
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ И
СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 537.533.73

**IN SITU КРИОЭЛЕКТРОННАЯ ТОМОГРАФИЯ
НА ПРИМЕРЕ КЕРАТИНОЦИТОВ**

© 2021 г. В.А. Кралин^{1,2}, Е.В. Сытина¹, Ю.М. Чесноков¹,
Р.А. Камышинский¹, А.А. Пантелеев¹, А.С. Орехов¹

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

²Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

*E-mail: Orekhov_AS@nrcki.ru

In situ криоэлектронная томография – динамично развивающийся метод трехмерной визуализации ультраструктуры клеток и тканей в их естественном состоянии. Благодаря появлению новых методик подготовки образцов, техническому развитию электронных микроскопов и постоянному усовершенствованию методов обработки экспериментальных данных, появилась возможность извлекать высокоточную структурную информацию о макромолекулярной организации одиночных клеток и межклеточном взаимодействии. В настоящей работе основные возможности метода *in situ* криоэлектронной томографии продемонстрированы на примере эпителиальных клеток.

ВВЕДЕНИЕ

In situ криоэлектронная томография с каждым годом становится все более популярным методом трехмерной структурной характеристики биологических объектов в их естественном (нативном) состоянии, таких как целые клетки, субклеточные органеллы и макромолекулярные комплексы [1–3]. Вместе с тем, из-за сложности подготовки образцов необходимой толщины (до 200–300 нм) для изучения методами криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ) долгое время структурный анализ был ограничен изолированными объектами (одиночными белками, вирусами и т.д.) и тонкими отростками клеток [4–7]. Для прямой визуализации внутренних структур более крупных объектов применяется утонение методом фокусированного ионного пучка Ga⁺ (крио-ФИП) [8] или метод ультрамикротомирования при температуре жидкого азота [9], которые позволяют получить срезы витрифицированных объектов толщиной менее 300 нм. Последний метод крайне сложен и требователен технически, а выход качественных срезов, пригодных для получения данных крио-ПЭМ с высоким разрешением, очень низок. Напротив, применение метода крио-ФИП в полуавтоматическом режиме позволяет за меньшее

время подготовить больше качественных срезов необходимой толщины (до 100 нм) с высокой локализацией места травления.

Одним из наиболее интересных объектов исследования являются эпителиальные клетки человека – кератиноциты, выполняющие множество различных функций, от защитных до секреторных. Для выполнения своих функций в организме, они должны сформировать характерную структуру – эпителиальный пласт, где у каждой клетки четко определены базальная и апикальная стороны, а также сформированы специфические контакты с соседними клетками. Межклеточные контакты включают несколько типов: десмосомы, плотные контакты, щелевые контакты. От нормального формирования и функционирования межклеточных контактов зависят как барьерные характеристики эпителия, так и его механические свойства, а также передача сигналов от клетки к клетке. Целый ряд патологий связан с нарушением работы этих структур [10–11]. Большинство контактов представляют собой сложные молекулярные белковые комплексы. Компактные размеры и типовая характерная структура делают их удобным объектом для исследования методами электронной микроскопии.

Кроме формирования различных межклеточных контактов, эпидермальным кератиноцитам свойственно формирование в их цитоплазме специфических гранул, содержание которых служит материалом для построения «рогового конверта» при ороговевании клеток эпидермиса кожи на последних, терминальных стадиях их дифференцировки. Морфология этих гранул, структура их мембран и содержимого являются ключевыми показателями характера дифференцировки кератиноцитов и, соответственно, функциональности эпидермиса, его барьерных свойств. Таким образом, разработка новых методов анализа структуры гранул в эпидермальных кератиноцитах является актуальной задачей, как с точки зрения диагностики различных заболеваний кожи, так и с фундаментальной, исследовательской точки зрения.

