностью 0,6, режим покрытия 1 (двунаправленное покрытие). Затем случайным образом отделена валидационная выборка размером 12% от общего количества кластеров. Остальная часть кластеров использова-

лась для тренировки модели. Таким образом, близкородственные последовательности не попадают одновременно и в валидационную выборку, и в выборку для обучения.

В качестве алгоритма машинного обучения был выбран классификатор на основе градиентного бустинга, реализованный в библиотеке CatBoost [19]. После обучения классификатора для исследования качества модели были рассчитаны метрики Precision, Recall, F1, ROC-AUC, также была построена ROC-кривая, precision-recall-F1-кривая. На основании метрики F1 при разных порогах классификатора был выбран наилучший порог.

Учитывая, что негативные примеры в нашем наборе белков могут быть частично неверно размечены из-за неспецифичной, неосновной каротиноид-связывающей активности белков, была рассчитана метрика Precision@k, где $k = 50, 100, 150$, что позволяет оценить ранжирующую способность модели.

Результаты и обсуждение

Анализ структур PDB. В базе данных PDB идентифицировано 626 уникальных структур, содержащих каротиноиды из целевого списка. Аминокислотные цепи разбиты на два типа: контактирующие и не контактирующие с каротиноидами (рис. 1А). Общее число идентифицированных цепей составило более пяти с половиной тысяч, уникальных белковых последовательностей – более двух тысяч (рис. 1Б). Предварительный анализ каротиноид-связывающих белков указывает на то, что зачастую это короткие (рис. S11) последовательности, представленные одной альфа-спиралью в составе больших молекулярных суперкомплексов фотосинтетического аппарата. Анализ метаданных полученного списка указывает на значительное увеличение за последние пять лет темпов определения новых структур, содержащих каротиноиды, причем это ускорение полностью связано с применением методов криоЭМ (рис 1В).

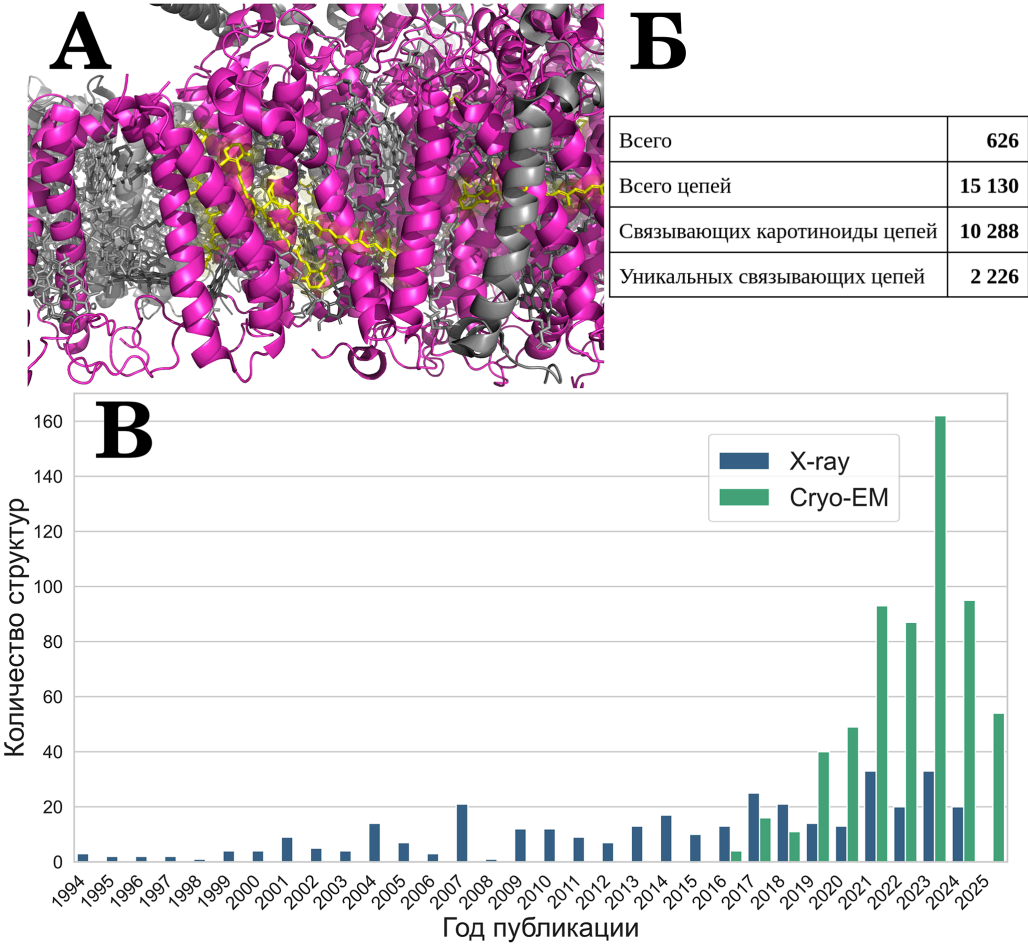


Рис. 1. Общий обзор анализируемых структур. А – Пример структуры, использованной в анализе. Изображен участок суперкомплекса фотосистемы II и светособирающего комплекса II (PDB: 3JCU), желтым отмечены связанные молекулы каротиноида (BCR), фиолетовым – контактирующие с каротиноидами цепи, серым – цепи, не контактирующие с каротиноидами; Б – Число структур, «Всего» – число уникальных pdb id, «Всего цепей» – общее число аминокислотных цепей в списке определенных структур, «Связывающих каротиноиды цепей» – число связывающих каротиноиды цепей, «Уникальных связывающих цепей» – число уникальных связывающих каротиноиды цепей; В – Динамика публикаций структур каротиноид-связывающих белков по годам. Показано распределение по методам определения структуры: рентгеноструктурный анализ (X-ray, синий) и криоэлектронная микроскопия (Cryo-EM, зеленый).

Ввиду того, что подавляющее большинство учтенных структур содержат С40-циклические каротиноиды, которые аналогичны по своим размерам и конформационным свойствам, анализ объединяет структурные наблюдаемые всей выборки без разделения на отдельные классы в зависимости от лиганда. Для полученной выборки структур проведен детальный анализ аминокислотного окружения лигандов и геометрии их взаимодействия с ароматическими остатками. Для кароти-

ноид-связывающих регионов характерен выраженный гидрофобный характер. Наблюдается сильное, статистически значимое обогащение окружения ароматическими (TRP, PHE) и алифатическими гидрофобными (LEU, ILE, VAL, ALA, MET) аминокислотами. Триптофан и фенилаланин стабильно занимают лидирующие позиции по степени обогащения ($\text{Log}_2(\text{Набл./Ожид.}) > 2$), что указывает на их ключевую роль в формировании сайта связывания (рис. 2).

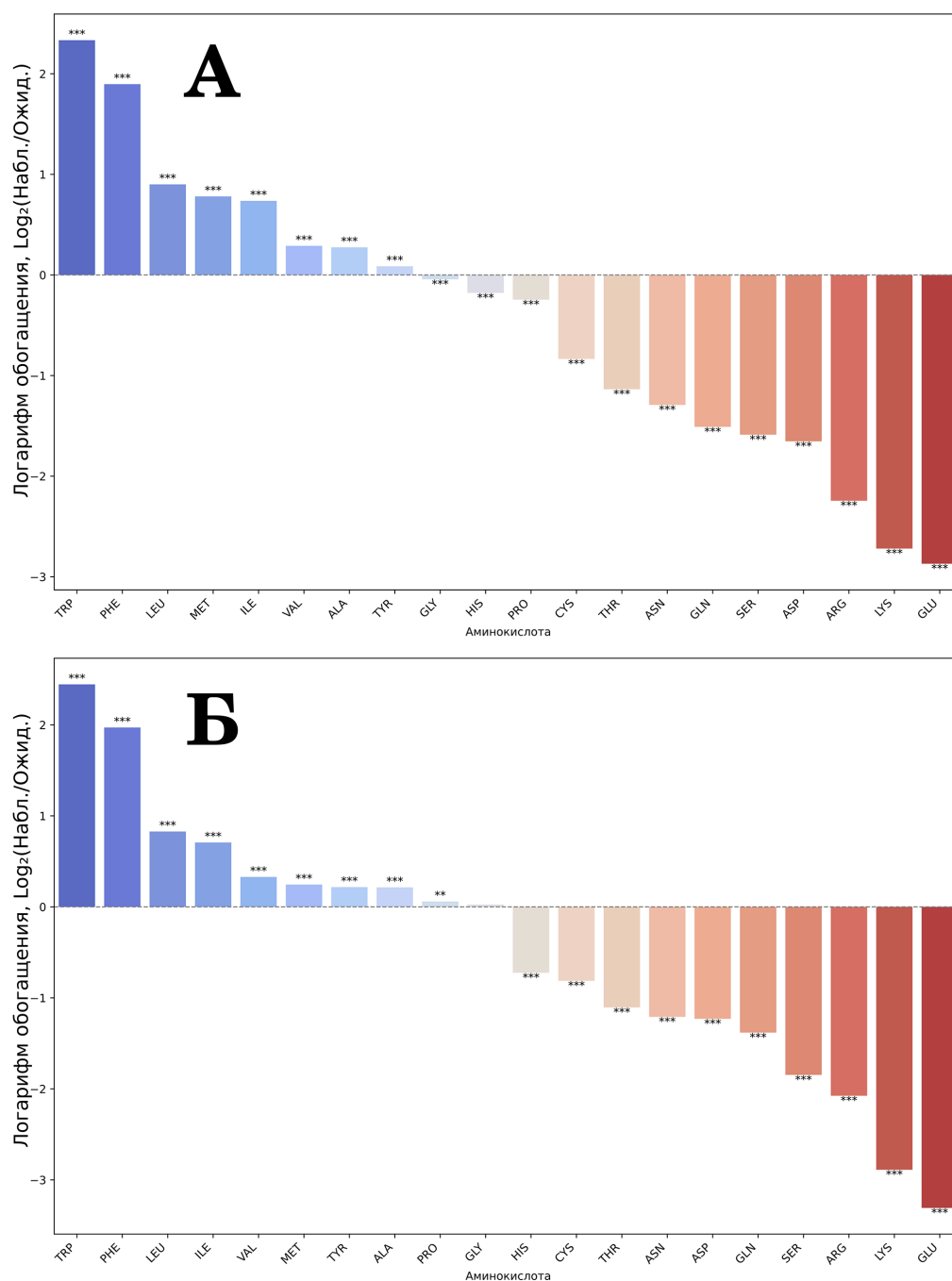


Рис. 2. Аминокислотное обогащение в сайтах связывания каротиноидов. Представлен логарифм отношения наблюдаемой частоты аминокислот в окружении (в пределах 4,5 Å) лиганда к ожидаемой (фоновой). Положительные значения (синие столбцы) указывают на обогащение, отрицательные (красные) – на обеднение. Символ «***» обозначает статистически значимое отклонение, при $p\text{-value} < 0,001$ (скорректированное по методу Бенджамини-Хохберга), символ «**» обозначает статистически значимое отклонение, при $0,01 \leq p\text{-value} < 0,05$ (скорректированное по методу Бенджамини-Хохберга). **А** – обогащение в сайте связывания; **Б** – Аминокислотное обогащение в непосредственной близости (до 4,5 Å) от иононовых колец каротиноидов.

Одновременно с этим наблюдается драматическое обеднение окружения полярными и, в особенности, заряженными аминокислотами. Остатки лизина (LYS), глутамата (GLU) и аргинина (ARG) встречаются на порядки реже, чем ожидалось бы при случайном распределении ($\text{Log}_2(\text{O/E})$ от -5 до -7), что соответствует в 32–128 раз более низкой частоте (рис. 2А).

Полученные данные свидетельствуют об универсальной стратегии связывания каротиноидов. Белок формирует гидрофобный участок, с которым контактирует значительная часть молекулы лиганда. Высокая частота ароматических остатков, вероятно, обусловлена их способностью формировать эффективные Ван-дер-Ваальсовы и π -стэкинговые взаимодействия с сопряженной системой лиганда, обеспечивая как аффинность, так и специфичность связывания.

Для более детального анализа специфичности взаимодействия был отдельно проанализирован состав окружения иононовых колец каротиноида (рис. 2Б), являющихся его наиболее функционально вариабельной частью. Сравнение с общим окружением (рис. 2А) показывает, что общие закономерности сохраняются, однако эффект для большинства аминокислот более выражен. Например, обогащение триптофаном и фенилаланином здесь еще сильнее. Интересное исключение представляют метионин (MET) и тирозин (TYR). TYR показывает умеренное, но значимое обогащение в окружении колец, в то время как его частота в окружении всей цепи ближе к фоновой. Вероятно, это связано со способностью тирозина формировать водородные связи с полярными группами ксантофиллов, которые обычно располагаются на кольцах, что невозможно для PHE и TRP. MET, в свою очередь, показывает высокое обогащение вдоль всей цепи, однако обогащение в области только колец снижено. Это может быть связано с наличием сульфидной группы, которая оказывается менее предпочтительной вблизи иононовых колец и их заместителей.

Анализ различных типов лигандов (рис. SI2) выявляет дополнительные закономерности. Например, для неполярного β -каротина (BCR) характерно наиболее сильное обеднение полярными остатками. В то же время для ксантофиллов, содержащих кето-группы (кантаксантин CRT, астаксантин A86), наблюдается менее выраженное обеднение полярными аминокислотами и даже некоторое обогащение тирозином и гистидином, способными образовывать водородные связи. Это указывает на то, что белки эволюционно адаптируют сайты связывания под конкретные химические свойства каротиноидов.

Для детального изучения геометрии взаимодействий между каротиноидом и ароматическими остатками был проведен анализ взаимного расположения иононового кольца каротиноида и аро-

матических колец аминокислот (PHE, TYR, TRP). Анализ распределения углов между плоскостями этих колец (рис. 3А) показал сильное смещение в сторону перпендикулярных ориентаций. Пик распределения находится в диапазоне 70 – 80° , что характерно для классических Т-образных взаимодействий. Параллельные (stacking) ориентации с углами $< 30^\circ$ встречаются крайне редко.

Распределение расстояний между центроидами колец (рис. 3Б) также оказалось нетривиальным. Основной пик наблюдается на относительно большом расстоянии, около $6,3$ – $6,7$ Å, со вторым плечом в районе $5,5$ – $6,0$ Å. Взаимодействия на близких расстояниях ($< 4,5$ Å), характерных для плотного параллельного стэкинга, практически отсутствуют.

Совокупность этих данных указывает на то, что классический стэкинг не является доминирующим мотивом взаимодействия. Вместо этого ароматические остатки чаще формируют стенки гидрофобного кармана, располагаясь перпендикулярно плоскости иононового кольца лиганда. Такое расположение позволяет максимизировать благоприятные контакты между С-Н группами одного кольца и π -системой другого, что является ключевой особенностью Т-образных взаимодействий. Относительно большие расстояния между центроидами могут объясняться наличием объемных метильных групп на иононовом кольце, создающих стерические препятствия для плотного сближения.

При разделении данных по типам ароматических аминокислот (рис. 3В) выявляются интересные различия. Фенилаланин почти исключительно участвует в Т-образных взаимодействиях ($> 60^\circ$). Тирозин демонстрирует удивительную неспецифичность: его кольцо может быть ориентировано практически под любым углом, с незначительным смещением в сторону перпендикулярных ориентаций. Триптофан показывает бимодальное поведение: он предпочитает Т-образные взаимодействия, но также образует небольшую, но заметную популяцию с параллельной ориентацией (~ 15 – 30°), которая практически отсутствует у PHE.

Это позволяет дифференцировать ароматические остатки по их более специфичным взаимодействиям. Фенилаланин выступает в роли «классического» строительного блока гидрофобного кармана. Уникальная гибкость тирозина, возможно, связана с его способностью формировать Н-связи, что делает точную ориентацию π -системы менее критичной. Двойственный характер триптофана, самого большого ароматического остатка, позволяет ему эффективно участвовать как в формировании стенок кармана, так и, в отдельных случаях, образовывать классические стэкинг-взаимодействия, стабилизируя определенные конформации лиганда.

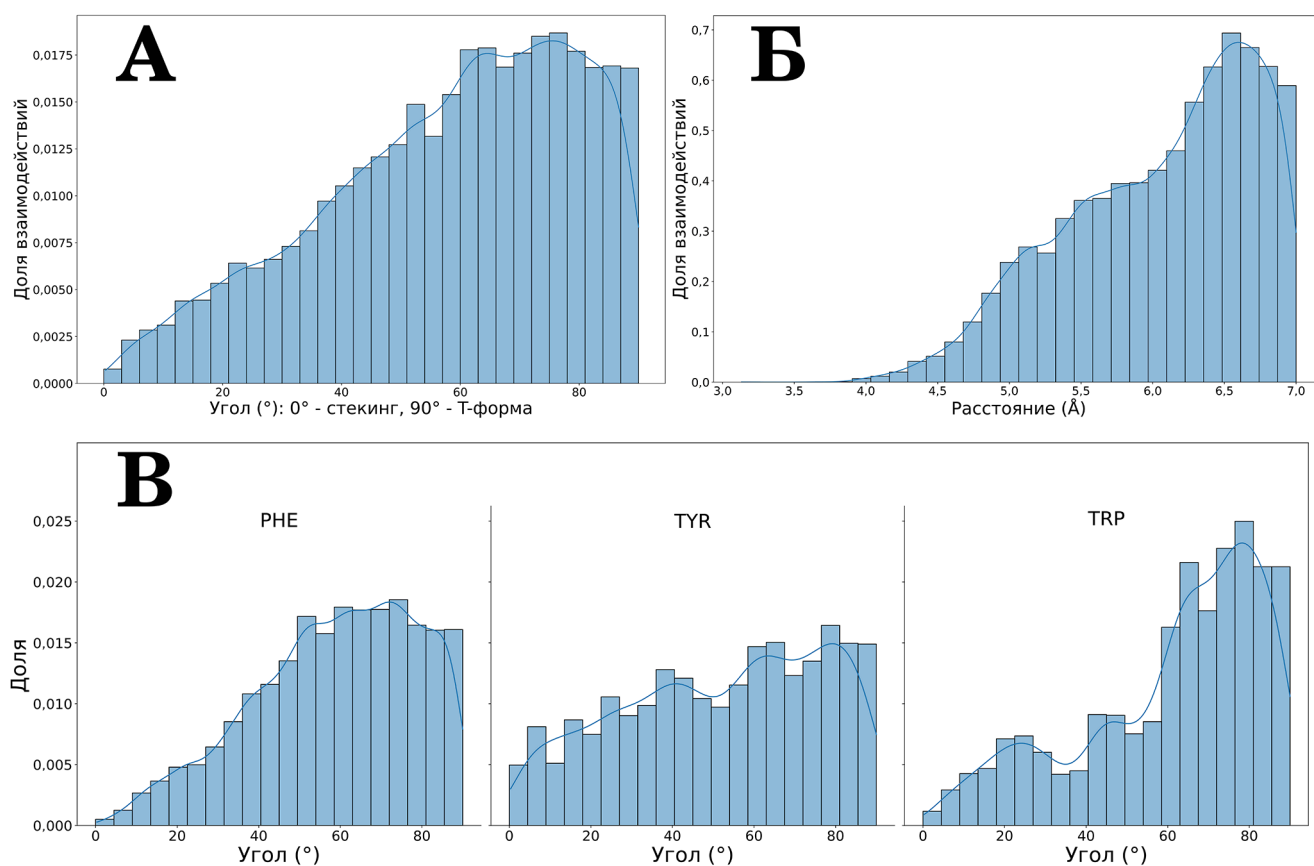


Рис. 3. Геометрические наблюдаемые относительного расположения каротиноида и аминокислотных остатков локального окружения проанализированных структур. **А** – Распределение углов между нормальными к плоскостям иононного кольца каротиноида и ароматического кольца аминокислоты. Угол 0° соответствует параллельной (stacking) ориентации, 90° – перпендикулярной (Т-образной); **Б** – Распределение расстояний между центроидами взаимодействующих иононного и ароматического колец; **В** – Распределение углов взаимодействия (аналогично А) в разрезе по типам ароматических аминокислот: фенилаланин (PHE), тирозин (TYR) и триптофан (TRP).

