

КРИСТАЛЛИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ДОМЕНА PX БЕЛКА SNX27*

© 2019 Y. Li¹, S. Liao², F. Li³, and Z. Zhu^{4**}

¹ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: ly1992@mail.ustc.edu.cn

² Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: jsod@mail.ustc.edu.cn

³ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China, lifudong@ustc.edu.cn

⁴ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: zlzhu63@ustc.edu.cn

Поступила в редакцию 05.07.18

После доработки 29.09.18

Принята к публикации 29.09.18

Белок SNX27 является компонентом тетрамерного комплекса, необходимого для рециклинга рецепторов, расположенных в мембранах. SNX27 содержит *N*-концевой домен PX, связывающий инозитол 1,3-дифосфат и важный для локализации белка SNX27. В представленном исследовании методом рентгенологической кристаллографии была определена кристаллическая структура домена PX белка SNX27 человека. При анализе структуры PX было установлено, что ион сульфата локализован в положительно заряженном липид-связывающем кармане этого домена, осуществляющем узнавание фосфолипидов. Кроме того, мы смоделировали структуру комплекса SNX27-PX-инозитол 1,3-дифосфат с целью лучшего понимания механизма узнавания доменом PX инозитол 1,3-дифосфата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SNX27, связывание липидов, домен PX, структура кристалла.

DOI: 10.1134/S0320972519020052

Эндоцитоз является энергозависимым процессом, играющим важную роль во внутриклеточном транспорте различных соединений, а именно, питательных веществ, частиц, вторично используемых молекул и т.д. [1, 2]. Сортировка и рециклинг трансмембранных белков в клетке при посредстве аппарата Гольджи опосредуются эндосомами и эндоцитозом [3]. Многие поддерживающие белковые молекулы, включая домен Phox (PX)-содержащие сортирующие нексины (SNX), принимают участие в эндоцитозе [4–6]. В геноме млекопитающих закодировано 30 белков SNX, несущих домен PX и локализованных на поверхности клеток, где они опосредуют различные сигнальные процессы путем взаимодействия с рецепторами [4, 7].

Среди белков SNX особый интерес вызывает SNX27, поскольку он содержит *N*-концевые домены PDZ и PX и три FERM-подобных домена, и участвует в качестве поддерживающей молекулы в клеточном транспорте [8–11]. Сообщалось, что SNX27 связывается с комплексом белков Vps26-Vps35-Vps29 через свой домен PDZ. Домен PX — это представитель липид-связывающего домена, который прикрепляет SNX27 к ранним эндосомам путем узнавания инозитол 1,3-дифосфата [8, 9]. Кроме того, SNX27 непосредственно взаимодействует с комплексом WASH, ингибируя вступления различных грузов в лизосомальный транспорт при рециклинге эндосом в клеточной мембране [9]. Нарушение функций SNX27 в клетках млекопитающих приводило к эпилептической энцефалопатии, гидроцефалии, к задержке роста, к псевдосаркоматозному фиброматозу и ко многим другим заболеваниям [12, 13].

Сообщалось, что SNX27 взаимодействует с эндосомами путем связывания его домена PX с

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 18-189, 19.11.2018.

