

УДК 577.3

## ИССЛЕДУЯ СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ПОЛИРИБОСОМ С АЛЕКСАНДРОМ СПИРИНЫМ

© 2021 В.Р. Klaholz<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Centre for Integrative Biology (CBI), Department of Integrated Structural Biology, IGBMC (Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology), 67404 Illkirch, France; e-mail: klaholz@igbmc.fr

<sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104, 67404 Illkirch, France

<sup>3</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, 67404 Illkirch, France

<sup>4</sup> Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

Поступила в редакцию 20.05.2021

После доработки 20.05.2021

Принята к публикации 06.06.2021

«Возможно ли исследовать молекулярные механизмы и структурную организацию полирибосомных комплексов, используя криоэлектронную томографию?» – этим вопросом мы задавались на протяжении всего многолетнего сотрудничества между моей научной группой и командой Александра Сергеевича Спирина. И действительно, это оказалось возможным. Мы обнаружили, что двурядные полисомы могут иметь и циркулярную, и линейную конфигурацию мРНК (Afonina Z.A., et al. (2013) *Biochemistry (Moscow)*); выяснили, как эукариотические рибосомы образуют на мРНК супрамолекулярные левозакрученные спирали (Myasnikov A.G., et al. (2014) *Nat. Commun.*); продемонстрировали, что циркуляризация полирибосом происходит независимо от поли(А)-последовательности и кэп-структуры (Afonina Z.A., et al. (2014) *Nucleic Acids Res.*); показали, что существуют промежуточные полирибосомы с открытыми структурами, представляющие переход из ювенильной фазы к формированию активно транслирующей полисомы среднего размера (Afonina Z.A., et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*), впоследствии переходящих в форму плотно упакованных спиральных структур со снижением активности. Таким образом, наши совместные плодотворные исследования привели к значительным достижениям в этой области, которые будут рассмотрены в этой статье с личной и исторической точки зрения в память об Александре Сергеевиче Спирине.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полирибосомы, полисомы, эукариотические рибосомы, криоэлектронная микроскопия, криоэлектронная томография.

DOI: 10.31857/S0320972521090037

### ВВЕДЕНИЕ

«Исследовать и понять структуру трехмерной организации эукариотических полирибосом – станет ли это когда-нибудь возможным?» – такие мысли могли приходить на ум, когда мы только начинали это делать в сотрудничестве с Александром Спириным в 2007 г. Полирибосомы (также называемые полисомами) были впервые визуализированы еще в середине 1960-х гг., в частности в ранней работе Warner [1, 2], в форме спиральных структур [3], но их трехмерная организация оставалась загадкой.

Впервые я встретился с Александром Сергеевичем Спириным на симпозиуме, посвященном его 70-летию, в Пущино в сентябре 2001 г.; казалось бы, достаточно поздно, но на самом де-

ле – не поздно никогда (я находился в то время на позиции постдока). Эта встреча была незабываемой, превосходной – с научной точки зрения, а также впечатляющей тем, как прорывные научные исследования Спирина распространились на множество научных групп, работающих по всему миру, и привели к выявлению молекулярных механизмов, лежащих в основе процесса биосинтеза белка.

Через несколько лет мы снова встретились, теперь уже на семинаре, который Спирин проводил в Институте генетики, молекулярной и клеточной биологии (IGBMC) в Страсбурге (Илькирш, Франция) в октябре 2007 г. (по приглашению Марата Юсупова). Находясь под впечатлением от его последней работы на тему «Поэтапное образование эукариотических двурядных полирибосом и циркулярная трансляция полисомной мРНК» (которая вскоре была опубликована в *Nucleic Acids Res.* [4]), я стал обсуждать со Спириным тему полирибосом. Возможно ли именно увидеть трехмерную структуру эу-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ЭТ – криоэлектронная томография; SECF – бесклеточная система с непрерывным обменом (continuous-exchange cell-free system).

кариотических полирибосом и ответить на некоторые из фундаментальных вопросов, таких как: каким образом отдельные рибосомы располагаются на молекуле мРНК, взаимодействуют ли они друг с другом, какова общая архитектура эукариотических полисом, как обстоят дела с циркуляризацией мРНК, специфичностью регуляции трансляции у эукариот, локализацией 5'- и 3'-концов, работой факторов трансляции, динамикой сборки рибосом, и др.? Мы обстоятельно всё обсудили и решили, что у нас есть всё необходимое для такой работы: прекрасная биохимия и возможность приготовления транслирующих полирибосом из проростков зародышей пшеницы в различных условиях, а также технические возможности для их визуализации и структурного анализа.

Один из основных путей к пониманию механизма функционирования рибосомы заключается в буквальной визуализации рибосомы в процессе её работы. В то время изучение структуры рибосом в основном сводилось к анализу изолированных рибосом с использованием рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии с анализом отдельных частиц (крио-ЭМ). Тем не менее поиск ответа на вопрос о том, как работает комплекс рибосом, будучи связанным с молекулой мРНК с формированием цепи, требовал прямой визуализации процесса и реконструкции трехмерной структуры большого макромолекулярного комплекса, состоящего из серии рибосом. Мы обсуждали возможность проведения структурного анализа полисом с помощью метода криоэлектронной томографии (крио-ЭТ), использовав тогда для анализа на клеточном уровне (начиная с первых работ в лаборатории W. Baumeister ([5] и многие другие статьи), но в то время ещё не применявшегося для анализа отдельных частиц или их комплексов (2007 год).

