

УЗНАВАНИЕ γ -СУБЪЕДИНИЦЫ β -СУБЪЕДИНИЦЕЙ. СТАБИЛИЗАЦИЯ GTP-СВЯЗАННОГО СОСТОЯНИЯ ФАКТОРА ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ 2 АРХЕЙ И ЭУКАРИОТ

© 2023 О.С. Никонов*, Е.Ю. Никонова, А.Г. Тарабарова, А.О. Михайлина,
О.В. Кравченко, Н.А. Невская, С.В. Никонов

Институт белка РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: alik@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 26.10.2022

После доработки 27.01.2023

Принята к публикации 28.01.2023

Фактор инициации трансляции 2 эукариот и архей (e/aIF2) функционирует как гетеротримерный комплекс. Он состоит из трех субъединиц (α , β , γ). Субъединицы α и β связаны с γ -субъединицей водородными связями и Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, но не контактируют друг с другом. Хотя основные функции фактора выполняет γ -субъединица, надежное формирование $\alpha\gamma$ - и $\beta\gamma$ -комплексов необходимо для его правильного функционирования. В представленной работе мы внесли замены в структуру узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса и показали, что как у эукариот, так и у архей определяющую роль в узнавании субъединиц играет гидрофобный эффект. Форма и свойства ложбины на поверхности γ -субъединицы способствуют переходу неупорядоченной узнающей части β -субъединицы в α -спираль, содержащую примерно одинаковое число остатков у архей и эукариот. Кроме того, на основании вновь полученных данных был сделан вывод, что для архей и эукариот переход γ -субъединицы в активное состояние ведет к дополнительному контакту между ее переключателем 1 и C-концевой частью β -субъединицы, который стабилизирует спиральную конформацию переключателя.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор инициации трансляции 2, структура, $\beta\gamma$ -узнавание.

DOI: 10.31857/S0320972523020100, **EDN:** QHAGKH

ВВЕДЕНИЕ

У эукариот и архей фактор инициации трансляции 2 (e/aIF2) в GTP-связанной форме доставляет инициаторную метионил-тРНК на малую субчастицу рибосомы. Структурные перестройки, возникающие в 43S-комплексе, способствуют быстрому гидролизу GTP даже в отсутствие мРНК [1]. Однако только после узнавания старт-кодона и удаления неорганического фосфата (Pi) фактор e/aIF2 в GDP-связанной форме 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 2 функционирует как гетеротримерный комплекс. Он состоит из трех

субъединиц (α , β , γ). Наибольшая – γ -субъединица – отвечает за основные функции фактора. Она взаимодействует как с α -, так и с β -субъединицами, тогда как α - и β -субъединицы не имеют контакта друг с другом. Следовательно, в молекуле e/aIF2 имеются два межсубъединичных интерфейса, стабилизированных водородными связями и Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями. В данной статье мы будем рассматривать только $\beta\gamma$ -интерфейс.

В настоящее время известны кристаллические [4–6] и cryo-ЕМ [7–9] структуры, содержащие $\beta\gamma$ -комплексы архей и эукариот. Все эти комплексы характеризуются наличием в β -субъединице α -спирали, которая взаимодействует с гидрофобным пятном на поверхности γ -субъединицы, имеющим форму ложбины. Дно ложбины сформировано β -тяжем ($\beta 7$),

Принятые сокращения: e/aIF2 – фактор инициации трансляции 2; ZBD – домен цинкового пальца; GDPCP – аналог GTP; SPR – поверхностный плазмонный резонанс; Sce – *Saccharomyces cerevisiae*; Sso – *Sulfolobus solfataricus*; Hsa – *Homo sapiens*; WT – дикий тип.

* Адресат для корреспонденции.

а края — двумя α -спиралями ($\alpha 4$ и $\alpha 5$). Спираль β -субъединицы, содержащая в своем составе более половины гидрофобных остатков, укладывается в эту ложбину. Аминокислотные остатки, формирующие спираль β -субъединицы, располагаются на N -конце архейных последовательностей и в середине эукариотических последовательностей. Как у архей, так и у эукариот за спиралью следует длинная (порядка 20 а.о.) неупорядоченная часть структуры, которая переходит в центральный α/β -домен и домен цинкового пальца (ZBD).

Второй контакт между субъединицами найден на участке поверхности γ -субъединицы в месте расположения переключателя 1. Здесь с γ -субъединицей взаимодействует или центральный домен β -субъединицы [4], или цинк-связывающий домен [5, 8]. Контакт зависит от состояния субъединицы, поскольку переключатель 1 меняет свою конформацию при ее переходе из активной формы в пассивную [4–5]. Длинная N -концевая часть эукариотических β -субъединиц, по-видимому, не играет существенной роли в связывании γ -субъединиц, так как ранее было показано, что архейные β -субъединицы и C -концевая часть последовательностей эукариотических β -субъединиц содержат около 80 гомологичных остатков, и этой части структуры эукариотической β -субъединицы достаточно для связывания eIF2 γ [10]. Известно, что N -концевая часть человеческой β -субъединицы содержит 4 сайта фосфорилирования и 3 лизиновых кластера, которые необходимы для взаимодействия с eIF2B и мРНК [11–12]. О пространственной структуре N -концевой части β -субъединицы эукариот и ее контактах с γ -субъединицей информация полностью отсутствует.

Таким образом, имеющаяся структурная информация показывает, что узнавание и первичное связывание γ -субъединицы осуществляется областью β -субъединицы, соответствующей спирали $\alpha 1$ архейных субъединиц, так как только эта спираль сохраняет неизменное положение на поверхности γ -субъединицы во всех известных комплексах. Этот вывод подтверждается точечными мутациями в области остатков 128–150 β -субъединицы из *Saccharomyces cerevisiae* (SceIF2 β), которые показали, что замена 6 остатков на аланины исключает связывание субъединиц и летальна для клеток [13]. Единичные замены в цинковом пальце SceIF2 β ведут к изменению функции eIF2 в клетке [14–16].

Роль остатков ложбины γ -субъединицы в связывании β -субъединицы исследована недостаточно. Известно, что миссенс-мутация

I222T в γ -субъединице *Homo sapiens* (HsaIF2 γ) ведет к X-хромосомному неврологическому заболеванию, которое характеризуется умственной отсталостью и микроцефалией [17]. Замена находится в области, соответствующей участку архейной IF2 γ , который взаимодействует со спиралью $\alpha 1$. У дрожжей аналогичная мутация (V281T в SceIF2 γ) практически не влияет на рост клеток, но ухудшает правильный выбор старт-кодона и функционирование eIF2 *in vivo*, причем негативная роль указанной мутации может быть минимизирована оверэкспрессией гена, кодирующего eIF2 β . Исключающей образование $\beta\gamma$ -комплекса у дрожжей является замена V281K. В γ -субъединице фактора инициации 2 археи *Sulfolobus solfataricus* (SsoIF2 γ) миссенс-мутации соответствует замена I181T [17]. Определенная нами структура SsoIF2 γ , содержащая эту замену [18], показала отсутствие каких-либо видимых изменений в области, не подвергшейся мутации. Более того, мутант I181T связывался с β -субъединицей примерно с тем же сродством, что и дикий тип [18]. Таким образом, можно сделать вывод, что указанная замена по-разному влияет на формирование $\beta\gamma$ -комплексов в различных организмах. Структурные особенности субчастиц, ответственные за это, пока не выявлены.

