

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут молекулярної біології і генетики

Бондарчук Тетяна Валеріївна

УДК 577.112; 577.217.535

**КОМПЛЕКС ФАКТОРІВ ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ eEF1В ЛЮДИНИ:
СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ**

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ-2023

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі структурної і функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий керівник: кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Шалак В'ячеслав Федорович,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу структурної і функціональної протеоміки.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Сиволоб Андрій Володимирович,
ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського національного Університету імені Тараса Шевченка;

кандидат біологічних наук,
Корольова Дар'я Сергіївна,
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
старший науковий співробітник відділу структури і функції білка.

Захист відбудеться 27 червня о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

Автореферат розіслано “_26_” травня 2023 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В клітинах еукаріот процес білкового синтезу відбувається на 80S рибосомах асоційованих з активованими матричними РНК. Для забезпечення білкового синтезу субстратом, eEF1A у ГТФ-формі зв'язує aa-тРНК і транспортує її до А-сайту рибосоми. При комплементарній взаємодії кодону мРНК і антикодону aa-тРНК, рибосома індукує розщеплення ГТФ зв'язаного з eEF1A, в результаті чого aa-тРНК залишається в А-сайті, а eEF1A*ГДФ вивільняється у розчин (*Dever et al., 2012*). Комплекс факторів елонгації eEF1B відповідає за відновлення ГТФ-зв'язаної форми eEF1A. До складу цього комплексу входять три субодиниці eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ (*Andersen et al., 2003*). Здатність до обміну гуанінового нуклеотиду мають дві з них – eEF1B α та eEF1B β , тоді як субодиниця eEF1B γ виступає як структурний елемент комплексу (*Le Sourd et al., 2006*). Відомо, що субодиниця eEF1B γ підсилює активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду в 2-4 рази (*Janssen et al., 1988*), але механізм цієї дії залишається нерозкритим. Варто зазначити, що подібного ефекту eEF1B γ на активність субодиниці eEF1B β не спостерігали (*Bec et al., 1994*).

Лабільний комплекс між eEF1B та eEF1A отримав назву eEF1H (heavy або важка форма комплексу елонгації трансляції). Окрім цього eEF1B утворює стабільний комплекс з валіл-тРНК синтетазою (VRS-eEF1B), що забезпечує пряму передачу валіл-тРНК від ферменту до eEF1A (*Bec et al., 1994*). Існування стабільних високомолекулярних комплексів аміноацил-тРНК синтетаз і факторів елонгації трансляції є однією з відмінних рис вищих еукаріот (*Merrick, 2010*), проте їх вивчення тривають до цього часу. Так, якісний склад комплексу eEF1B відомий, але стехіометрія субодиниць у ньому залишається дискусійним питанням. На сьогоднішній день було запропоновано кілька моделей структурної організації комплексу eEF1B, які мають суттєві розбіжності (*Sasikumar et al., 2012*).

Згідно з найпростішою моделлю, eEF1B α та eEF1B β зв'язуються з субодиницею eEF1B γ через їх N-кінцеві домени, утворюючи комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (*Janssen et al., 1994*). Інша модель передбачає, що eEF1B γ створює димерне ядро, а eEF1B α та eEF1B β зв'язуються з окремими субодиницями eEF1B γ , утворюючи комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma_2$ (*Sheu, and Traugh, 1999*). Також було запропоновано структурну роль для субодиниць eEF1B α та eEF1B β . Так, було висловлено припущення, що протомерний комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma$ може димеризуватись (*Bec et al., 1994*) або навіть тримеризуватись (*Minella et al., 1998*) за рахунок мотиву типу «лейцинова застібка» субодиниці eEF1B β . Було також запропоновано, що протомерний комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma_2$ може димеризуватись через субодиницю eEF1B α (*Sheu, and Traugh, 1999*). На додаток до експериментів *in vitro*, взаємодію білків у комплексі eEF1B людини вивчали за допомогою двогібридної дріжджової системи, де спостерігали взаємодію N-кінцевих доменів eEF1B α та eEF1B β з N-кінцевим доменом eEF1B γ , а також взаємодію між субодиницями eEF1B β (*Mansilla et al., 2002*). Таким чином, експерименти по реконструкції eEF1B з окремих рекомбінантних чи очищених нативних субодиниць не

призвели до однозначного визначення його четвертинної організації. Однією з причин такої невдачі можна назвати використання методу аналітичної гел'фільтрації як єдиного способу визначення молекулярної маси білків і їх комплексів у всіх попередніх дослідженнях, який є недостатньо точним у випадку несферичних мультидоменних білків.

Відомо, що в різні періоди життя організму, а також при певних патологіях таких як діабет або онкологічні захворювання, спостерігається зміна експресії субодиниць комплексу eEF1B (*Veremieva et al., 2014, Flores et al., 2016, Jiang et al., 2011*), що вказує на важливість розуміння особливостей його структурної організації, а також функціональної активності його субодиниць насамперед в нормальному стані для того, щоб мати змогу в подальшому виявляти його аномальні структурні і функціональні зміни.

Зважаючи на вищезазначене, встановлення структурної організації комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B людини, а також з'ясування функціональних особливостей його субодиниць eEF1B α та eEF1B β , є актуальним на сьогоднішній день.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться у відділі структурної та функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за бюджетними темами: «Дослідження трансляційних наноконкомплексів та їх компонентів» (2.2.4.9; №0110U000693 2010 – 2015 рр), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744 2016 - 2020 рр) та конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» - «Встановлення особливостей структурної організації комплексу елонгації трансляції eEF1B людини» (2020.02/0028, 2020-2021рр.)

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було встановлення структурної організації комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B людини та характеристика структурних особливостей і функціональних властивостей його субодиниць.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Встановити структурну організацію повнорозмірної субодиниці eEF1B α , а також створити та охарактеризувати її вкорочені форми;
2. Встановити структурну організацію повнорозмірної субодиниці eEF1B β , а також створити та охарактеризувати її вкорочені форми;
3. Встановити структурну організацію повнорозмірної субодиниці eEF1B γ .
4. Розкрити механізм підсилюючого впливу субодиниці eEF1B γ на функціональну активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду.
5. Перевірити функціональну активність eEF1B β в реакції обміну гуанінового нуклеотиду для обох ізоформ eEF1A1 та eEF1A2. Визначити вплив субодиниці eEF1B γ на функціональну активність eEF1B β .
6. Визначити сайти взаємодії між субодиницями eEF1B α і eEF1B γ , eEF1B β і eEF1B γ в подвійних комплексах і порівняти отримані дані з потрійним eEF1B $\alpha\beta\gamma$ комплексом.

7. Встановити стехіометрію субодиниць комплексу eEF1V $\alpha\beta\gamma$ і побудувати атомарну модель його просторової організації.

Об'єкт дослідження: комплекс eEF1V людини, до складу якого входять субодиниці eEF1V α , eEF1V β і eEF1V γ , а також функціональна активність eEF1V α і eEF1V β у вільному стані і у комплексі з eEF1V γ .

Предмет дослідження: структурна організація і ступінь олігомеризації рекомбінантних білків eEF1V α , eEF1V β і eEF1V γ , а також комплексів між ними. Сайти взаємодії між субодиницями eEF1V α і eEF1V γ , eEF1V β і eEF1V γ . Вплив eEF1V γ на функціональну активність eEF1V α і eEF1V β в реакції обміну гуанінового нуклеотиду на молекулах eEF1A1 та eEF1A2.

Методи дослідження: методи роботи з культурами клітин бактерій, біохімічні методи (ПЛР, створення плазмідних конструкцій, кодуєчих цільові білки, отримання, очищення та аналіз білків хроматографічними методами, електрофорез білків та нуклеїнових кислот в денатуруючих і/або нативних умовах, вимірювання кінетики [^3H]ГДФ/ГДФ обміну), структурні методи (аналітичне ультрацентрифугування, вимірювання кінетики заміщення водню на дейтерій в білках з наступним мас-спектрометричним аналізом, круговий дихроїзм), створення структурних моделей білків і молекулярний докінг білків.

Наукова новизна отриманих результатів: вперше визначено олігомерний стан усіх субодиниць комплексу eEF1V *in vitro* - eEF1V α є мономером, eEF1V γ існує як суміш мономер-димер при концентрації нижче 1.8 мкМ і олігомеризується при підвищенні концентрації, eEF1V β є стабільним тримером. Всі вищезазначені білки мають видовжену форму молекули.

Вперше створено атомарні моделі мономерів eEF1V α і eEF1V γ , а також тримеру eEF1V β .

Запропоновано механізм підсилюючої дії eEF1V γ на швидкість обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1V α . Вперше показано активність субодиниці eEF1V β в реакції обміну гуанінового нуклеотиду для обох ізоформ фактора елонгації трансляції eEF1A1 і eEF1A2.

Вперше встановлено стехіометрію комплексу eEF1V як ($\alpha\beta\gamma$) $_3$ і показано, що одна молекулі комплексу може зв'язувати шість молекул eEF1A2, що відповідає кількості GEF-доменів наявних в цьому комплексі. Застосувавши методи молекулярного докінгу, ми вперше побудували атомарну модель комплексу eEF1V.

Практичне значення одержаних результатів. Представлені результати сприяють більш глибокому розумінню структурної організації апарату трансляції людини, характерною відмінністю якого є компартменталізація його компонентів. Дослідження організації і функціонування комплексу елонгації трансляції eEF1V в нормі та при деяких патологічних станах, таких як онкогенез, може бути перспективним в плані розробки в майбутньому нових діагностичних підходів для таких захворювань. Відомості про структурні особливості окремих субодиниць і всього комплексу можуть бути корисним для більш глибокого розуміння їх неканонічних функцій. Матеріали роботи можуть

використовуватись в навчальних курсах для студентів КНДУ ім. Шевченка чи інших вищих навчальних закладів.

Особистий внесок здобувача. Автором було самостійно підібрано та проаналізовано наукову літературу за темою дисертації. Головна ідея та завдання дослідження були сформульовані спільно з науковим керівником – к.б.н. Шалаком В. Ф. Наведені в роботі результати були отримані особисто або за безпосередньою участю здобувача. Автор дякує к.б.н. Шалаку В. Ф. за люб'язно надані генетичні конструкції eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ .

Автор особисто виконала експерименти з клонування, експресії та очищення вкорочених форм білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ ; продукції та очищення повнорозмірних білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ ; визначення молекулярної маси вищеозначених білків за допомогою методу гель-фільтрації; експерименти з кінетики обміну [H^3]ГДФ/ГДФ; нативні гель-електрофорези для визначення взаємодії eEF1B α , eEF1B β та їх ізольованих GEF-доменів з eEF1A1 та eEF1A2, взаємодії eEF1A2 з комплексом eEF1B $\alpha\beta\gamma$; інтерпретацію результатів та статистичну обробку даних.

Експерименти з ультрацентрифугування білків та обробка даних були виконані спільно з науковим керівником к.б.н. Шалаком В. Ф. та доктором Щепановським Р. Г. (Міжнародний інститут молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща). Вимірювання КД та флуоресценції N-кінцевого домену eEF1B β виконувалась спільно з к.б.н. Шалаком В. Ф., Вівчарик М., та Ніколаєвим Р. (Група молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу). Робота з визначення динаміки обміну H/D-MS була виконана у співпраці з Фатальською А. (Інститут біохімії та біофізики, Польської Академії Наук, Варшава, Польща). Автор вдячна за допомогу в інтерпретації результатів Фатальській А. та доктору Дадлезу М. (Інститут біохімії та біофізики, Польської Академії Наук, Варшава, Польща). Автор щиро вдячна Ложко Д. М. (Відділ білкової інженерії та біоінформатики) за допомогу в біоінформатичному аналізі та моделювання повнорозмірних білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ та комплексу eEF1B.