Тогда мы находились в процессе инсталляции первого во Франции криоэлектронного микроскопа высокого разрешения «Polara» производства компании «FEI» (Нидерланды) в недавно отремонтированном здании Европейского центра биологии и структурной геномики (CEBGS – Centre Européen de Biologie et Génomique Structurale), на базе которого была организована новая платформа для исследований в области структурной биологии, что вскоре привело к созданию Центра интегративной биологии (CBI – Centre for Integrative Biology, Илькирш, Франция) в 2014 г., где в настоящее время располагаются инфраструктуры FRISBI, Instruct-ERIC и iNEXT-Discovery, обеспечивающие технологическую поддержку исследований в интегрированной структурной биологии на са-

мом передовом уровне. В этом криоэлектронном микроскопе высокого разрешения была установлена первая трансферная система для загрузки, отбора и анализа нескольких образцов; ПЗС-камера, которая позволила отказаться от утомительной работы с пленкой, облегчив, или скорее, фактически позволив получать томографические данные в автоматическом режиме; а также стабильный гониометр, позволивший проводить съемку угловых серий (гораздо более стабильный, чем классические микроскопы с боковым входом). Вскоре микроскоп «Polara» был модернизирован, в ходе чего в его составе появилась камера первого поколения для прямой детекции электронов («Falcon 1»), которая обладала значительно большей чувствительностью и имела запоминающее устройство, работающее на транзисторах. Кроме того, в ней имелась специальная система держателя образцов, которая позволяла выполнять регистрацию в режиме одно- и двухосевой томографии (с использованием устройства типа флип-флоп для поворота образца в плоскости перед съемкой второй угловой серии). Система обработки изображений позволяла получать реконструкцию трехмерной структуры из серии угловых изображений, полученных для конкретного участка замороженного и гидратированного, и таким образом сохраненного образца (что позволяло преодолеть ограничения, накладываемые методом электронной микроскопии с негативным контрастированием).

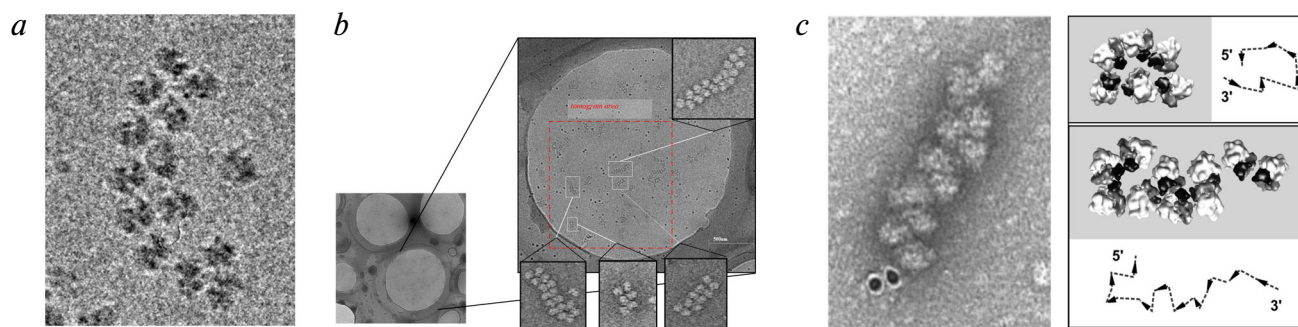
Поскольку с помощью крио-ЭМ сложно работать с образцами большой толщины, к тому же не обеспечивающими достаточного контраста при получении изображения, нам необходимо было найти способ приготовления соответствующих образцов, в идеале так, чтобы можно было получать образцы с небольшой толщиной непосредственно в процессе криоохлаждения («замораживания» без образования кристаллов льда, вместо которых формируется прозрачный лед аморфной структуры) решёток для проведения крио-ЭМ, как при анализе отдельных частиц. И это действительно стало возможным – благодаря работе с полисомами, полученными в бесклеточной системе, разработанной Александром Спириным еще несколько десятилетий тому назад [6]. Полисомы получали в системе трансляции из проростков пшеницы – бесклеточной системе с непрерывным обменом (CECF – continuous-exchange cell-free system) [4, 7] с применением конструкции мРНК β-глобина с белком GFP (зеленый флуоресцентный белок), а также конструкций с поли(А)-хвостом, и др. [8]. Полисомы фракционировали путём гель-хроматографии с использованием упаков-

ванной Сефакрилом колонки, вручную с помощью пипетки [9], что обеспечивало нас достаточным количеством продукта для приготовления препарата на решётках для крио-ЭМ, в отличие от фракционирования в градиенте сахарозы, которое вместо этого было использовано для седиментационного анализа и характеристики полисом; позднее мы научились работать непосредственно с клеточными экстрактами, что способствовало получению интактных и более однородных комплексов. Наше сотрудничество привело к ряду важных достижений и получению новых результатов (в обобщенном виде они показаны на рис. 1–4).

