

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

БОНДАРЧУК Тетяна Валеріївна

УДК 577.112; 577.217.535

ДИСЕРТАЦІЯ

**КОМПЛЕКС ФАКТОРІВ ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ eEF1B ЛЮДИНИ:
СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ.**

03.00.03 – молекулярна біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Т. В. Бондарчук

Науковий керівник: **Шалак В'ячеслав Федорович**, кандидат біологічних
наук, с.н.с., с.н.с. відділу структурної та функціональної протеоміки

КИЇВ – 2023

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 і генетики Національної академії наук України, Київ, 2023.

Дисертаційна робота присвячена вивченню особливостей структурної організації рекомбінантних субодиниць eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ , стехіометрії і архітектури комплексу між ними (eEF1B), а також функціональної активності eEF1B α та eEF1B β в якості факторів обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A.

Біосинтез білка в еукаріотичній клітині є просторово та структурно організованим, що забезпечує високу ефективність цього процесу. Однією з відмінних рис вищих еукаріот є існування стабільних високомолекулярних комплексів аміноацил-тРНК синтетаз та факторів елонгації трансляції. На сьогоднішній день просторова структура комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B, а також його окремих субодиниць, залишається невідомою.

Тому метою дисертаційної роботи було встановлення структурної організації комплексу eEF1B людини та характеристика структурних і функціональних властивостей його окремих субодиниць.

Ми визначили, що субодиниця eEF1B α існує у розчині у вигляді мономеру помірно видовженої форми. Цей білок складається з двох структурно-ригідних доменів (N-кінцевого та GEF), з'єднаних між собою довгою структурно-динамічною ділянкою. Субодиниця eEF1B β існує у розчині у вигляді стабільного тримеру сильно витягнутої форми. Тримеризація eEF1B β відбувається за рахунок мотиву типу «лейцинова

застібка», який утворює компактний суперспіральний тримерний пучок. По один бік суперспіральної «лейцинової застібки» знаходяться три GEF-домени, з'єднані з нею неструктурованими ділянками і CAR-доменами, по інший – три N-кінцевих домени, які мають динамічну просторову α -спіральну організацію. Субодиниця eEF1V γ є також білком помірно видовженої форми, олігомерний стан якого *in vitro* залежить від його концентрації. При концентраціях нижче 1,8 мкМ eEF1V γ утворює суміш типу мономер-димер. При збільшенні концентрації білка спостерігається утворення стабільних димерів і тетрамерів.

Ми з'ясували механізм стимулюючої дії eEF1V γ на активність eEF1V α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A. Ми показали, що власний N-кінцевий домен eEF1V α інгібує його активність шляхом перешкоджання взаємодії eEF1A з C-кінцевим доменом eEF1V α . Утворення комплексу eEF1V $\alpha\gamma$ призводить до фіксації N-кінцевого домену eEF1V α на eEF1V γ та, відповідно, усунення цього інгібуючого ефекту. На відміну від eEF1V α , функціональна активність eEF1V β не зазнавала змін при взаємодії з eEF1V γ .

Ми показали, що комплекси eEF1V $\alpha\gamma$ та eEF1V $\beta\gamma$ утворюються при еквімолярному співвідношенні субодиниць. За допомогою методу воднево-дейтерієвого обміну із мас-спектрометричним аналізом ми окреслили ділянки кожної субодиниці, які беруть участь у білок-білкових взаємодіях. При зв'язуванні eEF1V γ з eEF1V α , N-кінцевий домен останнього (залишки 6-58) набуває більш жорсткої конформації у комплексі. В свою чергу дві короткі ділянки N-кінцевого домену eEF1V γ (залишки 144-161 та 170-190) відповідають за взаємодію з eEF1V α . За формування комплексу eEF1V $\beta\gamma$ також відповідальні N-кінцеві домени цих білків, зокрема, ділянка eEF1V β з 11 по 29 амінокислотні залишки і майже весь N-кінцевий домен eEF1V γ , за винятком пептидів, що взаємодіють з eEF1V α .

За допомогою методу молекулярного докінгу ми побудували атомарну модель просторової організації комплексу eEF1V. N-кінцевий домен eEF1V γ взаємодіє одночасно з N-кінцевими доменами eEF1V α та eEF1V 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. Отже, 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.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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: аналіз літературних джерел по темі роботи; дизайн і створення генетичних конструкцій, які містять послідовності N-кінцевих доменів eEF1B β , eEF1B α та eEF1B γ та вкорочені форми eEF1B α (19-225) та eEF1B β (43-281), eEF1B β (78-118), eEF1B β (117-281), підбір умов експресії отриманих конструкцій в бактеріях та очищення цільових білків хроматографічними методами; визначення молекулярної маси досліджуваних білків методом гель-фільтрації; проведення кінетики воднево/дейтерієвого обміну з наступним маспектрометричним аналізом повнорозмірних eEF1B β , eEF1B α та eEF1B γ , подвійних комплексів eEF1B $\alpha\gamma$ та eEF1B $\beta\gamma$ та потрійного eEF1B $\alpha\beta\gamma$; перевірка білок-білкових взаємодій

методом агарозного гел-електрофорезу в нативних умовах, обробка експериментальних результатів, участь у написанні статті та підготовці її до друку.

Bondarchuk T. V., Lozhko D.M., Shalak V. F.,Fatalaska A., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrutskii 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: аналіз літературних джерел по темі роботи, дизайн і створення генетичної конструкції, яка містить послідовність N-кінцевого домену eEF1B β , підбір умов експресії отриманої конструкції в бактеріях та очищення цільового білка хроматографічними методами, визначення молекулярної маси досліджуваного білка методом гел-фільтрації, підготовка та участь у запису КД спектрів, проведення кінетики воднево/дейтерієвого обміну N-кінцевого домену eEF1B β з наступним маспектрометричним аналізом, обробка експериментальних результатів, участь у написанні статті та підготовці її до друку.

Bondarchuk T. V., Shalak V. F., Negrutskii 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: аналіз літературних джерел по темі роботи, дизайн і створення генетичних конструкцій, які кодують послідовності вкорочених форм eEF1B β , підбір умов експресії отриманих конструкцій в бактеріях та очищення вкорочених форм білка хроматографічними методами, визначення їх молекулярних мас методом гел-фільтрації, визначення активності повнорозмірного eEF1B β і його вкорочених форм в реакції обміну нуклеотиду, обробка експериментальних результатів, участь у написанні статті та підготовці її до друку.

Trosiuk(Bondarchuk) T. V., Shalak V. F., Szczepanowski R. H., Negrutskii

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: аналіз літературних джерел по темі роботи, дизайн і створення генетичних конструкцій, які кодують послідовності повнорозмірного eEF1B α і його вкорочених форм, підбір умов експресії отриманих конструкцій в бактеріях та очищення цільових білків хроматографічними методами, визначення їх молекулярних мас методом гель-фільтрації, визначення активності повнорозмірного eEF1B α і його вкорочених форм в реакції обміну нуклеотиду, перевірка білок-білкових взаємодій методом агарозного гель-електрофорезу в нативних умовах, обробка експериментальних результатів, участь у написанні статті та підготовці її до друку

Trosiuk(Bondarchuk) T. V., Liudkovska V. V., Shalak V. F., Negrutskiy 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: аналіз літературних джерел по темі роботи, дизайн і створення генетичних конструкцій, які кодують послідовності повнорозмірного eEF1B γ і його вкорочених форм, підбір умов експресії отриманих конструкцій в бактеріях та очищення цільових білків хроматографічними методами, визначення їх молекулярних мас методом гель-фільтрації, підбір умов денатурації/ренатурації вкорочених форм eEF1B γ , які утворювали нерозчинні агрегати в бактеріях, обробка експериментальних результатів, участь у написанні статті та підготовці її до друку.

Тези наукових доповідей на конференціях

Bondarchuk T. V., Shalak V. F., Fatalska A., Lozhko D.M., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrutskii 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.

Бондарчук Т.В., Шалак В.Ф., Ложко Д. М., Фатальська Ф., Щепановський 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)

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).

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.

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.

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.

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.

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, 2021.

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 *in vitro*, 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 , except for 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.

List of research articles and conference abstracts published on the topic of dissertation

Research articles

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalaska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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.

Bondarchuk T. V., Lozhko D.M., Shalak V. F., Fatalaska A., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrutskii 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.

Bondarchuk T. V., Shalak V. F., Negrutskii 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.

Trosiuk T. V. (**Bondarchuk T. V.**), Shalak V. F., Szczepanowski R. H.,

Negrutskii 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.

Trosiuk T. V. (Bondarchuk T. V), Liudkovska V. V., Shalak V. F., Negrutskii 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.

Conference abstracts

Bondarchuk T. V., Shalak V. F., Fatal'ska A., Lozhko D.M., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrutskii 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.

Бондарчук Т.В., Шалак В.Ф., Ложко Д. М., Фатальська Ф., Щепановський 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)

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

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.

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.

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.

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.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	16
ВСТУП	18
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1. Етапи біосинтезу білка у вищих еукаріот	27
1.2. Структурна організація і канонічна функція eEF1A	30
1.3. Неканонічні функції eEF1A	33
1.4. Відомості про структуру і функцію факторів елонгації трансляції, які належать до групи eEF1B вищих еукаріот	35
1.4.1. Структурно-функціональні властивості eEF1B α	37
1.4.2. Структурно-функціональні властивості eEF1B β	40
1.4.3. Структурні властивості eEF1B γ	43
1.5. Неканонічні функції субодиниць комплексу eEF1B	45
1.6. Існуючі моделі комплексів eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H	47
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	52
2.1. Матеріали та обладнання	52
2.2. Плазмідні конструкції та лабораторні штами бактерій	54
2.3. Дизайн вкорочених форм субодиниць комплексу eEF1B	54
2.4. Методи роботи з нуклеїновими кислотами	57
2.4.1. Полімеразна ланцюгова реакція	57
2.4.2. Рестрикція ДНК та лігування	60
2.4.3. Виділення плазмідної ДНК з <i>E. coli</i>	60
2.4.4. Електрофорез фрагментів ДНК в агарозному гелі	60
2.5. Приготування компетентних клітин <i>E. coli</i>	61
2.6. Трансформація компетентних клітин <i>E. coli</i> і селекція позитивних клонів	62
2.7. Методи роботи з білками	63
2.7.1. Отримання рекомбінантних білків	63

2.7.1.1. eEF1Ba	63
2.7.1.2. eEF1B β	65
2.7.1.3. eEF1B γ	66
2.7.2. Гель-електрофорез білків в денатуруючих умовах	67
2.7.3. Формування препаративних кількостей білкових комплексів	68
2.7.4. Аналітична гель-фільтрація білків і оцінка їх молекулярних мас	69
2.7.5. Аналітичне ультрацентрифугування білків і білкових комплексів	70
2.7.6. Гель-електрофорез білкових комплексів в нативних умовах	73
2.7.7. [^3H]ГДФ/ГДФ обмін	73
2.7.8. Круговий дихроїзм (КД)	74
2.7.9. Кінетика заміщення водню на дейтерій в білках з наступним мас-спектрометричним аналізом (H/D-MS)	76
2.8. Створення структурних моделей білків і молекулярний докінг білків	79
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	80
3.1. Структурно-функціональна характеристика субодиниці eEF1B α	80
3.1.1. Структурна організація субодиниці eEF1B α	80
3.1.2. Функціональні особливості субодиниці eEF1B α	87
3.2. Структурно-функціональна характеристика субодиниці eEF1B β	98
3.2.1. Структурна організація повнорозмірної субодиниці eEF1B β	99
3.2.2. Характеристика N-кінцевого домену eEF1B β і моделювання його структурної організації	103
3.2.3. Структурна організація мотиву типу	

«лейцинова застібка» eEF1V β	112
3.2.4. Моделювання тривимірної структури субодиниці eEF1V β	117
3.2.5. Функціональні особливості субодиниці eEF1V β	119
3.3. Структурна характеристика субодиниці eEF1V γ	125
3.4. Реконструкція комплексу eEF1V та його характеристика	133
3.5. Визначення сайтів взаємодії між субодиницями комплексу eEF1V. Моделювання комплексу eEF1V	144
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	156
ВИСНОВКИ	166
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПЕРШОДЖЕРЕЛ	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CAR домен – центральний негативно заряджений регіон в молекулах eEF1B α і eEF1B β

eEF1A – фактор елонгації трансляції 1A еукаріот

eEF1A1 – перша ізоформа фактора елонгації трансляції 1A еукаріот

eEF1A2 – друга ізоформа фактора елонгації трансляції 1A еукаріот

eEF1B – комплекс факторів елонгації трансляції 1B еукаріот, який містить α , β і γ субодиниці

eEF1B α – субодиниця α фактора елонгації трансляції 1B еукаріот

eEF1B β – субодиниця β фактора елонгації трансляції 1B еукаріот

eEF1B γ – субодиниця γ фактора елонгації трансляції 1B еукаріот

eEF1H – важка форма факторів елонгації трансляції 1 еукаріот, до якої входить комплекс eEF1B і фактор(и) eEF1A

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)

EF-Tu – фактор елонгації трансляції Tu прокаріот

EF-Ts – фактор елонгації трансляції Ts прокаріот

GEF-домен – домен, який прискорює обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A

GST – глутатіон-S трансфераза

H/D-MS – метод визначення кінетики заміщення водню на дейтерій з наступним мас-спектрометричним аналізом

IPTG – ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозид (isopropyl- β D-1-thiogalactopyranoside)

LZ-мотив – амінокислотна послідовність типу «лейцинова застібка»

PIPES – піперазин-*N,N'*-біс(2-етансульфонова кислота (Piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulphonic acid)

PMSF – фенілметилсульфонілфлорид

SDS – додецил сульфат натрію (sodium dodecyl sulfate)

TEMED – тераметилетилендіамін

ValRS – валіл-тРНК синтетаза

АУЦ – аналітичне ультрацентрифугування

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДТТ – дитіотреїтол (dithiothreitol)

КД – круговий дихроїзм

кДа – кілодальтон

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота

ос.ч. – особливо чистий

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

рРНК – рибосомальна рибонуклеїнова кислота

РУЦ – рівноважне ультрацентрифугування

Тріс – тріс(гідроксиметил)амінометан (tris(hydroxymethyl)aminomethane)

тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

ч.д.а. – чистий для аналізу

ШУЦ – швидкісне ультрацентрифугування

ЯМР – ядерниймагнітний резонанс

ВСТУП

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 (1,2). 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 (3,4). Здатність до обміну гуанінового нуклеотиду мають дві з них – eEF1B α та eEF1B β , тоді як субодиниця eEF1B γ виступає як структурний елемент комплексу (3). Відомо, що субодиниця eEF1B γ підсилює активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового нуклеотиду в 2-4 рази (5,6), але механізм цієї дії залишається нерозкритим. Варто зазначити, що подібного ефекту eEF1B γ на активність субодиниці eEF1B β не спостерігали (5).

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 (5,7). Існування стабільних високомолекулярних комплексів аміноацил-тРНК синтетаз і факторів елонгації трансляції є однією з відмінних рис вищих еукаріот (1,8), 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 (9). Згідно з найпростішою моделлю, eEF1B α та eEF1B β зв'язуються з субодиницею eEF1B γ через їх N-кінцеві домени, утворюючи комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (10). 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 $\alpha\beta\gamma_2$ (11). 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 (5) або навіть тримеризуватись (12) 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 (11). 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 (13). 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 гель-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 (14–16), 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 нанокомплексів 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 досліджень

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 субодинацями 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 субодинаць комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ і побудувати атомарну модель його просторової організації.

Об'єкт дослідження – комплекс eEF1B людини, до складу якого входять субодинаці eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ , а також функціональна активність eEF1B α і eEF1B β у вільному стані і у комплексі з eEF1B γ .

Предмет дослідження – структурна організація і ступінь олігомеризації рекомбінантних білків eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ , а також комплексів між ними. Сайти взаємодії між субодинацями eEF1B α і eEF1B γ , eEF1B β і eEF1B γ . Вплив eEF1B γ на функціональну активність eEF1B α і eEF1B β в реакції обміну гуанінового нуклеотиду на молекулах eEF1A1 та eEF1A2.

Наукова новизна одержаних результатів

У дисертаційній роботі ми вперше визначили олігомерний стан (четвертинну організацію) усіх субодинаць комплексу eEF1B *in vitro*. Показали, що завищена, в порівнянні з теоретично розрахованою, молекулярна маса усіх субодинаць, яку спостерігали в попередніх дослідженнях, обумовлена насамперед витягнутою формою їхніх молекул. Ми також продемонстрували, що у розчині субодинаця eEF1B α існує як стабільний мономер, eEF1B γ – представлений сумішшю мономер-димер при концентрації нижче 1,8 мкМ і олігомеризується при підвищенні концентрації. Ми вперше експериментально довели існування eEF1B β у вигляді стабільного тримеру.

Нами вперше було детально досліджено структурну організацію субодинаці eEF1B β . Ми визначили, що N-кінцевий домен не має жорстко структурованого ядра і складається з α -спіралей з динамічною організацією.

Він з'єднаний з мотивом типу «лейцинова застібка», який забезпечує тримеризацію eEF1B β , утворюючи суперспіральний пучок. GEF-домен має компакту укладку і з'єднаний з мотивом типу «лейцинова застібка» через динамічний SAR-домен та довгу неструктуровану ділянку. На основі отриманих даних за допомогою методів молекулярного докінгу ми створили атомарну модель тримеру eEF1B β .

В літературі було описано феномен підсилюючої дії eEF1B γ на активність eEF1B α в реакції обміну гуанінового. Нами було запропоновано пояснення цього ефекту, яке полягає в зміні просторової орієнтації N- та C-кінцевих доменів субодиниці eEF1B α при формуванні комплексу з eEF1B γ , що покращує доступність C-кінцевого домену для взаємодії з eEF1A.

Вперше нами була показана можливість безпосередньої взаємодії обох ізоформ фактора eEF1A з субодиницею eEF1B β та проведено виміри функціональної активності останньої в реакції обміну гуанінового нуклеотиду.

Застосовуючи різні експериментальні підходи ми визначили, що субодиниці eEF1B утворюють комплекс в еквімолярному співвідношенні. Нами було запропоновано стехіометрію комплексу eEF1B як $(\alpha\beta\gamma)_3$ і доведено існування його в такому вигляді. Ми вперше показали, що всі шість GEF-доменів, наявних у вищезазначеному комплексі, доступні і взаємодіють з фактором eEF1A2, тож склад комплексу eEF1H було визначено як eEF1B $(\alpha\beta\gamma)_3/6 \times$ eEF1A2.

Використовуючи методи молекулярного докінгу, ми вперше побудували атомарну модель комплексу eEF1B, в якій молекула eEF1B γ є структурним елементом, що з'єднує субодиниці eEF1B α та eEF1B β , а остання, в свою чергу, також виконує структурну функцію, забезпечуючи тримеризацію комплексу. При цьому C-кінцеві GEF-домени субодиниці eEF1B α та eEF1B β рознесені у просторі відносно мотиву типу «лейцинова застібка», що дозволяє вільний доступ молекулам eEF1A.

Наявність одразу шести GEF-доменів в одному комплексі є новим випадком своєрідної компартменталізації компонентів апарату трансляції у

вищих еукаріот, що може забезпечити ефективне відновлення ГТФ-зв'язаної форми eEF1A, необхідної для білкового синтезу.

Практичне значення одержаних результатів

Представлені результати сприяють більш глибокому розумінню структурної організації апарату трансляції людини, характерною відмінністю якого є компартменталізація його компонентів для забезпечення високої ефективності цього процесу.

Дослідження організації і функціонування комплексу елонгації трансляції eEF1B в нормі та при деяких патологічних станах, таких як онкогенез, може бути перспективним в плані розробки 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 дисертаційної роботи можуть використовуватись в навчальних курсах та спецкурсах по загальній темі «Біосинтез білка» для студентів інституту біології НКДУ ім. Тараса Шевченка чи інших 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 безпосередньої участі здобувача.

Векторні конструкції повнорозмірних субодиниць eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ , а також препарати білків eEF1A1 та eEF1A2, виділені з тканин кроля, були люб'язно надані к.б.н. Шалаком В.Ф. Автор особисто виконала

експериментальні дослідження з клонування, експресії та очищення вкорочених форм білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ , а також синтез та препаративне очищення повнорозмірних білків eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ ; визначення молекулярної маси вищезазначених білків за допомогою методу гель-фільтрації; експерименти з кінетики обміну [H^3]ГДФ/ГДФ субодиницями eEF1B α , eEF1B β та їхніми вкороченими формами на факторах eEF1A1 та eEF1A2; виконала гель-електрофорези в нативних умовах для визначення взаємодії eEF1B α та його вкороченої форми з eEF1A1 та eEF1A2 та взаємодії eEF1A2 з субодиницею eEF1B β та комплексом eEF1B $\alpha\beta\gamma$; провела інтерпретацію результатів та статистичну обробку даних.

Експерименти з аналітичного ультрацентрифугування білків та обробка даних були виконані спільно з науковим керівником к.б.н. Шалаком В. Ф. Автор також вдячна за допомогу в організації експериментів та інтерпретації результатів аналітичного ультрацентрифугування доктору Щепановському Р. Г. (Міжнародний інститут молекулярної та клітинної біології, Варшава, Польща). Вимірювання КД та флуоресценції N-кінцевого домену eEF1B β виконувалась спільно з науковим керівником к.б.н. Шалаком В. Ф. Автор також вдячна за допомогу у вимірюванні КД Вівчарик М. і Ніколаєву Р. за допомогу у вимірюванні флуоресценції (Група молекулярної фармакології відділу ензимології білкового синтезу). Робота з визначення динаміки Н/Д обміну з наступним мас-спектрометричним аналізом була виконана за участі Фатальської А. (Інститут біохімії та біофізики, Польської Академії Наук, Варшава, Польща). Автор вдячна за допомогу в інтерпретації результатів мас-спектрометрії 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 моделюванні білків і білкових комплексів, описаних в цій роботі.

Всім науковцям, студентам, які проходили практику під час виконання спільних експериментів, здобувачка щиро вдячна за участь і допомогу.

Автор виловлює слова щирої подяки безпосередньому керівнику роботи, к.б.н. Шалаку В.Ф. та завідувачу відділу структурної і функціональної протеоміки професору Негруцькому В.С. за слушні поради, рекомендації та зауваження під час виконання дисертаційної роботи. Отримані результати обговорено та оприлюднено у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації

Основні результати дослідження та окремі положення дисертації були апробовані на засіданнях відділу структурної та функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ.

Результати досліджень було представлено та обговорено на таких з'їздах та конференціях:

XII Ukrainian biochemical congress, 30 September-4 October 2019, Ternopil, I International scientific conference for students and young scientists Current chemical problem, 27-29 March 2018, Vinnitsa, 41st FEBS congress, 03-08 September 2016, Ephesus, Turkey, International Conference of the Young Scientists 15 (CYS-2015), 21-25 September, Kyiv, XI Ukrainian biochemical congress, 6-10 October 2014, Kyiv, 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, 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.

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових праць, з них 5 статей у фахових журналах, які входять до наукометричної бази даних Scopus (3 з яких належать також 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 7 тез доповідей у збірниках матеріалів закордонних та

вітчизняних наукових конференцій та з'їздів.

Структура та обсяг роботи

Дисертація складається з анотації, переліку публікацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 203 найменування. Дисертацію викладено на 190 сторінках, вона містить 47 рисунків та 3 таблиці.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Етапи біосинтезу білка у вищих еукаріот

Біосинтез білка, або трансляція, це один з фундаментальних метаболічних процесів, який є невід'ємною частиною життєдіяльності всіх клітин. Під час трансляції інформація, яка закодована в послідовності нуклеотидних триплетів матричної РНК, перекладається в послідовність амінокислотних залишків у молекулі білка (17). Біосинтетична машинерія є досить складною та багатокomпонентною. Вона включає 20 амінокислот, які входять до складу білкових молекул, 20 аміноацил-тРНК синтетаз, які забезпечують високоспецифічне приєднання кожної амінокислоти до відповідної тРНК, рибосоми, низку білкових факторів ініціації, елонгації і термінації трансляції; АТФ, ГТФ і системи ферментів, які відповідають за їх синтез; транспортні та рибосомальні РНК (тРНК та рРНК) та ферменти, які відповідають за їх «дозрівання» та пост-транскрипційні модифікації; матричну РНК (мРНК), а також низку ферментів, які каталізують реакції пост-трансляційних модифікацій синтезованих білків, тощо (1,8,18).

Синтез поліпептидного ланцюга відбувається безпосередньо на рибосомі й умовно поділяється на три етапи: ініціацію, елонгацію та термінацію (17). Повна 80S рибосома еукаріот складається з двох субодиниць: великої – 60S та малої – 40S (19). Суть етапу ініціації полягає в тому, що обидві рибосомні субодиниці мають розташуватись на мРНК таким чином, щоб послідовність ініціаторного кодону опинилась в Р-сайті рибосоми. Для реалізації цього, еукаріоти мають низку білкових факторів ініціації трансляції, скорочено eIF (19,20). Спочатку формується пре-ініціаторний комплекс 40S

субодиниці з факторами eIF1, eIF1A, eIF3 та eIF2, зв'язаним з ініціаторною Met-тРНК_i^{Met}, який має назву 43S (19,21). 5'-нетрансльований регіон еукаріотичних мРНК має кеп (7-^mGppp) і складну вторинну структуру. Для приєднання 43S комплексу до мРНК, остання має бути активованою за участі мультибілкового комплексу факторів ініціації eIF4F. Після взаємодії 43S рибосомного комплексу з eIF4F і посадки на мРНК починається розплітання її вторинної структури і пошук стартового кодону (сканування), котрий, як правило, розташований в контексті послідовності Козак (22–24). Розпізнавання стартового кодону 43S комплексом відбувається завдяки антикодону Met-тРНК_i^{Met} і додатковій участі факторів eIF1 та eIF1A, які переключають 40S субодиницю в положення замкненої з АУГ-кодоном в Р-сайті. Наступним кроком є приєднання 60S субодиниці за участі фактора eIF5B та утворення повної рибосоми. Частина ініціаторних факторів від'єднується вже на цьому етапі, частина ж дисоціює лише коли рибосома починає рухатись далі вздовж мРНК, переходячи до наступного етапу трансляції – елонгації (21).

Перша аміноацил-тРНК, яка потрапляє в А-сайт рибосоми після завершення ініціації, розпочинає етап елонгації або нарощування поліпептидного ланцюга. Цей процес є циклічним та реалізується у вищих еукаріот за участю фактора елонгації трансляції eEF1A, комплексу факторів елонгації eEF1B і фактора елонгації eEF2 (1,2).

Фактор елонгації трансляції eEF1A є ГДФ/ГТФ-зв'язуючим білком, який в своїй активній ГТФ-формі утворює комплекс з аміноацил-тРНК та доставляє останню до А-сайту рибосоми. Якщо має місце комплементарна відповідність антикодону тРНК до кодону мРНК, рибосома індукує гідроліз ГТФ на молекулі eEF1A. Конформація останнього при цьому змінюється, що призводить до його відокремлення від аміноацил-тРНК, яка залишається в А-сайті рибосоми. Таким чином, eEF1A вивільняється в розчин в своїй неактивній ГДФ-зв'язаній конформації і має бути відновленим до eEF1A-ГТФ (1).

Відомо, що заміна ГДФ на ГТФ на eEF1A може відбуватися спонтанно, так як останній має подібну спорідненість до обох нуклеотидів, але цей процес є повільним, тому в клітині існує комплекс факторів eEF1B (рис. 1.1.), який прискорює ГДФ/ГТФ обмін на eEF1A (1,25). eEF1B є гетеромерним комплексом, що складається з трьох субодиниць, а саме eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ (тут і далі в роботі використано номенклатуру, що запропонована В. Мерриком та Дж. Ньюборгом) (4,26). Субодиниці eEF1B α та eEF1B β прискорюють ГДФ/ГТФ-обмін на молекулі eEF1A, тоді як eEF1B γ вважається структурним компонентом комплексу.

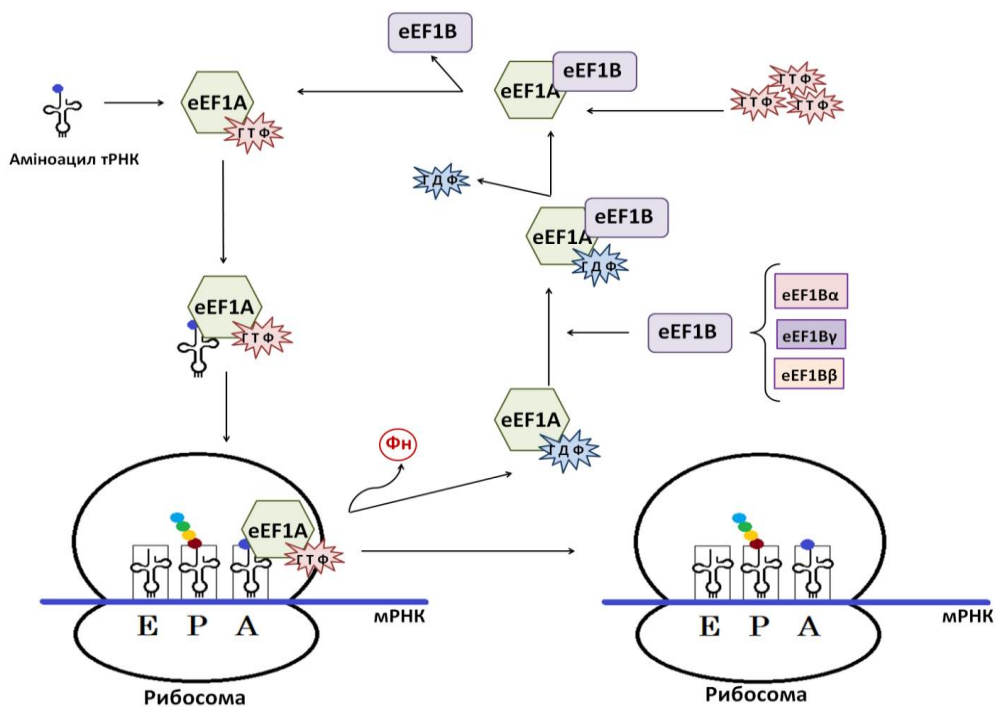


Рис. 1.1. Схематичне зображення функції білкових факторів елонгації трансляції вищих еукаріот на етапі доставки аміноацил-тРНК до А-сайту рибосоми

На наступному етапі пептидил-трансферазний центр рибосоми каталізує утворення пептидного зв'язку між амінокислотними залишками в А та Р-сайтах, що призводить до подовження поліпептидного ланцюга на одну ланку. В результаті реакції утворена пептидил-тРНК опиняється в А-сайті рибосоми. Для звільнення останнього необхідно здійснити її переміщення або

транслокацію до Р-сайту рибосоми. Це досягається шляхом переміщення рибосоми на один триплет вздовж мРНК і цей процес прискорює фактор елонгації трансляції eEF2 (17). Відповідно, деацильована тРНК з Р-сайту переходить до Е-сайту і під час наступного циклу елонгації вивільняється у розчин.

Синтез поліпептидного ланцюга продовжується до досягнення одного зі стоп-кодонів мРНК – UAA, UAG або UGA. Поява одного із стоп-кодонів в А-сайті рибосоми запускає процес термінації трансляції, в якому беруть участь білкові фактори термінації, що забезпечують вивільнення новосинтезованого поліпептиду і дисоціацію рибосоми на субодиниці (1,27). Таким чином, процес синтезу білка на рибосомі завершується.

1.2. Структурна організація і канонічна функція eEF1A

Фактор елонгації трансляції eEF1A являє собою поліпептидний ланцюг довжиною 435-462 амінокислотних залишки (залежно від організму) з молекулярною масою приблизно 50 кДа. Для eEF1A характерна надзвичайна консервативність первинної структури серед еукаріотів. Наприклад, амінокислотні послідовності eEF1A людини і кроля мають 100% ідентичність, загалом серед ссавців близько 99%, а порівняння послідовності людини та дріжджів показує 81% ідентичності. Фактор eEF1A людини представлений двома ізоформами, які кодуються окремими генами, що розташовуються на різних хромосомах. *EEF1A1* локалізований в хромосомі 6q13, тоді як *EEF1A2* – в 20q13 (28). На рівні білків eEF1A1 та eEF1A2 є ідентичними на 92% і гомологічними на 97%. Експресія генів, які кодують вищезазначені білки є тканино-специфічною. Зміна експресії генів обох ізоформ відбувається в період постнатального розвитку (29). Саме тоді замість *EEF1A1* в нейронах, міоцитах та кардіоміоцитах починає експресуватись *EEF1A2* (30). У ссавців в

нормі ці форми експресуються взаємовиключно, але відомо, що при певних умовах, як то пошкодження м'язів (31) або канцерогенез (32), може відбуватися ко-експресія генів обох ізоформ. Молекулярні механізми регуляції тканино-специфічної експресії генів, які кодують фактори eEF1A1 та eEF1A2 наразі невідомі.

Як було зазначено вище, основною або канонічною функцією обох ізоформ eEF1A є доставка аміноацил-тРНК до А-сайту рибосом (1). Деталі цього процесу було вивчено на факторі EF-Tu, який є бактеріальним гомологом eEF1A, із застосуванням широкого спектру методів. Було отримано кристалічні структури EF-Tu у комплексі з ГДФ, ГДФНФ (аналог ГТФ, який не піддається гідролізу), а також аміноацил-тРНК (33–35). Окрім цього, кристали з високою роздільною здатністю фактора елонгації архебактерій (aEF1A) також вдалось отримати для його ГДФ-зв'язаної форми і ГТФ-зв'язаної форми у комплексі з білком Pelota (36–38). Механізм EF-Tu опосередкованого зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом рибосоми було вивчено в деталях з використанням рентген-структурного аналізу і криоелектронної мікроскопії високої роздільної здатності (39,40). Було показано, що зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом є багатостадійним процесом, який включає: початкове зв'язування потрійного комплексу; розпізнавання кодону; закріплення антикодонового домену на 30S субодиниці, тоді як акцепторне стебло залишається у комплексі з EF-Tu; зміна конформації потрійного комплексу, яка призводить до індукції ГТФ-азної активності на EF-Tu; дисоціація комплексу EF-Tu з аміноацил-тРНК і остаточна акомодация останньої в А-сайті рибосоми з встановленням контактів акцепторного стебла з 50S субодиницею (17).

Нещодавно етап eEF1A опосередкованого зв'язування аміноацил-тРНК з А-сайтом рибосоми у вищих еукаріот було також досліджено з використанням криоелектронної мікроскопії високої роздільної здатності (41). Вважалось, що механізм зв'язування є подібним для прокариот і еукаріот, беручи до уваги досить високу структурну консервативність рибосом і

білкових факторів елонгації трансляції. Однак, при детальному структурному аналізі було виявлено суттєві відмінності у роботі декодуючого центру 80S рибосом, зокрема, у процесі розпізнавання кодону мРНК антикодоном аміноацил-тРНК, відбувається ротаційний рух малої рибосомної субодиниці навколо її довгої осі. Такі конформаційні перебудови в роботі 80S рибосоми в процесі селекції аміноацил-тРНК є унікальними для вищих еукаріот (41).

На відміну від EF-Tu, кристалічну структуру eEF1A вищих еукаріот вдалося отримати лише для його ГДФ-зв'язаної форми (42). Загалом, структурна організація eEF1A вищих еукаріот є подібною до такої бактеріального фактора елонгації. В структурі eEF1A також вирізняють три домени: перший домен, який зв'язує нуклеотид (амінокислотні залишки 1-234), має топологію подібну до укладки Росмана, другий та третій (залишки 241-328 та 337-445, відповідно) – складаються виключно з β -листоків, які утворюють β -циліндри. Перший та другий домени з'єднані за допомогою гнучкої лінкерної ділянки та розташовані таким чином, що не утворюють між собою контактів (рис. 1.2.). Другий та третій домени з'єднані між собою коротким лінкером, але також не контактують між собою. На відміну, третій домен взаємодіє з двома α -спіральними ділянками домену один, що призводить до утворення певної компактної конформації молекули eEF1A2 (42).

В процесі виконання своєї канонічної функції EF-Tu і eEF1A циклічно опиняються у ГТФ або ГДФ конформації (рис. 1.1.). Після дисоціації з рибосоми обидва фактори елонгації є зв'язаними з ГДФ. Заміна ГДФ на ГТФ на EF-Tu не може бути спонтанним процесом, так як його спорідненість до ГДФ є приблизно в 100 раз вищою ніж до ГТФ (43–45). Заміну ГДФ на ГТФ опосередковує фактор елонгації EF-Ts, який зв'язується з EF-Tu-ГДФ і прискорює дисоціацію нуклеотиду (2,33). У вищих еукаріот, заміну ГДФ на ГТФ на eEF1A здійснює комплекс eEF1B, до складу якого входять фактори обміну нуклеотиду eEF1B α та eEF1B β (3).

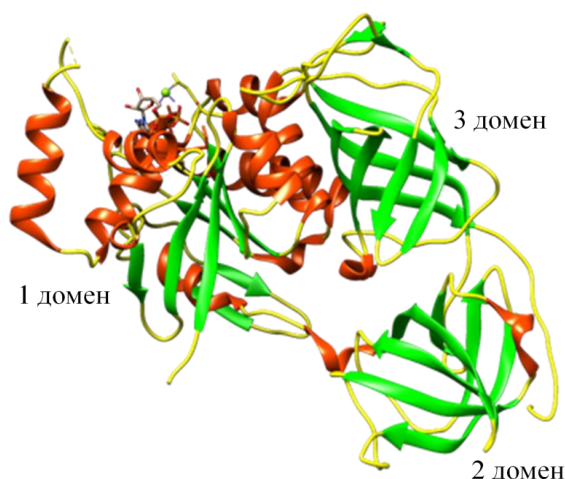


Рис. 1.2. Структура eEF1A2 кроля у ГДФ-зв'язаній формі (PDB номер 4C0S). Червоним позначені α -спіралі, зеленим β -листки, жовтим повороти та неструктуровані ділянки. Молекула ГДФ є зв'язаною з першим доменом білка. Іон Mg^{2+} показаний зеленою кулькою (42)

EF-Tu і eEF1A вищих еукаріот мають досить високий ступінь гомології амінокислотних послідовностей (близько 33%) і подібну доменну організацію (42). Проте варто зазначити, що деякі механістичні аспекти виконання канонічної функції обома факторами можуть різнитися. Так відомо, що бактеріальний EF-Tu не здатен компенсувати відсутність eEF1A в клітинах еукаріот, що було пояснено його неспроможністю доставляти аміноацил-тРНК в А-сайт рибосоми (46). Враховуючи відкриті нещодавно унікальні для вищих еукаріот конформаційні перебудови 80S рибосоми в процесі eEF1A-опосередкованої селекції аміноацил-тРНК (41), таке пояснення видається найбільш ймовірним.

1.3. Неканонічні функції eEF1A

З часом, накопичення експериментальних даних про eEF1A розкрило його надзвичайну мультифункціональність. Окрім участі в біосинтезі білка, він задіяний у виконанні цілого ряду неканонічних функцій (47). Найбільш

поширеною з них є участь eEF1A у реорганізації актинового і тубулінового цитоскелетів (48–51). Також було показано, що фактор eEF1A може брати участь не тільки у синтезі, а й у розподілі біомолекул в середині клітини (52). Так, у комплексі з експортином 5 він бере участь у транспорті тРНК з ядра до цитоплазми *regener*(53,54). Більше того, було показано, що eEF1A є складовою частиною протеасом-залежної системи деградації деяких білків (55). Цікаво, що фактор, який працює як човник у процесі трансляції, також проявляє шапероноподібні властивості по відношенню до низки аміноацил-тРНК синтетаз (56). Не виключено, що вищезгадана властивість eEF1A є необхідною для модуляції активності деяких представників цих ферментів і, як наслідок, оптимізації кількості аміноацил-тРНК в процесі білкового синтезу.

eEF1A, як компонент трансляційного апарату, виконує свої канонічні функції в цитоплазмі клітини, тож не дивно, що більшість неканонічних функцій також реалізуються там. Але, незважаючи на це, існує ряд даних про ядерну локалізацію eEF1A. Так відома низка робіт, де було виявлено локалізацію eEF1A в ядрах ракових клітин (57,58) та ядерцях міобластів (59). Функціональна роль такої локалізації є нерозкритою до цього часу.

Відомо, що дія вірусної інфекції спрямована не тільки на процес транскрипції, але й на процес трансляції клітини-хазяїна. Фактор eEF1A не опинився осторонь від дії деяких вірусів. Було виявлено, що eEF1A може бути залучений до процесу реплікації вірусу тютюнової мозаїки, вірусу західного Нілу та томбусвірусу (60,61), а також відіграє важливу роль при збиранні вірусних часток ВІЛ та коронавірусу (62).

eEF1A також пов'язують з розвитком низки хвороб, таких як хвороба Паркінсона через його здатність взаємодіяти з кіназою LRRK2 та знижувати її активність (63). Мутантні білки MID1, що характерні для пацієнтів синдромом Опитца, втрачають здатність зв'язуватись з eEF1A, що свідчить про певну роль фактора елонгації в розвитку цього захворювання (64). Підвищений рівень антитіл проти eEF1A було виявлено у пацієнтів з синдромом Фелті (65).

Також eEF1A бере участь в реакціях оксидативного стресу в клітині. Зокрема, було показано підвищення експресії eEF1A в клітинах жирової тканини за умов гіпоксії та його опосередкований вплив на ліпотоксичність, викликану оксидативним стресом (66–68).

Існуюча інформація щодо неканонічних функцій саме другої ізоформи eEF1A стосується переважно онкогенного ефекту при її надекспресії в невласливих для цього білка тканинах (69–72). Так, наявність експресії eEF1A2 було підтверджено у випадках карциноми молочної залози (70,73), підшлункової залози (72), яєчників (32), легень (71,74), печінки і шлунку (75,76). Окрім цього, eEF1A2 бере участь і в інших патологічних процесах, таких як нейродегенеративні захворювання (77). Так, делеція промоторного регіону разом з першим екзоном eEF1A2 у мишей призводить до неврологічних дефектів, м'язової атрофії та порушення імунітету (78,79). На цей час відома також низка мутацій eEF1A2, що призводять до тяжких порушень у людини. Було показано, що гомозиготна місенс мутація p.R333L в eEF1A2 є критичною для нормального розвитку людини, зокрема, призводить до неврологічних порушень та дефектів у розвитку скелетних і серцевих м'язів (80). Мутації p.G70S, p.D91N, p.F98L, p.E122K, p.D252H, p.R423C в eEF1A2 були виявлені у пацієнтів з важкою розумовою відсталістю, аутистичною поведінкою, гіпотонією при народженні, епілепсією та прогресуючою мікроенцефалією (81–83). Отже, подальше дослідження неканонічних функцій eEF1A є вкрай важливим для розуміння молекулярних механізмів розвитку певних генетичних патологій, пов'язаних з мутаціями в цьому білку.

1.4. Відомості про структуру і функцію факторів елонгації трансляції, які належать до групи eEF1B вищих еукаріот

Як вже було зазначено раніше, комплекс факторів елонгації трансляції eEF1B, відповідає за відновлення активної ГТФ-зв'язаної форми eEF1A,

прискорюючи обмін ГДФ на ГТФ. У нижчих еукаріот, зокрема дріжджів, комплекс складається лише з двох субодиниць, eEF1B α і eEF1B γ (Рис. 1.3.), перша з яких є функціональною, а друга виконує структурну роль. У вищих еукаріот до комплексу eEF1B входить ще одна субодиниця eEF1B β , яка також має здатність до ГДФ/ГТФ обміну (26). Вважається, що під час еволюції eEF1B β могла утворитися шляхом дуплікації частини гену eEF1B α (26).

