

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.322.63

ВЛИЯНИЕ МИССЕНС-МУТАЦИИ Pе222Thr В SsoIF2γ
НА СРОДСТВО γ- И β-СУБЪЕДИНИЦ aIF2© 2021 г. О. С. Никонов^{1,*}, О. В. Кравченко¹, Н. А. Невская¹, Е. А. Столбоушкина¹,
М. Б. Гарбер¹, С. В. Никонов¹¹ Институт белка РАН, Пущино, Россия

*E-mail: alik@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 08.09.2020 г.

После доработки 16.12.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Фактор инициации трансляции 2 эукариот (eIF2) и архей (aIF2) доставляет заряженную инициаторную тРНК (Met-tRNA^{iMet}) на малую рибосомную субчастицу. Фактор e/aIF2 состоит из трех субъединиц (α, β, γ) и функционирует как гетеротримерный комплекс. Ранее было показано, что мозаичная миссенс-мутация Pе222Thr в γ-субъединице человеческого IF2, нарушающая взаимодействие β- и γ-субъединиц, ведет к умственной отсталости и микроцефалии. В представленной работе показано, что аналогичная мутация в γ-субъединице фактора инициации трансляции 2 архей, который гомологичен эукариотическому белку, не изменяет ни конформацию этого белка, ни его сродство к aIF2β.

DOI: 10.31857/S0023476121050155

ВВЕДЕНИЕ

В эукариотах и археях фактор инициации трансляции 2 (e/aIF2) играет ключевую роль в инициации биосинтеза белка. В ГТФ-связанной форме он доставляет инициаторную метионил-тРНК на малую субчастицу рибосомы. Структурные перестройки, возникающие в 43S преинициаторном комплексе, состоящем из малой рибосомной субчастицы 40S, связанной с факторами инициации трансляции eIF1, eIF1A, eIF3, и тройным комплексом eIF2-Met-tRNA^{iMet}-GTP, способствуют быстрому гидролизу ГТФ даже в отсутствие мРНК [1]. После узнавания старт-кодона и удаления неорганического фосфата (Pi) eIF2 переходит в ГДФ-связанную форму и диссоциирует из инициаторного комплекса [2, 3], оставляя инициаторную тРНК в Р-сайте малой рибосомной субчастицы и открывая возможности для дальнейших этапов биосинтеза белка.

Фактор инициации трансляции 2 состоит из трех субъединиц (α, β, γ) и функционирует как гетеротримерный комплекс. Центральную роль в формировании e/aIF2 играет γ-субъединица. Она взаимодействует как с α-, так и с β-субъединицами, тогда как α- и β-субъединицы не взаимодействуют друг с другом. Присутствие α-субъединицы необходимо для связывания инициаторной метионил-тРНК [4, 5]; β-субъединица в эукариотическом факторе при образовании инициаторного комплекса 43S взаимодействует с мРНК [6].

Дефекты в связывании γ- и β-субъединиц, обусловленные миссенс-мутацией Pе222Thr в человеческом IF2γ (HsaIF2γ), приводят к X-хромосомному неврологическому заболеванию, характеризующемуся умственной отсталостью и микроцефалией [7]. В дрожжах аналогичная мутация ухудшает правильный выбор старт-кодона и функционирование SceIF2 *in vivo*, причем негативная роль указанной мутации может быть минимизирована суперэкспрессией гена белка eIF2β [7]. Структурное обоснование негативной роли миссенс-мутации в этих факторах в настоящее время невозможно, так как до сих пор не определена структура ни одного эукариотического фактора инициации трансляции 2 с атомным разрешением.

Ранее было показано, что *in vitro* aIF2 может функционально заменять eIF2 в связывании Met-tRNA^{iMet} с эукариотической рибосомой и в сканировании матрицы [8]. В настоящее время известны кристаллические структуры γ-субъединиц из *Pyrococcus abyssi* (PabIF2γ) [9], *Methanococcus jannaschii* (MjaIF2γ) [10], *Sulfolobus solfataricus* (SsoIF2γ) [11, 13] и *Pyrococcus furiosus* (PfuIF2γ) [12]. Каждая γ-субъединица состоит из трех доменов, N-концевой домен (G-домен) представляет собой ГТФазу и отвечает за основные функции белка, в том числе за узнавание β-субъединицы [12–14]. G-домены структур aIF2 из разных организмов (за исключением лабильных переключателей) могут быть наложены друг на друга с

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора и кристаллографического уточнения *Ile181Thr SsoIF2 γ*

