

УДК 577.322.63

СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ ФРАГМЕНТОВ, СОДЕРЖАЩИХ Cys2-Cys2 МОТИВЫ, В АРХЕЙНЫХ ФАКТОРАХ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2

© 2021 О.С. Никонов*, Н.А. Невская, М.Б. Гарбер, С.В. Никонов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук,
142290 Пушкино Московской обл., Россия; электронная почта: alik@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 23.04.2021

После доработки 21.05.2021

Принята к публикации 25.05.2021

Гетеротримерный ($\alpha\beta\gamma$) фактор инициации трансляции 2 архей и эукариот (a/eIF2) снабжает Р-сайт рибосомы инициаторной тРНК. Две его субъединицы (β и γ) содержат Cys2-Cys2 мотив, который при наличии ионов цинка способен формировать стабильную структуру цинкового пальца. В представленной работе мы провели сравнительный анализ структур фрагментов, содержащих Cys2-Cys2 мотивы, в β - и γ -субъединицах из разных организмов и проанализировали окружение этих фрагментов в кристаллах. На основании полученных данных нами был сделан вывод о том, что в γ - и β -субъединицах aIF2 конформация и роль этих фрагментов различны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор инициации трансляции 2, *Sulfolobus solfataricus*, кристаллическая структура, цинковый палец, Cys2-Cys2 мотив.

DOI: 10.31857/S032097252108011X

ВВЕДЕНИЕ

Классический домен, содержащий цинковый палец, состоит из двух β -шпилек и одной α -спирали. Атом цинка, который координирует Cys2-His2 мотив [1] располагается внутри структуры и стабилизирует ее. Неклассические типы цинковых пальцев могут иметь иные комбинации координируемых атомов, в частности Cys2-CysHis или Cys2-Cys2 [2]. Роль подобных структурных доменов в клетке многогранна. Они задействованы в процессе узнавания последовательности нуклеотидов ДНК [3], могут связываться с РНК [4], а также способствовать белок-белковому взаимодействию [5].

Фактор инициации трансляции 2 архей и эукариот (a/eIF2) состоит из трех отдельных субъединиц (α , β , γ) и содержит по одному Cys2-Cys2 мотиву в β и γ -субъединицах [6, 7]. Наибольшая γ -субъединица функционально является ГТРАЗой. Она связана с α - и β -субъединицами, тогда как две последние не имеют контакта друг с другом [8, 9]. В процессе инициации трансля-

ции фактор в его активной ГТР-связанной форме участвует в транслокации метионилированной инициаторной тРНК (Met-tRNA_i) на малую рибосомную частицу [10]. После кодон-антикодонного связывания ГТР гидролизует до GDP, и фактор в неактивной GDP-связанной форме покидает рибосому, оставляя тРНК в ее Р-сайте.

Аминокислотные последовательности β - и γ -субъединиц a/eIF2 содержат Cys2-Cys2 мотив, в некоторых случаях координируемый ионом цинка. Так, для γ -субъединицы фактора инициации трансляции 2 из *Pyrococcus abyssi* (PabIF2 γ) было показано, что в области между переключателями 1 и 2 имеется структура, содержащая четыре близко расположенных цистеина и соответствующая цинковому пальцу. Наличие атома цинка в этой структуре было подтверждено методом атомно-абсорбционной спектроскопии [7]. Подобные структуры были также найдены в γ -субъединицах *Methanococcus jannaschii* (MjaIF2 γ) [11] и *Pyrococcus furiosus* (PfuIF2 γ) [12].

Структура цинкового пальца, содержащая Cys2-Cys2 мотив и координированный атом цинка, была также описана в составе С-концевых доменов β -субъединиц архей *M. jannaschii* (MjaIF2 β) [6] и *Methanobacterium thermoautotrophicum* (MbtIF2 β) [13], определенных с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР), и

Принятые сокращения: ЯМР – ядерный магнитный резонанс; a/eIF2 – фактор инициации трансляции 2 архей и эукариот; aIF2 β – β -субъединица фактора инициации трансляции 2 архей; aIF2 γ – γ -субъединица фактора инициации трансляции 2 архей.

* Адресат для корреспонденции.

P. furiosus (PfuIF2 β) [12] и *Sulfolobus solfataricus* (SsoIF2 β) [8], определенных методом рентгеноструктурного анализа. По классификации, приведенной в работе [14], цинковые пальцы α/ϵ IF2 относятся к типу RanBP ZnFs, поскольку построены из двух β -шпилек, содержащих четыре цистеина. Подобные структуры были описаны в целом ряде эукариотических белков, но об их функции известно очень мало, соответственно роль цинковых пальцев в функционировании α/ϵ IF2 также изучена слабо. В настоящее время известно, что замена второго цистеина на серин в γ -субъединице [15] или нарушение целостности цистеинового кластера в β -субъединице критичны для роста клеток и активности IF2 в дрожжевых системах [16]. Некоторые мутации в β -субъединице увеличивают скорость гидролиза GTP в дрожжах и делают его независимым от ϵ IF5 [17]. Делеция цинк-связывающего мотива в β -субъединице приводит к дефектам в инициации трансляции [18].

Из всех известных структур α IF2 наиболее полно изучена структура SsoIF2 γ . Структура этой субъединицы изучена во всех функциональных состояниях: GTP-связанном, GDP-связанном и свободном от нуклеотида [19]. Кроме того, известны структуры гетеродимеров $\alpha\gamma$ [20], $\beta\gamma$ [12] и неполного (содержащего фрагменты α - и β -субъединиц и полную γ -субъединицу) и полного $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримера [8, 9]. Полученные кристаллы относятся к разным пространственным группам симметрии, что позволяет детально изучить белок-белковые взаимодействия, характерные для Cys2-Cys2 мотива этой субъединицы.