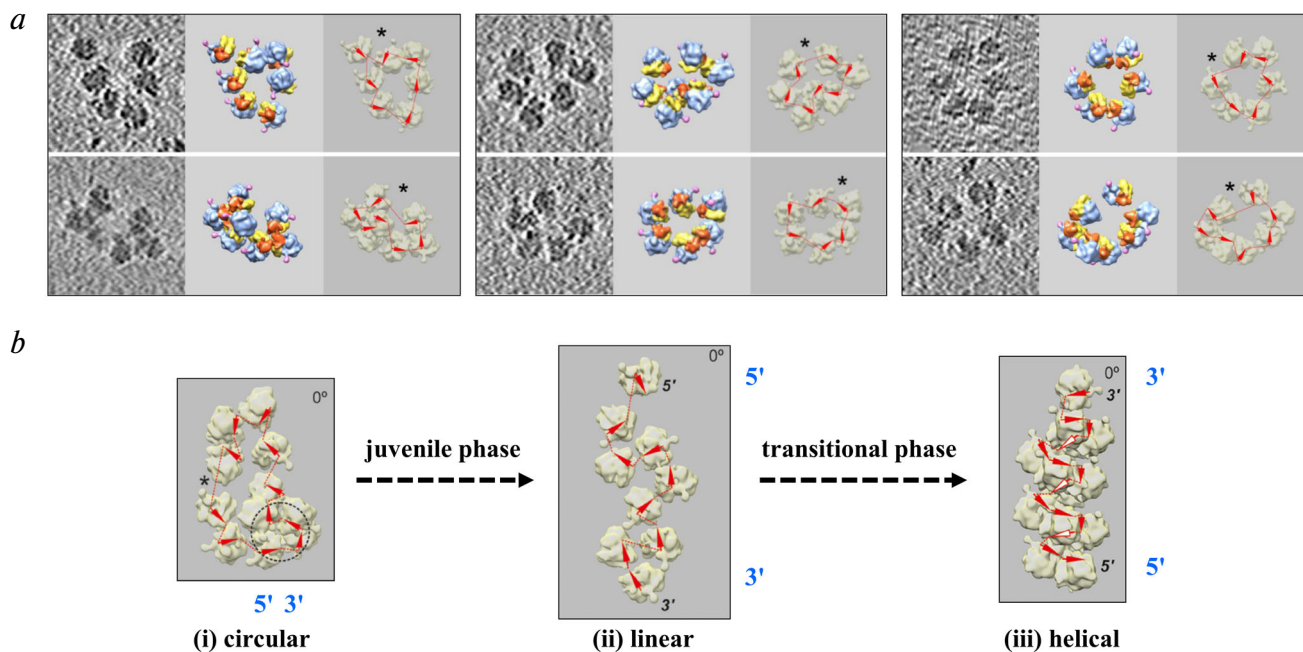
В нашей первой совместной работе мы исследовали путь молекулы мРНК внутри эукариотической полирибосомы, «пометив» её 5'-конец добавленными 40S субъединицами, а 3'-конец — наночастицами золота. Визуализацию проводили с помощью крио-ЭМ и крио-ЭТ (с использованием ускоряющего напряжения, равного 150 кВ, для повышения контрастности изображения). При проведении реконструкции томограмм отдельные рибосомы были вырезаны и выравнены, т.е. обработаны путем усреднения субтомограмм для улучшения соотношения сигнал/шум. Карты усреднённой плотности для каждой рибосомы были использованы при реконструкции расположения рибосом внутри полисомы (с корректными параметрами вращения и трансляции). В результате была получена 3D-реконструкция целой полисомы, в которой было возможно визуализировать взаимную ориентацию каждой рибосомы по отношению друг

к другу. Таким образом было продемонстрировано, что 40S субъединицы рибосом направлены вовнутрь, а 60S субъединицы — наружу, опосредуя направленность (5'→3') хода цепи мРНК. По результатам этого анализа было выявлено, что двурядные полирибосомы в одном образце могут иметь как циркулярную, так и линейную (подобную зигзагу) топологию мРНК [8].

Для оптимизации сбора данных с помощью крио-ЭТ в дальнейшем мы провели сравнительный анализ одно- и двухосевой томографии. Классический подход при использовании крио-ЭТ заключается в получении данных серии изображений под одним углом, что приводит к возникновению артефактов в 3D-реконструкциях ввиду систематического отсутствия угловых изображений (т.н. эффект «отсутствующего клина»). Более того, изображения, полученные с помощью крио-ЭМ, характеризуются низким значением соотношения сигнал/шум ввиду ограничения дозы из-за риска повреждения образцов под действием радиации. Сочетание первого набора данных со второй серией изображений, полученной после вращения образца в плоскости, позволяет сократить объём недостающих данных с клина до пирамиды, что обеспечивает снижение уровня искажений при 3D-реконструкции и улучшение соотношения сигнал/шум. Применительно к полисомам и отдельным рибосомам (первая крио-ЭТ визуализация отдельных частиц), этот подход позволяет получить значительно улучшенные 3D-реконструкции и карты, более простые в интерпретации [9].