Автор виловлює щиро подяку керівнику роботи, к.б.н, Шалаку В.Ф. та завідувачу відділу структурної і функціональної протеоміки д.б.н. Негруцькому В.С. за слушні поради, рекомендації та зауваження під час виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів роботи. Основні положення дисертації апробовано на семінарах відділу механізмів трансляції генетичної інформації та наукових конференціях ІМБІГ НАНУ і представлено у вигляді усних та стендових доповідей на: конференції молодих вчених, присвяченій 90 ювілею О.Й. Данилевського (Україна, Київ, 2013), практичному курсі ЕМВО «Високопродуктивне отримання білків і кристалізація» (Англія, Харвел, 2013), конференції молодих вчених, присвяченій 175 ювілею П.Г. Костюка (Україна, Київ, 2014), Українському біохімічному з'їзді (Україна, Київ, 2014), практичному курсі «Малокутове розсіювання нейтронів та рентгенівських променів білками у розчині» (Франція, Гренобль, 2015), міжнародній

конференції молодих вчених (Україна, Київ, 2015), 41st FEBS конгресі (Турція, Ефес, 2016), міжнародній конференції для студентів та молодих вчених «Сучасні проблеми хімії» (Україна, Винниця, 2018), конференції «Медична і клінічна хімія» (Україна, Тернопіль, 2019).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 5 статей у фахових наукових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus (3 з яких належать до першого квартилю (Q1) бази даних Web of Science Core Collection відповідно до класифікації Journal Citation Reports – International Journal of Biological Macromolecules, The FEBS Journal, Nucleic Acids Research) та тези 7 доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів, аналізу та узагальнення результатів, висновків і списку використаних джерел, який охоплює 203 найменувань. Основний зміст дисертації викладено на 190 сторінках машинописного тексту, містить 47 рисунки та 3 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

У першому розділі (огляд літератури) розглянуто процес біосинтезу білка у вищих еукаріот та наведено сучасну інформацію про відомі данні щодо структурної організації, канонічних та неканонічних властивостей білкових факторів, які беруть участь у ньому на етапі елонгації. Відмічено відсутність експериментальних даних щодо пояснення феномену позитивного впливу eEF1B γ на активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду, брак структурної інформації щодо повнорозмірних білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ та відсутність інформації щодо структури N-кінцевого домену eEF1B β . Також описано існуючі моделі комплексів eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H та відмічено їхнє різноманіття і суперечливість в плані кількості та стехіометрії субодиниць у їхньому складі.

Матеріали і методи дослідження.

Плазмідні конструкції для експресії eEF1B α , eEF1B γ і eEF1B β людини та препарати білків eEF1A1 та eEF1A2 було надано к.б.н. Шалаком В.Ф. (ІМБГ, Київ).

Вкорочені форми eEF1B α (а. з. 19-225, 39-225, 66-225, 91-225, 1-92) і eEF1B β (а.з. 43-281, 78-281, 117-281, 136-281, 183-281, 78-118 та 1-77) були спроектовані на основі порівняльного аналізу їх первинних послідовностей з різних організмів в програмі ClustalW та клоновані у вектор pGEX6p-1. Повнорозмірні та вкорочені форми зазначених вище білків були синтезовані у вигляді GST-злитих білків в *E. coli* та очищені на глутатіонсефарозі (GE Healthcare, США). Від GST-мітки, видаленної PreScission протеазою (GE Healthcare, США), білки відділяли за допомогою іонно-обмінної хроматографії на колонці HiTrap Q (1 мл, GE Healthcare, США) в градієнті NaCl. GST-мітки не видаляли з вкорочених форм eEF1B α (91-225), eEF1B β (183-281) та eEF1B β (78-118). Послідовність eEF1B γ у складі конструкції pET16b/eEF1B γ та її вкорочені

форми (амінокислотні залишки 1-228 та 263-437) заклоновані у вектор pET28a(+) експресували в *E. coli* у формі His6-злитих білків та очищали за допомогою афінного матриксу Ni-NTA (QIAGEN, ФРН).

Всі білки були додатково очищені від домішок агрегатів за допомогою гель-фільтрації на колонці HiLoad Superdex 200 (1.6×60 см, 120 мл, GE Healthcare, США). Білкові фракції збирали та аналізували за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах. Найбільш очищені з них об'єднували та діалізували в буфері, який містив 30 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 55% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол, і зберігали при -20°C .

Електрофорез в денатуруючих умовах проводили відповідно методу Лемлі (Laemmli, 1970). Електрофорез в агарозному гелі (0.7, 1 або 1.5%) в нативних умовах проводили в 89 мМ Tris-боратному буфері, pH 8.3 при кімнатній температурі. Гель фарбували Кумасі R-250 та відмивали у розчині, який містив 40% етанол і 3% оцтову кислоту.

Аналітичну гель-фільтрацію проводили на колонці Superose 6 HR 10/30 (24 мл, GE Healthcare, США) в буфері E_i (25 мМ імідазол pH 8.0, 150 мМ NaCl, 5% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол).

Аналітичне ультрацентрифугування проводили на ультрацентрифузі ProteomeLab XL-I з ротором An-60 Ti при 4°C . Моніторинг седиментації білків здійснювали по поглинанню на 280 нм. Швидкісне ультрацентрифугування (ШУЦ) проводили в 12 мм двосекторній затемненій кюветі, на швидкості ротора від 30000 до 50000 об/хв в залежності від досліджуваного білка. Поглинання реєструвалось цифрою камерою у безперервному режимі з інтервалом 270 секунд та довжиною крока 0.003 см. Набір кривих седиментації білка аналізували в програмі SEDFIT з використанням математичної моделі безперервного розподілу дискретних частинок за розміром (Schuck, 2000, 2003; Schuck et al, 2002). Рівноважне ультрацентрифугування (РУЦ) проводили в шестиканальній затемненій кюветі. Поглинання реєструвалось цифрою камерою кожні 4 години. Досягнення стану рівноваги контролювали за допомогою програми SEDFIT. Результати обраховували в програмі SEDPHAT (Vistica et al, 2004) з використанням математичної моделі для монодисперсних частинок в розчині, які не взаємодіють між собою або моделі рівноваги мономер-димер.

Круговий дихроїзм (КД) проводили на спектрополяриметрі JASCO-810. Спектри реєстрували на довжинах хвиль від 190 до 260 нм, кроком 0.5 нм та шириною каналу 1 нм зі швидкістю 50 нм/хв. Середню еліптичність на один а. з. визначали відповідно до (Greenfield, 2006). Отримані КД спектри обраховували з використанням програми CDNN та CONTINLL (Bohm, 1992, Sreerama, 2000) відповідно до (Whitmore, 2004).

Кінетику [³H]ГДФ/ГДФ обміну на eEF1A проводили відповідно до (Crepin et al, 2004) з використанням [³H]ГДФ (1500 Ci/mol, «GE Healthcare», США). Константи швидкості обміну [³H]ГДФ/ГДФ першого порядку і спостережні константи обраховували в OriginPro 8 (OriginLab, США).

Вимірювання кінетики заміщення водню на дейтерій з наступним мас-спектрометричним аналізом (H/D-MS) було виконано на мас-спектрометрі

SYNAPT G2 HDMS (Waters, Milford, США) в режимі іонної мобільності. Досліджувані білки були інкубовані з D₂O (99.8% Cambridge Isotope Laboratories, Inc, Англія) впродовж 10 сек, 1, 5, 25 хвилин та 2.5 години при 20°C. Протеолітичне розщеплення білків ініціювали додаванням 2 мкл розчину протеаз з *Aspergillus saitoi* (Sigma-Aldrich) в 1% мурашиної кислоти. Пептиди ідентифікували за допомогою ProteinLynx (PLGS, Waters, Milford, США) з наступним обрахуванням за допомогою програми DynamX 3.0 (Waters, Milford, США). Для обрахунку були прийняті такі критерії: мінімальна межа інтенсивності 3000, мінімальна кількість продуктів на кожну амінокислоту 0.3, мінімальна відмітка 7.5 та теоретичне значення для батьківських іонів нижче 10 ppm. Подальший аналіз виконували за допомогою програми власної розробки лабораторії (програмне забезпечення належить лабораторій мас-спектрометричного аналізу Інституту біохімії і біофізики, Варшава, Польща).

Структурні 3D моделі створювали з використанням програми Modeller (version 9.14) (Webb, 2014, Fiser *et al*, 2000), вдосконалювали в ModRefiner (Xu, 2011), перевіряли на web-сервері MolProbity (Chen *et al*, 2010) і покращували на сервері з мінімізації енергії YASARA (Krieger *et al*, 2009). Візуалізація та аналіз структурних моделей проводили в UCSF Chimera (Pettersen, 2004). Передбачення наявності неструктурованих регіонів в білках проводили на MetaDisorderMD2 (Kozlovski *et al*, 2012).

Процедура *in silico* докінгу між eEF1B β та eEF1B γ проводилась на web-сервері PatchDock (Dubovny *et al*, 2002, Schneidman-Duhovny *et al*, 2005). Симетричний докінг між мономерами eEF1B β проводили на web-сервері SymmDock (Schneidman-Duhovny *et al*, 2005). Уточнення та повторне оцінювання отриманих структур було зроблено з використанням FireDock (Mashiach *et al*, 2008). Аналіз і візуалізація молекулярних інтерфейсів між білками проводили на web-сервері Cocomaps (Vangone *et al*, 2011).

Результати дослідження та їх обговорення

Структурна організація субдиниці eEF1Ba. Маса eEF1Ba за допомогою гель-фільтрації була визначена як 75 кДа (рис. 1а), що є втричі більше за теоретично розраховану – 25,5 кДа. Точніше молекулярну масу білка визначали методом ШУЦ (Cole *et al.*, 2008), який показав, що в препараті eEF1Ba наявні молекули одного типу, з коефіцієнтом седиментації $S_w = 0,932S$ і їх вміст складає близько 93,4% від загального адсорбційного сигналу. При оптимальному співвідношенні $f/f_0 = 1,64$, розрахована молекулярна маса eEF1Ba становила 25,5 кДа, що відповідає теоретичній масі мономера (рис. 1б). Співвідношення $S_{max}/S = 1,6$ вказує на помірну видовженість молекули eEF1Ba. РУЦ дозволяє визначити молекулярну масу білка, без впливу форми молекули (Cole *et al.*, 2008), яка для eEF1Ba склала $26,3 \pm 2,6$ кДа (рис. 1в), що узгоджується з великою точністю з теоретично розрахованим значенням. Тож ми з'ясували, що eEF1Ba є мономером помірно видовженої форми.

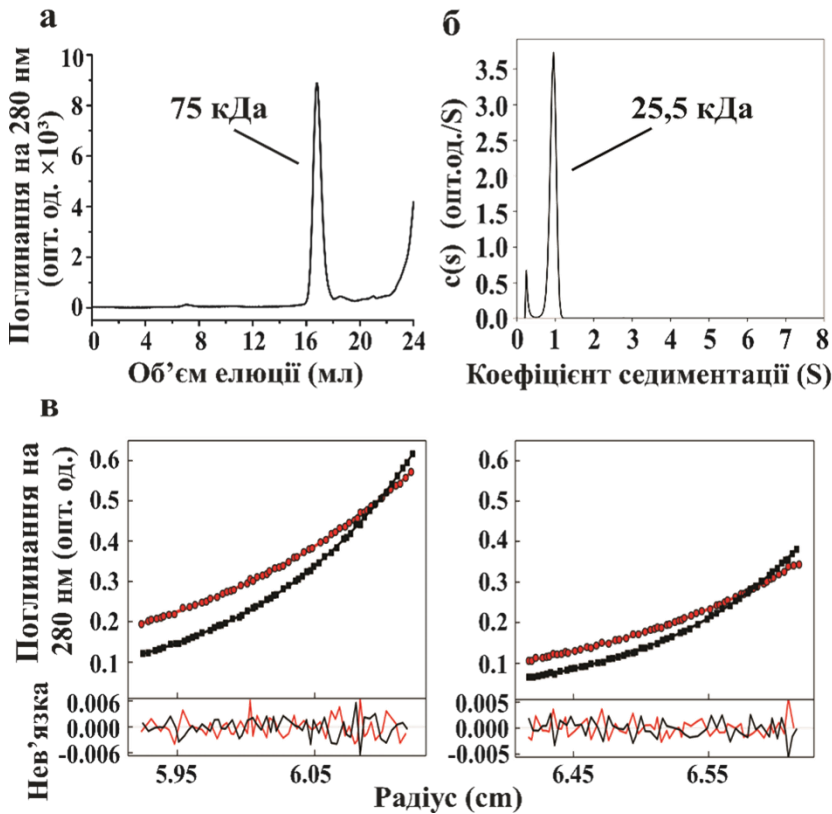


Рис. 1. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного eEF1Ba людини. (а) Хроматограма eEF1Ba на Superose 6HR. Наносили 100 мкл розчину білка з концентрацією 10 мкМ; (б) Седиментограма ШУЦ пре-парату eEF1Ba з концен-трацією 0,85 мг/мл (графік функції відновленого роз-поділу по коефіцієнту седиментації в координатах $s(s)$ від s); (в) Седиментограми РУЦ препаратів eEF1Ba з концентраціями 0,2 мг/мл (ліво-руч) та 0,12 мг/мл (праворуч) отримані на швидкості 17000 об/хв (червоний) та 21000 об/хв (чорний). Похибка обчислення представлена у вигляді «нев'язки», яка показує величину відхилення апроксимації від експериментальних значень