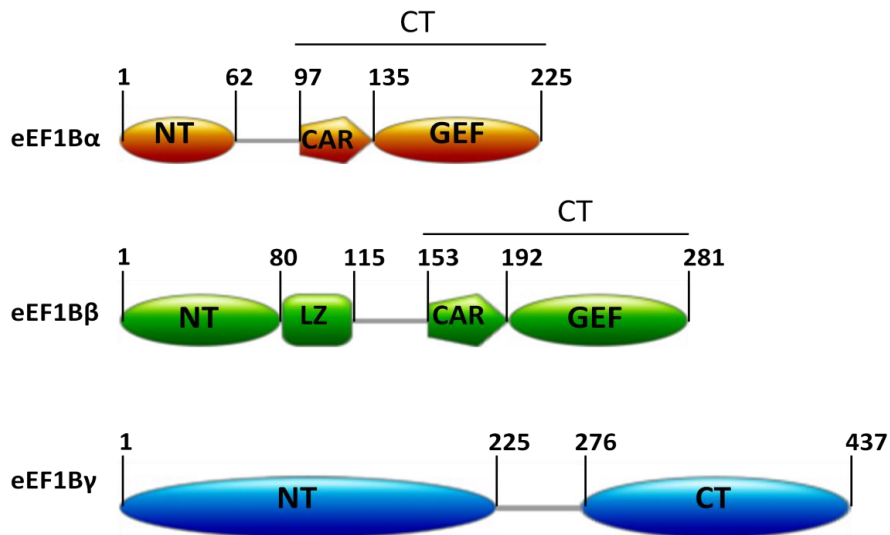


Рис. 1.3. Схематичне зображення доменної організації субодиниць, які входять до комплексу eEF1B. Умовні скорочення: NT – N-кінцевий домен, СТ – С-кінцевий домен, LZ – домен типу «лейцинова застібка», CAR – центральний негативно заряджений регіон, GEF – домен, який відповідає за ГДФ/ГТФ обмін

Для того, щоб обміняти нуклеотид eEF1A-ГДФ зв'язується з eEF1B, що призводить до утворення ще більшого комплексу факторів елонгації, який отримав назву eEF1H або важкої (heavy) форми факторів елонгації трансляції 1 (84). Окрім цього, в клітинах вищих еукаріот існує унікальне надмолекулярне утворення, а саме стабільний комплекс між валіл-тРНК синтетазою (ValRS) і eEF1B – ValRS-eEF1B (13,85). В межах цього комплексу відбувається передача продукту реакції аміноацілювання (валіл-тРНК) від

ValRS до eEF1A-ГТФ з утворенням потрійного комплексу валіл-тРНК-eEF1A-ГТФ (7).

На сьогоднішній день просторові структури повнорозмірних субодиниць, які входять до комплексу eEF1B, залишаються невідомими, окрім структури окремих доменів цих білків (10,85–89). Просторова організація всього комплексу також залишається невідомою. Більше того, немає відповіді на питання, чому у вищих еукаріот з'являється ще одна субодиниця (eEF1B β), яка містить структурно ідентичний до eEF1B α GEF-домен і який виконує таку ж саму функцію (19,90). До цього часу також незрозумілим є той факт, що з 20 аміноацил-тРНК синтетаз тільки валіл-тРНК синтетаза утворює стабільний комплекс з eEF1B. Питання, яким чином цей фермент взаємодіє з eEF1B і яке це має функціональне значення для метаболізму клітини, залишаються без відповіді і потребують подальших досліджень.

1.4.1. Структурно-функціональні властивості eEF1B α . Субодиниця eEF1B α є найменшою в комплексі eEF1B і має молекулярну масу близько 25 кДа. Вона також має високу консервативність первинної послідовності серед представників царства еукаріот (3,91). В структурі eEF1B α виділяють два домени, позначених як N- та C-кінцевий, які з'єднані між собою низькоконсервативним лінкерним регіоном (рис. 1.3.), що переважно складається з заряджених амінокислотних залишків (3).

N-кінцевий домен цього білка грає структурну роль – він відповідає за взаємодію з N-кінцевим доменом eEF1B γ (13,92–94). Він має значно нижчу гомологію первинної послідовності між різними організмами, ніж C-кінцевий домен (3,91). Нещодавно, за допомогою методу рентген-структурного аналізу, було встановлено його просторову структуру (амінокислотні залишки 1-88) у комплексі з N-кінцевим доменом eEF1B γ . Структуру цього комплексу було депоновано до банку даних PDB DataBase під номером 5DQS, але до цього часу не опубліковано. N-кінцевий домен eEF1B α складається з чотирьох α -

спіральних ділянок (амінокислотні залишки 8-19, 31-42, 49-66 та 75-79), з'єднаних між собою петлями.

С-кінцевий домен eEF1В α включає в себе CAR-домен та GEF-домен (89). Саме останній виконує функцію обміну ГДФ на ГТФ на молекулі eEF1A (13,93–96). Структуру GEF-домену eEF1В α людини (амінокислотні залишки 135-224) було розшифровано за допомогою ЯМР аналізу (97). Він є мономером видовженої форми зі співвідношенням ширина/довжина 0,5 та має у своєму складі 4 β -листка (амінокислотні залишки 138-147, 170-178, 183-189 та 213-223), та дві α -спіралі (амінокислотні залишки 155-163 та 199-207).

Механізм eEF1В α -опосередкованого обміну нуклеотиду на eEF1A було спочатку досліджено для дріжджів за допомогою рентген-структурного аналізу комплексу С-кінцевого домену eEF1В α з eEF1A (85,98). Донедавна вважалося, що важливу роль в утриманні молекули ГДФ на eEF1A грає іон Mg^{2+} , який координує контакти eEF1A з ГДФ. При утворенні комплексу дріжджового eEF1A з С-кінцевим доменом eEF1В α було показано, що лізин 205 останнього занурюється в сайт зв'язування ГДФ на eEF1A (рис. 1.4.) і, дестабілізуючи іон Mg^{2+} , сприяє вивільненню ГДФ з білка (2,85,98,99). Після цього eEF1A може зв'язати молекулу ГТФ, яка є в надлишку в цитоплазмі клітини (100).

Однак виявилось, що на відміну від нижчих еукаріот, у вищих еукаріот іон Mg^{2+} грає значно меншу роль у процесі обміну нуклеотиду на молекулі eEF1A. Експерименти з eEF1В α вищих еукаріот показали, що мутація залишку лізину, який є аналогом лізину 205 дріжджового фактора, призводила до зниження швидкості обміну нуклеотиду на eEF1A лише в 2 рази, що свідчить про певну різницю в механізмах обміну нуклеотиду у нижчих і вищих еукаріот (42). В зв'язку з цим, було запропоновано іншу гіпотезу механізму ГДФ/ГТФ обміну у вищих еукаріот, відповідно до якого дисоціація ГДФ відбувається виключно в наслідок конформаційних перебудов фактора eEF1A, викликаних взаємодією з eEF1В α (42,101). При цьому передбачається, що С-кінцевий домен eEF1В α , зв'язуючись з молекулою eEF1A, руйнує контакти між першим

та третім доменами останнього, що призводить до конформаційних змін в активному центрі першого домену, який зрештою втрачає афінність до ГДФ (42,85,98).

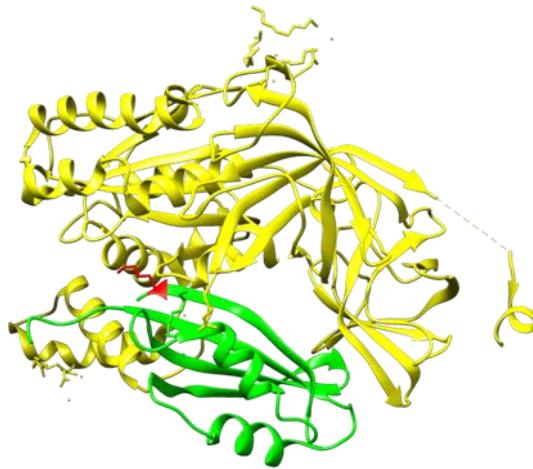


Рис. 1.4. Структура комплексу дріжджового eEF1A з N-кінцевим доменом eEF1B α , PDB номер 5O8W. Жовтим кольором позначено eEF1A, зеленим – N-кінцевий домен eEF1B α . Лізин 205 на структурі eEF1B α позначений червоним кольором (98)

Раніше було повідомлено, що на відміну від eEF1A1, eEF1A2 має слабку спорідненість до eEF1B α та eEF1B β (13). Однак, ці висновки не знайшли подальшого експериментального підтвердження. Навпаки, було показано, що eEF1A2 взаємодіє з eEF1B α *in vitro* (42) і колокалізується *in vivo* (14). Отже, обидві ізоформи eEF1A1 і eEF1A2 мають спільні фактори обміну нуклеотиду.

Як було зазначено вище, GEF-домен eEF1B α є необхідним і достатнім для прискорення ГДФ/ГТФ обміну на eEF1A (93,94,96), тоді як його N-кінцевий домен взаємодіє з N-кінцевим доменом eEF1B γ , що призводить до утворення дуже міцного комплексу між ними (5,102). Цікавим також є той факт, що активність eEF1B α збільшується в 2-4 рази при утворенні комплексу з eEF1B γ в порівнянні з його активністю в індивідуальному стані (5,6,102). Природа цього феномену залишалась не з'ясованою. Але зважаючи на те, що eEF1B γ впливає на активність C-кінцевого домену eEF1B α через взаємодію з його N-кінцевим доменом, ми висунули припущення, що останній певним

чином може впливати на процес обміну гуанінового нуклеотиду, який здійснює С-кінцевий домен eEF1B α .

1.4.2. Структурно-функціональні властивості eEF1B β . На відміну від прокариот і нижчих еукаріот, вищі еукаріоти мають додатковий фактор, який прискорює ГДФ/ГТФ обмін на eEF1A. Відповідно до номенклатури Меріка і Ньюборга, він має назву eEF1 β (4). Вперше цей білок був виявлений в ооцитах *Xenopus laevis* і спочатку вважався домішкою при очищенні важкої форми факторів елонгації 1 (103). Пізніше субодиницю eEF1B β , як частину eEF1H, було очищено та охарактеризовано з клітин *Artemia salina*, морського їжака, кроля та людини (90,104–106).

Цей білок має молекулярну масу близько 32 кДа і в його структурі умовно вирізняють кілька доменів (104). С-кінцевий домен eEF1B β показує високу гомологію з С-кінцевим доменом eEF1B α (107). Він має у своєму складі GEF-домен (рис. 1.3.) і виконує функцію обміну нуклеотиду на факторі eEF1A (5,92,104). N-кінцевий домен eEF1B β взаємодіє з N-кінцевим доменом eEF1B γ (13,104).

Структурна організація N-кінцевого фрагменту eEF1B β наразі невідома, але аналіз первинної послідовності свідчить про її унікальність, тому що вона суттєво відрізняється як від eEF1B α так і не є гомологічною будь-яким іншим білкам (105,108). В N-кінцевому фрагменті eEF1B β присутній мотив типу «лейцинова застібка» (амінокислотні залишки 80-115), який містить періодично повторювані залишки лейцину. Такі мотиви мають вторинну структуру у вигляді амфіпатичної α -спіралі з полярними і неполярними амінокислотними залишками, розташованими на її протилежних сторонах вздовж центральної осі (109). Необхідно зауважити, що «лейцинова застібка» eEF1B β є дещо довшою, ніж в інших білках, і нараховує 6 залишків лейцину замість стандартних 4 (90,110). α -спіральні ділянки, які мають класичні мотиви типу «лейцинова застібка», зазвичай асоціюються в димерні суперспіралі, в яких бокові радикали лейцину однієї спіралі розташовані

навпроти бокових радикалів лейцину іншої спіралі, утворюючи інтерфейс димеру (110).

Також відомо, що повнорозмірний eEF1V β здатен до утворення ди- або мультимерів і навіть високомолекулярних агрегатів (5,12,13). У присутності eEF1V γ спектр мультимерів може змінюватись, що свідчить про роль обох субодиниць в утворенні комплексу eEF1V (5,12,13). Було висунуто припущення, що окрім взаємодії з eEF1V γ , eEF1V β також може взаємодіяти з валіл-тРНК синтетазою (3,5,111). Підставою для такого припущення був той факт, що валіл-тРНК синтетаза може входити до комплексу eEF1V тільки при наявності субодиниці eEF1V β (3,5,111). Так у нижчих еукаріот, наприклад дріжджів, які не мають eEF1V β , вона існує в клітині у вільному стані (5,112). Однак не можна виключати і участі субодиниці eEF1V γ у взаємодії з валіл-тРНК синтетазою, адже відомо, що фосфорилування саме цієї субодиниці впливає на синтез багатих на валін білків (86).

Амінокислотна послідовність великого С-кінцевого фрагменту eEF1V β (амінокислотні залишки 153-281) (рис. 1.3.) має високий ступень ідентичності, близько 75%, з послідовністю С-кінцевого фрагменту eEF1V α (амінокислотні залишки 135-225) (3,87,97,107). Просторову структуру eEF1V β (153-281) було отримано методом ЯМР і встановлено, що цей фрагмент складається з компактно-згорнутого GEF-домену і приєднаної до нього через лінкерний регіон α -спіральної ділянки (амінокислотні залишки 153-192), яка отримала назву CAR-домен або «центральний негативно заряджений регіон» (рис. 1.3.) завдяки великій кількості негативно заряджених амінокислотних залишків в її складі (87,89). Зважаючи на те, що послідовність С-кінцевого домену eEF1V β майже ідентична послідовності С-кінцевого домену eEF1V α , було зроблено припущення, що CAR домен є також присутнім у структурі останнього з 97 по 136 амінокислотні залишки (рис. 1.3.) (87,89). Було показано, що CAR є необхідним для взаємодії з білком ТСТР (трансляційно контрольований білок пухлини), експресія якого збільшується при злоякісній трансформації клітини (113).

Особливості функціонування субодиниці eEF1B β в процесі білкового синтезу наразі вивчені дуже слабо. Його властивості як GEF-білка обговорювались переважно спираючись на високу ідентичність первинної послідовності та третинної структури GEF-доменів eEF1B β та eEF1B α (86,87). Прямих експериментів щодо обміну ГДФ на ГТФ на факторі eEF1A з цією субодиницею проведено надзвичайно мало. Так Бек із співавторами спостерігали прискорення швидкості обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A у присутності eEF1B β лише протягом короткого проміжку часу, після чого активність eEF1B β значно знижувалась. Автори пояснювали цей феномен можливою олігомеризацією або навіть агрегуванням eEF1B β *in vitro*, що призводило до зменшення його ефективної концентрації в розчині (97). Пізніше, в експериментах з рекомбінантним eEF1B β , його активність в обміні гуанінового нуклеотиду була показана більш переконливо. Більш того, цікавим виявився той факт, що ТСТР інгібує eEF1B β -опосередкований обмін нуклеотиду на факторі eEF1A, але не впливає на швидкість обміну у присутності комплексу eEF1B $\alpha\gamma$, що може свідчити про різницю у взаємодії двох факторів обміну нуклеотиду з eEF1A (113).

Було показано, що субодиниця eEF1B β , так само як і eEF1B α , прискорювала синтез поліфенілаланіну в реконструйованій системі трансляції *in vitro*. При цьому варто зауважити, що потрійний комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma$ робив цей процес майже в 10 разів швидшим, ніж будь яка субодиниця окремо, що свідчило про підсилюючу дію однієї субодиниці на іншу у складі комплексу (101). Цей висновок також підкріплюється тим фактом, що існує позитивний вплив eEF1B γ на активність eEF1B α при утворенні комплексу між ними (5,6,102). Однак, подібного впливу на субодиницю eEF1B β показано не було (97). Крім цього, було продемонстровано, що безпосередньої взаємодії між eEF1B α та eEF1B β немає (13). Таким чином, причина більш ефективної роботи eEF1B $\alpha\beta\gamma$ комплексу в безклітинній системі трансляції в порівнянні з його окремими компонентами залишається не до кінця зрозумілою.

Варто зазначити, що eEF1B β відомий як мішень при вірусних інфекціях. При зараженні, впливаючи на активність цього білка, деякі віруси пригнічують трансляцію білків клітини-хазяїна. При цьому ефективність синтезу вірусних білків не змінюється або навіть покращується. Так, при зараженні вірусом простого герпесу 1, білок ICP0 зв'язується з eEF1B β , що негативно впливає на синтез білків в лізатах ретикулоцитів кроля, а також до подібного ефекту призводить взаємодія eEF1B β з другим екзоном мРНК, що кодує білок Tat вірусу імунодефіциту людини 1 (114,115). Відомо, що частина вірусів (вірус герпесу HSV-1, цитомегаловірус CMV, вірус Епштейна-Бара EBV) впливають на функціонування eEF1B β шляхом фосфорилування його СК2 сайту власними кіназами (116–118). Також цікавим є факт, що eEF1B β був визначений як новий інгібітор синтезу мРНК вірусу грипу, котрий діє шляхом перешкоджання ядерному імпорту вірусних нуклеопротеїнів та PA-PB1 гетеродимерів (119).

1.4.3. Структурні властивості eEF1B γ . eEF1B γ – це білок з молекулярною масою близько 52 кДа, що складається з двох доменів (рис. 3.), з'єднаних за допомогою багатої на лізин ділянки (86,88,120). Вперше амінокислотну послідовність цього білка було визначено для *Artemia salina*, пізніше для *Xenopus laevis*, а згодом і для людини (120–123). Відомо, що гени, які кодують цю субодиницю, відсутні в прокариот, проте наявні в еукаріотичних організмів, починаючи з одноклітинних і закінчуючи багатоклітинними (3).

C-кінцевий домен eEF1B γ має більший ступінь консервативності амінокислотної послідовності ніж N-кінцевий (близько 57 % між різними видами) та проявляє високу стійкість до протеолізу (88). Наразі функціональна значимість цієї частини білка невідома. Цей домен (амінокислотні залишки 276-437) не належить до жодної з відомих структурних родин білків та існує у розчині як мономер. За даними ЯМР аналізу він складається з п'яти

антипаралельних β -листоків, оточених п'ятьма α -спіралями та має форму ввігнутої лінзи (88,124).

Натомість N-кінцевий домен eEF1V γ є гомологічним до Θ -класу родини глутатіон-S трансфераз (GST) (125) і має з ними велику структурну схожість, а також здатен зв'язуватись з глутатіон-сефарозою (92), проте його каталітична (трансферазна) активність є досить низькою (126). Цікавим також є факт, що повнорозмірний eEF1V γ такої активності взагалі не виявляє (127,128). Подібно до інших ферментів родини GST, структура N-кінцевого домену eEF1V γ дріжджів (амінокислотні залишки 1-219) складається з двох субдоменів (рис. 1.5.). Перший субдомен (амінокислотні залишки 1-74) представляє собою центральну складку з чотирьох β -листоків, з однієї сторони оточену двома паралельними α -спіралями α_1 та α_3 , а з іншої, відкритої до розчинника сторони, однією α -спіраллю α_2 . Лінкерна ділянка у формі α -спіралі з'єднує перший субдомен з другим (амінокислотні залишки 90-219), який складається з п'яти α -спіралей. N-кінцеві домени eEF1V γ дріжджів мають здатність симетрично димеризуватись за рахунок 4-ї β -складки і 3-ї α -спіралі першого субдомену одного білка з 4-ю α -спіраллю другого субдомену іншого білка. Ця взаємодія опосередковується полярними і гідрофобними боковими радикалами, та є більш сильною в порівнянні з відомими димерами GST інших класів (86). Структуру комплексу N-кінцевих доменів eEF1V α та eEF1V γ людини у було оприлюднено базі даних PDB DataBase під номером 5DQS без публікації експериментальної статті. Згідно з нею N-кінцевий домен eEF1V γ людини складається переважно з α -спіралей і одного β -листка, утвореного трьома складками, і має високу структурну подібність до N-кінцевого домену eEF1V γ дріжджів (рис. 1.5.), за виключенням будови β -листка, який у дріжджів, на відміну від людини, налічує чотири складки (86).

eEF1V γ дріжджів утворює стійкий комплекс тільки з одним білком-партнером, а саме з eEF1V α , тоді як eEF1V γ вищих еукаріот взаємодіє з двома білками – eEF1V α та eEF1V β (94,102). Картування сайтів взаємодії eEF1V γ вищих еукаріот з білками-партнерами в eEF1V комплексі було проведено за

допомогою методів обмеженого трипсинолізу *in vitro* та подвійних гібридів в клітинах дріжджів, але амінокислотних залишків, які безпосередньо відповідають за контакти між субодинами, визначено не було (13,92,129). Вдалося встановити, що для eEF1B α та eEF1B β є окремі сайти взаємодії на eEF1B γ , так як останній може зв'язати обидві субодинами одночасно, але не дві однакові (13). Окрім цього відомо, що eEF1B γ взаємодіє з різною силою з eEF1B α та eEF1B β , про що свідчать експерименти по дисоціації комплексу ValRS-eEF1H (104). При хроматографії на гідроксилапатиті у присутності 0,5M NaSCN, цей комплекс дисоціює з вивільненням окремо eEF1A, валіл-тРНК синтетази, eEF1B β та стійкого комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ (104). Останній, в свою чергу, було розділено на окремі субодинами тільки в денатуруючих умовах у присутності 7M сечовини (92,130).

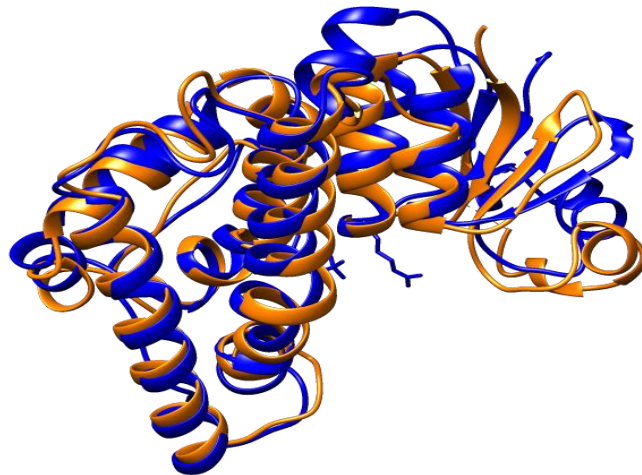


Рис. 1.5. Суперпозиція просторових структур N-кінцевих доменів eEF1B γ дріжджів (PDB номер 1NHU, синій)(86) та людини (PDB номер 5DQS, помаранчевий)

1.5. Неканонічні функції субодинами комплексу eEF1B

Окрім виконання своїх канонічних функцій, субодинами комплексу eEF1B можуть бути залученими і до інших клітинних процесів.

Окрім структурної ролі eEF1V γ в організації комплексу eEF1B, було показано, що цей білок взаємодіє з тубуліном, що може свідчити про його здатність приєднуватись до мембран та/або цитоскелету, виконуючи роль своєрідного якоря для eEF1B (102). Також eEF1V γ специфічно взаємодіє з проміжними кератиновими філаментами, беручи участь в регуляції синтезу білка в епітеліальних клітинах (131). eEF1V γ також проявив себе як РНК-зв'язувальний білок, показавши здатність взаємодіяти з 3'-нетрансльованою ділянкою мРНК одного з білків цитоскелету – віментину (132); з мРНК білка Che-1, який взаємодіє з РНК полімеразою II, та мРНК супресора пухлин p53 (133). Показано також, що eEF1V γ може активувати NF- κ B сигнальний шлях, зв'язуючись з мітохондріальним білком антивірусного сигналіну MAVS, що свідчить про його участь у відповіді на вірусну інфекцію (134). Також не виключено, що eEF1V γ може бути залученим до регуляції білкового синтезу, адже відомо, що він є субстратом для протеїнкінази CDK1/циклін B (103,135), а його фосфорилування, як вже згадувалось раніше, є необхідним для ефективного синтезу багатих на валін білків (86).

Інформації щодо можливої неканонічної функції eEF1B α на сьогоднішній день надзвичайно мало. Проте цей білок має сайт фосфорилування СК2 кіназою в області CAR домену (S106 у послідовності людини) (129,136,137), функціональне значення якого до цього часу є незрозумілим (104,136). Зважаючи на високу гомологію С-кінцевих доменів eEF1B α та eEF1B β не дивно, що останній також має подібний сайт фосфорилування СК2 кіназою (S125 у послідовності ембріону морського їжака) (11,138). Аналогічно до eEF1B α , інформації щодо значення фосфорилування по цьому сайту eEF1B β досі немає.

Відомо, що при певних патологічних процесах, таких як канцерогенез, може відбуватися зміна рівня експресії субодиниць комплексу eEF1B (57,139). Так, наприклад, було показано надекспресію eEF1V γ у клітинах карциноми шлунку і стравоходу (140,141). Інформації щодо участі в канцерогенезі eEF1B α небагато, зокрема надекспресію цього білка разом з іншими

субодиницями комплексу, а саме eEF1B β та eEF1B γ , пов'язували з високим метастатичним потенціалом клітин раку простати (PC3M-LN4) (142). З усіх субодиниць комплексу eEF1B, частіше всього при дослідженні пухлин згадується eEF1B β . Надекспресія цього білка була виявлена у низці ракових клітинних ліній, таких як первинна культура клітин карциноми молочної залози, аденокарциноми грудей, раку яєчників, простати, пласкоклітинною карциномою порожнини рота (142–145). Також eEF1B β проявляв онкогенні властивості у випадку Cd²⁺-індукованого онкогенезу (146).

Наведені дані говорять про те, що функціонування субодиниць комплексу eEF1B при патологічних станах знаходиться на початкових етапах дослідження і є далеким від повного розуміння.

1.6. Існуючі моделі комплексів eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H

Визначення структурної організації білків та білкових комплексів є важливим фактором для розуміння їх функцій. Хоч спроби вивчення структурної організації комплексів eEF1B, eEF1H та ValRS-eEF1H проводились досить давно, але дозволили отримати певні результати відповідно до технічних можливостей того часу. Зрозуміло, що одним із перших завдань було встановлення якісного та кількісного складу згаданих вище комплексів, а також яким чином білки, з яких вони складаються, взаємодіють між собою. Щодо якісного складу eEF1H у дослідників спочатку були певні розбіжності, які тим не менш згодом вдалося ліквідувати. На сьогоднішній день відомо, що eEF1H вищих еукаріот налічує чотири білки, з них три субодиниці α , β та γ утворюють стабільний комплекс і належать до групи факторів елонгації трансляції eEF1B. Четвертий білок - це eEF1A, який взаємодіє з α і β субодиницями eEF1B короткотривало для обміну ГДФ на ГТФ (рис. 1.6) (2,3,17). У нижчих еукаріот eEF1H представлений лише трьома білками тому, що eEF1B β є відсутнім в цих організмах (3,23).

Відомо також, що у вищих еукаріот eEF1B утворює стабільний комплекс з валіл-тРНК синтетазою (ValRS-eEF1H). Припускається, що саме eEF1B β є тією субодиницею в комплексі, яка відповідає за зв'язування з цим ферментом (104). Як вже було зазначено вище, при утворенні eEF1B комплексу, N-кінцеві домени eEF1B α і eEF1B β взаємодіють з N-кінцевим доменом eEF1B γ . С-кінцеві домени eEF1B α або eEF1B β зв'язують молекули eEF1A через контакти з його першим і другим доменом (2,3,9).

До цього часу було запропоновано кілька моделей структурної організації комплексів eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H. Найпростішою моделлю eEF1H, була модель факторів дріжджів. Відповідно до неї eEF1B γ існує у вигляді стабільного димеру, який утворює міцний комплекс з двома молекулами eEF1B α , по одній з кожним eEF1B γ . В свою чергу, кожна eEF1B α може зв'язувати по одній молекулі eEF1A. Отже, стехіометрія субодиниць в такому комплексі відповідає співвідношенню 2:2:2 (рис. 1.6.) (104). Відомо також, що димеризація eEF1B γ відбувається через його N-кінцевий GST-подібний домен (86).

Однією з перших у вищих еукаріот була запропонована модель eEF1H з *Artemia salina* (рис. 1.6.), до складу якої входять eEF1A та субодиниці eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ у співвідношенні 2:1:1:1, відповідно. Модель включає 2 молекули фактора eEF1A, кожна з яких через свій С-кінцевий домен взаємодіє з С-кінцевим доменом eEF1B α або eEF1B β . Автори віддають комплекс організуючу роль субодиниці eEF1B γ , яка зв'язує дві субодиниці обміну гуанінового нуклеотиду через їх N-кінцеві домени, таким чином реалізуючи четвертинну організацію eEF1H (10). Пізніше Бек зі співавторами оприлюднили іншу модель комплексу ValRS-eEF1H кроля, яка була створена по результатам експериментів по *in vitro* дисоціації-реконструкції цього комплексу (рис. 1.6.). В цій моделі eEF1B має такий вигляд: eEF1B γ взаємодіє з eEF1B α і eEF1B β , тоді як останній представляє собою стабільний димер завдяки мотиву «лейцинова застібка», який присутній у його структурі. Автори припустили, що валіл-тРНК синтетаза через свій N-кінцевий домен

взаємодіє з eEF1B β . Таким чином, співвідношення всіх компонентів в цій моделі ValRS-eEF1B становить 2:2:2:2 (5). Через наявність чотирьох факторів обміну нуклеотиду (2 eEF1B α та 2 eEF1B β) кількість молекул eEF1A, які можуть увійти до складу ValRS-eEF1H, дорівнює 4. До подібної структурної організації eEF1H людини також прийшли Мансілла зі співавторами, які визначали взаємодії між його компонентами за допомогою системи подвійних гібридів в дріжджах (13).

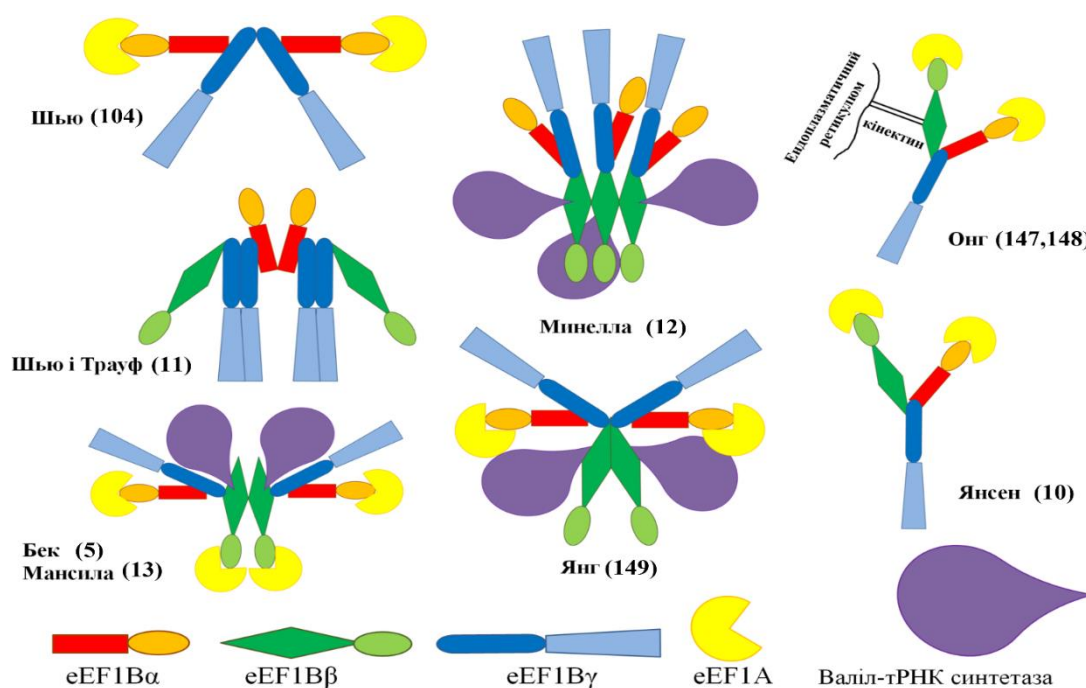


Рис. 1.6. Опубліковані моделі комплексів факторів елонгації трансляції eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H, номер посилання зазначений біля моделі. Фактор eEF1A позначено жовтим, N- і C-кінцеві домени субодиниць eEF1B α (червоний), eEF1B γ (синій) та eEF1B β (зелений) вказані в темних і світлих відтінках, відповідно. Валіл-тРНК синтетаза позначена фіолетовим

Цікаве дослідження щодо структурної організації комплексу eEF1B в клітинах мозку ембріону людини зробили Онг із співавторами. Шляхом вивчення колокалізації *in vivo*, вони показали, що кінектин імобілізує комплекс eEF1B на ендоплазматичному ретикулюмі (ЕПР) завдяки прямій

взаємодії з eEF1B β (рис. 1.6.). За відсутності взаємодії кінектин-eEF1B β , локалізація компонентів апарату трансляції змінювалась від примембранної до розподіленої по всій цитоплазмі (147,148). Однак, ці результати дещо суперечать вище описаним уявленням про роль eEF1B γ як головної субодиниці у зв'язуванні мембранних структур ЕПР.

Більш складну структурну організацію комплексу ValRS-eEF1B з ооцитів *Xenopus* було запропоновано Мінелою та співробітниками (12). Відповідно до цієї моделі, субодиниці eEF1B α і eEF1B β взаємодіють з eEF1B γ , утворюючи найменший або протомерний комплекс eEF1B, який, в свою чергу, тримеризується через субодиницю eEF1B β , а саме завдяки присутньому в його структурі мотиву «лейцинова застібка». Автори зробили таке припущення на основі аналізу послідовності цього мотиву, який виявився удвічі довшим ніж інші відомі на той час мотиви такого типу. Передбачається, що валіл-тРНК синтетаза в цьому комплексі також має взаємодіяти з eEF1B β . Отже, співвідношення всіх факторів елонгації і ферменту в такому комплексі передбачається як 3:3:3:3 (12).

Принципово іншу структурну модель комплексу eEF1B запропонували Шью і Трауф (11), в який вони відвели основну структурну роль субодиниці eEF1B γ . Автори постулюють, що eEF1B γ утворює стабільний димер, а субодиниці eEF1B α та eEF1B β приєднується до різних мономерів eEF1B γ . Дві молекули такого протомерного комплексу надалі димеризуються через взаємодію між eEF1B α субодиницями. Стехіометрія субодиниць в цій моделі відповідає співвідношенню 2:2:2 (11).

Варто зазначити, що у всіх вищезгаданих роботах молекулярну масу рекомбінантних чи очищених з біологічних тканин факторів елонгації трансляції та їх комплексів визначали методом гель-фільтрації, який не дає можливості точно оцінити молекулярну масу для несферичних білків (5,104). На нашу думку, саме це завадило встановленню коректної стехіометрії субодиниць в досліджуваних комплексах і, як результат, призвело до появи кількох суперечливих моделей їх структурної організації.

Архітектуру ValRS-eEF1H комплексу людини досліджували також за допомогою методу кріоелектронної мікроскопії (130,149). Автори дослідження побудували модель, в якій субодиниця eEF1B β відіграє центральну структурну роль, тоді як фактор eEF1A та валіл-тРНК синтетаза розташовані на периферії комплексу. Автори також постулюють, що до комплексу може приєднатися лише дві молекули eEF1A за рахунок взаємодії з двома молекулами eEF1B α , тому що молекули eEF1B β , найімовірніше, є екранованими іншими субодиницями комплексу. Отже, співвідношення eEF1A, eEF1B α , eEF1B β , eEF1B γ та валіл-тРНК синтетази в такому комплексі відповідає 2:2:2:2:2 (149).

Таким чином, до цього часу структурна організація комплексів eEF1B, eEF1H і ValRS-eEF1H залишається достеменно невідомою. Існуючі на цей час моделі є значною мірою спекулятивними. Однією з найголовніших проблем, на нашу думку, на той час була відсутність методів точного визначення молекулярної маси індивідуальних білків, які не належать до категорії сферичних, і їх комплексів. Іншою проблемою була схильність факторів eEF1B β і eEF1B γ до утворення олігомерів *in vitro*, що також ускладнювало інтерпретацію певних експериментальних даних (5,12,102,104). Як було зазначено раніше, просторові структури повнорозмірних субодиниць eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ є невідомим на цей час, однак структури деяких їх окремих доменів все ж таки вдалося отримати (10,85–89). Окрім цього відомо, що N-кінцевий домен eEF1B γ взаємодіє з N-кінцевими доменами eEF1B α і eEF1B β , однак сайтів зв'язування на цих білках визначено не було. Сучасні методи дослідження, такі як аналітичне ультрацентрифугування, сайт-спрямований мутагенез, хромато-маспектрометрія відкривають широкі можливості для отримання більш точної інформації як про окремі білки, так і про їх комплекси. Отже, нашим завданням було застосувати ці методи для детальної характеристики індивідуальних eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ та їх комплексів з метою визначення їх просторової організації.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали та обладнання

В роботі використовували наступне обладнання: центрифуги - 5810R («Eppendorff», Німеччина), Biofuge pico («Heraeus», США), Biofuge fresco («Heraeus», США); рН-метр («Mettler Toledo», Швейцарія); змішувач Vortex («BioSan», Литва); горизонтальний шейкер Mini Rocker MR-1 («BioSan», Литва); ультразвуковий гомогенізатор («BioLogics, Inc.», США); шейкер-інкубатор NB-205 («N-Biotek», Південна Корея) та KS 4000i («ІКА», Німеччина); магнітні мішалки («ІКА», Німеччина); спектрофотометри NanoDrop 2000 та BioMate 5 («Thermo Electron», США); система для фільтрування розчинів («Sartorius», Німеччина); прилад для УФ опромінення агарозного гелю Spectrolinker («Spectronics Corporation», США); ПЛР ампліфікатор 2720 ThermalCycler («Applied Biosystems», США); сцинтиляційний лічильник Tri-Carb 2800TR («Perkin Elmer», США); ваги електронні аналітичні Kern 770 («Kern», Німеччина); система для хроматографічного очищення білків та нуклеїнових кислот високого тиску АКТА FPLC («GE Healthcare», США); хроматографічна система низького тиску, що складається з перистальтичного насосу, оптичного та контролюючого модулів UV-1 та самозаписувачу REC 111 («GE Healthcare», США); хроматографічні колонки: HiTrap Q (1 мл, «GE Healthcare», США), Superose 6 HR 10/30 (24 мл, «GE Healthcare», США) HiLoad 16/600 Superdex 200 (16 × 600 мм, 120 ml, «GE Healthcare», США); система для візуалізації гелів MiniBIS Pro («DNR Bio-Imaging Systems», Ізраїль); нітроцелюлозні фільтри («Sartorius», Німеччина); спектрополяриметр JASCO-810 («JASCO

Corporation», Японія); колонки для хромато-маспектрометрії: пепсинова колонка Porozyme («ABI», США), C18 пре-колонка («ACQUITY VEN C18 VanGuard», США), аналітична колонка із оберненою фазою Acquity UPLCVEN C18 (2.1 × 100 мм, 1.7 μм, «Waters», США); мас-спектрометр YNAPT G2 HDMS («Waters», США); аналітична ультрацентрифуга ProteomeLab XL-I («BeckmanCoulter», США) з аналітичним ротором An-60 Ti, 12 мм двохсекторною затемненою кюветою та шести секторною затемненою кюветою (Eron, «Beckman-Coulter», США).

Матеріали і реактиви, які використовували в роботі: T4-ДНК-лігаза («Thermo Scientific», США); набір ендонуклеаз рестрикції («Thermo Scientific», США); ДНК полімерази – Pfu, DreamTaq, Phusion («Thermo Scientific», США); нефарбований та фарбований маркери молекулярної ваги білків («Thermo Scientific», США); маркер ДНК фрагментів 100 bp plus та 1 kb, X-Gal («Thermo Scientific», США); ізопропіл β-D-1 тіо-галактопіранозид («Thermo Scientific», США), коктейль інгібіторів протеаз «Complete» («Roche», США); гліцин, трис («Amresco», Бельгія); знежирене молоко («Fluka», Німеччина); агароза, додецилсульфат натрію, акриламід («Bio-Rad», США); HEPES, персульфат амонію («Helicon», Росія); BSA («Pierce», США); CaCl₂, β-меркаптоетанол, гліцерин, («Merck», Німеччина); Tween 20, етидій бромід («Sigma», США); KCl, NaCl, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, MgCl₂, дитіотриетол (ДТТ), імідазол, LB середовище («Roth», Німеччина), поживний агар («Фармактив», Україна); диметилсульфоксид (DMSO) («Acros Organic», США); TEMED, EDTA, PMSF, бромфеноловий синій, кумасі R-250 та G-250 («Serva», Німеччина та «Sigma-Aldrich», США); Triton X100 («Amersham», Швеція); набір для очищення плазмідної ДНК міні, міді та максі об'ємів, набір для очищення ДНК з гелю та набір для очищення фрагментів ДНК після ПЛР («Thermo Scientific», США); PreScission протеаза («GE Healthcare», США); антибіотики ампіцилін, канаміцин, хлорамфенікол, тетрациклін (фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), SybrGreen («Sigma-Aldrich»,

США), D₂O (99.8% «Cambridge Isotope Laboratories, Inc», Англія), [³H]ГДФ1500 Ci/mol («GE Healthcare», США).

Решта реактивів були марковані як «чда» або «ос.ч» (Україна). Для приготування розчинів використовували деіонізовану воду.

Стандартні буферні розчини:

ТВЕ буфер: 40 мМ Tris, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA (рН 8.0).

PBS: 150 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1.5 мМ Na₂HPO₄×2H₂O, 1.5 мМ KH₂PO₄, рН 7,4.

Трис-гліциновий електродний буфер для гель-електрофорезу за Лемлі: 25 мМ Трис, 250 мМ гліцин, 0.1 % SDS.

2.2. Плазмідні конструкції та лабораторні штами бактерій

Плазмідні конструкції рGEX6p-1/eEF1B α , рET16b/eEF1B γ та рGEX6p-1/eEF1B β зі вставками кДНК, які кодують білки eEF1B α , eEF1B γ і eEF1B β людини, було надано к.б.н. Шалаком В.Ф. (ІМБГ, Київ).

В роботі було використано комерційний вектор рGEX6p-1 фірми «GE Healthcare» (США) для клонування вкорочених форм субодиниць eEF1B α , eEF1B β , та eEF1B γ . Вектор рET28a(+) («Novagen», США) використовували для клонування деяких вкорочених форм субодиниці eEF1B γ .

Штами *Escherichia coli*, використані в роботі: XL10 Gold («Stratagene», США), BL21 Gold, BL21(DE3)pLysS, Rosetta (DE3) («Invitrogen», США).