В данной работе мы внесли замены в структуру узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса SsoIF2 γ и исследовали методом SPR связывание полученных мутантных форм с β -субъединицами IF2 *S. solfataricus*, *S. cerevisiae* и *H. sapiens*. В биохимических экспериментах использовались свободная γ -субъединица и комплекс SsoIF2 γ с аналогом GTP (GDPCP). Кроме того, нами была определена кристаллическая структура мутантной формы SsoIF2 γ I181K и сгенерирована процедурой AlphaFold2 модель мутантной формы V281K γ -субъединицы дрожжей.

Полученные биохимические и структурные данные показывают, что определяющее влияние на узнавание субъединиц оказывает изменение гидрофобности связывающихся поверхностей в узнающей части интерфейса. Так, заряженный атом лизина, отрицательно влияющий на формирование $\beta\gamma$ -комплекса в дрожжах, разрушает гидрофобное пятно ложбины SsoIF2 γ и SceIF2 γ без образования стерически недопустимых контактов с β -субъединицей. В то же время замена глицина на тирозин в этой части структуры (SsoIF2 γ G197Y) расширяет гидрофобное пятно и увеличивает сродство субъединиц.

Сродство субъединиц увеличивается также при использовании для образования ком-

плекса γ-субъединицы в активном состоянии за счет упорядочения переключателя 1 и его контакта с С-концевой частью β-субъединицы. По-видимому, этот контакт необходим для стабилизации структуры переключателя и минимизации неконтролируемого выхода монофосфата Pi из нуклеотид-связывающего кармана.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение β-субъединиц и мутантных форм γ-субъединиц фактора инициации трансляции 2. Сайт-направленный мутагенез осуществляли методом QuikChange®. В качестве матриц использовали плазмиду pET-11a с геном, кодирующим полноразмерную γ-субъединицу фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus* дикого типа (SsoIF2γ WT), плазмиду pET-11a с геном γ-субъединицы фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus*, мутантной по 181 положению (SsoIF2γ I181T), а также плазмиду pET-11c с геном *EIF2S2* (ген полноразмерной β-субъединицы).

Для аминокислотной замены глицина на тирозин в 197-положении в генах белков SsoIF2γ WT и SsoIF2γ I181T использовали праймеры F1 и R1; для внесения последовательности из шести гистидинов (6× His-tag) на С-конец белка HsaIF2β использовали праймеры F2 и R2. Последовательности используемых праймеров («Евроген», Россия) указаны в табл. 1.

Полученными плазмидами трансформировали клетки *Escherichia coli* штамма XL1-blue. Наличие необходимых замен/вставок оценивали по результатам секвенирования.

Клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3)/Rosetta, трансформированные плазмидами, содержащими гены целевых белков, растили на аутоиндукционной среде, содержащей селективные антибиотики (ампициллин и хлорамфеникол) при 37 °С до оптической плотности (A600)

1,2–1,5 о.е./мл. По достижении нужного значения оптической плотности инкубацию клеток останавливали и удаляли жидкую культуральную среду путем центрифугирования при 11 000 g и 4 °С в течение 15 мин.

Клетки штаммов-суперпродуцентов ресуспендировали в буфере для лизиса клеток (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM β-МЭ, 10 mM MgCl₂, 5 mM ЭДТА, 1 M NaCl — для SsoIF2γ и SsoIF2β; 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 20 mM имидазола, 10 mM βМЭ — для HsaIF2β) в соотношении 1 г клеток на 5 мл буфера и разрушали ультразвуком («Fisher Scientific», США). Дебрис осаждали путем центрифугирования при 12 300 g в течение 30 мин при 4 °С. Для выделения SsoIF2γ, ее мутантных форм и SsoIF2β из супернатанта удаляли рибосомы (60 мин при 162 000 g, 4 °С) и прогревали при 60 °С в течение 10 мин. Денатурировавшие белки осаждали путем центрифугирования в течение 30 мин при 12 300 g, 4 °С. К супернатанту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1,5 M, после чего проводили последовательную хроматографическую очистку в несколько этапов (очистка на бутил-сефарозе и гепарин-сефарозе) («GE Healthcare», Швеция). HsaIF2β очищали с помощью хроматографической очистки на Ni-сефарозе («GE Healthcare»). Финальной стадией очистки всех белков была гельфильтрационная хроматография на Superdex 200 («GE Healthcare»).

Получение комплексов мутантных форм SsoIF2γ с GDPCP. SsoIF2γ смешивали с GDPCP в молярном соотношении 1/1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин.

Оценка связывания β- и γ-субъединиц методом SPR. Мониторинг взаимодействия SsoIF2γ и ее мутантных форм с IF2β осуществляли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса на приборе ProteOn XPR36 («Bio-Rad», США). Эксперименты проводили при 25 °С. Для анализа кинетики белок-белкового взаимодействия методом SPR использовали ProteOn™ GLH Sensor Chip («Bio-Rad»).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'
F1	CATAAGATTAATATAGATTCTCTAATCGAATATATAGAAGAGTATATAAAAACTCCTTACAG
R1	CTGTAAGGAGTTTTTATATACTCTTCTATATATATTCGATTAGAGAATCTATATTAATCTTATG
F2	CCGTGCCAAAGCTAATCATCATCATCATCATCACTAAGGATCCGGCTGCTAACAAAGC
R2	GCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTTAGTGATGATGATGATGATGATGATTAGCTTTGGCACGG

Связывающая поверхность данного чипа состоит из уникальных модифицированных полисахаридов. Их карбоксильные группы активируются EDAC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид) и сульфо-N-гидроксисукцинимидом для повышения эффективности связывания и для стабилизации аминокислотного продукта. Белок взаимодействует с чипом через аминокислотную группу, образуя амидную связь. Таким образом, обеспечивается высокая связывающая емкость чипа, а также высокое сохранение биологической активности белка. Концентрации белка, соответствующие каждой сенсограмме, различались не менее, чем в 3 раза. Скорость потока жидкости, содержащей белок, составляла 30 мкл/мин. Непосредственно после активации на чип иммобилизовали белок-лиганд в концентрации 0,1 мг/мл до 10 000 резонансных единиц в буфере, содержащем 10 мМ NaAc (pH 4,5). Свободные карбоксильные группы на чипе, с которыми не связался белок, деактивировали раствором 1 М EtHN₂-HCl (pH 8,5). Взаимодействие аналита с лигандом изучали в буфере, содержащем 20 мМ Hepes-NaOH (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0,05% (v/v) Tween-20. Отмывание исследуемого аналита от лиганда перед нанесением следующего проводили раствором 10 мМ Глицин-HCl (pH 2,2).

