

Streszczenie

W organizmach eukariotycznych, obok kanonicznego białka eIF4E wiążącego kap, wyróżnia się wiele izoform eIF4E, które dotychczas w niewielkim stopniu zostały scharakteryzowane i dla wielu z nich rola w komórce nie jest poznana. W oparciu o analizę sekwencji, białka te zostały podzielone na trzy klasy. Klasę I-szą reprezentuje kanoniczna izoforma eIF4E, nazywana eIF4E1a, która oddziałując bezpośrednio ze strukturą końca 5' mRNA, kapem, w kompleksie z białkiem eIF4G aktywuje mRNA do inicjacji translacji. Proces ten regulowany jest z udziałem represorowych białek wiążących eIF4E, takich jak 4E-BP czy 4E-T, które podobnie do eIF4G oddziałują z eIF4E1a poprzez kanoniczny motyw wiążący YX₄LΦ.

Niniejsza praca obejmuje badania dla ludzkiej i żabiej izoformy eIF4E1b, jak również ludzkiej izoformy eIF4E2. Na poziomie struktury pierwszorzędowej białko eIF4E1b jest wysoce podobne do kanonicznego czynnika eIF4E1a (identyczność sekwencji wynosi 70%) i należy do klasy I-szej, a jego ekspresja ograniczona jest do oocytów. Natomiast izoforma eIF4E2 należy do klasy II-giej i wykazuje jedynie 30% identyczności sekwencji z eIF4E1a, lecz podobnie do czynnika kanonicznego wyrażana jest w większości komórek, tkanek. Choć izoformy eIF4E1b i eIF4E2 słabo oddziałują z kapem, jako komponenty dwóch różnych kompleksów białkowych, uczestniczą w represji translacji zależnej od kapu wybranych mRNA.

Stosując metodę miareczkowania fluorescencyjnego, dichroizm kołowy oraz modelowanie homologiczne, określono specyficzność i powinowactwo izoformy eIF4E1b z człowieka i żaby szponiastej względem analogów kapu. Struktura wymodelowanego białka eIF4E1b zachowuje charakterystyczny dla białek eIF4E fold $\alpha+\beta$, a kieszeń wiążącą kap formują tożsame aminokwasy, które są kluczowe dla oddziaływania eIF4E1a z kapem. Są to: Trp56, Trp102, Glu103, Trp166, Arg112, Arg157, Lys162 oraz aminokwasy C-końcowej pętli. Jednakże badane izoformy eIF4E1b oddziałują z analogami kapu trzykrotnie słabiej w porównaniu z eIF4E1a, zachowując wysoką specyficzność względem grupy metylowej w pozycji N⁷ guaniny. Ponadto, białka eIF4E1b odróżnia od eIF4E1a szereg ewolucyjnie zachowanych pozycji aminokwasów, z których część, jak zweryfikowano na podstawie modelowej struktury eIF4E1b, zlokalizowana jest w bliskim otoczeniu reszt aminokwasów bezpośrednio wiążących kap. Istotnie, w aktywności eIF4E1b obserwuje się różnice względem eIF4E1a. eIF4E1b wykazuje wyższe powinowactwo do grupy benzylovej w pozycji N⁷ guaniny analogu kapu, słabsze oddziaływanie z grupami funkcyjnymi mostka fosforanowego i wyższe powinowactwo względem analogów kapu przyłączonych do ziaren Sefarozy za pomocą linkera. Mutacja punktowa w eIF4E1a wybranych residuów rozróżniających grupy białek eIF4E1a i eIF4E1b powoduje dwukrotne osłabienie powinowactwa eIF4E1a względem analogów

kapu, co wskazuje na udział tych pozycji w modulowaniu słabszego powinowactwa izoform eIF4E1b do kapu.

Badania dla białka eIF4E2 (4EHP) dotyczą jego oddziaływania z nowym partnerem białkowym, nazywanym 4E-T, scharakteryzowanym wcześniej jako transporterowy czynnik izoformy eIF4E1a. Bezpośrednie oddziaływanie białek eIF4E2 i 4E-T pokazano metodą koimmunoprecypitacji, drożdżowego systemu dwuhybrydowego, jak również metodą immunofluorescencji, w której obserwowano w komórkach HeLa rekrutację eIF4E2 do granulek P poprzez białko 4E-T. Zweryfikowano również niekanoniczny motyw białka 4E-T zachowany wśród kręgowców, YX₄VW, który obok kanonicznego motywu YX₄LL, ma istotny wpływ na oddziaływanie białka 4E-T z eIF4E1a i eIF4E2 i tym samym reguluje zróżnicowane oddziaływanie 4E-T względem izoform eIF4E. Metodą immunofluorescencji pokazano również, że białko eIF4E2 w warunkach normalnych jest białkiem cytoplazmatycznym i w odróżnieniu od eIF4E1a, nie akumuluje w granulkach stresu indukowanych arsenkiem sodu. Ponadto, białko eIF4E2 podobnie do eIF4E1a jest transportowane do jądra przez pory regulowane receptorem Crm1/exportin1, lecz transport ten nie jest zależny od białka 4E-T, jak w przypadku białka eIF4E1a. Podsumowując, choć obydwie izoformy eIF4E wiążące kap oddziałują z tym samym czynnikiem białkowym 4E-T i są rekrutowane przez 4E-T do granulek P, to eIF4E2 najprawdopodobniej pełni inną funkcję niż eIF4E1a w cytoplazmie jak i w jądrze.