2.3. Дизайн вкорочених форм субодиниць комплексу eEF1B

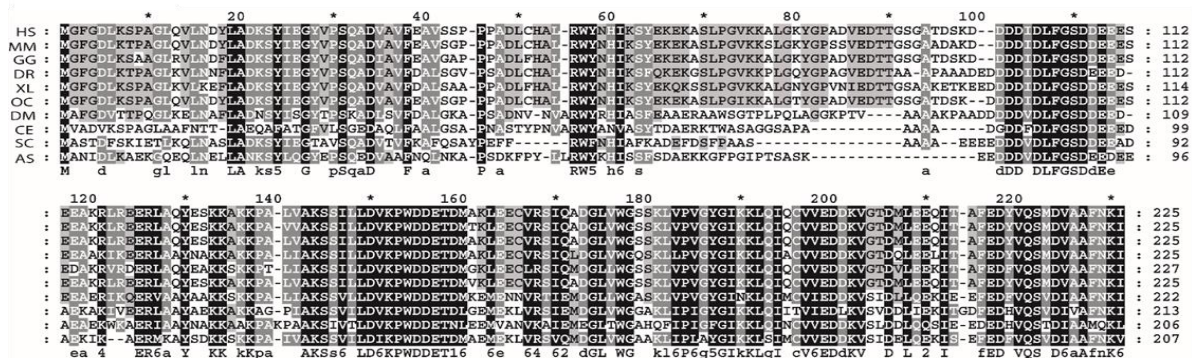
Для створення вкорочених форм субодиниць eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ генно-інженерним способом необхідно, насамперед, окреслити консервативні домени у первинних структурах цих білків. Це було зроблено за допомогою

порівняння амінокислотних послідовностей відповідного білка з різних організмів в програмі ClustalW. Амінокислотні послідовності для кожного з вказаних вище білків були взяті з бази даних GenBank (рис. 2.1.) (Національний центр біотехнологічної інформації, США).

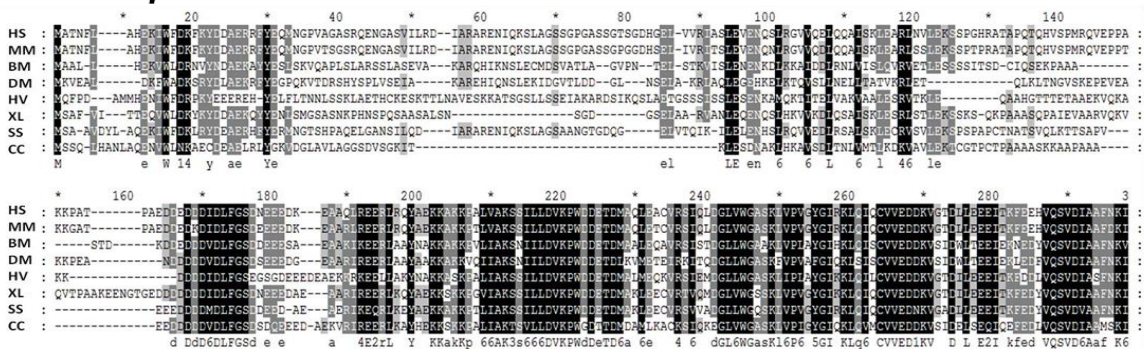
Для субодиниці eEF1В α порівнювали: *Homo sapiens* (NP_066944.1), *Mus musculus* (NP_061266.2), *Gallus gallus* (NP_990232.1), *Danio rerio* (NP_956243.1), *Xenopus laevis* (NP_001084134.1), *Oryctolagus cuniculus* (NP_001075868.1), *Drosophila melanogaster* (AAF57941.3), *Caenorhabditis elegans* (NP_498737.1), *Saccharomyces cerevisiae* (BAA03165.1), *Artemia salina* (AAC83402.1). Для субодиниці eEF1В β порівнювали: *Homo sapiens* (NP_001951.2), *Mus musculus* (AAG17466.1), *Xenopus laevis* (NP_001081523.1), *Drosophila melanogaster* (Q9VL18.1), *Bombyx mori* (BAB21109.1), *Hydra vulgaris* (XP_002156180.1), *Salmo salar* (ACN12466.1), *Caligus clemensi* (ACO15230.1). Для субодиниці eEF1В γ порівнювали амінокислотні послідовності наступних організмів: *Homo sapiens* (NP_001395.1), *Rattus norvegicus* (NP_001004223.1), *Bos taurus* (NP_001035577.1), *Xenopus laevis* (AAB29958.1), *Carassius auratus* (BAB64568.1), *Bombyx mori* (AEE28213.1), *Artemia sp.* (AAC83401.1) (рис 2.1.).

Далі, базуючись на результатах порівняльного аналізу первинних послідовностей субодиниць, ми спроектували низку вкорочених білків для кожної з них. Послідовній делеції підлягали консервативні ділянки на межі з варіабельною, або навпаки, починаючи з N-кінця досліджуваних білків (рис. 2.2). Для eEF1В α це були послідовності, що включали 19-225, 39-225, 66-225, 91-225, 1-92 амінокислотні залишки, для eEF1В β послідовності, що включали 43-281, 78-281, 117-281, 136-281, 183-281, 78-118 та 1-77 амінокислотні залишки і для eEF1В γ це були послідовності, що кодують окремо С або N-кінцеві домени, а саме 1-228 та 263-437 амінокислотні залишки, відповідно.

eEF1B α



eEF1B β



eEF1B γ

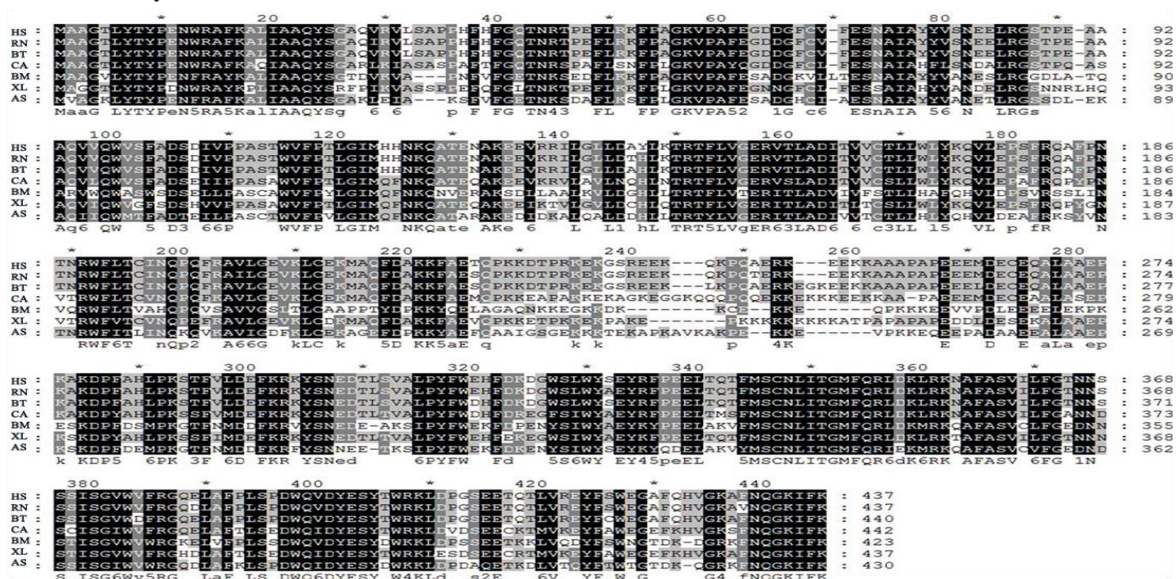


Рис. 2.1. Множинний порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ різних організмів

Скорочення HS - *Homo sapiens*, MM - *Mus musculus*, GG - *Gallus gallus*, DR - *Danio rerio*, XL - *Xenopus laevis*, OC - *Oryctolagus cuniculus*, DM - *Drosophila melanogaster*, CE - *Caenorhabditis elegans*, SC - *Saccharomyces cerevisiae*, AS - *Artemia salina*; BM - *Bombyx mori*; DM - *Drosophila melanogaster*; HV - *Hydra vulgaris*; SS - *Salmo salar*; CC - *Caligus clemensi*; RN - *Rattus norvegicus*; BT - *Bos taurus*; CA - *Carassius auratus*

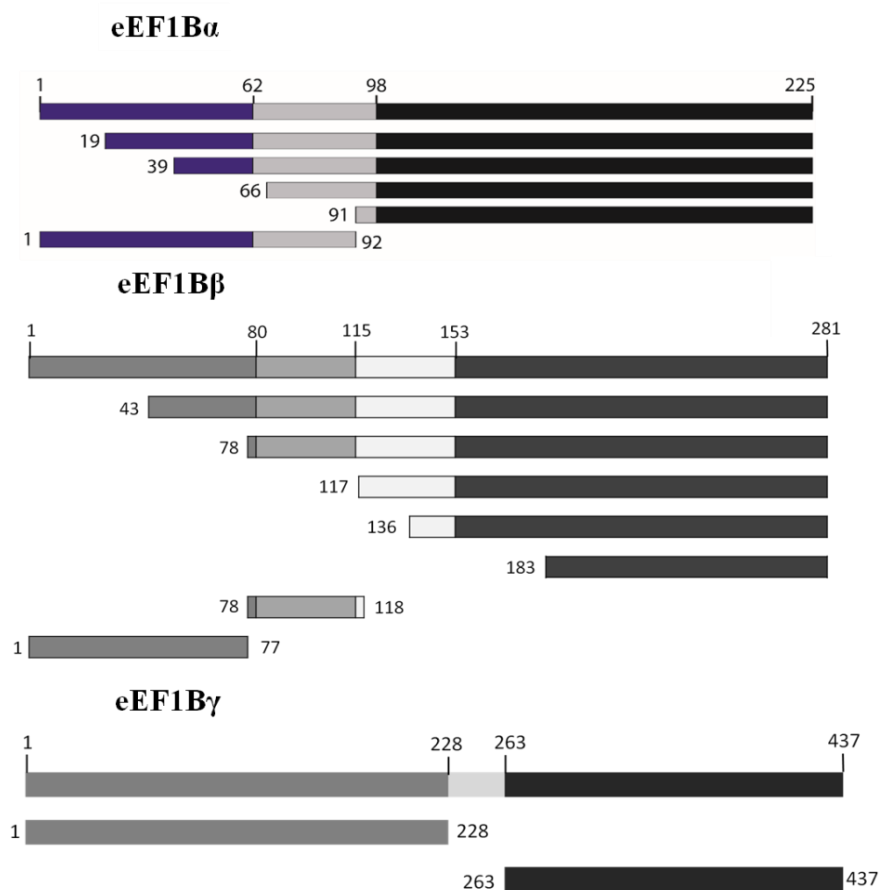


Рис. 2.2. Схема дизайну вкорочених форм окремих доменів субодиниць eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ . Номерами позначено відповідні амінокислотні залишки. Різними кольорами позначені N- та C-кінцеві домени та область лінкерного регіону, LZ-мотив додатково позначений у послідовності N-кінцевого домену eEF1B β з 80 по 115 залишки

2.4. Методи роботи з нуклеїновими кислотами

2.4.1. Полімеразна ланцюгова реакція. Фрагменти кДНК, що кодують вкорочені форми трьох субодиниць, отримували за допомогою ПЛР на матрицях pGEX6p-1/eEF1B α , pGEX6p-1/eEF1B β та pET16b/eEF1B γ з парами праймерів (таблиця 2.1), які містили сайти рестрикції для клонування у відповідний вектор. Для створення плазмідних конструкцій вкорочених форм

eEF1V α та eEF1V β на основі вектора pGEX6p-1 використовували сайти *EcoRI* та *XhoI*. Для створення конструкцій вкорочених форм eEF1V γ на основі вектора pET28a(+) використовували сайти *BamHI* та *XhoI* для клонування С-кінцевого домену білка і *NdeI* та *XhoI* для клонування N-кінцевого домену.

Вміст компонентів у ПЛР суміші об'ємом 50 мкл становив: матрична ДНК – 1 нг, прямий та зворотній праймери – 1 мкМ, дНТФ – 200 мкМ, реакційний буфер для полімерази – 5 мкл, полімераза 1,5-2,5 одиниць

Температурно-часові умови реакції ампліфікації кДНК фрагментів субодиниць eEF1V β та eEF1V γ :

Температурно-часові умови реакції ампліфікації кДНК фрагментів субодиниць eEF1V β та eEF1V γ :

Початкова денатурація ДНК	95°C, 3 хв	} 35 циклів
Денатурація ДНК	95°C, 30 сек	
Гібридизація праймерів	60°C, 30 сек	
Синтез ДНК	72°C, 120сек	
Закінчення синтезу	72°C, 10хв	

Температурні умови реакції ампліфікації кДНК фрагментів eEF1V α :

Початкова денатурація ДНК	93°C, 3 хв	} 35 циклів
Денатурація ДНК	95°C, 30 сек	
Гібридизація праймерів	60°C, 30 сек	
Синтез ДНК	72°C, 90 сек	
Закінчення синтезу	72°C, 10хв	

Таблиця 2.1

**Послідовності праймерів використаних для ампліфікації
відповідних фрагментів ДНК**

Фрагмент ДНК, який кодує:	прямий праймер (починається з 5'-ОН)	зворотній праймер (починається з 5'-ОН)
	Вектор для клонування – рGEX6p-1	
eEF1Bα (19-225)	aagaattcgcggaacaagagctacatcga	ttctcgagttagatcttgttgaagcagcca catccat
eEF1Bα (39-225)	aagaattcgccgtgtccagcccaccgcc t	ttctcgagttagatcttgttgaagcagcca catccat
eEF1Bα (66-225)	aagaattcgccagcctgccaggagtga gaaa	ttctcgagttagatcttgttgaagcagcca catccat
eEF1Bα (91-225)	aaagaattcgctacagatagtaaagatga tgatgac	ttctcgagttagatcttgttgaagcagcca catccat
eEF1Bα(1-92)	aaagaattcatgggttcggagacctgaa aagcct	tttctcgagttatgtagtgtcttccacat
eEF1Bβ (43-281)	aagaattcgccagcgtgatcctccgtgac att	ttctcgagtcaaatcttgttgaagctgctat atctacactct
eEF1Bβ (78-281)	ttgaattcggtgaactcgtcgttcgtattgc ca	ttctcgagtcaaatcttgttgaagctgctat atctacactct
eEF1Bβ (117-281)	aagaattcaagagttcgcctggacaccg agcca	ttctcgagtcaaatcttgttgaagctgctat atctacactct
eEF1Bβ (136-281)	aaagaattcatgcgccaagtggagcccc ca	ttctcgagtcaaatcttgttgaagctgctat atctacactct
eEF1Bβ (183-281)	aaagaattcgcggaagaaggccaag aa	ttctcgagtcaaatcttgttgaagctgctat atctacactct
eEF1Bβ (78-118)	ttgaattcggtgaactcgtcgttcgtattgc ca	aaactcgaggctcttctccagcacgt
eEF1Bβ(1-77)	aaagaattcatggctacaacttcttagc	tttctcgagtcagtggtctccgctgggtgcc
	Вектор для клонування – рЕТ28a	
eEF1Bγ(1-228)	tttgatccatggcggctgggaccctgta cac	tttctcgagtcacttttaggttgggtctctg c
eEF1Bγ (263-437)	aaacatatggatgaatgtgagcaggcgc t	aactcgagcttgaatatttgcctgattga aggctttgcccc

2.4.2. Рестрикція ДНК та лігування. Ампліфіковані кДНК фрагменти очищали від компонентів реакційної суміші, використовуючи набір для очищення продуктів ПЛР або набір для екстракції ДНК з гелю. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично. Фрагменти ДНК та вектори обробляли відповідними ендонуклеазами рестрикції згідно з протоколом виробника, після чого очищали від компонентів реакції за допомогою набору для очищення продуктів ПЛР або гель-електрофорезу і набору для екстракції ДНК з гелю. Лігування фрагменту ДНК з вектором проводили з використанням T4 ДНК лігази згідно з рекомендаціями виробника.

2.4.3. Виділення плазмідної ДНК з *E. coli*. Бактеріальну колонію з чашки Петрі переносили в 3 мл середовища LB, що містило селективний антибіотик. Інкубували за 37°C та інтенсивному перемішуванні (200 об/хв) протягом ночі. Наступного дня нічну культуру переносили в пластикову пробірку та центрифугували 12000 g протягом 1 хв, надосад відбирали. З осаду клітин виділяли плазмідну ДНК за допомогою відповідного комерційного набору згідно з протоколом виробника. Концентрацію ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометру NanoDrop.

2.4.4. Електрофорез фрагментів ДНК в агарозному гелі. Електрофоретична рухливість молекул ДНК в агарозному в гелі залежить від їх розміру та щільності гелю. Для аналізу і очищення ДНК фрагментів використовували гелі з вмістом агарози від 0,8 до 2%. Необхідну кількість агарози зважували і додавали до буферного розчину TBE (0,5×), нагрівали до повного розплавлення, а потім охолоджували до 60°C. Агарозний гель формували протягом 20-25 хв. при кімнатній температурі. Зразки ДНК змішували з фарбою для нанесення зразків, яка містила стандартні барвники і в деяких випадках SybrGreen, і вносили в лунки гелю. Електрофорез проводили в буферному розчині TBE (0,5×) при напрузі 80-160V протягом 1 години. Для визначення розміру фрагментів ДНК використовували стандартні

ДНК-маркери. За відсутності SybrGreen у зразках гель фарбували розчином етидію-броміду (0.5 мкг/мл) протягом 30 хвилин. Комплекс ДНК з барвником візуалізували в ультрафіолетовому світлі.

Розчин (6×) для нанесення ДНК на гель містив: бромфеноловий синій – 10 мг (0,25%); ксилен-ціанол – 10 мг (0,25%); гліцерол – 1,2 мл (30 %); вода – до 4 мл.

ТВЕ(10×): Tris – 24 г; борна кислота – 13,75 г; EDTA (0,5 М, рН 8) – 10 мл; H₂O – до 500 мл

2.5. Приготування компетентних клітин *E. coli*

Компетентні клітини штаму XL10 Gold для трансформації кільцевою плазмідною ДНК, або сумішшю для лігування плазмідної ДНК готували за оригінальною методикою (150). Бактерії зі стокового розчину, який зберігався при - 80°C, розсівали штрихом на середовище LB-агар з тетрацикліном та вирощували при 37°C протягом ночі. Наступного дня 1 ізольовану колонію діаметром 2-3 мм переносили в колбу, що містила 40 мл розчину SOB, та вирощували культуру на 18°C при інтенсивному перемішуванні (200 об/хв) до оптичної щільності суспензії клітин 0.6 (OD⁶⁰⁰) протягом двох діб. Після досягнення зазначеної щільності, 30 мл культури переносили у 50 мл пробірку та інкубували при 4°C 10-15 хв. Далі бактеріальну культуру центрифугували 10 хв при 1500 g, надосад відбирали. Пробірку з осадом додатково центрифугували 20 сек при 1500 g, після чого відбирали залишки рідини. Отриманий осад ресуспендували в 10 мл буферного розчину ТВ та інкубували при 4°C 15 хв, після чого знову центрифугували і відбирали залишки надосаду. На наступному етапі осад розчиняли в 2 мл буферного розчину ТВ та переносили на 4°C. Далі до клітин додавали 70 мкл ДМСО (кінцева концентрація 3.5%) двома порціями з проміжком в 15 хв. Отримані клітини

фасували по 150 та 300 мкл в охолоджені пробірки та заморожували в рідкому азоті.

ТВ: PIPES – 1,51 г (10 мМ); $MnCl_2 \times 2H_2O$ – 4,45 г (55 мМ); $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 1.10 г (15 мМ) KCl – 9,32 г (250 мМ); H_2O – до 500 мл.

SOB: екстракт дріждів – 4 г (2%); бакто триптон – 1,1 г (0,55%); NaCl (5 М) – 0,4 мл (0,01 М); KCl (1 М) – 2 мл (0,02 М) 2 М Mg^{2+} (1 М $MgCl_2$ + 1 М $MgSO_4$) – 2 мл (0,02 М); H_2O - до 200 мл.

2 М $Mg^{2+}MgCl_2 \times 6H_2O$ – 20,33 г (1 М); $Mg SO_4 \times 7H_2O$ – 24,65 г (1 М) H_2O – до 100 мл.

Компетентні клітини штамів BL21 Gold, BL21(DE3)pLysS та Rosetta (DE3), які використовуються для експресії рекомбінантних білків, отримували шляхом їх обробки розчином 50 мМ $CaCl_2$. Колонію з агаризованого середовища на чашці Петрі переносили в пробірку з 5 мл середовища LB з відповідним до штаму антибіотиком та вирощували в інкубаторі протягом ночі при 37°C. Наступного дня суспензію розводили в 50 разів свіжим середовищем та інкубували при 37°C до оптичної щільності суспензії клітин $OD^{600} = 0,45-0,55$. Після досягнення необхідної щільності клітин культуру охолоджували на льодяній бані впродовж 15-20 хв. 20мл культури центрифугували 5 хв при 6000 об/хв, клітини обережно ресуспендували в 10 мл охолодженого розчину 50 мМ $CaCl_2$. Суспензію інкубували 15 хв на льодяній бані та центрифугували 10 хв при 4000 об/хв, надосад зливали, а клітини обережно ресуспендували в кінцевому об'ємі 1 мл. Компетентні клітини фасували по 150 мкл в охолоджені пробірки та одразу використовували для трансформації.

2.6. Трансформація компетентних клітин *E. coli* і селекція позитивних клонів

Для проведення трансформації до порції компетентних клітини (150 мкл), яку тримали на льодяній бані, додавали 10 мкл лігуючої суміші або 50-

80 нг кільцевої плазмідної ДНК. Суспензію клітин обережно перемішували та інкубували при $+4^{\circ}\text{C}$ впродовж 30 хв. Потім клітини піддавали температурному шоку впродовж 1,5 хв при 42°C , після чого переносили на $+4^{\circ}\text{C}$ і додатково інкубували 2 хв. Далі до клітин додавали 1 мл нагрітого до 37°C поживного середовища LB та інкубували 1 год при 37°C з періодичним перемішуванням. З отриманої суспензії клітин відбирали 200 мкл та висівали на чашку з LB-агаром, яка містила відповідний антибіотик. Колонії, які вирости на селективному середовищі використовували для виділення плазмідної ДНК. Надалі проводили скринінг позитивних клонів за допомогою рестрикційного аналізу плазмідної ДНК з використанням кількох рестриктаз. Відсутність помилок у клонованих фрагментах ДНК підтверджували секвенуванням.

2.7. Методи роботи з білками

Препарати білків eEF1A1 та eEF1A2, виділені з тканин кроля (151,152), були надані Шалаком В.Ф.

2.7.1. Отримання рекомбінантних білків.

2.7.1.1. eEF1Ba. Повнорозмірний eEF1Ba та всі його вкорочені форми були синтезовані як білки, злиті з GST, у клітинах *E.coli* штаму BL21(DE3)pLysS. Клітини-продуценти вирощували в середовищі LB з 100 мкг/мл ампіциліном при 37°C до оптичної щільності $\text{OD}^{600}=0,5$. Синтез цільового білка індукували додаванням до культури розчину 1 мМ IPTG. Через 3 години після початку індукції клітини збирали центрифугуванням та двічі промивали охолодженим PBS буфером з додаванням 10% гліцерину та 5 мМ 2-меркаптоетанолу. Отриманий осад клітин ресуспендували в цьому ж буфері у співвідношенні 8 мл буферу на 1 г клітин та руйнували за допомогою ультразвуку. Всі наступні кроки виконували при 4°C .

Клітинний екстракт центрифугували при 12 000 об/хв впродовж 30 хв, надосад відбирали та змішували з 5 мл глутатіон-сефарози, попередньо врівноваженої буфером для екстракції, та інкубували на орбітальному перемішувачі впродовж ночі. Наступного дня матрикс двічі промивали буфером для екстракції та вносили в колонку. В колонці матрикс остаточно відмивали від білків, що не зв'язалися, буфером для екстракції. Елюцію GST-злитих білків проводили буферним розчином, який містив 20 мМ глутатіон рН 8. Білкові фракції збирали та аналізували за допомогою гель-електрофорезу в денатуруючих умовах. Найбільш очищені фракції об'єднували та діалізували в буфері, який містив 30 мМ Tris-HCl рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол та 0.01% Tween 20. Цільові білки відділяли від GST за допомогою PreScission протеази згідно з рекомендаціями виробника. Задля видалення GST проводили іонно-обмінну хроматографію на колонці HiTrap Q (1 мл) попередньо врівноважену буфером для діалізу. Препарати білків після обробки протеазою наносили на колонку HiTrap Q і промивали буфером, який містив 30 мМ Tris-HCl рН 7.5, 200 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол та 0,01% Tween 20. За цих умов GST не взаємодіяв з матриксом тоді як eEF1B α та його вкорочені форми зв'язувалися з колонкою. Їх елюцію проводили в лінійному градієнті NaCl від 200 мМ до 450 мМ (для повнорозмірного білка - від 250 мМ до 450 мМ NaCl) в тому ж буферному розчині. 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 рН 7,5, 150 мМ NaCl 55% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол, і зберігали при -20°C .

Нам не вдалося отримати вкорочену форму eEF1B α (91-225) в індивідуальному стані, оскільки після обробки протеазою цей білок випадав в осад. Отже, в подальшій роботі ми використовували його GST-злиту форму (GST-eEF1B α (91-225)).

Очищення N-кінцевого домену eEF1B α , eEF1B α (1-92), проводили за допомогою афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі, як описано вище, а

потім, після обробки протеазою, на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 (1,6×60 см, 120 мл), яку попередньо врівноважували буфером, що містив: 25 мМ Tris-HCl рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Чистоту цільового білка оцінювали гель-електрофорезом в денатуруючих умовах. Найбільш очищені фракції об'єднували, концентрували на центрифужних концентраторах Amicon Ultra 4 з діаметром пор 10 kDa («Millipore», США) та діалізували в буферному розчині, наведеному вище, і зберігали при – 20°C.

Концентрацію очищених білків визначали спектрофотометрично, враховуючи їх коефіцієнти поглинання на довжині хвилі 280 нм. Для повнорозмірного eEF1B α цей коефіцієнт становив 1.18 A₂₈₀ опт.од/мг білка, для eEF1B α (19-225) – 1,25, для eEF1B α (39-225) – 1,24, для eEF1B α (66-225) – 0,97, для GST-eEF1B α (91-225) – 1,4 та для eEF1B α (1-92) – 1,37.

2.7.1.2. eEF1B β . Повнорозмірний рекомбінантний eEF1B β та всі його вкорочені форми були синтезовані як GST-злиті білки у клітинах *E.coli* штаму BL21 Gold. Їх експресію, афінне очищення та обробку протеазою проводили за протоколом ідентичним для eEF1B α . Подальше очищення на колонці HiTrap Q (1 мл) проводили в градієнті NaCl від 250 до 450 мМ.

Вкорочена форма eEF1B β (183-281), яка є високогомологічною до eEF1B α (91–225), також випадала в осад під час обробки протеазою і тому використовувалась в роботі у вигляді GST-злитого білка (GST-eEF1B β (183-281)).

Послідовність eEF1B β , яка містить мотив типу «лейцинова застібка» (eEF1B β (78-118)), було також приєднано до послідовності GST і отримано у формі GST-злитого білка (GST-eEF1B β (78-118)). Його очищення проводили за допомогою афінної хроматографії на глутатіон-сефарозі відповідно до протоколу описаному вище, а потім на колонці HiLoad Superdex 200 (1,6×60 см, 120 мл), попередньо врівноваженої буфером, який містив: 25 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5% гліцерин та 5 мМ 2- меркаптоетанол. Найбільш очищені фракції цільового білка, відповідно до електрофорезу в денатуруючи

умовах, об'єднували, 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 .

Концентрацію очищених білків визначали спектрофотометично, використовуючи відповідні коефіцієнти поглинання (A_{280} опт.од/мг білка). Для повнорозмірного eEF1B β – 0,72, для eEF1B β (43-281) – 0,52, для eEF1B β (78-281) – 0,60, для eEF1B β (117-281) – 0,74, для eEF1B β (136-281) – 0,81, для GST-eEF1B β (183-281) – 1,46, для GST-eEF1B β (78-118) – 1,36 і для eEF1B β (1-77) – 0,92.

2.7.1.3. eEF1B γ . Повнорозмірний рекомбінантний eEF1B γ людини з N-кінцевою 6xHis-послідовністю отримували шляхом експресії конструкції pET16b/eEF1B γ у клітинах штаму BL21(DE3)pLysS.

Бактеріальну культуру вирощували на середовищі з 100 мкг/мл ампіциліну при 37°C до оптичної щільності $A^{600} = 0,5$, потім знижували температуру до 20°C і через одну годину додавали до культури 0,8 мМ IPTG для індукції синтезу цільового білка. Інкубацію продовжували протягом 16 годин, потім клітини збирали центрифугуванням та двічі промивали охолодженим буфером для екстракції наступного складу: 30 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 30 мМ KCl, 0,1 мМ EDTA, 10% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Зібраний осад розчиняли в буфері для екстракції в об'ємі 8 мл на 1г клітин та руйнували за допомогою ультразвуку. Всі наступні кроки виконувались при 4°C .

Екстракт клітин центрифугували при 12 000 об/хв впродовж 30 хв, надосад відбирали, доводили концентрацію NaCl до 500 мМ, імідазолу pH 8 до 20 мМ та Tween-20 до 0,01%. та змішували з 2 мл хроматографічного носія Ni-NTA, попередньо врівноваженого з буфером для екстракції, та інкубували на орбітальному перемішувачі 1,5-2 години. Матрикс вносили в колонку та промивали буфером А (25 мМ Tris-HCl pH 7,5, 500 мМ NaCl, 20 мМ імідазол pH 8, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол), а потім тим же буфером з 1М концентрацією NaCl. Елюція зв'язаного з носієм eEF1B γ проводилась буфером А з 220 мМ імідазолом pH 8. Фракції збирали та аналізували за допомогою

гель-електрофорезу в денатуруючі умови. Найбільш концентровані фракції були додатково очищені від агрегатів за допомогою гель-фільтрації на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 (1,6×60 см, 120 мл), попередньо врівноваженої буфером, який містив: 25 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Фракції з очищеним eEF1B γ об'єднували, діалізували в буфері з 30 мМ Tris-HCl рН 7,5, 150 мМ NaCl, 55% гліцерином, 5 мМ 2-меркаптоетанолом і зберігали при -20°C. Концентрацію білка вимірювали спектрофотометрично враховуючи коефіцієнт поглинання 1,74 опт. од/мг білка при 280 нм.

Послідовності вкорочених білків eEF1B γ (263-437) та eEF1B γ (1-228), з N-кінцевим 6xHis-тагом клонували у вектор pET28a(+) та експресували в клітинах штаму Rosetta(DE3) та BL21 (DE3) pLysS відповідно. Клітини вирощували на поживному середовищі з додаванням 50 мкг/мл канаміцину. Процедура експресії та очищення проводили як описано вище для повнорозмірного білка. Щоб покращити ступінь очищення на афінному матриксі, його додатково промивали буфером А з підвищеним вмістом імідазолу 30 мМ.

Концентрацію отриманого білка вимірювали спектрофотометрично враховуючи коефіцієнт поглинання (опт.од/мг білка) при 280 нм для eEF1B γ (263-437) = 2,28, а для eEF1B γ (1-228) = 1,19 опт. од/мг.

2.7.2. Гель-електрофорез білків в денатуруючих умовах. Гель-електрофорез білків в присутності додецилсульфату натрію проводили відповідно методу Лемлі (153). Гель складався з концентруючої і розділюючої частин, які готували на буферному розчині 62.5 мМ тріс-НСl рН 8.8 (розділюючий) або рН 6.8 (концентруючий); 1% SDS; 150mM NaCl, 0.03% TEMED, 0.1% персульфат амонію. Концентруючий гель містив 5% акриламід, розділюючий гель – 10-15%-ний акриламід (співвідношення акриламіду та бісакриламіду – 37.5:1). Денатурацію білкових зразків проводили в буферному розчині, що містив 62,5 мМ Tris-HCl рН 6.8; 1% SDS; 10% гліцерин; 40 mM

DTT; 0,5 мг/мл бромфенолового синього, витримуючи на киплячій бані від 1 до 10 хвилин в залежності від зразків. Електрофорез в гелі для концентрування проводили при напрузі 100 V протягом 30 хв, в гелі для розділення – при 180-200 V протягом 1 год.

Фарбування та фіксацію гелю проводили в розчині Кумасі R-250 (0.125% спиртового розчину Кумасі R-250, 5% оцтова кислота.), відмивку – в розчині 40% етанолу і 3% оцтової кислоти.

2.7.3. Формування білкових комплексів. Для формування подвійних комплексів eEF1B α γ та eEF1B β γ , або потрійного eEF1B α β γ компоненти в еквімолярній кількості були змішані в буфері, який містив 25 мМ імідазол-НCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол, та інкубовані протягом 5 хвилин при 37°C. Після цього комплекси додатково очищували на колонці HiLoad 16/60 Superdex 200 (1,6×60 см, 120 мл), попередньо врівноваженої буфером, що містив: 25 мМ Tris-НCl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Фракції центральної частини хроматографічного піку об'єднували та використовували для подальшого вивчення. Кінцева концентрація компонентів становила eEF1B α γ – 39,2 мкМ, eEF1B β γ – 35 мкМ, eEF1B α β γ – 53,6 мкМ. Молярна концентрація комплексів визначалася спектрофотометрично, враховуючи коефіцієнт поглинання для eEF1B α γ – 117270 M⁻¹cm⁻¹, для eEF1B β γ – 109820 M⁻¹cm⁻¹ при співвідношенні субодиниць в обох комплексах 1:1, для eEF1B α β γ – 139855 M⁻¹cm⁻¹ розрахований для співвідношення субодиниць в комплексі 1:1:1.

Для проведення експериментів з гель-електрофорезу в нативних умовах комплекси eEF1A1 та eEF1A2 з eEF1B α та його вкороченою формою eEF1B α (66-225) формували наступним чином: 10 мкМ eEF1A1 або eEF1A2 змішували з зростаючими (5–30 мкМ) концентраціями eEF1B α , або eEF1B α (66-225) та 150 мкМ ГДФ в буфері, який містив: 10 мМ Tris-НCl рН 7.5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Кінцевий об'єм суміші дорівнював 20 мкл.

Комплекс між eEF1B β і eEF1A2 формували наступним чином: 10 мкМ eEF1A2 змішували з зростаючими (0,36 –21 мкМ) концентраціями eEF1B β і 150 мкМ ГДФ в буфері, який містив: 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол. Кінцевий об'єм суміші дорівнював 25 мкл.

Комплекс eEF1B $\alpha\gamma$ формували наступним чином: 5 мкМ eEF1B α змішували з зростаючими (2–7 мкМ) концентраціями eEF1B γ , і, навпаки, 5 мкМ eEF1B γ змішували з зростаючими (2–7 мкМ) концентраціями eEF1B α . Змішування білків проводили в буфері, який містив: 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол, і в кінцевому об'ємі 20 мкл. Комплекс eEF1B $\beta\gamma$ формували аналогічним чином, як описано для eEF1B $\alpha\gamma$.

Титрування потрібного комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ фактором eEF1A2 проводили по такій схемі. Спочатку комплекс eEF1B $\alpha\beta\gamma$ формували шляхом змішування трьох індивідуальних субодиниць в кінцевій концентрації 6 мкМ в буферному розчині 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин, 5 мМ 2-меркаптоетанол при 37°C протягом 5 хв. Потім утворений комплекс титрували eEF1A2 наступним чином: 3 мкМ eEF1B $\alpha\beta\gamma$ змішували із зростаючими (3-30 мкМ) концентраціями eEF1A2 в присутності 150 мкМ ГДФ в буферному розчині зазначеному вище. Кінцевий об'єм суміші дорівнював 20 мкл.

У всіх випадках суміші білків інкубували 5 хвилин при 37°C.

2.7.4. Аналітична гель-фільтрація білків і оцінка їх молекулярних мас. Перевірку агрегатного стану всіх очищених білків і білкових комплексів, а також оцінку їх молекулярних мас, проводили за допомогою аналітичної гель-фільтрації на колонці Superose 6 HR 10/30 (24 мл). Колонку врівноважували буфером E_i, що містив 25 мМ імідазол pH 8.0, 150 мМ NaCl, 10% гліцерин та 5 мМ 2-меркаптоетанол. Зразок об'ємом 0,1 мл наносили на колонку зі швидкістю 0,4 мл/хв і контролювали поглинання розчину, який виходив з колонки, на довжині хвилі 280 нм. Після визначення об'єму елюції

(V_e) досліджуваного білка з колонки, розраховували його коефіцієнт міграції (K_{av}) за формулою: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, де V_0 – це вільний об'єм колонки, а V_t – загальний об'єм колонки. V_0 і V_t визначали по об'єму елюції з колонки блакитного декстрану (2 МДа) та 2-меркаптоетанолу (78,1 Да), відповідно. Надалі, молекулярну масу досліджуваного білка визначали по калібрувальному графіку побудованому в координатах K_{av} проти $\lg(M_r)$, приведенного нижче на рис. 2.3.

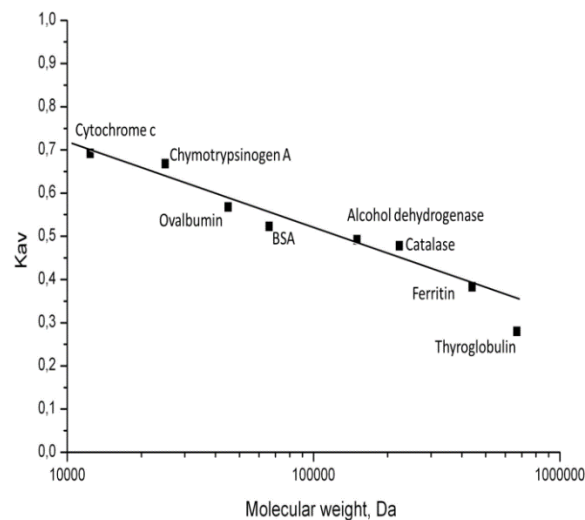


Рис. 2.3. Калібрувальна крива для колонки Superose 6 HR 10/30 (24 мл).

Для побудови калібрувальної кривої використовували білки-стандарти з відомими молекулярними масами, зокрема тиреоглобулін – 669 кДа, феритин – 450 кДа, каталаза – 232 кДа, спиртова дегідрогеназа – 150 кДа, бичачий сироватковий альбумін – 67 кДа, овальбумін – 45 кДа, хімотрипсिनоген А – 25 кДа, цитохром с – 12,4 кДа. Залежність K_{av} проти $\lg(M_r)$ має лінійний характер в діапазоні від 10 до 700 кДа

2.7.5. Аналітичне ультрацентрифугування білків і білкових комплексів. Аналітичне ультрацентрифугування (АУЦ) проводили на аналітичній ультрацентрифузі ProteomeLab XL-I з використанням ротору An-60 Ti при 4°C. Моніторинг седиментації білків здійснювали по поглинанню на 280 нм.

Для швидкісного ультрацентрифугування (ШУЦ) зразок об'ємом 400 мкл та контрольний буферний розчин об'ємом 410 мкл завантажували у 12 мм двосекторну затемнену кювету (Epon), яку закріплювали в роторі. Ультрацентрифугування проводили на швидкості ротора від 30000 до 50000 об/хв в залежності від досліджуваного білка. Поглинання білків в кюветі реєструвалось цифровою камерою у безперервному режимі з часовим інтервалом 270 секунд та довжиною кроку 0.003 см. Набір кривих седиментації білка, де точки показують значення оптичного поглинання молекул білка, які створюють рухливу межу, що формується під дією сили Кориоліса в процесі центрифугування, аналізували в програмі SEDFIT з використанням математичної моделі безперервного розподілу дискретних частинок за розміром, та отримували зображення позначене суцільними лініями (154–156). Похибку обчислення представляли у вигляді «нев'язки», яка показує величину відхилення математичної апроксимації від експериментальних значень. Розрахунки розподілу молекул за розміром проводились з достовірністю 0,95 за максимальною ентропією, використовуючи співвідношення f/f_0 в якості варіабельного параметру. f/f_0 є співвідношенням реального коефіцієнта тертя частинки до мінімального і вказує на її гідродинамічну форму ($f/f_0=1,2$ для сферичних білків і $f/f_0>1,2$ для білків витягнутої форми). Розподіл частинок за розміром робили з роздільною здатністю $N = 300$ коефіцієнтів седиментації в діапазоні від 0,2 до 12,0 S для індивідуальних білків і в діапазоні від 0,2 до 14,0 S для білкових комплексів.

Додатково, щоб проаналізувати форму досліджуваних білків, було визначено співвідношення S_{\max}/S , де S_{\max} це коефіцієнт седиментації білка за умови, що він є гладкою сферою без водного оточення, а S це реальний коефіцієнт седиментації $S_{(20,w)}$, отриманий при аналізі даних швидкісної седиментації. S_{\max} розраховували за формулою $S_{\max} = 0,00361(M_r)^{2/3}$, де M_r це молекулярна маса білка в Дальтонах (157).

Експерименти з рівноважного ультрацентрифугування (РУЦ) проводили з використанням шестиканальної затемненої кювети (Eron). Три зразки з різною концентрацією білка і об'ємом 0,1 мл кожний завантажували в комірки для зразків. В якості контролю у відповідні комірки завантажували буферний розчин об'ємом 0,12 мл. Кювету закріплювали у роторі і центрифугували зі швидкостями, зазначеними у підписах до рисунків. Поглинання білків в кюветі реєструвалось цифровою камерою кожні чотири години. Досягнення стану рівноваги в процесі седиментації білків контролювали за допомогою програми SEDFIT (156). Результати сканування, отримані на одній швидкості обертання ротору, або на різних (полішвидкісний аналіз для двох або трьох швидкостей) в подальшому обраховували в програмі SEDPHAT (158) з використанням математичної моделі для монодисперсних частинок в розчині, які не взаємодіють між собою, що можна описати рівнянням:

$$A_R = c_{r0} \varepsilon d \exp\{[M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2/2RT](r^2 - r_0^2)\}$$

де r являє собою відстань від центру обертання; r_0 – довільний опорний радіус; ω – кутова швидкість; T – абсолютна температура ротора; R – газова стала; \bar{v} – парціальний питомий об'єм білка; ρ – густина розчинника; ε – коефіцієнт поглинання; d – довжина оптичного шляху; c_{r0} – концентрація в опорному радіусі.

Для аналізу даних для двох швидкостей значення базової лінії поглинання буферного розчину зазначали в якості параметру, загального для обох швидкостей ротора.

У випадку, якщо експериментальні дані не відповідали найпростішій моделі для монодисперсних частинок в розчині, використовували модель рівноваги мономер-димер за наступним рівнянням:

$$A_R = c_{r0} \varepsilon d \exp\{[M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2/2RT](r^2 - r_0^2)\} + K_a c_{r0}^2 \varepsilon d \exp\{[2M(1 - \bar{v}\rho)\omega^2/2RT](r^2 - r_0^2)\}$$

де K_a означає константу асоціації димеру.

Похибку обчислення представляли у вигляді «нев'язки», яка показує величину відхилення апроксимації від експериментальних значень.

Швидкісне та рівноважне центрифугування білків і їх комплексів проводили в буфері, який містив: 25 мМ Tris-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 5% гліцерини і 1 мМ ДТТ. Густину розчинника $1,0216 \text{ г/см}^3$ і в'язкість 0,01962 Пуаз при температурі $2,3^\circ\text{C}$, а також $1,02164 \text{ г/см}^3$ і 0,01857 Пуаз при 4°C розраховували з використанням програмного забезпечення SEDNTERP (<https://www.spinanalytical.com/auc-software.php>).

Значення часткового питомого об'єму білків ($\text{см}^3/\text{г}$) та їх коефіцієнти поглинання ($\text{M}^{-1}\text{см}^{-1}$), розраховані за допомогою SEDNTERP, становили: для eEF1B α – 0,72585 та 30030, відповідно; для eEF1B α (19-225) – 0,72472 та 28545; для eEF1B α (39-225) – 0,72532 та 25570, для eEF1B α (66-225) – 0,72499 та 17085; для GST-eEF1B α (91-225) – 0,73301 та 5870, eEF1B α (1-92) – 0,72769 та 14440; для eEF1B β – 0,72259 та 22590, GST-eEF1B β (78-118) – 0,73865 та 43110, eEF1B β (117-281) – 0,72446 та 14110, eEF1B β (1-77) – 0,70931 та 8480; для eEF1B γ – 0,72288 та 87230; для eEF1B $\alpha\beta\gamma$ комплексу (1:1:1) – 0,72402 та 139855; eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) комплексу (1:1:1) – 0,72347 та 61100.