** Адресат для корреспонденции.

инозитол 1,3-дифосфатом на поверхности эндосом [14, 15]. Кроме того, домен PX белка SNX27 взаимодействует с другими молекулами, несущими домены PH и FYVE [16–18], а также обладает способностью связывать инозитол 1,3-дифосфат. Хотя взаимодействие PX белка с инозитол 1,3-дифосфатом играет ключевую роль в локализации SNX27 на эндосомах, молекулярный механизм этого взаимодействия остается неясным. В представленном исследовании мы получили кристалл домена PX белка SNX27 с ионом сульфата, который мог имитировать инозитол 1,3-дифосфат. Детальный структурный анализ показал, что домен PX белка SNX27 узнает ион SO_4^{2-} при посредстве положительно заряженной области молекулы. Далее, основываясь на структуре домена PX белка SNX27, мы смоделировали структуру комплекса SNX27–инозитол 1,3-дифосфат. Мы не только прояснили структурный механизм взаимодействия белка SNX27 и инозитол 1,3-дифосфата, но также внесли вклад в понимание его инозитол 1,3-дифосфат-зависимой локализации на эндосомах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клонирование, экспрессия и очистка белка. Кодирующую последовательность домена PX белка SNX27 клонировали в вектор pET28-MHL (регистрационный номер в Генбанке EF456735) и результирующую конструкцию трансфецировали в *E. coli* BL21 (DE3). Трансформированные бактериальные клетки культивировали при 37 °C в среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, до поглощения в суспензии $A_{600} = 0,8$ о.е. Овер-экспрессию рекомбинантного белка индуцировали 0,2 мМ изопропил β -D-тиогалактозидом (IPTG) в течение 20 ч при 16 °C. Клетки собирали, ресуспендировали в буфере для лизиса (20 мМ Tris-HCl, 0,4 М NaCl, pH 7,5) и разрушали ультразвуком. Лизат центрифугировали при 14 000 g в течение 25 мин при 4 °C. Супернатант, содержащий His₆-меченный белок наносили на Ni-NTA сефарозу («GE Healthcare», США). Элюированный белок диализовали против буфера 10 мМ Tris-HCl, 0,2 М NaCl, pH 7,5 при 4 °C и удаляли His₆-тег с помощью протеазы вируса табачной мозаики. Дальнейшую очистку проводили методом гельфильтрации на колонке 16/600 мм с Супердексом 75 и на колонке HisTrap SP HP («GE Healthcare», США). Очищенный белок концентрировали до ~15,6 мг/мл.

Кристаллизация белка, сбор данных и определение структуры. Кристаллы выращивали с использованием метода диффузии паров в висячей капле (*sitting drop vapor diffusion*) при 18 °C. Белок

смешивали с равным объемом буфера для кристаллизации (0,1 М Li_2SO_4 ; 0,1 М Tris-HCl, pH 8,5; 25% (v/v) PEG3350), кристаллы появлялись через 20 ч. Перед сбором данных кристаллы пропитывали криопротекторной смесью, содержащей 90% коллекторного раствора и 10% глицерина (v/v), и хранили в жидком азоте. Данные дифракции собирали при 0,9778 Å на устройстве BL18U1 на Шанхайской синхротронной установке (SSRF) и обрабатывали с использованием программы HKL2000 [19]. Исходная структура

Данные по кристаллографии и статистическая детализация

Параметры кристаллической ячейки	
Пространственная группа	$P2_12_12_1$
Размер ячейки a, b, c (Å)	98,33; 47,70; 47,83
Углы α , β , δ (°)	90, 90, 90
Статистика собранных данных	
Длина волны (нм)	0,9778
Разрешение (Å)	49,17–1,78 (1,80–1,77)*
R_{merge}	0,096 (0,606)
$I/\sigma I$	29 (6,6)
Полнота	98,4 (96,0)
Избыточность	12,5 (11,7)
Количество учтенных рефлексов	22035 (1018)
Статистическая детализация	
Число атомов белка в ячейке	1842
B -факторы (Å ²)	21,34
R -фактор/свободный R -фактор	0,189/0,217
RMSD	
Длина связи (Å)	0,006
Угол связи (°)	0,84
График Рамачандрана (% а.о.)	
Наиболее благоприятные районы	97,44
Разрешенные районы	2,56
Запрещенные районы	0

* Статистика для *shell* наивысшего разрешения указана в скобках.

RMSD – корневая среднеквадратичная ошибка между предсказанными и экспериментальными данными.