Проведенный анализ позволил сформулировать несколько общих принципов организации белок-каротиноидных взаимодействий. Во-первых, фундаментальным требованием является наличие гидрофобного кармана, исключающего полярные и заряженные аминокислотные остатки. Во-вторых, стенки этого кармана преимущественно сформированы ароматическими остатками (TRP, PHE), которые создают протяженный каркас для эффективных взаимодействий с сопряженной системой лиганда. В-третьих, геометрия этих взаимодействий в области иононных колец преимущественно перпендикулярна (Т-образна), а не параллельна, что диктует строгие стерические требования к архитектуре сайта связывания. Наконец, в-четвертых, на фоне этих общих правил наблюдается принцип «тонкой настройки»: сайт связывания адаптируется под химические особенности конкретного лиганда, например, за счет введения способных к водородным связям остатков (таких как тирозин) для стабилизации полярных групп ксантофилов. Совокупность этих принципов формирует структурную основу как для высокой аффинности, так и для специфичности каротиноид-белковых комплексов.

Машинное обучение. Подготовленный набор данных включает 6956 вхождений, из которых 1952 являются положительными – каротиноид-связывающими последовательностями. 906 вхождений были определены как тестовые (из них положительных – 271), остальные использовались для обучения.

На основе полученных из модели ProtBERT 1024-мерным векторам по каждой из аминокислот в последовательности были сформированы два 1024-мерных векторных признака для каждого белка (с вычислением среднего и с вычислением максимального значения по последовательности), что позволило получить для белков числовую репрезентацию, на которой обучена классификационная модель градиентного бустинга. Созданная модель оценивает первичную последовательность белка, выдавая для нее выходное значение от 0 до 1. Порог классификации (при достижении которого белок считается связывающим каротиноид) установлен на уровне 0,32, что соответствует максимальной метрике F1. Модель демонстрирует высокую производительность: F1 = 0,77, Precision = 0,72, Recall = 0,83, ROC-AUC = 0,92. Построенные ROC- и Precision-Recall-F1-кривые изображены на рис. SI3A и рис. SI3Б соответственно.

Таблица

Результаты работы созданной модели на ряде белков (с эмпирически известной активностью в отношении связывания каротиноидов): «—» — не связывает каротиноиды, «+» — неспецифическое связывание, «++» — специфическое связывание (основная функция)

| Белок | Выходное значение модели | Эксперимент |
|------------------------|--------------------------|---|
| альфа-казеин | 0,13 | + [20] |
| бета-казеин | 0,19 | + [20] |
| каппа-казеин | 0,32 | + [20] |
| DBXN, цепь А | 0,34 | ++ [22] |
| DBXN, цепь В | 0,54 | ++ [22] |
| DBXN, цепь С | 0,26 | ++ [22] *мало контактов с каротиноидом |
| Aster А | 0,02 | + [21] |
| Изоцитратдегидрогеназа | 0,05 | — |
| Протромбин | 0,01 | — |
| Бета-2 адренорецептор | 0,03 | — |
| Гексокиназа-1 | 0,02 | — |

По рассчитанным метрикам Precision@k (Таблица SI2) видно, что наиболее вероятные по мнению модели каротиноид-связывающие белки действительно в большинстве своем проявляют такую активность. Это говорит о хорошей способности модели ранжировать белки по аффинности к каротиноидам.

Предсказательная сила модели была проверена на отдельном наборе белков: туда вошли альфа-, бета-, каппа-казеины — для них известна способность связывать каротиноиды [20]; недавно открытый новый каротиноид-связывающий белок дибилиноксантин (DBXN, PDB: 9KUE), белок млекопитающих Aster А, для которого также известна каротиноид-связывающая активность [21], а также некоторые белки домашнего хозяйства (таблица). Модель классифицирует как каротиноид-связывающий каппа-казеин и цепи А, В дибилиноксантина при пороге в 0,32. Каппа-казеин действительно описан как казеин с самой сильной аффинностью к бета-каротину среди белков того же семейства; цепи А и В дибилиноксантина имеют больше всего контактов с каротиноидом в структуре. Белки Aster А и альфа, бета-казеины не определены моделью как каротиноид-связыва-

ющие. Альфа-, бета- казеины связывают бета-каротин хуже, чем каппа- — это согласуется с выходными значениями из модели. Возможно, механизм связывания или структурные особенности Aster А сильно отличаются от большинства белков, на которых обучалась модель. Белки домашнего хозяйства правильно определены как не связывающие каротиноиды.

Для улучшения модели необходимо сфокусироваться на нескольких ключевых направлениях: включение большего числа каротиноид-связывающих белков с различными механизмами связывания и из разных семейств (таких, как Aster А и другие); снижение «шумности» негативных примеров; а также включение структурных признаков помимо первичной последовательности белка. Более того, примененные методы агрегации векторных представлений могут быть недостаточно информативными — для преодоления данного недостатка возможно применение механизмов внимания.

В результате нами разработан универсальный подход для быстрой оценки каротиноид-связывающей активности белка по его аминокислотной последовательности. В основе подхода лежит способ числовой репрезентации первичной структуры белка с использованием модели ProtBERT. Числовая репрезентация позволяет использовать классические методы машинного обучения, в нашем случае градиентный бустинг, для классификации последовательности на предмет связывания каротиноидов. Хотя текущая версия модели сталкивается с проблемами при распознавании трудных негативных примеров и некоторых истинных положительных примеров, модель обладает предсказательной силой (верно предсказано наличие аффинности к каротиноидам у каппа-казеина и каротиноид-связывающего белка дибилиноксантина). К тому же, модель способна ранжировать белки по степени каротиноид-связывающей активности. Полученный результат закладывает основу для создания инструментов для разметки белков по аффинности к каротиноидам.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-74-20001 (<https://rscf.ru/project/25-74-20001/>). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yabuzaki J. Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. *Database*. 2017;2017:bax004.
2. Navaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci*. 1998;3(4):147–151.
3. Yaroshevich I.A., Krasilnikov P.M., Rubin A.B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in

photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Comput. Theor. Chem*. 2015;1070:27–32.
4. Tanumihardjo S.A., Palacios N., Pixley K.V. Provitamin A carotenoid bioavailability: What really matters? *Int. J. Vitam. Nutr. Res*. 2010;80(45):336–350.
5. Winterhalter P., Rouseff R.L., Eds. *Carotenoid-derived aroma compounds*. American Chemical Society; Distributed by Oxford University Press; 2002. 323 pp.

6. Sasamoto H., Suzuki S., Mardani-Korrani H., Sasamoto Y., Fujii Y. Allelopathic activities of three carotenoids, neoxanthin, crocin and β -carotene, assayed using protoplast co-culture method with digital image analysis. *Plant Biotechnol.* 2021;38(1):101–107.
7. Sharoni Y., Danilenko M., Walfisch S., Amir H., Nahum A., Ben-Dor A., Hirsch K., Khanin M., Steiner M., Agemy L., Zango G., Levy J. Role of gene regulation in the anticancer activity of carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 2002;74(8):1469–1477.
8. Eid S.Y., El-Readi M.Z., Wink M. Carotenoids reverse multidrug resistance in cancer cells by interfering with ABC-transporters. *Phytomedicine.* 2012;19(11):977–987.
9. Piccinini L., Iacopino S., Cazzaniga S., Ballottari M., Giuntoli B., Licausi F. A synthetic switch based on orange carotenoid protein to control blue–green light responses in chloroplasts. *Plant Physiol.* 2022;189(2):1153–1168.
10. Maksimov E.G., Yaroshevich I.A., Tsoraev G.V., Sluchanko N.N., Slutskaya E.A., Shamborant O.G., Bobik T.V., Friedrich T., Stepanov A.V. A genetically encoded fluorescent temperature sensor derived from the photoactive Orange Carotenoid Protein. *Sci. Rep.* 2019;9(1):8937.
11. Britton G., Helliwell J.R. Carotenoid-Protein Interactions. *Carotenoids*. Eds. G. Britton, S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander. Basel: Birkhäuser Basel; 2008:99–118.
12. Berman H.M. The Protein data bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–242.
13. Shen S., Kai B., Ruan J., Torin Huzil J., Carpenter E., Tuszynski J.A. Probabilistic analysis of the frequencies of amino acid pairs within characterized protein sequences. *Phys. A: Stat. Mech. Appl.* 2006;370(2):651–662.
14. Elnaggar A., Heinzinger M., Dallago C., Rehaw G., Wang Y., Jones L., Gibbs T., Feher T., Angerer C., Steinegger M., Bhowmik D., Rost B. ProfTrans: Toward understanding the language of life through self-supervised learning. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 2022;44(10):7112–7127.
15. The UniProt Consortium, Bateman A., Martin M.J., et al. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res.* 2025;53(D1):D609–D617.
16. Li W., Jaroszewski L., Godzik A. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics.* 2001;17(3):282–283.
17. Teufel F., Gíslason M.H., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R., Winther O., Nielsen H. GraphPart: homology partitioning for biological sequence analysis. *NAR Genom. Bioinform.* 2023;5(4):lqad088.
18. Steinegger M., Söding J. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(11):1026–1028.
19. Dorogush A.V., Ershov V., Gulin A. CatBoost: gradient boosting with categorical features support [Электронный ресурс]. arXiv. 2018. URL: <https://arxiv.org/abs/1810.11363> (дата обращения: 06.07.2025).
20. Shahidi F., Dissanayaka C.S. Binding of carotenoids to proteins: a review. *J. Food Bioact.* 2023;13–28.
21. Bandara S., Ramkumar S., Imanishi S., Thomas L.D., Sawant O.B., Imanishi Y., Von Lintig J. Aster proteins mediate carotenoid transport in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022;119(15):e2200068119.
22. Egorkin N.A., Aleksin A.M., Sedlov I.A., Zhiganov N.I., Bodunova D.V., Varfolomeeva L.A., Slonimskiy Y.B., Ziganshin R.H., Popov V.O., Boyko K.M., Vassilevski A.A., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. A green dichromophoric protein enabling foliage mimicry in arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2025;122(23):e2502567122.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 05.09.2025

Принята в печать 08.09.2025

RESEARCH ARTICLE

Structural features of carotenoid-binding proteins

M.M. Surkov¹ , A.Yu. Litovets¹ , A.A. Mamchur¹ ,
T.B. Stanishneva-Konovalova² , I.A. Yaroshevich^{1,*} 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–24 Leninskie gory, 119234, Moscow, Russia;

²Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–73 Leninskie gory, 119234, Moscow, Russia

*e-mail: iyapromo@gmail.com

Carotenoid-protein complexes play a crucial role in photosynthesis, photoreception, protection against oxidative stress, metabolism, and pigmentation. This study conducts a detailed analysis of structural data with atomic resolution for carotenoid-containing proteins. The research examines molecular features of carotenoid-binding regions and structural characteristics of bound carotenoids. The findings reveal general principles of the protein-carotenoid interface organization, essential for developing new approaches to targeted modification. Additionally, a machine learning model is created to predict carotenoid-binding activity based on the primary protein structure.

Keywords: carotenoids, carotenoproteins, protein–ligand interactions

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 25-74-20001).

Сведения об авторах

Сурков Макар Максимович — студент магистратуры кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: macsurmak.m02@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-5688-8753>

Литовец Андрей Юрьевич — студент кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: litovetsay@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-5329-9796>

Мамчур Александра Александровна — аспирант кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: al.mam4ur@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6025-7663>

Станишнев-Коновалова Татьяна Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: stanishneva-konvalova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8427-8178>

Ярошевич Игорь Александрович — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: iyapromo@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8525-5568>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.2

Структура трансляционного преинициаторного комплекса из экстракта зародышей пшеницы

О.В. Кравченко¹, Ю.М. Чесноков² , Ж.А. Афонина¹ , К.С. Василенко^{1, *} ¹Институт белка, Российская академия наук, Россия, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 4;²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Россия, 123182, г. Москва, пл. Академика И.В. Курчатова, д. 1

*e-mail: kvassil@vega.protres.ru

Преинициаторные рибосомные комплексы, состоящие из 40S субчастицы рибосомы и связанных с ней факторов инициации, являются стандартными компонентами цитоплазмы эукариотических клеток и участвуют в связывании мРНК. Формирование таких комплексов в простейших и в клетках млекопитающих изучалось очень активно, в том числе структурными методами. В данной работе с помощью метода криоэлектронной микроскопии одиночных частиц мы изучили структуру преинициаторных комплексов, выделенных из экстрактов зародышей пшеницы. Было показано, что в экстракте около 29% свободных 40S субчастиц образуют комплекс с факторами инициации 3 и 1A. Была получена карта электронной плотности комплекса со средним разрешением 3 Å, что является первыми известными данными о структуре инициаторных комплексов растений. Была построена предварительная атомная модель фактора инициации eIF3, связанного с 40S субчастицей рибосомы (как ядра, так и дистальных субъединиц) и выявлены заметные структурные отличия от комплексов, выделенных из клеток млекопитающих.

Ключевые слова: трансляционные преинициаторные комплексы, рибосома растений, факторы инициации трансляции

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-14

Введение

Трансляционные преинициаторные комплексы, включающие малую субчастицу рибосомы, являются важными компонентами эукариотических клеток, обеспечивающими начало синтеза белковой цепи. Они содержат белковые факторы, необходимые для подготовки 40S субчастицы рибосомы к связыванию 5'-конца мРНК и к узнаванию инициаторного кодона. Считается, что в цитоплазме эукариотических клеток может присутствовать набор преинициаторных комплексов на разных этапах формирования, различающихся по составу и образующихся как направленно (например, в процессе рециклинга транслирующих рибосом), так и в результате спонтанного связывания факторов инициации 40S субчастицей.

Основным способом получения рибосомных комплексов для биохимического и структурного анализа является их реконструкция *in vitro* из очищенных компонентов. Таким способом были получены 43S комплексы млекопитающих и определена их структура, правда с низким разрешением [1, 2]. Кроме того, данные высокого разрешения о положении основных факторов инициации на 40S суб-

частице рибосомы были получены для инициаторных комплексов, сформированных *in vitro* на мРНК (т.н. 48S комплексов), где антикодоновая шпилька тРНК связана с инициаторным кодоном [3, 4].

В последнее время появились работы, посвященные структурному анализу преинициаторных комплексов, непосредственно выделенных из лизатов эукариотических клеток [5, 6]. Такой подход является многообещающим, однако использование афинных методов очистки приводит к нежелательной высокой специфичности выделения комплексов и к крайне малому их количеству, не всегда достаточному для получения структур высокого разрешения.

В данной работе, для получения преинициаторных комплексов растений, мы использовали альтернативный подход, основанный на связывании очищенных 40S субчастиц рибосомы с концентрированными фракциями высокосолевого S100 экстракта зародышей пшеницы, содержащего факторы инициации трансляции. По сравнению со сборкой из очищенных факторов этот метод имеет то преимущество, что формирование комплекса происходит в присутствии всех, а не только

канонических компонентов. При этом остается возможность модуляции связывания факторов за счет изменения условий инкубации, соотношения компонентов и добавления кофакторов сборки (например, нерасщепляемых аналогов нуклеотидов). Мы показали, что в экстракте существенная часть 40S субчастиц образует комплекс с факторами инициации трансляции 3 (eIF3) и 1A (eIF1A). С помощью метода криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) одиночных частиц была проведена реконструкция карты электронной плотности этого комплекса и построена его предварительная атомная модель.

Материалы и методы

Получение преинициаторных комплексов. Экстракт зародышей пшеницы был получен в соответствии с методикой, описанной ранее [7], из озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта «Амир 2». Оптическая плотность экстракта на 260 нм составила 300 ОЕ. Экстракт был переведен в высокосолевые условия путем диализа против буфера, содержащего 0,5 М KCl. Все операции проводились на льду или при 4°C. Рибосомную фракцию осадил центрифугированием в настольной ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США) при 400000 g. Из осадка были выделена фракция 40S субчастиц путем ультрацентрифугирования в 5–30% градиенте сахарозы, содержащем 0,5 М KCl. Супернатант 10-кратно сконцентрировали и добавили очищенные 40S субчастицы до концентрации 100 ОЕ/мл, что примерно соответствовало 10-кратному количеству

свободных субчастиц в исходном экстракте. Образец перевели в стандартные солевые условия путем диализа против буфера с 0,1 М K(CH₃COO), осадил фракцию 40S субчастиц и растворили осадок, доведя концентрацию субчастиц до 5 мкМ по спектрофотометрической оценке. До момента использования образец хранился на льду, без замораживания. Перед нанесением на сетки (QF R1.2/1.3, UT, 300 Mesh без углеродного слоя, Quantifoil, Германия) образец разбавляли стандартным буфером до концентрации 0,4 мкМ 40S субчастиц.

КриоЭМ одиночных частиц. Набор данных осуществлялся с использованием криогенного просвечивающего электронного микроскопа Titan Krios 60–300 (ThermoFisher, США) при номинальном увеличении 81000×. После предобработки исходных данных из 8376 отобранных изображений было экстрагировано суммарно 1565993 проекций частиц. После двумерной классификации 240767 проекций частиц были использованы для реконструкции и рефайнмента консенсус-структуры, усредненной по всем частицам, содержащим 40S, с итоговым разрешением 2,84 Å.

