

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 577.2



Структура трансляционного преинициаторного комплекса из экстракта зародышей пшеницы

О.В. Кравченко¹, Ю.М. Чесноков² , Ж.А. Афонина¹ , К.С. Василенко¹, *

¹Институт белка, Российской академии 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 ТРНКи 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 осадили центрифугированием в настольной ультрацентрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США) при 400000 g. Из осадка были выделены 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), осадили 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).

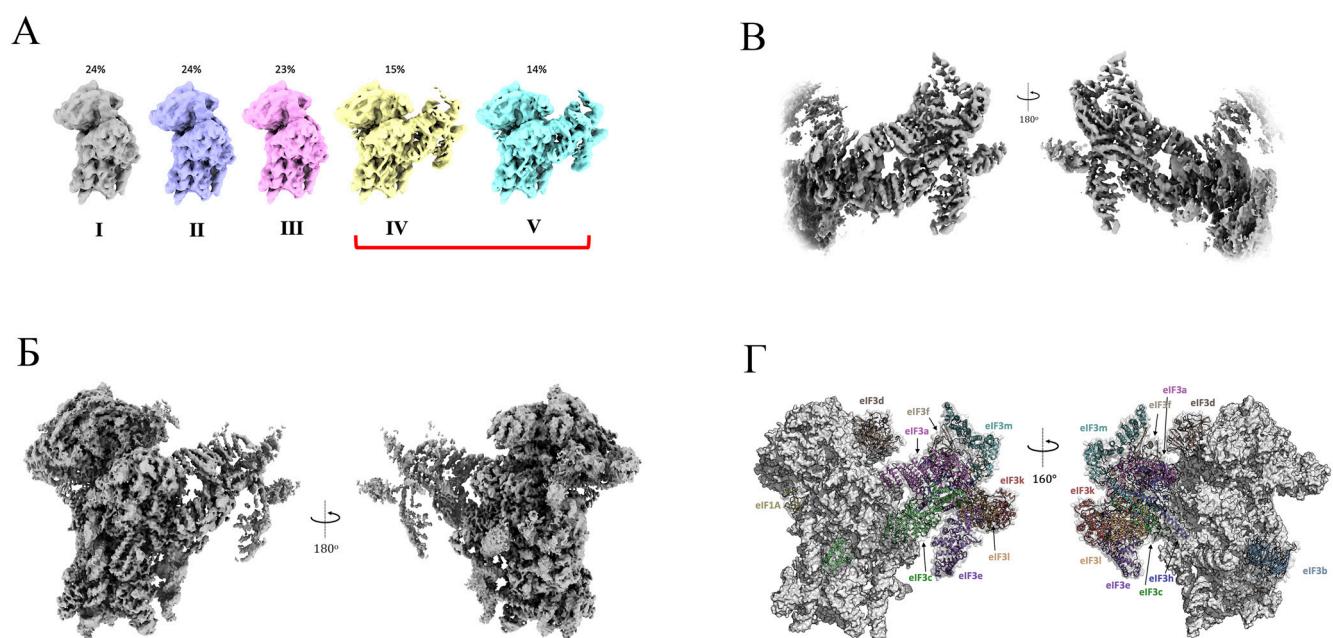


Рис. 1. Реконструкция структуры преинициаторного комплекса. (А) Результат трехмерной классификации проекций частиц, содержащих 40S субчастицу рибосомы пшеницы. Указано процентное содержание частиц каждого класса в наборе; (Б) Реконструкция карты электронной плотности комплекса 40S/eIF3/eIF1A (объединенные 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. 1В).

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 криоЕМ-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 корректировки 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

структурь 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. 1В).

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

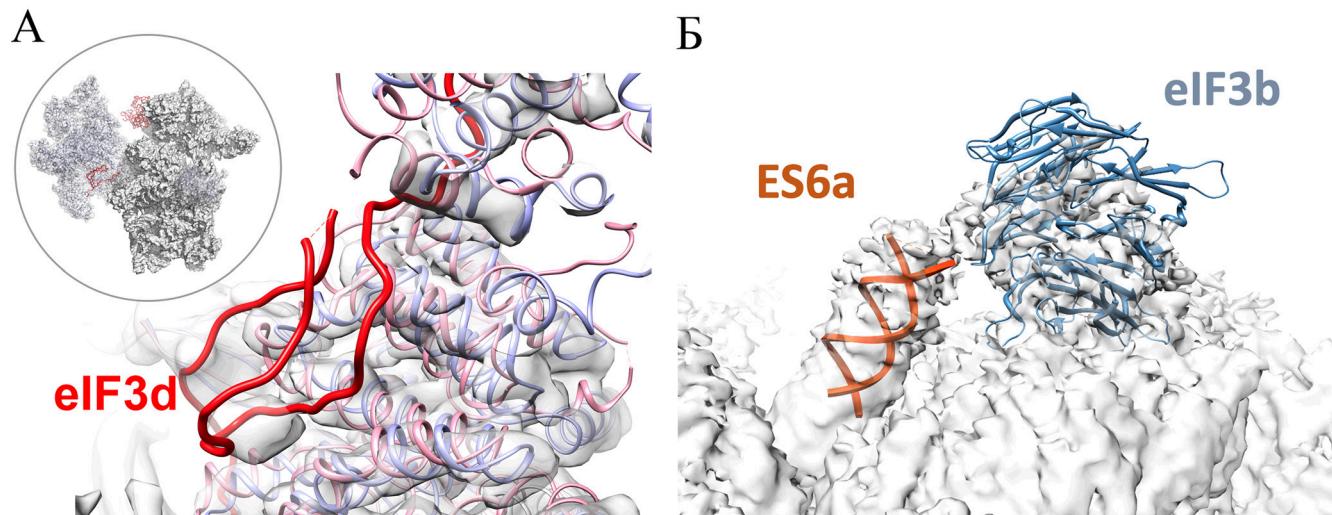


Рис. 2. Особенности структуры преинициаторного комплекса растений. (А) Красным цветом показан N-концевой фрагмент белка eIF3d человека в структуре 48S комплекса [4]. Цепи субъединиц фактора eIF3 пшеницы и человека выделены голубым и розовым цветами соответственно. Серым цветом показана реконструированная 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 pРНК 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 со-авт. [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 pРНК. 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. 2Б). 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 pРНК, 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., Karuppasamy 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 eIF3 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>