В настоящей работе сделана попытка свести воедино всю известную информацию о структурных фрагментах β - и γ -субъединиц α/ϵ IF2, содержащих мотивы Cys2-Cys2 и имеющих конформацию, соответствующую цинковым пальцам типа RanBP. Выявлено принципиальное отличие структуры мотива в γ -субъединице *S. solfataricus* от подобных структур в других α IF2 γ . На основе исследования известных структур и их упаковок в кристалле сделаны следующие выводы:

1) цинковый палец β -субъединицы необходим для дополнительной защиты GTP в нуклеотид-связывающем кармане и уменьшения внутренней GTPазной активности фактора. Во всех известных структурах атомы серы четырех цистеинов β -субъединицы располагаются в вершинах правильной четырехгранной пирамиды с координирующим ионом цинка в ее центре, тогда как содержащий их C-концевой домен субъединицы обладает высокой лабильностью. Существование упорядоченной структуры цин-

кового пальца этой субъединицы без координирующего иона цинка невозможно;

2) в γ -субъединице Cys2-Cys2 мотив является частью субдомена, формирующего сайт связывания β -субъединицы. В известных структурах α IF2 γ архей субдомен либо имеет конформацию цинкового пальца, либо, как в γ -субъединице SsoIF2, формирует две стабилизирующие S-S связи между соседними шпильками и не способен связывать ион цинка. В последнем случае определяющую роль в конформации субдомена играют аминокислотные последовательности после второго и четвертого цистеинов;

3) наличие Cys2-Cys2 мотива в аминокислотной последовательности не является достаточным условием для формирования конформации цинкового пальца.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы структуры свободных β - и γ -субъединиц фактора инициации трансляции 2 архей, а также их комплексов, определенные методами рентгеновской кристаллографии и ЯМР (таблица). Все структуры взяты из базы данных PDB. В β -субъединицах граница домена цинкового пальца была определена за два аминокислотных остатка (а.о.) до первого цистеина, как это было сделано в более ранних работах [6]. В γ -субъединицах субдомены, содержащие Cys2-Cys2 мотивы, также начинаются за два а.о. до первого цистеина.

Наложение последовательностей выполнено вручную с использованием структурных данных. Для наложения фрагментов структур использовали программу O [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее было показано [8, 11, 12], что структуры β - и γ -субъединиц α IF2 из различных организмов обладают высокой степенью сходства, особенно в части элементов вторичной структуры. Поэтому для удобства читателей на рис. 1 представлена структура $\beta\gamma$ -комплекса из *P. furiosus* (PDB-код: 2d74) и показаны элементы, которые обсуждаются в тексте статьи. Фрагменты β - и γ -субъединиц, содержащие Cys2-Cys2 мотивы, выделены полупрозрачными сферами, а C α -атомы цистеинов помечены белыми шариками. В соответствии со сложившейся практикой на рис. 1 не отображены короткие β -шпильки, которые присутствуют в Cys2-Cys2 фрагментах. Эти шпильки с добавлением литеры f (например, f β 1) показаны при сравнении последо-

Структуры aIF2 и его субъединиц, использованные в работе

Объект	Лиганд	PDB-код	Метод	Группа симметрии	Разрешение, Å	Ссылка
SsoIF2 γ	GDP	2pmd	X-ray	P3 ₁	2,65	[22]
SsoIF2($\alpha\gamma$)	GDPNP	2aho	X-ray	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	3,00	[20]
SsoIF2($\alpha\beta\gamma$) _{incomp}	GDP	2qn6	X-ray	C ₁ 2 ₁	2,15	[8]
SsoIF2 γ (Δ 37-47)	GDP	3pen	X-ray	I23	2,30	н/о
SsoIF2 γ	GDPCP	4rjl	X-ray	I23	1,64	[23]
SsoIF2 γ	GDPNP	4rd4	X-ray	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	1,30	[24]
SsoIF2 γ	GDP	4rd6	X-ray	P2 ₁ 2 ₁ 2	1,94	[24]
SsoIF2 γ +formate	GDP	4m4s	X-ray	H32	2,25	[19]
SsoIF2 γ	GDP	4m0l	X-ray	P2 ₁	2,60	[19]
SsoIF2 γ	–	4m2l	X-ray	P3 ₁ 2 ₁	2,15	[19]
SsoIF2 γ	GDPCP	4m53	X-ray	I23	2,00	[19]
SsoIF2 γ (–Mg ²⁺)	GDPCP	6h6k	X-ray	P1	2,00	[25]
PfuIF2($\beta\gamma$)	GDP	2d74	X-ray	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	2,80	[12]
PabIF2 γ	GDP	1kk3	X-ray	P2 ₁	1,90	[7]
MjaIF2 γ	–	1s0u	X-ray	P2 ₁	2,40	[11]
MjaIF2 β	–	1k81	NMR	н/п	н/п	[6]
MbtIF2 β	–	1nee	NMR	н/п	н/п	[13]
SsoIF2 $\alpha\beta\gamma$	–	3cw2	X-ray	P2 ₁	2,80	[9]
SsoIF2 $\alpha\beta\gamma$ +tRNA	GDPNP	3v11	X-ray	P3221	5,0	[26]

Примечание. Sso – *S. solfataricus*, Pfu – *P. furiosus*, Pab – *P. abyssi*, Mja – *M. jannaschii*, Mbt – *M. thermoautotrophicum*; GDP – гуанозиндифосфат; GDPCP – 5'-гуанозилметилентрифосфат; GDPNP – 5'-гуанилилимидодифосфат; incomp – неполный комплекс; X-ray – рентгеновская кристаллография; NMR – ядерный магнитный резонанс; formate – формиат; н/о – не опубликовано; н/п – не применимо.

вательностей фрагментов из разных организмов.

Цинковые пальцы в β -субъединицах aIF2. Как отмечалось ранее, структуры C-концевых доменов aIF2 β , содержащих Cys2-Cys2 мотивы, известны для четырех организмов: *M. jannaschii* [6], *M. thermoautotrophicum* [13], *P. furiosus* [12] и *S. solfataricus* [8]. Последовательности этих доменов содержат по 35 а.о. и описываются одной общей формулой: 2х, С, 2х, С, 17х, С, 2х, С, 8х, где х – любой а.о. Наибольшим числом замен обладает последовательность *S. solfataricus* (33,3% идентичности с другими последовательностями), тогда как последовательности *M. jannaschii*, *P. furiosus* и *M. thermoautotrophicum* имеют идентичность 54,5%, а для последовательностей C-концевых доменов MjaIF2 β и PfuIF2 β она достигает 70%.