Статистика набора	
Пр. гр.	<i>I</i> 23
$a = b = c$, Å; $\alpha \leq \beta \leq \gamma$, град	186.59; 90.0
Длина волны, Å	1.54
Пределы разрешения, Å	26.39–2.1 (2.2–2.1)
Общее число отражений	62755 (8124)
Число уникальных отражений	18403 (3357)
Полнота, %	99.9 (100.0)
R_{merge} , %	10.8 (34.28)
Избыточность	3.41 (2.42)
Среднее $I/\delta(I)$	8.02 (1.99)
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения, Å	26.38–2.10 (2.13–2.10)
Число молекул в асимметричной части	1
Число отражений	62736 (2594)
Размер тестовой выборки, %	5
R_{work} , %	18.2 (23.21)
R_{free} , %	20.6 (25.06)
Средний температурный фактор, Å ²	24.3
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0.005
Валентные углы, град	1.102
Число остатков на карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	97.8
Дополнительно разрешенные районы, %	2.2
PDB ID	6R8T

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

$r.m.s.d. < 0.65$ Å [14]. Это предполагает наличие только незначительных локальных изменений в сайте узнавания β -субъединицы. Со стороны последней во всех известных структурах в узнавании γ -субъединицы участвует α -спираль [12–14]. В *HsaIF2 β* участок 171–189 аминокислотной последовательности, соответствующий спирали $\alpha 1$ в структуре факторов из архей [15], скорее всего также имеет спиральную конформацию.

Тогда можем предположить, что миссенс-мутация будет иметь одинаковое влияние на целостность гетеротримера во всех *e/aIF2*. В настоящее время проверить это предположение возможно только для архей, так как только для них известны

пространственные структуры *IF2* или его субъединицы. Для исследования выбрали *SsoIF2 γ* с мутацией *Ile181Thr*, которая является аналогом мутации *Ile222Thr* в *HsaIF2 γ* . Полученная в работе структура мутантной формы *Ile181Thr SsoIF2 γ* оказалась идентична структуре белка *SsoIF2 γ* дикого типа (4rjl) [16]. Встраивание полученной структуры в структуру $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримера [13] не выявило стерических или других препятствий для связывания β - и γ -субъединиц.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение *Ile181Thr SsoIF2 γ* . Суперпродукцию и очистку мутантной формы *Ile181Thr SsoIF2 γ* проводили так же, как и белка *SsoIF2 γ* дикого типа [17]. Непосредственно перед кристаллизацией белок *Ile181Thr SsoIF2 γ* смешивали с нуклеотидом GTP и проводили эксперименты по кристаллизации в условиях, описанных в [18] для мутантной формы *Sso aIF2 γ* ($\Delta 37$ – 47) с GTP.

Определение структуры мутантного белка. Дифракционные данные собраны в Институте белка РАН (Пушино, Россия) на генераторе с вращающимся анодом (Bruker AXS MICROSTAR) с CCD-детектором (Bruker PLATINUM 135). Данные обрабатывали с помощью программного комплекса PROTEUM^{plus} (Bruker AXS). Стартовые фазы получены методом молекулярного замещения в программе Phaser [19], принадлежащей комплексу кристаллографических программ CCP4 [20]. В качестве стартовой модели использовали структуру белка *SsoIF2 γ* дикого типа высокого разрешения в комплексе с GTP (PDB ID 4rjl) [16]. Полученную структуру уточняли при разрешении 2.1 Å с использованием программного комплекса PHENIX [21]. Ручную правку и модификацию модели осуществляли с помощью программного комплекса Coot [22]. Статистика сбора данных и кристаллографического уточнения представлена в табл. 1. Координаты и структурные факторы помещены в банк белковых данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время структура $\beta\gamma$ -комплекса *IF2* известна для двух архей: *S. solfataricus* [13, 14] и *P. furiosus* [12], что позволяет надежно выделить область межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$. Фрагменты аминокислотных последовательностей *a/eIF2 γ* и *a/eIF2 β* , ответственные за формирование межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$, представлены на рис. 1. Список доступных структур субъединиц *aIF2* с литературными ссылками и PDB-кодами для каждой структуры приведены в табл. 2. Для исследования влияния миссенс-мутации в *aIF2 γ* на сродство β - и γ -субъединиц в архейном *IF2* выбрали структуру *SsoIF2 γ* прежде всего потому, что гетеротример *SsoIF2* определен