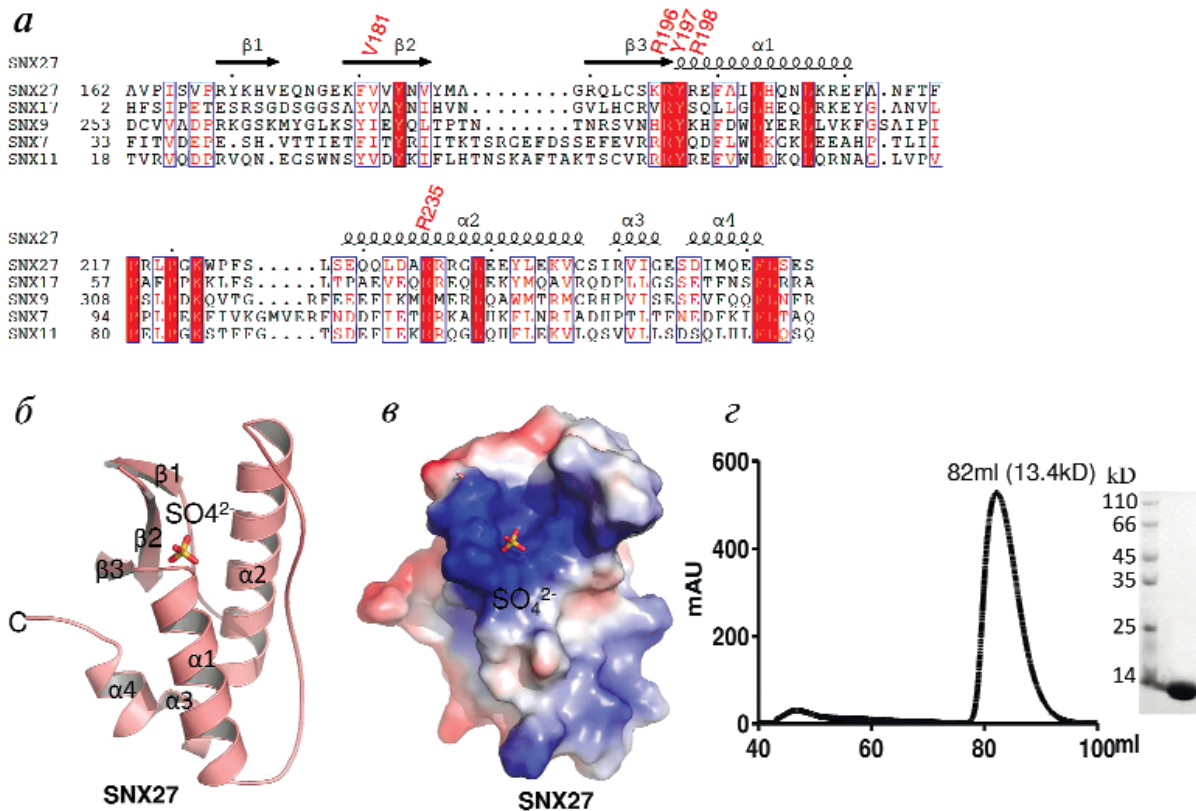


Рис. 1. Анализ последовательности и структура домена PX белка SNX27. *a* – Выравненные последовательности доменов PX из различных белков человека. Остатки, формирующие карман для связывания SO_4^{2-} : R196, Y197, R198 и R235. В скобках указаны регистрационные номера в Банке данных следующих белков: SNX27(Q96L92), SNX17(Q15036), SNX9(Q9Y5X1), SNX7(Q9UNH6), SNX11(Q9Y5W9). *б* – Структура домена PX белка SNX27. *в* – Поверхность электростатического потенциала домена PX белка SNX27. *г* – Гель-фильтрация очищенного препарата домена PX белка SNX27 и его Ds-Na ПААГ электрофорез.