2.7.6. Гель-електрофорез білкових комплексів в нативних умовах.

Електрофоретичне розділення білків і їх комплексів проводили в 0,7; 1 або 1,5% агарозних гелях в залежності від експерименту, що вказано в підписах до рисунків. Електрофорез проводили в 89 мМ Тріс-боратному буфері, pH 8.3 впродовж 2-х годин при напрузі 50 В і силі струму 22-24 мА за кімнатної температури. Гель фарбували Кумасі R-250 1-2 хвилини та відмивали у розчині, який містив 40% етанол і 3% оцтову кислоту, і фотографували в системі візуалізації MiniBIS Pro.

2.7.7. [^3H]ГДФ/ГДФ обмін. Кінетику [^3H]ГДФ/ГДФ обміну на молекулі eEF1A2 проводили відповідно до описаного раніше методу (42). Обмін на молекулі eEF1A1 проводили в таких самих умовах, за винятком температури реакції та концентрації факторів обміну нуклеотиду.

Реакційна суміш для обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A2 містила: 4 нМ концентрацію факторів обміну нуклеотиду (eEF1B α чи його вкорочені форми або eEF1B β чи його вкорочені форми, або комплекси eEF1B $\alpha\gamma$ чи eEF1B $\beta\gamma$), 150 мкМ ГДФ і 692 нМ eEF1A2*[^3H]мМГДФ. Реакцію обміну нуклеотиду на eEF1A2 з факторами обміну проводили при 25°C впродовж 6 хв. Реакцію спонтанного обміну – впродовж 40хв. Експерименти з eEF1A1 проводили аналогічним чином за винятком того, що концентрація факторів обміну нуклеотиду становила 20 нМ, а інкубацію проводили при 0°C впродовж 6 хв.

Константи швидкості обміну [^3H]ГДФ/ГДФ першого порядку у відсутності (k_{-1}) та присутності (k_{app}) різних білкових факторів отримували шляхом обрахунку експериментальних даних чотирьох незалежних експериментів з використанням експоненційної функції ($y=A_1*\exp(-x/t_1)+y_0$) в програмі OriginPro 8 (OriginLab, США).

Де x – це експериментальне значення часу інкубації (сек), y – рівень експериментально визначеної кількості зв'язаного з білком [^3H]ГДФ (%). Параметри, які розраховуються програмою: y_0 – значення зміщення графіка функції (offset) по осі y , яке відповідає горизонтальній асимптоті при $x \rightarrow \infty$, $A_1 + y_0$ – значення функції y (amplitude) при $x = 0$, t_1 – константа часу (сек). Константа швидкості реакції k_{-1} або k_{app} вираховувались із співвідношення k_{-1} (або $k_{\text{app}}) = 1/t_1$ (сек $^{-1}$).

Довірчі інтервали показують стандартне відхилення.

2.7.8. Круговий дихроїзм (КД). Спектри КД очищеного рекомбінантного eEF1B β (1-77) отримували в діапазоні температур від 25 до 55°C та концентрації білка 0,076 мг/мл (8,25 мкМ) в буфері 5 мМ Tris-HCl pH 7,5 з використанням кварцевої кювети з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Вимірювання проводили на спектрополяриметрі JASCO-810 в кюветі, яку закріплювали в тримачі з термочуваним Пельтьє елементом. Спектри реєстрували на довжинах хвиль від 190 до 260 нм («дальній» діапазон

ультрафіолетового випромінення) з кроком 0,5 нм та шириною каналу 1 нм зі швидкістю 50 нм/хв. Після віднімання КД спектру буферного розчину середнє значення КД сигналів від трьох спектрів білка використовували для розрахунку параметру $[\Theta]$ – середньої еліптичності на один амінокислотний залишок відповідно до рівняння (159):

$$[\Theta] = \Theta_{\lambda} / cnl$$

де Θ_{λ} – це еліптичність що спостерігається (міліградуси) при довжині хвилі λ , c – молярна концентрація білка у розчині, n – кількість амінокислотних залишків та l – довжина оптичного шляху в міліметрах.

Отримані КД спектри обраховували з використанням програми CDNN, що знаходиться у вільному доступі для некомерційних організацій (<http://www.gerald-böhm.de/download/cdnn>), з метою оцінки кількісного вмісту елементів вторинної структури в eEF1B β (1-77). Окрім цього, аналогічна оцінка проводилась за допомогою програми CONTINLL (160) з пакету CDPro (161). Набори, які складаються з 33 (NNET 33) та 29 (SP29) референтних білків з відомими просторовими структурами та КД спектрами, були використані в програмах CDNN та CONTINLL, відповідно, для розрахунку вмісту (у відсотках) елементів вторинної структури (α -спіраль, β -листок, поворот та неупорядкована структура), по спектру eEF1B β (1-77). Як критерій якості, програма CDNN вираховує мінімальну середню похибку (%) при передбаченні елементів вторинної структури без додаткового «тренування» нейрональної мережі. Як критерій якості для алгоритму CONTINLL, ми використовували нормалізоване середньоквадратичне відхилення (σ), яке визначалось як $\sigma = (\sum_{\lambda} (\Theta_{\text{exp}} - \Theta_{\text{cal}})^2 / \sum_{\lambda} (\Theta_{\text{exp}})^2)^{1/2}$ (162). Цей параметр демонструє наскільки добре розрахований програмою теоретичний КД спектр відповідає експериментальним даним у діапазоні довжин хвиль, на яких проводили виміри. Значення $\sigma < 0,1$ вказує на високу точність обчислень, тоді як значення $\sigma = 0,05$ або нижче свідчать про ідеальну симуляцію (162).

Окрім цього, для визначення структурного класу (відповідно до класифікації SCOP, див. (163)), до якого відноситься eEF1B β (1-77), ми

проаналізували його КД спектри за допомогою програми CLUSTER, що входить в пакет CDPPro (162).

2.7.9. Кінетика заміщення водню на дейтерій в білках з наступним мас-спектрометричним аналізом (H/D-MS). В експериментах з визначення кінетики заміщення водню на дейтерій (H/D обміну) з наступним мас-спектрометричним аналізом були використані білки та білкові комплекси в наступній концентрації: eEF1B α – 56,6 мкМ, eEF1B β – 36,4 мкМ, eEF1B γ – 46 мкМ, eEF1B $\alpha\gamma$ – 39,2 мкМ, eEF1B $\beta\gamma$ – 35 мкМ, eEF1B $\alpha\beta\gamma$ – 53,6 мкМ.

Спочатку для всіх досліджених індивідуальних білків було створено пептидну карту за відсутності дейтерію. Для цього 5 мкл стокового розчину білка змішували з 45 мкл реакційного буферу, що містив 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 150 мМ KSCN та 5 мМ 2-меркаптоетанол. pH розчину швидко знижували додаванням 10 мкл стоп-буферу (2 М гліцин pH 2.5). Протеолітичне розщеплення білків ініціювали додаванням 2 мкл розчину протеаз з *Aspergillus saitoi* («Sigma-Aldrich») в 1% мурашиній кислоті. Суміш інкубували при перемішуванні при температурі 4°C впродовж 30 сек та наносили на пепсинову колонку («Porozyme, ABI»). Отримані пептиди одразу завантажувались на уловлюючу колонку ACQUITY VEN C18 (VanGuard перед-колонка) з якої відбувалась їх поступова елюція в 10-35% градієнті ацетонітрила в 0.1% мурашиній кислоті зі швидкістю потоку 90 мкл/хв і одночасне завантаження на аналітичну колонку з оберненою фазою Acquity UPLC VEN C18 (колонка 2.1 × 100 мм, 1,7 мкм смола, «Waters»). Система контролювалася за допомогою бінарного розподільвача розчинників nanoACQUITY. Загальний час пробігу складав 12 хв. Температура розчинів, петель та колонок підтримувалась на рівні 0,5 °C за допомогою керівного пристрою HDX Manager («Waters», Milford, США) для мінімізації зворотного обміну водню на дейтерій у разі використання останнього в експериментах. Виключення складала пепсинова колонка, яка знаходилась в комірці пристрою HDX Manager при кімнатній температурі (20°C). Колонка C18 безпосередньо

з'єднувалась з мас-спектрометром SYNAPT G2 HDMS («Waters», Milford, США), який працював в режимі іонної мобільності. Параметри спектрофотометра були наступними: позитивний режим ESI, капілярна напруга 3 кВ, напруга в конусі збору зразка 35 В, напруга в конусі екстракції 3 В, температура джерела 80°C, десольватаційна температура 175°C та потік десольватаційного газу 800 л/год.

Експерименти H/D-MS проводили за описаним вище протоколом, використовуючи для приготування реакційного буфера замість звичайної води D₂O (99,8%). Білок зі стокового розчину в об'ємі 5 мкл 10-кратно розводили шляхом додавання 45 мкл D₂O буфера та інкубували впродовж 10 сек, 1, 5, 25 хвилин та 2,5 години при 20°C. Реакцію зупиняли додаванням 10 мкл стоп-буфера. Далі зразки швидко заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C до моменту аналізу. Часова точка для оцінки максимально можливого H/D обміну відповідала 24 годинам інкубації зразка. Надалі ступінь дейтерування пептидів в цій часовій точці приймався за 100% обміну. Виміри проводили в трьох повторах і результат представлено як їх середнє значення ± стандартне відхилення. Пептиди ідентифікували за допомогою глобального серверного програмного забезпечення 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 кожному амінокислоту 0,3, мінімальна відмітка 7,5 та теоретичне значення для батьківських іонів нижче 10 ppm. Значення експериментальних мас кожного пептиду у всіх можливих станах, повторах, часових точках та значення заряду були експортовані з DynamX 3.0 («Waters», Milford, США), і їх подальший аналіз виконували за допомогою програми власної розробки лабораторії (програмне забезпечення належить лабораторії мас-спектрометричного аналізу Інституту біохімії і біофізики, Варшава, Польща). Для кожного пептиду будували графік кінетики H/D обміну з експериментально виміряними значеннями включення дейтерію в пептид в умовних одиницях від 0 до 1, де 0

це 0%, а 1 це 100% дейтерування. Час інкубації був 0,2, 1, 5, 25 і 150 хв. Отримана кінетична крива розділяє графік на дві частини, які знаходяться вище і нижче кінетичної кривої (рис. 2.4.). Площу утвореної фігури над кінетичною кривою визначали шляхом інтегрування, а потім ділили на загальну площу кінетичного графіка. Отримане значення було названо терміном «сукупний захист», який відображає динаміку Н/D обміну для певного пептиду. Значення сукупного захисту може знаходитися в діапазоні від 0 (коли захисту немає і відбувається 100% включення дейтерію) до 1 (повний захист від включення дейтерію). Пептиди розділяли на три категорії за величиною сукупного захисту: менше 0,05 – відсутній захист; вище 0,05 і нижче 0,15 – слабкий захист; вище 0,15 – високий захист. Пептиди з відсутнім і слабким сукупним захистом вважали такими, що належать до динамічних ділянок, а пептиди з високим сукупним захистом – до ригідно-структурованих регіонів білка.

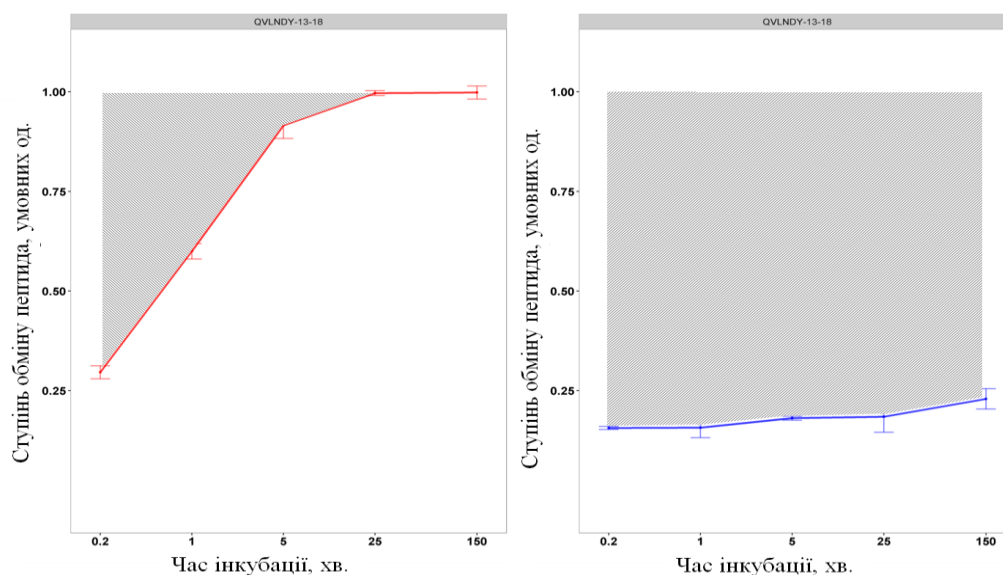


Рис. 2.4. Кінетичні криві Н/D обміну пептиду QVLNDY субодиниці eEF1Ba у вільному стані та у комплексі з субодиницею eEF1Bγ.

Кінетична крива обміну пептиду QVLNDY субодиниці eEF1Ba у вільному стані позначена червоним, у комплексі з субодиницею eEF1Bγ – позначена синім. Показано заштриховану зону над кінетичними графіками, площу якої визначали шляхом інтегрування

Графік «диференційний сукупний захист» показує різницю між значеннями сукупного захисту, виміряного для одного і того ж пептиду в різних станах, а саме у вільному і зв'язаному з партнером. Позитивні значення «диференційного сукупного захисту» вказують на те, що пептид стає більш захищеним в комплексі з партнером, негативні – що, навпаки, стає більш доступним для включення дейтерію.

2.8. Біоінформатичний аналіз, створення структурних моделей білків і молекулярний докінг білків

Структурні 3D моделі створювали з використанням програми Modeller (версія 9.14) (164). Неструктуровані регіони в білках моделювали за допомогою опції в цій програмі, яка дозволяє реконструювати петлеві ділянки (165). Подальше вдосконалення отриманих структурних моделей білків з високою роздільною здатністю виконували за допомогою програми ModRefiner (166). Всі структурні моделі перевірялись на web-сервері MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>) (167) і покращувались на сервері з мінімізації енергії YASARA (168). Візуалізація та аналіз структурних моделей проводили в програмі UCSF Chimera (169). Передбачення наявності неструктурованих регіонів в білкових молекулах проводилось за допомогою серверу MetaDisorderMD2 (170). Усі залишки, ймовірність для яких перевищує значення 0,5 вважаються такими, що належать до неструктурованих ділянок білка.

Процедура *in silico* докінгу між eEF1B β та eEF1B γ проводилась на web-сервері PatchDock (171,172). Симетричний докінг між мономерами eEF1B β проводили на web-сервері SymmDock (172). Уточнення та повторне оцінювання отриманих структур було зроблено з використанням FireDock (173). Аналіз і візуалізація молекулярних інтерфейсів між білками проводили на web-сервері Cocomaps (174).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Структурно-функціональна характеристика субодиниці eEF1Ba

Як вже було зазначено раніше, структура повнорозмірної субодиниці eEF1Ba залишається невідомою. Окрім цього, механізм описаного в літературі феномену підвищення функціональної активності субодиниці eEF1Ba у комплексі з eEF1Bγ досі є нерозкритим. Отже, перед нами постало завдання проаналізувати цей білок за допомогою методів, які дозволять визначити його структурні та функціональні особливості.

3.1.1. Структурна організація субодиниці eEF1Ba. Рекомбінантний eEF1Ba синтезували в бактеріях та очищали відповідно до процедури, описаної в «Матеріалах і методах». Чистота отриманого препарату білка склала більше ніж 90% згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.1a).

Для аналізу ступеню олігомеризації очищеного білка в нативних умовах ми провели гель-фільтрацію на колонці Superose 6HR (рис. 3.1б). Маса повнорозмірного eEF1Ba згідно калібрувальної кривої була визначена як 75 кДа, що є втричі більшою за теоретично розраховану – 25.5 кДа. Варто наголосити, що в процесі гель-фільтрації молекули розділяються за радіусом Стокса, тож отриманий результат можна пояснити як олігомеризацією білка, так і несферичною формою його молекули, або обома чинниками одночасно.

Визначення точної молекулярної маси білка можна здійснити за допомогою аналітичного ультрацентрифугування (АУЦ) (175), тож ми використали цей метод (рис. 3.1в), щоб вирішити питання про олігомеризацію

eEF1B α . Швидкісне ультрацентрифугування (ШУЦ) препарату повнорозмірного eEF1B α показало присутність у розчині молекул одного типу, які мають коефіцієнт седиментації $S_w = 0.932S$ (коефіцієнт седиментації, скорегований на стандартні умови для водного розчину при 20°C, $S_{20,w} = 1.91S$), і їх вміст складає близько 93,4% від загального адсорбційного сигналу (рис. 3.1в, права панель). Відомо, що швидкість седиментації молекули обернено пропорційна її коефіцієнту тертя у розчині, який в свою чергу залежить від форми молекули. Програма SEDFIT дає можливість встановити співвідношення коефіцієнтів тертя f/f_0 досліджуваної молекули, де f є реальним коефіцієнтом тертя молекули, а f_0 – теоретично розрахованим коефіцієнтом тертя гладкої сфери. Таким чином, співвідношення f/f_0 , що дорівнює 1, відповідає седиментації ідеальної сфери. Збільшення значення цього співвідношення вказує на певну асиметрію та/або гідратацію молекули. Для гідратованих сферичних білків f/f_0 приблизно дорівнює 1.2. Подальше збільшення цього значення вказує на збільшення асиметричності, тобто на певний ступінь видовженості молекули.

В результаті обчислення седиментаційних кривих eEF1B α в програмі SEDFIT, ми отримали оптимальне співвідношення $f/f_0=1.64$, що вказує на помірну видовженість молекули цього білка. Розрахована молекулярна маса eEF1B α становила 25.5 кДа, що відповідає теоретичній масі мономера.

Окрім співвідношення коефіцієнтів тертя, форму молекули також можна оцінити з використанням обчисленого нами для eEF1B α коефіцієнту седиментації. Якщо прийняти, що значення S_{max} – це максимально можливий коефіцієнт седиментації, для випадку молекули у вигляді гладкої сфери без зв'язаної води, а S – визначений експериментально коефіцієнт для досліджуваного білка, то розраховане співвідношення S_{max}/S буде показником асиметрії цього білка (157). Розраховане для eEF1B α S_{max}/S становило 1.6, що разом із раніше отриманим значенням співвідношення f/f_0 дозволяє зробити висновок про помірно видовжену форму його молекули.

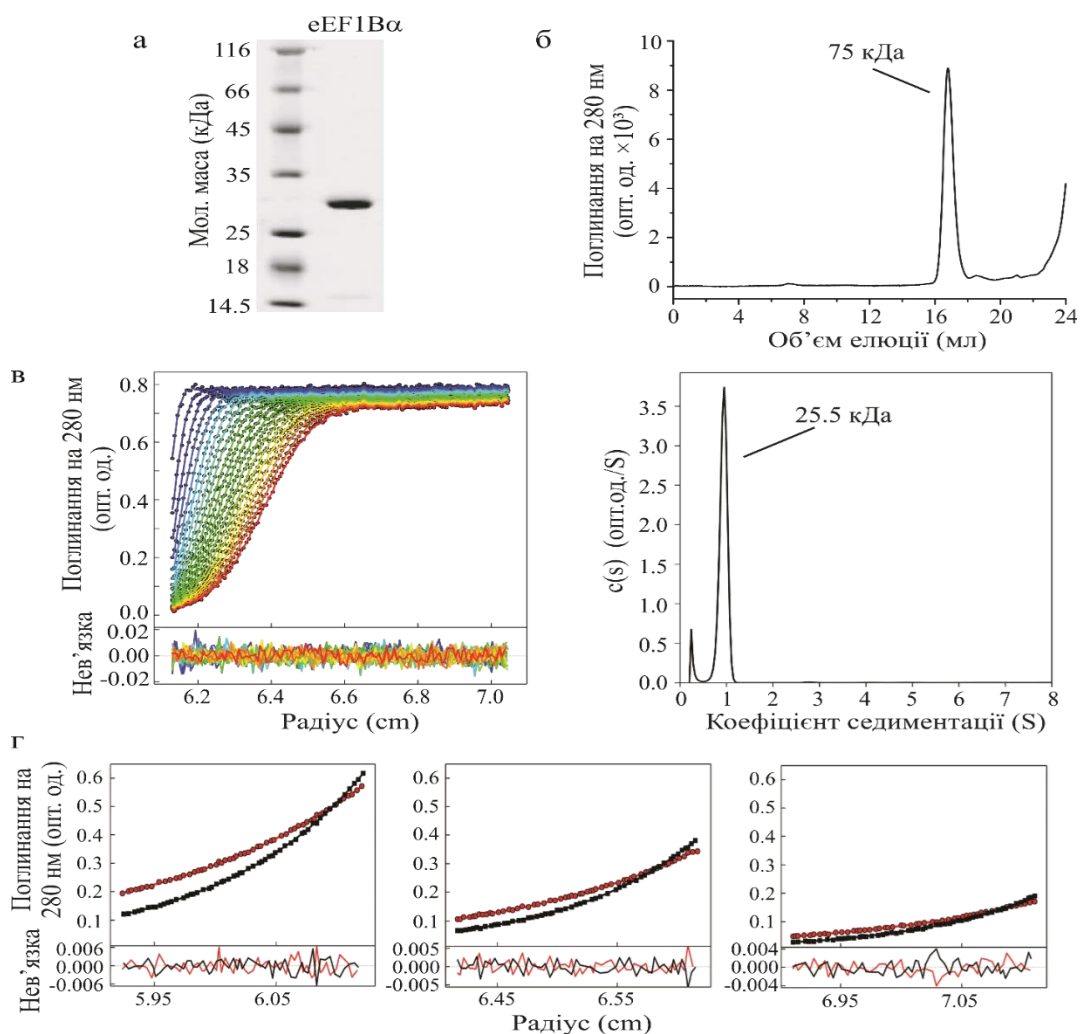


Рис. 3.1. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного eEF1B α людини. (а) електрофореграма eEF1B α в 12% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах, (б) хроматограма eEF1B α на Superose 6HR, (в) седиментограма ШУЦ препарату eEF1B α з концентрацією 0,85 мг/мл. Ліва панель: сукупність седиментаційних кривих. Права панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $c(s)$ від s . (г) седиментограми РУЦ препаратів eEF1B α з концентраціями 0,2 мг/мл (ліворуч), 0,12 мг/мл (по центру) та 0,06 мг/мл (праворуч). Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки під час центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам. Червоний – профілі отримані при досягненні термодинамічної рівноваги на кутових швидкостях 17000 об/хв., чорний – 21000 об/хв

Таким чином, отримані результати пояснюють перевищення значення молекулярної маси eEF1B α , визначене методом гель-фільтрації, в порівнянні з теоретично розрахованим.

Рівноважне ультрацентрифугування (РУЦ) дозволяє більш точно визначити молекулярну масу білка, до того ж при використанні цього методу форма молекули не грає ролі. Принцип методу полягає в досягненні рівноваги між дифузією білка у розчин та його осадженням в процесі центрифугування. В результаті утворюється такий розподіл білка, де його концентрація збільшується експоненційно в напрямку дна кювети. Логарифмічний графік залежності концентрації білка від квадрату радіусу обертання при досягненні рівноваги має вигляд прямої, по куту нахилу якої розраховується молекулярна маса цього білка. Цей математичний принцип закладений у програмі SEDPHAT, яку ми використали для визначення молекулярної маси eEF1B α . Експериментальні дані обраховували у програмі SEDPHAT з використанням моделі седиментації монодисперсного розчину молекул, які не взаємодіють між собою. При аналізі шести окремих седиментаційних кривих, вирахована молекулярна маса eEF1B α становила 26.3 ± 2.6 кДа. Полішвидкісний аналіз даних центрифугування при різних концентраціях білка показав масу 25.5 кДа, що узгоджується з великою точністю з теоретично розрахованим значенням (рис. 3.1г). Таким чином ми з'ясували, що повнорозмірна субодиниця eEF1B α існує у розчині у стані мономеру помірно видовженої форми.

Субодиниця eEF1B α має найбільш консервативну послідовність серед еукаріотичних факторів елонгації (рис. 2.1) і представляє собою двудоменний білок. В його структурі виділяють консервативні N-кінцевий (амінокислотні залишки 1-62) та C-кінцевий (амінокислотні залишки 97-228) домени пов'язані лінкерним регіоном (рис. 3.2а). C-кінцевий домен в свою чергу містить субдомени CAR та GEF.

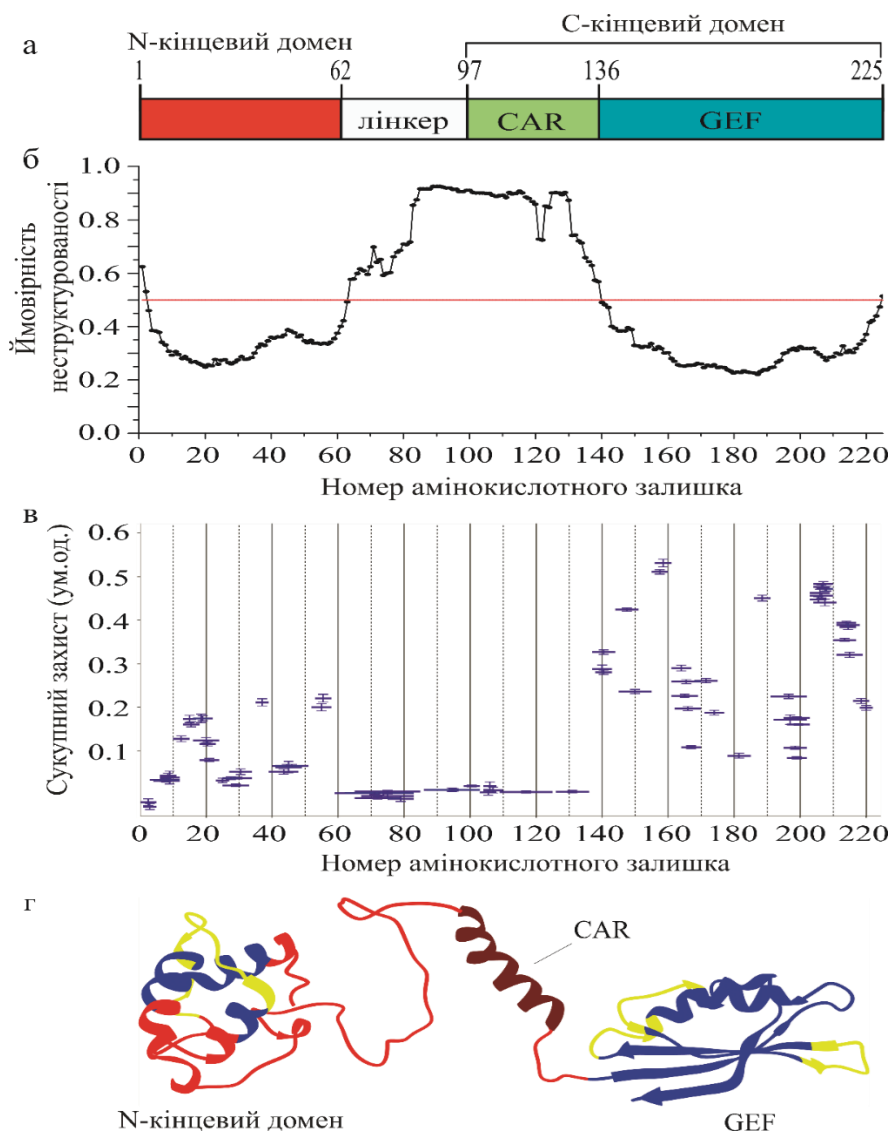


Рис. 3.2. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в eEF1Bα людини і модель його просторової організації. (а) схематичне зображення доменної організації eEF1Bα. Аббревіатури: CAR - центральний негативно заряджений регіон, GEF - домен, який прискорює обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A. (б) Прогнозування неструктурованих ділянок у молекулі eEF1Bα з використанням серверу MetaDisorderMD2. (в) Визначення динамічних і ригідно-структурованих регіонів в молекулі eEF1Bα методом H/D MS. (г) Модель просторової організації eEF1Bα, побудована з використанням програми Modeller Ригідно-структуровані регіони білка визначені методом H/D MS позначені синім, незахищені області - червоним, слабо захищені динамічні ділянки - жовтим

Наступним кроком ми проаналізували послідовність eEF1Ba людини на мета-сервері MetaDisorderMD2. Аналіз амінокислотної послідовності eEF1Ba показав з високою ймовірністю (>50%) наявність в ньому довгого неструктурованого регіону, який охоплює амінокислотні залишки від 64 до 139, і відповідає ділянці лінкера та CAR-домену (рис. 3.2б).

Щоб експериментально перевірити ці теоретичні розрахунки ми застосували метод воднево-дейтерієвого обміну з наступним мас-спектрометричним аналізом (H/D-MS), який дозволяє отримати інформацію про динамічні або, навпаки, ригідно-структуровані ділянки в структурі білка (176). Як було зазначено вище, принцип методу полягає у моніторингу швидкості обміну водню амідних груп поліпептидного ланцюга на дейтерій. Швидкість H/D обміну залежить в основному від доступності атомів водню для розчинника та стабільності внутрішньо молекулярних водневих зв'язків (177,178).

Спочатку ми вимірювали кінетику включення дейтерію в послідовність eEF1Ba. В результаті ми отримували показник сукупного захисту для кожного пептиду, який знаходився в діапазоні від 0 (100% включення дейтерію) до 1 (0% включення дейтерію) (рис. 2.4). Отримані дані представляли у вигляді графіку, де по абсцисі відкладали номер амінокислотного залишку, а по ординаті – значення сукупного захисту пептидів. Як видно з рис 3.2в, частина пептидів N-кінцевого домену eEF1Ba (залишки 1-60) та GEF-домену (залишки 136-225) мають сукупний захист більше 0.15 умовних одиниць, що вказує на їх приналежність до ригідно-структурованих ділянок. Інша частина пептидів має захист в діапазоні від 0 до 0.15 умовних одиниць, що свідчить про їх належність до динамічних регіонів. При цьому варто зазначити, що пептиди N-кінцевого домену eEF1Ba у порівнянні з GEF-доменом мають нижчі значення сукупного захисту, що може свідчити про більш динамічну структурну організацію N-кінцевого домену. Пептиди, що охоплюють лінкерну область (залишки 59-96) та домен CAR (залишки 97-136), демонструють нульовий захист. Це свідчить про те, що їх ланцюгові водні

дуже швидко заміщуються дейтерієм, що характерно для динамічних областей білка. MetaDisorderMD2 передбачає, що область лінкера та CAR-домен можуть бути неструктурованими і, відповідно, мати значну конформаційну свободу. Отже, ми експериментально підтвердили, що лінкер та CAR-домен субодиниці eEF1B α є структурно динамічними (рис. 3.2б).

Наступним кроком нашої роботи було створення атомарної моделі повнорозмірного eEF1B α . Для цього ми використали доступні структури N-кінцевого та GEF-доменів eEF1B α (PDB ID: 5DQS та ID: 1B64 відповідно) та високо гомологічної C-кінцевої ділянки eEF1B β (PDB ID: 2N51) як шаблони для моделювання в програмі Modeler. В результаті гомологічного моделювання ми отримали 50 структур молекули eEF1B α . Всі структури мають подібну доменну організацію, зокрема містять структуровані N- та GEF-домени і α -спіральний CAR, який знаходиться між ними і з'єднаний з вищеозначеними доменами неструктурованими лінкерними регіонами. Відмінності моделей полягають в різній орієнтації N- та GEF-доменів в просторі. Враховуючи, що eEF1B α має помірно видовжену форму в розчині, ми обрали одну репрезентативну модель із відповідною конформацією, показану на рис. 3.2г. Якість цієї моделі було перевірено веб-сервером MolProbity та вдосконалено сервером YASARA по мінімізації енергії.

Ми співставили створену нами структурну модель eEF1B α з результатами N/D-MS аналізу, позначивши синім ригідно-структуровані (сукупний захист $>0,15$ ум. од.), а жовтим (сукупний захист $0,05-0,15$ ум. од.) та червоним (сукупний захист $<0,05$ ум. од.) – динамічні ділянки цього білка (рис. 3.2в,г). N-кінцевий домен eEF1B α складається з трьох α -спіралей. Ділянки α -спіралей, позначені синім, ймовірно, беруть участь у формуванні ядра домену і тому є жорстко-структурованими, в той час як неструктуровані петлі з прилеглими частинами α -спіралей демонструють слабкий або відсутній захист, що підтверджує їх динамічну організацію. Ділянка лінкера, як передбачено MetaDisorderMD2 є неструктурованою, що узгоджується з відсутністю захисту від обміну N/D (рис. 3.2б,в,г), але цікаво, що не було

виявлено захисту для пептидів, які входять до складу домену CAR – ізольованого α -спірального елемента в eEF1 α (рис. 3.2в,г). Ця α -спіраль розташована між динамічними лінкерами і може зазнавати локальних флуктуацій, які призводять до розриву Н-зв'язків і доступу дейтерію до атомів амідного водню (179). Звичайний метод Н/D-MS, який ми використали в цьому дослідженні, швидше за все, є недостатньо чутливим, щоб виявити вторинний елемент, який є слабо-структурованим (має слабкі водневі зв'язки) та/або динамічним (180). Щоб відрізнити домен CAR від незахищених і неструктурованих ділянок цього білка, ми виділили його темно-червоним кольором на моделі (рис. 3.2г).

GEF-домен має компакту укладку, що сформована двома α -спіралями та β -лишком. Дані Н/D-MS свідчать, що більша частина цього домену є високозахищеною від обміну водню на дейтерій за виключенням трьох петель, які з'єднують між собою елементи вторинної структури, ймовірно, через їх локальні конформаційні коливання (рис. 3.2г).

Таким чином, модель структурної організації eEF1 α , згідно якої цей білок складається з двох структурованих доменів (N-кінцевого та GEF) з'єднаних між собою структурно динамічними лінкером та CAR-доменом, корелює з даними Н/D-MS аналізу.

3.1.2. Функціональні особливості субдиниці eEF1 α . Відомо, що С-кінцевий домен eEF1 α відповідає за обмін гуанінового нуклеотиду на факторі eEF1A, тоді як N-кінцевий домен взаємодіє з субдиницею eEF1 γ , утворюючи міцний комплекс (94,96). С-кінцевий домен eEF1 α є необхідним і достатнім для виконання функції обміну, однак було показано, що eEF1 γ підвищує активність eEF1 α при утворенні з ним комплексу (5). Це свідчить про те, що N-кінцевий домен eEF1 α може певним чином впливати на процес обміну гуанінового нуклеотиду. Тож ми вирішили дослідити таку можливість. Для цього ми створили набір вкорочених з N-кінця форм eEF1 α та окремо його N-кінцевий домен (рис. 2.2) на основі порівняльного аналізу первинних

послідовностей цього білка з різних організмів і визначенні його консервативних ділянок (рис. 2.1).

Рекомбінантні білки синтезували в *E.coli* та очищали як описано в розділі «Матеріали і методи». Чистота препаратів склала більше ніж 90% згідно з даними електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.3, верхня ліва панель).

Для аналізу ступеня олігомеризації білків проводили гель-фільтрацію на колонці Superose 6HR (рис. 3.3). Цікаво, що видалення частини N-кінцевого домену не призводило до суттєвої зміни об'єму елюції трьох його вкорочених форм у порівнянні з повнорозмірним eEF1B α .

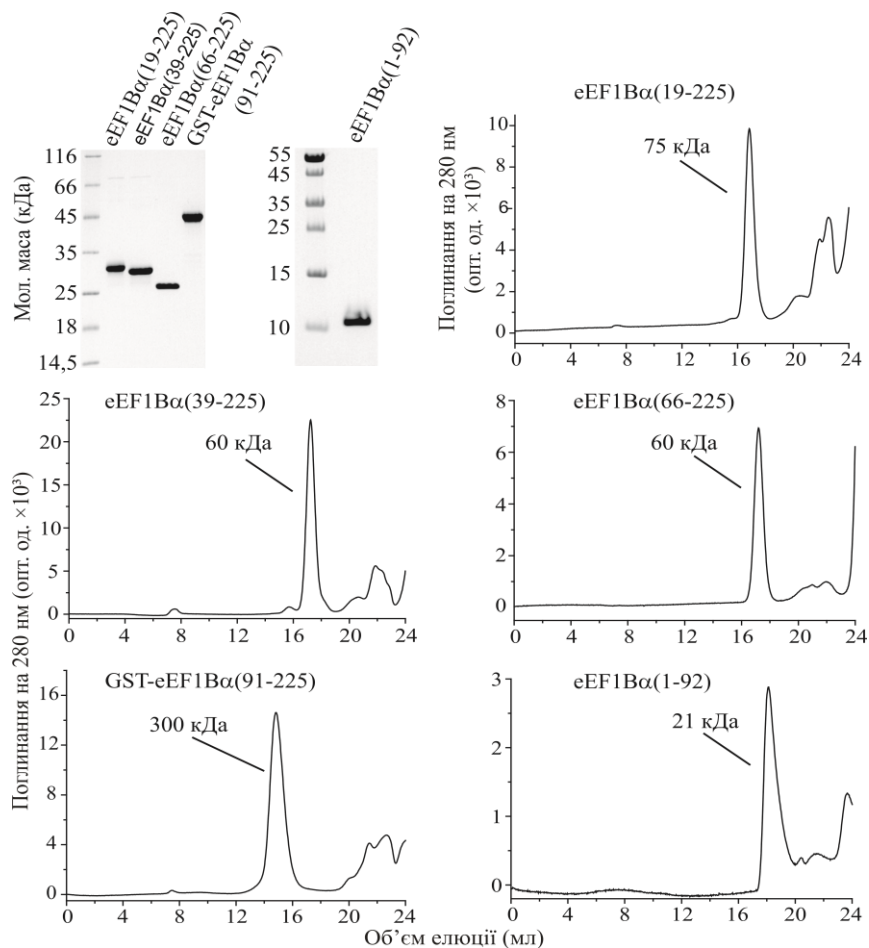


Рис. 3.3. Характеристика очищених препаратів вкорочених форм eEF1B α методами гель-електрофорезу в денатуруючих умовах і гель-фільтрації в нативних умовах

Так eEF1B α (19-225) елюювався з колонки в тому ж самому об'ємі, що і повнорозмірний білок (рис. 3.16). eEF1B α (39-225) та eEF1B α (66-225) показували молекулярну масу близько 60 кДа, що також значно перевищує їх теоретично-розраховані молекулярні маси. Молекулярна маса GST-eEF1B α (91-225) становила близько 300 кДа, але у цьому випадку треба додатково зважати на димеризацію GST.

Молекулярна маса N-кінцевого домену eEF1B α (1-92), визначена по гель-фільтрації, також перевищувала теоретично розраховане значення майже вдвічі, тобто 21 кДа та 11 кДа відповідно (рис. 3.3). Узагальнюючи результати гель-фільтрації вкорочених форм eEF1B α , ми можемо зробити висновок, що всі досліджені білки мають щонайменш двократне перевищення їх теоретично розрахованих молекулярних мас. Таку розбіжність можна пояснити їхньою мультидоменною організацією та видовженою формою, подібно до повнорозмірного eEF1B α (рис. 3.16). Однак, ми не можемо виключити можливості їхньої олігомеризації, тому всі вкорочені білки ми додатково проаналізували за допомогою АУЦ (рис. 3.4).

По седиментограмі (рис. 3.4а) ми бачимо, що розчин eEF1B α (19-225) є монодисперсним, і питомий вміст цього білка складає 92,4% від загального адсорбційного сигналу. При оптимальному співвідношенні коефіцієнтів тертя $f/f_0=1,86$, молекулярна маса eEF1B α становила 20 кДа, що наближається до теоретично розрахованої маси мономеру 22,7 кДа. Розраховане співвідношення $S_{\max}/S=2,02$, що свідчить про сильно видовжену форму цієї молекули.

Центрифугування eEF1B α (39-225) виявило наявність полідисперсності у цьому препараті. Графік розподілу $c(s)$ показує присутність трьох седиментуючих видів молекул, частка яких з найменшим коефіцієнтом седиментації становила 49,3%, середнім – 9,9%, а найбільшим – 40,8% від загального адсорбційного сигналу.

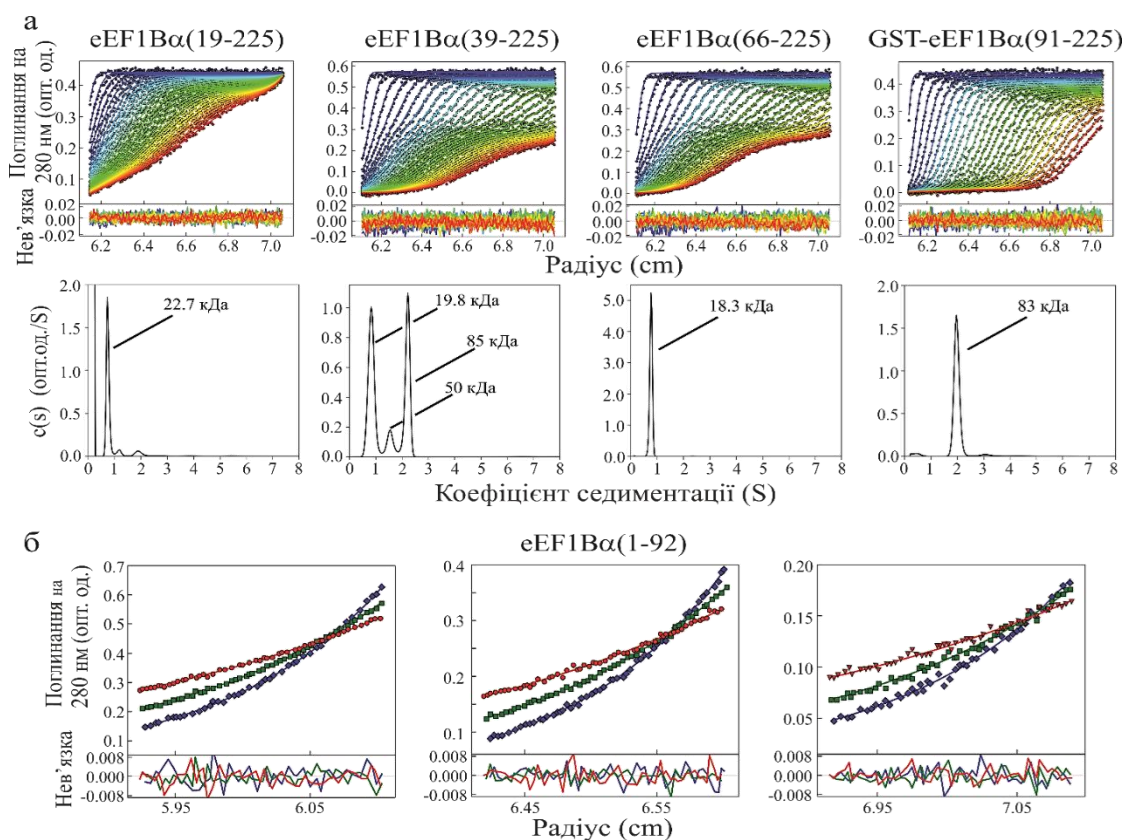


Рис. 3.4. Характеристика очищених препаратів вкорочених форм eEF1 α методами аналітичного ультрацентрифугування

(а) седиментограми ШУЦ препаратів eEF1 α (19-225), eEF1 α (39-225), eEF1 α (66-225) і GST-eEF1 α (91-225) з концентраціями 0,30 мг/мл, 0,37 мг/мл, 0,47 мг/мл і 0,28 мг/мл, відповідно. Верхня панель: сукупність седиментаційних кривих. Нижня панель: графіки функцій відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $s(s)$ від s для зазначених вище вкорочених форм eEF1 α . (б) седиментограми РУЦ препарату eEF1 α (1-92), отриманих при трьох концентраціях білка: 0,25 мг/мл (зліва), 0,15 мг/мл (по центру), 0,07 мг/мл (справа). Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки в процесі центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам Седиментаційні профілі eEF1 α (1-92) червоного, зеленого і синього кольорів було отримано при досягненні білком стану термодинамічної рівноваги на кутових швидкостях 20000, 25000 і 30000 об/хв., відповідно

Для оптимального співвідношення $f/f_0=1.64$ молекулярна маса першого, другого та третього типів молекул була оцінена як 19,8, 50 та 85 кДа, відповідно. Значення S_{max}/S становили 1,68, 1,43 та 1,59, відповідно. Так як теоретична маса цього білка складає 20,5 кДа, аналізований препарат скоріше за все являє собою суміш його мономерів, димерів та тетрамерів. Отримані данні не відповідають результатам гель-фільтрації, де ми спостерігали незначні кількості олігомерів (рис. 3.3.). До того ж коли препарат, який використовували для ультрацентрифугування, повторно перевірили на гель-фільтрації, він також показав відсутність олігомерів. Це може свідчити про зворотність олігомеризації eEF1B α (39-225). Аналіз eEF1B α (66-225) показав монодисперсність препарату цього білка з питомим вмістом 98,7% від загального адсорбційного сигналу. Для оптимального співвідношення $f/f_0=1,69$ його молекулярна маса була оцінена як 18,3 кДа, що наближається до теоретично розрахованої маси мономеру 17,5 кДа. Співвідношення S_{max}/S становило 1,63, що свідчить про помірно видовжену форму цієї молекули. GST-eEF1B α (91-225) седиментує як монодисперсний білок, питомий вміст якого становить 91,2% загального адсорбційного сигналу. З оптимальним співвідношенням $f/f_0=1,73$, молекулярна маса цього білка становила 83 кДа, що відповідає молекулярній масі димера, так як теоретично розрахована маса мономера складає 42,2 кДа. Співвідношення $S_{max}/S=1,75$ свідчить про помірно видовжену форму цієї молекули.