Біоінформатичний

аналіз eEF1Ba передбачив наявність в ньому довгого неструктурованого регіону в ділянці від 64 до 139 а.з., що відповідає лінкеру та CAR-домену. Щоб експериментально перевірити ці теоретичні розрахунки, ми застосували метод N/D-MS (Oganessian et al., 2018, Engen et al., 2009) (рис. 2а), результати якого позначили на створеній нами структурній моделі eEF1Ba представленій на рис. 3б. Ділянки α -спіралей N-кінцевого домену eEF1Ba, які відмічені синім, ймовірно, беруть участь у формуванні ядра домену, є ригідно-структурованими і мають значення сукупного захисту вище 0,15 ум. од., в той час як неструктуровані петлі з прилеглими частинами α -спіралей демонструють слабкий (0,05 - 0,15 ум.од.) або відсутній ($<0,05$ ум.од.) захист, що свідчить про їх динамічну організацію. Лінкерний регіон (червоний) та CAR-домен (темно-червоний) не показують захисту і, отже, мають динамічну структурну організацію, що корелює з біоінформатичним передбаченням. Більша частина GEF-домену є високозахищеною від N/D обміну, за виключенням трьох петель, які з'єднують між собою елементи вторинної структури (рис. 2а,б). Загалом, створена нами структурна модель eEF1Ba добре узгоджується з даними N/D-MS.

Таким чином, ми створили модель структурної організації eEF1Ba, в якій цей білок складається з двох ригідно-структурованих доменів (N-кінцевого та GEF) з'єднаних динамічними лінкером та CAR-доменом.

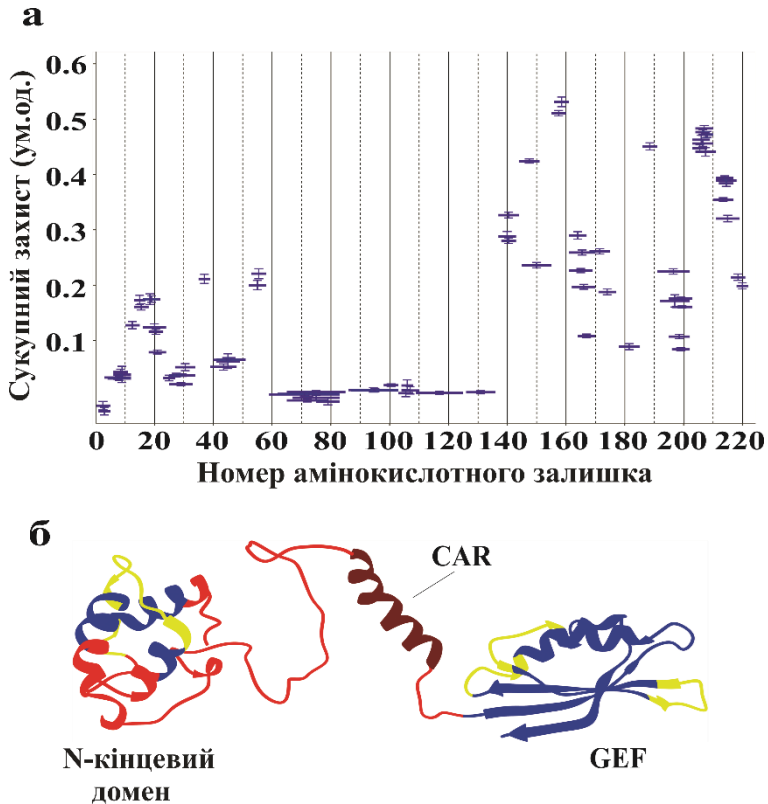


Рис. 2. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в eEF1Ba людини і модель його просторової організації. (а) Результати N/D MS для eEF1Ba. Значення сукупного захисту від включення дейтерію представляли у вигляді пептидної карти із зазначенням їх положення на амінокислотній послідовності білка. (б) Модель просторової організації eEF1Ba, побудована з використанням програми Modeller. Регіони білка зі значенням сукупного захисту $>0,15$ умовних одиниць позначені синім кольором зі значенням $<0,05$ умовних одиниць - червоним кольором, зі значенням від 0,05 до 0,15 умовних одиниць – жовтим. Темно-червоним кольором відмічено домен CAR, який має значення сукупного захисту $<0,05$ умовних одиниць, але був змодельований як α -спіраль

Функціональні особливості субодиниці eEF1Ba. Відомо, що N-кінцевий домен eEF1Ba взаємодіє з eEF1B γ (*van Damme et al., 1991, Perez et al., 1998*), що призводить до підвищення швидкості обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1Ba (*Bec et al., 1994*). Щоб зрозуміти, яким чином N-кінцевий домен eEF1Ba може впливати на швидкість обміну гуанінового нуклеотиду, ми створили набір вкорочених з N-кінця форм eEF1Ba та окремо його N-кінцевий домен. Надалі вкорочені форми eEF1Ba перевіряли в реакції обміну гуанінового нуклеотиду на факторах eEF1A1 та eEF1A2 і порівнювали з активністю повнорозмірного білка (рис. 3).

На рис. 3а. видно, що поступове вкорочення eEF1Ba з N-кінця призводить до поступового пришвидшення обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на факторі eEF1A2. Ефект повного видалення N-кінцевого домену eEF1Ba був подібним до ефекту, що спостерігався в результаті формування комплексу eEF1Ba γ . Варто відмітити, що вкорочення eEF1Ba з N-кінця значно менше вплинуло на зміну швидкості реакції обміну нуклеотиду на ізоформі eEF1A1. Певний позитивний ефект спостерігався лише при повному видаленні N-кінцевого домену eEF1Ba, а також при додаванні eEF1B γ (рис. 3б). За допомогою гель-електрофорезу в нативних умовах ми з'ясували, що N-кінцевий домен eEF1Ba не взаємодіє з її C-кінцевим доменом та фактором eEF1A2. При цьому C-кінцевий домен eEF1Ba утримує в комплексі обидві ізоформи фактора eEF1A краще, ніж повнорозмірний білок, що свідчить про його більш високу спорідненість до eEF1A.

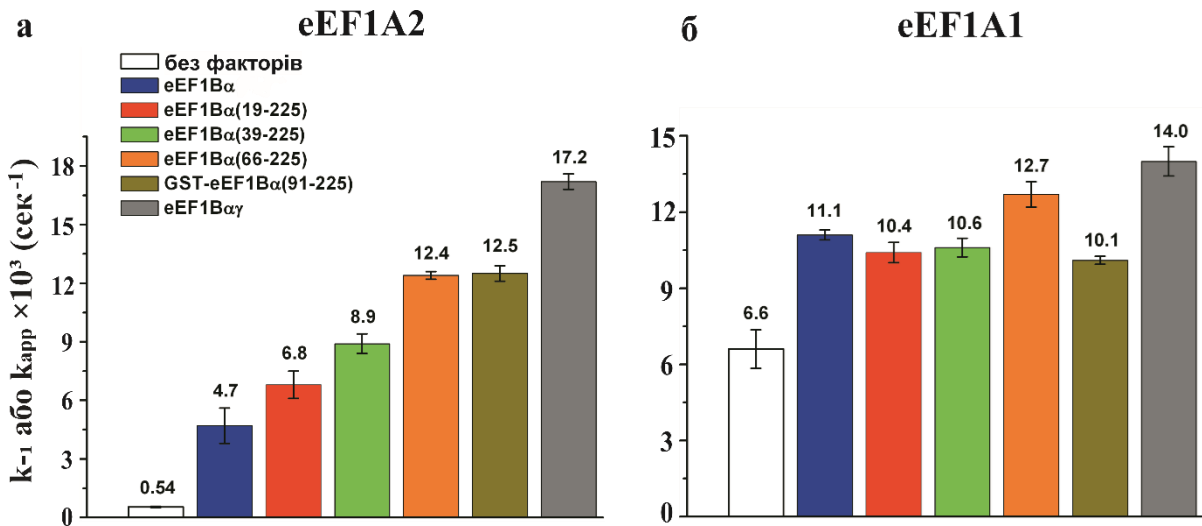


Рис. 3. Порівняльні діаграми спостережних констант швидкості (k_{app}) реакції обміну $[^3H]ГДФ/ГДФ$ у присутності eEF1Bα, його вкорочених форм і комплексу eEF1Bαγ на факторах eEF1A2(а) і eEF1A1(б). Цифри над стовпчиками це середні значення констант швидкості реакції, розраховані по чотирьох незалежних кінетичних експериментах

Тож ми запропонували наступний механізм підсилюючої дії eEF1Bγ: при формуванні комплексу eEF1Bαγ N- та C-кінцеві домени eEF1Bα змінюють своє положення у просторі так, що відкривається більш вільний доступ до взаємодії останнього з фактором eEF1A. Фізичне видалення N-кінцевого домену eEF1Bα, відповідно, призводить до такого ж результату (рис. 4).

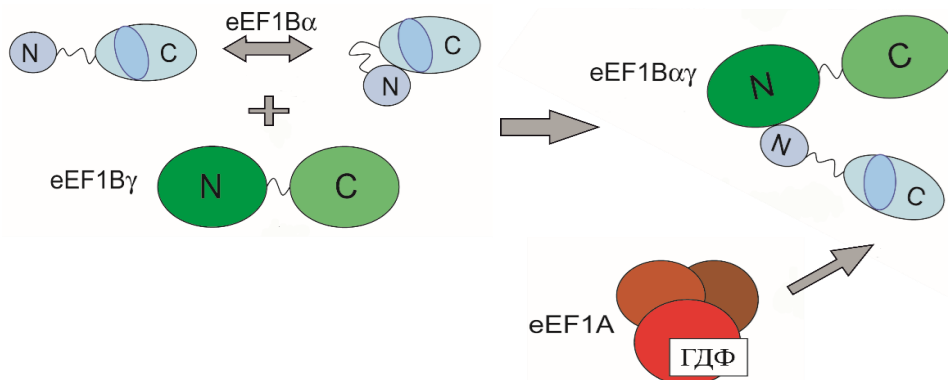


Рис. 4. Схема впливу субодиниці eEF1Bγ на конфомацію eEF1Bα, що призводить до підвищення функціональної активності останнього. N- та C-кінцеві домени субодиниць позначені відповідними літерами

Структурна характеристика субодиниці eEF1Bβ. Згідно гель-фільтрації, молекулярна маса білка складає 350 кДа (теоретично розрахована 32,5 кДа) (рис. 5а). Для визначення точної молекулярної маси eEF1Bβ ми використали ШУЦ, який показав, що білок є монодисперсним з коефіцієнтом седиментації $S_w=1,84\pm 0,04$ S. При $f/f_0=1,97\pm 0,07$ його молекулярна маса була оцінена як 92 ± 4 кДа (рис. 5б), що є близьким до теоретичної маси тримера eEF1Bβ – 95,7 кДа. Розраховане співвідношення S_{max}/S склало $2,02\pm 0,04$, що характерно для сильно витягнутих білків. Згідно РУЦ молекулярна маса eEF1Bβ склала $97,6\pm 2,4$ кДа (рис. 5в), що відповідає теоретичній молекулярній масі тримера.