Все C-концевые домены β -субъединиц указанных выше структур имеют конформацию

цинкового пальца с атомом цинка в середине четырехгранной правильной пирамиды, в вершинах которой располагаются атомы серы. Длина ребра пирамиды в структурах, определенных методом ЯМР, равна $3,81 \pm 0,02$ Å, тогда как ребра в структурах, определенных рентгеноструктурным методом, демонстрируют несколько меньшую усредненную длину и значительно больший разброс ($3,43 \pm 0,25$ Å), возможно, вследствие достаточно низкого разрешения. Положение атома цинка в этих структурах также отличается от его идеальной координации, наблюдаемой в ЯМР-структурах. Однако следует заметить, что незначительные развороты атомов серы цистеинов вокруг связи C α -C β позволяют разместить их в вершинах правильной четырехгранной пирамиды, не выходя за пределы электронной плотности.

Ранее было показано, что цинк необходим для стабилизации C-концевого домена aIF2 β [27].

Структура полного фактора [9] подтверждает, что отсутствие иона цинка в кристаллизационном растворе ведет к разупорядочению этого домена. Наиболее четкое представление о вторичной структуре цинкового пальца можно получить из анализа ЯМР-структуры фрагмента MjaIF2 β (PDB-код: 1k81) [6], поскольку этот фрагмент лишен искажений, вызванных упаковкой молекул в кристалле. Основу структуры цинкового пальца составляет антипараллельный β -лист, состоящий из трех β -тяжей (рис. 2). Образованная двумя последними тяжами β -шпилька содержит два цистеина. Другие два цистеина, формирующие цинковый палец, на-

ходятся на концах искаженной спирали, содержащей один виток, ось которой параллельна поверхности β -листа. В отличие от ЯМР-структур кристаллические структуры содержат две β -шпильки (h1-h2, h3-h4), в каждой из которых размещено по два цистеина. Шпильки лежат в двух приблизительно параллельных плоскостях; ион цинка расположен между ними. Поверхность пальца в основном гидрофобна, однако в области цистеинового кластера значительное число атомов кислорода главной цепи оказывается доступно растворителю.

Несмотря на высокую степень идентичности (67%) аминокислотных последовательностей и

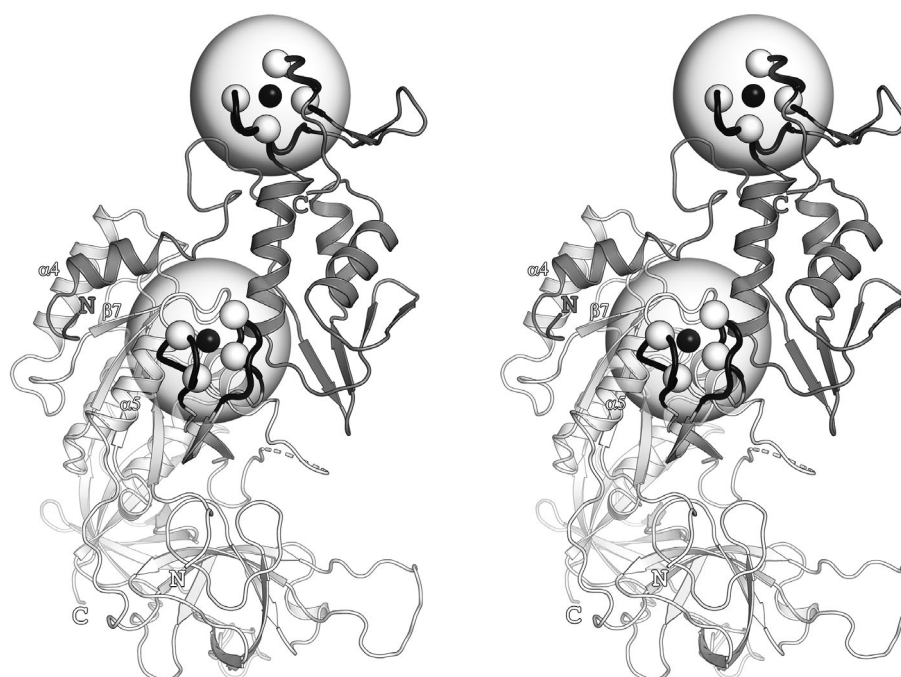


Рис. 1. Структура комплекса aIF2 $\beta\gamma$ из *P. furiosus* (PDB-код: 2d74); стереопары. Показаны элементы вторичной структуры и функционально важные участки, обсуждаемые в тексте статьи. Структуры β - и γ -субъединиц выделены белым и серым цветами соответственно. Цинк-связывающие мотивы выделены полупрозрачными сферами. α -атомы цистеинов показаны белыми сферами, ионы цинка – черными сферами, ход полипептидной цепи, формирующей цинк-связывающие мотивы – черным цветом



Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей цинковых пальцев β -субъединиц *M. jannaschii* (PDB код: 1k81), *M. thermoautotrophicum* (PDB код: 1nee), *P. furiosus* (PDB код: 2d74) и *S. solfataricus* (PDB код: 2qn6). Белым цветом на черном фоне показаны а.о., общие для всех четырех последовательностей, на сером фоне – только для трех, исключая последовательность SsoIF2 β . α -Спираль и три длинных β -тяжа соответствуют цинковому пальцу MjaIF2 β , β -шпильки (h1-h2 и h3-h4) – цинковым пальцам *P. furiosus* и *S. solfataricus*