Трехмерная классификация проекций частиц на пяти классов показала, что образец представляет собой смесь изолированных 40S субчастиц (классы 1, 2 и 3) и комплекса 40S с фактором инициации eIF3 (классы 4 и 5) (рис. 1А). Для реконструкции структуры преинициаторного комплекса были отобраны проекции из классов 4 и 5 (67864 частиц). Среднее разрешение полученной карты электронной плотности составило 3 Å (рис. 1Б).

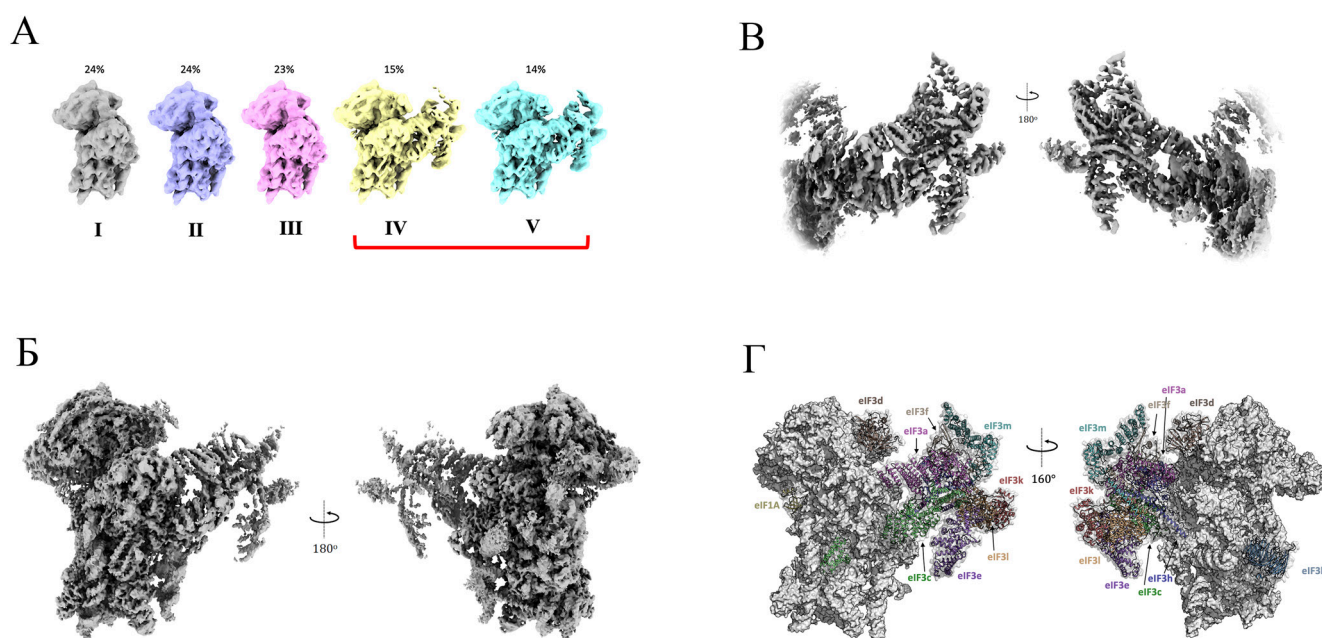


Рис. 1. Реконструкция структуры преинициаторного комплекса. (А) Результат трехмерной классификации проекций частиц, содержащих 40S субчастицу рибосомы пшеницы. Указано процентное содержание частиц каждого класса в наборе; (Б) Реконструкция карты электронной плотности комплекса 40S/eIF3/eIF1A (объединенные классы 4 и 5); (В) Результат локального рефайнмента области, соответствующей ядру фактора eIF3; (Г) Ленточное представление атомных моделей структуры субъединиц фактора инициации eIF3 и фактора eIF1A. Отдельные белки выделены цветом.

Дифференциальный анализ карт 40S субчастицы и комплекса позволил выделить фрагменты плотности, соответствующие ядру фактора инициации 3, его дистальным субъединицам и фактору eIF1A, при этом из-за высокой подвижности ядра eIF3 разрешение его структуры было заметно хуже, чем тела 40S субчастицы. Для уточнения структуры ядра фактора eIF3 был проведен локальный рефайнмент с наложением бинарной маски, построенной в программе ChimeraX 1.5 (USCF, США), на соответствующую часть электронной плотности, что позволило увеличить локальное разрешение с 4,8 до 3,6 Å (рис. 1B).

Построение атомной модели преинициаторного комплекса. Предварительные модели субъединиц фактора eIF3 и фактора eIF1A были построены в программе AlphaFold 2 (Google DeepMind, США) и размещены в соответствующих местах криоЭМ-карты как твердое тело с использованием программы ChimeraX 1.5 (USCF, США). Цепи белков были проанализированы и вписаны в карту плотности в программе WinCoot 0.9.8.93 (MRC Laboratory, Великобритания). Полученные модели были подвергнуты нескольким раундам уточнения в программном пакете Phenix 1.20.1-4487 (Lawrence Berkeley Laboratory, США) и ручной коррективки в WinCoot. Для проверки модели использовался инструмент MolProbity из пакета Phenix.

Результаты и обсуждение

Было обнаружено, что в экстракте из зародышей пшеницы существенная часть (29%) свободных 40S субчастиц рибосомы может находиться в составе комплекса с факторами инициации 3 и 1A. Была проведена трехмерная реконструкция

структуры такого комплекса и получена карта электронной плотности со средним разрешением 3 Å. Поскольку подвижное ядро фактора, состоящее из субъединиц eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3k, eIF3l и eIF3m, связанное с противоположной от интерфейса стороной платформы, имеет значительный размер и довольно жесткую структуру, применение к ней метода локального рефайнмента оказалось эффективным и позволило улучшить локальное разрешение соответствующего участка до 3,6 Å (рис. 1B).

Плотности субъединиц, занимающих изолированное от ядра положение на 40S субчастице — eIF3b, eIF3d, и дистальной части eIF3c, хорошо разрешены, особенно области их контакта с 40S субчастицей. Плотность, соответствующая субъединице eIF3j, не наблюдалась в области, которую она занимает в комплексах из клеток млекопитающих [4]. Плотности, соответствующие дистальным субъединицам eIF3g и eIF3i выражены слабо.

Выделенный нами комплекс напоминает по структуре и составу ранний (образующийся в процессе рециклинга) преинициаторный комплекс, выделенный из лизата клеток человека [6]. Однако существенное отличие состоит в том, что из факторов 1-й группы комплекс из млекопитающих включает только фактор инициации eIF1, в то время как комплекс из растений содержит только плотность, по структуре и положению соответствующую фактору инициации eIF1A.

Были построены предварительные атомные модели ядра фактора 3 и дистальных субъединиц (рис. 1Г). Также была скорректирована модель изолированной 40S субчастицы, опубликованная нами ранее [8], в соответствии с изменениями структуры, наблюдаемыми при образовании

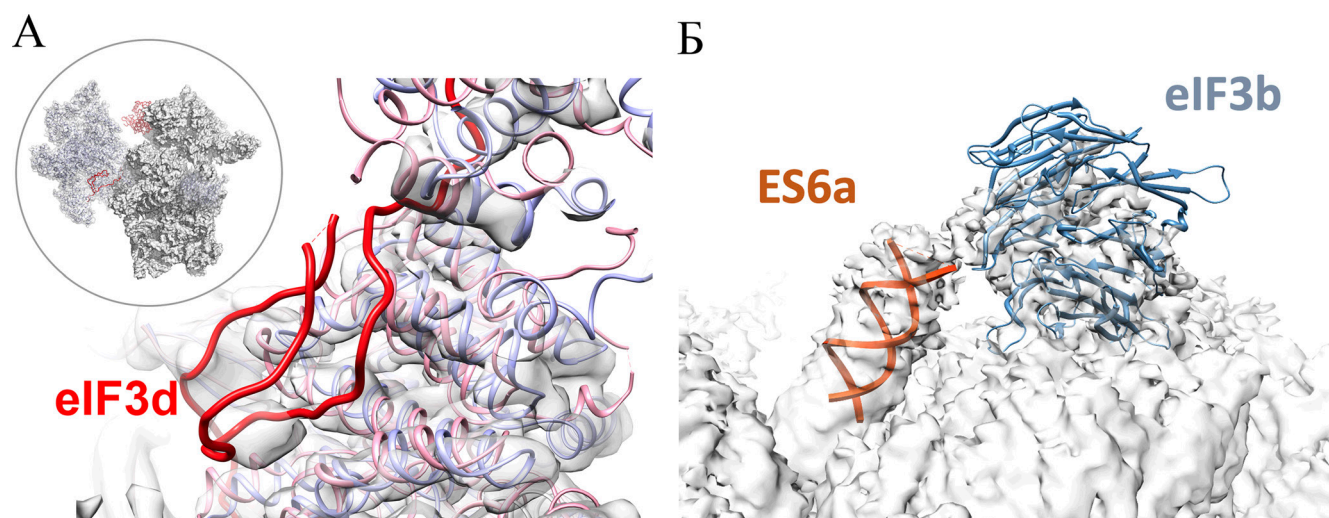


Рис. 2. Особенности структуры преинициаторного комплекса растений. (А) Красным цветом показан N-концевой фрагмент белка eIF3d человека в структуре 48S комплекса [4]. Цепи субъединиц фактора eIF3 пшеницы и человека выделены голубым и розовым цветами соответственно. Серым цветом показана реконструированная электронная плотность комплекса растений. На врезке красным цветом отмечено расположение фактора eIF3d человека в структуре комплекса; (Б) В комплексе пшеницы наблюдается тесное взаимодействие сегмента ES6a 18S рРНК и дистальной субъединицы eIF3b.

комплекса. Расположение и ход цепей хорошо соответствовали опубликованным моделям факторов 3 и 1A, полученным для инициаторных комплексов человека, с учетом разницы в последовательностях и длинах цепей субъединиц. Вместе с тем, в месте контакта ядра фактора eIF3 с телом малой рибосомной субчастицы отсутствует часть электронной плотности наблюдаемая в структуре 48S комплексов человека и отнесенная [4] к подвижной слабоструктурированной N-концевой части субъединицы eIF3d (рис. 2A), ядро которой, находящееся в контакте с головным доменом, обнаруживается в обеих структурах. Возможно, N-концевой фрагмент белка eIF3d уложен в комплексе растений иначе, чем аналогичная цепь в комплексах млекопитающих или имеет более высокую подвижность. Кроме того, из-за низкого локального разрешения в работе Брито Керидо и соавт. [4] отнесение этого фрагмента не может считаться однозначным. Таким образом, хотя эта цепь образует дополнительный мостик между 40S субчастицей и фактором eIF3, она, очевидно, не оказывает критического влияния на их взаимодействие и на формирование комплекса.

Также наблюдаются заметные отличия в положении и стабильности сегмента ES6a 18S рРНК. Во всех известных структурах свободных 40S субчастиц и рибосомных комплексов эукариот этот сегмент очень подвижен, но в полученной нами структуре преинициаторного комплекса растений фрагмент ES6a стабилизирован, и его

положение на субчастице можно определить достоверно. Фрагмент имеет форму «сломанной» РНК-шпильки, апикальная часть которой контактирует с изолированной субъединицей eIF3b (рис. 2B). Эти данные убедительно подтверждают предположение, что взаимодействие с сегментом ES6 вносит вклад в позиционирование и стабилизацию eIF3b на 40S субчастице [9]. Считается, что другая дистальная субъединица, eIF3i, может находиться в контакте с eIF3b, формируя мостик с головным доменом и мРНК. Кроме того, недавно были получены данные в пользу того, что РНК-хеликаза eIF4A также может быть связана с субъединицей eIF3b [10]. Расположение такой группы факторов, обладающих хеликазной активностью, на конце подвижного, но достаточно жесткого сегмента рРНК, возможно, обеспечивает их локализацию возле входа в мРНК-связывающий канал, оставляя необходимые степени свободы для «расплетания» 5'-НТО мРНК. Это может говорить об участии сегмента ES6 в процессе инициации трансляции у эукариот, что делает его очень интересным и многообещающим объектом исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 19-74-20186. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hashem Y., Des Georges A., Dhote V., Langlois R., Liao H., Grassucci R. A., Frank J. Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29. *Cell*. 2013;153(5):1108–1119.
2. Des Georges A., Dhote V., Kuhn, L., Hellen C.U., Pestova T.V., Frank J., Hashem Y. Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. *Nature*. 2015;525(7570):491–495.
3. Eliseev B., Yeramala L., Leitner A., Karup-pasamy M., Raimondeau E., Huard K., Alkalaeva E., Aebersold R., Schaffitzel, C. Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(5):2678–2689.
4. Brito Querido J., Sokabe M., Kraatz S., Gordiyenko Y., Skehel J.M., Fraser C.S., Ramakrishnan V. Structure of a human 48 S translational initiation complex. *Science*. 2020;369(6508):1220–1227.
5. Heuer A., Gerovac M., Schmidt C., Trowitzsch S., Preis A., Kötter P., Berninghausen O., Becker T., Beckmann R., Tampe R. Structure of the 40S–ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2017;24(5):453–460.
6. Kratzat H., Mackens-Kiani T., Ameismeier M., Potocnjak M., Cheng J., Dacheux E., Namane A., Berninghausen O., Herzog F., Fromont-Racine M., Becker T., Beckmann R. A structural inventory of native ribosomal ABCE1-43S pre-initiation complexes. *EMBO J*. 2021;40(1):e105179.
7. Shirokov V.A., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods in Molecular Biology: In Vitro Transcription and Translation Protocols. 2nd edn, Vol. 375*. Ed. G. Grandi. N.J.: Humana; 2007:19–55.
8. Kravchenko O.V., Baymukhametov T.N., Afonina Z.A., Vassilenko K.S. High-resolution structure and internal mobility of a plant 40S ribosomal subunit. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(24):17453.
9. Petrychenko V., Yi S.H., Liedtke D., Peng B.Z., Rodnina M.V., Fischer N. Structural basis for translational control by the human 48S initiation complex. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2025;32(1):62–72.
10. Brito Querido J., Sokabe M., Díaz-López I., Gordiyenko Y., Fraser C., Ramakrishnan V. The structure of a human translation initiation complex reveals two independent roles for the helicase eIF4A. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2024;31(3):455–464.

Поступила в редакцию 02.07.2025

После доработки 24.09.2025

Принята в печать 25.09.2025

SHORT COMMUNICATION

Structure of the translation pre-initiation complex from a plant extract

O.V. Kravchenko¹, Y.M. Chesnokov² , Zh.A. Afonina¹ , K.S. Vassilenko^{1,*} 

¹*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 4 Institutskaya Str., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia;*

²*National Research Center, "Kurchatov Institute," 1 I.V. Kurchatov Sq., Moscow, 123182, Russia*

*e-mail: kvassil@vega.protres.ru

Translation pre-initiation complexes are typical components of the cytoplasm of eukaryotic cells, consisting of 40S ribosomal subunits bound to initiation factors. Actively studied in mammals and protozoa, these complexes are involved in the initiation of mRNA translation. We studied the abundance and structure of plant pre-initiation complexes using single particle cryo-EM analysis of wheat germ extract preparations. It was found that about 29% of free 40S subunits form a complex with the initiation factors eIF3 and eIF1A. The structure of the complex was reconstructed with overall resolution better than 3 Å and the core of factor eIF3 with a resolution of 3.6 Å. These are the first structural data on the structure of initiation ribosomal complex in plants. We constructed the atomic models of the iIF3 core and distal subunits which revealed notable differences from those in mammalian cells.

Keywords: *eukaryotic translation, plant ribosome, pre-initiation complex*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project no. 19-74-20186.

Сведения об авторах

Кравченко Олеся Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы структурных исследований рибосомных белков Института белка РАН. Тел: 8-499-135-20-97; e-mail: olesyak@vega.protres.ru

Чесноков Юрий Михайлович — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Тел: 8-499-196-93-07; e-mail: chessyura@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8365-4699>

Афонина Жанна Аркадьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории механизмов биосинтеза белка Института белка РАН. Тел: 8-496-731-84-21; e-mail: afonina@vega.protres.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4496-0962>

Василенко Константин Станиславович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории механизмов биосинтеза белка Института белка РАН. Тел: 8-496-731-82-32; e-mail: kvassil@vega.protres.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3393-3109>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 578.34+577.22



Реконструкция осевой фибриллы Stx-конвертирующего бактериофага phi24B с помощью криоэлектронной микроскопии

А.В. Моисеенко¹ , М.А. Бубенчиков¹ , И. Чжан^{1, 2} , А.С. Кузнецов³ , А.В. Летаров³ , О.С. Соколова^{1, 2, *}

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

²Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне, Китай, 518172, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1;

³Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Российская академия наук, Россия, 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д. 7, корп. 2

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

Методом криоэлектронной микроскопии была изучена структура осевой фибриллы gp56, части адсорбционного аппарата Stx-конвертирующего фага phi24B. Осевая фибрилла обладает значительной подвижностью, тример gp56 окружен массивным комплексом гексамерного белка сопла gp57, что создает интерфейс несовпадения симметрий и затрудняет построение трехмерной реконструкции. С применением подхода расширения симметрии и локального уточнения ориентаций была получена карта рассеивающего потенциала для осевой фибриллы, визуализирована третичная структура ее глобулярных доменов и определено их расположение относительно белков адсорбционного аппарата phi24B.

Ключевые слова: бактериофаг, криоэлектронная микроскопия, конформационная гетерогенность

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-15

Введение

Бактериофаг phi24B (*Traversvirus tv24B*) — по- довирус из группы Stx-конвертирующих лямб- доидных фагов (Stx-фагов), которые играют важную роль в патогенезе эшерихиозов. Лизогенная кон- версия *Escherichia coli* Stx-конвертирующим фагом превращает бактерию в потенциального проду- цента шигаподобного токсина [1]. Лизогенные по Stx-фагам шигатоксигенные *E. coli* (Shiga toxigenic *Escherichia coli*, STEC) вызывают тяжелые и неред- ко летальные токсикоинфекции, проявляющиеся в виде диареи, геморрагического колита и гемоли- тико-уремического синдрома (ГУС) [2].

Распространенность профагов, родственных phi24B, в геномах STEC, вероятно, обусловлена их способностью распознавать высококонсерватив- ный рецептор *E. coli* — белок внешней мембраны BamA [3]. Однако рецептор-распознающие белки (receptor-binding proteins, RBPs), обеспечивающие взаимодействие с BamA или другими клеточными рецепторами, пока не идентифицированы [4], а структуры адсорбционных аппаратов соответ- ствующих бактериофагов слабо изучены. Особый интерес представляет уникальная архитектура ви- риона phi24B, отличающая его от типичных лямб-

доидных фагов и большинства подовирусов, инфи- циирующих *E. coli* [5, 6].