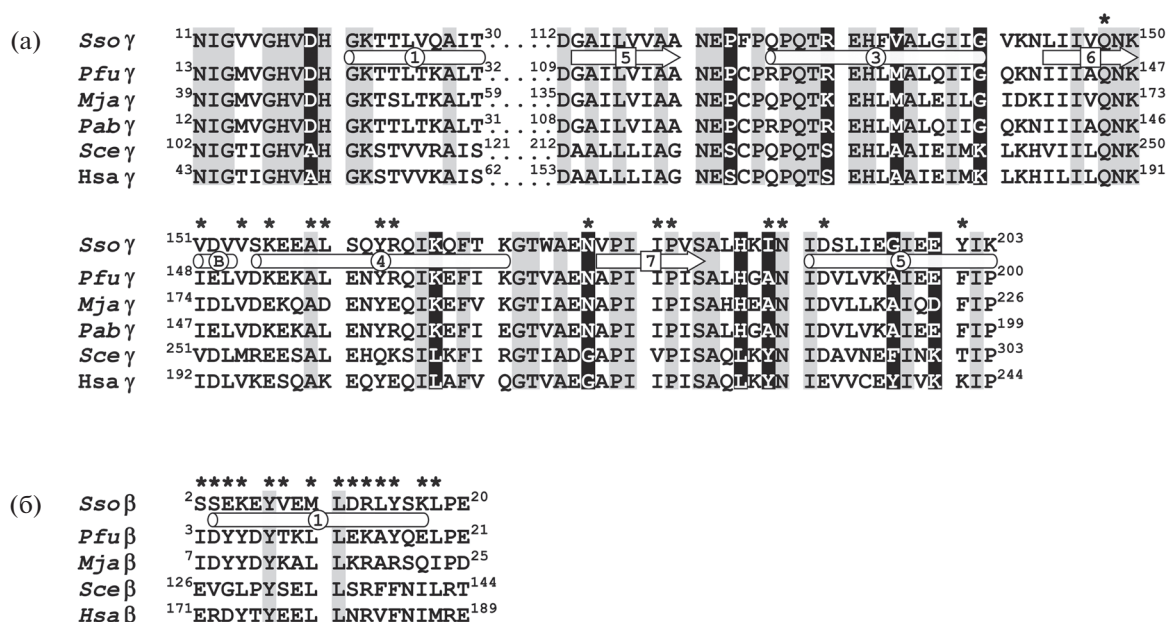


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагментов α IF2 и ϵ IF2 (табл. 2), ответственных за формирование области межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$. Остатки, взаимодействующие в межмолекулярной области β - и γ -субъединиц SsoIF2, помечены звездочками; а – сравнение фрагмента последовательностей IF2 γ архейных и эукариотических белков; б – сравнение аминокислотных последовательностей участка β -субъединицы архейных и эукариотических белков, ответственного за связывание γ -субъединицы; на сером фоне показаны идентичные остатки, на черном – остатки, кардинально различающиеся в архейных и эукариотических последовательностях.

с более высоким разрешением (2.15 Å), чем гетеродимер PfuIF2 (2.8 Å). Кроме того, в кристалле гетеродимера PfuIF2 N-конец β -субъединицы имеет плотный контакт с доменом II γ -субъединицы, что, по-видимому, искажает его спиральную конформацию, которая сохраняется в SsoIF2 γ .

Кристаллическая структура мутантной формы Pe181Thr SsoIF2 γ в комплексе с GDPCP (аналогом ГТФ) определена при разрешении 2.1 Å. Наложение этой структуры на структуру аналогичного комплекса белка дикого типа [16] показывает их полную идентичность (средняя квадратичная ошибка равна 0.184 Å для всех C α -атомов). Фрагмент структуры, ответственный за контакт с β -субъединицей, показан на рис. 2. В месте точечной мутации боковая цепь треонина повторяет

валиновую часть Pe181, положения атомов OG1 и CG1 совпадают в пределах ошибки измерения. В мутантной форме атом OG1 связан с двумя молекулами воды (S107 и S177), в структуре дикого типа вода вблизи CG1 отсутствует. Таким образом, единственное следствие миссенс-мутации в SsoIF2 γ – появление полярного остатка на поверхности при полном сохранении конформации белка.