С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

домена PX белка SNX27 была получена с помощью PHASER [20] и с использованием PX белка SNX17 в качестве симулирующей модели (PDB: 3LUI, 21). Результирующая структура PX была построена вручную с помощью Coot [21] и доведена до совершенства с использованием программы PHENIX [22]. Статистика для собранных данных и детали полученной структуры суммированы в таблице.

Моделирование связывания PX с инозитол 1,3-дифосфатом. Состыковку липида и PX выполняли с использованием программы PYRX [23]. Инозитол 1,3-дифосфат был состыкован с белком в анион-связывающем кармане домена PX. В работе представлена наиболее обоснованная модель комплекса PX-инозитол 1,3-дифосфат.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Домен PX белка SNX27 был экспрессирован в клетках *E. coli*, очищен и закристаллизован; его структура была воссоздана методом рентге-

ноструктурного анализа с разрешением 1,78 Å (таблица). Есть две молекулы (R.M.S.D. = 0,469) в асимметрической области (ASU). Несмотря на то, что домен PX белка SNX27 содержит два остатка цистеина, методом гель-фильтрации он идентифицируется как мономер (рис. 1, *г*). Кроме того, аминокислотные остатки с обоих концов молекулы и электрическая плотность остатков в диапазоне 183–187 в цепи также отсутствовали, что могло быть обусловлено внутренней пластичностью белка. Молекула домена PX белка SNX27 имеет классическую свернутую конформацию [24], содержит три антипараллельных β -стренда ($\beta 1$ – $\beta 3$), а также расположенные по одну сторону от β -стрендов четыре α -спирали с четырьмя витками (рис. 1, *a* и *б*).

В области ASU мы обнаружили три сульфат-иона, расположенные на двух молекулах PX, причем, только два из них локализованы в липид-связывающем кармане молекулы PX. Третий ион SO_4^{2-} , не находящийся в этом кармане, мог принимать участие в процессе кристаллизации, поскольку буфер для кристаллизации белка