Одним из основных методов установления структуры бактериофагов является криоэлектрон- ная микроскопия (криоЭМ). С помощью ком- плекса методов анализа отдельных частиц (single particle analysis) [7] получают трехмерные рекон- струкции вирионов и их отдельных структурных компонентов с высоким разрешением, что позво- ляет построить молекулярные модели входящих в их состав белков [8]. В этой работе мы примени- ли криоЭМ для анализа структурной композиции белков адсорбционного аппарата phi24B.

Материалы и методы

Микроскопия в негативном контрасте. Бакте- риофаг phi24B был выделен из лизогенной токси- нопродуцирующей *E. coli* серотипа O157:H7 [9] по отработанной ранее методике [5]. Высокоочи- щенный препарат наносился на сеточку для элект- ронной микроскопии с углеродной подложкой (EMCN, Китай), предварительно гидрофилизиро- ванную тлеющим разрядом на установке EasyGlow (TedPella, США) при остаточном давлении воздуха 0,26 мбар и токе 0,25 мА в течение 30 с. Негативное

контрастирование производилось 2%-ным раствором уранилацетата. Изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония) и электронной камеры Rio 9 (Gatan, США). На основании полученных 1078 изображений был произведен анализ проекций отдельных вирионов и двумерная классификация с помощью программного обеспечения cryoSPARC версии 4.6 [10].

КриоЭМ – получение изображений. Препарат бактериофага наносился на сеточки с перфорированной углеродной подложкой Quantifoil R1,2/1,3, предварительно гидрофилизированные тлеющим разрядом, и замораживался в жидком этане на установке Vitrobot Mark IV (ThermoFisher Scientific, США). Набор данных был получен на криоэлектронном микроскопе Titan Krios (ThermoFisher Scientific, США) при ускоряющем напряжении 300 кВ, дефокусировке объективной линзы в диапазоне от -0,5 до -2,5 мкм при увеличении, соответствующем калиброванному размеру пикселя 0,83 Å на детекторе K3 (Gatan, США). Суммарная доза электронного облучения каждого поля зрения не превышала 55 $e^-/\text{Å}^2$.

КриоЭМ – построение карты плотности. С помощью криоэлектронного микроскопа Titan Krios мы получили набор изображений, содержа-

щий 10038 проекций отдельных вирионов phi24B. Набор данных был обработан с помощью программного обеспечения cryoSPARC [10]. С помощью алгоритма «Homogeneous Refinement» из этих частиц была получена карта плотности для икосаэдрического капсида, которая затем использовалась в качестве опорной для построения реконструкции адсорбционного аппарата бактериофага. Для этого к проекциям частиц капсида применялось расширение симметрии по икосаэдрической группе симметрии (Symmetry Expansion) [11] с последующей трехмерной классификацией на основании маски, включавшей в себя одну из вершин икосаэдрического капсида совместно с прилегающей к ней областью снаружи капсида. Это позволило построить реконструкцию отдельно для вершины капсида, содержащей порталный комплекс и присоединенные к нему белки адсорбционного аппарата. Используя алгоритм «Local Refinement», мы уточнили ориентации проекций и получили трехмерную реконструкцию, симметризованную по группе вращательной симметрии C3 и обладающую разрешением 4,4 Å.

Для построения трехмерной реконструкции плотности осевой фибриллы мы осуществили переход от псевдо-C3 симметрии к C3. Для этого выровненные относительно псевдо-C3-симметризо-

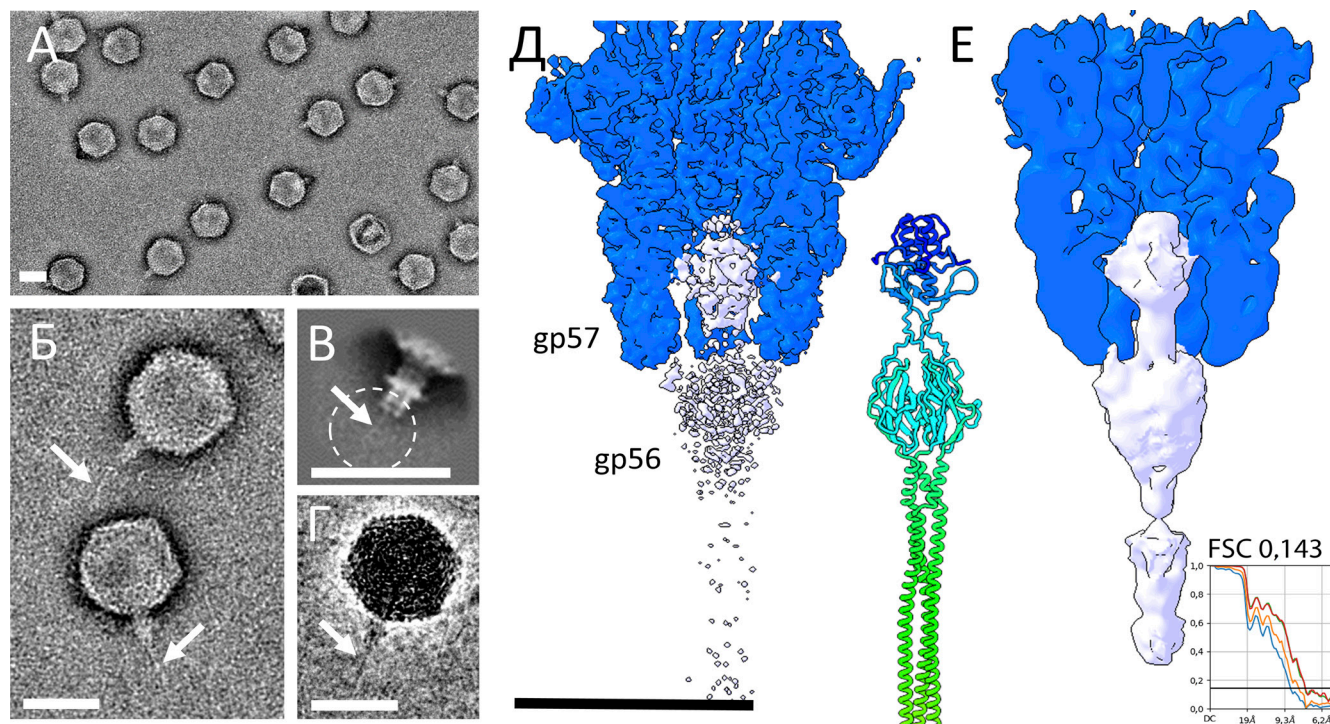


Рисунок. Морфология осевой фибриллы бактериофага phi24B. А – Изображение вирионов phi24B, полученное с помощью просвечивающего электронного микроскопа в негативном контрасте. Б – Нитевидный объект – осевая фибрилла. Обладает значительной подвижностью. В – Характерная двумерная классовая сумма. Подвижная осевая фибрилла практически неразличима. Г – Осевая фибрилла визуализируется на отдельных криоЭМ изображениях только в том случае, если бактериофаг ориентирован хвостом параллельно плоскости льда. Д – Сечение через трехмерную криоЭМ реконструкцию адсорбционного аппарата, обладающую псевдо-симметрией C3. Видно, что в канале, образованном гексамером белка сопла gp57, присутствует неструктурированная плотность, соответствующая осевой фибрилле. Е – Сечение через трехмерную карту плотности, полученную после перехода к действительной симметрии C3. Видна тримерная плотность, соответствующая осевой фибрилле. График корреляции Фурье оболочек (FSC, Fourier Shell Correlation) показывает разрешение 7,3 на отсечке 0,143. Показана молекулярная модель N-концевого фрагмента gp56, построенная с помощью AlphaFold, Масштабный отрезок – 50 нм на А, Б, В, Г и 10 нм на Д, Е.

ванной реконструкции частицы были подвергнуты расширению симметрии с группами симметрии C2 и C6. Получившиеся наборы частиц были расклассифицированы на 10 трехмерных классов, без реориентации частиц, с использованием цилиндрической маски, включающей в себя только область осевой фибриллы. Наилучшего результата удалось достичь при использовании расширения симметрии с группой C6. Из получившихся классовых сумм была выбрана та, что обладала наиболее выраженными тримерными структурами в области осевой фибриллы. Входящие в состав этого класса частицы и соответствующая классовая сумма были использованы для уточнения ориентации частиц (Local Refinement). Общее разрешение полученной реконструкции составило 7,3 Å. Молекулярные модели gp56 и gp57 были подготовлены с помощью AlphaFold 3 [12] на основании белковых последовательностей с кодом NC_027984 в GenBank. Подготовка изображений карт плотности и встраивание молекулярных моделей в карту плотности (Rigid Body Fit) выполнено в ChimeraX [12].

Результаты и обсуждение

Гомогенность и сохранность препарата вирионов phi24B, очищенного по оптимизированной методике [5], была оценена с помощью просвечивающей электронной микроскопии в негативном контрасте (рисунок А). Подавляющее большинство вирионов не имеют каких-либо морфологических особенностей, свидетельствующих о возможных повреждениях. На изображениях отдельных вирионов виден подвижный нитевидный объект, контактирующий с белком сопла (рисунок Б). Мы идентифицировали этот объект как осевую фибриллу gp56, прикрепленную к белку сопла gp57. Подвижность фибриллы хорошо видна как на индивидуальных изображениях (рисунок Б), так и на двумерных классовых суммах (рисунок В). Из-за ограничений микроскопии в негативном контрасте не представлялось возможным реконструировать область связывания белка сопла и осевой фибриллы.

Для реконструкции осевой фибриллы использовали криоЭМ. На этих изображениях, так же, как и на полученных в негативном контрасте, видна осевая фибрилла (рисунок Г). На основе проекций отдельных вирионов была получена трехмерная реконструкция — карта плотности рассеивающего потенциала — для области бактериофага, включающей в себя гексамер белка сопла gp57 и прикрепленный к нему фрагмент осевой фибриллы gp56. Симметризованная относительно оси вращательной симметрии C3 реконструкция имела разрешение 4,2 Å, что позволило однозначно идентифицировать плотность, относящуюся к гексамеру gp57. Однако определить положение gp56 не представлялось возможным. В силу несовпадения симметрий фибриллы и сопла gp57, получившаяся карта плотности обладала псевдо-C3 симметрией, и плот-

ность фибриллы была не структурирована (рисунок Д). Белок gp57 обладает гораздо большей молекулярной массой, чем прикрепленный к нему фрагмент gp56, поэтому рассеивающая плотность от массивного гексамера gp57 доминировала в процессе определения пространственных ориентаций проекций отдельных частиц, а вклад малой плотности gp56 был недостаточным. В результате, в полученной карте плотности корректно были реконструированы только гексамерные структуры. Для того чтобы выявить структуру осевой фибриллы, необходимо было перейти от псевдо-симметрии к действительной симметрии C3.

Для решения этой задачи мы использовали трехмерную классификацию с помощью программного обеспечения cryoSPARC [10] в сочетании с предварительным расширением симметрии. Для этого частицы, выровненные относительно реконструкции с псевдо-симметрией C3, подвергались расширению симметрии C6. Затем производилась трехмерная классификация, сфокусированная на области осевой фибриллы, ограниченной цилиндрической маской. В результате были выделены поднаборы частиц, реконструкции из которых содержали трехмерные структуры. После уточнения ориентаций (Local Refinement) была получена трехмерная реконструкция с общим разрешением 7,3 Å, включающая плотность осевой фибриллы (рисунок Е). Для интерпретации был проведен докинг молекулярной модели gp56, созданной с помощью AlphaFold 3. Доменная организация N-концевых доменов gp56, организованных в тример, хорошо соотносится с полученной нами картой плотности. N-концевой домен gp56 состоит из 65 аминокислот и содержит короткие альфа-спирали, соединенные длинными петлями. Этот домен закреплен в канале, образованном бета-пропеллерными доменами gp57. Домен с аминокислотными остатками 66–165, представляющий собой бета-сэндвич, расположен вне канала сопла, однако он может образовывать контакты с тремя из шести субъединиц gp57. Следующий фрагмент тримера gp56 представляет собой гибкий пучок альфа спиралей, плотность для которого реконструировать не удастся в силу его подвижности и небольшого молекулярного веса.

Заключение

Белок сопла gp57 и белок осевой фибриллы gp56 входят в состав адсорбционного аппарата Stx-конвертирующего бактериофага phi24B. Тример gp56 контактирует с гексамерным gp57 таким образом, что N-концевой домен gp56 расположен в канале, образованном бета-пропеллерными доменами gp57. Бета-сэндвичный домен каждой из трех цепей gp56 формирует контакт с одной из субъединиц gp57. Остальная часть gp56 обладает значительной подвижностью, что не позволяет получить ее трехмерную реконструкцию методом криоЭМ.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 25-24-00110). Исследования методом просвечивающей электронной микроскопии в негативном контрасте проводились на базе оборудования центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни», уникальной научной установки «Трёхмерная электронная микроскопия и спектроскопия». Исследования методом криоЭМ проводились на базе «Kobilka Institute of Innovative Drug

Discovery» Китайского Университета Гонгконга, г. Шэньчжэнь, Китай. О.С. Соколова руководит группой по разработке инновационных лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в университете МГУ-ППИ г. Шэньчжэнь, Китай (2022КСХТД034). И. Чжан благодарит Муниципальное правительство Шэньчжэня и университет МГУ-ППИ в Шэньчжэне за организационную поддержку. Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allison H.E. Stx-phages: Drivers and mediators of the evolution of STEC and STEC-like pathogens. *Future Microbiol.* 2007;2(2):165–174.
2. Beutin L., Martin A. Outbreak of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot.* 2012;75(2):408–418.
3. Smith D.L., Wareing B.M., Fogg P.C.M., Riley L.M., Spencer M., Cox M.J., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Multilocus characterization scheme for shiga toxin-encoding bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(24):8032–8040.
4. Golomidova A.K., Efimov A.D., Kulikov E.E., Kuznetsov A.S., Belalov I.Sh., Letarov A.V. O antigen restricts lysogenization of non-O157 *Escherichia coli* strains by Stx-converting bacteriophage phi24B. *Sci. Rep.* 2021;11(1):3035.
5. Kuznetsov A.S., Moiseenko A.V., Kulikov E.E., Letarov A.V. CryoEM investigation of three-dimensional structure of the Stx-converting bacteriophage phi24B. *Microbiology.* 2024;93(3):349–352.
6. Bubenichikov M., Zhang R., Moiseenko A., Kuznetsov A., Letarov A., Sokolova O.S. Cryo-EM Reconstruction of tail and capsid of Stx bacteriophage Phi24B. *Microsc. Microanal.* 2024;30(Suppl. 1):ozae044.378.
7. Lyumkis D. Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis. *J. Biol. Chem.* 2019;294(13):5181–5197.
8. Ayala R., Moiseenko A.V., Chen T.H., Kulikov E.E., Golomidova A.K., Orekhov P.S., Street M.A., Sokolova O.S., Letarov A.V., Wolf M. Nearly complete structure of bacteriophage DT57C reveals architecture of head-to-tail interface and lateral tail fibers. *Nat. Commun.* 2023;14(1):8205.
9. Allison H.E., Sergeant M.J., James C.E., Saunders J.R., Smith D.L., Sharp R.J., Marks T.S., McCarthy A.J. Immunity profiles of wild-type and recombinant shiga-like toxin-encoding bacteriophages and characterization of novel double lysogens. *Infect. Immun.* 2003;71(6):3409–3418.
10. 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.
11. Goetschius D.J., Lee H., Hafenstein S. CryoEM reconstruction approaches to resolve asymmetric features. *Complementary Strategies to Understand Virus Structure and Function. Advances in Virus Research*, vol. 105. Ed. F.A. Rey. Academic Press; 2019:73–91.
12. Abramson J., Adler J., Dunger J., et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature.* 2024;630(8016):493–500.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 03.09.2025

Принята в печать 05.09.2025

SHORT COMMUNICATION

Cryo-electron microscopy study of the axial fiber of the Stx-converting bacteriophage phi24B

A.V. Moiseenko¹ , M.A. Bubenichikov¹ , Y. Zhang^{1, 2} , A.S. Kuznetsov³ ,
A.V. Letarov³ , O.S. Sokolova^{1, 2, *} 

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

²Faculty of Biology, MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China;

³Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center “Biotechnology,” Russian Academy of Sciences, 7–2 60-letiya Oktyabrya Str., Moscow, 117312, Russia

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

Using cryo-electron microscopy, we studied the structure of the axial fiber protein gp56, a component of the adsorption apparatus of the Stx-converting phage phi24B. The axial fiber is highly mobile, and the gp56 trimer is encased by the bulky hexameric nozzle protein gp57, creating a symmetry-mismatch interface that complicates three-dimensional reconstruction.

By applying symmetry expansion and local orientation refinement, we generated a density map of the axial fiber, visualized the tertiary structure of its globular domains, and determined their positions relative to the other proteins of the phi24B adsorption apparatus.

Keywords: *bacteriophage, cryo-electron microscopy, conformational heterogeneity*

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 25-24-00110.

Сведения об авторах

Моисеенко Андрей Владимирович — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: postmoiseenko@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Бубенчиков Матвей Андреевич — лаборант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; email: wardersarsolid@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-2045-0080>

Чжан Ичен — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: zhangyichen2010@126.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6969-4527>

Кузнецов Александр Сергеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии». Тел.: 8-499-135-72-64; email: alexbluesking@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8016-3760>

Летаров Андрей Викторович — докт. биол. наук, зав. лабораторией вирусов микроорганизмов Института микробиологии имени С.Н. Виноградского, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии». Тел.: 8-499-135-72-64; email: letarov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6991-1983>

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 578.834+578.832+542.8

Исследование холодаадаптированного ослабленного мутанта SARS-CoV-2 методами просвечивающей, криоэлектронной и атомно-силовой микроскопии

Л.В. Кордюкова^{1,*} , А.В. Моисеенко² , Т.С. Трифонова² , А.И. Ахметова³ ,
А.В. Грачева⁴ , Е.Р. Корчевая⁴ , И.В. Яминский³ , Е.Б. Файзулов^{4,**}

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

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

³Физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2;

⁴Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Россия, 105064, г. Москва, Малый Казенный пер., д. 5А

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

**e-mail: faizulov@mail.ru

Одним из традиционных подходов к созданию живых аттенуированных вакцин является холодовая адаптация вируса с получением температурочувствительных (*ts*) мутантов. В настоящей работе мы исследовали морфологические особенности и антигенные свойства ослабленного *ts*-мутанта F-F3 SARS-CoV-2 в сравнении с родительским штаммом FEB2 (Omicron BA.5.2). Просвечивающая электронная микроскопия вируса, инактивированного ультрафиолетовым облучением, не выявила существенных различий в морфологии негативно контрастированных вирусных частиц и S-спайков: вокруг вирионов обнаружена характерная «корона», состоящая из шипов в нативной префузионной конформации. Криоэлектронная микроскопия родительского штамма подтвердила присутствие S-спайков в префузионной конформации, в то время как *ts*-мутанта не исследовали данным методом в связи с недостаточной концентрацией вирионов. Инкубация с иммунными сыворотками против омикрон-подобного штамма выявила образование иммунных комплексов как в случае родительского штамма, так и *ts*-мутанта. Атомно-силовая микроскопия позволила предположить наличие в препарате единичных вирионов, но не выявила характерной «короны» вокруг них. Это может быть связано с хрупкостью S-спайков, разрушаемых в процессе пробоподготовки, либо с маскирующим эффектом агрегатов сывороточного альбумина из культуральной клеточной среды.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, холодаадаптированный (*sa*) мутант, температурочувствительный (*ts*) фенотип, S-белок, криоЭМ, ПЭМ, АСМ

DOI: 10.5959/MSU0137-0952-16-80-3S-16

Введение

Вирус SARS-CoV-2, вызвавший пандемию COVID-19, является оболочечным РНК-содержащим вирусом и принадлежит к виду *Betacoronavirus pandemicum* семейства *Coronaviridae* [1]. Вакцинопрофилактика подобных вновь возникающих инфекций занимает ведущее место в снижении заболеваемости и сдерживании распространения

вируса среди населения. Одним из традиционных подходов к созданию живых аттенуированных вакцин, доказавших свою эффективность, является холодовая адаптация вируса с получением температурочувствительных (*ts*) мутантов [2].