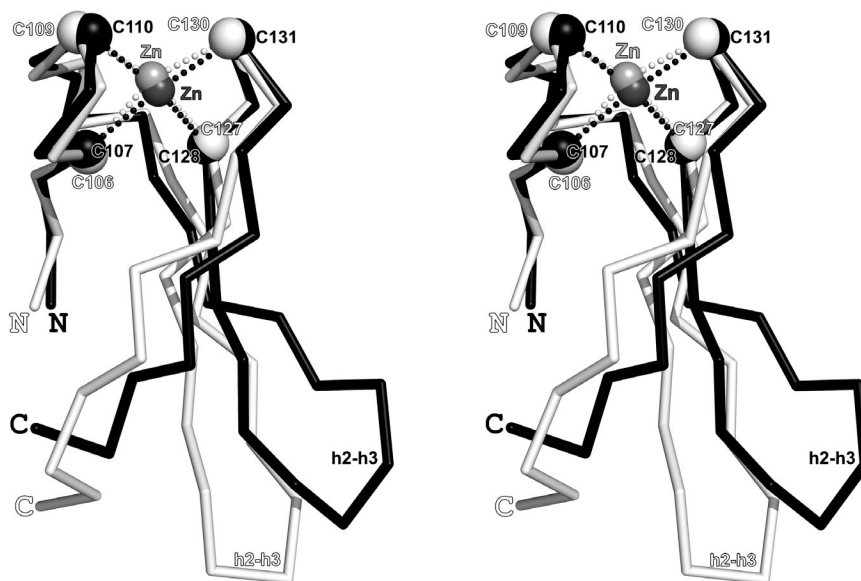


Рис. 3. Наложение кристаллических структур цинковых пальцев β -субъединиц SsoIF2 (показана белым цветом, PDB-код: 2qmu) и PfuIF2 (показана черным цветом, PDB-код: 2d74); стереопары. Наложение выполнено по 17-ти $\text{C}\alpha$ -атомам (103–113 (104–114) и 127–132 (128–133)) для SsoIF2 и PfuIF2 соответственно; $\text{C}\alpha$ -атомы показаны белыми и черными сферами соответственно с $\sigma = 0,534 \text{ \AA}$. Все четыре цистеина занимают приблизительно одинаковое положение в обеих структурах (максимальное отклонение $\text{C}\alpha$ -атомов в паре Cys106–Cys107 равно $0,64 \text{ \AA}$), тогда как положения β -шпильки h2-h3 и C-концевой части пальца сильно различаются и полностью определяются кристаллической упаковкой. Ионы цинка показаны светло-серой (2qmu) и тёмно-серой (2d74) сферами

одинаковое расположение атомов серы друг относительно друга наложение ЯМР-структур (MjaIF2 β и MbtIF2 β) сопряжено со значительными трудностями, т.к. взаимодействие N-концевого домена β -субъединицы с ее центральным доменом в одной из них [27] приводит к драматическим искажениям как β -листа, так и N-концевой части цинкового пальца. Кристаллические структуры цинковых пальцев β -субъединиц SsoIF2 и PfuIF2 также демонстрируют высокую лабильность, однако в этих структурах β -шпильки (h1-h2 и h3-h4) сохраняют свою конформацию (рис. 3). В пределах ошибки измерений сохраняется также и взаимное расположение $\text{C}\alpha$ -атомов и атомов серы всех четырех цистеинов. В то же время конформация центральной части пальца претерпевает значительные изменения в зависимости от положения C-концевой части β -субъединицы относительно γ -субъединицы. Участок последней, содержащий нуклеотид-связывающий карман, закрывается цинковым пальцем β -субъединицы (SsoIF2) или ее центральным доменом (PfuIF2), в обоих случаях обеспечивая защиту связанного нуклеотида.

В кристаллах $\beta\gamma$ -гетеродимера PfuIF2 [12] и неполного гетеротримерного комплекса SsoIF2 [8] цинковый палец β -субъединицы имеет разное окружение и взаимодействует с различными

областями симметричной молекулы γ -субъединицы. В кристаллах неполного SsoIF2 $\beta\gamma$ 3D α -гетеротримера [8] цинковый палец β -субъединицы сдвинут в сторону домена III γ -субъединицы и в большей степени прикрывает нуклеотид-связывающий карман. Различия кристаллических упаковок двух этих структур является, по видимому, основной причиной изменений в конформации их цинковых пальцев.

Следует отметить значительное конформационное различие между структурами цинкового пальца β -субъединицы в кристалле и растворе. Ранее уже говорилось о невозможности сравнения двух структур, полученных методом ЯМР. Попытка наложить β -шпильки кристаллических структур на соответствующие по аминокислотной последовательности участки структур в растворе в лучшем случае позволяет получить среднее квадратичное отклонение $\approx 3 \text{ \AA}$ при значительных смещениях $\text{C}\alpha$ -атомов всех четырех цистеинов. Таким образом, даже в присутствии координирующего иона цинка цинковый палец β -субъединицы представляет собой высоко лабильную структуру и способен принимать разные конформации.

Цинковые пальцы в структурах α IF2 γ . В структурах γ -субъединиц из *P. abyssi* [7], *P. furiosus* [12] и *M. jannaschii* [11] атом цинка координирует четыре атома серы подобно тому, как это

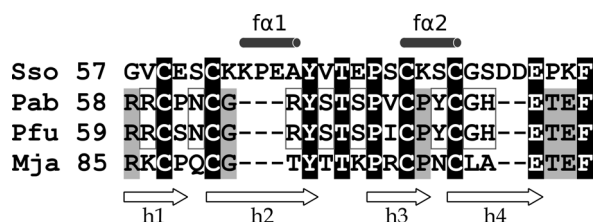


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей Cys2-Cys2 субдоменов архейных IF2 γ *S. solfataricus* (PDB-код: 4rd4), *P. abyssi* (PDB-код: 1kk3), *P. furiosus* (PDB-код: 2d74), *M. jannaschii* (PDB-код: 1s0u). Одновитковые спирали в структуре SsoIF2 γ показаны как $\alpha 1$ и $\alpha 2$, β -шпильки – как h1-h2 и h3-h4. Остатки, совпадающие во всех 4-х случаях, выделены белым шрифтом на черном фоне, в трех случаях – серым фоном, только в двух случаях – серой рамкой

наблюдается в β -субъединицах. Фрагмент структуры, содержащий Cys2-Cys2 мотив, представляет собой субдомен, связанный с телом молекулы двумя β -тяжами, и описывается общей формулой: 2x, C, 2x, C, 8x, C, 2x, C, 6x. Цинковые пальцы PabIF2 γ и PfuIF2 γ идентичны за исключением одного остатка. Идентичность последовательностей цинковых пальцев PabIF2 γ и MjaIF2 γ составляет 67%.

Подобно цинковым пальцам кристаллических структур β -субъединиц цинковые пальцы рассматриваемых трех γ -субъединиц также сформированы двумя β -шпильками (рис. 4). Шпильки связаны осью симметрии второго порядка, которая проходит через атом цинка и примерно параллельна оси пальца. На плоской поверхности каждой шпильки находятся четыре экспонированных в растворитель атома кислорода главной цепи. Содержащие цистеины участки цинковых пальцев β - и γ -субъединиц кристаллических структур имеют близкую конформацию. Так, в структуре PfuIF2 $\beta\gamma$ они могут быть наложены друг на друга со средней квадратичной ошибкой 1,05 Å для 18-ти C α -атомов, тогда как для 9-ти N-концевых C α -атомов эта величина уменьшается до 0,47 Å. Участок между N-концевой и C-концевой парами цистеинов в γ -субъединицах в два раза короче, чем в β -субъединицах, что, по-видимому, оказывает существенное влияние на стабильность структуры цинкового пальца.