Остаток в положении 181 включен в область межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$ и может оказывать влияние на сродство комплекса. Замена γ -субъединицы дикого типа в структурах SsoIF2 $\alpha\beta\gamma$ и PfuIF2 $\beta\gamma$ на мутантную форму Pe181Thr SsoIF2 γ показывает, что место мутации в области межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$ как SsoIF2, так и PfuIF2 остается доступным растворителю. Обе молекулы воды, входящие в бли-

Таблица 2. Опубликованные структуры субъединиц α IF2

Организм	Обозначение	Объект	PDB-код	Разрешение, Å	Литература
<i>S. solfataricus</i>	Sso	SsoIF2 γ	4rjl	1.64	[16]
		SsoIF2 $\alpha\beta\gamma$	3cw2	2.80	[14]
		SsoIF2 $\alpha\beta\gamma_{incomp}$	2qn6	2.15	[13]
<i>P. furiosus</i>	Pfu	PfuIF2($\beta\gamma$)	2d74	2.80	[12]
<i>P. abyssi</i>	Pab	PabIF2 γ	1kk3	1.90	[9]
<i>M. jannaschii</i>	Mja	MjaIF2 γ	1s0u	2.40	[10]

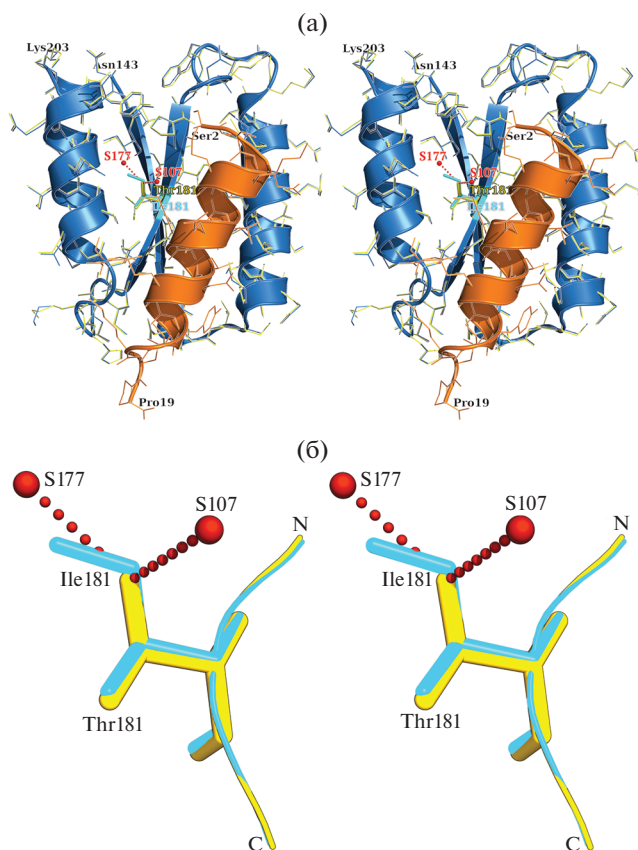


Рис. 2. Наложение участков (Asn143-Lys203) структур SsoIF2 γ дикого типа и мутантной формы Ile181Thr SsoIF2 γ , определяющих связывание β -субъединицы: а – вторичная структура и аминокислотные остатки SsoIF2 γ дикого типа показаны черным, аминокислотные остатки мутантной формы – белым. N-концевая α -спираль (Ser2-Pro19) SsoIF2 β , участвующая в формировании $\beta\gamma$ -комплекса, показана серым; б – положения атомов CG1 в изолейцине белка дикого типа и OG1 в треонине мутантной формы совпадают в пределах ошибки измерения (0.26 Å). В мутантной форме остаток Thr181 связан с двумя молекулами воды.

жайшее окружение Thr181 в свободной мутантной форме SsoIF2 γ , сохраняют свое положение при образовании $\beta\gamma$ -гетеродимера, что позволяет этому остатку образовать все возможные для него водородные связи. Таким образом, анализ структурных данных показывает, что миссенс-мутация в SsoIF2 не создает стерических или каких-либо других ограничений, мешающих связыванию субъединиц. Это подтверждают проведенные биохимические эксперименты по связыванию мутантной формы Ile181Thr SsoIF2 γ с SsoIF2 β дикого типа (рис. 3). Обе субъединицы по-прежнему связываются друг с другом со средством в соотношении 1 : 1.

Сравнение аминокислотных последовательностей архейных и эукариотических факторов инициации трансляции 2 (рис. 1) показывает, что

Оптическая плотность, отн. ед.