В данной работе мы демонстрируем результаты трехмерной реконструкции внутриклеточных структур, в том числе компонентов их цитоскелета, нативных эпителиальных клеток – эпидермальных кератиноцитов, полученных с помощью *in situ* криоэлектронной томографии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эпидермальные эквиваленты из первичных кератиноцитов кожи человека или иммортализованных кератиноцитов линии N-TERT были получены, как описано ранее [12], на поликарбонатных вставках. Кератиноциты высевались в количестве 120–150 тыс. на подготовленную поликарбонатную вставку (Millicell Cell Culture Insert P1HP01250, Millipore) с сеточками и инкубировались при 37°C и 5% CO₂. Через 1–2 дня, по достижении конфлюэнтного монослоя, среду заменяли на дифференцировочную, а еще через сутки переходили на культивирование на границе раздела сред (Air-Liquid interface). Формирование монослоя оценивали методом прижизненного окрашивания клеток диацетатом флуоресцеина (ФДА). Для размножения кератиноцитов использовали среду Keratinocyte serum-free medium (KSFM) (Gibco 17005042), для дифференцировки среду CnT-Prime 3DBarrier Medium (CELLnTEC, Cat. No. CnT-PR-3D). Структура эквивалентов оценивалась на 4–6 день культивирования на границе раздела сред.

Сеточки (Au 200, Quantifoil) стерилизовали погружением на 20 минут в 70% раствор этанола. Затем сеточки покрывали раствором коллагена IV (50 мкг/мл в 0.03% уксусной кислоте), высушивая раствор в стерильных условиях. Перед посевом

клеток сеточки однократно отмывали дистиллированной водой.

Для получения клеточного пласта кератиноциты человека линии N-TERT размножали по стандартной методике в бессывороточной среде для кератиноцитов Keratinocyte serum-free medium (KSFM, Gibco 17005042) и высевали на предварительно подготовленные сеточки в высокой плотности. Для посева клетки снимали с субстрата 0.25% раствором трипсина (ПанЭко).

По достижении 100% конфлюэнтности клетки переводили на дифференцировочную среду: DMEM (ПанЭко) с GlutaMAX (Gibco), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone).

Витрификация образцов проводилась с помощью автоматизированной системы Vitrobot Mark IV. Сетки (предварительно гидрофилизированные с помощью установки Pelco easyGlow при значении силы тока 25 мА, давлении 0.26 мБар в течение 30 секунд) с исследуемыми клеточными препаратами подвергались процедуре одновременного двустороннего сжатия фильтровальной бумагой для удаления излишков раствора и далее быстро замораживались в сжиженном этане, охлажденном до температуры жидкого азота (–196°C). В процессе нанесения образца на сетку температура в камере системы Vitrobot составляла 14°C, влажность – не менее 95%.

Для приготовления тонких клеточных срезов с помощью фокусированного ионного пучка (крио-ФИП) использовался растровый электронно-ионный микроскоп (РЭИМ) Versa 3D FEG (FEI, USA) с приставкой для работы с замороженными образцами Quorum PP3010 (QT, UK). РЭМ изображения получены при ускоряющем напряжении электронов 5 кэВ, травление ионами Ga⁺ проводилось при ускоряющем напряжении 30 кэВ и последовательном понижении тока пучка от 1 нА до 50 пА.

Полученные срезы витрифицированных клеточных систем переносились в замороженном состоянии с помощью специального шлюза в крио-ПЭМ Titan Krios 60-300 (FEI, USA). Получение изображений проводилось с помощью программного обеспечения Tomography 4.1 (FEI, USA) в режиме малых доз в диапазоне от –60 до +60 градусов с угловым шагом в 2 градуса. Для набора томографических серий использовались увеличения 8700x и 18000x с экспериментально подобранными оптимальными значениями дефокусировки в диапазоне [–8 мкм; –5 мкм]. Суммарное значение дозы электронов, прошедших через единицу пло-

щади образца за всё время экспозиции, составило $\sim 100 e^-/\text{Å}^2$.

С полученными массивами изображений проводились процедуры кросс-корреляционного выравнивания и томографического восстановления с использованием методов одновременной итерационной реконструкции (SIRT, Simultaneous Iterative Reconstruction Technique) и обратно-взвешенных проекций (WBP, Weighted Back Projections) с помощью программного пакета IMOD [13]. Дальнейшая аннотация и сегментирование выполнялись в несколько этапов с помощью сверточных нейронных сетей в программном пакете EMAN 2.2 [14]. Для определения положения внутриклеточных филаментов использовалась кросс-корреляция с цилиндрическими шаблонами в программе Avizo. Для улучшения разрешения трехмерной реконструкции и определения ориентации повторяющихся объектов использовался метод субтомографического усреднения в программе Relion2. Финальная визуализация проводилась с помощью программных пакетов UCSF Chimera [15] и Avizo (FEI, USA). Обработка полученных данных проводилась на мощностях локальной вычислительной станции, оснащенной графическим ускорителем Nvidia GeForce 1080Ti и процессором Intel Core i7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были получены *in vitro* образцы многослойного (стратифицированного) кожного эпителия человека на поликарбонатных вставках. Однако толщина этих образцов была слишком велика для определения их положения на сеточке в РЭИМ. Для того чтобы оптимизировать размеры и уменьшить толщину объекта, на сеточках был выращен монослой эпидермальных кератиноцитов (клеточный пласт) толщиной в 1 клетку при сохранении клеточных контактов (десмосом и других типов межклеточных контактов). На рис. 1а,б виден сформированный на сеточке клеточный пласт, различимы границы клеток так