Ранее в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова от пациента с лабораторно подтвержденным

COVID-19 в культуре клеток почки обезьяны Vero CCL-81 был получен штамм SARS-CoV-2 FEB2 (сублиния Omicron BA.5.2) [3]. Видовая и субвидовая таксономическая принадлежность штамма была установлена методом ОТ-ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией) и подтверждена путем полногеномного секвенирования с последующим филогенетическим анализом (GenBank ID OP920753.1). В связи с продолжающейся циркуляцией в мире сублиний варианта Omicron с измененными антигенными свойствами, позволяющими вирусу ускользать от поствакцинального или естественного иммунитета хозяина, нам представилось целесообразным получить холодоадаптированные (*ca*) мутанты омикрон-подобного штамма FEB2 и исследовать их свойства. В настоящей работе мы поставили задачи описать морфологию вирионов в составе разрабатываемой ослабленной живой вакцины и форму S-спайков на поверхности вирионов, а также тестировать иммунные свойства вируса.

Негативное контрастирование препаратов с последующей просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ) является достаточно информативным методом первичного анализа вирусных и вакцинных препаратов, позволяющим следить за морфологией вирусных антигенов [4]. Однако форма вирионов может искажаться из-за поверхностного натяжения при высушивании препарата на сетке. Простейшая криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) позволяет избежать таких побочных эффектов и выявляет как нативную морфологию наружных антигенов, так и тонкую внутреннюю структуру вириона [5]. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) дает возможность довольно быстро получать и анализировать не только 2D-, но и 3D-изображения вирионов [6, 7].

В настоящей работе, используя методы ПЭМ, криоЭМ и АСМ, мы исследовали вирионы в составе родительского Омикрон-подобного штамма SARS-CoV-2 FEB2 (сублиния BA.5.2) [3] и его ослабленного *ca*-мутанта F-F3, обладающего *ts*-фенотипом (неспособностью в отличие от родительского штамма размножаться в культуре клеток при температуре 37°C и выше).

Материалы и методы

Омикрон-подобный штамм SARS-CoV-2 FEB2 (сублиния BA.5.2, GenBank ID OP920753.1) и его *ca/ts*-мутанта F-F3 (GenBank ID PX401966) выращивали в культуре клеток Vero CCL-81 при 37°C и 24°C соответственно, в атмосфере 5% CO₂, контролируя лизис клеток. Инфекционную активность вируса определяли методом титрования по конечной точке цитопатического действия (ЦПД), а концентрацию вирусной РНК оценивали методом количественной ОТ-ПЦР-РВ как описано ранее [3]. *Ca*-мутант F-F3, способный

размножаться при температуре 24°C, был получен в результате проведения 24-х пассажей штамма FEB2 в клетках Vero CCL-81 при постепенно понижаемой температуре (пассажи 1–4 – 37°C, пассаж 5 – 35°C, далее снижение температуры на 1°C на каждом пассажном уровне). Исходно было получено 6 *ca*-клонов вируса FEB2, но не все клоны обладали выраженным *ts*-фенотипом, то есть утратили способность размножаться при температуре 37°C и 39°C. Для дальнейшей работы был выбран клон F-F3, чувствительный к температуре 37°C и выше (таблица).

Таблица

Концентрация вирусной РНК в культуре клеток Vero CCL-81, зараженной родительским штаммом FEB2 или его *ca/ts*-мутантом F-F3 (MOI = 0,001)

| Вирус | 24°C | | 37°C | | 39°C | |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | эксп. 1 | эксп. 2 | эксп. 1 | эксп. 2 | эксп. 1 | эксп. 2 |
| F-F3 | 8,2 | 8,0 | ≤3,0 | ≤3,0 | ≤3,0 | ≤3,0 |
| FEB2 | 4,3 | 4,0 | 8,4 | 9,1 | 7,9 | 7,0 |

* Образцы культуральной жидкости при 37°C и 39°C отбирались через 4 сут после заражения, при 24°C – через 9 сут после заражения. Представлены значения lg копий РНК/мл из двух независимых экспериментов (эксп. 1, эксп. 2).

Вирусосодержащую жидкость, собранную на пике проявления ЦПД, «осветляли» центрифугированием при 4000 об./мин (10 мин, 4°C), отбирали аликвоту для титрования и инактивировали в чашке Петри под бактерицидной ультрафиолетовой лампой «TUV 30W/G30 T8» (Phillips, Нидерланды) (λ = 253,7 нм) в течение 6 мин с регулярным покачиванием. Вирус концентрировали пропусканием через фильтры Amicon Ultra 100 (10 мин, 4500 об./мин), ресуспендировали в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS; pH 7,2), получая содержание инактивированного вируса в препарате, соответствующее титру ~ 7,5–8,5 lg ТЦД₅₀/мл. Аликвоты вируса хранили при –80°C.

Для получения иммунных комплексов исследуемый образец вируса (50 мкл) размораживали, добавляли 3 мкл кроличьей сыворотки против омикрон-подобного штамма, аккуратно перемешивали, инкубировали 1 ч при 37°C и наносили на сетку.

Для негативного контрастирования образец (7 мкл) наносили на медную сетку, покрытую формваром с углеродным напылением (TedPella, США), выдерживали в течение 1 мин; избыток жидкости оттягивали фильтровальной бумагой. Далее наносили 7 мкл 2%-ного водного раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК; pH = 7,0), выдерживали в течение 30 с, избыток раствора удаляли. ПЭМ проводили на микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония).

Для криоЭМ анализа препарат (3 мкл) нанесли на медные сеточки с дырчатой углеродной подложкой Lacey (TedPella, США), предварительно обработанные тлеющим разрядом в установке EasyGlow (TedPella, США). При нанесении препарат выдерживался при температуре 4°C и относительной влажности 95%. Заморозку в жидком этане выполняли 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. Эксперименты 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).

Для выполнения АСМ образец (1 мкл) нанесли на подложку свежесколотой слюды, высушивали и аккуратно промывали дистиллированной водой. АСМ выполняли на установке сканирующей зондовой микроскопии ФемтоСкан в резонансном режиме кантилевером NSG10 на воздухе. Обработка данных проводилась при использовании программного обеспечения ФемтоСкан Онлайн [8].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены микрофотографии негативно контрастированных вирионов омикрон-подобного штамма FEB2 и его *ts*-мутанта F-F3. Популяция вируса включала сферические или овальные частицы с диаметром от 90 до 150 нм, преимущественно окруженные по контуру «коронай» из спайков шиповидного белка. У некоторых вирионов спайки располагались редко или отсутствовали. По данным ПЭМ морфология вирусных частиц и форма S-спайков не различалась между родительским FEB2 (рис. 1А–В, Ж) и мутантным F-F3 (рис. 1Г–Е, З) вариантами вируса. Анализ изображений позволил выявить только спайки S-белка треугольной/бочкообразной формы (flail-like), находящиеся в нативной префузионной (pre-fusion) конформации (рис. 1Ж, З). Ранее в инактивированных препаратах вирионов Ухань-подобных штаммов SARS-CoV-2 мы наблюдали помимо шипов в префузионной конформации также шипы в форме иголок (needle-like), соответствующие конформации «post-fusion» [4, 5]. При этом значительная доля (23–33%) шипов в пост-фузионной конформации наблюдалась после воздействия бета-пропиолактона, в то время как при использовании протоколов с применением ультрафиолетового излучения или формальдегида пост-фузионных

шипов было немного (4 или 5% соответственно) [4]. Отметим, что подготовка препаратов для ПЭМ в предыдущей работе [4] проводилась вне зоны BSL3, поэтому мы не исследовали морфологию контрольных неинактивированных вирионов, сконцентрированных путем ультрацентрифугирования, и не знаем исходного состояния популяции спайков. В настоящем исследовании шипы в пост-фузионной конформации обнаружены не были. Очевидно, более мягкий протокол концентрирования вируса с помощью фильтров Amicon, в сочетании с параметрами ультрафиолетового излучения, использованными в данной работе, не вызывали существенного изменения нативной морфологии S-шипов. Это согласуется с сохранением способности Ухань-подобного штамма Dubrovka, инактивированного ультрафиолетом по той же схеме, что и в настоящем исследовании, вызывать у иммунизированных животных выработку как суммарных, так и вируснейтрализующих антител [9].

И родительский штамм, и *ts*-мутант после инкубации с иммунной сывороткой против омикрон-подобного штамма, образовывали небольшие кластеры частиц (иммунные комплексы) или крупные агрегаты (рис. 1Б, В, Д, Е). Это указывает на сохранение у поверхностных белков (в первую очередь S-белка) *ts*-мутанта, выращенного при не физиологичной температуре 24°C и утратившего способность размножаться при температуре 37°C, антигенных свойств. Такой вывод подтверждается способностью *ts*-мутанта F-F3 при интраназальной иммунизации вызывать у всех иммунизированных золотистых сирийских хомячков сероконверсию с выработкой вируснейтрализующих антител [10].

Отметим, что в S-белке клона F-F3 обнаружены четыре аминокислотные замены: N414K, D742Y, T937S, P940S. Появление замен в S-белке может быть связано как с адаптацией вируса к клеткам обезьяны, так и с культивированием при непривычно низкой для вируса температуре 24°C. Интересна замена N414K, расположенная в рецептор-связывающем домене (RBD, Receptor-Binding Domain) субъединицы S1 [1]. Анализ 3D-структуры RBD и его эволюционной изменчивости у различных штаммов SARS-CoV-2 [11] указывает на стабилизацию «открытой» формы спайка в случае замены K417N (по нумерации S-белка штамма Wuhan, GenBank ID NC_045512.2), располагающейся на интерфейсе между мономерами в тримере, в процессе эволюции штаммов от Ухань-подобного вируса к варианту Бета; та же мутация сохранена и у Омикрон-подобных вирусов (K414N по нумерации S-белка омикрон-подобного штамма FEB2, GenBank ID OP920753.1). Таким образом, в случае *ca/ts*-мутанта F-F3 «обратная» замена N414K (теоретически) может ослаблять средство RBD к рецептору.

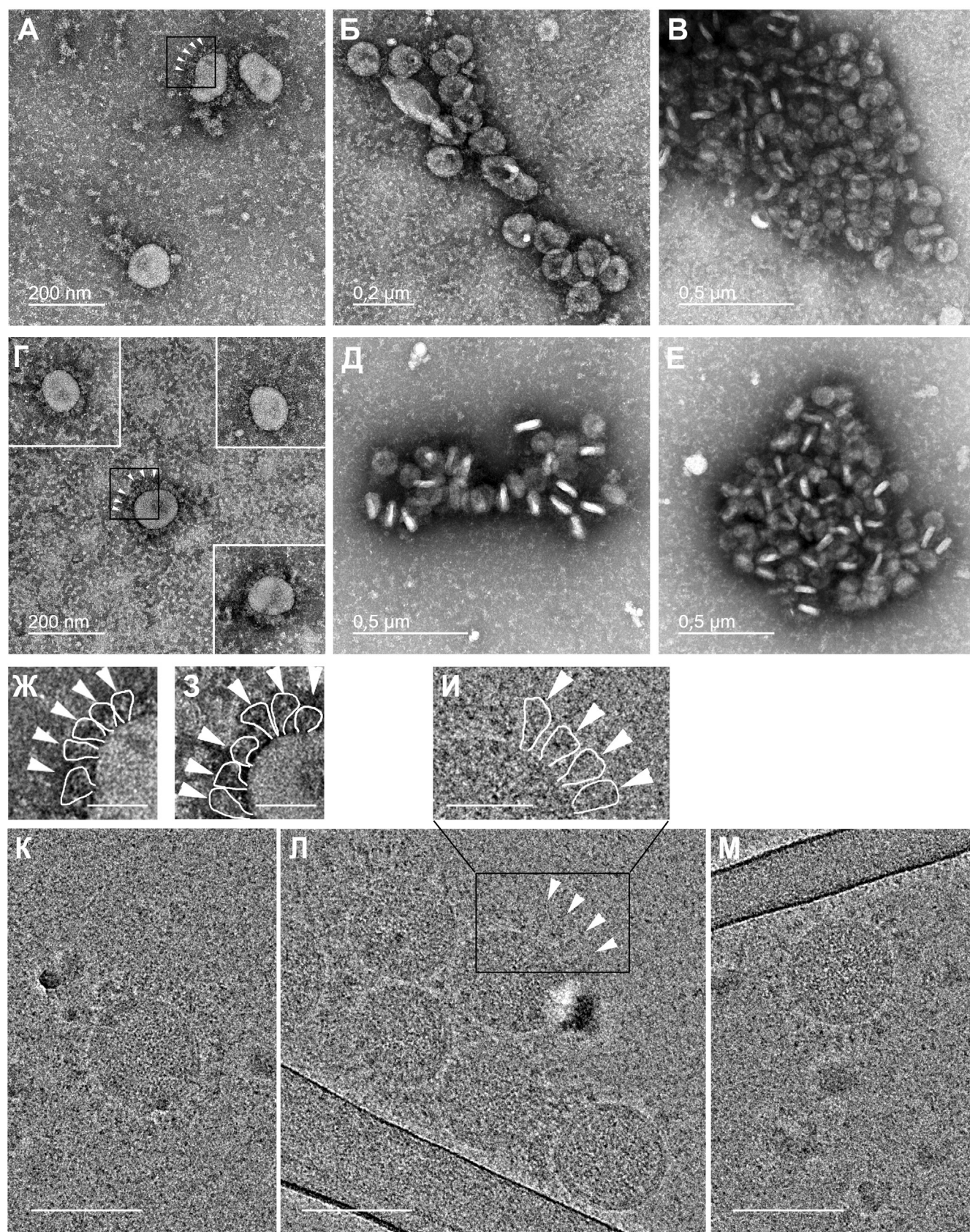


Рис. 1. Морфологический анализ штамма FEB2 (А–В, Ж) и его *sa/ts*-мутанта F-F3 (Г–Е, З) методами ПЭМ и КРИОЭМ изображения FEB2 (И–М).

ПЭМ: (А, Г) – исходные вирионы и их увеличенные фрагменты (Ж, З), выделенные рамками на панелях (А, Г) соответственно; (Б, В, Д, Е) – иммунные комплексы, полученные при инкубации вирионов с иммунной сывороткой против омикрон-подобного штамма. КРИОЭМ: (К–М) – исходные вирионы и увеличенный фрагмент (И), выделенный рамкой на панели (Л). «Корона» вокруг вирионов состоит из S-шипов в префузионной конформации; часть шипов обведена вспомогательным контуром (панели Ж, З, И). Масштабные штрихи: 50 нм (Ж–И); 100 нм (К–М).

В иммунных комплексах помимо сферических вирионов в ряде случаев обнаружены также продолговатые частицы, особенно отчетливо различимые на рис. 1Д и 1Е (мутант F-F3), и в меньших количествах присутствующие на рис. 1В (родительский вирус FEB2). Мы предполагаем, что это могут быть дефектные «пустые» вирионы, сплюснутые давлением со стороны соседних вирусных частиц в агрегате, которые не содержат генетического материала, однако сохранили оболочку со спайками S-белка, реагирующими с антителами при образовании иммунных комплексов. Вероятно, *ca/ts*-мутант F-F3 в условиях его культивирования при 24°C продуцирует больше дефектных частиц, чем родительский штамм FEB2, который выращивают при 37°C.

КриоЭМ-анализ вирионов в простейшей конфигурации (см. Материалы и методы) был выполнен для родительского штамма FEB2 (рис. 1И–М). Липидный бислой визуализируется как четкая двойная линия. Видны вирионы округлой формы, с плотной «коронай» из S-шипов в префузионной

конформации. Форма S-спайков на изображениях, полученных с помощью криоЭМ, хорошо согласуется с данными ПЭМ (рис. 1). Концентрации вирионов *ts*-мутанта F-F3 по данным ПЭМ было недостаточно для того, чтобы предпринимать криоЭМ-анализ данного препарата.

На рис. 2 приведены 2D- и 3D-изображения образцов родительского вируса FEB2 и его *ts*-мутанта F-F3, полученные методом АСМ. В препаратах присутствовало большое количество белковых примесей — предположительно альбумина из культуральной среды, агрегировавшего при пропускании вирусосодержащей жидкости через фильтры Amicon 100 K, и не полностью смывавшихся при подготовке препарата.

Образец родительского вируса FEB2 (рис. 2А, Б) был более однородным, чем препарат F-F3; детектировали единичные вирионы или группы по несколько частиц. Средняя высота вирионов составляла 50–60 нм. Полученные топографические данные хорошо согласуются с данными литературы для вирионов SARS-CoV-2 [12].