**Рис. 1.** *a, b* — Визуализация полирибосом из проростков пшеницы с помощью криоэлектронного микроскопа в условиях заморозки, т.е. в интактном и неокрашенном виде. Изображение, полученное с использованием крио-ЭМ, демонстрирует полисому, на которой была произведена первая попытка аннотации спирали (ноябрь 2008 г., *a*), незадолго до получения первых изображений с помощью крио-ЭТ (декабрь 2008 г., *b*). На небольшом рисунке показан участок криоэлектронной решётки с несколькими отверстиями, одно из которых было использовано для съёмки нескольких угловых серий в различных участках отверстия (отмечены белыми прямоугольниками; тёмные точки — это частицы золота, используемые в качестве координатных маркеров). На вставке показаны центральные секции трехмерной реконструкции полисомы различного размера. *c* — Для двурядных полирибосом показано существование как циркулярной, так и линейной топологии мРНК [9]. Изображение, полученное с помощью электронной микроскопии с негативным окрашиванием 3'-конца наночастицами золота (слева) и аннотация рибосомных частиц (40S субъединицы рибосомы показаны тёмным цветом, 60S — светлым), основанная на 3D-реконструкции, полученной с помощью крио-ЭТ. Эта аннотация позволила описать ход цепи мРНК и её 5'→3' направленность. Изображения представлены с разрешения «Oxford University Press»



**Рис. 2.** *a* – Образование циркулярных полирибосом на эукариотической мРНК без кэп-структуры и поли(А)-хвоста, что было подтверждено путём сравнения полисом, содержащих кэпированную и полиаденилированную мРНК (слева), кэпированную и неполиаденилированную мРНК (по центру), некэпированную и неполиаденилированную мРНК (справа). Эти данные продемонстрировали, что циркуляризация полирибосом происходит независимо от поли(А)-хвоста и кэп-структуры [12]. *b* – Конформационные изменения эукариотических полирибосом в процессе многократной повторной трансляции. В ранней (ювенильной) фазе полисомы образуют циркулярные структуры, которые затем преобразуются в линейно расположенные полисомы среднего размера, осуществляющие активную трансляцию. За этим следует переходная фаза, приводящая к образованию плотно упакованных спиральных структур, обладающих пониженной трансляционной активностью. В этой работе было показано, что промежуточные полирибосомы существуют в открытой форме до момента формирования более компактных спиральных структур [13]. Изображения предоставлены с разрешения «Oxford University Press»

Следующая часть проекта, заключающаяся в реконструкции структуры полного полирибосомного комплекса, оказалась действительно амбициозной задачей и заняла несколько лет. Спустя множество проведенных серий исследований с использованием крио-ЭТ нам в итоге удалось получить супрамолекулярную структуру эукариотических полирибосом. Криоэлектронная томография (с использованием наночастиц золота в качестве координатных маркеров для совмещения изображений и получения 3D-структуры) в сочетании с усреднёнными субтомограммами и молекулярным моделированием позволили получить трёхмерную структуру полисомы, состоящую из 23 рибосом, связанных с одной молекулой мРНК (выбранной в качестве примера из многих других полисом). Поскольку это был один из самых больших асимметричных комплексов, структура которого была когда-либо разрешена (~ 110 МДа), то внесение полученных координат в базу данных PDB стало «особенным предприятием». На примере этой структуры было продемонстрировано, что спиральные полисомы образуют левозакрученную супрамолекулярную спираль. Её разрешение позволило визу-

ализировать три функциональные части полисомного комплекса: центральный «коровый» участок, который образует довольно компактную левостороннюю супрамолекулярную спираль, и более открытые участки, содержащие сайты инициации и терминации на разных концах. Спиральный участок формирует непрерывный канал для мРНК, в котором нуклеотидная цепь образует мостик между участками входа и выхода из канала на соседних рибосомах, что предотвращает образование петель мРНК между рибосомами. Эта структура предоставила ценнейшую информацию о контактах между рибосомами, опосредованных белками и РНК, в которых задействованы консервативные сайты 40S субъединиц рибосом и длинные выступающие сегменты экспансии РНК. Эти открытия пролили свет на молекулярную машинерию рибосомы и механизмы её функционирования [10]. Результаты этого исследования мы обсудили в обзоре, посвящённом многоуровневой интеграции данных о работе рибосомы от молекулярного до клеточного уровня, откуда это описание и цитируется [11].