Кинетический анализ проводили с использованием 4–5 сенсограмм для одностадийной реакции с помощью обсчета (по Лангмюру) с коррекцией масс-транспорта. Обсчет каждого набора данных давал нам константы скоростей ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также рассчитываемую из них равновесную константу диссоциации ($K_D = k_a/k_d$). Полученный набор сенсограмм обсчитывали в программе BIAEvaluation с использованием модели гетерогенного лиганда.

Определение кристаллической структуры мутантной формы SsoIF2γ I181K. Процедура получения мутантной формы SsoIF2γ I181K, ее кристаллизация и определение структуры полностью аналогична процедуре, описанной для мутантной формы I181T [18]. Статистические характеристики дифракционного набора данных и кристаллографического уточнения даны в табл. 2.

Генерация модели мутантной формы IF2γ *S. cerevisiae* (SceIF2γ V281K). Модель была получена при помощи онлайн-сервиса: «ColabFold: AlphaFold2 using MMseqs2» [19]. Данный сервис предсказывает трехмерные структуры белков на основе их аминокислотных последовательностей, используя процедуру AlphaFold2 [20] с модифицированным

Таблица 2. Статистические характеристики набора дифракционных данных и кристаллографического уточнения SsoIF2γ I181K

Сбор и обработка данных	
Группа симметрии	I23
Параметры ячейки	
$a = b = c$, Å	186,86
$\alpha = \beta = \gamma$, °	90, 90, 90
Источник излучения	Bessy BL 14,1
Длина волны источника излучения, Å	0,9184
Число молекул в асимметричной части	1
Пределы разрешения, Å	40,71–2,18 (2,20–2,18)
Общее число отражений	56 426 (2851)
Полнота набора, %	100 (100)
Избыточность	11,39
Среднее $I/\sigma(I)$	14,24 (1,35)
Статистика уточнения	
Диапазон разрешения, Å	46,70–2,18 (2,20–2,18)
Число отражений	56 420 (2851)
Размер тестовой выборки, %	4,75
Rwork, %	16,8 (24,7)
Rfree, %	19,0 (28,6)
Средний температурный фактор, Å ²	29,1
Средние квадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0,008
Валентные углы, °	1,136
Остатки на карте Рамачандрана	
Наиболее предпочтительные районы, %	98,0
Дополнительно разрешенные районы, %	2,0
PDB ID	6R8S

Примечание. Данные в скобках соответствуют интервалу наиболее высокого разрешения.

этапом поиска гомологичных последовательностей на основе процедуры MMseqs2 [21]. При построении модели для поиска шаблонов использовалась база данных PDB70 [22]. Минимизация энергии и уточнение геометрии полученной модели в рамках работы сервиса ColabFold производились с использованием силового поля AMBER [23]. Анализ и ручная правка всех молекулярных моделей проводились в программе Coot [24]. Иллюстрации созданы в программах Inkscape (Inkscape: Open Source Scalable Vector Graphics Editor, <https://www.inkscape.org>) и PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0 Schrödinger, LLC.)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор места точечных замен. Доступная в настоящее время структурная информация показывает, что ответственная за узнавание и первичное связывание часть $\beta\gamma$ -интерфейса содержит область β -субъединицы, соответствующую спирали $\alpha 1$ архейных субъединиц и гидрофобную ложбину на поверхности γ -субъединиц (рис. 1).

Точечные замены аминокислотных остатков в этой области способны оказать наибольшее влияние на связывание субъединиц. В наших экспериментах мутациям подвергались участки поверхности ложбины aIF2 γ , находящиеся на

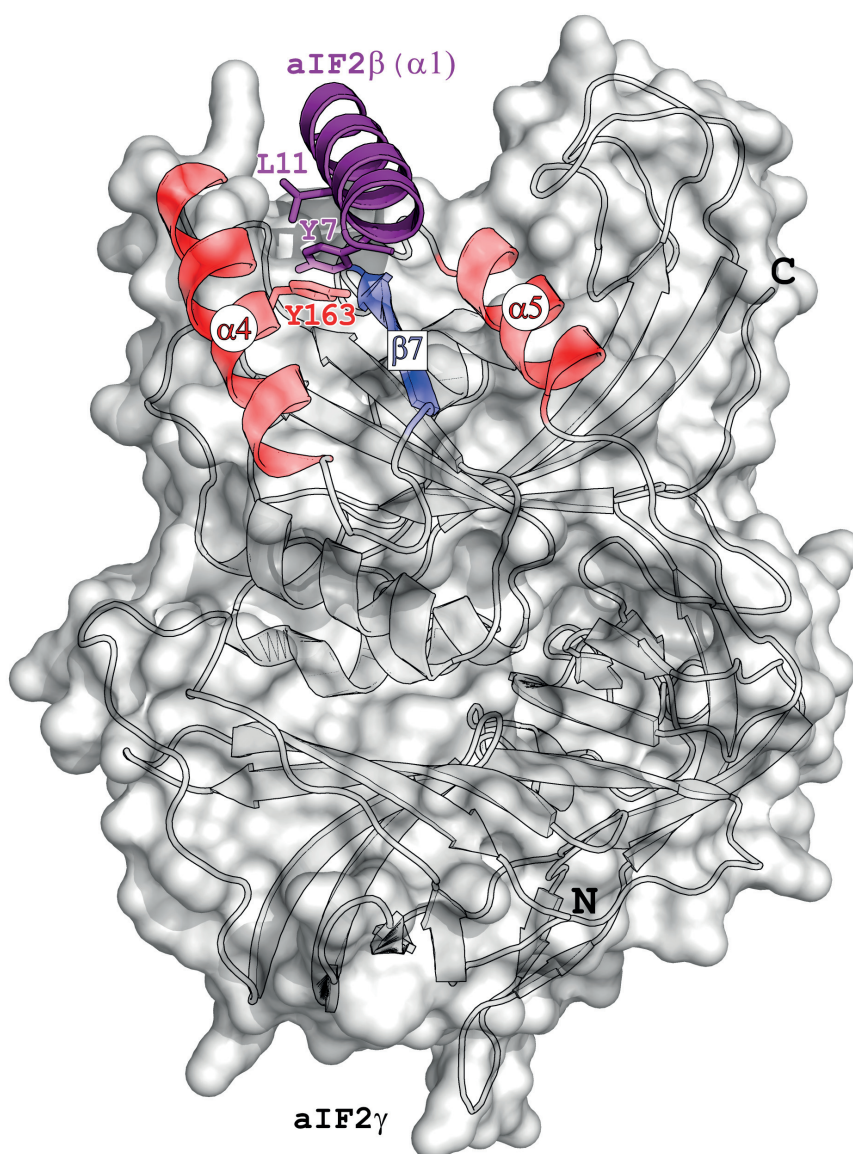


Рис. 1. Место специфического контакта SsoIF2 γ и SsoIF2 β (PDB ID: 2qmu, [18]). Гидрофобная поверхность специфического контакта со стороны γ -субъединицы формируется остатками β -тяжа $\beta 7$ и α -спиралей $\alpha 4$ и $\alpha 5$. Со стороны β -субъединицы в образовании контакта участвует N -концевая спираль $\alpha 1$. Показаны остатки, предположительно, ответственные за формирование первого зародышевого витка спирали $\alpha 1$ β -субъединицы при ее взаимодействии с γ -субъединицей

