

ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПОЛИРИБОСОМ – СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД

©2018 г. Ж. А. АФОНИНА, В. А. ШИРОКОВ

Институт белка РАН, г. Пущино, Московская область

I. Введение. II. Криоэлектронная томография полирибосом. III. Структура полирибосом у прокариот. IV. Структура эукариотических полирибосом. V. Структура мембранно-связанных полирибосом. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Полирибосомы (полисомы) представляют собой группу из нескольких рибосом, связанных с одной молекулой мРНК и последовательно транслирующих ее в одном направлении [1–6]. Классическая схема полирибосомы изображает ее в виде «бусин» рибосом на «ниточке» мРНК. Однако, еще в самых ранних электронно-микроскопических (ЭМ) исследованиях было замечено, что в полисомах наблюдается характерная упорядоченная организация рибосом. При визуализации полирибосом с помощью классических ЭМ техник (ультратонкие срезы клеток, негативное и позитивное контрастирование, оттенение металлом) эукариотические полирибосомы выявлялись в форме двойных рядов, спиралей и колец [7–14] (рис. 1).

Кольцеобразные полирибосомы, впервые описанные Ричем с соавт. в 1963 [1], всегда представляли особый интерес для исследователей. Данная форма была показана как для свободных цитоплазматических, так и мембранно-связанных полирибосом эукариот [8–11]. Считается, что 5'- и 3'-концевые участки мРНК сближены в кольцевых полирибосомах благодаря взаимодействию белков, связанных с 5' и 3'-нетранслируемыми областями, и это обеспечивает более эффективную работу полирибосомы вследствие повторной инициации

Принятые сокращения: ЭМ – электронная микроскопия, крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия, крио-ЭТ – криоэлектронная томография, eIF – эукариотический фактор инициации, РАВР – поли(А)-связывающий белок, НТО – нетранслируемая область мРНК, н.о. – нуклеотидные остатки.

Адрес для корреспонденции: shirokov@vega.protres.ru

Публикация подготовлена при поддержке грантов РФФИ № 16-34-60148 и № 15-04-08649 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

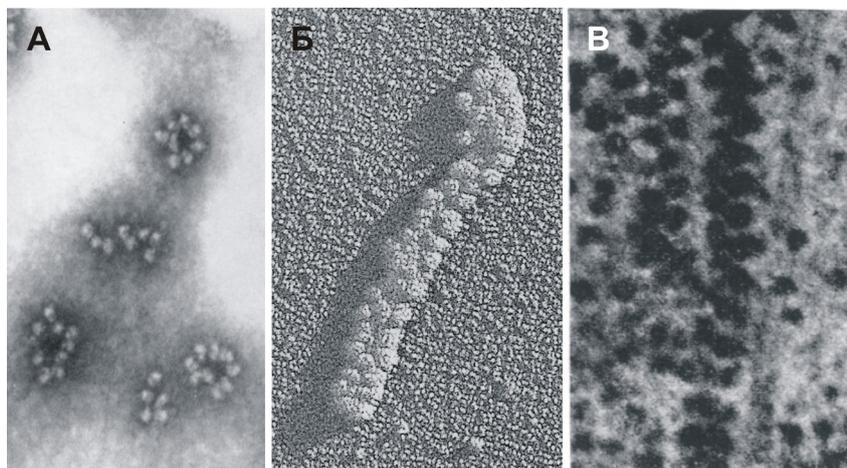


Рис. 1. Различные формы эукариотических полирибосом, визуализированных с помощью классической ЭМ (адаптировано с изменениями из работ [8, 20, 26]).

А – негативно контрастированный препарат полирибосом, изолированных из раковых клеток мышцы [8].

Б – оттененный платиной препарат полирибосом, сформированных в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы [20].

В – срез культивируемых клеток [26].

(реинициации) рибосом на той же самой мРНК после терминации трансляции [15–17]. Такая модель процесса циркулярной трансляции в эукариотических полирибосомах, называемая «closed-loop model», сегодня является общепризнанной [16]. Взаимодействие концов мРНК (через комплекс белков eIF4E–eIF4G–PABP, связывающих 5'-концевой кэп и 3'-поли(А)-последовательность) было прямо продемонстрировано с помощью атомно-силовой микроскопии для мРНК-белковых комплексов, не связанных с рибосомами [18].

Другая часто обнаруживаемая с помощью традиционной ЭМ форма полирибосом – двурядная. Двойные ряды полисомных рибосом часто интерпретировали как схлопнутые кольца, с топологически циркулярной (нековалентно замкнутой) мРНК, 5' и 3'-концы которой сближены и находятся на одном из торцов полирибосомы [12, 19–20]. В то же время, двумерные ЭМ изображения не позволяли исключить альтернативной – линейной конфигурации некоторой части двурядных полирибосом, с зигзагообразным ходом цепи мРНК (концы мРНК располагаются на разных торцах полирибосомы). Подобная конфигурация хорошо прослеживалась в двурядных линейных полирибосомах прокариот [21].