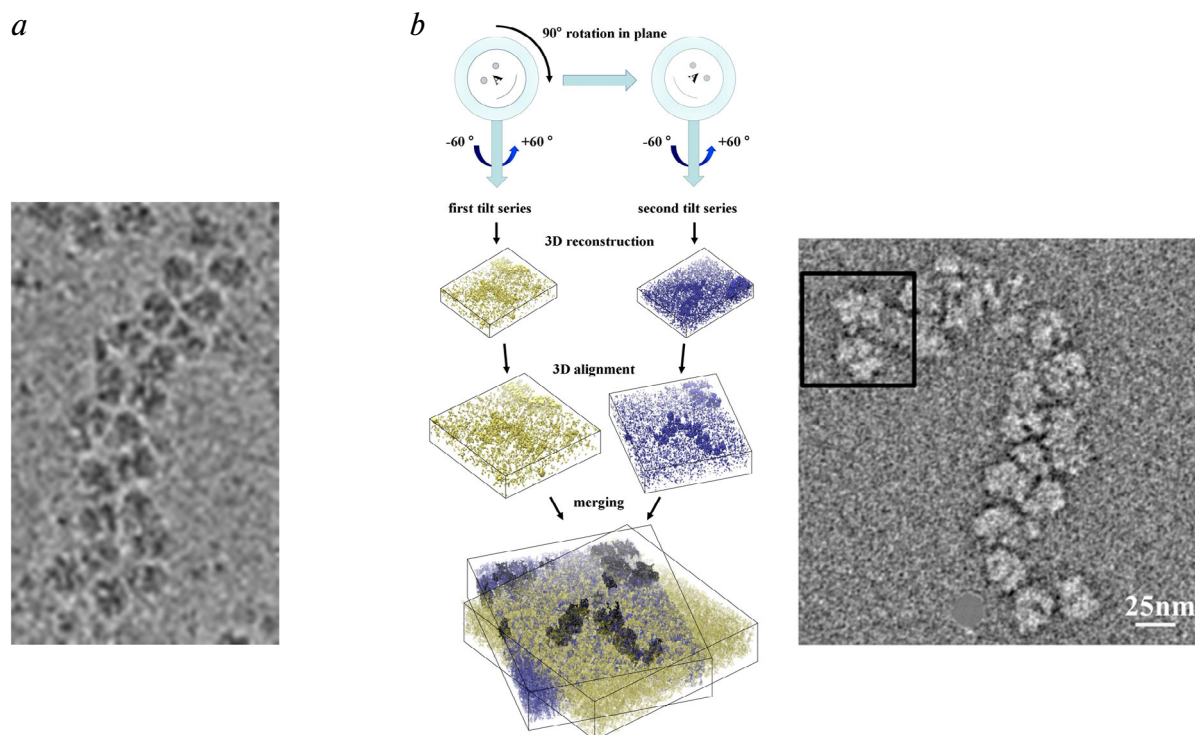
Параллельно мы изучали зависимость циркуляризации полисом от структуры 5'-концево-

го кэпа и 3'-поли(А)-хвоста мРНК. Мы проанализировали контрольные полисомы с мРНК GFP или  $\beta$ -глобина, содержащие 5'-кэп и поли(А)-хвост, сравнивая их с неэкспонированной мРНК и с мРНК, у которой отсутствовал 3'-поли(А)-хвост. С помощью крио-ЭТ и усреднения субтомограмм мы смогли проследить ход цепи мРНК, соединяющей соседние сайты выхода и входа в канал мРНК на рибосомах, образующих полисомы. К нашему удивлению оказалось, что формирование и циркуляризация полисомом не зависят от тех элементов, которые на протяжении десятилетий рассматривались как ключевые факторы циркуляризации посредством взаимодействия с кэп-связанным фактором инициации eIF4F и поли(А)-связывающим белком, что привело к смене парадигмы в этой области [12]. Тем не менее до сих пор остаётся неясным, какие же элементы или ассоциированные с полисомой белковые факторы в действительности индуцируют её циркуляризацию.

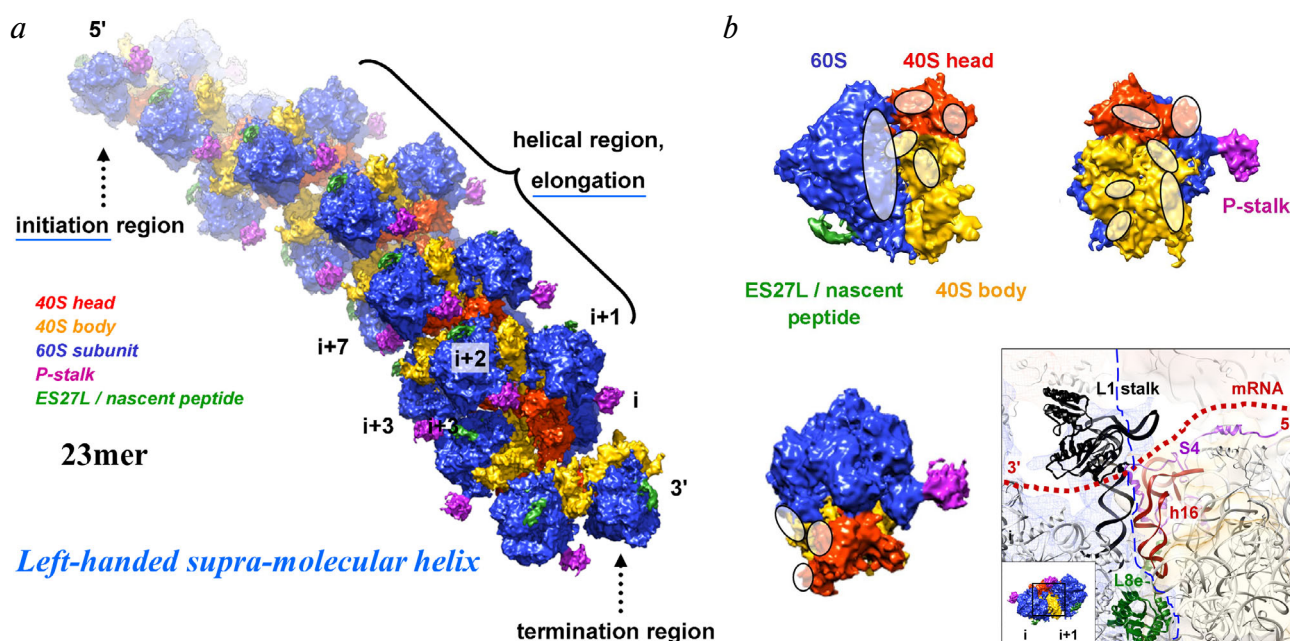
Наша последняя совместная статья была посвящена изучению конформационных изменений полисомом на различных стадиях образования полирибосом. С помощью анализа для ряда