В кристалле PfuIF2 γ β -шпилька, содержащая C-концевую пару цистеинов, имеет плотный контакт с центральным доменом β -субъединицы, а вершина шпильки, содержащей N-концевую пару цистеинов, контактирует со спиралью $\alpha 1$ β -субъединицы. В кристаллах PabIF2 γ и MjaIF2 γ с окружающими молекулами контактирует, соответственно, либо вершина C-концевой шпильки, либо вершина N-концевой

шпильки. Тем не менее все 24 C α -атома, составляющие цинковый палец указанных структур, могут быть наложены друг на друга со средней квадратичной ошибкой, не превышающей 0,57 Å.

В базе данных PDB содержится несколько структур PabIF2 γ , определенных с разрешением выше 1,9 Å. Эти структуры позволяют оценить среднее расстояние между координируемыми цинком атомами серы в $3,69 \pm 0,25$ Å, что близко к оценке этой величины в структурах aIF2 β , полученных методом ЯМР. Следует отметить, что изменение конформации боковых цепей цистеинов этих структур в пределах электронной плотности легко позволяет расположить атомы серы в вершинах правильной четырехгранной пирамиды.

Cys2-Cys2 мотив в структуре SsoIF2 γ . Цистеиновый кластер SsoIF2 γ содержит аминокислотные остатки в положениях 57–85 и, подобно Cys2-Cys2 мотивам рассмотренных ранее γ -субъединиц архейных факторов инициации 2, представляет собой отдельный субдомен, содержащий две β -шпильки. Однако структурно субдомен SsoIF2 γ существенно отличается от цинковых пальцев других aIF2 γ . Он содержит дополнительно 3 а.о. между вторым и третьим цистеинами и 2 а.о. после четвертого цистеина и описывается формулой 2x, C, 2x, C, 11x, C, 2x, C, 8x. Удлинение Cys2-Cys2 субдомена SsoIF2 γ на 5 а.о. по отношению к цинковым пальцам других aIF2 γ привело к значительному изменению его конформации по сравнению с ними.

Наложение структур субдоменов SsoIF2 γ и PabIF2 γ показано на рис. 5. Вставка 3-х а.о. в N-концевой β -шпильке SsoIF2 γ привела к образованию одновитковой спирали с участием а.о. в положениях 64–68, стабилизированной двумя водородными связями Lys63 O – Ala67 N и Pro65 O – Tyr68 N, тогда как конформация остальной части шпильки существенно не поменялась. При этом положение C α -атомов цистеинов практически идентично в обоих белках. В C-концевой β -шпильке вставка двух аминокислотных остатков после последнего цистеина в последовательность SsoIF2 γ изменила конформацию участка последовательности в положениях 73–83, сместив оба цистеина на концы одновитковой спирали 74–78. Для Cys77 C α это смещение составило 3,91 Å по отношению к соответствующему Cys75 PabIF2 γ .

Сближение цистеинов N- и C-концевой шпилек в Cys2-Cys2 субдомene SsoIF2 γ и изменение ориентации их C α -C β связей привели к образованию двух S-S мостиков: Cys59–Cys74 и Cys62–Cys77, стабилизирующих структуру субдомена. Сравнение структур SsoIF2 γ высокого

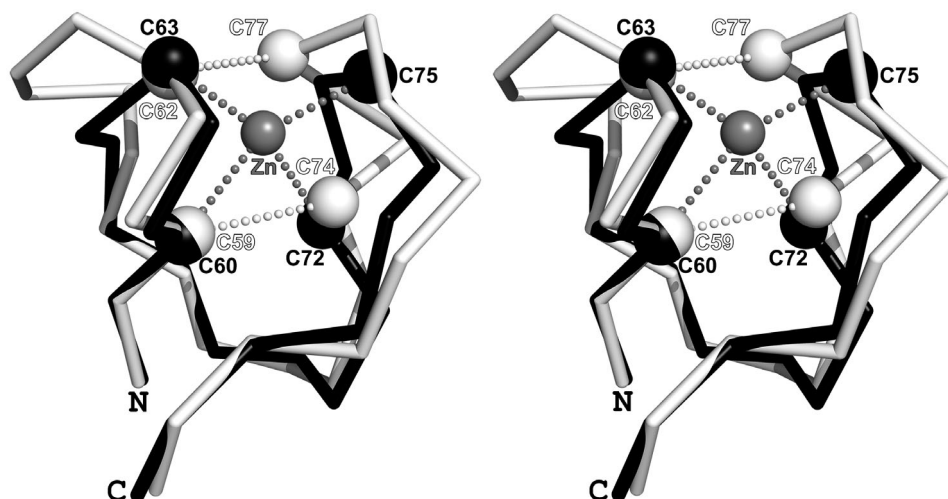


Рис. 5. Наложение структур субдоменов SsoIF2 γ (показана белым цветом, PDB-код: 4rd4) и PabIF2 γ (показана черным цветом, PDB-код: 1kk3); стереопары. Наложены а.о. в положениях 57–62, 67–70 и 82–85 структуры 4rd4 и а.о. 58–63, 65–68 и 78–81 структуры 1kk3 ($\sigma = 0,516$). С α -атомы цистеинов показаны сферами соответствующих цветов, ион цинка PabIF2 γ показан сферой серого цвета. Вставка 3 а.о. в *N*-концевой β -шпильке SsoIF2 γ и 2 а.о. в *C*-концевой β -шпильке привела к образованию двух одновитковых спиралей: 64–68 и 74–78, двух S-S связей и значительному смещению шпилек относительно друг друга. Для Cys77 С α это смещение составило 3,91 Å по отношению к соответствующему Cys75 PabIF2 γ

разрешения показывает, что атомы серы располагаются в вершинах неправильной четырехгранной пирамиды со сторонами S59–S74 и S62–S77, равными $2,05 \pm 0,01$ Å, и сторонами S59–S62, S59–S77, S62–S74 и S74–S77, равными $4,80 \pm 0,08$, $3,92 \pm 0,09$, $5,42 \pm 0,14$ и $4,77 \pm 0,07$ Å соответственно. Очевидно, что в этом случае координация атомов серы ионом цинка невозможна, что подтверждается отсутствием соответствующего иона во всех структурах SsoIF2 γ .