Одна из форм организации полирибосом, обнаруживаемая методами традиционной ЭМ в клетках при особых или неблагоприятных условиях роста – длинные плотноупакованные полирибосомы [22–25]. Такие полирибосомы авторы часто интерпретировали в виде 3-мерных спиралей (helix). В модели [26], построенной на основе ЭМ изображений полирибосом различной длины и ориентированных под разными углами в ультратонких срезах клеток, полирибосома была представлена в виде левозакрученной спирали с 4 рибосомами на виток, что впоследствии оказалось верным. Предположение о низкой трансляционной активности такого типа полирибосом было высказано рядом авторов [25, 27], в частности, наблюдавших накопление спиральных полирибосом при вирусной инфекции в эукариотических клетках, сопутствующее уменьшению скоростей синтеза белка и накопления вирусных частиц [25]. Таким образом, основные идеи о пространственной организации эукариотических полирибосом и ее возможной функциональной роли были заложены еще в ранних работах.

Следует отметить, однако, что фиксация, дегидратация, контрастирование и высушивание образца при приготовлении препарата полирибосом на ЭМ-подложке могли приводить к искажению реальной формы полирибосом. В последние десятилетия для изучения структуры аппарата трансляции у про- и эукариот широко используется быстро развивающийся метод криоэлектронной микроскопии. Приготовление препаратов для крио-ЭМ предполагает отсутствие стадий высушивания и контрастирования металлами, а макромолекулы, наоборот, замораживаются в буфере подходящего солевого состава и затем исследуются в слое аморфного льда. Методом анализа одиночных частиц (single particle analysis), разрешение которого на сегодняшний день почти достигло атомного, исследуют положение на рибосоме мРНК, тРНК, факторов трансляции. Структуру таких комплексов получают путем объединения в трехмерном пространстве большого числа (сотен тысяч) двумерных крио-ЭМ изображений одинаковых комплексов, зарегистрированных в различных проекциях. Другой подход криоэлектронной микроскопии – криоэлектронную томографию – используют для изучения макромолекулярных комплексов, имеющих уникальную структуру, таких как полирибосомы. На данный момент это единственный метод, позволяющий получить структуру полирибосом в условиях, приближенных к нативным, с разрешением порядка 25–50 Å [28–37]. При таком разрешении ориентация отдельных рибосом в полирибосоме может быть однозначно определена, что делает возможным проведение вероятного хода цепи мРНК в полирибосомах и, тем самым, определение их топологии.

II. КРИОЭЛЕКТРОННАЯ ТОМОГРАФИЯ ПОЛИРИБОСОМ

Полирибосомы были исследованы методом криоэлектронной томографии (крио-ЭТ) в виде образца, приготовленного из бесклеточной системы трансляции (*in vitro*) [28, 30–33], образца, выделенного из клеток [28, 34], либо с использованием клеточных срезов [36] или даже целых клеток (*in situ*) [29]. Препарат полирибосом для этого быстро замораживают при сверхнизкой температуре и проводят съемку в криоэлектронном микроскопе под разными углами, с диапазоном от -70° до $+70^\circ$. Полученную серию проекций реконструируют в трехмерную плотность (томограмму) [38]. Криоэлектронная томография полирибосом часто применяется в сочетании с субтомографическим анализом – совокупностью методов обработки данных, необходимых для извлечения из томограмм информации о локализации и ориентации рибосом. Если полирибосомы исследуются *in vivo*, в окружении других клеточных макромолекул, визуальная идентификация рибосом в томограмме бывает затруднена. Тогда для их локализации используется метод совмещения со стандартной структурой («template matching») [39–40], который находит соответствие между известной структурой рибосомы и плотностью рибосомы в томограмме [41].

Поскольку биологические макромолекулы очень чувствительны к облучению электронами, общая доза электронов, применяемая для съемки угловой серии, обычно не должна превышать $60\text{--}100\text{ e}/\text{\AA}^2$. Использование такой низкой дозы электронов приводит к относительно слабому сигналу от макромолекул в томограмме. Увеличения соотношения сигнал/шум и, как следствие, разрешения, по сравнению с исходным в томограмме, можно достичь, применив метод усреднения субтомограмм [42]. Субтомограммы, содержащие отдельные полисомные рибосомы, усредняют с привлечением внешней модели (известной структуры рибосомы) или без модели на основе метода максимального правдоподобия [42, 43]. Полученная усредненная рибосома (с разрешением $25\text{--}50\text{ \AA}$) вписывается в исходную томограмму в соответствии с найденными в процессе усреднения значениями сдвига и поворота для каждой из полисомных рибосом, что позволяет интерпретировать структуру полирибосом с точки зрения хода цепи мРНК. Основываясь на объективно определенном расположении полисомных рибосом и их взаимной ориентации, а также учитывая известное расположение мест входа и выхода мРНК в рибосоме [44, 45] оказывается возможным провести вероятный ход цепи мРНК в полирибосоме. Такой анализ позволяет сделать заключение о линейной или циркулярной топологии мРНК в полисоме.

III. СТРУКТУРА ПОЛИРИБОСОМ У ПРОКАРИОТ

Впервые крио-ЭТ анализ структуры полирибосом был применен для полисом *E.coli*, образованных *in vivo* и *in vitro* [28]. В бесклеточной системе трансляции в качестве мРНК использовали мРНК, кодирующие полную или укороченную люциферазу без стоп-кодона. На таких мРНК происходило образование длинных полирибосом, видимых на двумерных изображениях как двурядные. Томографический анализ полирибосом с последующим усреднением субтомограмм показал, что полирибосомы в основном имеют «синусоидальный» (зигзагообразный) или трехмерный спиральный ход цепи мРНК (рис. 2). Основные контакты между рибосомами реализуются между их малыми субчастицами. В случае «синусоидального» хода цепи происходит чередование двух типов контактов между 40S субчастицами – «голова к голове» и «голова к основанию» (top-to-top и top-to-bottom, рис. 2А). Для трехмерного спирального хода цепи мРНК характерен один тип контактов – «голова к голове». Анализ структуры полирибосом в лизатах сферопластов *E.coli* выявил наличие в них межрибосомных контактов, подобных описанным выше для полирибосом из бесклеточной системы трансляции. Таким образом, в исследованных прокариотических системах поли-