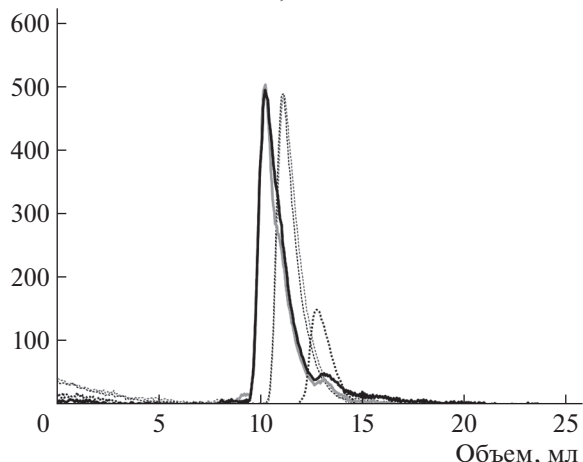


Рис. 3. Профиль элюции комплекса SsoIF2 $\beta\gamma$ и его компонентов, полученный с использованием гель-хроматографии и колонки Superdex 75 10/30. Тонкая черная пунктирная линия – SsoIF2 γ дикого типа, тонкая серая пунктирная линия – Ile181Thr SsoIF2 γ , черная пунктирная линия – SsoIF2 β , черная сплошная линия – SsoIF2 $\beta\gamma$, серая сплошная линия – Ile181Thr SsoIF2 $\beta\gamma$.

некоторые остатки области межмолекулярного взаимодействия $\beta\gamma$, сохраняющие идентичность в археях, кардинально меняются в случае эукариот. Это остатки в позициях 167, 177, 187, 189, 194 и 197 (номенклатура SsoIF2 γ). Возможно, именно замены в каких-то из этих положений при наличии миссенс-мутации влияют на средство β - и γ -субъединиц в эукариотических IF2. Исследование влияния замен в этих положениях на средство Ile181Thr SsoIF2 γ и SsoIF2 β SsoIF2 является целью дальнейшей работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-01331-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Algire M.A., Maag D., Lorsch J.R.* // Mol. Cell. 2005. V. 20. P. 251. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.09.008>
2. *Kap L.D., Lorsch J.R.* // Annu. Rev. Biochem. 2004. V. 73. P. 657. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419>
3. *Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V.* // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2010. V. 11. P. 113. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
4. *Pedulla N., Palermo R., Hasenohrl D. et al.* // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. P. 1804. <https://doi.org/10.1093/nar/gki321>
5. *Yatime L., Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y.* // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 15984. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311561200>

6. Laurino J.P., Thompson G.M., Pacheco E., Castilho B.A. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 173.
<https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.173>
7. Borck G., Shin B-S., Stiller B. et al. // *Mol. Cell.* 2012. V. 48. P. 641.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.005>
8. Dmitriev S.E., Stolboushkina E.A., Terenin I.M. et al. // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 413. P. 106.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.08.026>
9. Schmitt E., Blanquet S., Mechulam Y. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 1821.
<https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1821>
10. Roll-Mecak A., Alone P., Cao C. et al. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 10634.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M310418200>
11. Yatime L., Mechulam Y., Blanquet S., Schmitt E. // *Structure.* 2006. V. 14. P. 119.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2005.09.020>
12. Sokabe M., Yao M., Sakai N., Toya S., Tanaka I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 13016.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604165103>
13. Yatime L., Mechulam Y., Blanquet S., Schmit E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 18445.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706784104>
14. Stolboushkina E., Nikonov S., Nikulin A. et al. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 680.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.039>
15. Thompson G.M., Pacheco E., Melo E.O., Castilho B.A. // *Biochem. J.* 2000. V. 347. P. 703.
<https://doi.org/10.1042/bj3470703>
16. Nikonov O., Kravchenko O., Arkhipova V. et al. // *Biochimie.* 2016. V. 121. P. 197.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.11.029>
17. Nikonov O., Stolboushkina E., Nikulin A. et al. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 373. P. 328.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.07.048>
18. Nikonov O., Stolboushkina E., Arkhipova V. et al. // *Acta Cryst. D.* 2014. V. 70. P. 658.
<https://doi.org/10.1107/S1399004713032240>
19. Storoni L.C., McCoy A.J., Read R.J. // *Acta Cryst. D.* 2004. V. 60. P. 432.
<https://doi.org/10.1107/S0907444903028956>
20. Collaborative Computational Project. Number 4 // *Acta Cryst. D.* 1994. V. 50. P. 760.
<https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
21. Adams P.D., Grosse-Kunstleve R.W., Hung L.W. et al. // *Acta Cryst. D.* 2002. V. 58. P. 1948.
<https://doi.org/10.1107/S0907444902016657>
22. Emsley P., Lohkamp B., Scott W., Cowtan K. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. P. 486.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>