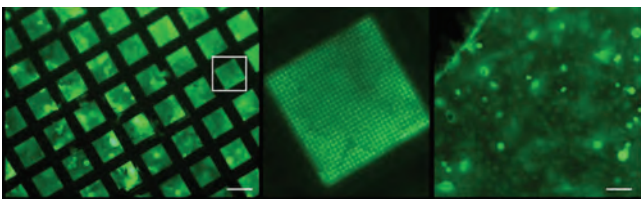


Рис. 1. Кератиноциты N-TERT, культивируемые на сетках (а), шкала 200 мкм, (б) увеличенный фрагмент фото а, (в) монослой кератиноцитов на культуральном пластике, шкала 20 мкм. Прижизненное окрашивание ФДА

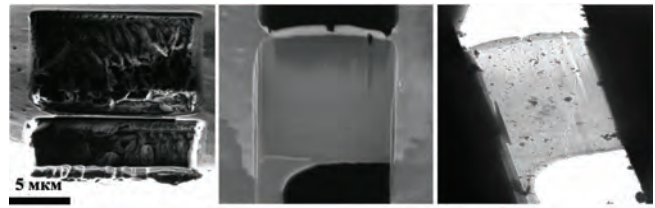


Рис. 2. РЭМ (а, б) и крио-ПЭМ (в) изображения подготовленной ламели: а) вид сверху, б–в) вид сбоку

же, как при контрольном культивировании на пластике (рис. 1в). Такой подход позволил существенно улучшить визуализацию сеток в замороженном состоянии в РЭИМ и четко определять места контактов клеток.

Методом крио-ФИП были получены ламели толщиной 100–200 нм. На рис. 2б,в показаны изображения ламели с размерами около $10 \times 10 \times 0.2$ мкм; в верхней части ламели наблюдается сохранившийся защитный слой платины (Pt). Таким образом, «прозрачными» для электронов являются центральные части клеток и клеточные контакты, а не только тонкие отростки клеток (толщиной менее 300 нм).

На рис. 3 представлены срезы томограмм, на которых различимы компоненты цитоскелета кератиноцитов, а также рибосомные субъединицы. Толщина ламели в данном участке составляет около 100 нм. Наблюдаемые протяженные структуры были идентифицированы по форме и размеру. Диаметр наблюдаемых микротрубочек составляет около 25 нм, промежуточных кератиновых филаментов – 10 нм, микрофиламентов – 5 нм. Взаимное положение всех филаментов было определено на отдельных томограммах (рис. 4б), как и положение и ориентация рибосом и других цитоплазматических компонентов клетки (гранулы и микровези-

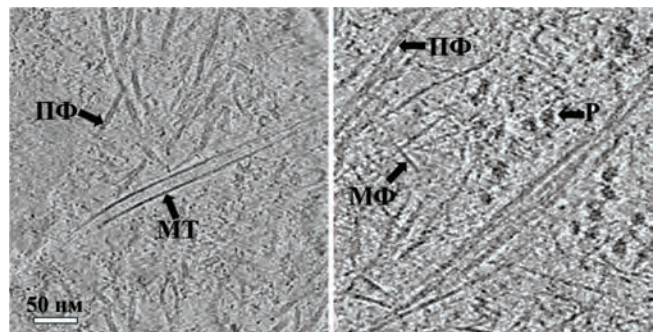


Рис. 3. Томографические срезы кератиноцитов, демонстрирующие рибосомы (Р) и элементы цитоскелета: микротрубочки (МТ), промежуточные филаменты (ПФ), актиновые микрофиламенты (МФ). Диаметр микротрубочек около 25 нм, промежуточных филаментов 10 нм, и микрофиламентов 5 нм