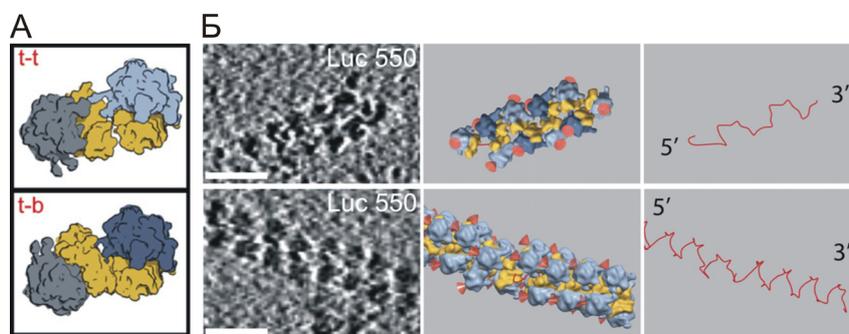


Рис. 2. Структурная организация прокариотических полирибосом по данным крио-ЭТ.

А – типы межрибосомных контактов (t-t – top-to-top, t-b – top-to-bottom).

Б – примеры плоской зигзагообразной (верхний ряд) и трехмерной спиральной полирибосом (нижний ряд); левая панель – срезы томограмм (масштабная метка – 50 нм), средняя панель – структуры полирибосом (40S субчастица обозначена желтым цветом, 60S – голубым, красным цветом показано место выхода пептида из рибосомного туннеля), правая панель – схемы вероятного хода цепи мРНК в соответствующих полирибосомах. Адаптировано с изменениями из работы [28].

рибосомы всегда имели линейную топологию мРНК. Эти данные согласуются с тем фактом, что 5' и 3'-концы мРНК у прокариот практически всегда разделены в пространстве: в то время как на 5' конце мРНК происходит формирование полирибосом, ее 3'-конец еще синтезируется РНК-полимеразой [46, 47].

IV. СТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ ПОЛИРИБОСОМ

Структурная организация эукариотических полирибосом была изучена методом крио-ЭТ *in situ* (в клетке) [29], в образце полирибосом, изолированных из клеток [34], и в препаратах полирибосом, полученных *in vitro* – в бесклеточных системах трансляции [30–33].

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИРИБОСОМ *IN SITU*

Анализ структуры полисом в интактной клетке представляет наибольший интерес. Клеточные полирибосомы *in situ* были исследованы в отростках клеток глиомы человека, имеющих небольшую толщину, до 200–400 нм [29]. Для этого клетки глиомы были выращены на ЭМ сетке и затем мгновенно заморожены для визуализации в крио-ЭМ и снятия угловых серий. В полученных томограммах визуальная детекция полирибосом была затруднена из-за наличия соседствующих монорибосом. Поэтому для идентификации полисомных рибосом был проведен анализ специфических контактов между соседними рибосомами. В результате было обнаружено 4 наиболее встречающихся типа контактов, которые были характерны для 25–30% всех полисомных рибосом. 2 из 4-х типов оказались сходны с контактом «голова к голове» (top-to-top), найденном для прокариотических полирибосом [28]. Компьютерное моделирование показало, что многократное повторение обнаруженных рибосомных контактов в модельной полирибосоме могло бы приводить к образованию нескольких вариантов укладок полисом, приводящих либо к трехмерной спиральной (helix), либо к плоской спиральной (spiral) конфигурации. Было подтверждено, что подобные укладки полирибосом действительно встречаются в томограммах. Так, были обнаружены плотноупакованные трехмерные спирали, а кроме того – плоские двурядные полирибосомы с переменной укладкой и линейной, в целом, топологией мРНК. Таким образом, исследование, проведенное *in situ*, показало наличие только топологически линейных эукариотических полирибосом [29]. Возможно, однако, что циркулярные полирибосомы не были обнаружены в клетках из-за отсутствия в них плотных межрибосомных контактов, на анализе которых базировалась идентификация полисом.

Структурная организация полирибосом в препаратах, выделенных из клеток MCF-7 центрифугированием в сахарозном градиенте, была проанализирована методом крио-ЭТ и атомно-силовой микроскопии [34]. В таких препаратах были найдены полирибосомы не только линейной, но и кольцеобразной конфигурации.

СТРУКТУРА ПОЛИРИБОСОМ *IN VITRO*

При трансляции мРНК в эукариотической бесклеточной системе трансляции происходит формирование полирибосом, сходных с клеточными полирибосомами [19, 20]. Использование таких систем позволяет, в отличие от клеточной ситуации, изучать полирибосомы, образованные на специфической мРНК, добавленной в систему трансляции. Это дает возможность исследовать связь структуры полирибосом с конструкцией используемой мРНК, в первую очередь, со свойствами ее 5'- и 3'-нетранслируемых областей (НТО).