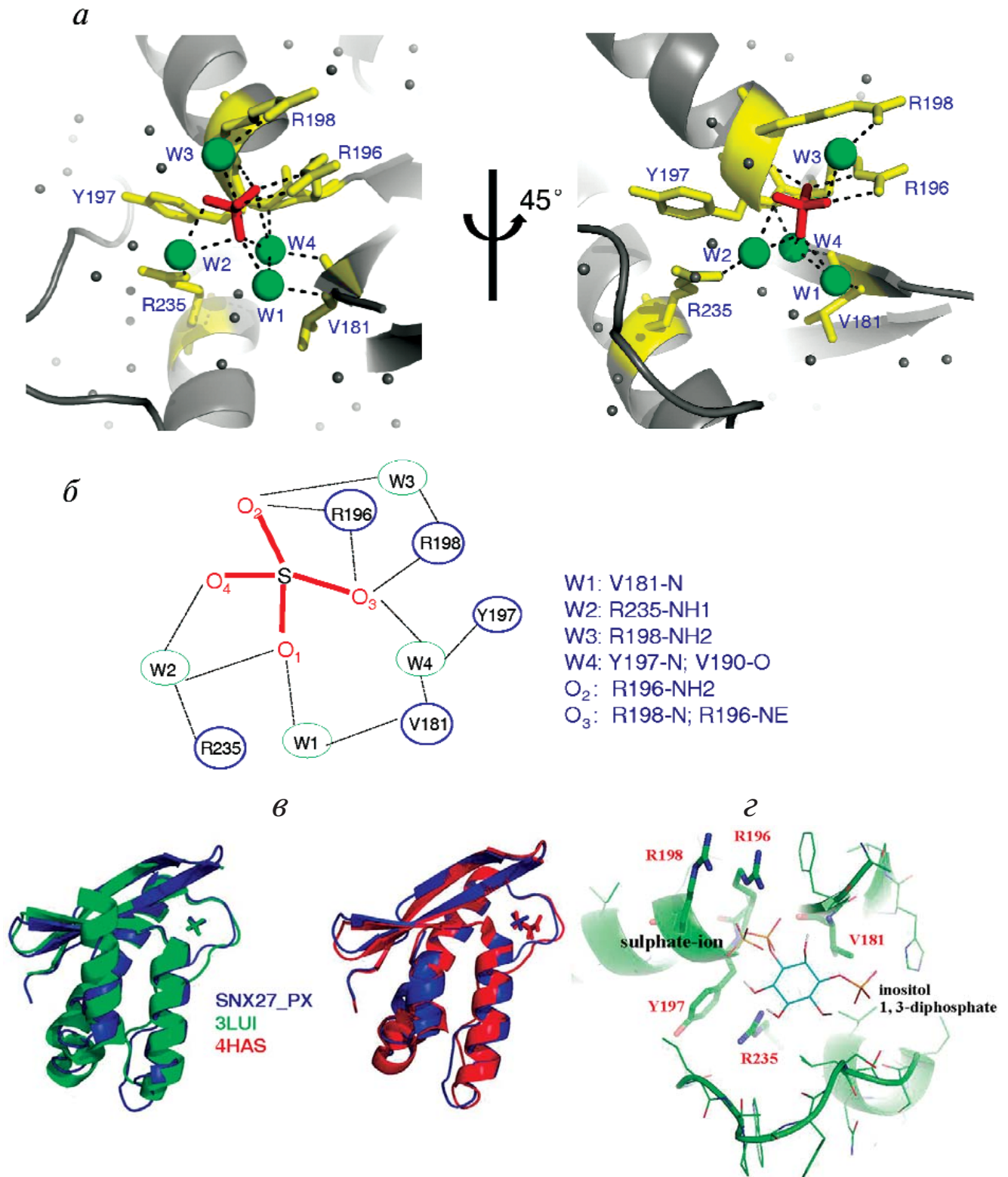


Рис. 2. Структурный анализ липид-связывающего кармана домена PX белка SNX27. *a* – Стереобразное изображение молекулы с поворотом на 45° вокруг оси Y. Указаны аминокислотные остатки, ответственные за узнавание иона сульфата. *б* – Подборное изображение взаимодействий между доменом PX SNX27 и ионом SO_4^{2-} . *в* – Сравнение структур домена PX SNX27 с 3LUI (домен PX SNX17 с сульфат-ионом в липид-связывающем центре) и с 4HAS (домен PX SNX27 с цитрат-ионом в липид-связывающем центре). *г* – Модель комплекса домен PX SNX27-I(1,3)P₂. Координаты и показатели структуры домена PX белка SNX27 были зарегистрированы в Банке белковых структур под номером 5ZN9. С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

содержал этот ион. Эта кристаллическая структура была подобна структуре домена PX белка SNX17 [25]. Сульфат-ион (S1) расположенный внутри положительно заряженного кармана, созданного цепями $\beta 2$, $\beta 3$, $\alpha 1$ и $\alpha 2$ (рис. 1, в), образует обширные водородные связи с белком SNX27 (рис. 2, а и в). Основная цепь (полипептидный каркас) и боковая цепь остатка Arg205, а также основная цепь остатка Arg207 были непосредственно связаны водородными связями с S1, тогда как остатки Val190, Tyr206, Arg207 и Arg244 формировали связи с S1 при посредстве молекул воды (рис. 2, а и в). Выравнивание последовательности домена PX белка SNX27 с последовательностями PX других белков SNX показало, что остатки Arg196, Tyr197 и Arg235 белка SNX27 являются абсолютно консервативными во всех выровненных последовательностях (рис. 1, а). Недавно была установлена кристаллическая структура комплекса PX SNX27-SO₄²⁻; выравнивание последовательностей показало, что степень подобия между доменами PX у человека довольно мала [25]. Наиболее консервативные аминокислотные остатки локализованы в кармане, связывающем отрицательно заряженные группы. Другая группа наиболее консервативных гидрофобных остатков локализована в областях «пластичности», где могут связываться цепи различных жирных кислот липидов. Суперпозиция структур белков SNX17 и SNX27 показывает, оба их домена PX демонстрируют очень сходную общую структуру и сходное строение сульфат-связывающих областей. Это свидетельствовало о консервативности в организации SO₄²⁻-связывающих карманов у белков SNX (рис. 2, в, левая панель). Кроме того, мы провели сравнение другой структуры домена PX белка SNX27, находящегося в комплексе с цитратом вместо сульфата (рис. 2, в, правая панель). Полученные результаты также продемонстрировали, что сульфат-связывающий карман домена PX белка SNX27 предпочтительно взаимодействует с различными отрицательно заряженными группировками.