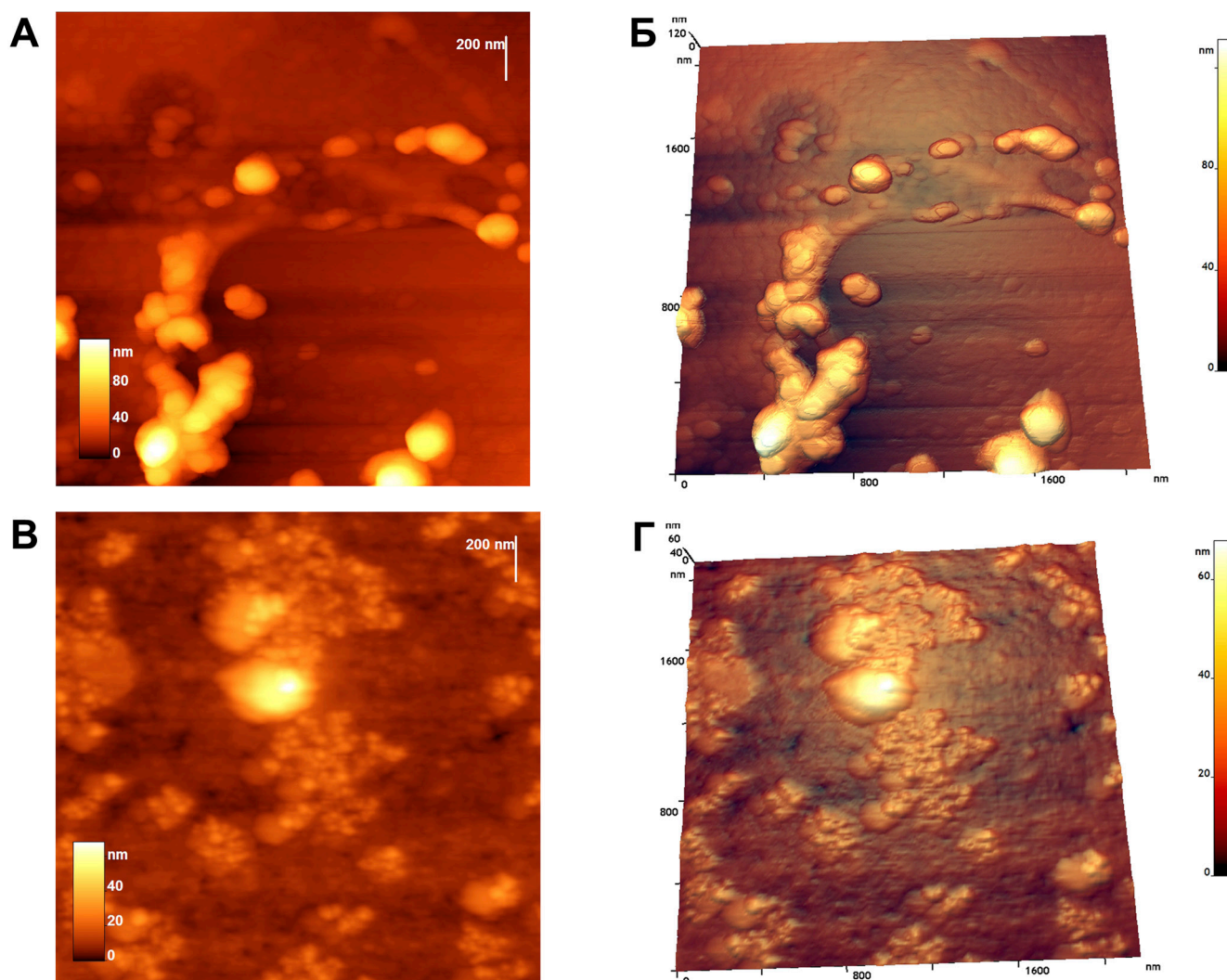


Рис. 2. АСМ родительского штамма FEB2 (А, Б) и его *ts*-мутанта F-F3 (В, Г). (А, В) — 2D-изображения; (Б, Г) — 3D-изображения тех же полей зрения. Детектируются единичные вирионы и группы вирионов в скоплениях из более мелких шарообразных структур — белковых агрегатов (В, Г).

В образце *ts*-мутанта F-F3 видны редкие одиночные вирусные частицы в скоплении примесных белков (рис. 2В, Г). Высота вирионов ~ 50–60 нм; их латеральный размер увеличен за счет агрегатов белка вокруг частицы. Белковые агрегаты визуализируются как скопления шарообразных структур с диаметром ~ 5–20 нм (рис. 2В, Г).

Мы наблюдали сглаженную морфологию вирусных частиц в обоих образцах, но на некоторых вирионах можно заметить характерные выступы, предположительно, S-спайки в виде шарообразных «выростов» на поверхности вирионов. Известно, что спайки коронавирусов довольно хрупкие и могут «обламываться» в процессе пробоподготовки, что затрудняет их визуализацию [4].

Следует отметить, что метод АСМ дает уширенное изображение объектов нанометрового размера примерно на радиус закругления зонда (от 5–10 до 10–100 нм, в зависимости от остроты зонда). Кроме того, подложка из слюды гидрофильна, и вирионы на ней сплющиваются, из-за чего латеральный размер частицы больше, чем ее высота. Вероятно, S-спайки амортизируют воздействие кантилевера, и это тоже может приводить к увеличению латерального размера частиц (до 150–200 нм) на изображениях.

Заключение

Родительский штамм FEB2 (Omicron BA.5.2) SARS-CoV-2 и его *sa*-мутант F-F3, обладающий *ts*-фенотипом, по данным ПЭМ продемонстрировали сходную морфологию. Вирионы с диаметром 90–150 нм довольно плотно окружены S-шипами в префузионной конформации. Шипы в пост-фузионной конформации обнаружены не были. Такая же форма спайков наблюдалась при исследовании родительского штамма методом криоЭМ. Тонкий анализ частиц методом АСМ был затруднен из-за присутствия в препарате большого количества белковых примесей, маскирующих структуру вирионов, но позволил выявить единичные вирионы и их скопления.

Исследования выполнены в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и Научно-исследовательского института вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова и проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kordyukova L.V., Shanko A.V. COVID-19: Myths and reality. *Biochemistry (Mosc.)*. 2021;86(7):800–817.
2. Maassab H.F., DeBorde D.C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. *Vaccine*. 1985;3(5):355–369.
3. Gracheva A.V., Drokov A.O., Smirnova D.I., Khokhlova D.M., Korchevaya E.R., Pankratov A.A., Trunova G.V., Khokhlova V.A., Vorontsova M.S., Leneva I.A., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Virulence and tissue tropism of different epidemiologically significant SARS-CoV-2 variants for golden Syrian hamsters. *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2024;101(4):470–482.
4. 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.
5. Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Timofeeva T.A., Fedyakina I.T. Cryo-electron microscopy of enveloped viruses using an upgraded transmission electron microscope: influenza type A and B viruses and SARS-CoV-2. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2023;78(Suppl. 1):S17–S21.
6. Kiss B., Kis Z., Pályi B., Kellermayer M.S.Z. Topography, spike dynamics, and nanomechanics of individual native SARS-CoV-2 virions. *Nano Lett.* 2021;21(6):2675–2680.
7. Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., et al. Structural characterization of B-PROPIOLACTONE inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.* 2022;85(2):562–569.
8. Yaminsky I., Akhmetova A., Meshkov G. Femtoscan online software and visualization of nano-objects in high-resolution microscopy. *Nanoindustry*. 2018;(6):414–416.
9. 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.
10. Грачева А.В. Вирулентность, иммуногенность и протективная активность холодоадаптированного омикрон-подобного штамма SARS-CoV-2. *Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены*. Екатеринбург: ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора; 2024:35–37.
11. Wrobel A.G., Benton D.J., Roustan C., Borg A., Hussain S., Martin S.R., Rosenthal P.B., Skehel J.J., Gamblin S.J. Evolution of the SARS-CoV-2 spike protein in the human host. *Nat. Commun.* 2022;13(1):1178.
12. Cardoso-Lima R., Santos-Oliveira R., Souza P.F.N., Barbosa L.R.S., Wuite G.J.L., Alencar L.M.R. Physical virology: how physics is enabling a better understanding of recent viral invaders. *Biophys. Rev.* 2023;15(4):611–623.









Поступила в редакцию 27.06.2025

После доработки 26.09.2025

Принята в печать 30.09.2025

SHORT COMMUNICATION

Study of a cold-adapted attenuated SARS-CoV-2 mutant using transmission, cryo-electron and atomic force microscopy

L.V. Kordyukova^{1,*} , A.V. Moiseenko² , T.C. Trifonova² , A.I. Akhmetova³ ,
A.V. Gracheva⁴ , E.R. Korchevaya⁴ , I.V. Yaminsky³ , E.B. Faizuloev^{4,**} 

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

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

³Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 1–2 Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia;

⁴I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5a Maly Kazenny Lane, Moscow, 105064, Russia

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

**e-mail: faizuloev@mail.ru

One of the traditional approaches to the creation of live attenuated vaccines is cold adaptation of the virus to produce temperature-sensitive (*ts*) mutants. In this work, we investigated the morphological features and antigenic properties of the attenuated *ts* mutant F-F3 SARS-CoV-2 in comparison with the parent strain FEB2 (Omicron BA.5.2). Transmission electron microscopy of the virus inactivated by ultraviolet radiation revealed no significant differences in the morphology of negatively contrasted virus particles and S-spikes: a characteristic “crown” consisting of spikes in the native prefusion conformation was found around the virions. Cryoelectron microscopy of the parent strain confirmed the presence of S-spikes in the prefusion conformation, while the *ts* mutant was not studied by this method due to insufficient virion concentration. Incubation with immune sera against an omicron-like strain revealed the formation of immune complexes both in the case of the parent strain and the *ts* mutant. Atomic force microscopy suggested the presence of single virions in the preparation, but did not reveal a characteristic corona around them. This may be due to the fragility of S-spikes destroyed during sample preparation, or to the masking effect of serum albumin aggregates from the culture cell medium.

Keywords: SARS-CoV-2, cold-adapted (*ca*) mutant, temperature sensitive (*ts*) phenotype, S-protein, TEM, cryo-EM, AFM

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University and I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums.

Сведения об авторах

Кордюкова Лариса Валентиновна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. НИИ ФХБ имени 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 — науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Трифорова Татьяна Сергеевна — лаборант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: trf.trifonova@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2042-5244>

Ахметова Ассель Иосифовна — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. физического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-82; e-mail: akhmetovaai@my.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5115-8030>

Грачева Анастасия Вячеславовна — науч. сотр., НИИВС имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-495-917-05-15; e-mail: anastasiia.gracheva.95@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Корчевая Екатерина Романовна — мл. науч. сотр., НИИВС имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-495-917-05-15; e-mail: s.korchevaya@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Яминский Игорь Владимирович — профессор, докт. физ.-мат. наук, физический факультет МГУ. Тел.: 8-495-939-16-82; e-mail: yaminsky@nanoscopy.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8731-3947>

Файзулов Евгений Бахтиерович — канд. биол. наук, зав. лабораторией прикладной вирусологии НИИВС имени И.И. Мечникова. Тел.: 8-495-917-05-15; e-mail: faizuloev@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.29

Роль С-концевого домена Pob3 в разворачивании нуклеосом комплексом FACT: данные электронной микроскопии**О.И. Волох¹ , А.Л. Сивкина^{1, 2} , В.М. Студитский^{1, 3} , О.С. Соколова^{1, 4, *}** ¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²Институт биологии гена, Российская академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;⁴Биологический факультет, Университет МГУ-ППИ в Шэньчжэнь, Китай, 518172, Провинция Гуандун, г. Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, д. 1

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

Шаперон гистонов FACT играет ключевую роль в реорганизации хроматина, обеспечивая АТФ-независимое разворачивание нуклеосом. В состав комплекса уFACT дрожжей входят субъединицы Spt16 и Pob3, образующие гетеродимер, функционально ассоциированный с негистоновым белком Nhp6. В данной работе методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием изучали взаимодействие с нуклеосомой в присутствии Nhp6 комплекса уFACT, содержащего субъединицу Pob3 с удаленным С-концевым доменом (CTD, C-Terminal Domain). В результате удаления CTD эффективность связывания уFACT с нуклеосомой снизилась в два раза и способность к полноценному разворачиванию нуклеосом нарушилась: вместо характерных для дикого типа уFACT почти симметричных, полностью развернутых структур наблюдались асимметричные, частично развернутые. Полученные данные свидетельствуют о ключевой роли CTD Pob3 в обеспечении связывания FACT с нуклеосомой, что важно для понимания механизмов ремоделирования хроматина и регуляции транскрипции.

Ключевые слова: шаперон FACT, CTD-домен Pob3, электронная микроскопия, АТФ-независимое разворачивание нуклеосом, транскрипция хроматина

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-17

Шаперон гистонов FACT участвует во многих важных процессах: репликации, репарации, рекомбинации, инициации и элонгации транскрипции, поддержании функции центромеров и канцерогенезе [1]. FACT занимает особое место среди регуляторов транскрипции благодаря своей уникальной способности обратимо изменять структуру хроматина в отсутствие АТФ, что принципиально отличает его от других известных хроматин-ремоделирующих комплексов [2]. Исследования *in vitro* показали, что FACT также облегчает движение РНК-полимеразы через нуклеосомы, скорее всего путем взаимодействия с ДНК-связывающими поверхностями димера гистонов H2A-H2B [3].

Дрожжевой комплекс уFACT состоит из двух мультидоменных субъединиц Spt16 и Pob3 (рис. 1А), формирующих гетеродимер, функционально ассоциированный с негистоновым белком Nhp6 [4]. Важно отметить, что Nhp6 способен свя-

зываться с кислыми С-концевыми доменами (CTD, C-Terminal Domain) Spt16 и Pob3 (рис. 1А), изменяя конформацию уFACT (рис. 1Б) для связывания с нуклеосомой [4]. После взаимодействия с нуклеосомой CTD Spt16 и Pob3 конкурентно связываются с входящими в ее состав димерами гистонов H2A-H2B [5]. Таким образом, было высказано предположение, что уFACT использует одни и те же CTD как для взаимодействия с гистонами H2A-H2B, так и с фактором Nhp6 [4]. Однако в опубликованных структурах с высоким разрешением комплексов FACT-нуклеосома расположение CTD показано не было [6, 7].

В данной работе методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с негативным контрастированием мы сравнили образование комплексов нуклеосомы с полноразмерным уFACT (Spt16/Pob3) и мутантным уFACT с делецией CTD-субъединицы Pob3 (Spt16/Pob3ΔCTD) в присутствии фактора Nhp6.

Материалы и методы

Сборка комплексов. уFACT (дикого типа и с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD) и белок Nhp6 были любезно предоставлены проф. Т. Формозой (Медицинская школа Университета Юты, г. Солт-Лейк-Сити, США). У мутантной субъединицы Pob3ΔCTD были удалены аминокислоты с 478 по 552 с С-конца [8]. Нуклеосомы были собраны на рекомбинантных гистонах *Xenopus laevis* с использованием 603 Widom ДНК и очищены в 4,5%-ном полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях в буфере HE (10 mM HEPES-NaOH, pH 8,0, 0,2 mM EDTA) при 4°C, как описано ранее [4, 9]. Эти нуклеосомы использовались для сборки комплексов с уFACT дикого типа либо с мутантной субъединицей Pob3ΔCTD в присутствии Nhp6 при стандартном соотношении Spt16/Pob3:Nhp6 = 1:10.

Электронная микроскопия. Свежеприготовленные комплексы нуклеосом с уFACT наносили на покрытые углеродом медные сетки (Ted Pell, США), предварительно обработанные в тлеющем разряде, с использованием устройства Emitech K100X (Emitech Ltd., Великобритания). Контрастирование проводили 1%-ным водным раствором уранилацетата в течение 30 с с последующей сушкой на воздухе. Исследование сеток выполняли на микроскопе JEOL2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ в режиме низкой дозы облучения. Микрографии регистрировали с помощью камеры Gatan Ultrascan (Gatan, Великобритания) при увеличении 25000× (размер пикселя 4,1 Å) без наклона образца, используя программу SerialEM [10, 11].

Обработка изображений. Регистрацию микрографий проводили в режиме низкой дозы с использованием программы SerialEM [10, 11] в полуавтоматическом режиме. Для последующего анализа изображения одиночных частиц отбирались с помощью нейросетевого алгоритма в EMAN2.3 [12]. В окончательный 2D-анализ вошло 32324 и 31396 частиц для дикого типа и мутанта соответственно.

Результаты и обсуждение

Изображения уFACT с Nhp6, полученные методом ПЭМ, подвергали двумерной классификации для увеличения соотношения сигнал/шум. Результаты классификации изображений уFACT дикого типа представлены на рис. 1Б, а мутантного – на рис. 1В. В составе уFACT можно различить три домена: М-домен Spt16, центральный гетеродимерный модуль (D-Spt16/M/D-Pob3) и М-домен Pob3 (N-домен Spt16 и неструктурированные CTD Spt16 и Pob3 не детектируются на 2D-классах из-за их гибкости). Мономеры Nhp6 имеют размер менее 10 кДа, поэтому также не различимы на изображениях, полученных методом ПЭМ. Мы предположили, что Nhp6 взаимодействует с CTD субъединиц Spt16 и Pob3 [4], переводя уFACT в открытое состояние даже в отсутствие нуклеосомы (рис. 1Б, схема). Заметим, что так как у мутантного уFACT отсутствует один CTD, то со стороны субъединицы Pob3 Nhp6 связываться не будет (рис. 1В, схема) и открытые конформации будут образовываться реже.

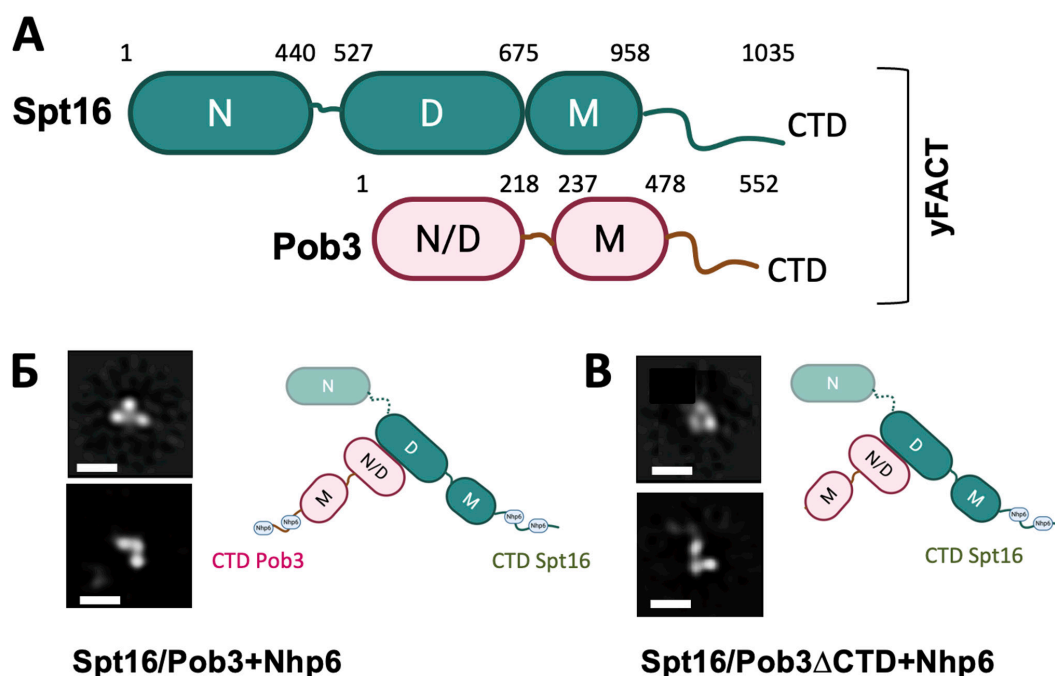


Рис. 1. Состав и структурная организация комплекса FACT дрожжей. (А) Гетеродимер Spt16 и Pob3: N – N-концевой домен, D – домен димеризации, M – средний домен, CTD – С-концевой неупорядоченный домен; ПЭМ визуализация уFACT в присутствии Nhp6: (Б) Spt16/Pob3; (В) Spt16/Pob3ΔCTD. Справа – схематическое изображение. Масштабные отрезки – 10 нм.