Циркулярные эукариотические полирибосомы

Классический механизм циркуляризации мРНК в полирибосомах предполагает взаимодействие фактора инициации eIF4E и РАВР, связанных, соответственно, с 5'-концевым кэпом и 3'-поли(А)-хвостом, через фактор инициации eIF4G [16–17]. Образование кольцевой формы свободной (не в составе полисомы) кэпированной полиаденилированной мРНК при добавлении данных факторов было показано методом атомно-силовой микроскопии [18]. Кроме того, функциональные данные о взаимном усилении трансляции (синергизме) таких элементов мРНК, как 5'-кэп и 3'-поли(А)-хвост, также свидетельствуют в пользу существования данного взаимодействия в полирибосомах [48–52]. До настоящего времени, однако, не было получено прямых структурных доказательств того, что комплекс белков eIF4E–eIF4G–РАВР является причиной образования топологически циркулярных полирибосом.

Топологически циркулярные полирибосомы были обнаружены и впервые исследованы методом крио-ЭТ в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы [30–31, 33]. Система трансляции из зародышей пшеницы обладает важным преимуществом, которым является отсутствие в ней эндогенной мРНК и полирибосом. Используя данную систему, можно проследить за формированием полирибосом на добавляемой мРНК заданной конструкции в течение длительного времени [33]. Для проверки гипотезы об участии кэп-поли(А) взаимодействия в циркуляризации полирибосом, была проанализирована структура полирибосом, сформированных на

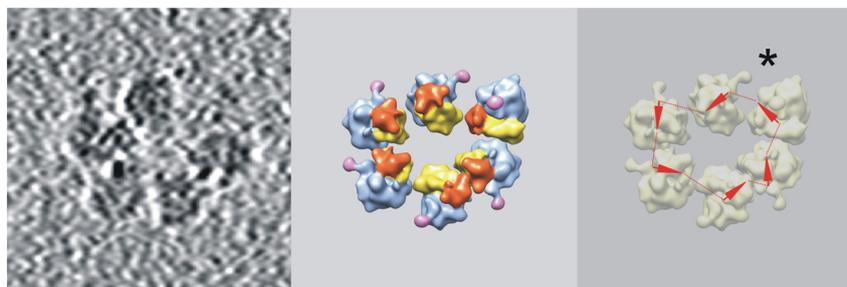


Рис. 3. Пример циркулярной полирибосомы, сформированной в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы на кэпированной мРНК без поли(А)-хвоста. Левая панель – срез томограммы, средняя панель – структура полирибосомы (головка 40S субчастицы обозначена красным, тело 40S субчастицы – желтым, 60S субчастица – голубым, Р-выступ – розовым цветом), правая панель – схема вероятного хода цепи мРНК в полирибосоме. Ориентация цепи мРНК в каждой рибосоме представлена стрелкой (в направлении от входа мРНК в рибосому к выходу из нее), предполагаемая последовательность прохождения мРНК через рибосомы показана пунктиром. Звездочкой обозначено вероятное место взаимодействия концов мРНК. Адаптировано из работы [31].

мРНК с различными НТО [31]. В случае кэпированной полиаденилированной мРНК было обнаружено, что значительная часть (около 40%) полисомных рибосом находятся в составе полирибосом с циркулярной топологией. Оказалось, однако, что и на кэпированной мРНК без 3' поли(А)-последовательности успешно образуются топологически циркулярные полирибосомы (рис. 3) в количестве, сравнимом с кэпированной полиаденилированной мРНК. Более того, сравнимое содержание циркулярных полирибосом было обнаружено и в системе трансляции мРНК с негомологичными 5'- и 3'-НТО, не содержащей кэпа и поли(А). Был сделан вывод, что взаимодействие кэпа и поли(А), опосредованное комплексом eIF4E–eIF4G–PABP, вероятно, не является единственным способом замыкания полисомной мРНК в кольцо. Авторы предположили, что в циркуляризации мРНК в полирибосомах может принимать участие взаимодействие компонентов инициаторного (вероятно, eIF3 и eIF4) и терминационного комплексов [31].

Структура двурядных полирибосом

Длительное время считалось, что полирибосомы эукариот, выявляемые на двумерном ЭМ изображении как двойные ряды рибосом, представляют собой кольца, в которых противоположные стороны схлопнуты и имеют антипараллельную укладку (циркулярная топология мРНК) [12, 19–20]. В то же время, можно было предположить, что мРНК проходит через двойной ряд рибосом по зигзагообразному (топологически линейному) пути и ее концы находятся на разных торцах полирибосомы. Недавние работы, посвященные крио-ЭТ структуре полирибосом у про- и эукариот, позволили наконец решить вопрос о топологии мРНК в двурядных полирибосомах. Первой появилась работа, где было доказано существование двурядных полирибосом с линейной топологией мРНК: такие полирибосомы, сформированные в бесклеточной системе трансляции *E.coli*, имеют синусоидальный (зигзагообразный) ход цепи мРНК [28].

В последующих работах по крио-ЭТ анализу структуры полирибосом, сформированных в бесклеточной системе трансляции из зародышей пшеницы [30, 33], было показано, что двурядные эукариотические полирибосомы могут иметь разную топологию. В одном и том же образце полирибосом обнаруживались циркулярные (кольцевидные) и двурядные полирибосомы в примерно равном соотношении, а также спиральные полирибосомы. При этом оказалось, что среди двурядных полирибосом топологически циркулярные полирибосомы (схлопнутые кольца) составляли лишь около 10%, остальные имели линейную (зигзагообразную) топологию мРНК [30]. Это свидетельствует о том, что в реальности (в замороженном растворе полирибосом) кольца циркулярных полирибосом схлопываются довольно редко. В то же время, в классической ЭМ большинство колец могут схлопываться при адсорбции на ЭМ подложках и приобретать вид двойных рядов, которыми они, как правило, и представлены на изображениях в этих случаях.