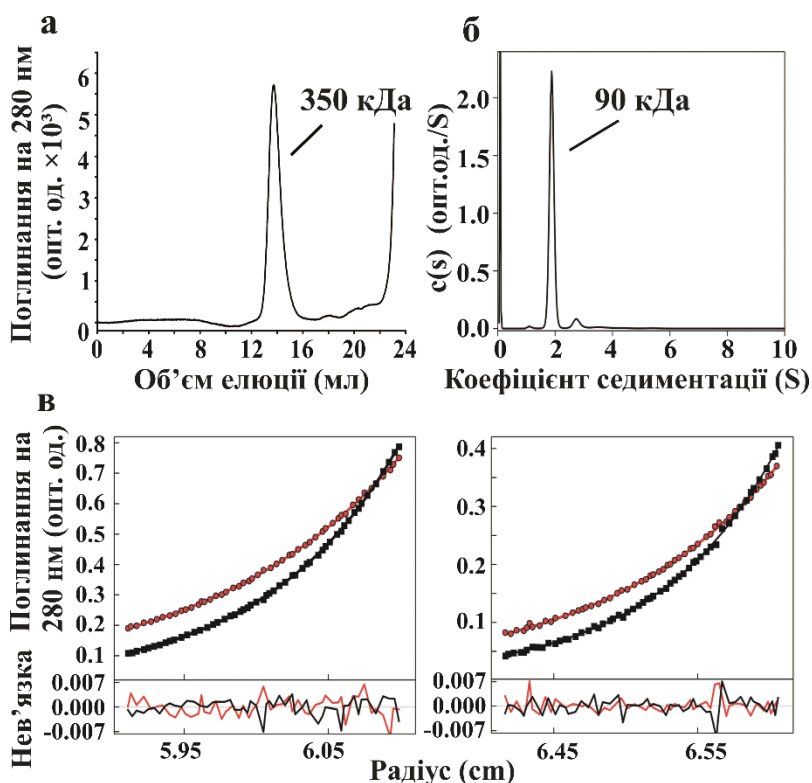


Рис. 5. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного eEF1B β людини.

(а) хроматограма eEF1B α на Superose 6HR. (б) седиментограма ШУЦ препарату eEF1B β з концентрацією 0,7 мг/мл (графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $s(s)$ від s).

(в) Седиментограми РУЦ препаратів eEF1B β з концентраціями 0,7 мг/мл (ліворуч) та 0,35 мг/мл (праворуч). Червоний – седиментаційні профілі, отримані при досягненні рівноваги на кутовій швидкості 10000 об/хв., чорний – на 12000 об/хв. Похибка обчислення представлена у вигляді «нев'язки», яка показує величину відхилення апроксимації від експериментальних значень

Таким чином, ми з'ясували, що рекомбінантний eEF1B β є стабільним тримером сильно видовженої форми.

Характеристика N-кінцевого домену eEF1B β і моделювання його структурної організації. Структура N-кінцевого домену eEF1B β наразі невідома. Біоінформатично було передбачено наявність неструктурованих ділянок в його складі. Згідно гель-фільтрації молекулярна маса рекомбінантного eEF1B β (1-77) становила 20 кДа. РУЦ продемонструвало, що цей білок є мономером, з масою $9,13 \pm 0,4$ кДа, що відповідає його теоретично розрахованій масі (9,5 кДа).

Вторинну структуру N-кінцевого домену eEF1B β ми визначили за допомогою спектроскопії кругового дихроїзму в діапазоні температур від 24 до 55°C (рис. 6).

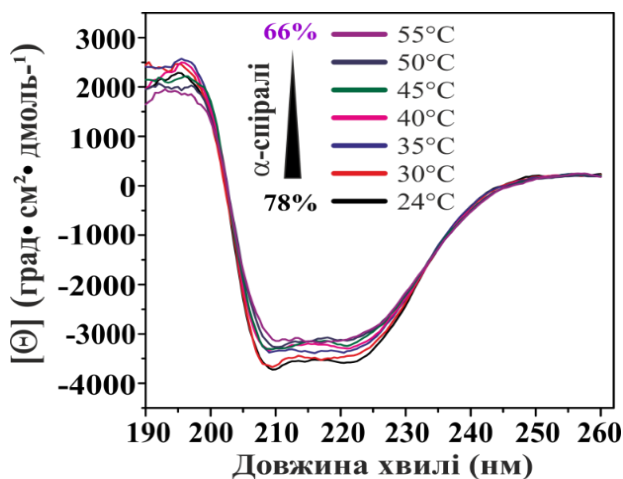


Рис. 6. Спектри КД eEF1B β (1-77) за різних температур. Спектри представлено у вигляді графіку залежності середньої еліптичності розрахованої на один амінокислотний залишок [Θ] від довжини хвилі

Математичний аналіз спектру, записаного при 24°C, за допомогою програми CDNN показав, що 78% послідовності eEF1B β (1-77) представлено в α -спіральній

конформації, а інша частина є неструктурованою. Поступове підвищення температури до 55°C зменшує вміст α -спіралей (приблизно на 10%), і відповідно збільшує вміст неструктурованих ділянок. Моделювання N-кінцевого домену eEF1B β , було проведено з використанням I-TASSER Suite (Yang et al., 2015). Три найкращі моделі, представлені на рис. 7. мали наблизений до експериментальних даних вміст α -спіралей та неструктурованих ділянок і відрізнялись між собою лише їх просторовою орієнтацією.

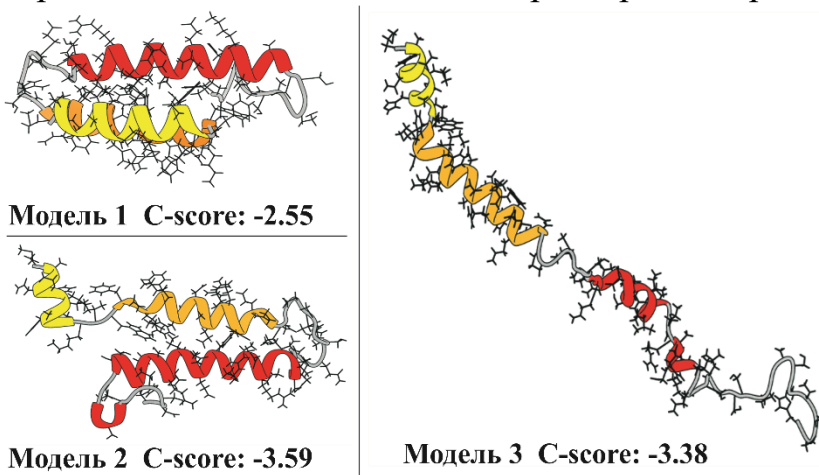


Рис. 7. Моделі структурної організації eEF1B β (1-77) створені за допомогою I-TASSER та вдосконалені ModRefiner. Стрічкове подання моделей eEF1B β (1-77) на яких бічні ланцюги амінокислот показані у вигляді структурних радикалів. С-критерій I-TASSER (C-score) вказаний для кожної моделі. Усі моделі додатково обраховували з використанням алгоритму ModRefiner і їх конформація була

підтверджена за допомогою серверу MolProbity

Результати Н/Д-MS для N-кінцевого домену eEF1B β (рис. 9) показують майже повну відсутність захисту від проникнення дейтерію, що вказує на динамічну просторову організацію елементів його вторинної структури. Отже, всі змодельовані конформації цього домену можуть мати місце. Для подальшої роботи була обрана перша модель з найкращим показником довірчого критерію C.

Структурна організація мотиву типу «лейцинова застібка» eEF1B β .

Наразі експериментальних даних щодо структурної організації LZ-мотиву eEF1B β немає. Ми створили конструкцію GST-eEF1B β (78-118), яка охоплює LZ-мотив eEF1B β , та дослідили отриманий білок. Згідно гель-фільтрації, молекулярна маса GST-eEF1B β (78-118) складає близько 380 кДа. ШУЦ показало присутність двох популяцій молекул, які седиментують з коефіцієнтами $S_w=3,728$ S та $S_w=5,316$ S, відповідно. Враховуючи $f/f_0 = 1,1$, їх молекулярні маси було оцінено, як 107 та 183 кДа. Ці значення є близькими до молекулярної маси тримеру (95,2 кДа) і гексамеру (190,4 кДа) GST-eEF1B β (78-118), що свідчить про те, що LZ-мотив спричиняє олігомеризацію eEF1B β . Створена за допомогою CBuilder 2.0 (Wood та Woolfson, 2018) структурна модель тримеру LZ-мотиву eEF1B β , яка має найменше значення енергії взаємодії між спіралями (-425,6 кДж/моль) (Wood et al., 2014), показана на рис. 8.

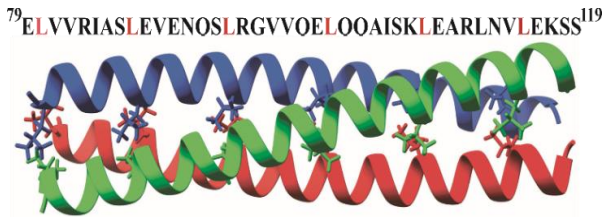


Рис. 8. Модель структури тримеру мотиву типу «лейцинова застібка» eEF1B β . Три α -спіралі є закрученими одна навколо одної, утворюючи суперспіральний пучок. Усі залишки лейцину, що беруть участь у гідрофобних взаємодіях, показані у вигляді кольорових бічних радикалів. Послідовність амінокислот мотиву показана у

верхній частині малюнка з гептадним повторенням залишків лейцинів, позначених червоним

Моделювання структурної організації субодиниці eEF1B β . Аналіз eEF1B β за допомогою H/D-MS показав, що пептиди N-кінцевого домену, лінкерної області та CAR-домену мають близьке до нульового значення захисту від включення дейтерію (рис. 9а), а, отже, є динамічними ділянками в цьому білку. В той час як LZ-мотив і більшість пептидів GEF домену, показують високі значення сукупного захисту, тож є ригідно-структурованими (рис.9а).

Моделювання мономеру eEF1B β проводили з використанням Modeller, тоді як симетричне моделювання тримеру - на сервері SymmDock. Найкращу модель тримеру eEF1B β за оцінкою комплементарності геометричної форми було відібрано та вдосконалено сервером мінімізації енергії YASARA (рис. 9б). Результати H/D-MS добре узгоджуються з представленою моделлю.

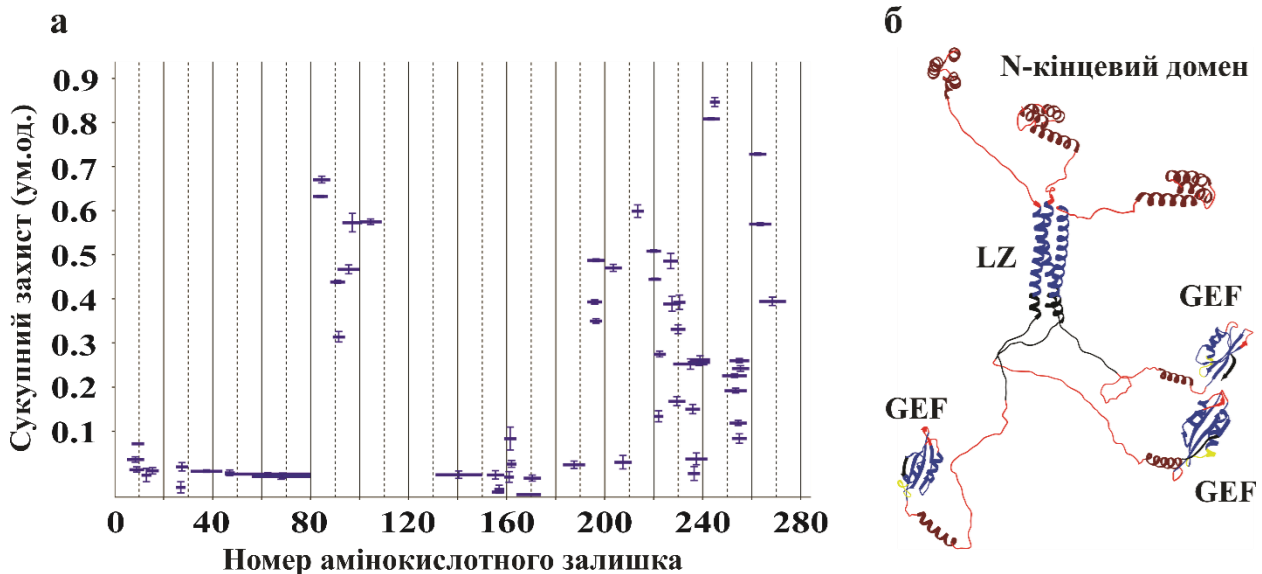


Рис. 9. Визначення ригідно-структурованих та динамічних ділянок в eEF1B β людини і модель його просторової організації. (а) Результати H/D MS для eEF1B β . Значення сукупного захисту від включення дейтерію представляли у вигляді пептидної карти із зазначенням їх положення на амінокислотній послідовності білка. (б) Модель просторової організації тримера eEF1B β . Регіони білка зі значенням сукупного захисту >0,15 умовних одиниць позначені синім кольором зі значенням <0,05 умовних одиниць - червоним кольором, зі значенням від 0,05 до 0,15 умовних одиниць – жовтим. Темно-червоним кольором відмічено домен CAR, який має значення сукупного захисту <0,05 умовних одиниць, але був змодельований як α -спіраль. Чорним позначено ділянки з відсутніми для аналізу пептидами

Суперспіраль LZ-мотиву і більшість пептидів компактно згорнутого GEF-домену демонструють високий ступінь захисту, тоді як N-кінцевий домен і CAR, змодельовані як α -спіральні ділянки, є незахищеними від проникнення дейтерію,

що вказує на їх динамічну організацію (рис 9б, темно-червоний колір). Неструктуровані області eEF1B β , які також не мають захисту, є динамічними ділянками (рис 9б, червоний). Таким чином, поєднання експериментального та обчислювального підходів дозволило нам вперше створити структурну модель тримеру eEF1B β . У цій моделі три мономери eEF1B β збираються в стійкий тример за рахунок взаємодії їх «лейцинових застібок». В кожному з мономерів N-кінцевий домен з'єднаний з LZ-мотивом через короткий неструктурований лінкер, тоді як С-кінцевий домен з'єднаний з ним порівняно довгою структурно динамічною ділянкою. Загальна форма тримера eEF1B β є видовженою, і його N- та С-кінцеві частини, швидше за все, орієнтовані в просторі довільним чином.