Ранее сообщалось, что домен PX белка SNX27 связывает инозитол 1,3-дифосфат (I(1,3)P₂) с $K_d = 15 \text{ мкМ}$ [25]. На основе структуры комплекса SNX27-SO₄²⁻ мы создали модель структуры SNX27-I(1,3)P₂, где липид замещает сульфат-ион. В этом комплексе кольцевая структура I(1,3)P₂ располагается без каких-либо стерических конфликтов в положительно заряженной щели, образованной цепями $\alpha 2$, $\beta 2$ и $\beta 3$ (рис. 2, г). Один фосфатный остаток I(1,3)P₂ занимает участок связывания сульфат-иона, тогда как другая фосфатная группа взаимодействует с аминокислотными остатками α -спирали $\alpha 2$ (рис. 2, г).

Структура комплекса PX SNX27-I(1,3)P₂ свидетельствует о специфичности связывания липида с белком, и эта специфичность обуславливается двумя фосфатными компонентами I(1,3)P₂. Специфическое связывание I(1,3)P₂ с SNX27 свидетельствует о том, что SNX27 взаимодействует с ранними эндосомами I(1,3)P₂-зависимым образом. Поэтому представленная нами структура домена PX белка SNX27 определяет механизм локализации молекул SNX27 на ранних эндосомах.

Финансирование

Эта работа была поддержана Национальным фондом Китая по естественным наукам (грант № 31500601).

Благодарности

Мы глубоко признательны Национальному центру Китая по исследованию белка в Шанхае за поддержку работы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goldstein, J.L., Anderson, R.G., and Brown, M.S. (1979) Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis, *Nature*, **279**, 679–685.
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004) Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis, *Biochem. J.*, **377**, 159–169.
- Bonifacio, J.S., and Traub, L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 395–447.
- Teasdale, R.D., Loci, D., Houghton, F., Karlsson, L., and Gleeson, P.A. (2001) A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1, *Biochem. J.*, **358**, 7–16.
- Seet, L.F., and Hong, W. (2006) The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 878–896.
- Worby, C.A., and Dixon, J.E. (2002) Sorting out the cellular functions of sorting nexins, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 919–931.
- Sato, T.K., Overduin, M., and Emr, S.D. (2001) Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains, *Science*, **294**, 1881–1885.