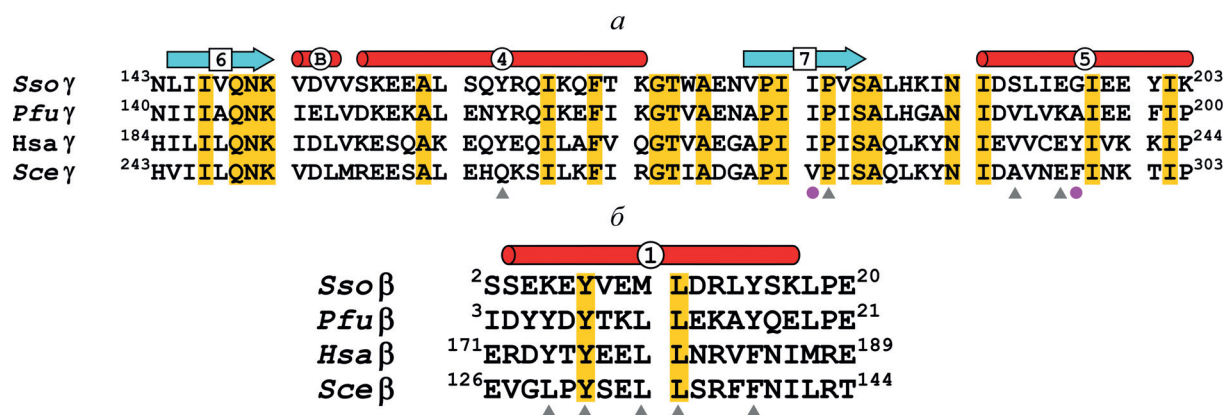


Рис. 2. Сравнение последовательностей фрагментов αIF2 и eIF2, ответственных за формирование βγ-интерфейса. Для фрагментов аминокислотной последовательности SsoIF2 указано расположение и нумерация элементов вторичной структуры (стрелки — для β-тяжей и цилиндры — для α-спиралей). *a* — Сравнение последовательностей части G-домена архейных и эукариотических белков. Для SsoIF2 (*Sulfolobus solfataricus*), Pfulf2 (*Pyrococcus furiosus*), MjaIF2 (*Methanococcus jannaschii*) и PabIF2 (*Pyrococcus abyssi*) доступны кристаллические структуры; для SceIF2 (*Saccharomyces cerevisiae*) и HsaIF2 (*Homo sapiens*) — ЕМ-структуры низкого разрешения. Желтым цветом показаны идентичные остатки. Помечены остатки, подвергавшиеся мутациям (I181T, I181K, G197Y) в SsoIF2γ (розовые кружочки) и остатки, рассматриваемые в тексте (серые треугольники). *b* — Сравнение последовательностей участка β-субъединицы архейных и эукариотических белков, ответственного за связывание γ-субъединицы. Раскраска остатков на обеих панелях идентична

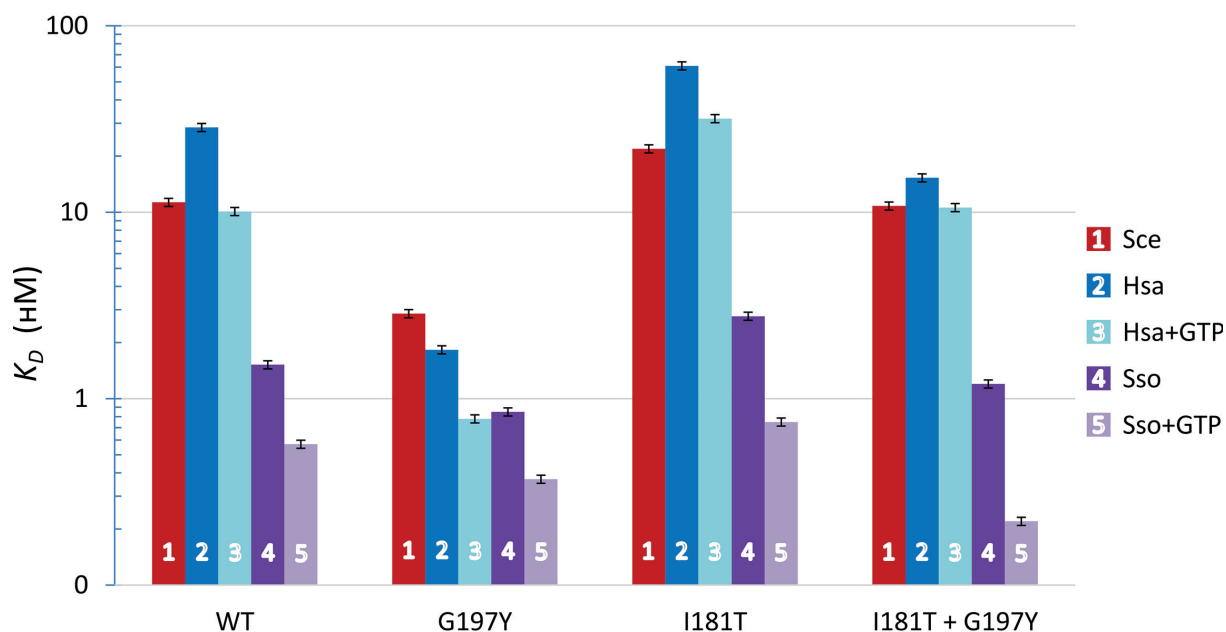


Рис. 3. Равновесные константы диссоциации комплексов SsoIF2γ дикого типа (WT) и его мутантных форм с β-субъединицами из разных организмов

ее дне и одном из краев. Фрагменты аминокислотных последовательностей ряда архей и эукариот, соответствующих этой части βγ-интерфейса, приведены на рис. 2, *a*.