Трехмерные спиральные полирибосомы

Трехмерные спиральные полирибосомы – форма, обнаруживаемая методом крио-ЭТ как в про- [28], так и в эукариотических системах [29, 32]. В общих чертах про- и эукариотические трехмерные полирибосомы сходны и образуют плотноупакованные левозакрученные спирали с 4-мя рибосомами на виток, при этом 40S субчастицы смотрят внутрь спирали, а 60S субчастицы находятся снаружи (рис. 4А). Взаимное расположение соседствующих рибосом в таких

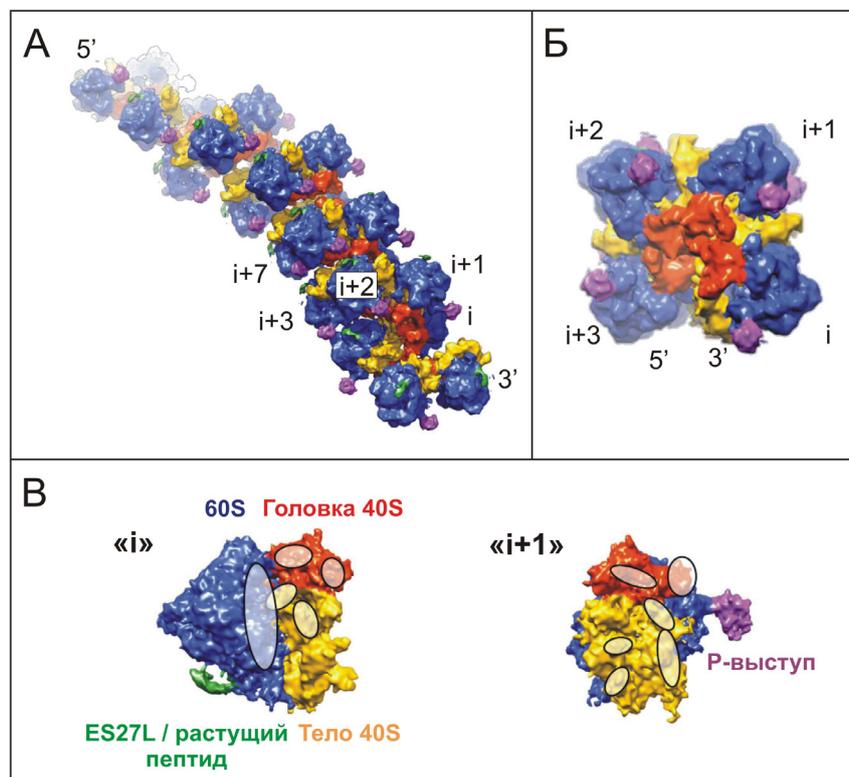


Рис. 4. Структура плотноупакованной трехмерной спиральной полирибосомы. Боковой вид (А) и вид вдоль оси спирали (Б, масштаб увеличен в 2 раза), $i+n$ – порядковый номер полисомной рибосомы в направлении от 3'-к 5'-концу мРНК. В – участки контакта между соседними рибосомами « i » и « $i+1$ » спиральной полирибосомы, изображенной на Рис. 4Б. Адаптировано с изменениями из работы [32].

полисомах описывается ориентацией «голова к голове», впервые описанной для прокариотических полисом [28]. Расположение рибосом в витке спирали в проекции напоминает укладку рибосом в кристалле [45], однако они упакованы более плотно (рис. 4Б).

Для того чтобы подробно описать контакты между рибосомами в трехмерных спиральных полирибосомах, в крио-ЭТ структуру спиральной полирибосомы, сформированной в пшеничной бесклеточной системе трансляции, была вписана кристаллическая структура дрожжевой рибосомы [32]. В результате были идентифицированы

рибосомные белки и элементы рРНК, формирующие межрибосомный контакт в спиральной полирибосоме. Основное взаимодействие имеет место между головками и телами 40S субчастиц соседствующих рибосом, в контакте также участвует область L1-выступа одной из рибосом (рис. 4B). Первый участок контакта включает в себя взаимодействие h16 (18S рРНК) 40S субчастицы рибосомы (i+1) (находящейся ближе к 5'-концу) с белком L1 60S субчастицы, а также с белками S11 и S26e 40S субчастицы рибосомы i (находящейся ближе к 3'-концу). Второй участок контакта опосредован взаимодействием головок 40S субчастиц соседних рибосом, где первая контактная область – это белок S10e и S12e рибосомы (i+1) и S7, S19e, S25e и дополнительный рРНК сегмент ES9^s рибосомы i, а вторая контактная область – S10 рибосомы (i+1) и RACK1 рибосомы i. Кроме взаимодействия соседних рибосом по цепи, возможно, существует также взаимодействие рибосом в соседних витках спирали. Так, из структуры видно, что плотность, соответствующая началу дополнительного сегмента ES27^L рРНК рибосомы в одном витке направлена в сторону Р-выступа рибосомы на один виток выше (в сторону 5'-конца мРНК) [32].