8. Temkin, P., Lauffer, B., Jager, S., Cimerancic, P., Krogan, N.J., and von Zastrow, M. (2011) SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 715–721.
9. Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E.C., Bell, A.J., Heesom, K.J., Tavaré, J.M., and Cullen, P.J. (2013) A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 461–471.
10. Lauffer, B.E., Meleró, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T., and von Zastrow, M. (2010) SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane, *J. Cell Biol.*, **190**, 565–574.
11. Gallon, M., Clairfeuille, T., Steinberg, F., Mas, C., Ghai, R., Sessions, R.B., Teasdale, R.D., Collins, B.M., and Cullen, P.J. (2014) A unique PDZ domain and arrestin-like fold interaction reveals mechanistic details of endocytic recycling by SNX27-retromer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E3604–E3613.
12. Damseh, N., Danson, C.M., Al-Ashhab, M., Abu-Libdeh, B., Gallon, M., Sharma, K., Yaacov, B., Coulthard, E., Caldwell, M.A., Edvardson, S., Cullen, P.J., and Elpeleg, O. (2015) A defect in the retromer accessory protein, SNX27, manifests by infantile myoclonic epilepsy and neurodegeneration, *Neurogenetics*, **16**, 215–221.
13. Small, S.A., and Petsko, G.A. (2015) Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders, *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 126–132.
14. Cullen, P.J., and Korswagen, H.C. (2011) Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 29–37.
15. Cai, L., Loo, L.S., Atlashkin, V., Hanson, B.J., and Hong, W. (2011) Deficiency of sorting nexin 27 (SNX27) leads to growth retardation and elevated levels of N-methyl-D-aspartate receptor 2C (NR2C), *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 1734–1747.
16. Ellson, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K.E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Coadwell, J., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T., and Stephens, L.R. (2001) PtdIns(3)P regulates the neutrophil oxidase complex by binding to the PX domain of p40(phox), *Nat. cell biol.*, **3**, 679–682.
17. Kutateladze, T., and Overduin, M. (2001) Structural mechanism of endosome docking by the FYVE domain, *Science*, **291**, 1793–1796.
18. Kutateladze, T.G., Ogburn, K.D., Watson, W.T., de Beer, T., Emr, S.D., Burd, C.G., and Overduin, M. (1999) Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain, *Mol. Cell*, **3**, 805–811.
19. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Methods Enzymol.*, **276**, 307–326.
20. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007). Phaser crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658–674.
21. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126–2132.
22. Adams, P.D., Grosse-Kunstleve, R.W., Hung, L.W., Ioerger, T.R., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Read, R.J., Sacchettini, J.C., Sauter, N.K., and Terwilliger, T.C. (2002). PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 1948–1954.
23. Dallakyan, S. and Olson, A. J. (2015) Small-molecule library screening by docking with PyRx, *Methods Mol. Biol.*, **1263**, 243–250.
24. Bravo, J., Karathanassis, D., Pacold, C.M., Pacold, M.E., Ellson, C.D., Anderson, K.E., Butler, P.J., Lavenir, I., Perisic, O., Hawkins, P.T., Stephens, L., and Williams, R.L. (2001) The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate, *Mol. Cell*, **8**, 829–839.
25. Ghai, R., Mobli, M., Norwood, S.J., Bugarcic, A., Teasdale, R.D., King, G.F., and Collins, B.M. (2011) Phox homology band 4.1/ezrin/radixin/moesin-like proteins function as molecular scaffolds that interact with cargo receptors and Ras GTPases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 7763–7768.

CRYSTAL STRUCTURE OF THE PX DOMAIN OF SNX27

Y. Li¹, S. Liao², F. Li³, and Z. Zhu^{4*}

¹ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: ly1992@mail.ustc.edu.cn

² Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: jsod@mail.ustc.edu.cn

³ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China, lifudong@ustc.edu.cn

⁴ Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale & School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China; E-mail: zlzhu63@ustc.edu.cn

Received July 5, 2018

Revision received September 29, 2018

Accepted September 29, 2018

SNX27 is a component of the retromer complex essential for the recycling of transmembrane receptors. SNX27 contains the N-terminal PX domain that binds inositol 1,3-diphosphate and is important for the SNX27 localization. Here, we determined the crystal structure of human SNX27 PX domain by X-ray crystallography. We found that the sulfate ion is located in the positively charged lipid-binding pocket of the PX domain, which mimics the phospholipid recognition. In addition, we modelled the SNX27-PX–inositol 1,3-diphosphate complex to better understand the mechanism of inositol 1,3-diphosphate recognition by the PX domain of SNX27.

Keywords: SNX27, lipid binding, PX domain, crystal structure