Анализ кристаллических упаковок SsoIF2 γ подтверждает высокую стабильность Cys2-Cys2 субдомена этого белка, содержащего два S-S мостика. Известные в настоящее время структуры SsoIF2 γ закристаллизованы в девяти пространственных группах (таблица). Среди рассмотренных структур имеются соответствующие всем трем состояниям белка (GTP-связанному, GDP-связанному и свободному от нуклеотида), в том числе содержащие $\alpha\gamma$ -гетеродимер и комплекс γ -субъединицы со спиралью $\alpha 1$, принадлежащей β -субъединице. Наиболее плотное окружение цистеинового субдомена обнаружено в кристалле, относящемся к пространственной группе P1. В этой структуре субдомен контактирует с двумя соседними молекулами: со шпилькой $\beta 19$ – $\beta 20$ домена III одной молекулы и междоменной перетяжкой доменов II и III другой. Домен III соседней молекулы перекрывает ограниченную субдоменом впадину на поверхности SsoIF2 γ , в которой расположен сайт связывания β -субъединицы. Аналогичный контакт с доменом III симметричной молекулы

найден в структуре 4tj1, кристаллы которой принадлежат к кубической пространственной группе симметрии I23, и в структурах 2pmd и 4m2l, кристаллы которых принадлежат к пространственным группам P3 $_1$ и P3 $_1$ 21 соответственно. В остальных кристаллах SsoIF2 γ - и SsoIF2 $\alpha\gamma$ -гетеродимера сайт связывания β -субъединицы также занят различными частями симметричных молекул, а именно шпилькой $\beta 12$ – $\beta 13$, *N*-концевой частью переклювателя 2, переклюкателем 1 или доменом 1 α -субъединицы. Только в кристаллах комплекса γ -субъединицы с принадлежащей β -субъединице спиралью $\alpha 1$ (PDB-код: 2qn6) межмолекулярные контакты в этой области отсутствуют. Отсюда следует, что Cys2-Cys2 субдомен ограничивает «липкую» впадину на поверхности γ -субъединицы, которая используется для связывания спирали $\alpha 1$ β -субъединицы. Более того, сродство этой спирали к γ -субъединице выше, чем сродство других участков SsoIF2, принимающих участие в кристаллических контактах.

Сравнение структур SsoIF2 γ , относящихся к различным группам симметрии, показало, что несмотря на различное окружение, существенных изменений в конформации главной цепи Cys2-Cys2 субдомена при изменении упаковки молекул в кристалле не наблюдается (среднее квадратичное отклонение не превышает 0,85 Å даже для пары структур низкого разрешения). Наибольшему смещению подвергаются С α -атомы Cys77, расстояния между которыми в паре структур низкого или среднего разрешения мо-

жет достигать 2,2 Å. Следует, однако, заметить, что это смещение практически не влияет на взаимное расположение атомов серы всех четырех цистеинов, расстояния между которыми остаются почти неизменными. Область субдомена, обращенная к телу молекулы (а.о. в положениях 57–69), представляет собой его наиболее консервативный участок.

Структура Cys2-Cys2 субдомена SsoIF2 γ демонстрирует, что наличие четырех близко расположенных цистеинов не обязательно ведет к формированию цинкового пальца. В отличие от других aIF2 γ в структуре SsoIF2 γ цистеины двух соседних шпилек формируют две S-S связи, что обеспечивает ее высокую стабильность и исключает перестройки в положениях атомов серы, которые необходимы для посадки иона цинка. Отсюда можно сделать вывод, что часть молекулы aIF2 γ , которая в структурах PfuIF2 γ , PabIF2 γ и MjaIF2 γ имеет форму цинкового пальца, не предназначена для выполнения известных из литературы функций этого пальца, а используется исключительно для формирования места связывания β -субъединицы. Для этих целей субдомен SsoIF2 γ , не требующий для своей стабилизации связывания иона цинка, более предпочтителен, чем цинковый палец, используемый другими археями. Анализ соответствующих участков аминокислотных последовательностей факторов инициации 2 дрожжей и человека позволяет сделать вывод, что вставка 5 а.о. в последовательность Cys2-Cys2 субдомена, характерная для SsoIF2 γ , является эволюционным приобретением, которое используют и эукариоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цинковый палец архейных IF2 β необходим, по-видимому, для дополнительной защиты нуклеотида в нуклеотид-связывающем кармане и не несет структурной функции. В присутствии координирующего иона цинка атомы серы всех четырех цистеинов сохраняют свое взаимное положение, чего нельзя сказать о конформации пальца в целом. Анализ структур C-концевых доменов β -субъединиц из различных организмов позволяет сделать вывод о высокой лабильности этого фрагмента. Наложение всех C α -атомов для кристаллических структур PfuIF2 β и SsoIF2 β дает $\sigma = 1,6$ Å, а для структур, полученных методом ЯМР, наложение выполнить практически невозможно. В отсутствие иона цинка палец не в состоянии сохранять упорядоченную структуру, и его β -лист разрушается. Тяж $\beta 3$ вступает в непосредственный контакт с N-концевой частью переключателя 1 aIF2 γ [9], что ве-

дет к смещению цинкового пальца относительно нуклеотид-связывающего кармана γ -субъединицы и снижает степень защиты нуклеотида от столкновения с другими молекулами в процессе броуновского движения, хотя и не ликвидирует ее полностью. По-видимому, отсутствие ионов цинка столь же критично для функционирования цинкового пальца IF2 β , как и замены одного из цистеинов на другой аминокислотный остаток [18]. Защитная роль цинкового пальца β -субъединицы подтверждается также тем, что мутации в этой области увеличивают собственную скорость гидролиза GTP в IF2 из *S. cerevisiae* даже в отсутствие eIF5 [17]. Кроме того, крио-ЭМ структура полного инициаторного комплекса архейной рибосомы [28] также демонстрирует, что в случае, когда антикодон тРНК удален от Р-сайта рибосомы, цинковый палец β -субъединицы расположен напротив нуклеотид-связывающего кармана γ -субъединицы и отходит в сторону при кодон-антикодновом спаривании, снимая дополнительную защиту нуклеотида.