Присутствие различных структурных форм полирибосом в клетке могло бы отражать разнообразие транслируемых мРНК. В процессе трансляции в бесклеточной системе, однако, формирование различных форм полирибосом происходит на единственной используемой мРНК, что заставило предположить возможность структурных превращений полисом. В работе [33] было исследовано соотношение различных форм полирибосом в зависимости от времени инкубации системы. Максимальное количество циркулярных и зигзагообразных полирибосом обнаруживалось после короткого времени инкубации системы трансляции (первые несколько раундов трансляции), длительная работа системы приводила к формированию большого количества плотноупакованных трехмерных спиральных полирибосом. На основе статистики по соотношению структурных форм полирибосом и их загруженности рибосомами в разное время трансляции была предложена модель процесса формирования эукариотических полирибосом: 1) образуются короткие (≥ 100 нуклеотидных остатков (н.о.) мРНК на рибосому) циркулярные и зигзагообразные полирибосомы, 2) увеличение загруженности коротких полирибосом рибосомами (≤ 100 н.о. мРНК на рибосому) приводит к образованию небольших элементов трехмерной спиральной организации в их структуре, что является причиной расцикливания циркулярных полирибосом и их трансформации в линейные зигзагообразные полирибосомы, 3) в результате дальнейшего заполнения

зигзагообразных полирибосом рибосомами они превращаются в плотноупакованные трехмерные спирали (30–60 н.о. мРНК на рибосому). Такая плотная упаковка рибосом, вероятно, может являться причиной малой трансляционной активности спиральных полирибосом [33].

V. СТРУКТУРА МЕМБРАННО-СВЯЗАННЫХ ПОЛИРИБОСОМ

В отличие от цитозольных, полирибосомы, связанные с мембранными структурами, локализованы в 2-мерном пространстве поверхности мембраны, что ограничивает возможные способы межрибосомных контактов в них. Структура мембранно-связанных полирибосом определяется, в первую очередь, связью растущего пептида с транслоконом. Структура связанных с мембранами полирибосом была исследована методом крио-ЭТ в препарате микросом из поджелудочной железы собаки [35], а также в тонкой ламелле, приготовленной из клетки HeLa методом крио обработки фокусированным ионным пучком (FIB) [36]. Как и можно было ожидать, рибосомы оказались универсально направлены к мембране стороной, где находится выход рибосомного туннеля. В контакте рибосомы с мембраной участвуют, в частности, дополнительные сегменты 28S рРНК ES27L и ES7L. Следующая по цепи рибосома, как правило, повернута относительно предыдущей и рибосомы вдоль мРНК расположены так, что сайты входа и выхода мРНК в соседних рибосомах образуют плавный путь [35]. В целом взаимное расположение рибосом напоминает форму плоской спирали (spiral), что согласуется с данными ранних работ. Аналогичная организация мембранно-связанных полирибосом была обнаружена также в дрожжевых митохондриях. Интересно, что и в этом случае один из контактов рибосомы с мембраной образован дополнительным сегментом 96-ES1 21S рРНК [37].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование крио-ЭТ для исследования структуры полирибосом позволило определить топологию мРНК в циркулярных, двурядных и спиральных полирибосомах и описать детали взаимодействия между рибосомами в полисомах. Полученные результаты позволили также сделать важные функциональные выводы и предположения.

Оказалось, что кэп-структура и поли(А)-последовательность в мРНК не обязательны для образования циркулярных полирибосом, как это ранее предполагалось в рамках общепринятой модели циркулярной трансляции. Это заставляет допустить существование другого, возможно, более общего механизма циркуляризации. Например, такой механизм может быть основан на взаимодействии компонентов инициаторного и терминационного или посттерминационного комплексов. Возможным кандидатом для такого взаимодействия может быть белок ABCE1, который участвует в рециклинге, взаимодействуя с терминировавшей 80S рибосомой [53], а также, вероятно, имеет сродство к факторам инициации eIF2, eIF3, eIF5 [54, 55]. Более того, нельзя исключить, что специфика расположения участков входа и выхода мРНК на рибосоме, вызывающая поворот каждой следующей рибосомы на определенный угол при контактах в полирибосоме (как это найдено в структуре мембранных и цитоплазматических полисом, [29, 35–36]), может сама по себе способствовать формированию циркулярной конфигурации. В целом, все три механизма могут действовать одновременно, обеспечивая динамическое циркулярное состояние полирибосомы, необходимое для эффективной реинициации и циркулярной трансляции.

Трехмерные спиральные полирибосомы – тип организации, обнаруженный методом крио-ЭТ как у про-, так и эукариот. Плотная упаковка рибосом в таких полисомах может определять их сниженную трансляционную активность, что может служить элементом регуляции скорости трансляции или, при необходимости, ее полной остановки для сохранения и последующего быстрого рестарта. «Остановленные» полирибосомы были обнаружены недавно в клетках саркомы методом флуоресцентной микроскопии [56]. Временная остановка транслирующих полирибосом может быть необходима для переноса полирибосом в определенный компартмент клетки, где далее происходит их ре-активация. Такой механизм был предположен для полирибосом, транслирующих синаптические мРНК в нервных клетках. Преимуществом данного механизма является быстрый локальный синтез белков, участвующих в синаптической передаче

сигналов [57]. Кроме того, подобная модель возможно реализуется в полирибосомах, транслирующих специфические для дендритов мРНК. Было показано, что транспорт мРНК с 3'-нетранслируемой областью гена *Arc*, определяющей ее локализацию в дендритах, происходит уже после того, как на ней образовались полирибосомы [58]. Образование трехмерных спиральных полирибосом ранее наблюдали при вирусной инфекции, связывая их образование с понижением уровня трансляции в инфицированных клетках [25].