Функціональні особливості субдиниці eEF1B β . Даних щодо функціональних властивостей eEF1B β наразі дуже мало. Аналогічно до eEF1A α , ми провели серію кінетичних експериментів з повнорозмірним eEF1B β , його вкороченими формами, eEF1A1 та eEF1A2. Ми встановили, що послідовне вкорочення eEF1B β з N-кінця і утворення ним комплексу з eEF1B γ достовірно не вплинуло на значення констант швидкості дисоціації ГДФ як на eEF1A1, так і на eEF1A2, в порівнянні з індивідуальним eEF1B β (рис. 10).

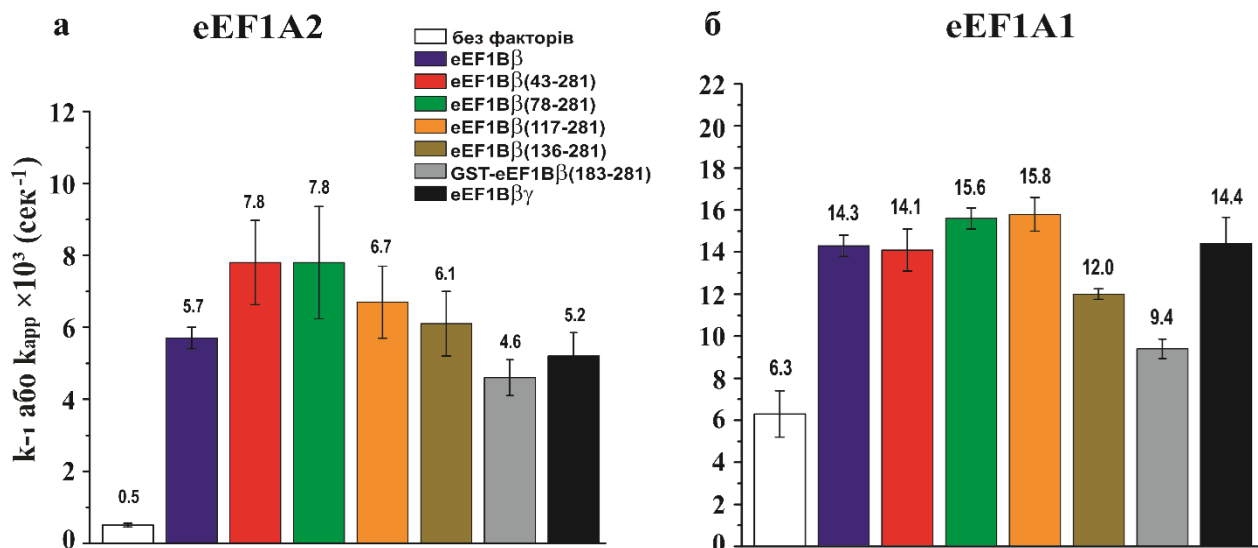


Рис. 10. Порівняльні діаграми спостережних констант швидкості (k_{app}) реакції обміну $[^3H]GDP/GDP$ у присутності eEF1B β , його вкорочених форм і комплексу eEF1B β γ на факторах eEF1A2 (а) і eEF1A1 (б). Цифри над стовпчиками це середні значення констант швидкості реакції розраховані по чотирьох незалежних кінетичних експериментах, довірчі інтервали показують стандартне відхилення

Таким чином, ми вперше показали здатність eEF1B β до обміну гуанінового нуклеотиду на факторі eEF1A2 та відсутність впливу видалення N-кінцевого домену або взаємодії з eEF1B γ на швидкість обміну $[^3H]GDP/GDP$ на обох ізоформах eEF1A.

Так як eEF1B β є тримером і має, відповідно, три GEF-домени, то їх здатність взаємодіяти з eEF1A2 перевіряли методом електрофорезу в нативних умовах. Дійсно, при титруванні eEF1A2 субдиницею eEF1B β утворюється три види комплексів із різною рухливістю в гелі (рис. 11.).

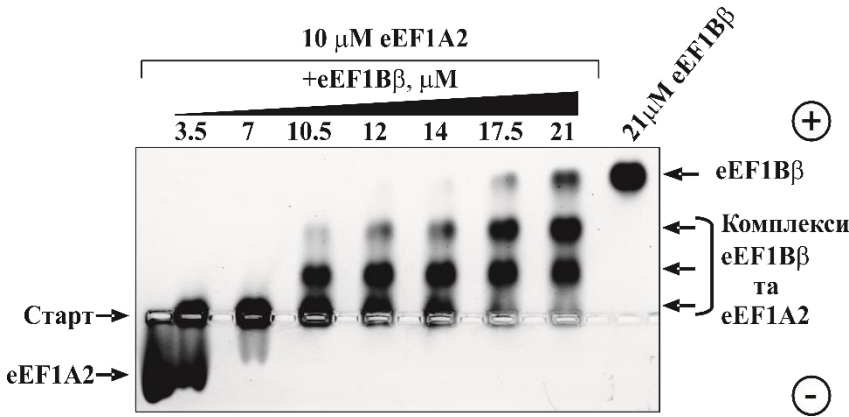


Рис. 11. Електрофореграма розділення комплексів фактора eEF1A2 і субодиниці eEF1B β . eEF1A2 інкубували із вказаними концентраціями eEF1B β , білкові суміші розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі в нативних умовах. Білки виявляли фарбуванням Coomassie Brilliant Blue

Структурна характеристика субодиниці eEF1 γ . Згідно гель-фільтрації, eEF1 γ має тенденцію до утворення мультимерів, в залежності від його концентрації. За результатами ШУЦ, eEF1 γ при концентрації 0,57 мг/мл і 0,34 мг/мл формує два типи молекул з розрахованими молекулярними масами 50 і 91 кДа ($f/f_0=1,67$) та 53 і 87 кДа ($f/f_0=1,65$), відповідно. Ці значення є близькими до маси мономера (52,6 кДа) та димеру (105,2 кДа) eEF1 γ . Співвідношення S_{max}/S для мономера та димера eEF1 γ становить 1,74 і 1,84, що вказує на їх помірно видовжену форму. РУЦ при концентрації білка 0,27 мг/мл показало наявність димерів та тетрамерів у зразку (рис. 12, ліва панель). Константи дисоціації тетрамеру обчислених для різних швидкостей становили 0,9 мкМ (10000 об/хв) та 18 мкМ (12000 об/хв).

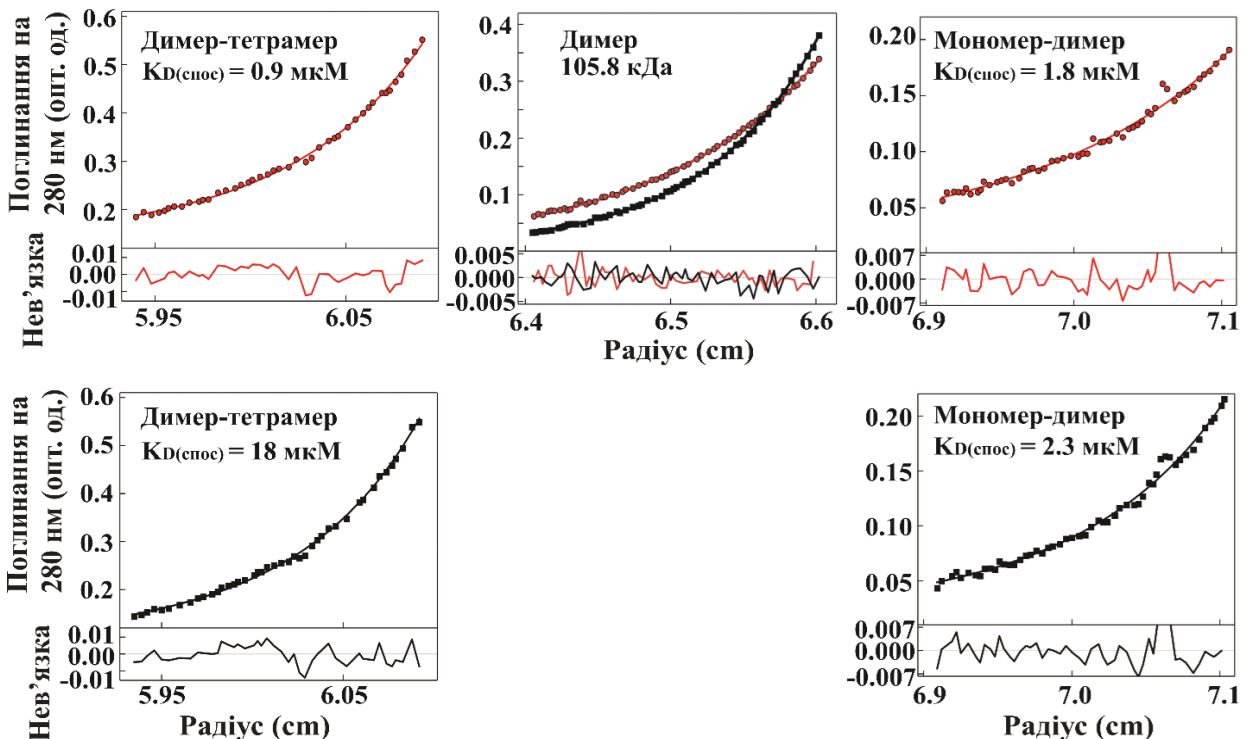


Рис. 12. Седиментограми РУЦ препаратів eEF1 γ з концентраціями 0,27 мг/мл (ліва панель), 0,18 мг/мл (середня панель) та 0,09 мг/мл (права панель), отримані на 10000 об/хв (червоний) та 12000 об/хв (чорний). Похибка обчислення представлена у вигляді «нев'язки», яка показує величину відхилення апроксимації від експериментальних значень

При концентрації білка 0,18 мг/мл, молекулярна маса eEF1 γ становила 105,9 кДа, що відповідає масі димеру (105,2 кДа) (рис. 12, по центру). При зменшенні

концентрації до 0,09 мг/мл, eEF1Vу формував суміш мономерів та димерів. Константи дисоціації димеру eEF1Vу обрахованих для різних швидкостей становили 1,8 і 2,3 мкМ (рис. 12, права панель). Різниця значень констант дисоціації, отриманих на різних швидкостях центрифугування та при різних концентраціях зразків, свідчить про те, що вони є «спостережними» та підтверджує висновок про схильність eEF1Vу до незворотної концентраційно-залежної олігомеризації.