Молекулярну масу eEF1B α (1-92), що відповідає N-кінцевому домену з частиною лінкерного регіону, визначали за допомогою РУЦ через обмеження використання ШУЦ для білків з малою молекулярною масою. Аналіз даних дев'яти експериментальних кривих, отриманих на різних швидкостях та при різних концентраціях eEF1B α (1-92), показав значення молекулярної маси $10,6\pm 1$ кДа. Полішвидкісний аналіз даних центрифугування білка за різних концентрацій показав масу $11,5\pm 1$ кДа, що узгоджується з теоретично розрахованим значенням (10,5 кДа).

У підсумку можна сказати, що подібно до повнорозмірного eEF1B α , його вкорочені форми існують в розчині у вигляді мономерів, за виключенням GST-eEF1B α (91-225), який димеризується за рахунок GST. Співвідношення S_{\max}/S знаходиться в межах 1,68-2,02 і є властивим для несферичних білків з помірно та сильно видовженою формою молекули. Це пояснює їх завищену молекулярну масу, визначену при гелі фільтрації. Варто зазначити, що найбільше співвідношення f/f_0 належить саме eEF1B α (19-225) – 1,86, що свідчить на користь структурного розгортання N-кінцевого домену внаслідок видалення перших 18 амінокислотних залишків цього білка.

Надалі вкорочені форми eEF1B α перевіряли в реакції обміну гуанінового нуклеотиду на факторах eEF1A1 та eEF1A2 і порівнювали з активністю повнорозмірного білка. На рис. 3.5 видно, що зменшення довжини eEF1B α на 18 амінокислот з N-кінця призводить до незначного пришвидшення обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на факторі eEF1A2, у той час як видалення 38 амінокислот пришвидшує обмін майже вдвічі. Видалення 65 амінокислотних залишків N-кінцевого домену більше ніж в 2,5 рази збільшує швидкість обміну гуанінового нуклеотиду. GST-eEF1B α (91-225), в якому видалено N-кінцевий домен разом з наступним лінкерним регіоном, проявив таку ж саме швидкість обміну, як і попередній білок eEF1B α (66-225). Таким чином, ми спостерігаємо цікаву тенденцію до збільшення швидкості обміну гуанінового нуклеотиду при видаленні N-кінцевого домену eEF1B α . Аналогічний ефект спостерігався при взаємодії eEF1B α з eEF1B γ . Ми виміряли константу швидкості обміну нуклеотиду на eEF1A2 у присутності комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ і виявили, що вона в 3,6 разів вища в порівнянні з індивідуальною субодиницею eEF1B α . Отже, видалення N-кінцевого домену eEF1B α або його зв'язування з eEF1B γ призводило до подібного впливу на швидкість реакції обміну нуклеотиду.

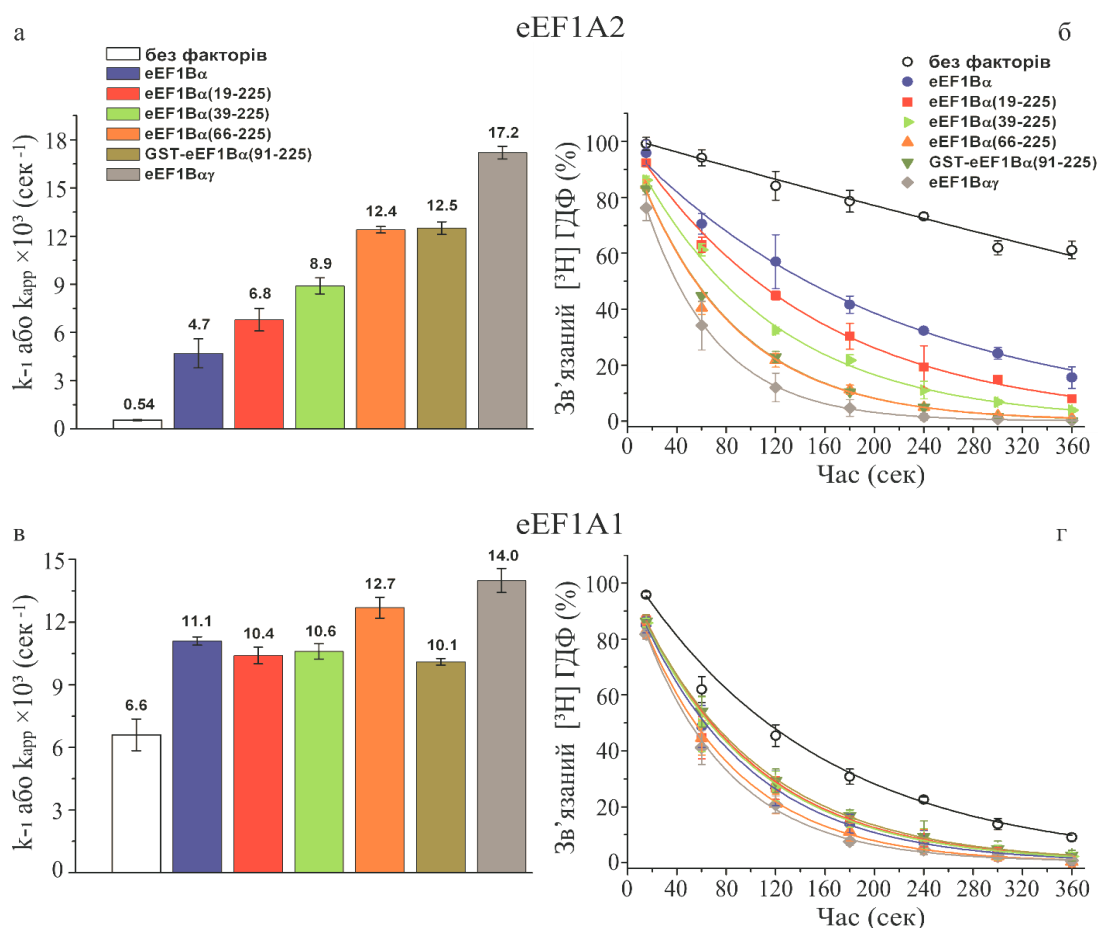


Рис. 3.5. Вплив еEF1Bα і його вкорочених форм, а також комплексу еEF1Bαγ на швидкість реакції обміну гуанінового нуклеотиду на факторах еEF1A1 і еEF1A2.

(а) і (в). Порівняльні діаграми констант швидкості першого порядку (k_{-1}) реакції спонтанного обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$, а також спостережних констант швидкості (k_{app}) реакції обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$ у присутності еEF1Bα, його вкорочених форм і комплексу еEF1Bαγ на факторах еEF1A1 і еEF1A2, (б) і (г) Кінетичні криві реакції обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$ на еEF1A1 і еEF1A2 у відсутності або у присутності еEF1Bα, його вкорочених форм і комплексу еEF1Bαγ

Щодо реакції обміну нуклеотиду на ізоформі еEF1A1, то вкорочення еEF1Bα з N-кінця несуттєво вплинуло на зміну швидкості її протікання. Відносно низький позитивний ефект спостерігався лише при видаленні 65

амінокислотних залишків з N-кінця eEF1В α , у порівнянні з повнорозмірною субодиницею. Ефект додавання eEF1В γ був також незначний, швидкість обміну нуклеотиду комплексом eEF1В $\alpha\gamma$ збільшилась лише приблизно на 20%. Тим не менш, варто відмітити, що тенденція до підвищення швидкості обміну гуанінового нуклеотиду при видаленні N-кінцевого домену або при утворенні комплексу із субодиницею eEF1В γ все ж таки зберігалась.

Необхідно зазначити, що дані кінетичних експериментів, отримані для обох ізоформ, складно порівнювати безпосередньо через різницю температурних умов та концентрацій факторів обміну нуклеотиду в реакціях. Константа швидкості дисоціації ГДФ з eEF1A1 суттєво вища навіть при 0°C ($k_{-1} = 6.6 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$), в порівнянні з eEF1A2 при 25°C ($k_{-1} = 5.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$). Крім того, щонайменше 5-кратно вища концентрація eEF1В α та його вкорочених форм була потрібна для суттєвого впливу на обмін [^3H]ГДФ/ГДФ на факторі eEF1A1 у порівнянні з eEF1A2. Одним з пояснень цього феномену може бути припущення, що ізоформи eEF1A можуть взаємодіяти з eEF1В α по різному. До того ж обмін нуклеотиду на eEF1A1 вимірювали при значно нижчій температурі, що також могло ослабити білок-білкові взаємодії та зменшити стимулюючий ефект вкорочених форм eEF1В α .

Амінокислотні залишки, які безпосередньо беруть участь в процесі обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A, були ідентифіковані виключно на C-кінцевому домені eEF1В α (98). Було показано, що C-кінцеві домени eEF1В α *Artemia salina* (залишки 114-206) та *Saccharomyces cerevisiae* (залишки 110-205) утворюють комплекси з eEF1A, в той час як N-кінцеві домени eEF1В α – ні (94,181). Таким чином, ефект видалення N-кінцевого домену на швидкість обміну насправді був доволі неочікуваний. Одним з пояснень цього феномену може бути те, що N-кінцевий домен eEF1В α може якимось чином заважати взаємодії фактора eEF1A з C-кінцевим доменом eEF1В α . Це може бути пов'язано або з безпосереднім зв'язуванням eEF1A з N-кінцевим доменом eEF1В α або відбуватись через зменшення доступності C-кінцевого домену в результаті міждоменної взаємодії всередині eEF1В α . Щоб пролити світло на

це питання, ми розглянули взаємодію між N- та С-кінцевими доменами eEF1B α та фактором eEF1A2 за допомогою гелі-електрофорезу в нативних умовах. Завдяки різниці в молекулярних масах та ізоелектричних точках досліджуваних білків, ми могли спостерігати різницю в їхній рухливості в агарозному гелі. На електрофореграмі рис. 3.6. видно, що eEF1B α (66-225) (18,2 кДа, pI=4,4) рухається в напрямку катоду швидше, ніж eEF1B α (1-92) (10,6 кДа, pI=5). eEF1A2 (50,45 кДа, pI=9,1) рухається в напрямку аноду. При титруванні eEF1B α (66-225) або eEF1A2 зростаючою кількістю eEF1B α (1-92) не відбувається жодних змін в рухливості вищезазначених білків в гелі. Це свідчить про те, що фрагмент eEF1B α (1-92) не утворює стабільного комплексу ані з eEF1A2, ані з eEF1B α (66-225).

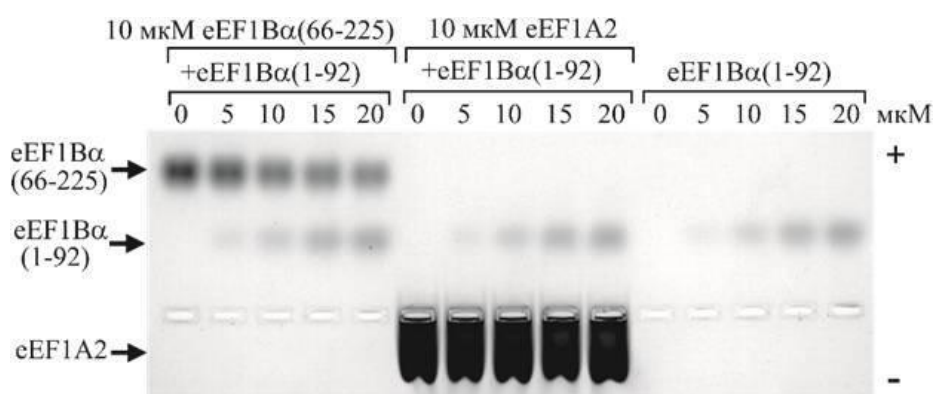


Рис. 3.6. Електрофореграма титрування С-кінцевого домену eEF1B α (eEF1B α (66-225)) і eEF1A2 N-кінцевим доменом eEF1B α (eEF1B α (1-92)).

10 мкМ eEF1B α (66-225) або eEF1A2 змішували з eEF1B α (1-92) в концентрації від 5 до 20 мкМ, інкубували при 37°C і наносили на 0,7% агарозний гелі для проведення електрофорезу в нативних умовах. Білки в гелі візуалізували за допомогою фарбування Кумасі

Відсутність прямої взаємодії між eEF1B α (1-92) та eEF1A2 дозволяє припустити, що N-кінцевий домен у складі повнорозмірного eEF1B α може

бути розташований таким чином, що заважає зв'язуванню фактора eEF1A з С-кінцевим доменом. В такому випадку можна очікувати різницю в спорідненості до eEF1A між повнорозмірним eEF1B α та eEF1B α (66-225). Ми перевірили цю можливість за допомогою гель-електрофорезу в нативних умовах (рис. 3.7).

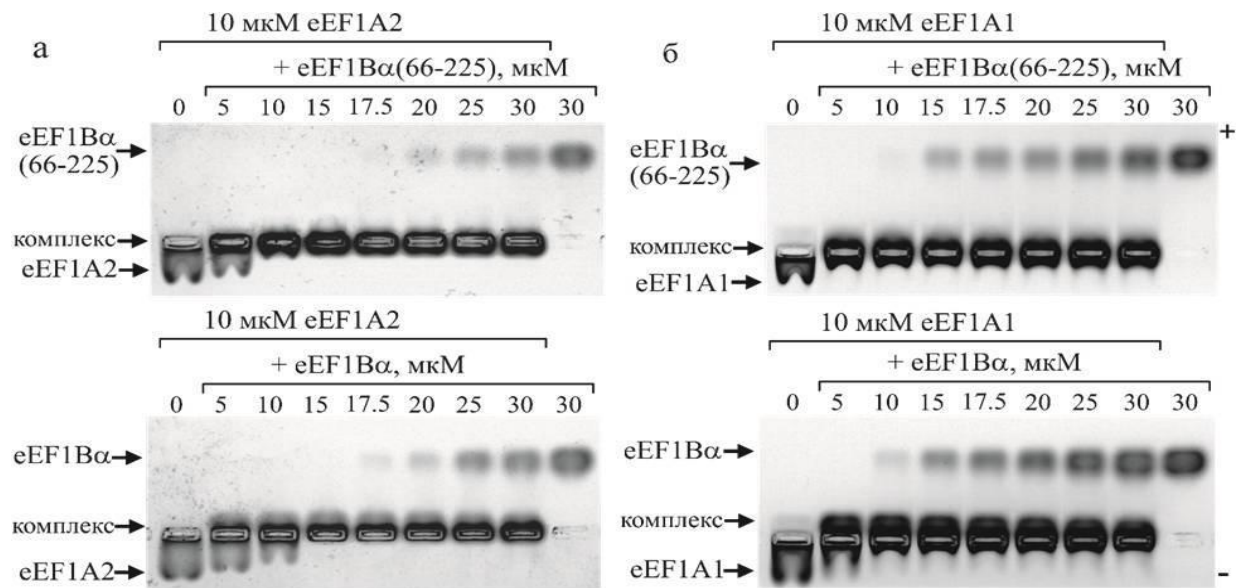


Рис. 3.7. Електрофореграма комплексів факторів eEF1A1 і eEF1A2 з eEF1B α і eEF1B α (66–225).

(а) 10 мкМ eEF1A2 змішували з eEF1B α (66–225) або eEF1B α в кінцевих концентраціях від 5 до 30 мкМ, інкубували при 37°C і наносили на 0,7% агарозний гель для проведення електрофорезу білків в нативних умовах в одному гелі. (б) 10 мкМ eEF1A1 змішували з eEF1B α (66–225) або eEF1B α в кінцевих концентраціях від 5 до 30 мкМ, інкубували при 37°C і наносили на 0,7% агарозний гель для проведення електрофорезу білків в нативних умовах в одному гелі. Білки в гелях візуалізували за допомогою фарбування Кумасі

Повнорозмірна субодиниця eEF1B α (25,5 кДа, pI=4,9), як і eEF1B α (66-225) (18,2 кДа, pI=4,4), рухається в напрямку катоду, обидві ізоформи фактора eEF1A рухаються подібним чином в напрямку аноду. При утворенні

комплексу eEF1A з eEF1Ba або ізольованим С-кінцевим доменом ми спостерігаємо зміну рухливості комплексу в гелі порівняно з вільними білками. На електрофореграмі рис. 3.7. ми бачимо, що eEF1Ba(66-225) утримує в комплексі обидві ізоформи фактора eEF1A краще, ніж повнорозмірний eEF1Ba, що підтверджує факт більш високої спорідненості ізольованого С-кінцевого домену до eEF1A.

Підсумовуючи отримані результати, ми можемо зробити висновок, що видалення N-кінцевого домену eEF1Ba, так само як і утворення комплексу eEF1Ba γ , стимулює обмін гуанінового нуклеотиду на факторі eEF1A. Якщо прийняти до уваги той факт, що просторове розташування N-кінцевого домену eEF1Ba може заважати зв'язуванню його С-кінцевого домену з фактором eEF1A, то вищезначений ефект можна пояснити наступним чином. При формуванні комплексу eEF1Ba γ N- та С-кінцеві домени eEF1Ba змінюють своє положення у просторі так, що відкривається вільний доступ до взаємодії останнього з фактором eEF1A. Фізичне видалення N-кінцевого домену eEF1Ba, відповідно, призводить до того ж самого результату.

Висновки до підрозділу 3.1.

Показано, що повнорозмірна субодиниця eEF1Ba є мономерним білком помірно видовженої форми. Теоретично передбачено та експериментально підтверджено наявність довгої неструктурованої ділянки, що з'єднує N- та С-кінцеві домени субодиниці eEF1Ba. Побудована модель структурної організації eEF1Ba.

Досліджено феномен пришвидшення обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1Ba в комплексі з eEF1B γ . Показано, що N-кінцевий домен eEF1Ba інгібує нуклеотид-обмінюючу активність повнорозмірного білка, тоді як його видалення, або зв'язування субодиницею eEF1B γ призводить до усунення цього інгібуючого ефекту. Отже, негативний вплив цього домену на

функціональну активність eEF1B α можна пояснити створенням перешкоди для зв'язування eEF1A з С-кінцевим доменом eEF1B α . Утворення комплексу eEF1B γ з N-кінцевим доменом eEF1B α змінює конформацію останнього і усуває таку перешкоду.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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

Trosiuk(Bondarchuk) T. V., Shalak V. F., Szczepanowski R. H., Negrutskii 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

3.2. Структурно-функціональна характеристика субодиниці eEF1B β

eEF1B β це характерний лише для вищих еукаріот компонент комплексу eEF1B. Структурних даних про субодиницю eEF1B β надзвичайно мало, в банку даних PDB DataBase є лише структура довгого фрагменту С-кінцевого домену цього білка (87,89). Функціонально ця субодиниця також досліджена слабо. Відомо, що на відміну від eEF1B α , субодиниця eEF1B γ не впливає на швидкість обміну гуанінового нуклеотиду при утворенні комплексу з eEF1B β (97), проте, незрозуміло, чим обумовлена така різниця. Відкритим також залишається питання, чи здатна eEF1B β здійснювати обмін на обох ізоформах eEF1A, адже експериментів з обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A2 проведено не було. Таким чином, ми вирішили дослідити повнорозмірну

eEF1V β за допомогою методів, які дозволять визначити його структурні особливості, побудувати його просторову модель та провести низку функціональних досліджень.

3.2.1. Структурна організація повнорозмірної субодиниці eEF1V β .

Щоб докладно дослідити субодиницю eEF1V β ми отримали повнорозмірний білок шляхом його синтезу в бактеріях. Рекombінантний білок очищали до ступеня гомогенності більше ніж 90% згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.8а).

Ступінь олігомеризації отриманого білка було досліджено за допомогою гель-фільтрації на колонці Superose 6HR (рис. 3.8б). Повнорозмірний eEF1V β елюювався з колонки в об'ємі, що відповідає молекулярній масі близько 350 кДа. Це значення приблизно в 11 разів більше значення молекулярної маси мономеру (31,9 кДа). Така розбіжність вже не може бути обумовлена лише неферичною формою молекули, як у випадку з субодиницею eEF1V α , тож свідчить на користь олігомерної організації eEF1V β .

Щоб визначити точну молекулярну масу та олігомерний стан eEF1V β ми застосували метод аналітичного ультрацентрифугування (рис. 3.8в,г). На седиментограмі ШУЦ повнорозмірної субодиниці eEF1V β за різних концентрацій ми бачимо, що препарат білка є монодисперсним і його коефіцієнт седиментації становить $S_w = 1,84 \pm 0,04 S$ ($S_{(20,w)} = 3,74 \pm 0,07 S$). При оптимальному співвідношенні коефіцієнтів тертя $f/f_0 = 1,97 \pm 0,07$ молекулярна маса білка була оцінена як 92 ± 4 кДа (рис. 3.8в). Ці значення є близькими до теоретичної молекулярної маси тримера eEF1V β (95,7 кДа). Розраховане співвідношення гідродинамічного параметру S_{max}/S склало $2,02 \pm 0,04$, що характерно для сильно витягнутих білків.

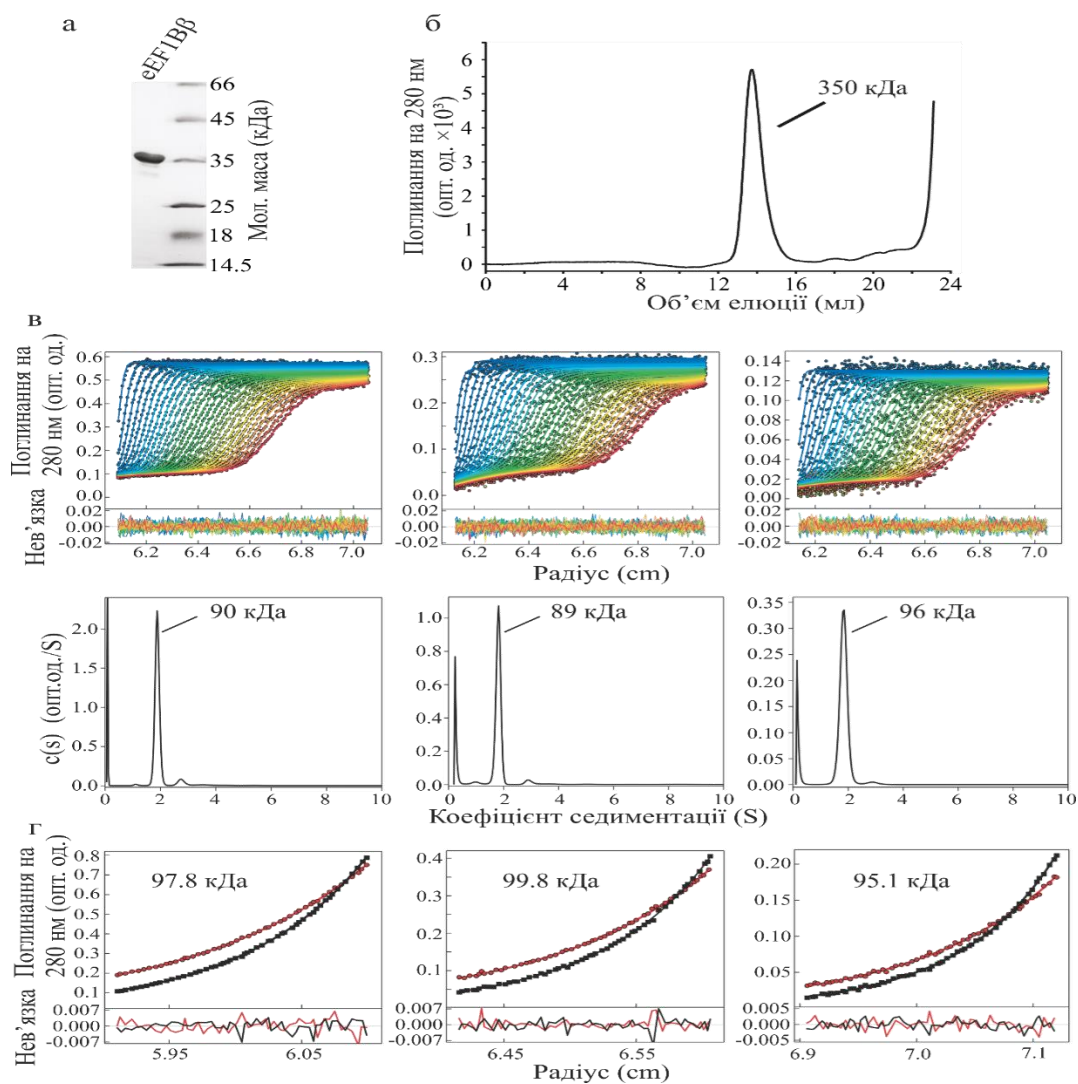


Рис. 3.8. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного eEF1B β людини. (а) електрофореграма eEF1B β в 13% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. (б) хроматограма eEF1B α на Superose 6HR. Седиментограма ШУЦ (в) та РУЦ (г) препарату eEF1B β з концентраціями 0,7 мг/мл (ліворуч), 0,35 мг/мл (по центру) та 0,17 мг/мл (праворуч). ШУЦ верхня панель: сукупність седиментаційних кривих, нижня панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $s(s)$ від s . На седиментограмі РУЦ символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки під час центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам. Профілі eEF1B β червоного кольору було отримано при досягненні термодинамічної рівноваги на кутовій швидкості 10000 об/хв., чорного – 12000 об/хв

Метод РУЦ був застосований для більш точної оцінки маси eEF1B β . Аналіз шести окремих седиментаційних кривих дозволив нам вирахувати молекулярну масу eEF1B β , яка склала 101,2 \pm 3,9 кДа. Полішвидкісний аналіз даних центрифугування при різних концентраціях білка (рис. 3.8г) показав масу 97,6 \pm 2,4 кДа, що є також близьким до теоретичної молекулярної маси тримера (95,7 кДа).

Таким чином, результати експериментів АУЦ дозволяють зробити висновок, що рекомбінантний eEF1B β є стабільним тримером у розчині і належить до типу білків із сильно витягнутою формою.

Згідно літературних даних, eEF1B β має доменну структуру і включає в себе N-кінцевий домен (амінокислотні залишки 1-80), мотив типу «лейцинова застібка» (LZ-мотив, амінокислотні залишки 81-115) та C-кінцевий домен, в якому виділяють CAR (амінокислотні залишки 153-192) та функціональний або GEF-домен (амінокислотні залишки 193-281). Між доменом типу «лейцинова застібка» та C-кінцевим доменом знаходиться довгий лінкерний регіон (рис. 3.9а).

Як вже згадувалось вище, N-кінцевий домен eEF1B β не має суттєвої гомології з будь-яким відомим білком та, згідно порівняльного аналізу первинних послідовностей (рис. 2.1), показує низьку гомологію серед еукаріотичних організмів. Він має певну консервативність лише на ділянці від 1 до 33 амінокислоти. Мотив типу «лейцинова застібка» eEF1B β привертає особливу увагу, адже містить 6 замість класичних 4 залишків лейцину, тож є нетипово довгим (90,110). Послідовності регіонів CAR та GEF, на відміну від N-кінцевого домену, є значно більш консервативними і мають високу гомологію з відповідними доменами субодиниці eEF1B α . Так само як і eEF1B α , завдяки наявності домену GEF, субодиниця eEF1B β здатна пришвидшувати обмін нуклеотиду на факторі eEF1A.

Структурна організація N-кінцевого домену, LZ-мотиву та довгого (38 амінокислотних залишків) міждоменного лінкерного регіону eEF1B β невідомі, тож ми вирішили проаналізувати цей білок за допомогою мета сервера

MetaDisorderMD2 щоб оцінити ступінь неструктурованості його послідовності (рис. 3.9б).

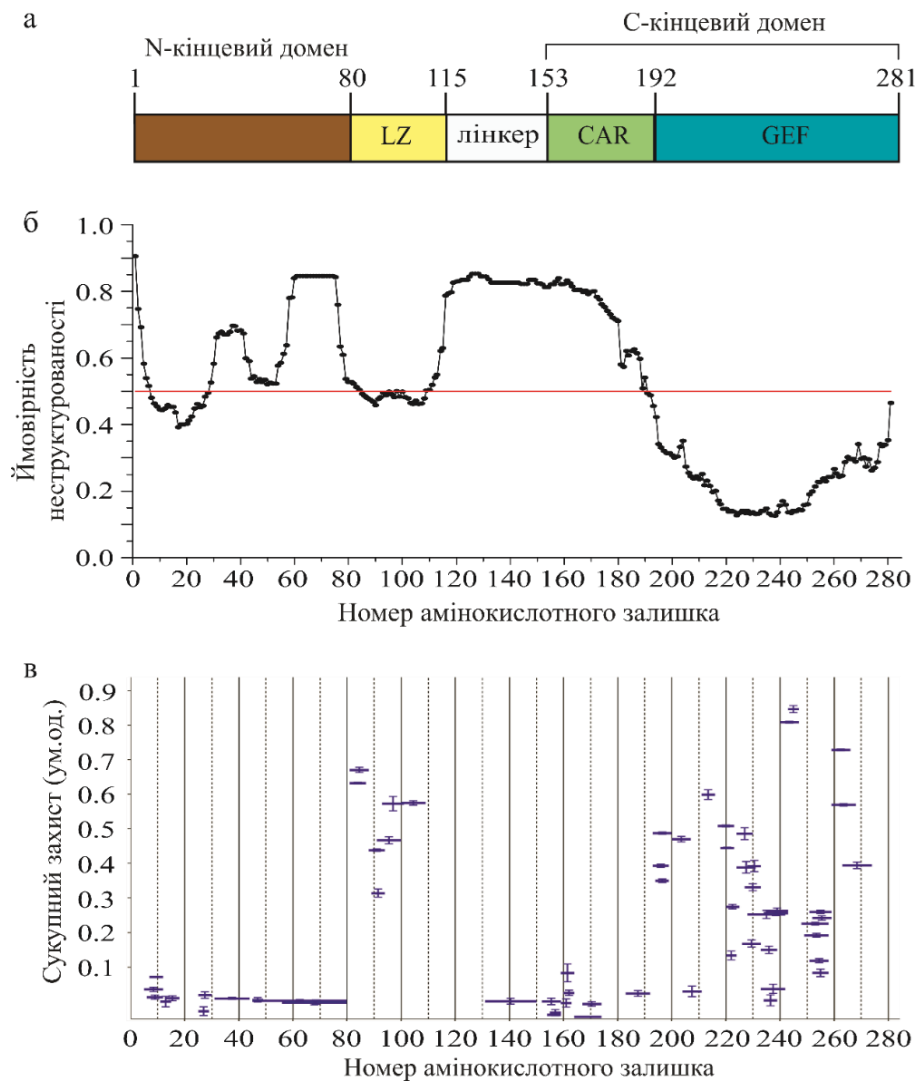


Рис. 3.9. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в структурі eEF1Bβ людини.

(а) схематичне зображення доменної організації eEF1Bβ. Аббревіатури: LZ - мотив типу «лейцинова застібка», CAR - центральний негативно заряджений регіон, GEF - домен, який прискорює обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A, (б) прогнозування неструктурованих ділянок у молекулі eEF1Bβ з використанням серверу MetaDisorderMD2, (в) визначення динамічних і ригідно-структурованих регіонів в молекулі eEF1Bβ методом N/D-MS

MetaDisorderMD2 передбачив високу ймовірність неструктурованості (>50%) для частини N-кінцевого домену та фрагмента, що включає в себе лінкерний регіон разом з CAR-доменом (залишки 64-190). Тоді як частина N-кінцевого домену, LZ-мотив і GEF є з високою ймовірністю структурованими.

Наступним кроком ми проаналізували eEF1B β за допомогою методу N/D-MS (рис. 3.9в), щоб експериментально оцінити його структурну динамічність. Результати експерименту виявились досить цікавими, адже доволі довгий регіон N-кінцевого домену (залишки 1-80) продемонстрував майже повну відсутність захисту від включення дейтерію (рис. 3.9в), що свідчить про його динамічність і, скоріш за все, відсутність ригідно-структурованої просторової укладки. LZ-мотив (залишки 81-118) сильно захищений; всі пептиди, що охоплюють цю область, демонструють значення агрегованого захисту в діапазоні 0,3-0,7. З літератури відомо, що мотиви типу «лейцинова застібка» взаємодіють між собою (110,182). Зважаючи на той факт, що повнорозмірний eEF1B β існує в розчині як тример, ми припускаємо, що саме цей регіон може відповідати за тримеризацію, що і обумовлює такий високий рівень захисту.

Всі пептиди з лінкерної області та CAR-домену мають рівень захисту близький до нульового. Переважна більшість пептидів, які входять до складу GEF домену, мають високі значення сукупного захисту від N/D обміну (рис. 3.9в), що корелює з відомою структурою цього домену (PDB ID: 2N51).

3.2.2. Характеристика N-кінцевого домену eEF1B β і моделювання його структурної організації. Як вже було зазначено вище, структура N-кінцевого домену eEF1B β наразі не розшифрована, тому ми застосували низку методів, щоб дослідити його більш детально. Спочатку ми створили конструкцію, клонувавши послідовність кДНК, яка кодує фрагмент з 1 по 77 амінокислотний залишки eEF1B β людини, в вектор pGEX6p-1. В результаті експресії в бактеріях і очищення ми отримали препарат eEF1B β (1-77) із

ступенем чистоти більше ніж 90% згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.10а).

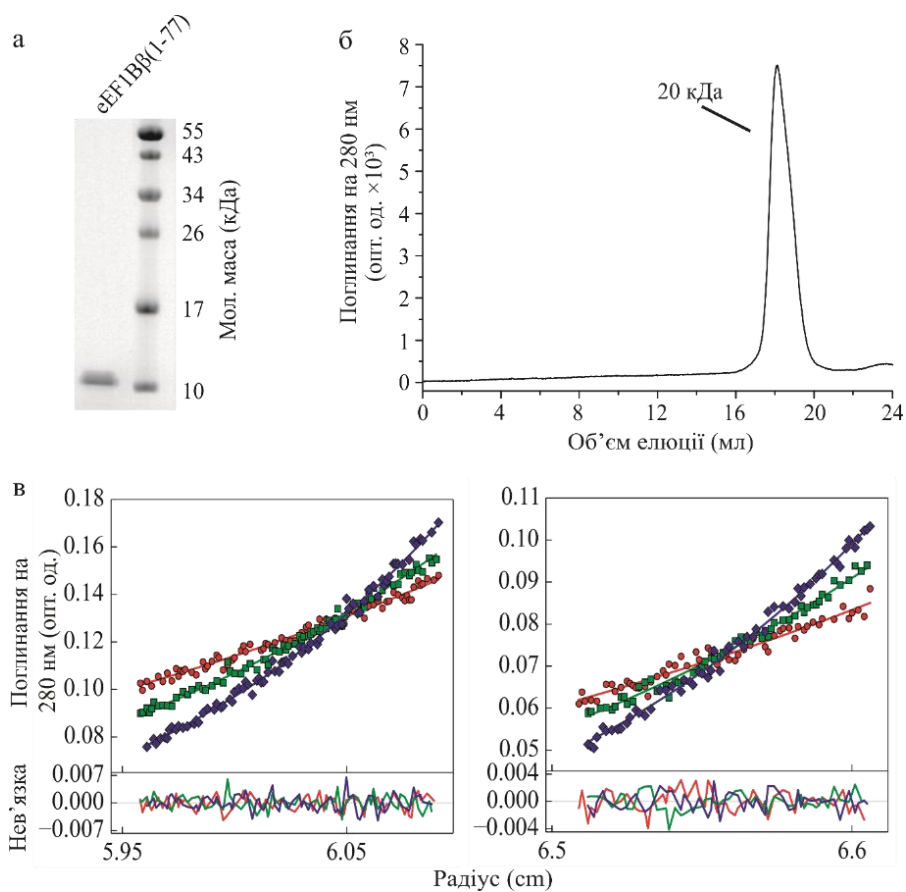


Рис. 3.10. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного eEF1B β (1-77) людини.

(а) електрофореграма eEF1B β (1-77) в 18% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. (б) хроматограма eEF1B β (1-77) на Superose 6HR. (в) седиментограми РУЦ препаратів eEF1B β (1-77) з концентраціями 0,14 мг/мл (ліворуч) та 0,09 мг/мл (праворуч). Седиментаційні профілі eEF1B β (1-77) червоного кольору було отримано при досягненні білком стану термодинамічної рівноваги на кутовій швидкості 20000 об/хв., седиментаційні профілі зеленого та синього кольорів – 25000 та 30000 об/хв. відповідно. Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки в процесі центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам

Ступінь олігомеризації eEF1B β (1-77) було досліджено за допомогою гель-фільтрації на колонці Superose 6HR, яка показала масу 20 кДа, тобто в 2 рази більшу за теоретично розраховану (рис. 3.10б). Для більш точного визначення молекулярної маси eEF1B β (1-77) ми використали метод РУЦ (рис. 3.10в).

Згідно результатів аналізу шести окремих седиментаційних кривих, молекулярна маса eEF1B β (1-77) дорівнює $9,13 \pm 0,4$ кДа, що наближається до теоретичної маси мономеру 9,2 кДа. Полішвидкісний аналіз даних центрифугування показав значення 8,61 та 9,49 кДа для 0,14 мг/мл і 0,09 мг/мл концентрації eEF1B β (1-77), відповідно, вказуючи на те, що очищений рекомбінантний eEF1B β (1-77) є мономером у розчині. Таким чином, ми показали, що eEF1B β (1-77), існує в розчині у вигляді мономеру і, скоріш за все, має помірно видовжену форму та/або збільшений гідродинамічний об'єм, що пояснює завищення його молекулярної маси в процесі гель-фільтрації.

Відповідно до передбачення MetaDisorderMD2, N-кінцевий домен eEF1B β може мати щонайменше одну структуровану ділянку (залишки 6-30) і потенційно структуровану коротку ділянку від 45 до 55 амінокислотного залишку (рис. 3.9б). З іншого боку, результати N/D-MS показують повну відсутність захисту для всієї послідовності N-кінцевого домену (рис. 3.9в), що свідчить про відсутність ригідно-структурованих ділянок в його складі. Це означає, що, якщо елементи вторинної структури є дійсно присутніми в структурі N-кінцевого домену eEF1B β , то вони мають динамічну просторову організацію.

Метод спектроскопії кругового дихроїзму (КД) у віддаленій УФ області (190-260 нм) застосовують для визначення вторинної структури білків, тож ми використали його для eEF1B β (1-77) (рис. 3.11). Для оцінки стабільності наявних елементів вторинної структури вимірювання проводилися при кількох температурах від 24 до 55°C. Спектри КД, записані для eEF1B β (1-77), мали типовий вигляд спектрів білків з високим вмістом α -спіралей. На всіх спектрах спостерігаються два мінімуми при 208 і 222 нм і максимум в області

195 нм. Математичний аналіз спектру, записаного при 24°C, за допомогою програми CDNN (таблиця 3.1.) показав, що 78,4% послідовності eEF1B β (1-77) представлено в α -спіральній конформації, а інша частина є неструктурованою. Поступове підвищення температури від 24°C до 55°C суттєво не змінює форму КД спектрів, але поступово зменшує вміст α -спіралей і відповідно збільшує вміст неструктурованих ділянок (рис. 3.11).

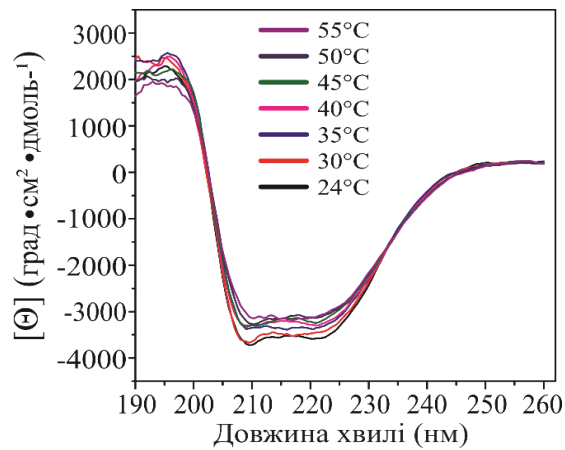


Рис. 3.11. Спектри КД eEF1B β (1-77) за різних температур.

Спектри записано в буферному розчині, який містив 5 мМ трис-НСІ, рН 7,5 і представлено у вигляді графіку залежності середньої еліптичності розрахованої на один амінокислотний залишок $[\Theta]$ від довжини хвилі

При 55°C eEF1B β (1-77) все ще мав значний вміст α -спіралей, який становив майже 68,5%. Тобто лише близько 10% α -спіральних елементів цього білка втрачається при 55°C в порівнянні з 24°C.

Аналогічні результати були отримані при обрахунку КД спектрів eEF1B β (1-77) програмою CONTILL (таблиця 3.2.). Загальний вміст α -спіралей у структурі eEF1B β (1-77) при нагріванні змінився від 78% при 24°C до 65,5% при 55°C. У той же час вміст неструктурованих ділянок, поворотів і β -листів збільшується з 22%, 0% і 0% при 24°C до 25,6%, 3,1% і 5,9%, відповідно, при 55°C.