Полирибосома, как совокупность нескольких транслирующих рибосом, может обеспечивать ко-трансляционное формирование олигомерных белковых комплексов с использованием полипептидных цепей, синтезируемых соседними рибосомами. Такой механизм, как предполагается, имеет место при образовании тетрамера β -галактозидазы [59] и при формировании так называемых «сводчатых частиц» (vault particles), состоящих из 78 копий белка MVP (95,8 kDa) [60].

Современное развитие метода крио-ЭТ идет в направлении разработки новых технических решений для повышения разрешения (фазовая пластинка, камеры прямой детекции электронов, новые программы анализа структурных данных), для исследования клеточных структур *in situ*; новая техника совмещает флуоресцентную и электронную микроскопию в одном приборе (коррелятивная микроскопия). Это, несомненно, обеспечит скорый прогресс в исследовании механизмов формирования трехмерной организации полирибосом и в изучении ее вклада в регуляцию и локализацию синтеза белка в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Warner, J.R., Rich, A., Hall, C.E. (1962) Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. *Science*, **138**, 1399–1403.
2. Warner, J.R., Knopf, P.M., and Rich, A. (1963) A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 122–129.
3. Rich, A., Warner, J.R. and Goodman, H.M. (1963) The structure and function of polyribosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 269–285.
4. Gierer, A. (1963) Function of aggregated reticulocyte ribosomes in protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, **6**, 148–157.
5. Wettstein, F.O., Staehelin, T., and Noll, H. (1963) Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: characterization of the ergosome. *Nature*, **197**, 430–435.
6. Penman, S., Scherrer, K., Becker, Y., and Darnell, J.E. (1963) Polyribosomes in normal and poliovirus-infected HeLa cells and their relationship to messenger-RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **49**, 654–662.
7. Palade, G.E. (1955) A small particular component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 59–68.

8. Shelton, E. and Kuff, E.L. (1966) Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.*, **22**, 23–31.
9. Mathias, A.P., Williamson, R., Huxley, H.E., Page, S. (1964) Occurrence and function of polysomes in rabbit reticulocytes. *J. Mol. Biol.*, **9**, 154–167.
10. Yazaki, K., Yoshida, T., Wakiyama, M., Miura, K. (2000) Polysomes of eukaryotic cells observed by electron microscopy. *J. Electron Microscopy* (Japan), **49**, 663–668.
11. Christensen, A.K., Kahn, L.E., Bourne, C.M. (1987) Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat anterior pituitary. *Am. J. Anat.*, **178**, 1–10.
12. Christensen, A.K. and Bourne, C.M. (1999) Shape of large bound polysomes in cultured fibroblasts and thyroid epithelial cells. *Anat. Rec.*, **255**, 116–129.
13. Behnke, O. (1963) Helical arrangement of ribosomes in the cytoplasm of differentiating cells of the small intestine of rat fetuses. *Exp. Cell Res.*, **30**, 597–598.
14. Waddington, C.H., Perry, M.M. (1963) Helical arrangement of ribosomes in differentiating muscle cells. *Exp. Cell Res.*, **30**, 599–600.
15. Philipps, G.R. (1965) Haemoglobin synthesis and polysomes in intact reticulocytes. *Nature*, **205**, 567–570.
16. Jacobson, A. (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. In *Translational Control* (Hershey J.W.B., Mathews M.B., Sonenberg N., eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp. 451–480.
17. Preiss, T., and Hentze, M. W. (1999) From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 515–521.
18. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell*, **2**, 135–140.
19. Madin, K., Sawasaki, T., Kamura, N., Takai, K., Ogasawara, T., Yazaki, K., Toshiaki, T., Takei, T., Miura, K., Endo, Y. (2004) Formation of circular polyribosomes in weat germ cell-free protein synthesis system. *FEBS Lett.*, **562**, 155–159.
20. Kopeina, G.S., Afonina, Z.A., Gromova, K.V., Shirokov, V.A., Vasiliev, V.D., Spirin, A.S. (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2476–2488.
21. Slayter, H., Kiho, Y., Hall, C., Rich, A. (1968) An electron microscopic study of large bacterial polyribosomes. *J. Cell Biol.*, **37**, 583–590.
22. Rosenbaum, R.M., Wittner, M. (1970) Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. *J. Cell Biol.*, **45**, 367–382.
23. Kusamrarn, T., Sobhon, P., Bailey, G.B. (1975) The mechanism of formation of inhibitor-induced ribosome helices in *Entamoeba invadens*. *J. Cell Biol.*, **65**, 529–539.
24. Jensen, W.A. (1968) Cotton embryogenesis. Polysome formation in the Zygote. *J. Cell Biol.*, **36**, 403–406.
25. Djaczenko, W., Benedetto, A., Pezzi, R. (1970) Formation of helical polyribosomes in poliovirus-infected cells of the 37 RC line. *J. Cell Biol.*, **45**, 173–177.
26. Weiss, P., Grover, N.B. (1968) Helical array of polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 763–768.