Згідно біоінформатичного передбачення, лінкерний регіон eEF1Vу (215-280 а.з.) є неструктурованим. Дійсно, Н/D-MS аналіз eEF1Vу показав, що цей регіон має близький до нульового захист від включення дейтерію (рис. 13а) і, таким чином, є структурно динамічним. Натомість, більшість пептидів, що входять до складу N- та С-кінцевих доменів мають високий рівень захисту, що свідчить про їх ригідну структурованість. Створена за допомогою Modeller просторова модель повнорозмірного eEF1Vу добре узгоджується з даними Н/D-MS аналізу (рис. 13б).

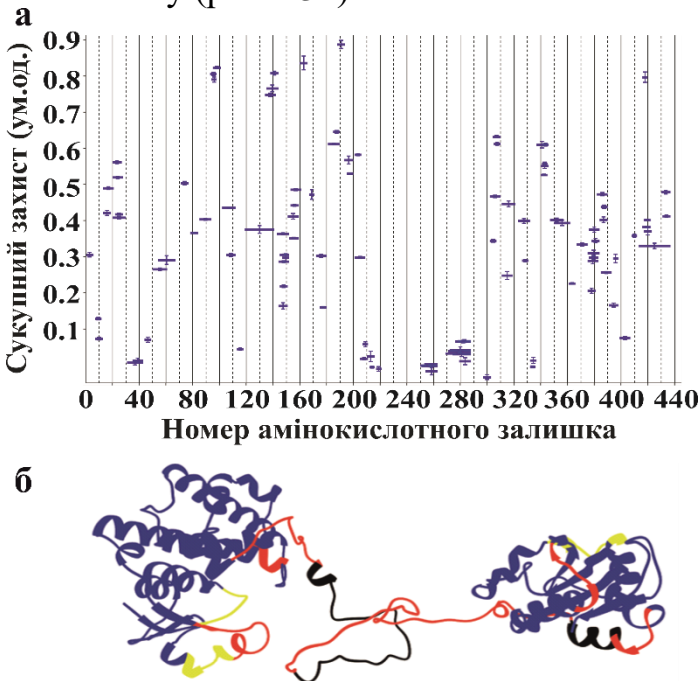


Рис. 13. Визначення ригідно-структурованих та динамічних ділянок в eEF1V людини і модель його просторової організації. (а) аналіз eEF1Vу методом Н/D-MS. Значення сукупного захисту від включення дейтерію представляли у вигляді пептидної карти із зазначенням їх положення на амінокислотній послідовності (б) модель просторової організації eEF1Vу побудована з використанням програми Modeller. Регіони білка зі значенням сукупного захисту >0,15 умовних одиниць позначені синім кольором зі значенням <0,05 умовних одиниць - червоним кольором, зі значенням від 0,05 до 0,15 умовних одиниць – жовтим. Чорним позначено ділянки з відсутніми для аналізу пептидами

Реконструкція комплексу eEF1B та його характеристика. Ми продемонстрували, що комплекси eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ і eEF1B $\alpha\beta\gamma$ утворюються при еквімолярних співвідношеннях субодиниць за допомогою методів гель-електрофорезу в нативних умовах та аналітичної гель-фільтрації (рис. 14 а, в, д). ШУЦ комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ показав присутність двох видів молекул, що седиментують з коефіцієнтами $S_w = 1,973 S$, і $S_w = 2,716 S$, та розрахованою масою 80 кДа та 130 кДа, відповідно ($f/f_0=1,66$). Ці значення є близькими до маси гетеродимеру eEF1B $\alpha\gamma$ – 80 кДа, та дигетеродимеру eEF1B($\alpha\gamma$)₂ – 156,2 кДа. Гідродинамічне співвідношення $S_{max}/S=1,68$ свідчить про помірно видовжену форму eEF1B $\alpha\gamma$ (рис. 14б). Згідно РУЦ, при концентраціях 0,24 і 0,12 мг/мл комплекс eEF1B $\alpha\gamma$ є стабільним дигетеродимером з розрахованою молекулярною масою 158,6 та 160,7 кДа, відповідно. При концентрації 0,06 мг/мл спостерігається наявність у зразку суміші eEF1B $\alpha\gamma$ /eEF1B($\alpha\gamma$)₂ з

обрахованою масою гетеродимеру eEF1B $\alpha\gamma$ 80 кДа і константою дисоціації дигетеродимеру 0,3 мкМ.

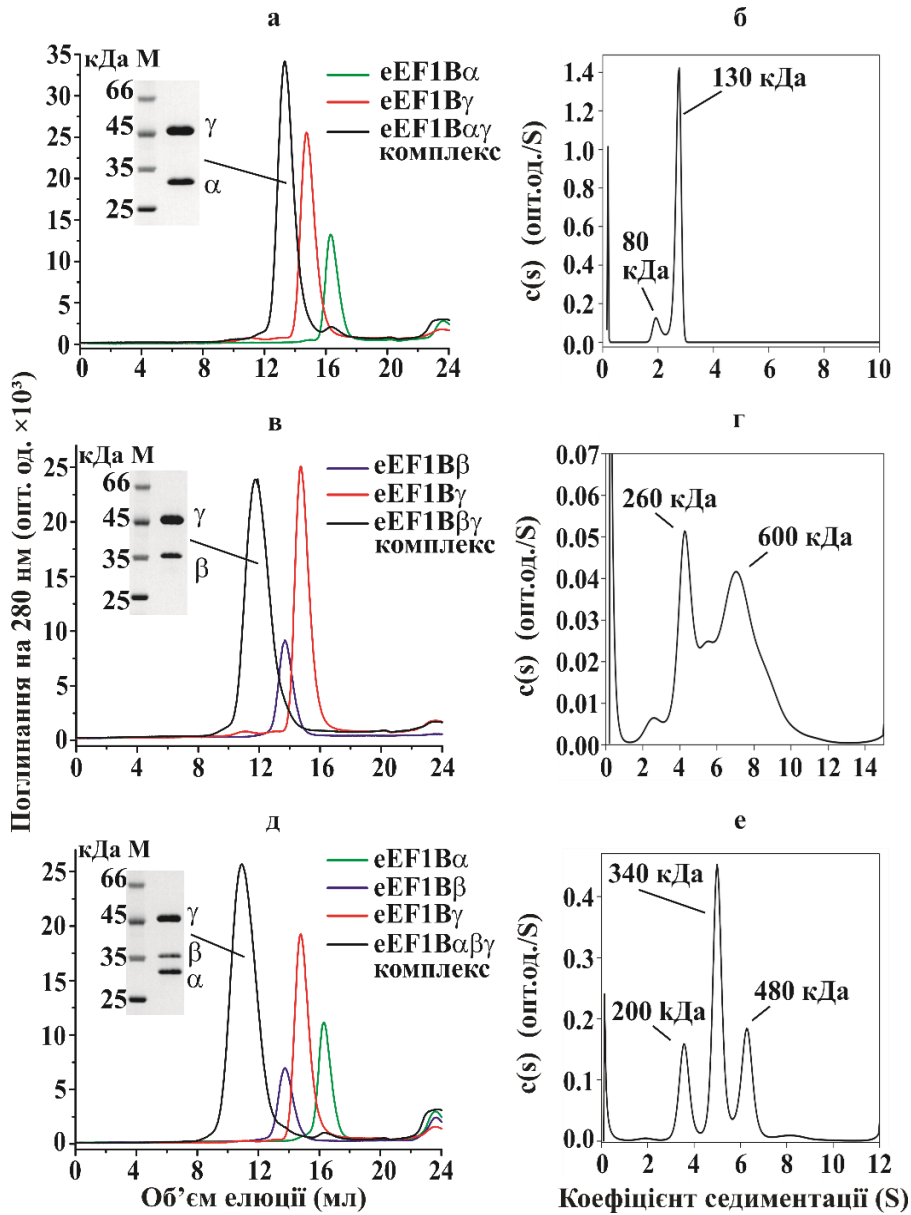


Рис. 14. Характеристика очищених препаратів комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ людини. Гель-фільтрація окремих субодиниць eEF1B та їх сформованих комплексів eEF1B $\alpha\gamma$ (а), eEF1B $\beta\gamma$ (в) та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (д).

Седиментограми ШУЦ препаратів eEF1B $\alpha\gamma$ (б), eEF1B $\beta\gamma$ (г) та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (е) з концентраціями 0,3 мг/мл, 0,17 мг/мл та 0,27 мг/мл відповідно (графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $s(s)$ від s)

ШУЦ комплексу eEF1B $\beta\gamma$ показав наявність двох основних видів седиментуючих молекул з $S_w = 4,30S$ і $S_w = 7,66S$. Враховуючи оптимальне співвідношення $f/f_0=1,64$ їх молекулярні маси склали 260 та 600 кДа, відповідно (рис. 15г), що відповідає розрахованим масам тригетеродимеру eEF1B($\beta\gamma$) $_3$ – 253,2 кДа та гексагетеродимеру eEF1B($\beta\gamma$) $_6$ – 506,4 кДа. Гідродинамічне співвідношення $S_{max}/S = 1,73$ свідчить про помірно видовжену форму обох комплексів. РУЦ також підтвердив, утворення суміші eEF1B($\beta\gamma$) $_3$ /eEF1B($\beta\gamma$) $_6$ при різних концентраціях комплексу. Молекулярна маса тригетеродимеру eEF1B($\beta\gamma$) $_3$ була визначена як 253,2 кДа і константи дисоціації гексагетеродимеру eEF1B($\beta\gamma$) $_6$ становили 2 мкМ, 0,9 мкМ і 0,26 мкМ при різних концентраціях досліджуваного зразка. Різні значення обчислених констант дисоціації вказує на те, що вони є «спостережними».

ШУЦ комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ показало наявність трьох видів седиментуючих молекул зі значеннями $S_w = 3,588 S$, $S_w = 5,021 S$ і $S_w = 6,297 S$ (рис. 14e). З урахуванням $f/f_0=1,88$ їх молекулярні маси становили 200, 340 та 480 кДа, відповідно. Інтегрування розподілу $c(s)$ показало, що пік першого виду комплексів становив 18,7%, другого - 46,7% і третього - 24,5% від загального сигналу поглинання. При співвідношенні субодиниць потрійного комплексу 1:1:1, його розрахована молекулярна маса становить 111,8 кДа, тож маса найбільш представленої другої фракції (340 кДа) відповідає його тригетеротримеру – eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃. Стехіометрія субодиниць першого і третього піків залишається невизначеною. Комплекс eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ має помірно видовжену форму, згідно $S_{max}/S = 1,79$. Метод РУЦ також підтвердив, що препарат eEF1B $\alpha\beta\gamma$ являє собою суміш eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃/eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₆. Розрахована маса тригетеротримеру eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ становила 335,6 кДа. Отримані значення констант диссоціації гексагетеротримеру eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₆ залежать від концентрації досліджуваного зразка та становлять 5 мкМ, 1,6 мкМ та 0,6 мкМ, що вказує на те, що ці значення є «спостережними».

Визначення сайтів взаємодії між субодиницями комплексу eEF1B. Моделювання комплексу eEF1B. Для ідентифікації сайтів взаємодії між субодиницями eEF1B, ми застосували техніку H/D-MS до комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ та eEF1B $\alpha\beta\gamma$. Для цього спочатку ми визначали кінетику включення дейтерію в послідовність індивідуальних субодиниць, а потім тих самих білків, але вже у складі комплексів. За різницею цих значень розраховували диференційний сукупний захист для пептидів всіх субодиниць.

Ми визначили, що при формуванні комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ більшість пептидів N-кінцевого домену eEF1B α набували позитивних значень диференційного сукупного захисту. Це свідчить про те, що майже весь N-кінцевий домен eEF1B α зазнає підсилення структурної жорсткості при зв'язуванні з eEF1B γ (рис. 15а). В свою чергу, на субодиниці eEF1B γ більш вузькі ділянки (пептиди 144-161 та 170-190) стали більш захищеними від включення дейтерію при взаємодії з eEF1B α (рис. 15в). Це свідчить на користь їх безпосередньої участі в утворенні контактів з eEF1B α . С-кінцевий домен та лінкерна область (залишки 220-440) eEF1B γ не показали змін H/D обміну при взаємодії з eEF1B α (рис. 15в). При дослідженні комплексу eEF1B $\beta\gamma$ лише пептиди, що лежать в регіоні 11-29 а.з. eEF1B β (рис. 15б), показали збільшення диференційного сукупного захисту. Вони належать до N-кінцевого домену (перша і друга α -спіралі) і, ймовірно, формують інтерфейс прямої взаємодії з eEF1B γ . Решта послідовності eEF1B β не піддається суттєвим змінам (рис. 15б). Зв'язування eEF1B β з eEF1B γ провокує доволі масштабне збільшення значень диференційного сукупного захисту пептидів, які належать регіону 7-190 а.з. eEF1B γ , що свідчать про підвищення структурної жорсткості всього N-кінцевого домену цього білка при взаємодії з eEF1B β (рис. 15г).