Нормалізоване середньоквадратичне відхилення, приведене в Таблиці 3.2, коливалось у межах від 0,048 до 0,072 для різних кривих КД, що підтверджує точний розрахунок вторинної структури. Крім цього, спектри КД eEF1B β (1-77), отримані при різних температурах, були проаналізовані програмою CLUSTER, яка також прогнозує вміст вторинних елементів в білках за іншим алгоритмом. Результат, отриманий після аналізу цією програмою кожного спектру і приведений в Таблиці 3.2, був “переважно α -спіральна структура”.

Таблиця 3.1.

Оцінка вмісту елементів вторинної структури eEF1B β (1-77) по спектрам КД з використанням програми CDNN

температура, T,°C	Програма CDNN		
	α -спіралі, %	β -повороти, %	Неструктуровані ділянки, %
24	78.4	9.6	23.7
30	79.2	9.1	19.8
35	77.8	8.7	20.4
40	76.3	9.4	22.9
45	73.8	9.4	24.7
50	70.5	10.0	29.0
55	68.5	10.6	33.1

Примітка: Середня похибка прогнозу - 5,57%

Таким чином дані, обраховані за двома різними алгоритмами, дозволяють зробити висновок, що вторинна структура eEF1B β (1-77) складається переважно з α -спіралей та має невеликий відсоток неструктурованих ділянок, вміст яких незначно збільшується при нагрівання від 24 до 55°C.

Таблиця 3.2.

Оцінка вмісту елементів вторинної структури eEF1B β (1-77) по спектрам КД за допомогою програми CONTILL

T, °C	Програма CONTILL								Передбачення програмою CLUSTER
	α -спіралі			β -листки		Повороту	Неструктуровані	σ	
	(r), %	(d), %	(сума), %	(r),	(d),	%	%		
4	3.8	4.2	78	0	0	0	22.0	0.048	“all alpha”
0	2.3	4.1	76.4	0	0	6	22.9	0.054	“all alpha”
5	0.6	3.0	73.6	0	0	2.4	24.0	0.064	“all alpha”
0	6.4	3.3	67.7	0	0	4.2	26.2	0.061	“all alpha”
5	0.6	3.4	74	0	3	4.8	20.8	0.072	“all alpha”
0	6.5	2.3	68.8	0	1.9	4.3	24.9	0.065	“all alpha”
5	2.0	3.5	65.5	0	3.1	5.9	25.6	0.064	“all alpha”

Примітки: 1. Символи "r" та "d" у дужках означають регулярні та деформовані елементи вторинної структури, відповідно. 2. σ – нормалізоване середньоквадратичне відхилення

Для отримання додаткової інформації про структурну організацію eEF1B β (1-77) ми застосували метод КД-спектроскопії в ближньому УФ-діапазоні (250–350 нм). Цей підхід дозволяє отримати сигнал від ароматичних залишків амінокислот, величина якого залежить від оточення, в якому вони знаходяться (183,184). Отримання чітких спектрів свідчить про наявність гідрофобного кору в молекулі білка. КД-спектри eEF1B β (1-77) з концентрацією 56 мкМ в ближньому УФ-діапазоні мали вигляд базової лінії (нульовий сигнал, дані не представлено). Цей результат свідчить на користь відсутності гідрофобного ядра в N-кінцевому домені eEF1B β , однак не може розглядатися як беззаперечний доказ цього факту. Необхідні додаткові експерименти, які б підтверджували цей висновок.

У підсумку можна зазначити, що N-кінцевий домен eEF1B β , згідно результатів КД у віддаленій УФ області, складається переважно з α -спіралей та коротких неупорядкованих регіонів. Елементи вторинної структури утворюють динамічну просторову структуру відповідно до результатів N/D-MS.

Наступним нашим кроком було створення просторової атомарної моделі N-кінцевого домену eEF1B β . Для цього ми використали пакет програмного забезпечення Suite, який реалізує алгоритми на основі I-TASSER для прогнозування структури та функції білка (185).

В результаті моделювання програма класифікує створені моделі за параметром C, який є довірчим критерієм, що лежить в межах від -5 до 2. Чим вище значення має C-критерій, тим більша ймовірність існування саме цієї структурної моделі для досліджуваного білка. Окрім цього, програма розраховує TM-критерій, який вказує на подібність двох структур, що порівнюються між собою, а саме створеної найкращої структурної моделі і найбільш близької структури моделі-шаблону, який існує в базі даних. Значення TM-критерію більше 0.5 вказує на те, що створена модель має правильну топологію, а менше 0.17 означає випадкову подібність (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/example/cscore.txt>). Всі моделі

eEF1B β (1-77), створені I-TASSER, представлені на рис. 3.12. Модель 1 має найкращі показники всіх параметрів: С-критерій: 2,55, ТМ-критерій: 0,42 \pm 0,14 і RMSD: 8,9 \pm 4,6 Å. Інші чотири моделі мають значно нижчі показники якості в порівнянні з моделлю 1 (рис. 3.12.). Тим не менш, усі моделі мають наближений до експериментальних даних вміст α -спіралей та неструктурованих ділянок і відрізняються лише просторовою орієнтацією α -спіральних елементів. Отримані моделі додатково обраховували з використанням алгоритму ModRefiner. Після вдосконалення їх атомарних структур, вміст елементів вторинної структури становив: 72,7% α -спіралей, 0,0% β -листіків, 10,4% β -витків, і 16,9% неструктурованих регіонів (модель 1); 54,5% α -спіралей, 0,0% β -листіків, 26,0% β -витків, 19,5% неструктурованих областей (модель 2); 55,8% α -спіралей, 2,6% β -листіків, 13,0% β -витків, 28,6% неструктурованих областей (модель 3); 45,5% α -спіралей, 0,0% β -листіків, 10,4% β -витки, 44,2% неструктурованих областей (модель 4); 55,9% α -спіралей, 0,0% β -листіків, 20,8% β -витків, 23,4% неструктурованих областей (модель 5). Варто відмітити, що α -спіралі, які є єдиними структурованими елементами в eEF1B β (1-77), співпадають з його еволюційно-консервативними амінокислотними ділянками (рис. 3.12, нижня панель). Надалі конформація всіх 3D моделей eEF1B β (1-77) була підтверджена за допомогою серверу MolProbity. Діаграма Рамачандрана, яка описує значення двогранних кутів поліпептидного ланцюга, для всіх вдосконалених моделей показала, що 75 амінокислотних залишків (>99,8%) знаходяться у дозволених регіонах.

Необхідно зазначити, що жодна з наведених вище моделей не має гідрофобного ядра, а радикали гідрофобних амінокислот є експонованими до розчинника, включаючи єдиний залишок триптофану, присутній в цьому білку. Для перевірки такого твердження ми записали спектр емісії флуоресценції для цього залишку і встановили, що його максимум емісії знаходився на довжині хвилі 349 нм (дані не показані). Цей результат однозначно вказує, що залишок триптофану є експонованим і знаходиться в гідрофільному оточенні (186).

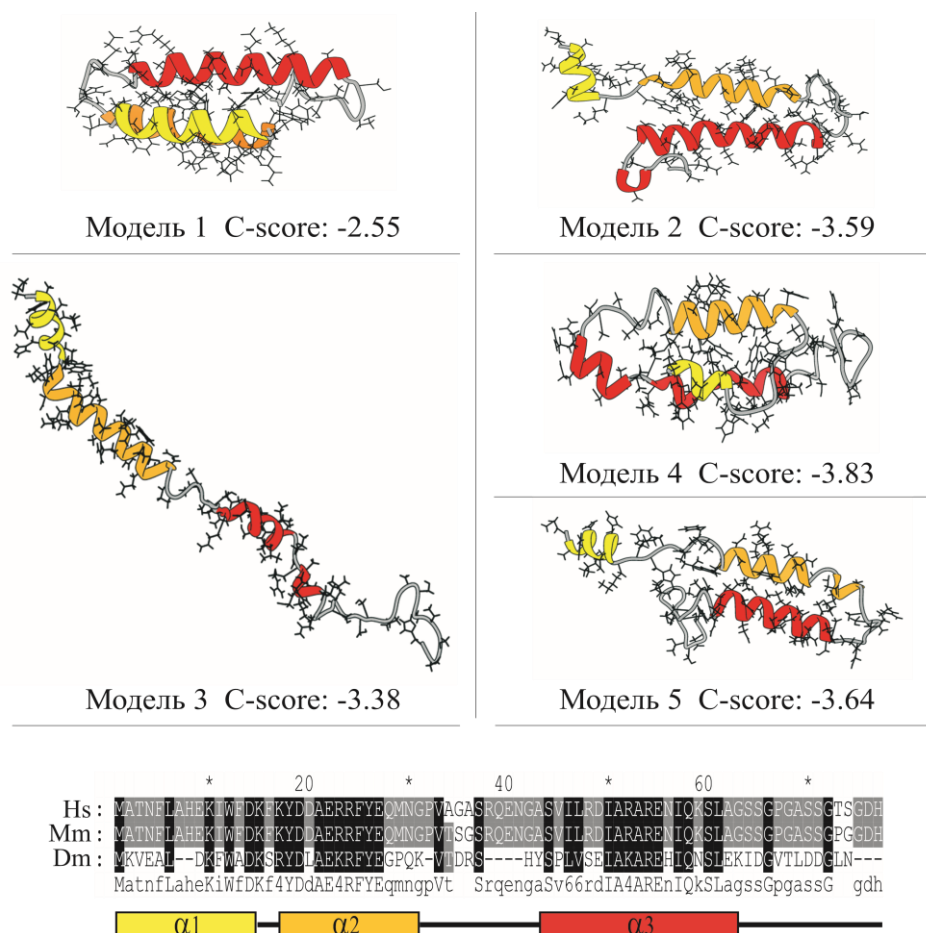


Рис. 3.12. Моделі структурної організації eEF1Bβ(1–77), створені за допомогою I-TASSER та вдосконалені ModRefiner.

Верхня панель: стрічкове подання передбачених I-TASSER та вдосконалених за допомогою ModRefiner моделей eEF1Bβ(1–77). Бічні ланцюги амінокислот показані у вигляді структурних радикалів. С-критерій I-TASSER (C-score) вказаний для кожної моделі. Нижня панель: множинне вирівнювання послідовностей амінокислот eEF1Bβ(1–77) з різних видів. Скорочення: Hs - *Homo sapience*; Mm - *Mus musculus*; Dm - *Drosophila melanogaster*. Вторинні структурні елементи, α-спіралі та неструктуровані області, нанесені на карту вирівнювання амінокислотної послідовності відповідно до моделі 1. α-спіралі мають ті самі кольори, що зазначені на моделі

Окрім цього, ми перевірили, чи існує стійкий гідрофобний кластер в eEF1Bβ(1–77), сформований в ньому наявними гідрофобними залишками. Для

цього ми використали флуоресцентний барвник 8-аніліно-1-нафтalen сульфонову кислоту (ANS), який специфічно зв'язується з структурованими гідрофобними ділянками білків. Як правило, після зв'язування ANS до гідрофобної кишені, квантовий вихід його флуоресценції значно збільшується з одночасним зміщенням довжини хвилі максимуму емісії від 510 нм до 480 нм залежно від ступеня полярності сайту зв'язування (187,188). Аналіз спектрів флуоресценції ANS, отриманих в присутності різних концентрацій eEF1B β (1-77), засвідчив, що положення максимуму спектрів емісії, відповідало ANS у вільному стані (дані не приведено). Таким чином, ми дійшли висновку, що eEF1B β (1-77) не містить відповідного гідрофобного кластеру, здатного зв'язати ANS. В цілому, експерименти по флуоресценції узгоджуються з результатами КД-спектрометрії і підтверджують динамічну структурну організацію eEF1B β (1-77).

Отже, відповідність експериментальних даних і комп'ютерного моделювання просторової структури eEF1B β (1-77) дозволили нам зробити висновок про динамічну третинну організацію цього домену, який складається з трьох α -спіралей і неструктурованих регіонів.

3.2.3. Структурна організація мотиву типу «лейцинова застібка» eEF1B β . Наразі експериментальних даних щодо структурної організації LZ-мотиву немає. Як вже було зазначено вище, eEF1B β існує у розчині у вигляді стійкого тримеру (рис. 3.8). Зважаючи на те, що його N- і C- кінцеві домени є мономерами (рис. 3.10) (87,89), роль елемента, завдяки якому відбувається тримеризація цього білка, може відігравати саме мотив типу «лейцинова застібка», так як такого типу послідовності є здатними до ди- або тримеризації (110,182). Крім цього, за допомогою H/D-MS ми показали, що LZ-мотив є добре захищеним від включення дейтерію, а отже, являє собою ригідно-структуровану ділянку (рис. 3.9в), що може виникнути в результаті тримеризації. Щоб перевірити це припущення, ми створили конструкцію GST-eEF1B β (78-118), амінокислотні залишки якої охоплюють увесь LZ-мотив.

eEF1B β . GST-мітка була необхідною для полегшення спектроскопічної детекції LZ-мотиву, бо останній не містить залишків триптофану. Ми отримали необхідну кількість злитого рекомбінантного білка GST-eEF1B β (78-118) та очистили його до гомогенного стану згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.13а). Олігомерний стан GST-eEF1B β (78-118) було досліджено за допомогою гель-фільтрації на колонці Superose 6HR (рис. 3.13б). Прогнозована молекулярна маса злитого білка GST-eEF1B β (78-118) становить 31,7 кДа, а з урахуванням димеризації домену GST – 63,4 кДа. Але на хроматограмі ми бачимо пік, який відповідає мультимеру з масою приблизно 380 кДа, що в 6 раз перевищує розраховане значення. Однак, такий результат не дає уявлення про точну кількість молекул в агрегаті. Щоб відповісти на це питання, ми застосували метод АУЦ (рис. 3.13в,г).

Графік безперервного розподілу за розміром для седиментограми ШУЦ GST-eEF1B β (78-118) (рис. 3.13в) показує присутність двох популяцій молекул, які седиментують з коефіцієнтами $S_w = 3.728 S$ ($S_{(20,w)} = 7.638 S$) та $S_w = 5.316 S$ ($S_{(20,w)} = 10.893 S$), відповідно. Для оптимального співвідношення коефіцієнтів тертя $f/f_0 = 1.1$, їх молекулярні маси було оцінено, відповідно, як 107 та 183 кДа. Ці значення є близькими до молекулярної маси тримеру (95.2 кДа) та гексамеру (190.4 кДа) GST-eEF1B β (78-118).

Для більш точного визначення молекулярної маси eEF1B β (78-118) ми застосували метод РУЦ. Аналіз чотирьох окремих седиментаційних кривих показав молекулярну масу 194.5 ± 4.8 кДа, тоді як полішвидкісний аналіз – 205.2 ± 0.1 кДа (рис. 3.13г). Отримані результати вказують на те, що GST-eEF1B β (78-118) в умовах термодинамічної рівноваги існує у вигляді гексамеру. Беручи до уваги, що домен GST утворює димери, а LZ-мотив за нашим припущенням може тримеризуватись, існування гексамерів GST-eEF1B β (78-118) є логічним. Отже, отримані результати дозволяють нам дійти висновку, що LZ-мотив спричиняє олігомеризацію eEF1B β .

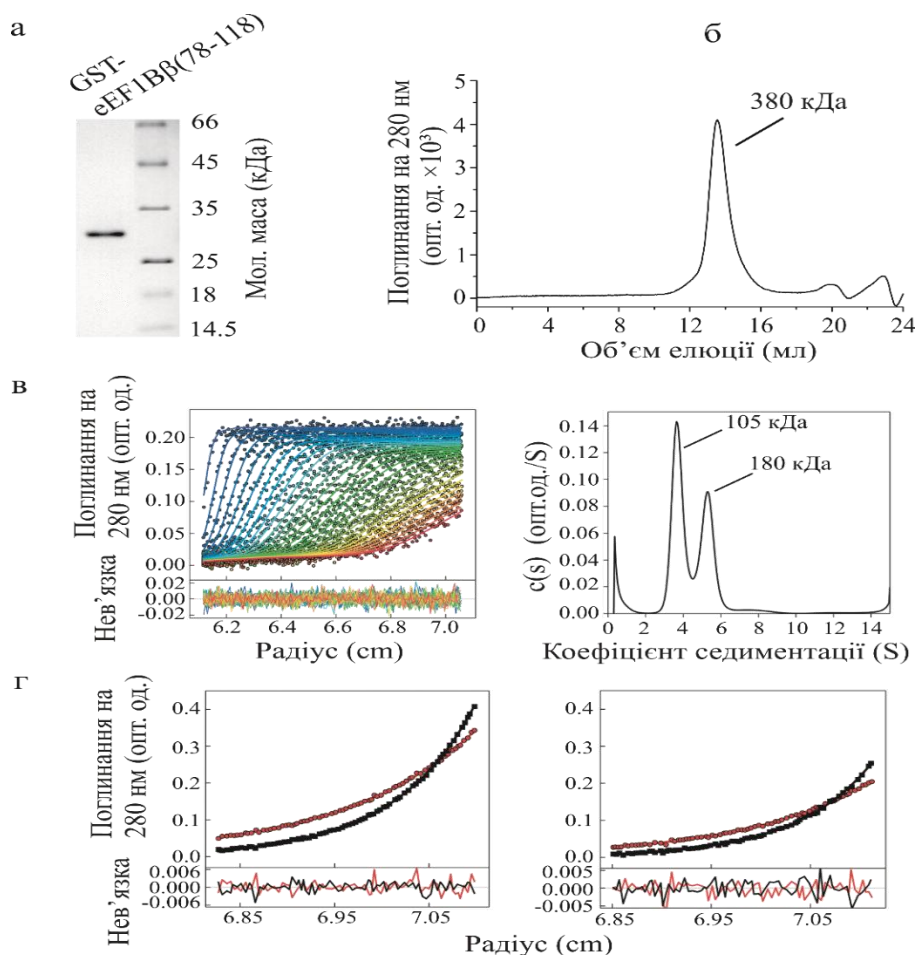


Рис. 3.13. Характеристика очищеного препарату рекомбінантного GST-eEF1Bβ(78-118) людини. (а) електрофореграма GST-eEF1Bβ(78-118) в 13% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. (б) Хроматограма GST-eEF1Bβ(78-118) на Superose 6HR. (в) седиментограма ШУЦ препарату GST-eEF1Bβ(78-118) з концентрацією 0,15 мг/мл. Ліва панель: сукупність седиментаційних кривих. Права панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $c(s)$ від s . (г) Седиментограми РУЦ препаратів GST-eEF1Bβ(78-118) з концентраціями 0,15 мг/мл (ліворуч) та 0,1 мг/мл (праворуч). Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки під час центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам. Червоний – профілі отримані при досягненні термодинамічної рівноваги на кутових швидкостях 10000 об/хв., чорний – 12000 об/хв

Лінкерний регіон між мотивом типу «лейцинова застібка» та CAR доменом eEF1B β є досить довгим і його структурна роль до цього часу не досліджувалась. Не виключено, що цей регіон також може брати участь у тримерізації eEF1B β . Щоб перевірити це припущення, ми отримали вкорочену рекомбінантну форму eEF1B β , а саме eEF1B β (117-281), яка охоплювала амінокислотні залишки від 117 до 281, і містила весь лінкерний регіон, а також домени CAR та GEF.

Молекулярну масу eEF1B β (117-281) визначали методом РУЦ при двох концентраціях білка та на двох швидкостях (рис. 3.14). При аналізі даних чотирьох окремих седиментаційних кривих, молекулярна маса білка склала 21.6 ± 1.1 кДа. Полішвидкісний аналіз показав масу 21.7 кДа. Отримані значення є близькими до теоретичної молекулярної маси мономеру eEF1B β (117-281) – 19.2 кДа.

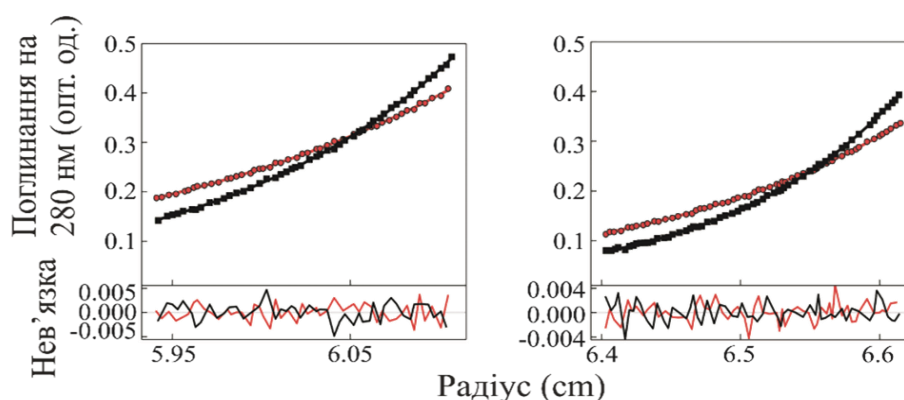


Рис. 3.14. Седиментограма РУЦ eEF1B β (117-281) з концентраціями 0,35 мг/мл (ліворуч) та 0,23 мг/мл (праворуч).

Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки під час центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам. Червоний – профілі отримані при досягненні термодинамічної рівноваги на кутових швидкостях 10000 об/хв., чорний – 12000 об/хв

Отже, ми зробили висновок, що С-кінцева частина eEF1B β , яка включає всю лінкерну область цього білка, є мономером у розчині і, скоріше за все, не

бере участі у тримеризації eEF1B β . Таким чином, отримані результати чітко вказують на те, що LZ-мотив є єдиною ділянкою eEF1B β , відповідальною за його тримеризацію.

Мотив типу «лейцинова застібка» зазвичай містить повторення залишків лейцину, які займають кожне сьоме положення в цій амінокислотній послідовності, так званий гептадний повтор, і утворюють α -спіральну ділянку, яка в певних випадках може брати участь в димеризації чи олігомеризації білків (189). Такі α -спіральні ділянки можуть збиратися в α -суперспіралі шляхом контакту між їх гідрофобними поверхнями, по типу відомому як з'єднання «виступи-в-отвори» або «мама-тато» (knobs-into-holes) (189). В гептадному повторі eEF1B β налічується шість залишків лейцину, які займають кожну сьому позицію в послідовності (рис. 3.15, верхня панель) і, таким чином, утворюють гідрофобну смугу вздовж α -спіральної ділянки. З'єднання двох або кількох α -спіралей такого типу може призводити до утворення суперспіральних структур.

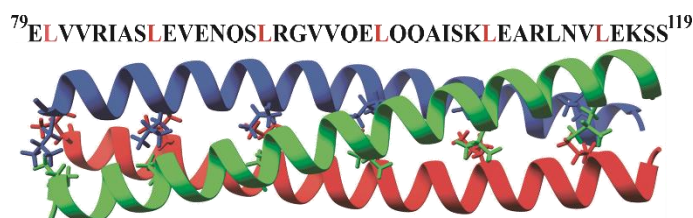


Рис. 3.15. Модель структури тримеру мотиву типу «лейцинова застібка». eEF1B β . Три α -спіралі є закрученими одна навколо одної, утворюючи пучок з наступними параметрами: радіус - 5,6 Å, кут інтерфейсу - 19°, крок - 61,8 Å, кількість залишків на оберт спіралі - 3,62. Усі залишки лейцину, що беруть участь у гідрофобних взаємодіях, показані у вигляді кольорових бічних радикалів. Послідовність амінокислот мотиву показана у верхній частині малюнка з гептадним повторенням залишків лейцинів, позначених червоним

Такі структури є регулярними і їх можна моделювати з використанням невеликого числа геометричних параметрів, таких як крок, радіус збірки і кут

інтерфейсу. Для моделювання структури LZ-мотиву eEF1B β ми використали програмне забезпечення CBuilder 2.0 (190). Краща оптимізована структурна модель мотиву з найменшим (-425,6 кДж/моль) значенням енергії взаємодії між спіралями (BUDE) (191), показана на рис. 3.15.

Зазвичай такий поліпептидний пучок, зібраний з трьох α -спіралей, має компактну упаковку, а значить, і ригідну структуру, що пояснює його високий захист від включення дейтерію (рис. 3.9в).

3.2.4. Моделювання тривимірної структури субодиниці eEF1B β .

Таким чином, ми створили структурні моделі N-кінцевого домену eEF1B β та LZ-мотиву. Структуру його C-кінцевого домену з частиною лінкерного регіону (залишки 153-281) було раніше отримано за допомогою ЯМР (87). Наступним нашим завданням було створити модель повнорозмірного eEF1B β .

Для створення атомарної моделі тримеру повнорозмірного eEF1B β ми спочатку створили модель його мономеру. Для цього ми застосували програмне забезпечення Modeller. В результаті проведення гомологічного моделювання з використанням відповідних шаблонів ми створили 5 структурних ансамблів для мономеру eEF1B β з 40 структурними моделями в кожному. Кращі 25 структур відібрали з кожного ансамблю, беручи до уваги показник дискретної оптимізованої енергії білка (DOPE) та оцінку об'єктивної функції в Modeller (MOF). Якість кожної моделі було підтверджено за допомогою веб-сервера MolProbity. Модель 1 у рейтингу, яка мала найкращу оцінку DOPE було обрано для подальшого моделювання тримеру.

Потім, моделювання тримерної структури eEF1B β проводили за допомогою сервера SymmDock. Тример (рис. 3.16.) зібрали з раніше змодельованого мономеру з урахуванням того, що мотив типу «лейцинова застібка» відповідає за його тримеризацію. Найкращу модель за оцінкою комплементарності геометричної форми було відібрано та вдосконалено сервером мінімізації енергії YASARA.

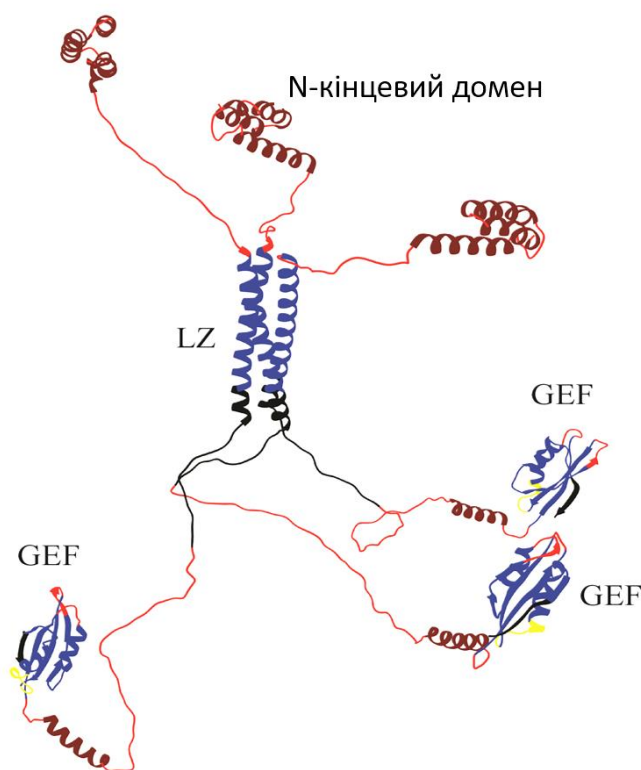


Рис. 3.16. Структурна модель тримера eEF1B β , побудована з використанням Modeller та вдосконалена SREFLEX. Аббревіатури: LZ - мотив типу «лейцинова застібка», GEF – домен, який прискорює обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A. Ригідно-структуровані регіони білка визначені методом H/D MS позначені синім кольором, незахищені та неструктуровані області позначені червоним, слабо захищені динамічні ділянки позначені жовтим. Темно-червоним кольором відмічено спіральні ділянки N-кінцевого домену і CAR, які мають значення сукупного захисту $<0,05$ умовних одиниць, але були змодельовані як α -спіралі. Чорним позначено ділянки з відсутніми для аналізу пептидами

Щоб наочно представити динамічні та ригідні регіони eEF1B β ми позначили їх на отриманій моделі згідно результатів H/D-MS (рис. 3.16.). LZ-мотив демонструє значний ступінь захисту, як і GEF-домен, більшість пептидів якого, за винятком однієї слабо- і двох незахищених коротких

ділянок, є високозахищеними. Отже вони відносяться до ригідно-структурованих регіонів (рис. 3.9в), і на рис 3.16 вони відмічені синім.

N-кінцевий домен і CAR демонструють рівень захисту близький до нульового, що вказує на їх високодинамічну організацію, проте, як вже було вказано раніше, вони мають вторинну α -спіральну структуру. Тому, ми позначили N-кінцевий домен і CAR на рис. 3.16 темно-червоним кольором, щоб відрізнити їх від незахищених і неструктурованих областей, позначених червоним.

Таким чином, поєднання експериментального та обчислювального підходів дозволило нам вперше створити атомарну модель структури eEF1B β (рис. 3.16). У цій моделі три мономері 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 C-кінцевий домен з'єднаний з ним порівняно довгою структурно динамічною ділянкою. Загальна форма гомотримера eEF1B β є видовженою, і його N- та C-кінцеві частини, швидше за все, орієнтовані в просторі довільним чином.

3.2.5. Функціональні особливості субдиниці eEF1B β . Інформації щодо функціональної особливості eEF1B β наразі дуже мало, тож багато питань залишаються відкритими. З літератури відомо, що на відміну від eEF1B α формування комплексу eEF1B $\beta\gamma$ не призводило до зміни швидкості обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A, але в чому полягає різниця між взаємодією eEF1B α та eEF1B β з eEF1B γ залишалось не з'ясованим. Ми вияснили, що у випадку з eEF1B α ключову роль у цьому феномені грає її N-кінцевий домен, тож вирішили перевірити, чи видалення N-кінцевого домену вплине на активність eEF1B β .

На основі порівняльного аналізу первинних послідовностей eEF1B β з різних організмів (рис. 2.1.), ми створили серію форм вкорочених з N-кінця на 42, 77, 116, 135 та 182 амінокислотні залишки. До N-кінців цих вкорочених

форм ми додали GST-домен (рис. 2.2). Рекombінантні цільові білки синтезували в бактеріях та очищали до ступеня гомогенності більш ніж 90%, згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис.3.16). GST-домени видаляли з усіх білків, окрім eEF1B β (183-281), за допомогою протеази і проводили додаткову стадію очищення для видалення GST і протеази. У вкороченій формі GST-eEF1B β (183-281) GST-домен не видаляли щоб уникнути її агрегації.

Ступінь олігомеризації отриманих білків було досліджено за допомогою гель-фільтрації на колонці Superose 6 HR (рис. 3.17). Цікаво, що маса вкорочених форм з частково чи повністю видаленим N-кінцевим доменом, становила 340 та 305 кДа, відповідно, тобто не значно відрізнялась від маси повнорозмірного білка – 350 кДа (рис. 3.8б). Більш короткі конструкції з видаленими LZ-мотивом і частиною лінкерного регіону, а саме eEF1B β (117-281) та eEF1B β (136-281), показували значно менші молекулярні маси - 60 та 58 кДа, відповідно. Однак, навіть такі значення перевищували теоретично розраховані в 3 рази. GST у складі конструкції GST-eEF1B β (183-281) забезпечує її димеризацію, тож теоретично білок має масу $38,2 \times 2$ кДа, проте на гель-фільтрації він відповідав масі 175 кДа, що є приблизно вдвічі більше за розраховану. Отримані результати корелюють з нашими попередніми даними про роль LZ-мотиву в тримеризації eEF1B β .

Завищену молекулярну масу eEF1B β (136-281) можна пояснити як помірно видовженою формою C-кінцевого домену, так і наявністю частини лінкерного регіону, що збільшує радіус Стокса цього білка. Це припущення узгоджується з нашими результатами ультрацентрифугування eEF1B β (117-281), який має у своєму складі більшу частину невпорядкованого лінкерного регіону, проте існує в розчині як мономер (рис. 3.14).

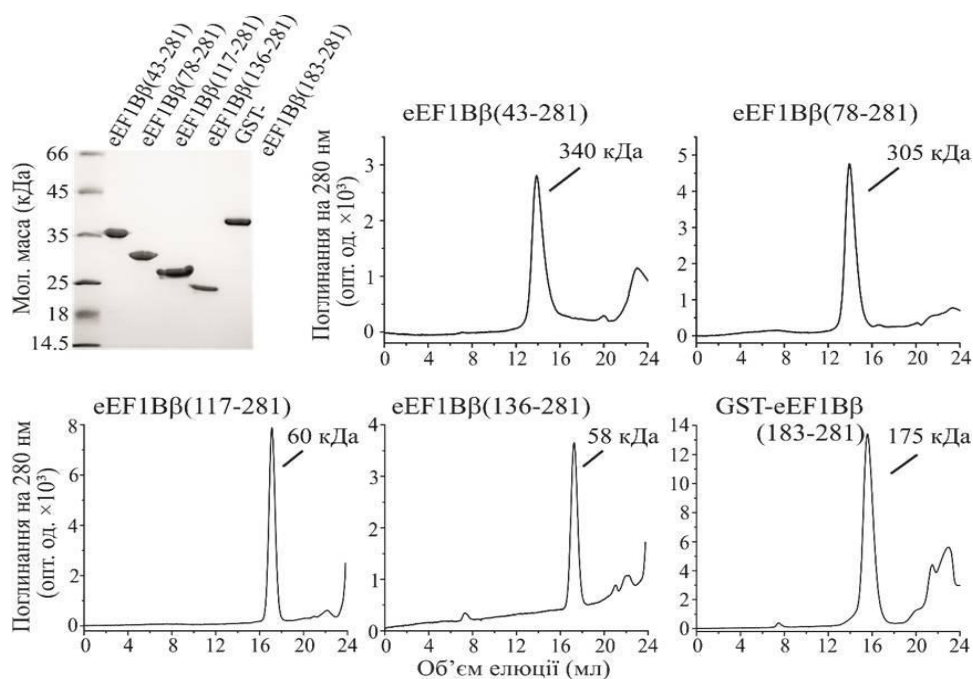


Рис. 3.17. Характеристика очищених препаратів вкорочених форм eEF1 β методами гелі-електрофорезу в денатуруючих умовах і гелі-фільтрації в нативних умовах.

Електрофореграма вкорочених форм eEF1 β (43-281), eEF1 β (78-281), eEF1 β (117-281), eEF1 β (136-281) та GST-eEF1 β (183-281) на 12,5% поліакриламідний гелі в денатуруючих умовах та хроматограми гелі-фільтрації всіх зазначених вище вкорочених форм eEF1 β на Superose 6HR. Теоретично розраховані молекулярні маси вкорочених форм eEF1 β становили 26,9, 23,5, 19,2, 17,3 та 38,2 кДа, відповідно

Не дивлячись на те, що ізоформа eEF1A2 була відкрита досить давно, до цього часу не було показано здатності субодиниці eEF1 β обмінювати гуаніновий нуклеотид на цьому факторі. Отже, ми вирішили провести кінетичні експерименти, подібні до описаних для субодиниці eEF1 α , для обох eEF1A1 та eEF1A2 у присутності повнорозмірного eEF1 β та його вкорочених форм. Як показано на рис. 3.18а,б, часткове (42 амінокислоти) і повне (77 амінокислот) видалення N-кінцевого домену eEF1 β незначною мірою впливало на швидкість обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на eEF1A2. Подальше

вкорочення eEF1B β , а саме вилучення LZ-мотиву та частини лінкерної області, також не змінило швидкість обміну гуанінового нуклеотиду. В той же час, часткове видалення CAR-домену призвело до незначного зниження швидкості обміну. Додавання eEF1B γ до eEF1B β не вплинуло на значення констант швидкості дисоціації ГДФ з eEF1A2, в порівнянні з індивідуальним eEF1B β .

Вимірювання швидкості обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на eEF1A1 (рис. 3.18в, г) у присутності вкорочених форм eEF1B β , зменшених на 42, 77 і 116 амінокислотних залишків, показало, що значення констант швидкості дисоціації ГДФ суттєво не відрізняється від такої повнорозмірної субодиниці. У присутності двох інших білків, eEF1B β (136–281) та GST-eEF1B β (183–281), швидкість обміну нуклеотидів дещо знизилася, порівняно з повнорозмірним eEF1B β (рис. 3.18в, г). Аналогічно з eEF1A2, формування комплексу eEF1B β з субодиницею eEF1B γ суттєво не вплинуло на швидкість обміну гуанінового нуклеотиду (рис. 3.18в,г).

Таким чином, ми показали, що поетапне вкорочення eEF1B β з N-кінця статистично достовірно не впливає на швидкість обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на eEF1A1 і eEF1A2. eEF1B γ не стимулює активність обміну [^3H]ГДФ/ГДФ субодиницею eEF1B β , на відміну від eEF1B α .

Тим не менш, варто зазначити, що часткове видалення CAR-домену призвело до уповільнення обміну гуанінового нуклеотиду, що особливо помітно у випадку з використанням eEF1A1 (рис. 3.18в,г). Можна припустити, що домен CAR певним чином взаємодіє з eEF1A, однак, в цьому випадку не виключена можливість стеричного перешкоджання взаємодії з eEF1A GST-міткою в складі конструкції GST-eEF1B β (183–281). Для перевірки цього припущення необхідні подальші експерименти.

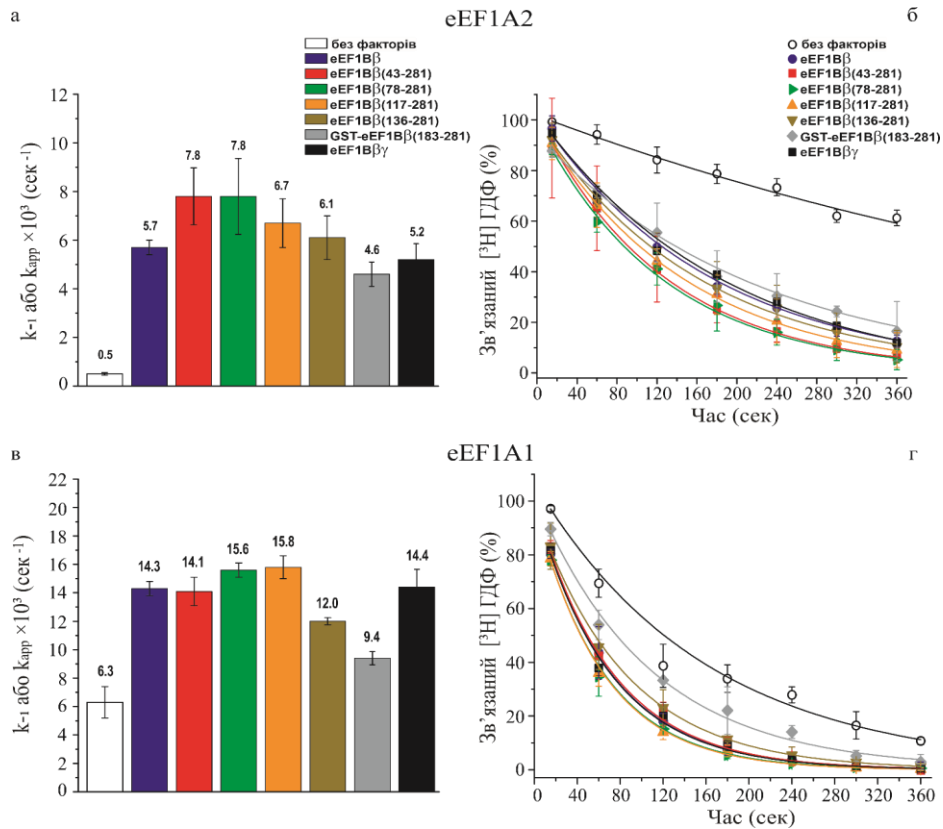


Рис. 3.18. Вплив eEF1Bβ і його вкорочених форм, а також eEF1Bβγ комплексу на швидкість реакції обміну гуанінового нуклеотиду на факторах eEF1A1 і eEF1A2.

(а) і (в). Порівняльні діаграми констант швидкості першого порядку (k_{-1}) реакції спонтанного обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$, а також констант швидкості (k_{app}) реакції обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$ у присутності eEF1Bβ, його вкорочених форм і комплексу eEF1Bβγ на факторах eEF1A1 і eEF1A2. (б) і (г). Кінетичні криві реакції обміну $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$ на eEF1A1 і eEF1A2 у відсутності або у присутності eEF1Bβ, його вкорочених форм і комплексу eEF1Bβγ

Ми показали, що eEF1Bβ є тримером, а значить він налічує три GEF-домени. Ми перевірили, чи дійсно всі вони доступні для eEF1A за допомогою гель-електрофорезу в нативних умовах. На електрофореграмі 3.19 видно, що при титруванні фактора eEF1A2 субодиницею eEF1Bβ утворюються три види комплексів із різною рухливістю в гелі. Таким чином, ми показали, що три GEF-домени eEF1Bβ здатні одночасно взаємодіяти з eEF1A2.

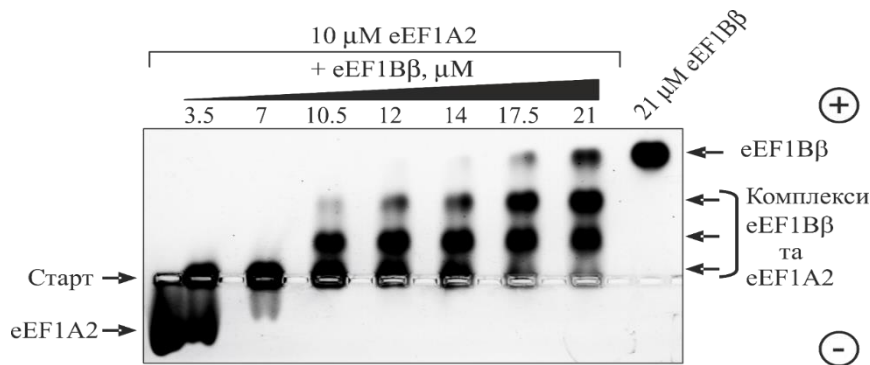


Рис. 3.19. Електрофореграма титрування фактора eEF1A2 зростаючими концентраціями субодиниці eEF1B β в нативних умовах.

eEF1A2 інкубували із збільшенням концентрації eEF1B β . Білкові суміші розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі в нативних умовах. Білки виявляли фарбуванням Coomassie Brilliant Blue

Висновки до підрозділу 3.2.

Вперше показано, що рекомбінантний eEF1B β людини є мультидоменним білком з довгими неупорядкованими лінкерними регіонами, який утворює у розчині стабільний тример і має сильно видовжену форму. Доведено, що мотив типу «лейцинова застібка» відповідає за тримеризацію eEF1B β .

Визначено вторинну організацію N-кінцевого домену eEF1B β , який складається переважно з α -спіралей та коротких неструктурованих ділянок, і має динамічну просторову структуру. Створено атомарну модель його третинної структури.

Створено атомарну модель мотиву типу «лейцинова застібка» eEF1B β , який утворюється в результаті тримеризації відповідної спіральної ділянки в суперспіральну структуру за рахунок гідрофобних взаємодій між залишками лейцину.

Створено атомарну модель тримеру eEF1B β , конформація якої узгоджується з даними аналітичного ультрацентрифугування.

Вперше показано, що eEF1B β , подібно до eEF1B α , пришвидшує обмін гуанінового нуклеотиду на обох ізоформах фактора eEF1A. Однак, на відміну від eEF1B α , поступове видалення N-кінцевого домену eEF1B β , а також утворення комплексу з субодиницею eEF1B γ достовірно не впливає на швидкість реакції обміну гуанінового нуклеотиду.