С целью унификации полученных данных в качестве одного из партнеров в исследуемых βγ-комплексах использована структура SsoIF2γ. Для этого белка было показано [25–26], что конформация участка его структуры, соответствующего ложбине, в которую укладывается α-спираль β-субъединицы, не зависит от функционального состояния

белка (GTP-связанного, GDP-связанного или свободного). Для наших исследований были выбраны свободный и связанный с нерасщепляемым аналогом GTP (GDPCP) SsoIF2γ. В аминокислотной последовательности SsoIF2γ сделаны замены: G197Y, I181T и двойная замена I181T + G197Y. Первая замена заполняет выемку на боковой поверхности ложбины SsoIF2γ между N190 и Y201 (рис. 1 и 2) и наблюдается в HsaIF2γ-субъединице, вторая — соответствует ранее обсуждавшейся миссенс-мутации.

Таблица 3. Взаимодействие SsoIF2γ дикого типа (WT) и его мутантных форм с β-субъединицами из разных организмов

SsoIF2γ	e/aIF2β	$k_a \times 10^5, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_d \times 10^{-3}, \text{s}^{-1}$	$K_D \times 10^{-9}, \text{M}$
WT	Sce	3,84	4,33	11,30
	Hsa	1,39 (1,46)	3,97 (1,47)	28,50 (10,1)
	Sso	5,12 (6,97)	0,78 (0,45)	1,52 (0,64)
G197Y	Sce	3,65	1,04	2,86
	Hsa	7,41 (6,83)	1,35 (0,53)	1,83 (0,78)
	Sso	5,95 (7,36)	0,51 (0,27)	0,85 (0,37)
I181T	Sce	4,65	10,20	21,90
	Hsa	0,78 (1,01)	4,74 (3,22)	61,00 (31,8)
	Sso	5,28 (5,42)	1,45 (0,87)	2,77 (1,61)
I181T + G197Y	Sce	2,24	2,42	10,80
	Hsa	1,75 (1,07)	2,69 (1,14)	15,30 (10,6)
	Sso	6,06 (7,08)	0,73 (0,45)	1,20 (0,63)

Примечание. Данные в скобках соответствуют βγ-комплексам, содержащим активную форму SsoIF2γ (SsoIF2γ–GDPSP).

В качестве другого партнера в βγ-комплексах были использованы молекулы SsoIF2β, HsaIF2β и SceIF2β, так как для них имеются структуры, содержащие βγ-интерфейс [7–9], и описано влияние миссенс-мутации [17] на функционирование eIF2. Взаимодействие SsoIF2γ дикого типа и его мутантных форм с β-субъединицами дикого типа из трех разных организмов анализировали, используя метод SPR. Данные анализа представлены в табл. 3 и в виде гистограммы на рис. 3. Влияние переключателя 1 γ-субъединицы на связывание β-субъединицы оценивали аналогичным способом, используя в качестве одного из партнеров комплекс SsoIF2γ с нерасщепляемым аналогом GTP (табл. 3, рис. 3).

Анализ комплексов, образованных SsoIF2γ и его мутантными формами с IF2β архей и эукариот. Дрожжевая и человеческая β-субъединицы связываются с SsoIF2γ дикого типа с близким сродством, тогда как сродство архейных субъединиц на порядок выше в основном за счет уменьшения константы скорости диссоциации. Пониженная стабильность комплексов с эукариотическими IF2β, по всей видимости, связана с потерей водородной связи, возникшей из-за замены Y15F (номенклатура SsoIF2β) в их β-субъединицах (рис. 2, б). Следует также отметить, что константа скорости ассоциации для SceIF2β почти в 3 раза выше, чем для HsaIF2β.

Увеличение гидрофобной поверхности за счет замены G197Y в SsoIF2γ кардинально меняет картину связывания, особенно для HsaIF2β. Константа скорости ассоциации для этой субъединицы увеличивается более чем в 5 раз, а константа скорости диссоциации уменьшается почти в 3 раза. Для SceIF2β изменения в связывании заметно умереннее, возможно, потому что в последовательности дрожжевой γ-субъединицы в аналогичном положении находится фенилаланин, который лучше, чем тирозин, вписывается в структуру нативного комплекса. В результате замены G197Y сродство β-субъединиц из разных организмов становится приблизительно одинаковым, что подтверждает отсутствие специфического контакта между N-концевой частью эукариотических β-субъединиц и γ-субъединицей [10]. Кроме того, эта замена указывает на существенную, а, возможно, и определяющую роль гидрофобного эффекта в связывании субъединиц, влияние которого заметно даже в комплексе SsoIF2γ–SsoIF2β, в котором сродство субъединиц увеличивается почти в 2 раза. Более того, отсутствие значительных расхождений в константах связывания указывает на то, что в разных организмах замены аминокислотных остатков в узнающей части βγ-интерфейса, по-видимому, происходят согласованно.

Значительный интерес для нас представляла замена I181T в SsoIF2γ, которая, как уже

отмечалось ранее, соответствует миссенс-мутации I222T в HsaIF2 γ . Для комплекса, образованного архейной β -субъединицей с этой мутантной формой, замена I181T оказалась несущественной (табл. 3), что подтверждает полученные ранее результаты [18]. По-видимому, это связано с тем, что T181 контактирует с M10 β -субъединицы, который компенсирует появление полярного остатка на дне ложбины SsoIF2 γ . В то же время замена I181T в SsoIF2 γ заметно ухудшила сродство эукариотических β -субъединиц к этой мутантной форме γ -субъединицы. В комплексах, образованных этими субъединицами, напротив T181 находится лейцин, и практически недоступный воде полярный остаток T181 не имеет возможности образовать водородную связь.

Двойная замена I181T + G197Y позволяет оценить влияние миссенс-мутации на связывание субъединиц в эукариотических комплексах. По причинам, изложенным выше, влияние двойной замены корректнее сравнивать с данными, относящимися к мутантной форме G197Y SsoIF2 γ . Замена I181T примерно в 4 раза ухудшает сродство SsoIF2 β к этой мутантной форме, тогда как для HsaIF2 β наблюдается ухудшение почти в 10 раз. Эти данные полностью соответствуют полученным ранее результатам [17]. На связывание субъединиц в природном архейном комплексе SsoIF2 γ –SsoIF2 β двойная замена практически не влияет.

Переход SsoIF2 γ в GTP-связанное (активное) состояние увеличивает сродство β - и γ -субъединиц (табл. 3). Как известно, только в этом состоянии переключатель 1 SsoIF2 γ имеет спиральную конформацию, в остальных состояниях он не упорядочен. Для $\beta\gamma$ -комплексов, образованных как дикой, так и мутантными формами γ -субъединицы, наблюдается уменьшение константы скорости диссоциации, что указывает на контакт этого переключателя с β -субъединицей.