Додатково ми провели порівняння даних диференційного захисту пептидів eEF1B α між комплексами eEF1B $\alpha\gamma$ і eEF1B $\alpha\beta\gamma$, пептидів eEF1B β між eEF1B $\beta\gamma$ і eEF1B $\alpha\beta\gamma$ та пептидів eEF1B γ між eEF1B $\alpha\gamma$ і eEF1B $\alpha\beta\gamma$, а також eEF1B $\beta\gamma$ і

eEF1B $\alpha\beta\gamma$, яке показало, що присутність однієї з субодиниць в комплексі суттєво не впливає на зв'язування іншої.

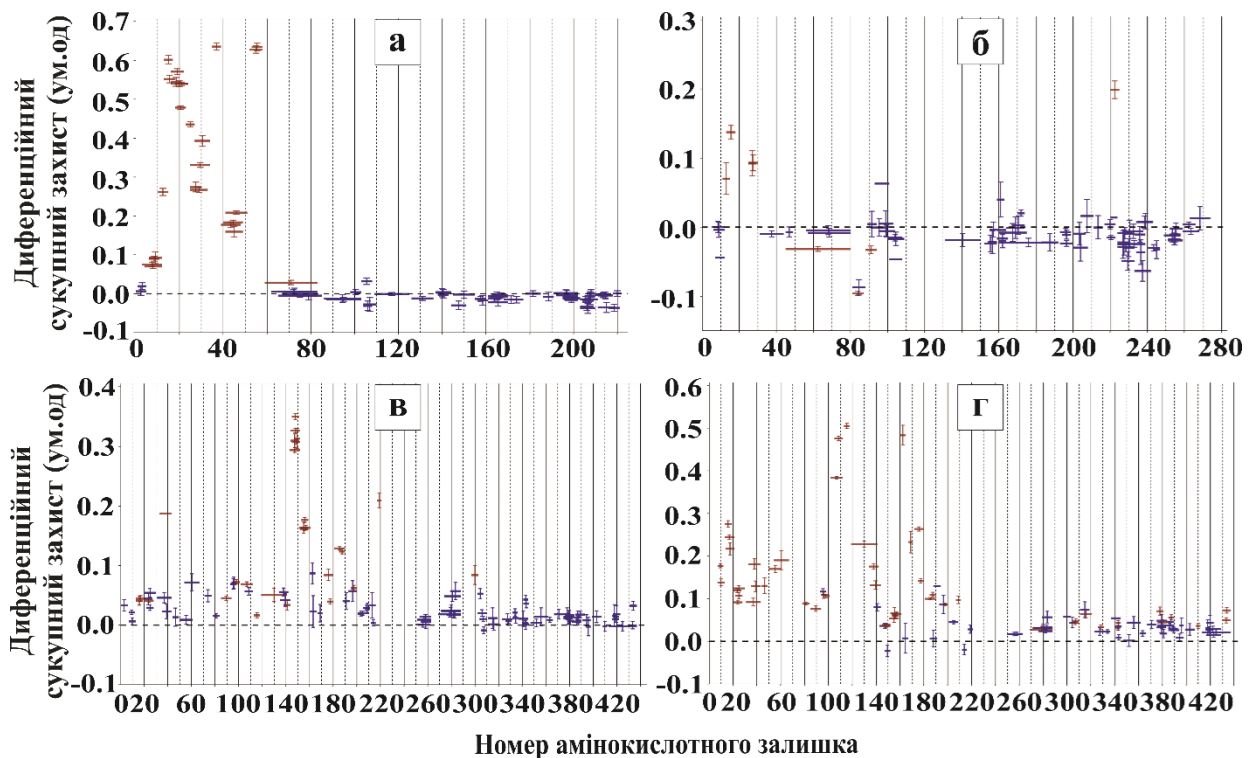


Рис. 15. Ідентифікація пептидів eEF1B α (а), eEF1B β (б) які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1B γ , та eEF1B γ , які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1B α (в) та eEF1B β (г). На графіках диференційованого сукупного захисту, коричневим позначені пептиди які змінили значення диференційованого сукупного захисту при взаємодії з партнером, і різниця захисту є статистично значущою для трьох або більше часових точок інкубації. Синім позначено пептиди, які не змінили значення диференційованого сукупного захисту при взаємодії з партнером

Модель комплексу N-кінцевих доменів eEF1B β та eEF1B γ створювали керуючись даними H/D-MS з використанням алгоритму PatchDock (Duhovny та Wolfson, 2002) і найращу з них вдосконалювали за допомогою FireDock (Mashiach et al., 2008). У цій моделі, перші дві α -спіралі eEF1B β у зігнутий конформації розташовуються всередині N-кінцевого домену eEF1B γ , утворюючи комплекс, який стабілізується гідروفобними взаємодіями і водневими зв'язками. Реконструкцію потрійного комплексу N-кінцевих доменів проводили шляхом накладання моделі N-кінцевих доменів eEF1B $\beta\gamma$ на відому кристалічну структуру комплексу N-кінцевих доменів eEF1B $\alpha\gamma$ (ID PDB: 5DQS), для яких N-кінцевий домен eEF1B γ є спільною частиною у потрійному комплексі. Моделювання комплексу eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ повнорозмірних субодиниць (рис. 16), проводили по аналогічному алгоритму.

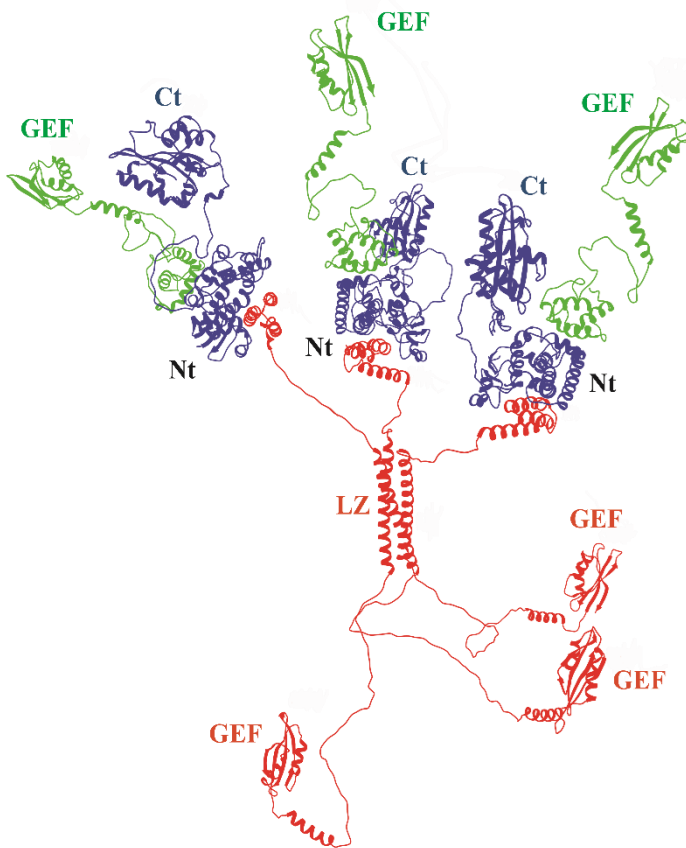


Рис. 16. Модель четвертинної організації комплексу eEF1B.

eEF1B α – позначена зеленим, eEF1B β – червоним, а eEF1B γ – синім. Умовні позначення: GEF – домен обміну гуанінового нуклеотиду, Nt- та Ct – N- та C-кінцеві домени відповідно, LZ – мотив типу «лейцинова застібка»

Відповідно до створеної нами моделі, роль структурного компонента комплексу належить не лише eEF1B γ , а й eEF1B β , адже eEF1B γ утримує дві інші субодиниці разом, а eEF1B β відповідає за тримеризацію цього комплексу. Щоб перевірити, чи

дісно всі GEF-домени комплексу eEF1B доступні для взаємодії з eEF1A ми провели його титрування фактором eEF1A2 з наступним гель-електрофорезом в нативних умовах, та показали, що одна молекула комплексу може утримувати до шести молекул eEF1A2 (рис. 17).

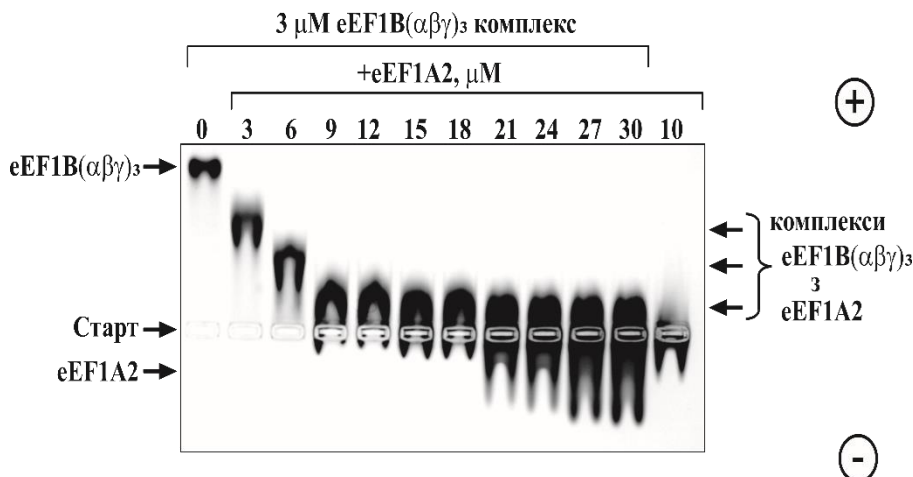


Рис. 17. Електрофореграма титрування комплексу eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ зростаючою концентрацією eEF1A2.

Комплекс eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ інкубували з вказаними концентраціями eEF1A2, білкові суміші розділяли за допомогою електрофорузу в 1% агарозному гелі в нативних умовах. Білки виявляли фарбуванням Coomassie Brilliant Blue

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі було досліджено структурно-функціональні особливості комплексу eEF1B людини та побудовано атомарну модель його структурної організації.