Далее мы сформировали комплекс уFАСТ-нуклеосома в присутствии Nhr6 и провели ПЭМ с анализом двумерных изображений (рис. 2). Анализ выявил что 100% уFАСТ дикого типа в присутствии фактора Nhr6 взаимодействовали с нуклеосомой (суммарно конформации 1–3), тогда как в образце мутантного уFАСТ взаимодействия наблюдались только у 61% молекул (суммарно конформации 2–3). Комплекс уFАСТ-нуклеосома формировал ряд промежуточных конформаций, описанных нами ранее [4]: неразвернутую, частично развернутую и полностью развернутую (в этом исследовании мы наблюдали ее только у дикого типа). Полностью развернутая нуклеосома (5% частиц) была представлена почти симметричной структурой с 4–5 округлыми участками электронной плотности, более выраженными на одном конце. Неразвернутый комплекс уFАСТ с нуклеосомой идентифицировался в приблизительно одинаковом соотношении в образцах дикого типа (29% всех частиц), и в мутантных (35%). С другой стороны, у дикого типа наблюдалось почти в 2 раза больше частично развернутых асимметричных частиц (66% у дикого типа и 26% у мутанта).

Основываясь на полученных экспериментальных данных, мы можем предположить роль STD при разворачивании нуклеосом комплексом уFАСТ. Процесс разворачивания начинается с перевода уFАСТ в открытое состояние при взаимодействии его STD с Nhr6 (рис. 1Б). Далее открытый уFАСТ связывается с частично дестабилизированной нуклеосомой, образуя вначале компактные комплексы (рис. 2). В этом состоянии С-концевые домены уFАСТ образуют слабые

контакты с димерами Н2А-Н2В, а Nhr6 может связаться с ДНК (рис. 3). Связывание Nhr6 приводит к ослаблению контактов ДНК с гистонами в нуклеосоме. Оба димера Н2А-Н2В вытесняются от нуклеосомной ДНК, что приводит к уFАСТ-опосредованному разворачиванию нуклеосомы, при этом у уFАСТ дикого типа каждый из двух STD взаимодействует с одним димером гистонов Н2А-Н2В (рис. 3). Удаление STD Pob3 приводит к ослаблению контактов уFАСТ с гистонами, что приводит, во-первых, к понижению способности к комплексообразованию и, во-вторых, к невозможности полностью развернуть нуклеосому. Асимметричная структура частично развернутого комплекса (рис. 2) позволяет предположить, что в случае мутантного уFАСТ удаляется только один из димеров Н2А-Н2В, расположенный со стороны С-конца субъединицы Spt16, а второй остается связанным с тетрамером Н3-Н4 и с нуклеосомной ДНК (схема на рис. 3).

Мы также предположили, что STD Pob3 может быть необходимым для перехода от начального распознавания нуклеосомы к активной стадии разворачивания. Его отсутствие, вероятно, нарушает электростатический баланс взаимодействий и лишает комплекс ключевой точки опоры, требуемой для диссоциации гистоновых димеров Н2А-Н2В, что и «запирает» FАСТ и нуклеосому в непродуктивном состоянии. Интересно, что аналогичная конформация наблюдается для hFАСТ [2], что может указывать на ее потенциальную роль *in vivo*, например, в качестве промежуточного состояния, подверженного регуляции.

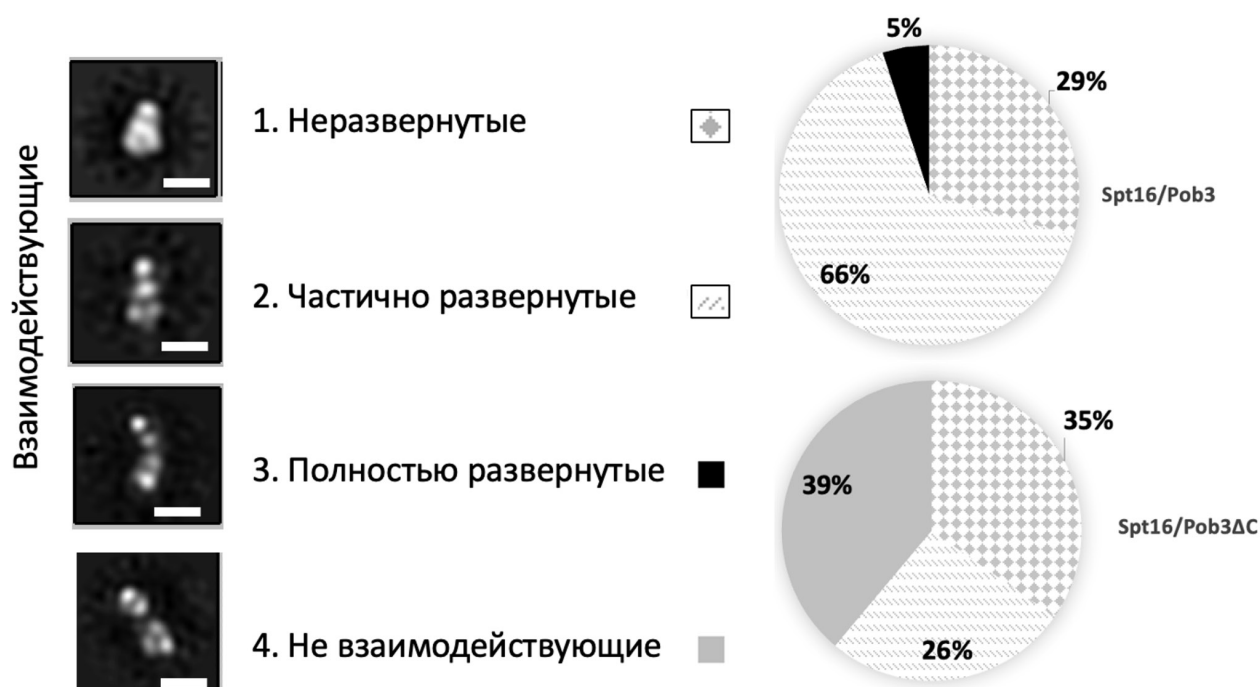


Рис. 2. Делеция STD Pob3 нарушает разворачивание нуклеосомы уFАСТ. Слева — изображения различных промежуточных конформаций комплекса по данным ПЭМ. Масштабные отрезки — 10 нм. Справа — распределение долей промежуточных конформаций при взаимодействии Spt16/Pob3 или Spt16/Pob3ΔCTD с нуклеосомой.

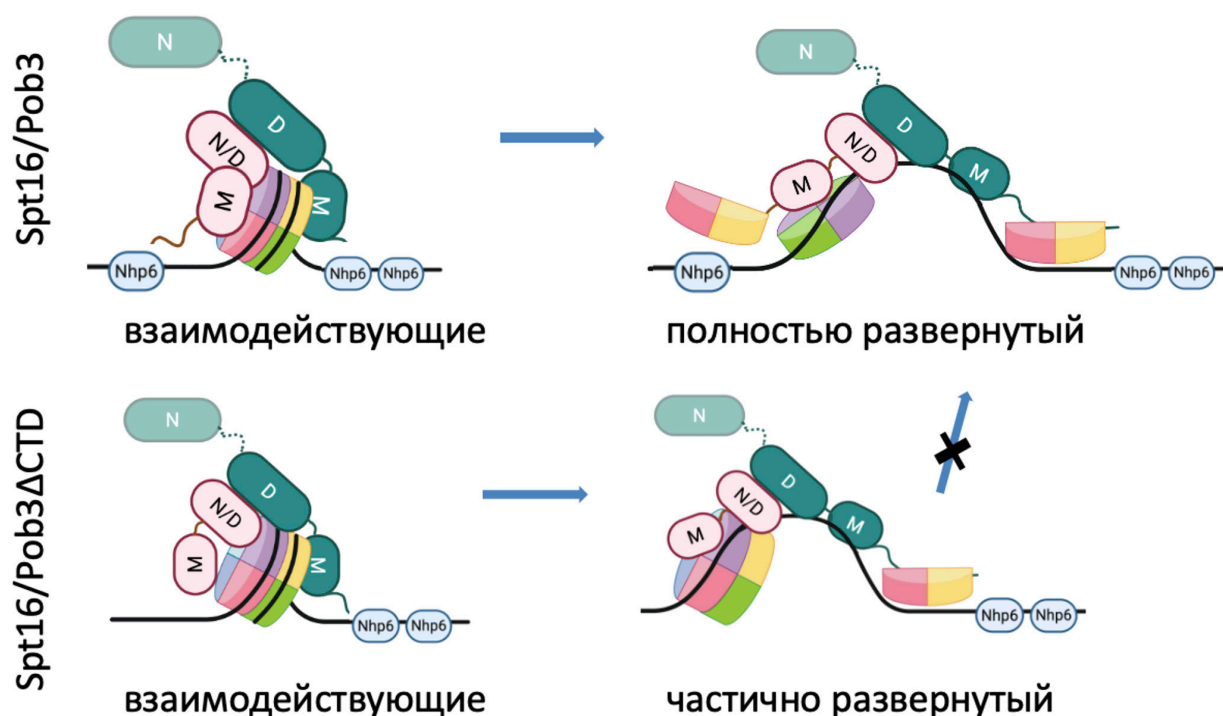


Рис. 3. Схема разворачивания нуклеосомы комплексом уFACT (Spt16/Pob3) – сверху и мутантным уFACT (Spt16/Pob3ΔCTD) – снизу. Nhp6 связывается с нуклеосомной ДНК.

Заключение

Проведенное исследование свидетельствует в пользу важности CTD Pob3 в процессе АТФ-независимого разворачивания нуклеосом комплексом уFACT. Данные электронной микроскопии демонстрируют, что делеция этого домена приводит к нарушению образования комплексов и дальнейшего разворачивания нуклеосомы. Установленная роль CTD Pob3 как ключевого структурного элемента, обеспечивающего эффективное разворачивание, задает новые ориентиры для изучения регуляции транскрипции. В частности, представляет интерес исследование того, как мутации в этом домене, выявленные в некоторых типах рака, влияют на активность FACT и целостность хроматина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gurova K., Chang H.W., Valieva M.E., Sandlesh P., Studitsky V.M. Structure and function of the histone chaperone FACT—Resolving FACTual issues. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2018;1861(9):892–904.
2. Volokh O., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Beyond chaperoning: The multifaceted role of FACT in chromatin transactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2025;26(11):5176.
3. Hsieh F.K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110(19):7654–7659.
4. Sivkina A.L., Karlova M.G., Valieva M.E., McCullough L.L., Formosa T., Shaytan A.K., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Electron

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). О.С.Соколова руководит группой по разработке инновационных лекарственных препаратов на основе структурной биологии и биоинформатики в университете МГУ-ППИ г. Шэньчжэнь, Китай (2022KCXTD034). Электронная микроскопия проводилась на базе центра коллективного пользования «Электронная микроскопия в науках о жизни» биологического факультета МГУ (г. Москва, Россия). Микроскоп JEOL2100 входит в состав уникальной научной установки «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия». Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

microscopy analysis of ATP-independent nucleosome unwinding by FACT. *Commun. Biol.* 2022;5(1):2.

5 Kemble D.J., McCullough L.L., Whitby F.G., Formosa T., Hill C.P. FACT Disrupts nucleosome structure by binding H2A-H2B with conserved peptide motifs. *Mol. Cell.* 2015;60(2):294–306.

6 Mayanagi K., Saikusa K., Miyazaki N., Akashi S., Iwasaki K., Nishimura Y., Morikawa K., Tsunaka Y. Structural visualization of key steps in nucleosome reorganization by human FACT. *Sci. Rep.* 2019;9(1):10183.

7 Liu Y., Zhou K., Zhang N., Wei H., Tan Y.Z., Zhang Z., Carragher B., Potter C.S., D'Arcy S., Luger K. FACT caught in the act of manipulating the nucleosome. *Nature.* 2020;577(7790):426–431.

8. Wittmeyer J., Joss L., Formosa T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha. *Biochemistry*. 1999;38(28):8961–8971.

9. Volokh O.I., Sivkina A.L., Moiseenko A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Valieva M.E., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Formosa T., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Mechanism of curaxin-dependent nucleosome unfolding by FACT. *Front. Mol. Biosci.* 2022;9:1048117.

10. Schorb M., Haberbosch I., Hagen W.J.H., Schwab Y., Mastronarde D.N. Software tools for automated transmission electron microscopy. *Nat. Methods*. 2019;16(6):471–477.

11. de la Cruz M.J., Martynowycz M.W., Hattne J., Gonen, T. MicroED data collection with SerialEM. *Ultra-microscopy*. 2019;201:77–80.

12. Bell J.M., Chen M., Baldwin P.R., Ludtke S.J. High resolution single particle refinement in EMAN2.1. *Methods*. 2016;100:25–34.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 04.10.2025

Принята в печать 06.10.2025

SHORT COMMUNICATION

Structural role of Pob3 CTD in FACT-mediated nucleosome uncoiling revealed by electron microscopy

O.I. Volokh¹ , A.L. Sivkina^{1, 2} , V.M. Studitsky^{1, 3} , O.S. Sokolova^{1, 4, *} 

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

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;

³Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA;

⁴Faculty of Biology, MSU-BIT University, 1 International University Park Road, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China

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

The histone chaperone FACT plays a key role in chromatin reorganization by mediating ATP-independent nucleosome unwinding. The yeast yFACT complex consists of the Spt16 and Pob3 subunits, which form a heterodimer functionally associated with the non-histone protein Nhp6. In this study, negative-stain transmission electron microscopy was used to investigate the interaction of the yFACT complex containing the Pob3 subunit with the C-terminal domain (CTD) removed with the nucleosome in the presence of Nhp6. As a result of CTD removal, the efficiency of FACT binding to the nucleosome decreased by a factor of 2, and the ability to fully unfold the nucleosome was impaired: instead of the almost symmetrical, fully unfolded structures characteristic of wild type yFACT, asymmetrical, partially unfolded structures were observed. The data obtained indicate the key role of the Pob3 CTD in ensuring FACT binding to the nucleosome, which is important for understanding the mechanisms of chromatin remodeling and transcription regulation.

Keywords: *chaperon FACT, CTD domain Pob3, electron microscopy, ATP-independent nucleosome unfolding, chromatin transcription.*

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 19-74-30003.

Сведения об авторах

Волох Олеся Игоревна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2261-9587>

Сивкина Анастасия Львовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории структурно-функциональной организации хромосом ИБГ РАН. Тел.: 8-499-135-30-92; e-mail: anastasiia.sivkina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4681-0178>

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Сokolova 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 576.315.42

Анализ архитектуры гетерохроматина с помощью криоэлектронной томографии

Е.П. Казаков^{1, 2, *} , Ю.М. Чесноков³ , И.И. Киреев^{1, 2} , С.А. Голышев¹

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

²Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы 1, стр. 12;

³Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

*email: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

КЭТ (криоэлектронная томография) представляет собой мощный инструмент для изучения структуры биологических объектов в их нативном состоянии. Однако КЭТ до сих пор не получила широкого распространения для изучения клеточных органелл *in situ*, включая клеточное ядро и хроматин. В нашей работе мы стремились исследовать возможности применения КЭТ для изучения архитектуры хроматина, сосредоточив внимание на возможности использования метода криокорреляционной световой и электронной микроскопии для выбора областей интереса, а именно локусов гетерохроматина, при изготовлении ламелей с помощью травления фокусированным ионным пучком (ФИП).

Ключевые слова: криоэлектронная томография, корреляционная микроскопия, хроматин, гетерохроматин

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-18

Список сокращений: КЭТ — криоэлектронная томография, крио-ФИП — фокусированный ионный пучок в криогенных условиях, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ПЭМ — просвечивающая электронная микроскопия

Введение

Геномы эукариот отличаются значительными размерами и, в форме хроматина, компактно упакованы в ограниченном объеме клеточного ядра без ущерба для реализации геномных процессов и разделения реплицированных молекул ДНК между дочерними клетками [1, 2]. Гетерохроматические районы хромосом играют важнейшую роль в поддержании архитектуры ядра и в организации внутриядерного пространства через формирование контактов ДНК с ядерной оболочкой [3], в регуляции активности генов за счет поддержания локального репрессивного окружения [4] и в обеспечении стабильности хромосом в митозе [5]. Для понимания принципов структурирования самого хроматина необходимо детальное знание о его организации, начиная от уровня небольших групп нуклеосом, определяющих функционирование хроматина на молекулярном уровне и до уровня хромосомных территорий, на котором происхо-

дит цитологическое разделение эу- и гетерохроматина и неслучайное позиционирование геномных локусов в пространстве ядра. На самых нижних уровнях этой иерархии хроматин наиболее восприимчив к воздействиям процедур пробоподготовки — альдегидная фиксация считается причиной артефактной неспецифической агрегации, а контрастирование тяжелыми металлами маскирует детали тонкой структуры макромолекулярных комплексов хроматина [6, 7].

Геномные методы и применение субдифракционной микроскопии показывают, что геном организован в виде иерархии доменов с преобладающим взаимодействием *in cis*, начинающимся на уровне хромосомных территорий и продолжающимся до компактных кластеров («клатчей») из десятков нуклеосом [8–11], но геномные методы (3С и дериваты) ограничены в своей способности выявлять взаимодействия *in cis* между сегментами молекул ДНК в повторяющихся последовательностях. Когда событие приходится на повтор, невозможно точно локализовать местоположение этого повтора в геноме и результат приходится отбрасывать. Обогащенность повторами делает гетерохроматические зоны сложным объектом для такого изучения. Современные методы на основе *in situ*-

гибридизации ДНК, такие, как Oligopaint, в сочетании с субдифракционной микроскопией, позволяют визуализировать геометрию хроматиновых фибрилл с геномным разрешением до десятков тысяч пар оснований и с пространственным разрешением до десятков нанометров [9]. Но, несмотря на достигнутый прогресс, и гибридизация, и методы на основе 3С, требуют применения химической фиксации, неизбежно нарушающей исходную структуру хроматина. И, подобно 3С-методам, Oligopaint неприменим для анализа блоков повторяющихся последовательностей, что заставляет исследователей фокусировать внимание на геномных регионах, богатых генами.