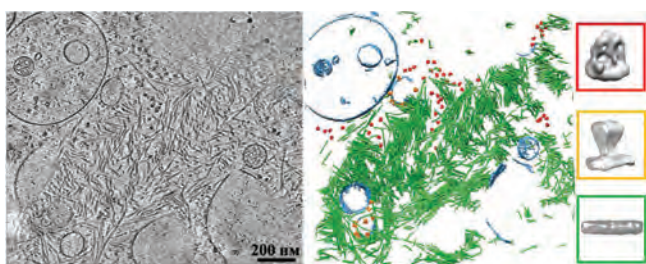


Рис. 4. а) томографический срез, показывающий взаимное расположение филаментов, гранул и микровезикул, и б) трехмерная модель томограммы. Синим цветом окрашены мембраны, оранжевым – мембранные белки, красным – рибосомы, зеленым – промежуточные филаменты; в) результаты субтомографического усреднения рибосом, мембранных белков и промежуточных филаментов с разрешением 4 нм

кулы – рис. 4а). Результаты субтомографического усреднения продемонстрировали, что даже при небольшом количестве копий объектов, присутствующих на отдельных томограммах, их гетерогенности в естественном клеточном окружении и отсутствии опорных меток (например, наночастиц золота, применяемых для выравнивания томографической серии), метод *in situ* криоэлектронной томографии позволяет получить трехмерные реконструкции с разрешением около 4 нм. Дальнейшая оптимизация экспериментальных методик позволит обеспечить субнанометровое разрешение реконструкций.

ВЫВОДЫ

Продемонстрирована возможность получения трехмерных реконструкций тонких срезов витрифицированных препаратов кератиноцитов, выращенных на микроскопических сеточках. Показано, что применение субтомографического усреднения для повторяющихся структурных элементов позволяет получать экспериментальные данные с высоким пространственным разрешением, а также проводить анализ их взаимного расположения и конформационных состояний. Отсутствие воздействия жестких фиксаторов и сохранение внутриклеточного водного баланса при использовании метода *in situ* криоэлектронной томографии позво-

ляет сохранить исходную топографию цитоплазматического расположения клеточных органелл и их микроструктуру.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский Институт» (приказ от 02.07.2020 №1056).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Grunewald, O. Medalia, A. Gross et al. // *Biophys Chem*, 100 (2003), pp. 577–591.
2. J. Kurner, A.S. Frangakis, W. Baumeister // *Science*, 307 (2005), pp. 436–438.
3. G.E. Murphy, J.R. Leadbetter, G.J. Jensen et al. // *Nature*, 442 (2006), pp. 1062–1064.
4. Brooke M.A., Nitoiu D., Kellsell D.P. // *Cell-cell connectivity: desmosomes and disease. J Pathol.* 2012 Jan.; 226(2):158–71.
5. M. Barcena, G.T. Oostergetel, W. Bartelink, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106 (2009), pp. 582–587.
6. A. de Marco, B. Muller, B. Glass et al. // *PLoS Pathog*, 6 (2010), p. e1001215.
7. K. Grunewald, P. Desai, D.C. Winkler et al. // *Science*, 302 (2003), pp. 1396–1398.
8. Камышинский Р.А., Чесноков Ю.М., Орехов А.С. // *Кристаллография*, 2020, т. 65, №5, с. 774. DOI: 10.31857/S0023476120050094.
9. B.F. McEwen, M. Marko // *J Histochem Cytochem*, 49 (2001), pp. 553–564.
10. K. Grunewald, P. Desai, D.C. Winkler, et al. // *Science*, 302 (2003), pp. 1396–1398.
11. J. Liu, A. Bartesaghi, M.J. Borgnia, et al. // *Nature*, 455 (2008), pp. 109–113.
12. Romanova O.A., Tenchurin T.H., Demina T.S. et al. // *Cell Prolif.* 2019, 52, 3.
13. A. Ishida-Yamamoto, S. Igawa, M. Kishibe et al. // *J Dermatol*, 2018, v. 45, №4, pp. 385–389.
14. Wan W., Briggs J.A.G. // *Methods in Enzymology. 1st ed.* Elsevier Inc., 2016, v. 579, p. 329–367.
15. Bharat T.A.M., Scheres S.H.W. // *Nat. Protoc.* 2016, v. 11, №11, p. 2054–2065.