27. Wooding, F.B. (1968) Ribosome helices in mature cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **24**, 157–164.
28. Brandt, F., Etchells, S.A., Ortiz, J.O., Elcock, A.H., Hartl, F.U., Baumeister, W. (2009) The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell*, **136**, 261–271.
29. Brandt, F., Carlson, L.A., Hartl, F.U., Baumeister, W., Grunewald, K. (2010) The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells. *Mol. Cell*, **39**, 560–569.
30. Afonina, Zh.A., Myasnikov, A.G., Khabibullina, N.F., Belorusova, A.Y., Menetret, J.-F., Vasiliev, V.D., Klaholz, B.P., Shirokov, V.A., Spirin, A.S. (2013) Topology of mRNA chain in isolated eukaryotic double-row polyribosomes. *Biochemistry (Mosc)*, **78**, 445–454.
31. Afonina, Z.A., Myasnikov, A.G., Shirokov, V.A., Klaholz, B.P., Spirin, A.S. (2014) Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly(A)-tail: a cryo electron tomography study. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9461–9469.
32. Myasnikov, A.G., Afonina, Z.A., Menetret, J.-F., Shirokov, V.A., Spirin, A.S., Klaholz, B.P. (2014) The molecular structure of the left-handed supra-molecular helix of eukaryotic polyribosomes. *Nature Commun.*, **5**, 5294.
33. Afonina, Z.A., Myasnikov, A.G., Shirokov, V.A., Klaholz, B.P., Spirin, A.S. (2015) Conformation changes of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 618–628.
34. Viero, G., Lunelli, L., Passerini, A., Bianchini, P., Gilbert, R.J., Bernabò, P., Tebaldi, T., Diaspro, A., Pederzoli, C., Quattrone A. (2015) Three distinct ribosome assemblies modulated by translation are the building blocks of polysomes. *J. Cell Biol.*, **208**, 581–596.
35. Pfeffer, S., Brandt, F., Hrabe, T., Lang, S., Eibauer, M., Zimmermann, R., Förster, F. (2012) Structure and 3D arrangement of endoplasmic reticulum membrane-associated ribosomes. *Structure*, **20**, 1508–1518.
36. Mahamid, J., Pfeffer, S., Schaffer, M., Villa, E., Danev, R., Cuellar, L.K., Förster, F., Hyman, A.A., Plitzko, J.M., Baumeister, W. (2016) Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science*, **351**, 969–972.
37. Pfeffer, S., Woellhaf, M.W., Herrmann, J.M., Förster, F. (2015) Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. *Nat. Commun.*, **26**, 6019.
38. Lucić, V., Förster, F., Baumeister, W. (2005) Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 833–865.
39. Bohm, J., Frangakis, A.S., Hegerl, R., Nickell, S., Typke, D., Baumeister, W. (2000) Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14245–14250.
40. Frangakis, A.S., Böhm, J., Förster, F., Nickell, S., Nicastro, D., Typke, D., Hegerl, R., Baumeister, W. (2002) Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14153–14158.
41. Ortiz, J.O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A.A., Baumeister, W. (2006) Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. *J. Struct. Biol.*, **156**, 334–341.

42. Wan, W., Briggs, J.A. (2016) Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging. *Methods Enzymol.*, **579**, 329–367.
43. Scheres, S.H., Melero, R., Valle, M., Carazo, J.M. (2009) Averaging of electron subtomograms and random conical tilt reconstructions through likelihood optimization. *Structure*, **17**, 1563–1572.
44. Evstafieva, A.G., Shatsky, I.N., Bogdanov, A.A., Semenov, Y.P., Vasiliev, V.D. (1983) Localization of 5' and 3' ends of the ribosome-bound segment of template polynucleotides by immune electron microscopy. *EMBO J.*, **2**, 799–804.
45. Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H., Noller, H.F. (2001) The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell*, **106**, 233–241.
46. Miller, O.L. Jr., Hamkalo, B.A., Thomas, C.A. Jr. (1970) Visualization of bacterial genes in action. *Science*, **169**, 392–395.
47. Kohler, R., Mooney, R.A., Mills, D.J., Landick, R., Cramer, P. (2017) Architecture of a transcribing-translating expressome. *Science*, **356**, 194–197.
48. Gallie, D.R. (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.*, **5**, 2108–2116.
49. Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C. C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J., and Gallie, D.R. (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16247–16255.
50. Tarun, S. Z. J., and Sachs, A. B. (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.*, **15**, 7168–7177.
51. Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.*, **17**, 7480–7489.
52. Borman, A.M., Michel, Y.M., Malnou, C. E., and Kean, K.M. (2002) Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J. Biol. Chem.*, **277**, 36818–36824.
53. Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U., Pestova, T.V. (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell*, **37**, 196–210.
54. Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C.A., Qiu, H., Hinnebusch, A.G. (2004) The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42157–42168.
55. Chen, Z.Q., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A.G., Dean, M. (2006) The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.*, **281**, 7452–7457.
56. Yan, X., Hoek, T.A., Vale, R.D., Tanenbaum, M.E. (2016) Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell*, **165**, 976–989.
57. Graber, T.E., Hébert-Seropian, S., Khoutorsky, A., David, A., Yewdell, J.W., Lacaille, J.C., Sossin, W.S. (2013) Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16205–16210.
58. Wang, C., Han, B., Zhou, R., Zhuang, X. (2016) Real-Time Imaging of Trans-

- lation on Single mRNA Transcripts in Live Cells. *Cell*, **165**, 990–1001.
59. Kiho, Y. and Rich, A. (1964) Induced Enzyme Formed on Bacterial Polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 111–118.
60. Mrazek, J., Toso, D., Ryazantsev, S., Zhang, X., Zhou, Z.H., Fernandez, B.C., Kickhoefer, V.A., Rome, L.H. (2014) Polyribosomes are molecular 3D nanoprinters that orchestrate the assembly of vault particles. *ACS Nano*, **8**, 11552–11559.