Для получения детализированной информации о структуре хроматина мы использовали АТ-богатые гетерохроматические локусы в качестве ориентира для вытравливания ламелей единичных, по одной на клетку, пластинок толщиной 150–250 нм – и последующей криоэлектронной томографии (КЭТ), что позволяет изучить трехмерную структуру гетерохроматина на мезоуровне в состоянии, предельно близком к нативному, и напрямую наблюдать ее изменения при репликации и репарации ДНК. Культивируемые клетки мыши являются уникальной моделью для изучения поведения гетерохроматических локусов, так как помимо периферического гетерохроматина, содержащего репрессированные гены, содержат специфичные для этого вида «хромоцентры» – блоки коротких АТ-богатых высокоповторяющихся последовательностей в каждой хромоosome [13].

Материалы и методы

Культивирование клеток. Клетки линии 3Т3 (иммortalизованные мышинные фибробласты) культивировали на среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин и смеси антибиотика и антимикотика (все – Capricorn Scientific, Германия). Для экспериментов клетки высевали на покрытые поли-L-лизинном золотые сетки для электронно-микроскопических исследований с углеродной подложкой Quantifoil (R1/2 200 mesh) (EMS, США). Клетки фиксировали 1%-ным раствором глутарового альдегида в 100 мМ водном растворе какодилата натрия в течение 1 ч, дважды промывали и окрашивали в 10 мкг/мл растворе DAPI (Lumiprobe, Россия) на том же растворе.

Витрификация клеток и изготовление ламелей.

Витрификацию проводили, используя установку Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США). Осушение проводили при 20°C и относительной влажности 85% с нижней стороны сетки, заменяя верхний осушающий фильтр на специально изготовленный тефлоновый диск. Сразу после осушения образцы замораживали погружением в жидкий этан. Для наведения сфокусированного

ионного пучка (ФИП) и травления ламелей в гетерохроматиновых зонах ядер проводили панорамную съемку витрифицированных образцов на флуоресцентном микроскопе THUNDER Imager EM cryoCLEM (Leica Microsystems, Германия), оснащенном крио-объективом 50× NA0.9. Ламели изготавливали на двухлучевом сканирующем электронном микроскопе Versa 3D DualBeam (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенном системой крио-переноса PP3010 (Quorum Technologies, Великобритания) и встроенной системой ввода газа для металлизации поверхности образцов платиной. Ламели изготавливали травлением образца пучком ионов Ga⁺ с ускоряющим напряжением 30 кВ, постепенно понижая ток луча от 500 до 30 пА для получения ламелей толщиной порядка 150 нм.

КЭТ. Криоэлектронные томограммы были получены с помощью криоэлектронного микроскопа Titan Krios 60–300 (ThermoFisher, США), работающего при напряжении 300 кВ и оснащенного детектором прямых электронов K3 BioQuantum (Gatan, США). Серии угловых проекций были записаны с помощью SerialEM с использованием дозосимметричной схемы получения данных (от -54° до +66° с шагом 3°) при увеличении 26000× (2,68 Å/пиксель), при общей дозе ~140 е-/Å² и значениях дефокуса от -5 до -8 мкм. Томограммы были выровнены с помощью программного пакета IMOD версии 4.11 [14] с применением выравнивания методом отслеживания фрагментов изображения. При реконструкции изображений с 4-кратным биннингом использовалась взвешенная обратная проекция с фильтром типа SIRT, что привело к конечному разрешению 1,072 нм/пиксель. Окончательные томограммы были обработаны с использованием программного обеспечения IsoNet версии 0.3 [15].

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Клетки растили на покровных стеклах и фиксировали 1%-ным раствором глутарового альдегида на 100 мМ какодилате натрия в течение 1 ч, затем постфиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия на том же буфере в течение ночи при температуре 4°C и обезвоживали, проводя через серию растворов этанола с увеличением концентрации. Затем обезвоживали в ацетоне и пропитывали смесями эпон-ацетон с постепенным увеличением доли смолы. После замены смесей на чистую смолу Epon 812 образцы отверждали при температуре 60°C в течение 48 ч. Ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы Ultracut E (Reichert-Jung, Австрия) и монтировали на медные бленды покрытые формваром. Срезы окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата в течение 30 мин и цитратом свинца в течение 45–90 с и исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония).

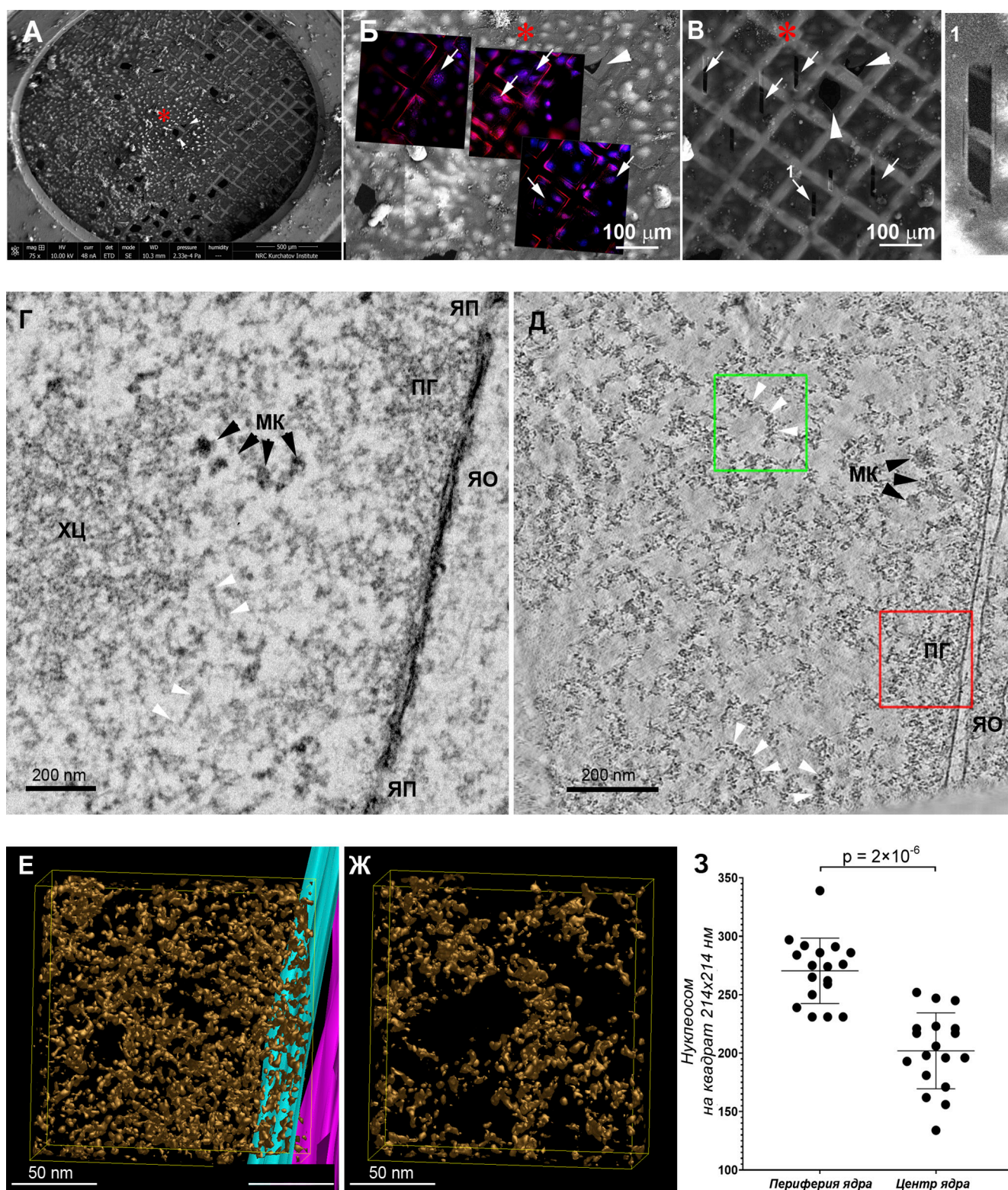


Рисунок. Строение периферических областей ядер мышинных фибробластов линии 3Т3. **А** – криостабильные («витрифицированные») на сетке, наблюдение в режиме СЭМ. Красный астериск – геометрический центр сетки, указатели – ориентиры. **Б** – совмещение флуоресцентной «карты» с СЭМ-изображением сетки, стрелки – выбранные клетки. **В** – подготовленные ламели (стрелки). Стрелка, отмеченная цифрой «1» указывает на ламель, показанную крупным планом на врезке справа. **Г** – ультратонкий срез (80 нм), заключенной в эпоксидную смолу клетки линии 3Т3. ПГ – периферический гетерохроматин, ХЦ – хромоцентр, ЯО – ядерная оболочка, ЯП – ядерная пора, МК – «мегакомплексы», указатели – фибриллярные структуры хроматина. **Д** – виртуальный срез толщиной 10 нм, полученный из криотомограммы зафиксированной глутаровым альдегидом клетки 3Т3, не подвергнутой химическому контрастированию. **Е, Ж** – трехмерные модели эу- и гетерохроматических зон, отмеченных красной и зеленой рамками на панели Д. Пурпурный и фиолетовый – внутренняя и внешняя ядерные мембраны соответственно. **З** – Локальная плотность популяции нуклеосом на периферии и в центральных районах ядра. Данные представлены, как среднее \pm стандартное отклонение.

Обработка изображений и статистический анализ. Для построения трехмерных моделей в программном пакете IMOD изображения были сегментированы по порогу яркости, после чего были построены поверхности равной яркости. Мембраны ядерной оболочки были трассированы вручную. Анализ распределения локальной плотности популяции нуклеосом был осуществлен с помощью инструментов «Поиск локальных максимумов» и «Подсчет частиц» из пакета FIJI 2.16.0 [16] на фрагментах томограмм из 10 срезов в окнах размером 200×200 пикселей (214×214 нм) на периферии ядра (в непосредственной близости ядерной оболочки) и в центре ядра. Всего было посчитано 36 таких окон из трех томограмм. Для статистического анализа использовали пакет Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США). Сравнение выборок проводили с применением U-теста Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что при окраске ДНК красителями DAPI или Hoechst блоки гетерохроматина хорошо различимы при использовании не иммерсионного объектива с числовой апертурой 0,6–0,9, идентификация предварительно выбранных для анализа клеток в режиме сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) является весьма затруднительной. Чтобы реализовать такую идентификацию, мы сопоставили полученную с помощью флуоресцентного микроскопа карту сетки с расположенными на ней клетками и изображение той же области, полученное в СЭМ, и использовали «естественные» ориентиры, в т. ч. повреждения подложки, для повторного обнаружения выбранных клеток (рисунок, А–В). Ламели вытравливали в зонах, демонстрирующих наиболее яркую флуоресценцию DAPI.

Благодаря этому удалось получить криотомограммы гетерохроматических районов ядер. На текущий момент попадание конкретного хромоцентра в изготавливаемую из криостабилизированного образца ламель является фактически случайным событием, так что основным объектом наших исследований стал периферический гетерохроматин. Разрешение результирующих томограмм не позволяет визуализировать детали строения индивидуальных нуклеосом, но большое поле зрения позволяет с высокой долей уверенности утверждать, что некоторые группы нуклеосом формируют рыхлые

фибриллы переменной толщины, наиболее заметные на удалении от ядерной оболочки (рисунок, Д–Ж). Локальная плотность популяции нуклеосом вблизи ядерной оболочки существенно выше, чем в центральных районах ядра, что было подтверждено статистическим анализом (рисунок, Е–З).

На ультратонких срезах заключенных в смолу образцов мы также наблюдали фибриллы хроматина переменной толщины и более компактный периферический гетерохроматин (рисунок, Г), что полностью соответствует данным, полученным с применением метода селективного контрастирования ДНК на ультратонких срезах [17] и данным КЭТ [18]. И на ПЭМ-, и на КЭТ-изображениях мы обнаружили два типа структур: вышеупомянутые фибриллярные структуры и кластеры телец неправильной формы, идентичные «мегакомплексам» [19], предположительно, являющимся незрелыми рибосомами, идущими на экспорт из ядра.

Общее сходство картины хроматина, наблюдаемой в ядрах на ультратонких срезах заключенных в эпоксидную смолу и получаемой с криостабилизированных образцов после химической фиксации, позволяет утверждать, что обезвоживание и заключение образцов в смолу не наносит значительного ущерба ультраструктуре. В то же время мы не можем уверенно сказать, является ли наблюдаемое состояние хроматина следствием альдегидной фиксации или нет. Дальнейший анализ мезоструктуры хроматина методом КЭТ в клетках, не подвергнутых химической фиксации, позволит пролить новый свет на этот, пока еще дискуссионный, вопрос. Следующим этапом предполагается применение корреляционной световой микроскопии и КЭТ для прицельного изучения двух типов субхромосомных доменов — хромоцентров и зон репликации ДНК. Есть основания полагать, что новые сведения существенно дополняют данные об архитектуре ядра в целом и его отдельных зон, полученные методами стабилизации конформации хромосом (ЗС и производные) и методами световой микроскопии.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-74-00021. Часть работы выполнена с использованием оборудования, приобретенного в рамках программы развития МГУ ПНР5.13. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tark-Dame M., Jerabek H., Manders E.M., van der Wateren I.M., Heermann D.W., van Driel R. Depletion of the chromatin looping proteins CTCF and cohesin causes chromatin compaction: insight into chromatin folding by polymer modelling. *PLoS Comput. Biol.* 2014;10(10):e1003877.

2. Hoencamp C., Rowland B.D. Genome control by SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2023;24(9):633–650.

3. Falk M., Feodorova Y., Naumova N., Imakaev M., Lajoie B.R., Leonhardt H., Joffe B., Dekker J., Fudenberg G., Solovei I., Mirny L.A. Heterochromatin drives

compartmentalization of inverted and conventional nuclei. *Nature*. 2019;570(7761):395–399.

4. Shatskikh A.S., Abramov Y.A., Lavrov S.A. Trans-inactivation: Repression in a wrong place. *Fly (Austin)*. 2017;11(2):96–103.

5. Weaver B.A., Cleveland D.W. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007;67(21):10103–10105.

6. Dubochet J., Sartori Blanc N. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron*. 2001;32(1):91–99.

7. Sengupta R., Poderycki M.J., Mattoo S. CryoAPEX – an electron tomography tool for subcellular localization of membrane proteins. *J. Cell Sci*. 2019;132(6):jcs222315.

8. Cremer T., Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2010;2(3):a003889.

9. Bintu B., Mateo L.J., Su J.H., Sinnott-Armstrong N.A., Parker M., Kinrot S., Yamaya K., Boettger A.N., Zhuang X. Super-resolution chromatin tracing reveals domains and cooperative interactions in single cells. *Science*. 2018;362(6413):eaau1783.

10. Huang K., Li Y., Shim A.R., Virk R.K.A., Agrawal V., Eshein A., Nap R.J., Almassalha L.M., Backman V., Szleifer I. Physical and data structure of 3D genome. *Sci. Adv*. 2020;6(2):eaay4055.

11. Gómez-García P.A., Portillo-Ledesma S., Neguembor M.V., Pesaresi M., Oweis W., Rohrich T., Wieser S., Meshorer E., Schlick T., Cosma M.P., Lakadamyali M. Mesoscale Modeling and single-nucleosome tracking reveal remodeling of clutch folding and dynamics in stem cell differentiation. *Cell Rep*. 2021;34(2):108614.

12. Saksouk N., Simboeck E., Déjardin J. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:3.

13. Maison C., Quivy J.P., Probst A.V., Almouzni G. Heterochromatin at mouse pericentromeres: a model for *de novo* heterochromatin formation and duplication during replication. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. 2010;75:155–165.

14. Mastronarde D.N. Dual-axis tomography: An approach with alignment methods that preserve resolution. *J. Struct. Biol*. 1997;120(3):343–352.

15. Liu Y.T., Zhang H., Wang H., Tao C.L., Bi G.Q., Zhou Z.H. Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning. *Nat. Commun*. 2022;13(1):6482.

16. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. 2012;9(7):676–682.

17. Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J., Inagaki A., Ellisman M.H., O'Shea C.C. ChromEMT: visualizing and reconstructing chromatin ultrastructure and 3D organization in situ. *Nat. Protoc*. 2025;20(4):934–966.

18. Hou Z., Nightingale F., Zhu Y., MacGregor-Chatwin C., Zhang P. Structure of native chromatin fibres revealed by Cryo-ET in situ. *Nat. Commun*. 2023;14(1):6324.

19. Chen J.K., Liu T., Cai S., Ruan W., Ng C.T., Shi J., Surana U., Gan L. Nanoscale analysis of human G1 and metaphase chromatin in situ. *EMBO J*. 2025;44(9):2658–2694.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 24.08.2025

Принята в печать 05.09.2025

SHORT COMMUNICATION

Analysis of heterochromatin mesoscale architecture by cryo-electron tomography

E.P. Kazakov^{1, 2, *} , Y.M. Chesnokov³ , I.I. Kireev^{1, 2} , S.A. Golyshev¹ 

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

²Department of Cell Biology and Histology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

³Kurchatov Complex of NBICS Nature-Like Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute,” Russian Federation, 1 Academician Kurchatov Sq., Moscow, 123182, Russia

*e-mail: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru

Cryo-ET (cryo-electron tomography) is a powerful tool for studying the structure of biological objects in their native state. However, Cryo-ET is still not widely used to study cellular organelles including cell nucleus and chromatin *in situ*. In our work, we aimed to investigate the possibilities of employing Cryo-ET for studying the architecture of natively preserved chromatin, focusing on the possibility of using a cryoCLEM (cryo-correlative light and electron microscopy) approach to target final steps of sample preparation by focused ion beam (FIB) milling exactly to the area of interest – specifically, heterochromatin loci.

Keywords: cryo-electron tomography, correlation microscopy, chromatin, heterochromatin

Funding: This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 23-74-00021.

Сведения об авторах

Казаков Евгений Павлович — аспирант, мл. науч. сотр. отдела электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: kazakov.evgeny.2016@post.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0959-1348>

Чесноков Юрий Михайлович — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории электронной микроскопии Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт». Тел.: 8-499-196-95-39; e-mail: chesnokov_ym@nrcki.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8365-4699>

Киреев Игорь Игоревич — докт. биол. наук, зав. отделом электронной микроскопии, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: kireev@belozersky.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9252-6808>

Голышев Сергей Александрович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-10-00; e-mail: sergei.a.golyshev@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4877-1061>

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 2023 г. составляет 0,892, показатель CiteScore 2023 (Scopus) англоязычной версии — 1,0.

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 — полуторный, 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). Объемы, 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 пристатейного 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., Казённов 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 подвиговые 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](#)