установленных временных точек с использованием бескеточной системы многократной повторной трансляции, седиментационного анализа и крио-ЭТ реконструкции мРНК-индуцированных полисомом нам удалось показать, что во время ювенильной фазы образуются циркулярные полисомы среднего размера с открытыми структурами, вслед за которыми появляются промежуточные «зигзагообразные» линейные и активно транслирующие полирибосомы, в конечном итоге переходящие в форму плотно упакованных спиральных структур со сниженной трансляционной активностью. Эти конформационные изменения сопровождаются снижением белок-синтезирующей активности. В этой работе была продемонстрирована динамика эукариотических полисомом и их конформационные переходы как функция их формирования и трансформации в сменяющих друг друга фазах, т.е. «онтогенез» полисомом [13].

Александр Спиринов лично представил первые полученные нами в ходе этой работы данные на 38-м конгрессе FEBS в Санкт-Петербурге (Россия) в 2013 г. В последующем наши совместно полученные результаты были представ-



**Рис. 3.** *a* – Пример изображения большого полисомного комплекса, полученного с помощью крио-ЭМ, использованного для проведения крио-ЭТ. *b* – Концепция проведения съёмки угловой серии изображений и реконструкция томограммы (слева), которая может быть дополнена второй серией изображений, полученной под другим углом после разворота решётки для крио-ЭМ в плоскости примерно на  $90^\circ$ . 3D-реконструкция на основе данных двухосевой томографии даёт более ясную картину с меньшим уровнем искажений и потому более простую в интерпретации (более подробно описано в тексте). Такая реконструкция была проведена для полисомом и отдельных рибосом (например, первые крио-ЭТ изображения отдельных частиц опубликованы в работе [8]). Изображения представлены с разрешения «Elsevier»



**Рис. 4.** *a, b* – 3D-реконструкция полисомы, состоящей из 23 рибосом, с использованием крио-ЭТ, усреднённых субтомограмм и молекулярного динамического моделирования. Для получения представления о структуре молекулярного комплекса в данные томограммы вносятся значения усреднённой плотности рибосом с соответствующими параметрами трансляции и вращения. 60S субъединица показана синим цветом, голова и тело 40S субъединицы – красным и оранжевым соответственно, Р-выступ и ES27L/наследственный пептид – розовым и зеленым соответственно. Полученные результаты демонстрируют, что спиральные полирибосомы образуют левозакрученную супрамолекулярную спираль [10]. Аннотированы участки инициации, элонгации и терминации трансляции. Показаны участки контактов между соседними рибосомами (овалы белого цвета; *b*); особенно интересный участок контакта (включающий L1-выступ и спираль h16 18S рРНК) представляет продвижение мРНК, выступающей из рибосомного канала (*i*) рибосомы и входящей в следующую рибосому (*i+1*), при этом последовательность мРНК остаётся защищённой от деградации за счет контакта рибосом

лены Жанной Афониной, Александром Мясниковым и мной на нескольких международных конференциях, включая GTBio/Французская ассоциация кристаллографии (Париж, 2009); Конференцию по рибосомам (Орвието, Италия, 2010); Конференцию EMBO по биосинтезу белка и регуляции трансляции (Гейдельберг, Германия, 2011); Конференцию J. Monod, Транслирующая рибосома: на пути к зрелым белкам (Роскофф, Франция, 2012); Гордоновская научная конференция по 3D-ЭМ (Жирона, Испания, 2014); Гордоновская научная конференция по 3D-ЭМ (Колледж Колби Соьер, США, 2015); Конференция EMBO: Структура и функции рибосомы (Страсбург, Франция, 2016).

В ядро рабочей группы по изучению рибосомных комплексов входила Жанна Афонина из научной группы Александра Спирина и Владимира Широкова, которая приезжала из Пущино в Страсбург/Илькирш, где на протяжении нескольких месяцев в ходе её учёбы в аспирантуре получала препараты полирибосом в различных условиях и с различными конструкциями мРНК. Кроме того, активным участником работы был Jean-François Ménéret из моей группы, который начал работу с использованием методики элек-

тронной микроскопии с негативным окрашиванием, привнеся свой многолетний опыт работы в этой области; Александр Мясников, член моей группы, который получал образцы для крио-ЭМ и наладил тщательный сбор данных одно- и двухосевой томографии на новом микроскопе «Polara», проделал всю работу по обработке изображений и анализу томограмм (усреднение субтомограмм, седиментационный анализ, динамическое молекулярное моделирование), а также Владимир Широков, Александр Спири́н и я, руководящие исследованиями и обсуждавшие детали экспериментов со всеми членами команды. Я благодарен всем им. Моменты мозгового штурма и великий дух этой «полисомной команды», которые объединяли исследователей двух стран, навсегда останутся в нашей памяти. При размышлениях о топологии и расположении рибосом в цепи полисом, о подготовке образцов, о проведении томографии этих сложных образцов, при обсуждении результатов и обдумывании последующих шагов. Александр Спири́н покинул нас в конце 2020 г., а Владимир Широков – еще в 2019 г. Жизнь проходит, но воспоминания остаются, пока время продолжает идти. Александр Спири́н был невероятным

вдохновением для каждого, выдающимся ученым — страстным и в то же время человечным.