Влияние замены I/V на K в IF2 γ у архей и эукариот. Ранее [17] было показано, что в дрожжах замена V281K (I222 – в человеческом факторе инициации 2 и I181 – в *S. solfataricus*) летальна для функционирования фактора. Возможны два варианта отрицательного влияния этой замены: нарушение контакта между субъединицами за счет удлинения боковой цепи остатка в положении 281 или ухудшение узнавания за счет введения заряженного атома в гидрофобное пятно на поверхности γ -субъединицы. Чтобы решить эту дилемму, мы сделали в SsoIF2 γ замену I181K и определили кристаллическую структуру этой мутантной формы.

Как и следовало ожидать, в полученной структуре изменения коснулись только места замены. По отношению к полярному атому T181 заряженный атом K181 сместился на 3,7 Å в сторону E196 и образовал водородную связь с S193, однако наложение этой структуры на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. solfataricus* (PDB ID: 2qmu) никаких дополнительных контактов со спиралью $\alpha 1$ не обнаружило (рис. 4, а).

Используя процедуру AlphaFold, мы сгенерировали модель γ -субъединицы дрожжевого фактора инициации 2 с заменой V281K (рис. 4, б). Сравнение этой модели с мутантной формой SsoIF2 γ I181K показывает, что в дрожжевом белке боковая цепь K281 из-за близкого контакта с боковой цепью F297 меняет конформацию, смещаясь в сторону узнающей спирали β -субъединицы. Тем не менее заряженный атом азота не выступает за пределы поверхности ложбины, располагаясь между неполярными атомами P282, A293 и F297. Наложение полученной модели на структуру $\beta\gamma$ -комплекса дрожжей (PDB ID: 6i3m) показывает, что заряженный атом K281 располагается напротив L134 узнающей спирали β -субъединицы (рис. 4, б). Стерически недопустимых контактов между субъединицами нет.

Эти данные позволяют считать, что замена изолейцина/валина на лизин в IF2 γ как у архей, так и у эукариот не создает стерически запрещенных контактов в узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса, а искажает гидрофобную поверхность ложбины на поверхности γ -субъединицы, что препятствует ее узнаванию β -субъединицей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможный механизм узнавания γ -субъединицы β -субъединицей. Полученные нами данные подтверждают важную роль ложбины на поверхности γ -субъединицы в узнавании β -субъединицы. Интерфейс со стороны обеих молекул (рис. 1 и 2) содержит значительное число гидрофобных остатков, которые в процессе связывания стремятся сформировать межсубъединичное гидрофобное ядро. Изменение степени гидрофобности поверхности ложбины сразу же сказывается на изменении сродства субъединиц, особенно в случае человеческого фактора инициации 2. Комплекс при этом формируется, хотя и с ухудшенными характеристиками. Поэтому увеличение концентрации β -субъединиц может скомпенсировать нарушение гидрофобности ложбины, что и было показано для SsoIF2. В то же время

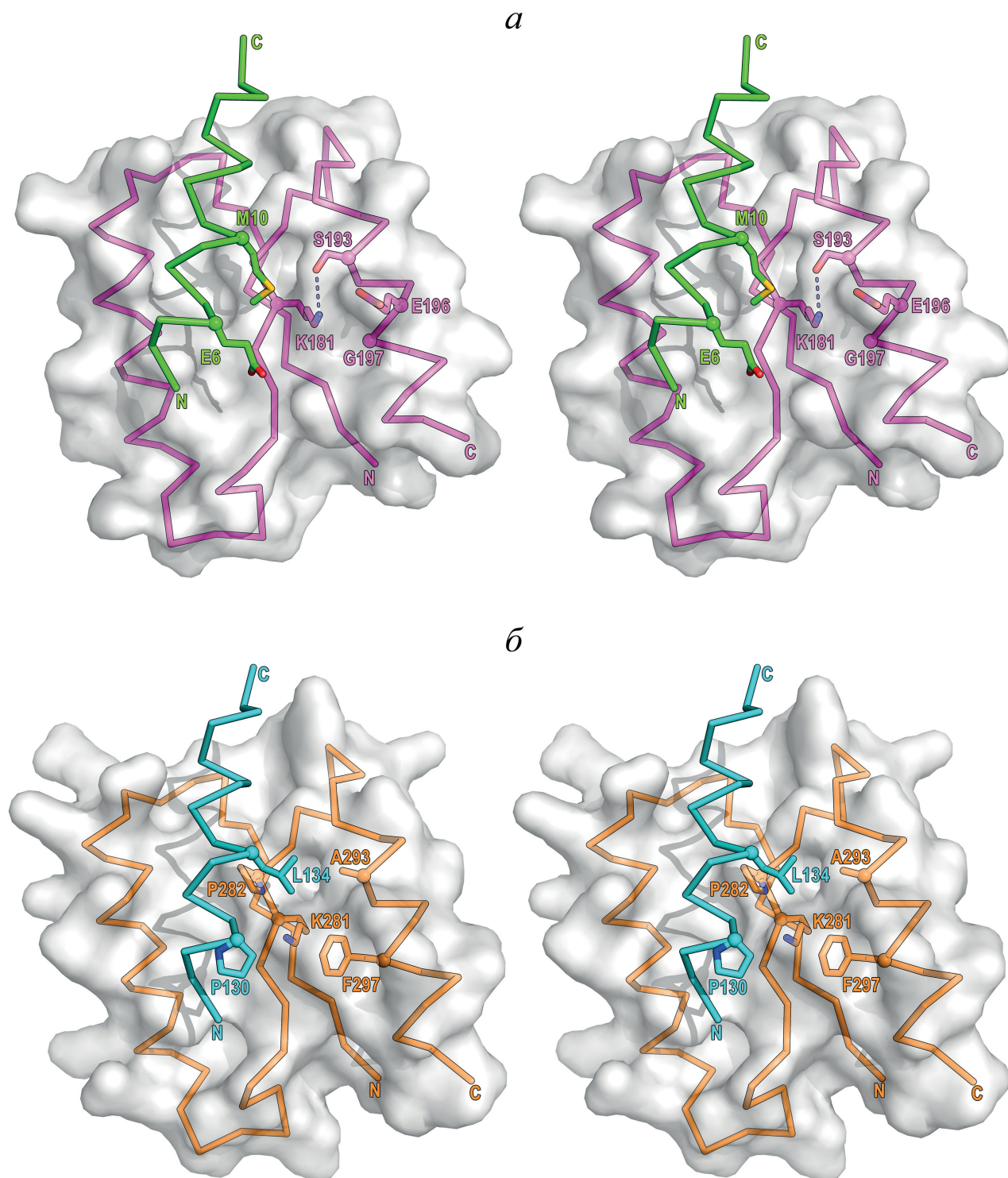


Рис. 4. Модели узнающей части $\beta\gamma$ -интерфейса. *a* – Архейный комплекс, образованный мутантной формой SsoIF2 γ I181K (малиновый цвет) со спиралью α 1 (зеленый цвет) β -субъединицы. Положение спирали α 1 получено путем наложения мутантной формы на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. solfataricus* (PDB ID: 2qmu). Лизин в позиции 181 формирует водородную связь с S193. Заряженный атом азота K181 не образует выступа на поверхности ложбины и не имеет недопустимых контактов со спиралью α 1 β -субъединицы. *б* – Дрожжевой комплекс, образованный мутантной формой SceIF2 γ V281K (оранжевый цвет) с узнающей спиралью β -субъединицы (голубой цвет). Положение спирали получено в результате наложения мутантной формы на структуру $\beta\gamma$ -комплекса *S. cerevisiae* (PDB ID: 6i3m). Боковая цепь лизина не образует выступа на поверхности и не имеет недопустимых контактов с узнающей спиралью β -субъединицы. Замена метионина (M10 в SsoIF2 β) на лейцин (L134) в β -субъединице дрожжей усиливает отталкивающее влияние лизина

замена I281K в дрожжевом факторе, нарушающая конформацию и свойства поверхности ложбины, полностью исключает связывание субъединиц [17].