За допомогою методу електрофорезу в нативних умовах показано, що всі GEF-домени тримеру eEF1B β доступні до взаємодії з фактором eEF1A2.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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

Bondarchuk T. V., Lozhko D.M., Shalak V. F., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Dadlez M., Negrutskii 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.

Bondarchuk T. V., Shalak V. F., Negrutskii 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

3.3. Структурна характеристика субодиниці eEF1B γ

Субодиниця eEF1B γ є структурним компонентом комплексу eEF1B, що зв'язує субодиниці eEF1B α та eEF1B β . Вона складається з двох консервативних доменів, поєднаних лінкером (рис. 2.1.), багатим на залишки лізину (120). Структури окремих доменів (N-кінцевого з 1 по 219 та С-

кінцевого з 276 по 437 амінокислотні залишки) були визначені (86,88,124), проте щодо структурної організації повнорозмірної субодиниці інформації немає. Щоб дослідити субодиницю eEF1В γ , ми синтезували рекомбінантний повнорозмірний білок, та окремо N- та С-кінцеві домени eEF1В γ (залишки 1-228 та 263-437 відповідно) (рис. 2.2.). Білки були очищені до ступеня гомогенності більше ніж 90% згідно даних електрофорезу в денатуруючих умовах (рис. 3.20а).

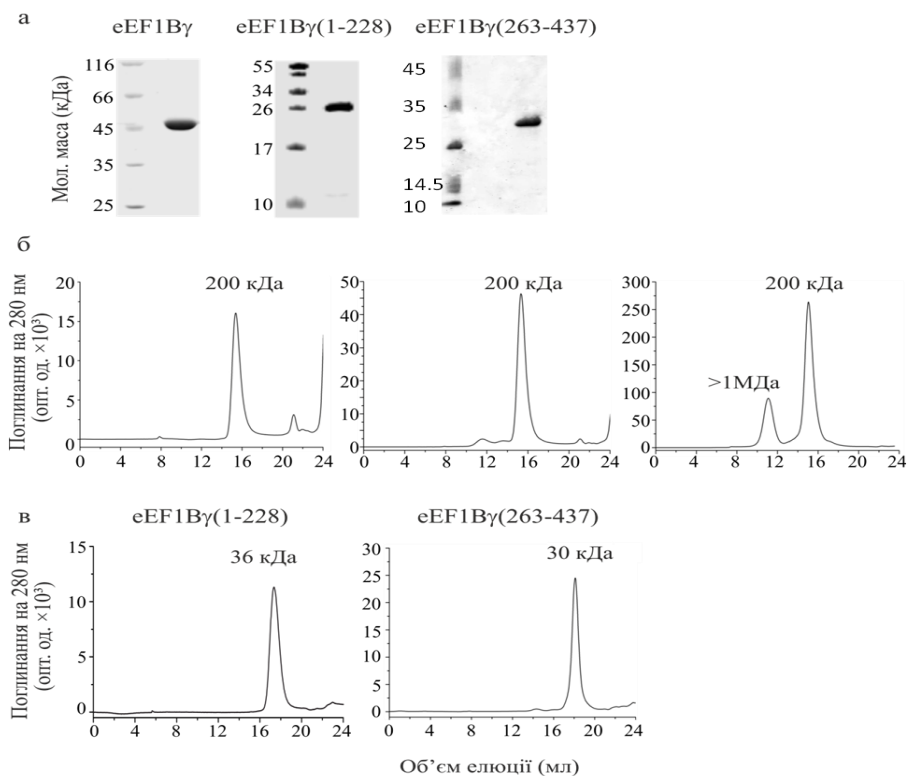


Рис. 3.20. Характеристика очищених препаратів повнорозмірного eEF1В γ людини і його N- та С-кінцевих доменів eEF1В γ (1-228) та eEF1В γ (263-437), відповідно.

(а) електрофореграма повнорозмірного eEF1В γ , і його N- та С-кінцевих доменів в 13% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. (б) хроматограма eEF1В γ на Superose 6HR. Наносили 100 мкл розчину білка з концентрацією 0,3 мг/мл (зліва), 1,6 мг/мл (по центру) та 8 мг/мл (справа). (в) хроматограма eEF1В γ (1-228) і eEF1В γ (263-437) на Superose 6HR. Наносили 100 мкл розчину білка з концентрацією 10 мкМ

Для аналізу ступеня олігомеризації отриманих білків була проведена гель-фільтрація на колонці Superose 6 HR. Цікаво, що повнорозмірний His-eEF1V γ має тенденцію до самоасоціації, в залежності від концентрації нанесеного препарату (рис. 3.20б). При аналізі зразка з концентрацією 0,3 мг/мл, на хроматограмі ми бачимо гострий пік, який відповідає молекулярній масі близько 200 кДа, що майже в чотири рази перевищує теоретично розраховану – 52 кДа.

При підвищенні концентрації білка до 1,6 мг/мл, ми бачимо появу незначної кількості агрегатів, а при концентрації 8 мг/мл їх кількість суттєво збільшується. Молекулярна маса утворених агрегатів становить більше 1 МДа. Маса вкороченої форми eEF1V γ (263-437) згідно гель фільтрації була оцінена як 30 кДа (рис. 3.20в), що є дещо більшою за теоретично розраховану – 21,4 кДа. Відома структура С-кінцевого домену eEF1V γ людини (залишки 276-437) має форму лінзи й існує в розчині, як мономер (88,124). Ймовірно, що eEF1V γ (263–437) також є мономером, але дещо видовженої форми за рахунок наявності в ній частини неупорядкованого лінкерного регіону. Це може пояснити її завищену молекулярну масу, оцінену за допомогою гель-фільтрації. Згідно хроматограми, білок eEF1V γ (1-228) виходить в об'ємі, що відповідає масі близько 36 кДа (рис. 3.20в). Розрахована маса eEF1V γ (1-228) складає 31,9 кДа, тобто вищезазначений білок існує у розчині як мономер.

Надалі, ми застосували метод АУЦ, щоб більш точно визначити молекулярну масу і олігомерний стан повнорозмірної субодиниці eEF1V γ . ШУЦ проводили при концентраціях зразка 0,57 мг/мл та 0,34 мг/мл (рис. 3.21). В обох випадках аналіз даних виявив наявність у розчині двох видів молекул. Для більш концентрованого зразка, при оптимальному співвідношенні коефіцієнтів тертя $f/f_0=1,674$, їх молекулярні маси оцінили, відповідно, як 50 та 91 кДа. Подібний результат отримали для менш концентрованого зразка: співвідношення $f/f_0=1,65$ і молекулярні маси 53 та 87 кДа, відповідно. Ці значення є наближеними до розрахованої молекулярної маси мономеру (52,6 кДа) та димеру (105,2 кДа) eEF1V γ . Співвідношення S_{max}/S для мономеру та

димеру eEF1Vу становить 1,74 і 1,84, відповідно, що вказує на їх помірно видовжену форму.

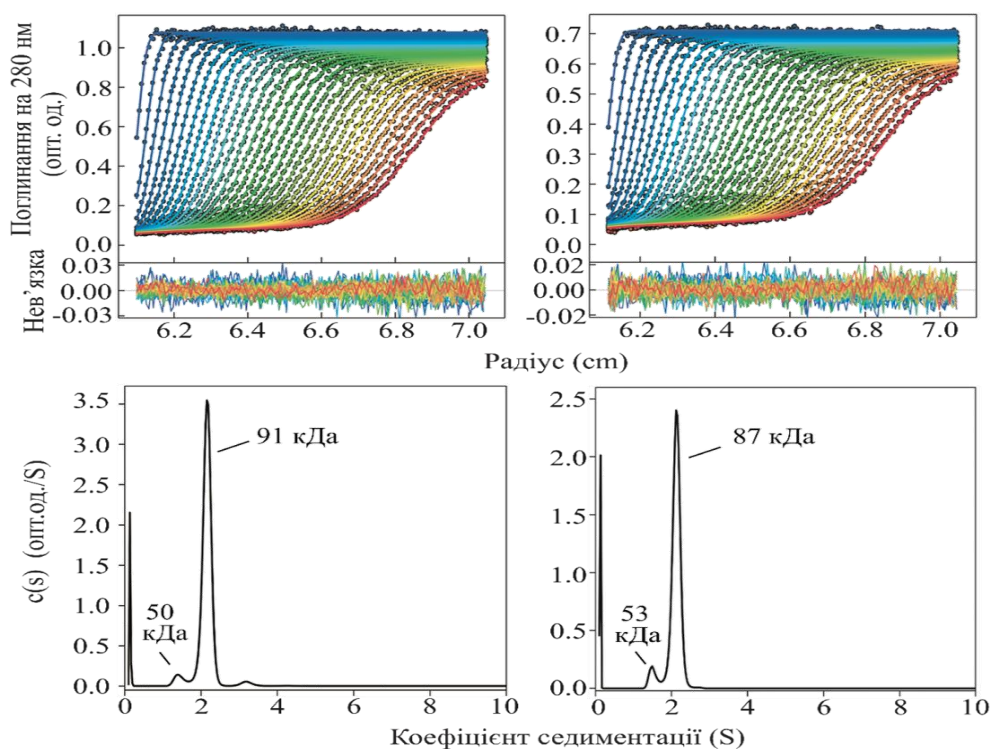


Рис. 3.21. Седиментограми ШУЦ препаратів eEF1Vу з концентраціями 0,57 мг/мл (ліва панель) та 0,34 мг/мл (права панель). Верхня панель: сукупність седиментаційних кривих. Нижня панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $c(s)$ від s

РУЦ застосували для більш точного визначення молекулярної маси eEF1Vу (рис. 3.22). При концентрації білка 0,27 мг/мл ми спостерігали наявність димерів та тетрамерів у зразку (рис. 3.22, ліва панель). Ми розрахували константи дисоціації тетрамеру на різних швидкостях, вони становили 0,9 мкМ при 10000 об/хв та 18 мкМ при 12000 об/хв. Суттєва відмінність значень констант дисоціації, отриманих при різних швидкостях, свідчать про те, що ці константи дисоціації є «спостережними». При дослідженні зразка з концентрацією білка 0,18 мг/мл, ми отримали результати,

згідно яким його маса становила 105,9 кДа, що відповідає теоретично розрахованій молекулярній масі димеру (105,8 кДа) (рис. 3.22, по центру).

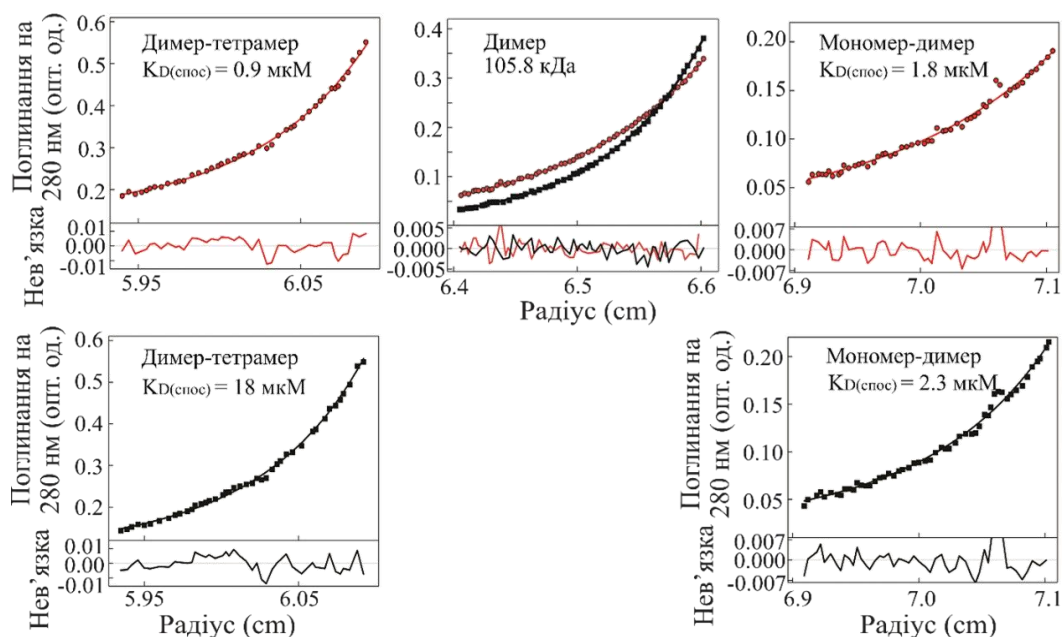


Рис. 3.22. Седиментограми РУЦ препаратів eEF1Vу з концентраціями 0.27 мг/мл (ліва панель), 0,18 мг/мл (середня панель) та 0.09 мг/мл (права панель). Седиментаційні профілі eEF1Vу червоного кольору було отримано при досягненні білком стану термодинамічної рівноваги на кутовій швидкості 10000 об/хв., седиментаційні профілі чорного кольору – 12000 об/хв. Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки в процесі центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам у програмі SEDPHAT. Для обрахування маси димеру використовували математичну модель седиментації монодисперсного розчину білка, молекули якого не взаємодіють між собою. Для обрахування маси молекул у сумішах використовували математичну модель седиментації полідисперсного розчину білка, молекули якого знаходяться у стані рівноваги мономер-димер. При описі стану рівноваги димер-тетрамер ми використали модель обрахунку мономер-димер, прийнявши значення мономеру як 105,2 кДа

При концентрації білка 0,09 мг/мл результати обраховували з використанням моделі рівноваги мономер-димер, що найкраще відповідала отриманим експериментальним даним. При швидкості 10000 об/хв маса мономеру eEF1V та константа дисоціації димеру становили 52,6 кДа та 1,8 мкМ, відповідно. При 12000 об/хв ми отримали значення 52,6 кДа та 2,3 мкМ (рис. 3.22, права панель).

Різниця значень констант дисоціації, отриманих на різних швидкостях центрифугування, підтверджує висновок, зроблений нами вище про те, що ці константи дисоціації є «спостережними». Тобто, при досягненні термодинамічної рівноваги в зразках при різних концентраціях білка і різних швидкостях центрифугування ми отримуємо суміш його мономерів і димерів, стабільних димерів чи суміш димерів і тетрамерів, що свідчить про схильність eEF1V до концентраційно-залежної олігомеризації.

Як було зазначено вище, структура повнорозмірного eEF1V невідома, однак структури окремих N- і C-кінцевого доменів були оприлюднені (86,88). З метою з'ясування присутності неструктурованих ділянок в цьому білку ми використали MetaDisorderMD2 сервер. За результатами аналізу лінкерний регіон eEF1V (залишки 215-280) з високою ймовірністю є неструктурованою ділянкою (рис. 3.23б), що пояснює складнощі з кристалізацією цілого білка (192,193).

Неструктуровані регіони в білках як правило є динамічними і, отже, можуть бути визначеними за допомогою H/D-MS аналізу. Дійсно, як представлено на рис. 3.23в, ділянка, яка обмежена залишками 210-290, має майже нульовий захист від включення дейтерію. Це свідчить про високу структурну динамічність цієї ділянки і узгоджується з передбаченням MetaDisorderMD2.

Натомість, більшість пептидів, що входять до складу N- та C-кінцевих доменів мають рівень захисту від 0,2 до 0,9 умовних одиниць, що свідчить про конформаційну стабільність цих доменів. Виключення складають пептиди 6-12, 112-118, та 399-408, які мають низький рівень сукупного захисту (0,05-0,15

умовних одиниць) і пептидів 30-50 та 331-336, які мають рівень захисту близький до нуля (<0,05 умовних одиниць), які відповідають невпорядкованим петлям, що ймовірно здатні до певної конформаційної рухливості.

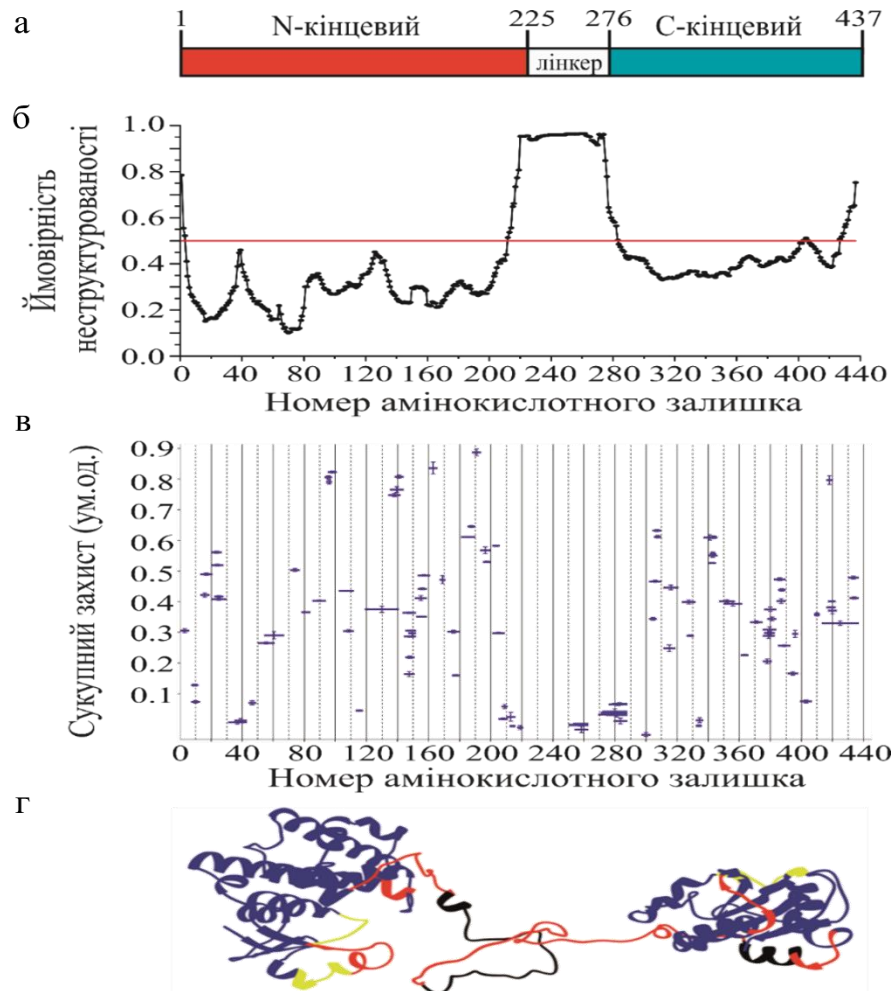


Рис. 3.23. Структурна організація повнорозмірного eEF1B людини.

(а) схематичне зображення доменної організації eEF1B. (б) прогнозування неструктурованих ділянок у молекулі eEF1B з використанням серверу MetaDisorderMD2. (в) визначення динамічних і ригідно-структурованих регіонів в молекулі eEF1B методом H/D-MS. (г) модель просторової організації eEF1B побудована з використанням програми Modeller. Ригідно-структуровані регіони білка визначені методом H/D MS позначені синім, незахищені області - червоним, слабо захищені динамічні ділянки - жовтим. Чорним позначено ділянки з відсутніми для аналізу пептидами

Ми використали існуючі в базі даних PDB структури окремих С- та N-кінцевих доменів eEF1Vу для моделювання атомарної структури повнорозмірного eEF1Vу. Гомологічне моделювання проводили в програмі Modeller, як описано в розділі «Матеріали і методи». Всі створені моделі відрізнялися між собою орієнтацією N- та С-кінцевих доменів в просторі завдяки наявності довгого гнучкого лінкерного регіону між ними. Зважаючи на те, що eEF1Vу у розчині має помірно видовжену форму (рис. 3.21), ми обрали одну репрезентативну модель, яка відповідає цьому критерію і є представленою на рис. 3.23г. Якість моделі додатково перевіряли веб-сервером MolProbity. Порівняння створеної моделі з даними H/D-MS аналізу показало високу позитивну кореляцію. Переважна більшість пептидів, які входять до складу N- та С-кінцевого доменів є добре захищеними від включення дейтерію, що свідчить про їх належність до ригідно-структурованих регіонів (позначені синім кольором).

Отже, домени eEF1Vу мають щільну укладку вторинних елементів і компакту просторову організацію, що і відображено на створеній моделі. Натомість лінкерний регіон та кілька коротких ділянок N- та С-кінцевих доменів представлених α -спіралями, петлями чи лінкерами є незахищеними, а значить належать до структурно-динамічних регіонів (позначено червоним кольором). Таким чином, створена нами модель структурної організації eEF1Vу узгоджується з отриманою нами теоретичною і експериментальною інформацією.

Висновки до підрозділу 3.3.

Показано, що eEF1Vу – це білок помірно видовженої форми, який складається з двох компактно згорнутих доменів, з'єднаних між собою довгим неструктурованим лінкерним регіоном.

Встановлено, що eEF1Vу у розчині має схильність до олігомеризації. При концентрації <1,8 мкМ, білок існує як суміш мономерів та димерів. Із

збільшенням концентрації спостерігається спочатку утворення стабільних димерів, а потім тетрамерів.

Побудовано атомарну модель структурної організації eEF1B γ , яка добре корелює із даними воднево-дейтерієвого обміну.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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

Trosiuk (Bondarchuk) T. V., Liudkovska V. V., Shalak V. F., Negrutskii 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

3.4. Реконструкція комплексу eEF1B та його характеристика

Питання стехіометрії субодиниць комплексу eEF1B досі залишається дискусійним. Щоб відповісти на нього ми використали різні експериментальні підходи. Першим кроком ми застосували метод електрофорезу в нативних умовах, зважаючи на те, що eEF1B α та eEF1B β відрізняються від eEF1B γ поверхневим зарядом та розміром (рис. 3.24).

Субодиниці eEF1B α (25,5 кДа) та eEF1B β (31,9 кДа) мають ізоелектричну точку 4,5 і 4,9, відповідно, і рухаються в гелі у напрямку катоду значно швидше, ніж eEF1B γ (5,6 кДа), який має pI=6,7. Рух комплексів eEF1B $\alpha\gamma$ та eEF1B $\beta\gamma$ в агарозному гелі також відрізняється від міграції індивідуальних білків. Тому, для визначення стехіометрії субодиниць в комплексах було зручно провести титрування фіксованої концентрації однієї

субодиниці різними концентраціями іншої. Результати титрування представлено у вигляді електрофореграми на рис. 3.24. Вони засвідчують, що комплекси eEF1B α γ і eEF1B β γ утворюються при еквімолярних співвідношеннях субодиниць.

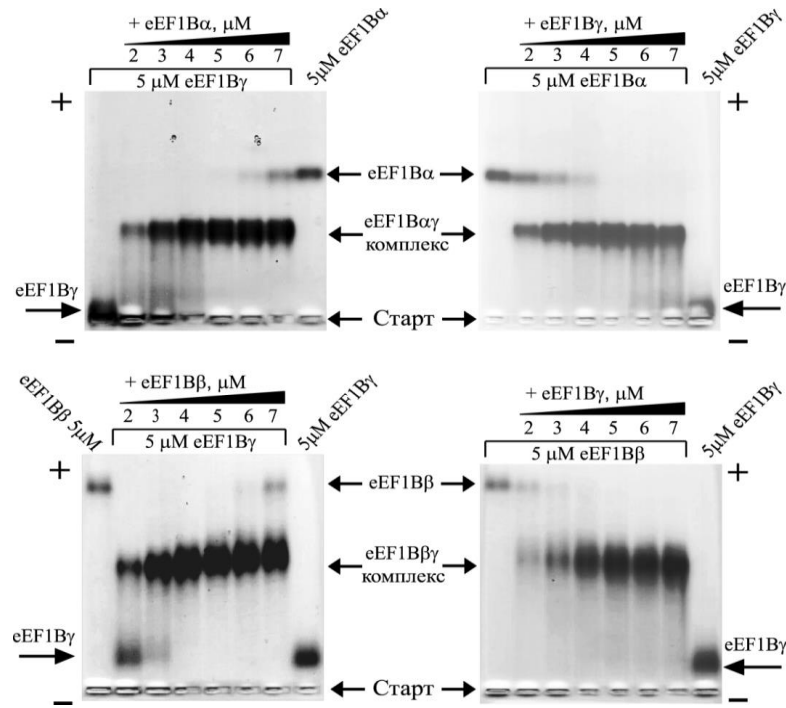


Рис. 3.24. Електрофореграма комплексів eEF1B α /eEF1B γ та eEF1B β /eEF1B γ при прямому та зворотному титруванні на електрофорезі в нативних умовах в 1% агарозному гелі. Білки виявляли за допомогою фарбування Кумасі

Наступним нашим кроком був аналіз eEF1B α γ , eEF1B β γ та eEF1B α β γ комплексів за допомогою аналітичної гель-фільтрації (рис. 3.25).

Розрахована молекулярна маса комплексу eEF1B α γ при співвідношенні субодиниць 1:1 складає 78,1 кДа. На хроматограмі рис. 3.25 (ліва панель) ми бачимо, що комплекс, утворений при змішуванні еквімолярних кількостей субодиниць, елююється в об'ємі, що відповідає молекулярній масі близько 400 кДа. Це число в п'ять разів перевищує теоретичне значення маси eEF1B α γ . Наявність обох субодиниць у фракціях першого хроматографічного піку було підтверджено гель-електрофорезом в денатуруючих умовах (рис. 3.25).

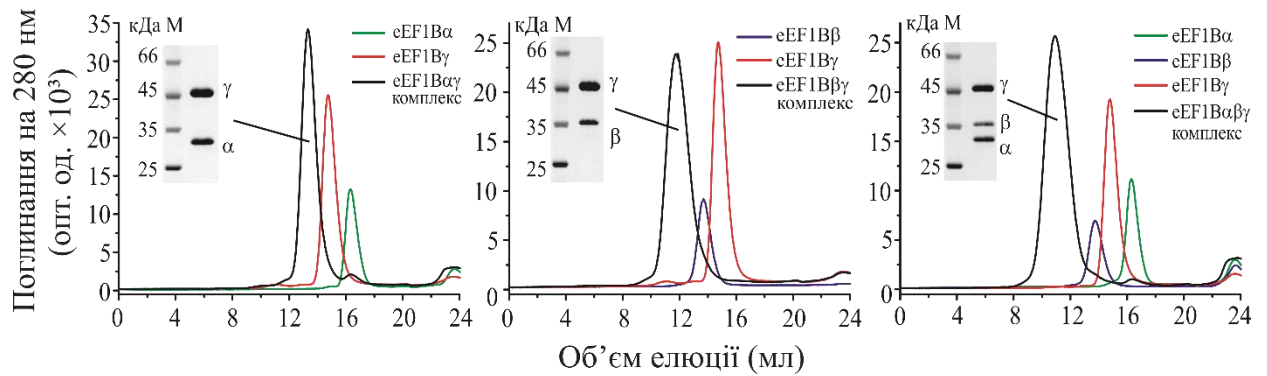


Рис. 3.25. Хроматограми комплексів eEF1B $\alpha\gamma$ (ліва панель), eEF1B $\beta\gamma$ (середня панель) та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (права панель) на Superose 6HR. Індивідуальні повнорозмірні субодиниці у відповідних концентраціях наносили окремо в якості референсу. Вставка: електрофореграма комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ в 12% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Центральні фракції піку білкових комплексів об'єднували, концентрували і наносили у кількості 5 мкг білка на доріжку

Аналіз комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ з концентрацією 0,3 мг/мл (3,8 мкМ) методом ШУЦ показав присутність двох видів молекул, що седиментують з коефіцієнтами $S_w = 1,973 \text{ S}$ ($S_{(20,w)} = 3,998 \text{ S}$), і $S_w = 2,716 \text{ S}$ ($S_{(20,w)} = 5,503 \text{ S}$), відповідно. При оптимальному співвідношенні $f/f_0 = 1,66$, молекулярну масу менших молекул оцінили як 80 кДа, що відповідає теоретичному значенню гетеродимеру eEF1B $\alpha\gamma$ – 78,1 кДа. Молекулярну масу більших молекул оцінили як 130 кДа, що є близьким до значення маси дигетеродимеру eEF1B($\alpha\gamma$)₂ – 156,2 кДа (рис. 3.26а). Зменшення концентрації білка до 0,15 мг/мл, (1,9 мкМ) суттєво не змінило седиментаційну картину (дані не показані).

Седиментограма на рис. 3.26 демонструє, що комплекс eEF1B $\alpha\gamma$ переважно знаходиться у формі дигетеродимеру eEF1B($\alpha\gamma$)₂. Ми розрахували його гідродинамічний параметр S_{\max}/S , який для комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ склав 1,68, що характерно для білків з помірно видовженою формою (157).

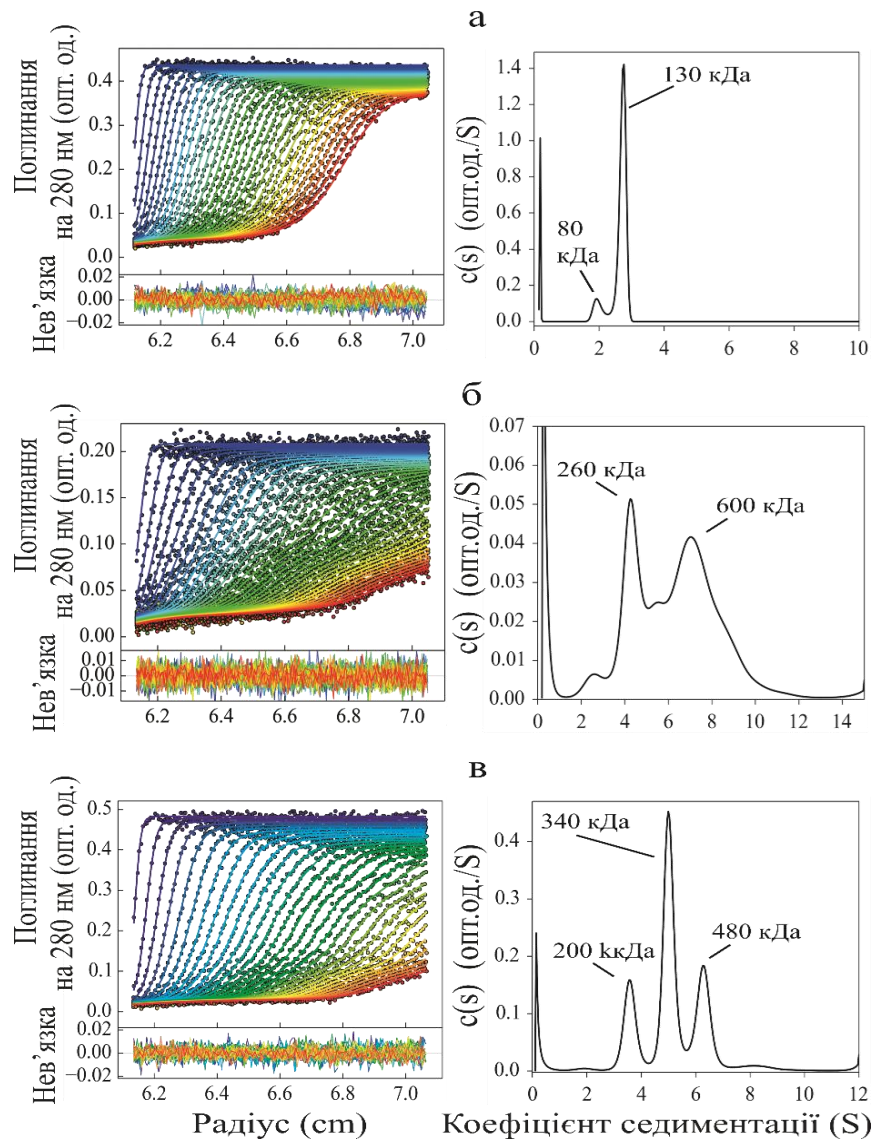


Рис. 3.26. Седиментограми швидкісного ультрацентрифугування препаратів (а) eEF1B $\alpha\gamma$, (б) eEF1B $\beta\gamma$ та (в) eEF1B $\alpha\beta\gamma$ з концентраціями 0,3 мг/мл, 0,17 мг/мл та 0,27 мг/мл відповідно. Ліва панель: сукупність седиментаційних кривих. Права панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $c(s)$ від s

РУЦ було виконано для трьох різних концентрацій комплексу eEF1B $\alpha\gamma$. Результати показали, що при високій і середній концентраціях він існує як стабільний дигетеродимер (рис. 3.27, ліва та середня панелі) з розрахованою молекулярною масою 158,6 та 160,7 кДа, відповідно.

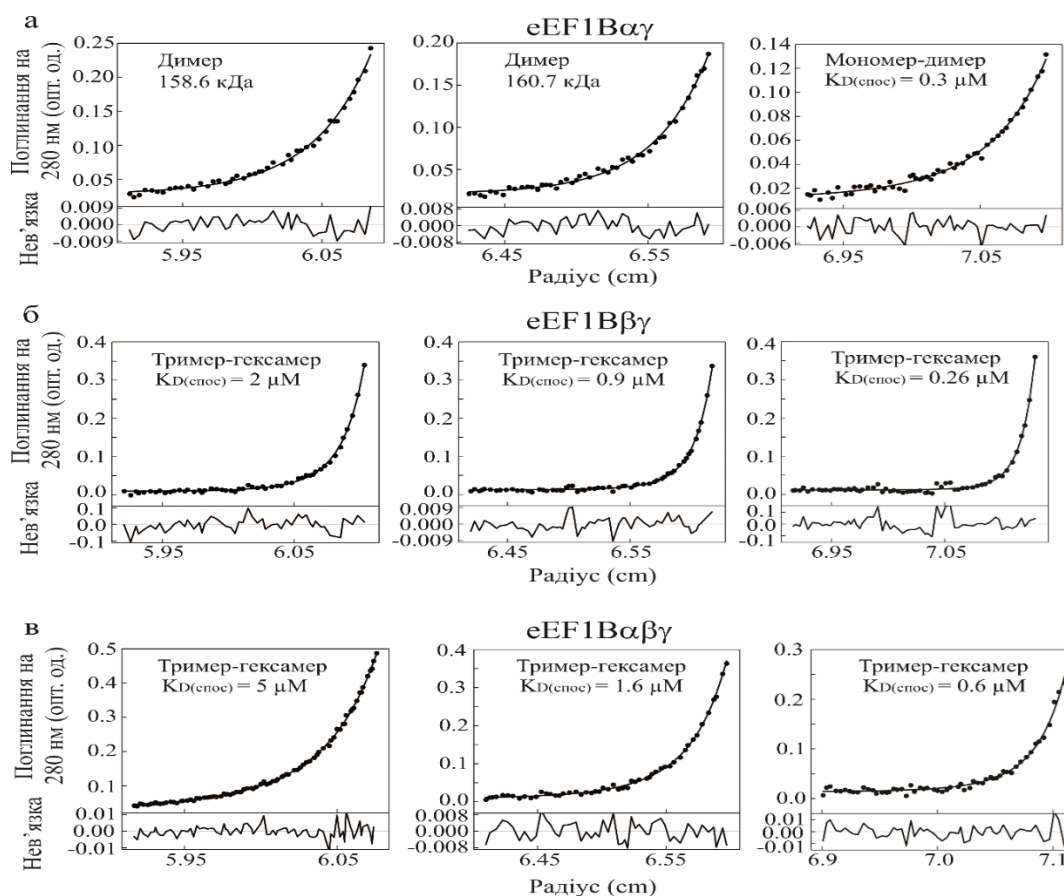


Рис. 3.27. Седиментограми РУЦ препаратів комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ (а), eEF1B $\beta\gamma$ (б) та eEF1B $\alpha\beta\gamma$ (в) з концентраціями 0,24 мг/мл (ліва панель), 0,12 мг/мл (центральна панель) та 0,06 мг/мл (права панель).

Седиментаційні профілі, отримані при досягненні комплексами стану термодинамічної рівноваги на кутовій швидкості 14000 об/хв. для eEF1B $\alpha\gamma$ та eEF1B $\beta\gamma$ і 9000 об/хв. для eEF1B $\alpha\beta\gamma$. Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки в процесі центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам. Для обрахування маси eEF1B($\alpha\gamma$)₂ використовували математичну модель седиментації монодисперсного розчину білка, молекули якого не взаємодіють між собою. Для обрахування седиментаційних кривих сумішей eEF1B $\alpha\gamma$ -eEF1B($\alpha\gamma$)₂, eEF1B($\beta\gamma$)₃-eEF1B($\beta\gamma$)₆ та eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃-eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₆ використовували математичну модель седиментації типу «мономер-димер», де за масу «мономеру» приймали теоретичні маси комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B($\beta\gamma$)₃ і eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃, відповідно

В той час як при низькій концентрації спостерігається суміш гетеродимерів $eEF1B\alpha\gamma$ і дигетеродимерів $eEF1B(\alpha\gamma)_2$ (рис. 3.27, права панель). У програмі SEDPHAT ми розрахували молекулярну масу гетеродимеру $eEF1B\alpha\gamma$ та константу дисоціації дигетеродимеру, що склали 80 кДа та 0,3 мкМ, відповідно. Загалом, дані ультрацентрифугування свідчать про те, що комплекс $eEF1B\alpha\gamma$ в розчині переважно знаходиться у формі дигетеродимеру. Разом з інформацією про несферичну форму молекули $eEF1B\alpha\gamma$, цей факт дозволяє пояснити завищене значення молекулярної маси комплексу на гель-фільтрації. За нашими даними субодиниця $eEF1B\alpha$ існує в розчині як мономер, в той час як $eEF1B\gamma$ може утворювати димери, тож ймовірно, саме він відповідає за димеризацію комплексу $eEF1B\alpha\gamma$.

Теоретично розрахована молекулярна маса комплексу $eEF1B\beta\gamma$ при співвідношенні субодиниць 1:1 складає 84,4 кДа, проте на хроматограмі 3.25 (середня панель), ми бачимо, що комплекс елюється з колонки в об'ємі, що відповідає масі близько 1000 кДа. Це значення майже в дванадцять разів перевищує теоретичне і свідчить про олігомеризацію комплексу $eEF1B\beta\gamma$. Гель-електрофорез в денатуруючих умовах підтвердив наявність обох субодиниць у фракціях хроматографічного піку (рис. 3.25, середня панель).

Далі ми провели ШУЦ комплексу $eEF1B\beta\gamma$, щоб більш точно визначити молекулярну масу утворюваного олігомеру. Аналіз седиментограми на рис. 3.26б показав наявність двох основних видів осідаючих молекул при $Sw = 4,30 S$ ($S_{(20,w)} = 8,729 S$) і $Sw = 7,66 S$ ($S_{(20,w)} = 15,551 S$). При обчисленні седиментаційних кривих ми отримали оптимальне співвідношення $f/f_0 = 1,64$. Використовуючи це значення визначили молекулярні маси молекул з двох піків, які склали 260 та 600 кДа відповідно. Отримані значення є близькими до розрахованої маси тригетеродимеру $eEF1B(\beta\gamma)_3$ (253,2 кДа) та гексагетеродимеру $eEF1B(\beta\gamma)_6$ (506,4 кДа). Обчислений гідродинамічний параметр S_{max}/S для $eEF1B\beta\gamma$ склав 1,73, що свідчить про його помірно видовжену форму (157).

РУЦ проводили для трьох різних концентрацій $eEF1B\beta\gamma$. Аналіз седиментаційних кривих показав, що комплекс $eEF1B\beta\gamma$ знаходиться в рівновазі тригетеродимер-гексагетеродимер (рис. 3.27б). За допомогою SEDPHAT ми визначили, що при молекулярній масі тригетеродимеру $eEF1B(\beta\gamma)_3$ 253.2 кДа, константи дисоціації гексагетеродимеру становили 2 мкМ, 0,9 мкМ і 0,26 мкМ, відповідно при різних концентраціях препарату комплексу. Різні значення обчислених констант дисоціації вказує на те, що вони є «спостережними».

У розділі 3.2 ми показали, що $eEF1B\beta$ є стабільним тримером (рис. 3.9). Зважаючи на той факт, що комплекс з $eEF1B\gamma$ він утворює у співвідношенні 1:1, існування тригетеродимерного комплексу $eEF1B(\beta\gamma)_3$ виглядає логічним. Утворення гексагетеродимеру $eEF1B(\beta\gamma)_6$ можна пояснити здатністю субодиниці $eEF1B\gamma$ до димеризації. Тим не менш, навіть гексагетеродимер комплексу $eEF1B\beta\gamma$ має теоретичну молекулярну масу майже вдвічі меншу, ніж оцінена за допомогою гель-фільтрації. Цей результат ми можемо пояснити витягнутою формою комплексу. Оскільки субодиниці $eEF1B\beta$ і $eEF1B\gamma$ є несферичними білками з сильно і помірно видовженими формами, відповідно, їх комплекс має також помірно видовжену форму. Обчислений гідродинамічний параметр $S_{max}/S = 1.73$ підтверджує це твердження (157).

Потрійний комплекс $eEF1B\alpha\beta\gamma$, сформований при співвідношенні субодиниць 1:1:1, мігрує на колонці Superose 6HR як показано на хроматограмі рис. 3.25а, (права панель). Об'єм елюції єдиного піку $eEF1B\alpha\beta\gamma$ дорівнює 10,9 мл, що відповідає молекулярній масі більше 1 МДа. Варто зазначити, що цей об'єм менший, ніж у комплексу $eEF1B\beta\gamma$ (11,7 мл), що говорить про утворення олігомерів більшої форми. Наявність усіх трьох субодиниць у фракціях хроматографічного піку було підтверджено гель-електрофорезом в денатуруючих умовах (рис. 3.25, права панель).

Далі $eEF1B\alpha\beta\gamma$ було проаналізовано за допомогою ШУЦ. На седиментограмі (рис. 3.26в) ми бачимо наявність трьох видів молекул зі значеннями $S_w = 3.588 S$ ($S_{(20,w)} = 6.965 S$), $S_w = 5.021 S$ ($S_{(20,w)} = 9.746 S$) і $S_w =$

6.297 S ($S_{(20,w)} = 12.224$ S). Ми розрахували найкраще співвідношення f/f_0 , яке склало 1.89. З урахуванням останнього, молекулярні маси першого, другого та третього видів молекул становили 200, 340 та 480 кДа, відповідно. Інтегрування розподілу $c(s)$ показала, що пік першого виду становив 18,7%, другого - 46,7% і третього - 24,5% від загального сигналу поглинання (рис. 3.24в). При співвідношенні субодиниць потрійного комплексу 1:1:1, його розрахована молекулярна маса становить 111.8 кДа. Таким чином, маса найбільш представленої другої фракції (340 кДа) відповідає тригетеротримеру $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$. Стехіометрія субодиниць першого і третього піків залишається невизначеною. Комплекс $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$ має помірно видовжену форму, адже розрахований нами гідродинамічний параметр S_{max}/S склав 1.79 (157).

Метод РУЦ також був застосований для потрійного комплексу $eEF1B\alpha\beta\gamma$. Він показав, що цей комплекс представляє собою суміш тригетеротримерів та гексагетеротримерів. Розрахована маса тригетеротримеру комплексу становила 335.6 кДа. Отримані значення констант диссоціації гексагетеротримеру залежать від концентрації досліджуваного зразка та складають 5 мкМ, 1,6 мкМ та 0,6 мкМ, відповідно (рис. 3.27в), що вказує на те, що отримані значення констант є «спостережними».