В электронном письме Александру Спирину в конце 2013 г., когда наша статья по полисомной супрамолекулярной спирали готовилась к опубликованию (она вышла позднее в *Nat. Commun.* в 2014 г. [10] вместе с двумя статьями в *Nucleic Acids Res.* [12, 13]), я писал: «Где бы [в каком бы журнале] эта работа ни была опубликована, она будет представлять собой основу для понимания ключевого аспекта биосинтеза белка. И потому я выражаю Вам, Александр, огромную благодарность за то, что мы повстречались осенью 2007 г., сразу после окончания вашего семинара, и начали обсуждать возможности 3D-анализа полисом... С тех пор каждый из нас вложил много сил [речь шла о всех задействованных в этой работе людях, т.е. Владимире Широкове, Жанне Афониной, Александре Мясникове и Jean-François Ménétret], чтобы вместе разработать проект, организовать поездки и обмены, получить соответствующие образцы и начать работу по криоэлектронной томографии, использование которой в нашей области было совсем не очевидно, когда мы всё это начинали. Наша совместная работа была интересной и захватывающей как с научной точки зрения, так и просто с человеческой». Он ответил мне: «Успешное сотрудничество с Вами и вашей группой стало замечательным опытом для всей моей научной команды и меня лично», и осенью 2014 г., когда статья в *Nat. Commun.* была уже на выходе, он написал: «Действительно, все мы сейчас можем сказать, что наша первая встреча, состоявшаяся несколько лет назад, и последующая совместная работа оказались очень плодотворными и привели к получению новых и интересных результатов фундаментального значения». Резюмируя вышесказанное, для меня было большой честью и удовольствием все эти годы работать с Александром Сергеевичем Спириным.

Со времени нашей совместной работы в период с 2008 по 2015 г., параллельно которой появлялись и другие интересные работы по бактериальным и эукариотическим полирибосомам

[14–16] (см. также наши обзоры и главы в книгах [17, 18]), эта область исследований продолжала движение вперед с развитием многоуровневого интегрирования [11, 17, 18] и крио-ЭМ высокого разрешения (на уровне 3 Å и выше), ставшей возможной благодаря появлению прямых детекторов электронов [11, 19] и новых методов обработки изображений. В будущем, вероятно, появится возможность анализа структуры полисом с квазиатомным разрешением, а также *in situ* непосредственно во внутриклеточном контексте, что стало бы осуществлением мечты Александра Спирина. Первые работы в этом направлении с использованием крио-ЭТ высокого разрешения для исследования рибосом внутри клетки были проведены в этом году [20], и полученные результаты указывают на многообещающее будущее этой области исследований.

**Благодарности.** Я благодарен за поддержку бывшим и настоящим членам моей исследовательской группы в СБИ/IGBMC и членам платформы интегрированной структурной биологии в СБИ/IGBMC.

**Финансирование.** Я подтверждаю полученную поддержку от следующих структур: Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National pour la Recherche Médicale (Inserm), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut National du Cancer (INCa), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Ligue nationale contre le cancer (Ligue), Agence Nationale pour la Recherche (ANR) и USIAS Страсбургского университета (USIAS-2018-012). Работа отдела электронной микроскопии была поддержана такими структурами как Région Grand Est, French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) и Instruct-ERIC.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соответствие этическим стандартам.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов, выполненных автором.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Warner, J. R., Rich, A., and Hall, C. E. (1962) Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin, *Science*, **138**, 1399–1403, doi: 10.1126/science.138.3548.1399.
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, doi: 10.1073/pnas.49.1.122.
3. Wooding, F. B. (1968) Ribosome helices in mature cells, *J. Ultrastruct. Res.*, **24**, 157–164, doi: 10.1016/S0022-5320(68)80025-5.
4. Kopeina, G. S., Afonina, Zh. A., Gromova, K. V., Shirokov, V. A., Vasiliev, V. D., and Spirin, A. S. (2008) Step-wise formation of eukaryotic double-row polyribosomes and circular translation of polysomal mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 2476–2488, doi: 10.1093/nar/gkm1177.
5. Medalia, O., Weber, I., Frangakis, A. S., Nicastro, D., Gerisch, G., Baumeister, W. (2002) Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography, *Science*, **298**, 1209–1213, doi: 10.1126/science.1076184.

6. Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S., Alakhov, Y. B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, *Science*, **242**, 1162-1164, doi: 10.1126/science.3055301.
7. Shirokov, V. A., Kommer, A. A., Kolb, V. A., and Spirin, A. S. (2007) Continuous-exchange protein-synthesizing systems, in *Methods in Molecular Biology, In vitro Transcription and Translation Protocols* (Grandi, G., ed.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, **375**, pp. 19-55, doi: 10.1007%2F978-1-59745-388-2\_2.
8. Myasnikov, A. G., Afonina, Z., and Klaholz, B. P. (2013) Single particle and molecular assembly analysis of polyribosomes by single- and double-tilt cryo electron tomography, *Ultramicroscopy*, **126**, 33-39, doi: 10.1016/j.ultramicro.2012.12.009.
9. Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Khabibullina, N. F., Belorusova, A. Yu., Ménétret, J.-F., et al. (2013) Topology of mRNA chain in isolated eukaryotic double-row polyribosomes, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 445-454, doi: 10.1134/S0006297913050027.
10. Myasnikov, A. G., Afonina, Z. A., Ménétret, J.-F., Shirokov, V. A., Spirin, A. S., and Klaholz, B. P. (2014) The molecular structure of the left-handed supra-molecular helix of eukaryotic polyribosomes, *Nat. Commun.*, **5**, 5294, doi: 10.1038/ncomms6294.
11. Orlov, I., Myasnikov, A. G., Andronov, L., Natchiar, S. K., Khatter, H., et al. (2017) The integrative role of cryo electron microscopy in molecular and cellular structural biology, *Biol. Cell*, **109**, 81-93, doi: 10.1111/boc.201600042.
12. 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, doi: 10.1093/nar/gku599.
13. Afonina, Z. A., Myasnikov, A. G., Shirokov, V. A., Klaholz, B. P., and Spirin, A. S. (2015) Conformation transitions of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 618-628, doi: 10.1093/nar/gku1270.
14. Ortiz, J. O., Förster, F., Kürner, J., Linaroudis, A. A., and Baumeister, W. (2006) Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryo electron tomography and pattern recognition, *J. Struct. Biol.*, **156**, 334-341, doi: 10.1016/j.jsb.2006.04.014.
15. Brandt, F., Carlson, L. A., Hartl, F. U., Baumeister, W., Grünwald, K. (2010) The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells, *Mol. Cell*, **39**, 560-569, doi: 10.1016/j.molcel.2010.08.003.
16. Brandt, F., Etchells, S. A., Ortiz, J. O., Elcock, A. H., Hartl, U., and Baumeister, W. (2009) The native 3D organization of bacterial polysomes, *Cell*, **136**, 261-271, doi: 10.1016/j.cell.2008.11.016.
17. Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A. G., Ménétret, J.-F., and Klaholz, B. P. (2011) Insights into translation initiation and termination complexes and into the polysome architecture, in *Ribosomes* (Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., and Green, R., eds.) Springer, Vienna, doi: 10.1007/978-3-7091-0215-2\_10.
18. Ménétret, J.-F., Khatter, H., Simonetti, A., Orlov, I., Myasnikov, A. G., et al. (2013) Integrative structure-function analysis of large nucleoprotein complexes, in *RNA Structure and Folding* (Klostermeier, D., and Hammann, C., eds.), doi: 10.1515/9783110284959.
19. Klaholz, B. P. (2019) Deriving and refining atomic models in crystallography and cryo-EM: the latest Phenix tools to facilitate structure analysis, *Acta Cryst.*, **D75**, 878-881, doi: 10.1107/S2059798319013391.
20. Tegunov, D., Xue, L., Dienemann, C., Cramer, P., and Mahamid, J. (2021) Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.5 Å in cells, *Nat. Methods*, **18**, 186-193, doi: 10.1038/s41592-020-01054-7.

## STUDYING THE STRUCTURAL ORGANIZATION OF POLYRIBOSOMES WITH ALEXANDER S. SPIRIN

Bruno P. Klaholz<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Centre for Integrative Biology (CBI), Department of Integrated Structural Biology, IGBMC (Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology), 67404 Illkirch, France; e-mail: klaholz@igbmc.fr

<sup>2</sup> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7104, 67404 Illkirch, France

<sup>3</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, 67404 Illkirch, France

<sup>4</sup> Université de Strasbourg, 67081 Strasbourg, France

“Would it be possible to analyze molecular mechanisms and structural organisation of polyribosome assemblies using cryo electron tomography?” – we asked through a longstanding collaboration between my research group and that of Alexander S. Spirin. Indeed, it was: we found that double-row polyribosomes can have both circular and linear arrangements of their mRNA [Afonina, Z. A., et al. (2013) *Biochemistry (Moscow)*], we figured out how eukaryotic ribosomes assemble on an mRNA to form supramolecular left-handed helices [Myasnikov, A. G., et al. (2014) *Nat. Commun.*], that the circularization of polyribosomes is poly-A and cap-independent [Afonina, Z. A., et al. (2014) *Nucleic Acids Res.*], and that intermediary polyribosomes with open structures exist after a transition from a juvenile phase to strongly translating polysomes of medium size [Afonina, Z. A., et al. (2015) *Nucleic Acids Res.*] until they form densely packed helical structures with reduced activity. Our joint fruitful exchanges, hence, led to major advances in the field, which are reviewed here from a personal and historical perspective in memory of Alexander S. Spirin.

**Keywords:** polyribosomes, polysomes, eukaryotic ribosomes, cryo electron microscopy, cryo electron tomography