Мотив Cys2-Cys2 сохраняется также в последовательностях β -субъединиц эукариот, что говорит в пользу схожести функции этих мотивов в обоих доменах жизни. Предполагается, что в эукариотах цинковый палец β -субъединицы вместе с лизиновыми повторами участвует в связывании мРНК [29]. Тем не менее анализ структуры архейной рибосомы в состоянии, предшествующем кодон-антикодновому связыванию, и в состоянии кодон-антикоднового взаимодействия [28] не обнаруживает каких-либо контактов между β -субъединицей и мРНК.

В γ -субъединице субдомена, содержащий Cys2-Cys2 мотив, ограничивает с одной из сторон глубокую выемку, образующую сайт связывания β -субъединицы, другая сторона которой образована спиралью $\alpha 4$. В факторах, содержащих одну субъединицу, таких как EF-Tu [30], подобная выемка отсутствует. Формирование выемки в гетеротримерных факторах инициации трансляции 2 обеспечивает нужную ориентацию узнающей спирали β -субъединицы, которая может быть направлена только параллельно тяжу $\beta 7$ (рис. 1). Использование в качестве ограничителя небольшой, но стабильной структуры цинкового пальца является, по-видимому, эволюционным приобретением некоторых aIF2, ускоряющим формирование гетеротримера. Тем не менее структура цинкового пальца, содержащего Cys2-Cys2 мотив, стабильна только в присутствии иона цинка [9, 27]. В археях, которые используют цинковый палец в качестве одной из стенок сайта связывания β -субъединицы, в случае недостатка цинка в клетке образо-

вание $\beta\gamma$ -гетеродимера может быть заблокировано или сильно затруднено, что ведет к нарушению функции aIF2. Видимо поэтому в процессе эволюции стабилизация субдомена с помощью иона цинка в *S. solfataricus* была заменена стабилизацией двумя S-S связями. Кроме того, N-концевая спираль субдомена SsoIF2 γ перпендикулярна спирали $\alpha 5$ и обеспечивает его дополнительную привязку к телу молекулы. Обращает на себя внимание идентичное положение по отношению к спирали $\alpha 5$ консервативного Tyr68 (положение соответственно номенклатуре SsoIF2 γ) во всех известных структурах aIF2 γ вне зависимости от конформации субдомена. Этот остаток входит в состав гидрофобного ядра между субдоменом и телом молекулы. Усиление связи субдомена с $\alpha 5$ и сокращение расстояния между субдоменом и $\alpha 4$ повышают вероятность узнавания β -субъединицей сайта связывания на SsoIF2 γ . Следует отметить, что последовательности γ -субъединиц эукариот вообще не содержат Cys2-Cys2 мотив, однако вполне вероятно, что аналогичный участок их сайта связывания с β -субъединицей также стабилизирован S-S связями. Так, последовательность дрожжевой субъединицы содержит пять цистеинов с минимальным расстоянием в 4 а.о. между ними, а последовательность человеческой γ -субъединицы – всего три цистеина. Таким образом, имеются все основания полагать, что этот субдомен выполняет только структурную функцию. В пользу данного вывода свидетель-

ствует также высокая стабильность цинкового пальца γ -субъединицы архей, что кардинально отличает его от цинкового пальца β -субъединиц, который, вероятно, не выполняет структурной функции.

Наш анализ показывает, что конформации субдоменов, содержащих Cys2-Cys2 мотивы в γ -субъединицах aIF2 из разных организмов, могут существенно различаться. В трех известных aIF2 γ в присутствии ионов цинка формируется конформация цинкового пальца с координирующим атомом цинка в центре правильной четырехгранной пирамиды и четырьмя атомами серы в ее вершинах, тогда как в структуре SsoIF2 γ атомы серы образуют две S-S связи и не требуют иона цинка для стабилизации субдомена. Таким образом, несмотря на схожесть формул, описывающих аминокислотные последовательности субдоменов, наличие Cys2-Cys2 мотива не является достаточным доказательством присутствия цинкового пальца в структуре.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119122490038-8.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang, W., Xu, C., Bian, C., Tempel, W., Crombet, L., et al. (2011) Crystal structure of the Cys2-His2-type zinc finger domain of human DPF26 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **413**, 58-61, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.043.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., et al. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease, *Cell Death Discov.*, **3**, 17071-17082, doi: 10.1038/cddiscovery.2017.71.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., and Harrisont, S. C. (1992) DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex, *Nature*, **356**, 408-414, doi: 10.1038/356408a0.
- Hall, T. M. (2005) Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 367-373, doi: 10.1016/j.sbi.2005.04.004.
- Mackay, J. P., and Crossley, M. (1998) Zinc fingers are sticking together, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 1-4, doi: 10.1016/s0968-0004(97)01168-7.
- Cho, S., and Hoffman, D. W. (2002) Structure of the β subunit of translation initiation factor 2 from the archaeon *Methanococcus jannaschii*: a representation of the eIF2 β /eIF5 family of proteins, *Biochemistry*, **41**, 5730-5742, doi: 10.1021/bio11984n.
- Schmitt, E., Blanquet, S., and Mechulam, Y. (2002) The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors, *EMBO J.*, **21**, 1821-1832, doi: 10.1093/emboj/21.7.1821.
- Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S., and Schmitt, E. (2007) Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18445-18450, doi: 10.1073/pnas.0706784104.
- Stolboushkina, E., Nikonov, S., Nikulin, A., Blasi, U., Manstein, D. J., et al. (2008) Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the alpha- and beta-subunits, *J. Mol. Biol.*, **382**, 680-691, doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.039.
- Kyrpidis, N. C., and Woese, C. R. (1998) Archaeal translation initiation revisited: the initiation factor 2 and eukaryotic initiation factor 2B α - β - δ subunit families, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3726-3730, doi: 10.1073/pnas.95.7.3726.
- Roll-Mecak, A., Alone, P., Cao, C., Dever, T. E., and Burley, S. K. (2004) X-ray structure of translation initiation factor eIF2gamma: implications for tRNA and eIF2alpha binding, *J. Biol. Chem.*, **279**, 10634-10642, doi: 10.1074/jbc.M310418200.
- Sokabe, M., Yao, M., Sakai, N., Toya, S., and Tanaka, I. (2006) Structure of archaeal translational initiation factor 2