Поверхность ложбины имеет форму полуцилиндра и структурно комплементарна поверхности спирали (рис. 1 и 3). Однако узнавание не может осуществляться по механизму структурной комплементарности поверхностей, так как ЯМР-структуры из двух разных организмов [27–28] показывают, что *N*-концевая часть молекулы архейных β -субъединиц в растворе неупорядочена. Рассмотрим возможный механизм узнавания на примере SsoIF2.

Спираль $\alpha 1$ SsoIF2 β содержит строго консервативные Y7 и L11 (рис. 2, б), причем в качестве узнающего элемента, скорее всего, выступает Y7. Определяющую роль этого остатка также подтверждают результаты замен в области спирали $\alpha 1$ SceIF2 β [13]. Для Y7 на спирали $\alpha 4$ aIF2 γ имеется специфическое место, обеспечивающее его стекинг с Y163 (рис. 1), кроме того, Y7 образует водородную связь с Q148 (рис. 2, а). На поверхности ложбины aIF2 γ Y7 и L11 SsoIF2 β вместе, скорее всего, формируют первый зародышевый виток спирали $\alpha 1$, а форма и свойства ложбины обеспечивают рост спирали с обоих концов. Наличие в кристаллических структурах aIF2 β длинного неупорядоченного участка между спиралью $\alpha 1$ и центральным доменом позволяет компенсировать конформационные изменения, вызванные переходом контактной области из неупорядоченного в спиральное состояние без значительных энергетических затрат на перемещения центрального домена и домена цинкового пальца. Эта часть молекулы aIF2 в кристаллах гетеротримерных комплексов архей либо не видна [5], либо не имеет строго определенной конформации [6]. Следовательно, ложбина на поверхности γ -субъединицы формирует спираль β -субъединицы и, таким образом, выступает в роли молекулярного шаперона.

Замены в $\beta\gamma$ -интерфейсе показывают, что определяющую роль в узнавании и связывании субъединиц играет гидрофобный эффект. Появление полярного остатка на дне ложбины ухудшает связывание β -субъединицы, а появление там заряженного остатка в эукариотических факторах полностью исключает образование $\beta\gamma$ -комплекса. В то же время замена глицина на тирозин на одном из склонов ложбины повышает сродство субъединиц. Поэтому устранение отрицательного влияния миссенс-мутации I222T в γ -субъединице человеческого фактора инициации 2 возможно

только путем лекарств, повышающих гидрофобность поверхностей, формирующих узнающую часть $\beta\gamma$ -интерфейса.

Роль центрального и цинк-связывающего доменов в функционировании e/aIF2. Анализ структур $\beta\gamma$ -гетеродимеров [4–5, 8], содержащих центральный и цинк-связывающий домены β -субъединицы, позволяет заключить, что в этих структурах β -субъединица взаимодействует с функционально важным участком γ -субъединицы — переключателем 1. Эти данные подтверждаются результатами SPR-анализа, которые показывают, что β -субъединица связывается с комплексом SsoIF2 γ –GDPСР прочнее, чем со свободным белком. В гетеродимере *Pyrococcus furiosus* (Pfu) во взаимодействии участвует ее центральный домен, а ZBD направлен в раствор; в структурах *S. solfataricus* и *H. sapiens*, наоборот, с γ -субъединицей взаимодействует ZBD, хотя и в разных ориентациях. Ранее [5] было высказано предположение, что для архей различие в контактах может быть функциональным, хотя и не исключалось влияние кристаллической упаковки [29]. Структура человеческого фактора инициации трансляции 2 позволяет по-новому взглянуть на эту проблему. Суть в том, что в случае *P. furiosus* мы имеем дело с γ -субъединицей в GDP-связанном состоянии, в случае *S. solfataricus* — в промежуточном и в случае *H. sapiens* — в GTP-связанном состоянии. В GDP-связанном состоянии переключатель 1 разупорядочен, и прямой контакт между ним и β -субъединицей отсутствует, тогда как в GTP-связанном состоянии переключатель упорядочен и формирует ряд контактов с ZBD. Эти контакты стабилизируют переключатель в GTP-форме и, по-видимому, препятствуют ложному срабатыванию фактора и преждевременному освобождению мРНК. Замены в ZBD, нарушающие контакт с переключателем 1 [14, 16], ведут к увеличению внутренней GTPазной активности SceIF2 и значительно ухудшают связывание инициаторной тРНК. Отсюда можно сделать вывод, что GTP-связанное состояние изолированной e/aIF2 γ нестабильно, и для ее нормального функционирования требуется контакт с цинк-связывающим доменом β -субъединицы. Поэтому целостность фактора так важна для его эффективного функционирования [17].

Вклад авторов. С.В. Никонов — руководство работой; Е.Ю. Никонова, А.Г. Тарабарова, О.С. Никонов — проведение экспериментов; А.О. Михайлина — проведение SPR-измерений; О.С. Никонов, Н.А. Невская, С.В. Никонов — обсуждение результатов исследования.

ния; О.С. Никонов — оформление рисунков; С.В. Никонов, Н.А. Невская — написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование было выполнено в рамках ГЗ ИБ РАН № АААА-А19-119122490038-8.

Благодарности. Авторы благодарят Столбоушкину Е.А. за предоставление плазмид pET-11a с геном, кодирующим гамма-субъединицу фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus* дикого типа, pET-11a с геном гамма-субъединицы фактора инициации трансляции 2 археи *S. solfataricus*, мутантной по 181-положению,

а также pET-11c с геном *EIF2S2*; Джус У.Ф. — за предоставление препарата белка SceIF2 β ; Габдулхакова А.Г. — за сбор дифракционных данных.

Выражаем благодарность Пермякову С.Е. за возможность проводить эксперименты на приборе ProteOn XPR36 в Институте биологического приборостроения РАН.