1. Визначено, що рекомбінантна субодиниця eEF1B α існує у розчині як мономер помірно видовженої форми. За допомогою методу H/D-MS показано, що N-кінцевий та GEF-домени eEF1B α є ригідно-структурованими, тоді як лінкерний регіон і CAR-домен є динамічними ділянками;
2. Встановлено, що рекомбінантна субодиниця eEF1B β існує у розчині як стабільний тример сильно видовженої форми. Тримеризація цього білка реалізується за рахунок LZ-мотиву. За допомогою методу H/D-MS визначено, що GEF-домени та LZ-мотив eEF1B β є ригідно-структурованими, тоді як N-кінцевий домен, що складається з трьох α -спіралей, і CAR-домен є динамічними ділянками в цьому білку;
3. Визначено, що рекомбінантна субодиниця eEF1B γ є білком помірно видовженої форми і має схильність до олігомеризації, ступінь якої залежить від концентрації білка. Методом H/D-MS показано, що ригідно-структуровані N- та C-кінцеві домени eEF1B γ поєднані між собою довгим динамічним лінкерним регіоном;
4. Показано, що видалення N-кінцевого домену eEF1B α , так само як і утворення комплексу eEF1B $\alpha\gamma$, пришвидшує обмін гуанінового нуклеотиду на факторі eEF1A в порівнянні з повнорозмірним eEF1B α . Конформація N-кінцевого домену повнорозмірного eEF1B α знижує спорідненість eEF1A до GEF-домену, що призводить до зменшення швидкості реакції обміну гуанінового нуклеотиду. Як наслідок, видалення N-кінцевого домену eEF1B α або його фіксація в комплексі з eEF1B γ усуває його інгібіторний ефект;
5. Вперше показано, що рекомбінантний eEF1B β функціонує як фактор обміну гуанінового нуклеотиду не тільки для eEF1A1, але і для eEF1A2 *in vitro*. Продемонстровано, що на відміну від eEF1B α , субодиниця eEF1B γ , при утворенні комплексу з eEF1B β , не впливає на функціональну активність останнього;
6. Показано, що N-кінцевий домен eEF1B γ одночасно взаємодіє з N-кінцевим доменом як eEF1B α , так і eEF1B β . За допомогою сайт-спрямованого мутагенезу та методу H/D-MS визначено ділянки, які беруть участь у взаємодії між цими білками.
7. Визначено, що комплекси eEF1B $\alpha\gamma$ та eEF1B $\beta\gamma$ утворюються при еквімолярному співвідношенні субодиниць. Показано, що комплекс eEF1B існує переважно у формі тригетеротримеру ($\alpha\beta\gamma$)₃ і здатен зв'язувати шість молекул фактора eEF1A2. За допомогою молекулярного докінгу побудовано атомарну модель структурної організації комплексу eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃, який містить шість GEF-доменив.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Bondarchuk T.V.**, Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatal'ska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrut'skii B. S., (2022) Quaternary organization of the human eEF1B complex reveals unique multi-GEF domain assembly. *NAR* 2022, 50 (16), 9490–9504, doi.org/10.1093/nar/gkac685 (*Особистий внесок здобувача: створення генетичних конструкцій та отримання цільових білків; біохімічні дослідження, проведення кінетики воднево/дейтерієвого обміну з наступним маспектрометричним аналізом eEF1B β , eEF1B α та eEF1B γ , комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ та eEF1B $\alpha\beta\gamma$; перевірка білок-білкових взаємодій, обробка та аналіз результатів.*)

2. **Bondarchuk T. V.**, Lozhko D.M., Shalak V. F., Fatal'ska A., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrut'skii B. S., El'skaya A. V., (2019) The protein-binding N-terminal domain of human translation elongation factor 1B β possesses a dynamic α -helical structural organization, *Int J Biol Macromol*, 126, 899-907, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.220. (*Особистий внесок здобувача: створення генетичної конструкції та отримання N-кінцевого домену eEF1B β , структурні дослідження, обробка та аналіз експериментальних результатів.*)

3. **Bondarchuk T. V.**, Shalak V. F., Negrut'skii B. S., El'skaya A. V., (2016) Leucine-zipper motif is responsible for self-association of translation elongation factor 1B β ., *Biopolymers and Cell*, 32 (1), 9-20, doi: 10.7124/bc.000907 (*Особистий внесок здобувача: створення генетичних конструкцій та отримання цільових білків, біохімічні дослідження, експерименти з кінетики обміну гуанінового нуклеотиду, обробка та аналіз експериментальних результатів.*)

4. **Trosiuk (Bondarchuk) T. V.**, Shalak V. F., Szczepanowski R. H., Negrut'skii B. S., El'skaya A. V., (2016) A non-catalytic N-terminal domain negatively influences the nucleotide exchange activity of translation elongation factor 1B α , *The FEBS Journal*, 283 (3), 487-497, doi: 10.1111/febs.13599 (*Особистий внесок здобувача: створення генетичних конструкцій та отримання цільових білків, біохімічні дослідження, експерименти з кінетики обміну гуанінового нуклеотиду, перевірка білок-білкових взаємодій, обробка та аналіз експериментальних результатів.*)

5. **Trosiuk (Bondarchuk) T. V.**, Liudkovska V. V., Shalak V. F., Negrut'skii B. S., El'skaya A. V., (2014) Structural dissection of human translation elongation factor 1B γ (eEF1B γ): expression of full-length protein and its truncated forms, *Biopolymers and cell*, 30 (2), 96-106, doi: 10.7124/bc.000887 (*Особистий внесок здобувача: створення генетичних конструкцій та отримання цільових білків, біохімічні дослідження, обробка та аналіз експериментальних результатів.*)

6. **Bondarchuk T. V.**, Shalak V. F., Fatal'ska A., Lozhko D.M., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrut'skii B. S., El'skaya A. V., (2019 October) The new model of structural organization of the human translation elongation complex eEF1B, 30 September-4 October 2019, Ternopil. Medical and Clinical Chemistry, Vol. 21, №3 (Supplement), P. 18. – Oral talk award.

7. **Бондарчук Т.В.**, Шалак В.Ф., Ложко Д. М., Фатальська Ф., Щепановский Р. Г., Капустян Л. М., (2018 March), Структурные особенности N-концевого домена фактора элонгации трансляции eEF1B β , I International scientific conference for students and young scientists Current chemical problem, 27-29 March, Vinnitsa, Abstract Book, p.42 (1st place oral talk award).

8. **Bondarchuk T.V.**, Shalak V. F., (2016 September) Structural and functional features of translation elongation factor 1Ba, 41st FEBS congress, Ephesus, Turkey 03-08 September 2016, The FEBS journal, 2016, Vol. 283, (Supplement 1), p.229-230 (poster).

9. **Bondarchuk T.V.**, Shalak V. F., (2015 September) Leucine zipper motif is responsible for the multimerisation of translation elongation factor 1B β , International Conference of the Young Scientists 15 (CYS-2015), 21-25 September, Kyiv. – Abstract book, P. 42. – Oral talk award.

10. **Trosiuk (Bondarchuk) T.V.**, Shalak V. F., (2014 October) Dissection of translation elongation factor eEF1B γ : creation of deletion mutants to study its interaction with protein partners in vitro., Materials of XI Ukrainian biochemical congress, 6-10 October 2014, Kyiv. – Ukr. Biochem. J., 2014, Vol.86, №5 (Suppl. 1), p. 39-40. – Oral talk award.

11. **Trosiuk (Bondarchuk) T.V.**, Shalak V. F. (2014 May) The interaction of truncated forms of translation elongation factor eEF1B γ with eEF1B α and eEF1B β ., VIII Conference of Young Scientists of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine Dedicated to 90th anniversary of P.G. Kostyuk, 20-21 May, Kyiv Biopolymers and cell, 2014, Vol.30, Special issue, p.21. – Oral talk award.

12. **Trosiuk (Bondarchuk) T.V.**, Shalak V. F., (2013 May), Construction and expression of deletion mutants of translation elongation factors eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ ., VII Conference of Young Scientists of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine Dedicated to 175th anniversary of O.Y. Danilevsky, 28-29 May, Kyiv, Biopolymers and cell, 2013, Vol.29, Special issue, p.27. – Oral talk award.

АНОТАЦІЯ

Бондарчук Т.В. Комплекс факторів елонгації трансляції eEF1B людини: структурна організація і функціональні властивості. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.03 «Молекулярна біологія». – Інститут молекулярної біології та генетики Національної академії наук України, Київ, 2023.

Дисертацію присвячено дослідженню структурних і функціональних особливостей комплексу елонгації трансляції eEF1B людини. Показано, що рекомбінантна eEF1B α є мономером, eEF1B γ перебуває у рівновазі мономер-димер при концентрації нижче 1.8 мкМ і олігомеризується при підвищенні концентрації, eEF1B β існує у вигляді стабільного тримеру. Всі вищезазначені білки мають видовжену форму молекули. Досліджено структурну організацію субодиниці eEF1B β і створено атомарну модель тримеру цього білка. Нами було

запропоновано механізм підсилюючої дії eEF1B γ на швидкість обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1B α . Ми також показали, що eEF1B β може зв'язувати не тільки eEF1A1 але й eEF1A2, та обмінювати гуаніновий нуклеотид на обох факторах. Ми побудували атомарну модель просторової організації комплексу eEF1B. N-кінцевий домен eEF1B γ взаємодіє одночасно з N-кінцевими доменами eEF1B α та eEF1B β . Субодиниця eEF1B β , в свою чергу, тримеризується за рахунок мотиву типу «лейцинова застібка», таким чином, утворюється комплекс типу eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃. Оскільки білки eEF1B α і eEF1B β мають структурно подібні GEF-домени, їх загальна кількість в комплексі дорівнює шести. Ми довели, що комплекс eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ може зв'язувати до шести молекул eEF1A2. Таке унікальне структурне об'єднання факторів обміну нуклеотиду в одному комплексі може розглядатися як своєрідний «GEF-хаб», який забезпечує ефективне відновлення активної ГТФ-зв'язаної конформації eEF1A в процесі елонгації трансляції у вищих еукаріот.

Ключові слова: біосинтез білка, фактори елонгації трансляції еукаріот, білок-білкові взаємодії, стабільні білкові комплекси.

SUMMARY

Bondarchuk T.V. The human translation elongation complex eEF1B: structural organization and functional features. - Qualifying scientific work with the manuscript copyright.

Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2023.

This thesis describes the structural organization of recombinant eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ subunits, stoichiometry and architecture of their complex, eEF1B, and functional activity of eEF1B α and eEF1B β as the guanine nucleotide exchange factors of eEF1A.

Protein biosynthesis in eukaryotic cell is spatially and structurally organized that ensures high efficiency of this process. One of the distinguishing features of the eukaryotic cell is the presence of the stable macromolecular complexes of aminoacyl-tRNA synthetases and translation elongation factors. Until now, the structural organization of the eEF1B translation elongation factor complex, as well as its individual subunits, remains unknown. Therefore, the aim of this thesis is to establish the structural organization of the human eEF1B complex and characterize the structural features and functional properties of its individual subunits.

We determined that eEF1B α is a monomeric protein with a moderately elongated shape in solution. It consists of two rigidly structured domains (N-terminal and GEF) connected by a long structurally dynamic region. eEF1B β is a stable trimer of a highly elongated shape in solution. Trimerization of eEF1B β is mediated by its leucine-zipper motif, which forms a compact supercoiled trimeric bundle. Three GEF domains are connected to this bundle via unstructured regions and CAR domains on one side of this bundle; three N-terminal domains with a dynamic α -helical organization are located on the other side. eEF1B γ is also a moderately elongated protein and its aggregation state

depends on the protein concentration. At a concentration below 1.8 μM , eEF1B γ forms monomer-dimer equilibrium. Increasing protein concentration results in the formation of stable dimers and tetramers.

We explained a mechanism of the stimulatory effect of eEF1B γ on the rate of guanine nucleotide exchange reaction mediated by eEF1B α . We demonstrated that the N-terminal domain of eEF1B α inhibits its nucleotide exchange activity by interfering with eEF1A binding to the C-terminal domain of eEF1B α . The formation of the eEF1B $\alpha\gamma$ complex confines the N-terminal domain of eEF1B α in eEF1B γ that consequently eliminates this inhibitory effect. In contrast to eEF1B α , eEF1B γ did not affect functional activity of eEF1B β .

We found that the eEF1B $\alpha\gamma$ and eEF1B $\beta\gamma$ complexes are formed at an equimolar subunits ratio. Using the method of hydrogen deuterium exchange coupled to mass spectrometry, we outlined the regions involved in the protein-protein interaction for each subunit. Amino acid residues 6-58 of the eEF1B α N-terminal domain acquire rigidly structured conformation when interacting with eEF1B γ . In turn, two short regions of the eEF1B γ N-terminal domain (residues 144-161 and 170-190) are responsible for the interaction with eEF1B α . The N-terminal domains of eEF1B β and eEF1B γ are responsible for the eEF1B $\beta\gamma$ complex formation as well, particularly, amino acid residues 11-29 of eEF1B β and the entire N-terminal domain of eEF1B γ , with the exception of peptides interacting with eEF1B α , display high protection in the complex.

Using the molecular docking method, we built an atomistic model of the eEF1B complex. The N-terminal domain of eEF1B γ interacts with the N-terminal domains of eEF1B α and eEF1B β simultaneously. The eEF1B β subunit is trimerized by the leucine-zipper motif interaction, thus, forming the eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ complex. Since eEF1B α and eEF1B β proteins have structurally similar GEF-domains, their total number in the complex is equal to six. Therefore, the eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ complex is able to bind up to six molecules of eEF1A2. Such, so far, unique structural assembly of the guanine-nucleotide exchange factors within a stable complex may be considered as a “GEF-hub” that provides efficient conversion of eEF1A from the GDP-bound state to the active GTP-bound conformation in higher eukaryotes.

Key words: protein biosynthesis, eukaryotic translation elongation factors, protein-protein interactions, stable protein complexes.