- betagamma-GDP reveals significant conformational change of the beta-subunit and switch 1 region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13016-13021, doi: 10.1073/pnas.0604165103.
13. Gutierrez, P., Osborne, M. J., Siddiqui, N., Trempe, J. F., Arrowsmith, C. and Gehring, K. (2004) Structure of the archaeal translation initiation factor aIF2 β from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: implications for translation initiation, *Protein Sci.*, **13**, 659-667, doi: 10.1110/ps.03506604.
 14. Gamsjaeger, R., Liew, C. K., Loughlin, F. E., Crossley, M., and Mackay, J. P. (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs, *Trends Biochem Sci.*, **32**, 63-70, doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.007.
 15. Erickso, F. L., Harding, L. D., Dorris, D. R., and Hanning, E. M. (1998) Functional analysis of homologs of translation initiation factor 2 γ in yeast, *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 711-719, doi: 10.1007/s004380050375.
 16. Donahue, T. F., Cigan, A. M., Pabich, E. K., and Valavicius, B. C. (1988) Mutations at a Zn(II) finger motif in the yeast eIF-2 β gene alter ribosomal start-site selection during the scanning process, *Cell*, **54**, 621-632, doi: 10.1016/s0092-8674(88)80006-0.
 17. Huang, H. K., Yoon, H., Hanning, E. M., Donahue, T. F. (1997) GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Dev.*, **11**, 2396-2413, doi: 10.1101/gad.11.18.2396.
 18. Castilho-Valavicius, B., Thompson, G. M., and Donahue, T. F. (1992) Mutation analysis of the Cys-X2-Cys-X19-Cys-X2-Cys motif in the β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2, *Gene Expr.*, **2**, 297-309.
 19. Nikonov, O., Stolboushkina, E., Arkhipova, V., Kravchenko, O., Nikonov, S., and Garber, M. (2014) Conformational transitions in the γ subunit of the archaeal translation initiation factor 2, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 658-667, doi: 10.1107/S1399004713032240.
 20. Yatime, L., Mechulam, Y., Blanquet, S., and Schmitt, E. (2006) Structural switch of the gamma subunit in an archaeal aIF2alpha gamma heterodimer, *Structure*, **14**, 119-128, doi: 10.1016/j.str.2005.09.020.
 21. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models, *Acta Crystallogr. A Found. Adv.*, **47**, 110-119, doi: 10.1107/s0108767390010224.
 22. Nikonov, O., Stolboushkina, E., Nikulin, A., Hasenöhrl, D., Bläsi, U., et al. (2007) New insights into the interactions of the translation initiation factor 2 from archaea with guanine nucleotides and initiator tRNA, *J. Mol. Biol.*, **373**, 328-336, doi: 10.1016/j.jmb.2007.07.048.
 23. Nikonov, O., Kravchenko, O., Arkhipova, V., Stolboushkina, E., Nikonov, S., and Garber, M. (2016) Water clusters in the nucleotide-binding pocket of the protein aIF2g from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: proton transmission, *Biochimie*, **121**, 197-203, doi: 10.1016/j.biochi.2015.11.029.
 24. Dubiez, E., Aleksandrov, A., Lazennec-Schurdevin, C., Mechulam, Y., and Schmitt, E. (2015) Identification of a second GTP-bound magnesium ion in archaeal initiation factor 2, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 2946-2957, doi: 10.1093/nar/gkv053.
 25. Nikonov, O., Kravchenko, O., Nevskaya, N., Stolboushkina, E., Garber, M., and Nikonov, S. (2019) The third structural switch in the archaeal translation initiation factor 2 (aIF2) molecule and its possible role in the initiation of GTP hydrolysis and the removal of aIF2 from the ribosome, *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.*, **75**, 392-399, doi: 10.1107/S2059798319002304.
 26. Schmitt, E., Panvert, M., Lazennec-Schurdevin, C., Coureux, P. D., Perez, J., et al. (2012) Structure of the ternary initiation complex aIF2-GDPNP-methionylated initiator tRNA, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 450-454, doi: 10.1038/nsmb.2259.
 27. Gutierrez, P., Collet-Matillon, S., Arrowsmith, C., and Gehring, K. (2002) Zinc is required for structural stability of the C-terminus of archaeal translation initiation factor aIF2 β , *FEBS Lett.*, **517**, 155-158, doi: 10.1016/s0014-5793(02)02610-8.
 28. Coureux, P.-D., Lazennec-Schurdevin, C., Monestier, A., Larquet, E., Cladiere, L., et al. (2016) Cryo-EM study of start codon selection during archaeal translation initiation, *Nat. Commun.*, **7**, 13366-13375, doi: 10.1038/ncomms13366.
 29. Laurino, J. P., Thompson, G. M., Pacheco, E., Castilho, B. A. (1999) The β subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif, *Mol. Cell Biol.*, **19**, 173-181, doi: 10.1128/mcb.19.1.173.
 30. Berchtold, H., Reshetnikova, L., Riser, C. O., Schirmer, N. K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R. (1993) Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements, *Nature*, **365**, 126-132, doi: 10.1038/365126a0.

STRUCTURE AND FUNCTION OF ARCHAEL TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 FRAGMENTS CONTAINING Cys2-Cys2 MOTIVES

O. S. Nikonov*, N. A. Nevskaya, M. B. Garber, and S. V. Nikonov

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: alik@vega.protres.ru*

Heterotrimeric ($\alpha\beta\gamma$) translation initiation factor 2 of archaea and eukaryotes (a/eIF2) supplies the P site of the ribosome with the initiation tRNA. Its two subunits (β and γ) contain the Cys2-Cys2 motif, which in the presence of zinc ions is capable of forming a stable structure of zinc finger. In this work, a comparative analysis of fragments, containing Cys2-Cys2 motifs, of aIF2 β and aIF2 γ structures from different organisms and their environment in crystals was carried out. Based on the data obtained, a conclusion was made about the different conformation and role of these fragments in β and γ subunits of aIF2.

Keywords: translation initiation factor 2, *Sulfolobus solfataricus*, crystal structure, Zn-finger, Cys2-Cys2 motif