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

1. Algire, M. A., Maag, D., and Lorsch, J. R. (2005) Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation, *Mol. Cell*, **20**, 251-262, doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.08.
2. Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004) The molecular mechanisms of eukaryotic translation, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 657-704, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.030403.080419.
3. Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113-127, doi: 10.1038/nrm2838.
4. Sokabe, M., Yao, M., Sakai, N., Toya, S., and Tanaka, I. (2006) Structure of archaeal translational initiation factor 2bg-GDP reveals significant conformational change of the b-subunit and switch 1 region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13016-13021, doi: 10.1073/pnas.0604165103.
5. 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.
6. Stolboushkina, E., Nikonov, S., Nikulin, A., Bläsi, U., Manstein, D. J., Fedorov, R., Garber, M., and Nikonov, O. (2008) Crystal structure of the intact archaeal translation initiation factor 2 demonstrates very high conformational flexibility in the α - and β -subunits, *J. Mol. Biol.*, **382**, 680-691, doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.039.
7. Adomavicius, T., Guaita, M., Zhou, Y., Jennings, M. D., Latif, Z., Roseman, A. M., and Pavitt, G. D. (2019) The structural basis of translational control by eIF2 phosphorylation, *Nat. Commun.*, **10**, 2136-2146, doi: 10.1038/s41467-019-10167-3.
8. Querido, J., Sokabe, M., Kraatz, S., Gordiyenko, Y., Skehel, J. M., Fraser, C., and Ramakrishnan, V. (2020) Structure of a human 48S translational initiation complex, *Science*, **369**, 1220-1227, doi: 10.1126/science.aba4904.
9. Thoms, M., Buschauer, R., Ameisemeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hyan, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Sturzel, C. M., Frohlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., and Beckmann, R. (2020) Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 1249-1255, doi: 10.1126/science.abc8665.
10. Thompson, G. M., Pacheco, E., Melo, E. O., and Castilho, B. A. (2000) Conserved sequences in the β subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2 γ , *Biochem. J.*, **347**, 703-709, doi: 10.1042/bj3470703.
11. Kashiwagi, K., Yokoyama, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Shirouzu, M., and Ito, T. (2019) Structural basis for eIF2B inhibition in integrated stress response, *Science*, **364**, 495-499, doi: 10.1126/science.AAW4104.
12. Laurino, J. P., Thompson, G. M., Pacheco, E., and 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.
13. Hashimoto, N. N., Carnevali, L. S., and Castilho, B. A. (2002) Translation initiation at non-AUG codons mediated by a weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits, *Biochem. J.*, **367**, 359-368, doi: 10.1042/bj20020556.
14. Huang, H. K., Yoon, H., Hanning, E. M., and 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.
15. 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.
16. 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.
 17. Borck, G., Shin, B.-S., Stiller, B., Mimouni-Bloch, A., Thiele, H., Kim, J.-R., Thakur, M., Skinner, C., Aschenbach, L., Smirin-Yosef, P., Har-Zabav, A., Nurnberg, G., Altmuller, J., Frommolt, P., Hofmann, K., Konen, O., Nurnberg, P., Munnich, A., Schwartz, C. E., Gothelf, D., Colleaus, L., Dever, T. E., Kubisch, C., and Basel-Vanagaite, L. (2012) eIF2 γ mutation that disrupts eIF2 complex integrity links intellectual disability to impaired translation initiation, *Mol. Cell*, **48**, 641-646, doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.005.
 18. Никонов О. С., Кравченко О. В., Невская Н. А., Столбоушкина Е. А., Гарбер М. Б., Никонов С. В. (2021) Влияние миссенс-мутации Ile222Thr в SsoIF2 на сходство γ - и β -субъединиц aIF2, *Кристаллография*, **66**, 772-776, doi: 10.31857/S0023476121050155.
 19. Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., and Steinegger, M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all, *Nat. Methods*, **19**, 679-682, doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.
 20. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
 21. Mirdita, M., Steinegger, M., and Söding, J. (2019) MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches, *Bioinformatics*, **35**, 2856-2858, doi: 10.1093/bioinformatics/bty1057.
 22. Steinegger, M., Meier, M., Mirdita, M., Vöhringer, H., Haunsberger, S. J., and Söding, J. (2019) HH-suite3 for fast remote homology detection and deep protein annotation, *BMC Bioinformatics*, **20**, 473, doi: 10.1186/s12859-019-3019-7.
 23. Eastman, P., Swails, J., Chodera, J. D., McGibbon, R. T., Zhao, Y., Beauchamp, K.A., Wang, L.-P., Simmonett, A. C., Harrigan, M. P., Stern, C. D., Wiewiora, R. P., Brooks, B. R., and Pande, V. S. (2017) OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics, *PLOS Comput. Biol.*, **13**, e1005659, doi: 10.1371/journal.pcbi.1005659.
 24. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., and Cowtan, K. (2010) Features and Development of Coot, *Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 25. 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 Cryst.*, **D70**, 658-667, doi: 10.1107/S1399004713032240.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Vasile, F., Pechkova, E., and Nicolini, C. (2008) Solution structure of the β -subunit of the translation initiation factor aIF2 from archaeobacteria *Sulfolobus solfataricus*, *Proteins*, **70**, 1112-1115, doi: 10.1002/Prot.21797.
 29. Schmitt, E., Naveau, M., and Mechulam, Y. (2010) Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier, *FEBS Lett.*, **584**, 405-412, doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.002.

RECOGNITION OF γ -SUBUNIT BY β -SUBUNIT. STABILIZATION OF THE GTP-BOUND STATE OF TRANSLATION INITIATION FACTOR 2 IN ARCHAEA AND EUKARYOTES

O. S. Nikonov*, E. Yu. Nikonova, A. G. Tarabarova, A. O. Mikhaylina,
O. V. Kravchenko, N. A. Nevskaya, and S. V. Nikonov

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

Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2 (e/aIF2) functions as a heterotrimeric complex. It consists of three subunits (α , β , γ). The α - and β -subunits are linked to the γ -subunit by hydrogen bonds

and van der Waals interactions, but do not contact each other. Although the main functions of the factor are performed by the γ -subunit reliable formation of $\alpha\gamma$ - and $\beta\gamma$ -complexes is necessary for its proper functioning. In this work, we made mutations in the recognition part of the $\beta\gamma$ interface and showed that both in eukaryotes and archaea, the hydrophobic effect plays a decisive role in the recognition of subunits. The shape and properties of the hollow on the surface of the γ -subunit facilitates the transition of the disordered recognition part of the β -subunit into the α -helix containing approximately the same number of residues in archaea and eukaryotes. In addition, based on the newly obtained data, it was concluded that in archaea and eukaryotes, the transition of the γ -subunit to the active state leads to additional contact between its switch 1 and the C-terminal part of the β -subunit, which stabilizes the helical conformation of the switch.

Keywords: translation initiation factor 2, structure, $\beta\gamma$ recognition