Підсумовуючи можна сказати, що α , β і γ субодиниці $eEF1B$ утворюють стабільні подвійні ($\alpha\gamma$ і $\beta\gamma$) і потрійний ($\alpha\beta\gamma$) комплекси *in vitro*, з еквімолярною стехіометрією. $eEF1B\alpha\gamma$ існує як стабільний дигетеродимер скоріш за все за рахунок димеризації субодиниці $eEF1B\gamma$. Комплекс $eEF1B\beta\gamma$ утворює суміш тригетеродимерів та гексагетеродимерів, тоді як $eEF1B\alpha\beta\gamma$ – суміш тригетеротримерів та гексагетеротримерів. Формування комплексів ($eEF1B(\beta\gamma)_3$ і $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$) обумовлено власною тримеризацією субодиниці $eEF1B\beta$, подальша олігомеризація до комплексів ($eEF1B(\beta\gamma)_6$ і $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_6$), ймовірно, відбувається через димеризацію $eEF1B\gamma$. Важливо, що як подвійні, так і потрійні комплекси мають помірно видовжену форму, що також сприяє завищенню їх молекулярної маси при аналізі методом гель-фільтрації.

Відомо, що до взаємодії у комплексі eEF1B залучені N-кінцеві домени субодиниць eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ . Тож ми отримали (eEF1B α (1-92), eEF1B β (1-77) та eEF1B γ (1-228) в індивідуальному стані і використали їх для реконструкції комплексу між ними *in vitro* (рис. 3.28). Для цього вищезначені білки змішували в еквімолярній кількості (співвідношення 1:1:1) і аналізували за допомогою аналітичної гель-фільтрації та АУЦ. Потрійний комплекс eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) елююється з колонки HR Superose 6 (рис. 3.28а) як єдиний пік, який відповідає молекулярній масі близько 80 кДа, що є близьким до теоретичного значення молекулярної маси його дигетеротримеру (96 кДа). Наявність всіх білків у фракціях піку підтверджували за допомогою гель-електрофорезу.

Аналіз седиментограми ШУЦ потрійного комплексу з концентрацією 0,36 мг/мл (7,6 мкМ) показав наявність одного типу молекул з $S_w = 2.345$ S (рис. 3.26б). Розраховане нами оптимальне співвідношення f/f_0 дорівнювало 1.42, що свідчить про помірну витягнуту форму комплексу. Молекулярна маса eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) була розрахована в програмі SEDFIT і становила 75 кДа що є вищою за теоретичне значення гетеротримеру (48 кДа), але нижчою за дигетеротримеру (96 кДа). Зниження концентрації комплексу до 0,18 мг/мл (3,8 мкМ) та 0,1 мг/мл (2,1 мкМ) не призвело до суттєвої зміни седиментаційного розподілу (дані не показані). Далі, ми застосували метод РУЦ, щоб більш точно оцінити молекулярну масу комплексу eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228). По седиментограмі ми розрахували, що eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) має молекулярну масу 98.9 ± 0.6 кДа (рис. 3.28в), що відповідає теоретичній масі дигетеротримерного комплексу (96 кДа).

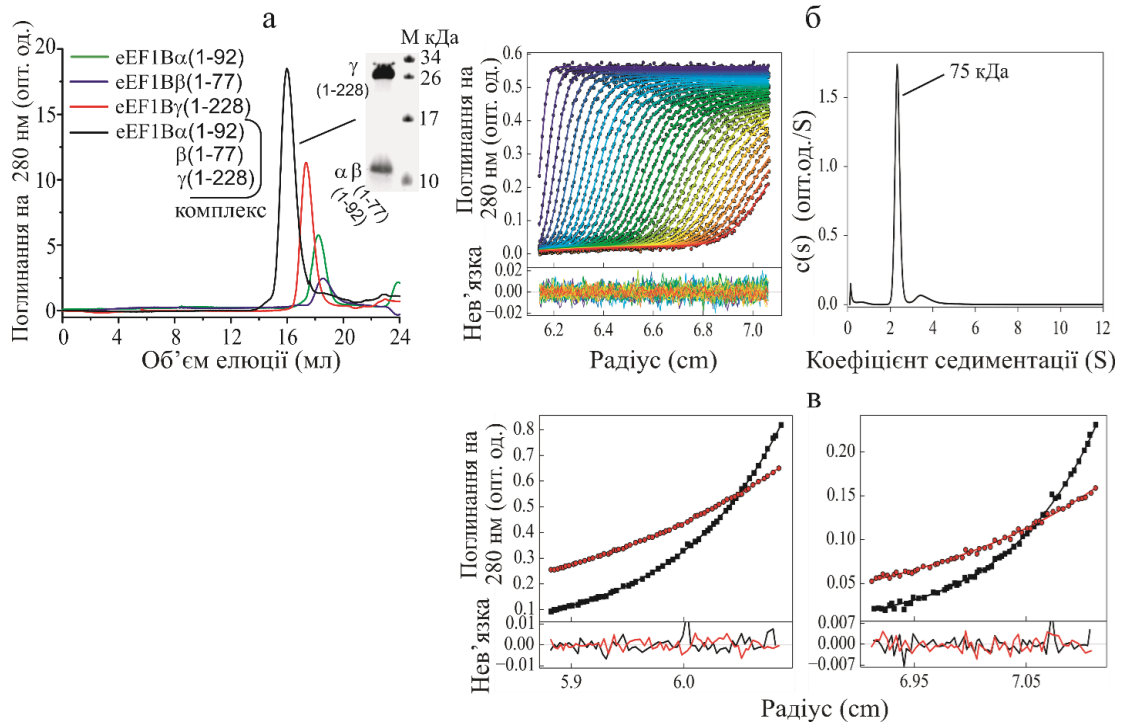


Рис. 3.28. Характеристика очищеного препарату комплексу eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) людини.

(а) хроматограма комплексу eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) на Superose 6HR. Індивідуальні повнорозмірні субодиниці наносили окремо в якості референсу. Вставка: електрофореграма комплексу eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) в 18% поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах. Центральні фракції піку комплексу об'єднували, концентрували і наносили у кількості 5 мкг білка на доріжку. (б) седиментограма ШУЦ препарату eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) з концентрацією 0,36 мг/мл. Ліва панель: сукупність седиментаційних кривих. Права панель: графік функції відновленого розподілу по коефіцієнту седиментації в координатах $c(s)$ від s . (в) Седиментограми РУЦ препаратів комплексу eEF1B α (1-92) β (1-77) γ (1-228) з концентраціями 0,33 мг/мл (ліворуч) та 0,08 мг/мл (праворуч). Червоний – профілі отримані при досягненні термодинамічної рівноваги на кутових швидкостях 10000 об/хв., чорний – 12000 об/хв. Символи показують значення оптичного поглинання молекул білка, отримані при скануванні центрифужної комірки в процесі центрифугування. Суцільні лінії представляють апроксимацію по експериментальним точкам.

Висновки до підрозділу 3.4.

Показано, що комплекси eEF1B $\alpha\gamma$ та eEF1B $\beta\gamma$ утворюються при еквімолярному співвідношенні субодиниць.

Продемонстровано, що eEF1B $\alpha\gamma$ переважно існує у вигляді дигетеродимеру, eEF1B($\alpha\gamma$)₂, помірно видовженої форми. При низьких концентраціях комплексу ми зафіксували існування стану термодинамічної рівноваги типу гетеродимер-дигетеродимер з константою дисоціації останнього 0,3 мкМ.

Показано, що при взаємодії β та γ субодиниць формується суміш двох типів комплексів: тригетеродимерного eEF1B($\beta\gamma$)₃ та гексагетеродимерного eEF1B($\beta\gamma$)₆.

Встановлено, що при взаємодії α , β та γ субодиниць також утворюється суміш двох типів комплексів: тригетеротримерного eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ та гексагетеротримерного eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₆.

Потрійний комплекс, сформований при змішуванні N-кінцевих доменів α , β та γ субодиниць являє собою стабільний дигетеротример.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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

3.5. Визначення сайтів взаємодії між субодинами комплексу eEF1B. Моделювання комплексу eEF1B

Відомо, що до взаємодії у комплексі eEF1B залучені N-кінцеві домени субодинами eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ , проте сайти цих взаємодій залишалися невизначеними [4,13]. Тож наступним нашим завданням було визначити, які ділянки N-кінцевих доменів субодинами eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ утворюють між собою контакти. В першу чергу ми використали створені нами вкорочені форми eEF1B α та eEF1B β , а також повнорозмірний eEF1B γ та його C-кінцевий домен для перевірки їх здатності до утворення подвійних комплексів. На рис.3.29а,б видно, що вкорочені форми eEF1B α (19-225) та eEF1B β (43-281) повністю втратили можливість зв'язуватись з повнорозмірним eEF1B γ .

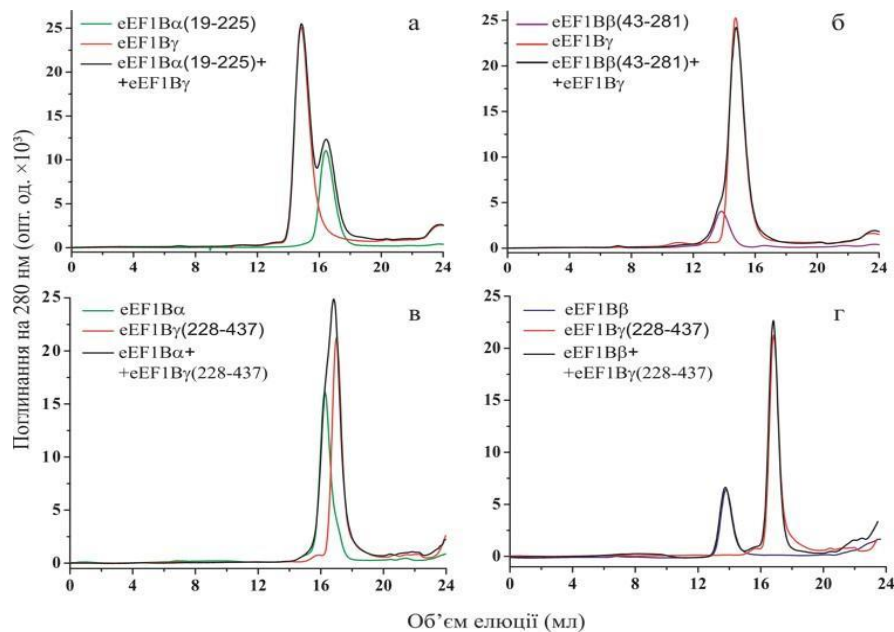


Рис. 3.29. Хроматограми сумішей вкорочених форм eEF1B α , eEF1B β і eEF1B γ з їх повнорозмірними білками-партнерами. 100 мкл 10 мкМ суміші eEF1B α (19-225) з eEF1B γ (а), eEF1B β (43-281) з eEF1B γ (б), eEF1B γ (228-437) з eEF1B α (в) та eEF1B γ (228-437) з eEF1B β (г) наносили на колонку Superose 6HR. Індивідуальні повнорозмірні білки та відповідні N-кінцеві вкорочені форми в концентрації 10 мкМ наносили окремо.

Це свідчить або про безпосередню участь видалених ділянок у взаємодії, або про їх вплив на укладку відповідних доменів, яка порушується внаслідок їх видалення. Отже, видалені амінокислотні послідовності на початку N-кінців обох білків надзвичайно важливі для зв'язування з eEF1V γ .

Щоб виключити участь C-кінцевого домену eEF1V γ у формуванні комплексу eEF1B, ми перевірили зв'язування eEF1V γ (228-437), що включає область лінкера та C-кінцевий домен, з повнорозмірними eEF1V α та eEF1V β (рис. 3.29в,г). Як і очікувалось, в такому випадку формування комплексів не відбувалося, що підтверджує виключну роль N-кінцевого домену eEF1V γ у комплексоутворенні.

Для більш точної ідентифікації сайтів взаємодії між субодинами ми застосували техніку H/D-MS до комплексів eEF1V $\alpha\gamma$, eEF1V $\beta\gamma$ та eEF1V $\alpha\beta\gamma$. Цей метод дозволяє виміряти швидкість воднево-дейтерієвого обміну на молекулі білка. Як вже було зазначено вище, вона може залежати від жорсткості третинної структури і доступності воднів амідних груп поліпептидного ланцюга для розчинника. В процесі взаємодії ці показники зазвичай змінюються, що дозволяє порівняти швидкість обміну для кожного пептиду білка у вільному та зв'язаному з партнером стані і окреслити зону взаємодії цього білка з партнером.

Спочатку ми дослідили комплекс eEF1V $\alpha\gamma$. Для цього була визначена кінетика включення дейтерію в послідовність індивідуальних субодинамиць, а потім тих самих білків, але вже у складі комплексу. Значення сукупного захисту та диференційного сукупного захисту розраховували, як описано в розділі «Матеріали і методи» (рис 2.4.), і будували графік представлений на рис. 3.30. Значення сукупного захисту пептидів eEF1V α , або eEF1V γ що знаходилися в комплексі eEF1V $\alpha\gamma$, позначені червоним кольором, а пептидів індивідуальних білків – синім (рис. 3.30а). На графіку диференційованого сукупного захисту коричневим кольором позначено пептиди, які продемонстрували статистично достовірну зміну значень при формуванні комплексу eEF1V $\alpha\gamma$.

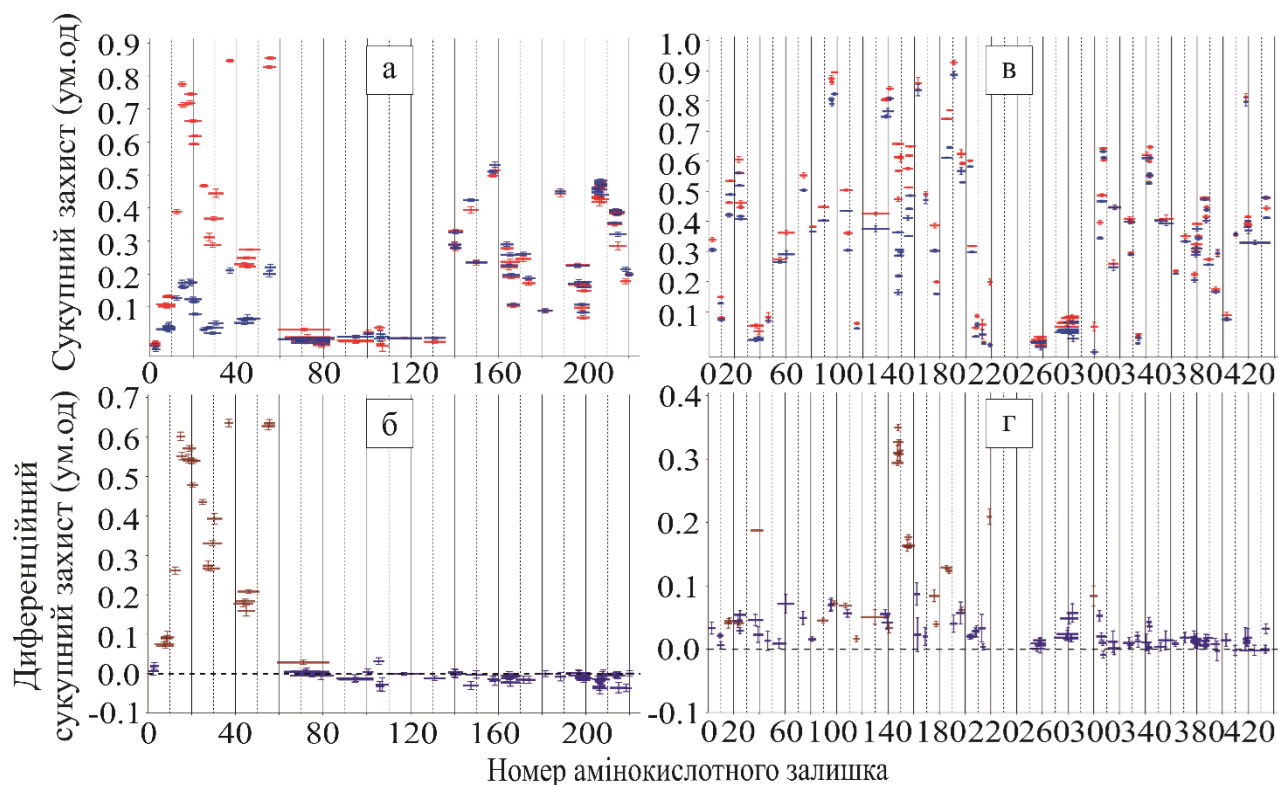


Рис. 3.30. Ідентифікація пептидів eEF1Va (а і б), які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1V γ та eEF1V β (в і г), які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1Va. На графіках, де представлений сукупний захист, пептиди eEF1Va (а) та eEF1V γ (в), отримані з комплексів позначені червоним кольором, а пептиди з індивідуальних білків - позначені синім кольором. На графіках, де представлений диференційний сукупний захист, коричневим кольором позначені пептиди eEF1Va (б), та eEF1V γ (г), які змінили значення диференційного сукупного захисту при взаємодії з партнером, і різниця захисту є статистично значущою для трьох або більше часових точок інкубації. Ті пептиди, які не змінили значення диференційного сукупного захисту при взаємодії з партнером, позначені синім кольором

Рис. 3.30б показує, що більшість пептидів, які входять до складу N-кінцевого домену eEF1Va, за винятком перших п'яти амінокислот, мали позитивні значення диференційного сукупного захисту. Це свідчить про те, що

майже весь N-кінцевий домен eEF1B α зазнає збільшення структурної жорсткості при зв'язуванні з eEF1B γ . Як ми показали раніше, видалення перших 18 амінокислотних залишків eEF1B α унеможливило взаємодію з eEF1B γ . На нашу думку, це можна пояснити значним порушенням фолдингу N-кінцевого домену eEF1B α , яке і спричиняє такий ефект.

В свою чергу на eEF1B γ можна було виділити більш вузькі ділянки, які змінили ступінь захисту при взаємодії з eEF1B α . Так пептиди 144-161 та 170-190 eEF1B γ стали більш захищеними від включення дейтерію (рис. 3.30в,г), що може свідчити про їх безпосередню участь у контакті 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. 3.30г), що узгоджується з нашими результатами, отриманими іншим методом (рис. 3.29в).

Наступним ми досліджували комплекс eEF1B $\beta\gamma$. На відміну від eEF1B α , для субодиниці eEF1B β у комплексі з eEF1B γ збільшення захисту спостерігали лише для пептидів, що лежать в регіоні 11-29 амінокислотних залишків (рис. 3.31а,б). Ця ділянка належить до N-кінцевого домену eEF1B β і охоплює першу і другу α -спіралі. Решта молекули eEF1B β (LZ-мотив, лінкерна область, CAR та GEF-домен) не піддається суттєвим змінам (рис. 3.31а,б). Це узгоджується з отриманими нами результатами, коли видалення перших 42 амінокислот eEF1B β унеможливило його взаємодію з eEF1B γ (рис. 3.29б). Тому можна зробити висновок, що саме ця ділянка контактує з eEF1B γ .

В той же час зв'язування eEF1B β з eEF1B γ провокує доволі масштабні зміни в N-кінцевому домені останнього (рис. 3.31в,г). Позитивні значення диференційного сукупного захисту пептидів, що охоплюють послідовність 7-190 амінокислотних залишків, свідчать про зменшення швидкості включення дейтерію в цьому регіоні (рис. 3.31г). Такий результат говорить про підвищення структурної жорсткості всього N-кінцевого домену eEF1B γ при взаємодії з eEF1B β . Варто зазначити, що значущих змін ступеня захисту С-кінцевого домену eEF1B γ та лінкерної області (залишки 220-440) від включення дейтерію не відбулося (рис. 3.31г).

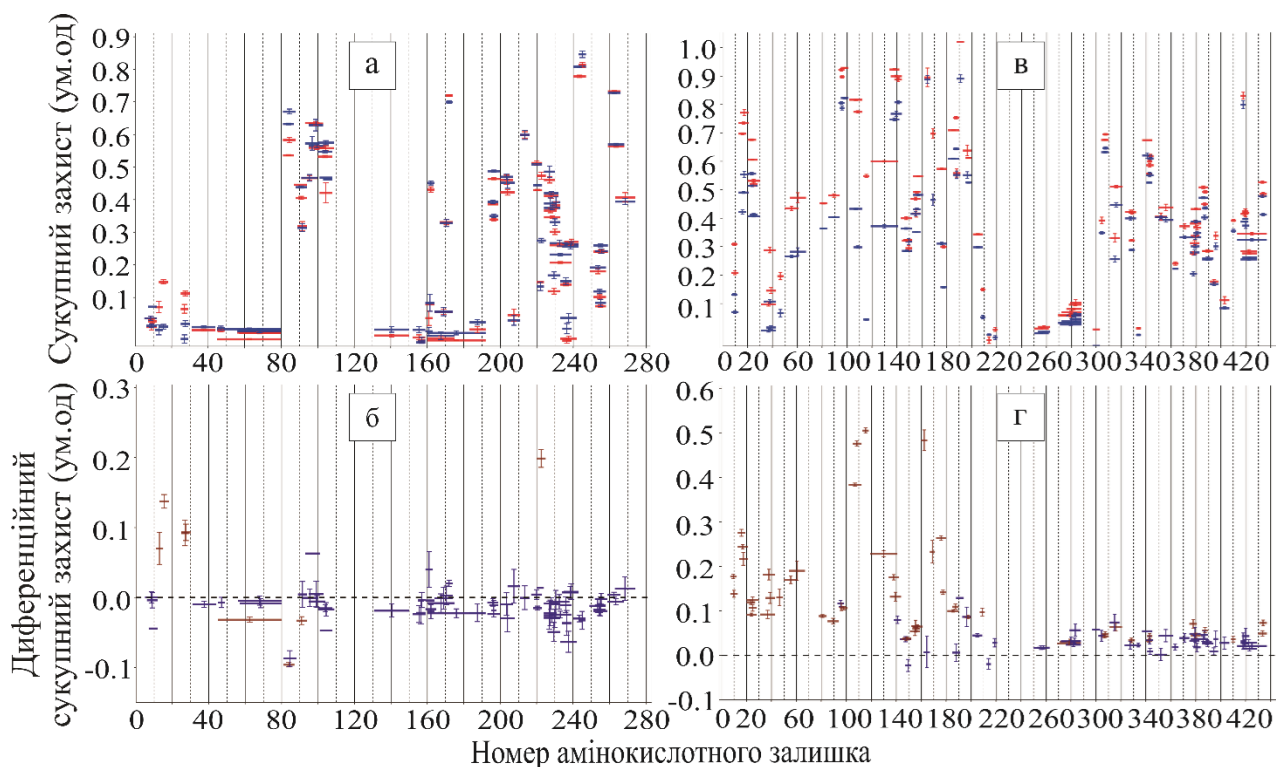


Рис. 3.31. Ідентифікація пептидів eEF1V β (а і б) які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1V γ та eEF1V γ , які змінюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1V β (в і г). На графіках, де представлений сукупний захист, пептиди, eEF1V β (а) та eEF1V γ (в), отримані з комплексів позначені червоним кольором, а пептиди з індивідуальних білків - позначені синім кольором. На графіках, де представлений диференційний сукупний захист, коричневим кольором позначені пептиди eEF1V β (б), та eEF1V γ (г), які змінили значення диференційного сукупного захисту при взаємодії з партнером, і різниця захисту є статистично значущою для трьох або більше часових точок інкубації. Ті пептиди, які не змінили значення диференційного сукупного захисту при взаємодії з партнером, позначені синім кольором

Відомо, що eEF1V α та eEF1V β взаємодіють з N-кінцевим доменом eEF1V γ одночасно. Для того, щоб зрозуміти, чи впливає присутність однієї субодиниці в комплексі на зв'язування другої субодиниці, ми провели порівняння даних диференційного захисту пептидів eEF1V α між комплексами

eEF1V α γ та eEF1V α β γ . Аналогічне порівняння провели і для пептидів eEF1V β в комплексах eEF1V β γ та eEF1V α β γ .

Додавання субодиниці eEF1V β до комплексу eEF1V α γ призвело до незначних змін значень диференційного сукупного захисту eEF1V α (рис. 3.32а). Коротка ділянка з 137 по 154 залишки, що входять до першої β -складки домену GEF, виявилась більш захищеною в потрійному комплексі порівняно з подвійним. Фрагмент eEF1V α 137-154 не бере участі у взаємодії з eEF1V γ і розташований далеко від місця взаємодії, тож підвищення рівня захисту цієї ділянки можна пояснити зменшенням її локальної конформаційної рухливості в потрійному комплексі.

Додавання eEF1V α до комплексу eEF1V β γ виявило також дуже незначний вплив на конформацію eEF1V β (рис. 3.32б). Цікаво, що в даному випадку ефект проявився у послабленні захисту ділянки 192-200 eEF1V β , яка також належить до першого β -ланцюга домену GEF (рис. 3.32б), ймовірно, через зміни локальної конформаційної рухливості вищезазначеного фрагменту. Також зміни в значеннях диференційного сукупного захисту спостерігались в області ділянки, яка відповідає LZ-мотиву (залишки 80-120). В даному випадку ми бачимо підсилення рівню захисту, що вказує на більшу стабілізацію α -суперспірального пучка в потрійному комплексі.

N-кінцевий домен eEF1V γ взаємодіє з обома факторами обміну нуклеотиду одночасно, що може вказувати на можливий вплив зв'язування одного фактора на структуру сайту зв'язування іншого білка. Однак профілі захисту H/D-MS пептидів eEF1V γ у потрійному комплексі eEF1V α β γ виявилися дуже подібними до тих, що були отримані для комплексів eEF1V α γ (рис. 3.32в,г) та eEF1V β γ (рис. 3.32д,е), відповідно. Цей результат свідчить про незалежний спосіб зв'язування обох факторів обміну нуклеотиду з eEF1V γ .

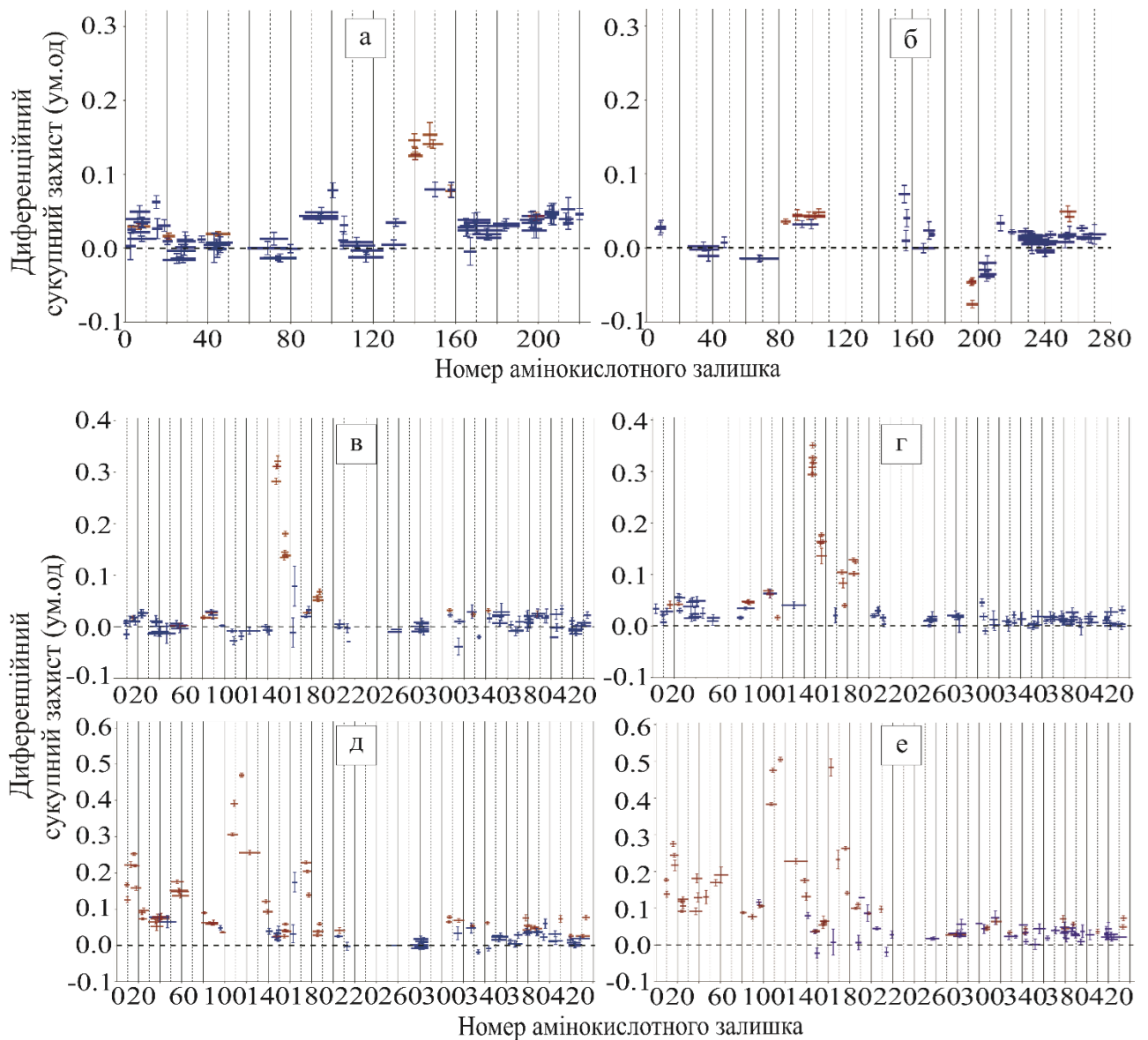


Рис. 3.32. Ідентифікація пептидів eEF1V α (а), eEF1V β (б) та eEF1V γ (в – е), які змінюють свій захист від включення дейтерію у комплексі eEF1V $\alpha\beta\gamma$ в порівнянні з комплексами eEF1V $\alpha\gamma$ (в і г) та eEF1V $\beta\gamma$ (д і е), відповідно.

Коричневим кольором позначені пептиди eEF1V α (а) та eEF1V β (б), де різниця диференційного сукупного захисту є статистично значущою для трьох або більше часових точок інкубації комплексів eEF1V $\alpha\gamma$ проти eEF1V $\alpha\beta\gamma$ (а) та eEF1V $\beta\gamma$ проти eEF1V $\alpha\beta\gamma$ (б). На графіках (в) та (г) коричневим позначено пептиди eEF1V γ , які змінюють захист у комплексах eEF1V $\beta\gamma$ проти eEF1V $\alpha\beta\gamma$ та eEF1V γ проти eEF1V $\alpha\gamma$, відповідно, на графіках (д) та (е) – у комплексах eEF1V $\alpha\gamma$ проти eEF1V $\alpha\beta\gamma$ та eEF1V γ проти eEF1V $\beta\gamma$, відповідно. Позначені синім кольором пептиди не змінюють свого захисту

Таким чином, можна зробити висновок, що взаємодія одного фактора обміну нуклеотиду з eEF1V γ не має значного впливу на сайт зв'язування іншого фактора.

Далі ми зробили реконструкцію комплексу eEF1B *in silico*, використовуючи структури N-кінцевих доменів субодиниць. Кристалічна структура комплексу між N-кінцевими доменами eEF1B α та eEF1V γ (PDB ID: 5DQS) відома, тож ми зосередились на моделюванні взаємодії між eEF1B β та eEF1V γ (рис. 3.33). Докінг між цими білками здійснювали за допомогою алгоритму PatchDock (171). N-кінцевий домен eEF1B β (1-77) визначали як ліганд, а N-кінцевий домен eEF1V γ (1-210) визначали як рецептор, адже більшість його пептидів зазнавали змін конформаційної динаміки при взаємодії з eEF1B β (1-77). Координати eEF1B β (1-77) та eEF1V γ (1-210) відповідали атомістичним моделям, зображеним на рис. 3.12. та рис. 3.23.

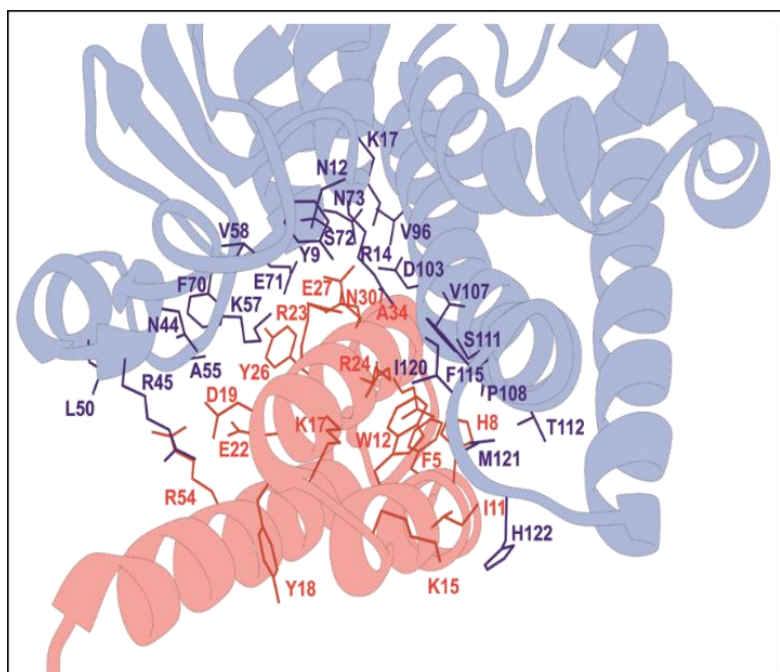


Рис. 3.33. Амінокислотні залишки, які беруть участь у взаємодії між eEF1B β та eEF1V γ (межа відстані становить 5Å). Бічні радикали амінокислот eEF1B β мають червоний колір, eEF1V γ - синій

PatchDock сформував список комплексів білок-ліганд, відсортований за шкалою комплементарності геометричних форми площею поверхні взаємодії рецептор-ліганд та енергією контактів між атомами ліганда і рецептора. П'ять найкращих моделей вдосконалювали за допомогою FireDock (173). Модель комплексу N-кінцевих доменів eEF1B $\beta\gamma$, яка найкраще узгоджувалась з даними H/D-MS показана на рис. 3.33. Перші дві α -спіралі eEF1B β у зігнутій 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 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 (рис. 3.34б). Моделювання потрійного комплексу eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ повнорозмірних субодиниць, зображеного на рис. 3.34а, проводили по аналогічному алгоритму.

В результаті ми отримали модель четвертинної організації комплексу eEF1B. Субодиниці eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ взаємодіють між собою через N-кінцеві домени, при цьому їх C-кінцеві домени вільно розташовані у просторі завдяки своїм неструктурованим динамічним лінкерним регіонам. C-кінцеві ділянки eEF1B α та eEF1B β закінчуються GEF-доменами, які мають бути доступними до взаємодії з фактором eEF1A. Функціональна значимість C-кінцевого домену eEF1B γ наразі невідома.

Варто відмітити, що відповідно до створеної нами моделі, роль структурного компоненту 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.

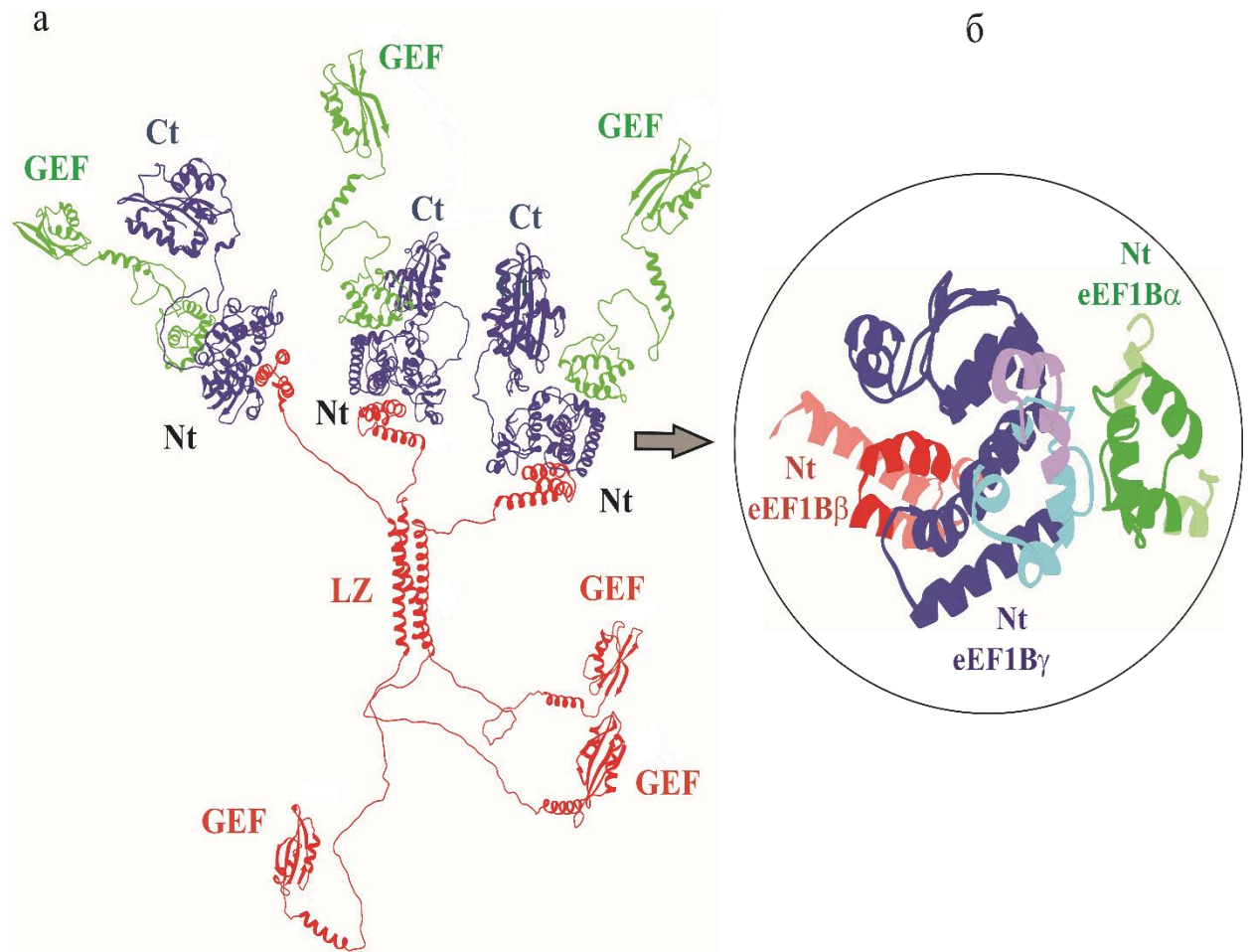


Рис. 3.34. Модель четвертинної організації комплексу eEF1B.

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

(а) просторова модель eEF1B складена з повнорозмірних субодиниць, (б) модель комплексу N-кінцевих доменів eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ , пофарбованих відповідно до даних H/D-MS. Ділянки N-кінцевих доменів eEF1B α і eEF1B β , захищені від обміну H/D в цьому комплексі, позначені зеленим та червоним, відповідно. Ділянки, які не змінюють захист у комплексі, позначені світло-зеленим та світло-червоним, відповідно. Регіони N-кінцевого домену eEF1B γ , які стають більш захищеними при взаємодії з eEF1B α та eEF1B β , позначаються світло-синім та темно-синім, відповідно. Короткий фрагмент N-кінцевого домену eEF1B γ , який не змінює захист у комплексі з обома партнерами має світло-фіолетовий колір

Щоб перевірити, чи дійсно всі GEF-домени, які входять до складу eEF1B доступні для взаємодії з eEF1A ми провели титрування фактором eEF1A2 комплексу eEF1B з наступним розділенням суміші гелі-електрофорезом в нативних умовах. На електрофореграмі 3.35 видно, що одна молекула комплексу може утримувати до шести молекул eEF1A2.

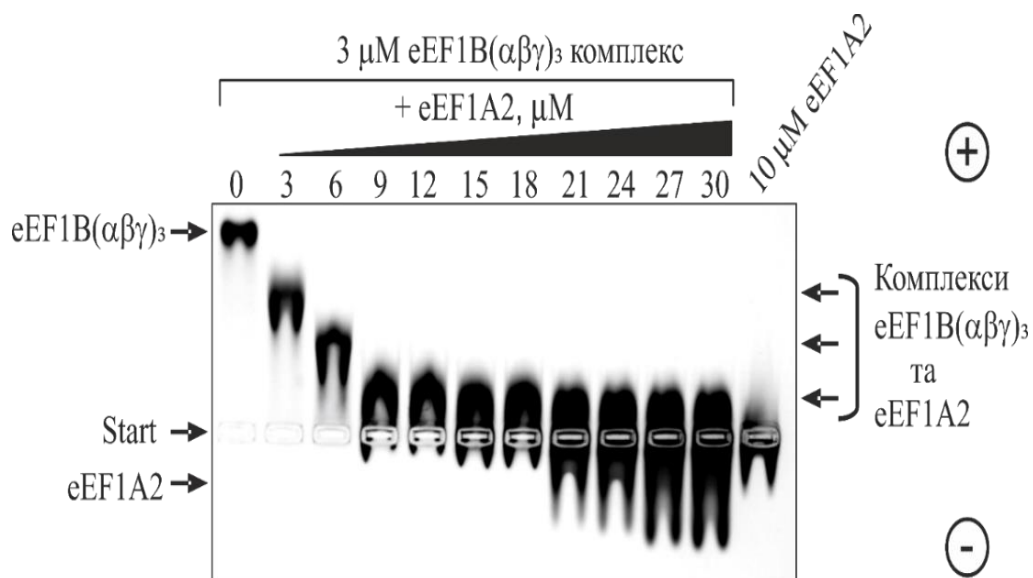


Рис. 3.35. Електрофореграма титрування комплексу eEF1B(αβγ)₃ зростаючою концентрацією фактора eEF1A2 в нативних умовах.

Комплекс eEF1B(αβγ)₃ інкубували з eEF1A2 10 хв. при 25°C. Білкові суміші розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі в нативних умовах. Білки були виявлені фарбуванням Coomassie Brilliant Blue.

Висновки до підрозділу 3.5.

Показано, що видалення перших 18 амінокислотних залишків eEF1Bα та 42 амінокислотних залишків eEF1Bβ унеможлиблює взаємодію цих субодиниць з повнорозмірним eEF1Bγ.

За допомогою методу H/D-MS встановлено, що майже увесь N-кінцевий домен eEF1Bα (залишки 6-58) збільшує свій захист від проникнення дейтерію при взаємодії з eEF1Bγ. В той же час лише невелика ділянка N-кінцевого

домену eEF1B γ (залишки 144-161 та 170-190) стає більш захищеною при взаємодії з eEF1B α . Отриманий результат добре узгоджується з кристалічною структурою комплексу N-кінцевих доменів eEF1B α та eEF1B γ (PDB 5DQS).

За допомогою методу H/D-MS також встановлено, що при формуванні комплексу eEF1B $\beta\gamma$, лише для короткої ділянки (11-29 амінокислотних залишків) eEF1B β спостерігається підвищення захисту від проникнення дейтерію, тоді як в молекулі eEF1B γ більшість пептидів N-кінцевого домену, за винятком тих, що взаємодіють з eEF1B α , стають більш захищеними. Це свідчить про набуття N-кінцевим доменом eEF1B γ більшої структурної жорсткості саме при утворенні комплексу з eEF1B β .

Показано, що додавання eEF1B α до комплексу eEF1B $\beta\gamma$, чи eEF1B β до eEF1B $\alpha\gamma$ майже не змінює картини сукупного диференційного захисту, відповідно, субодиниць eEF1B α і eEF1B β , зв'язаних з eEF1B γ .

За допомогою методу молекулярного докінгу побудовано структурні моделі комплексів N-кінцевих доменів eEF1B $\beta\gamma$ і eEF1B $\alpha\beta\gamma$, а також модель структурної організації eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ з повнорозмірними субодиницями. Отримані моделі узгоджуються з даними H/D-MS.

За допомогою електрофорезу в нативних умовах показано, що комплекс eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃ здатен утримувати до шести молекул фактора eEF1A2.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

Bondarchuk T.V., Shalak V. F., Lozhko D. M., Fatalska A., Szczepanowski R. H., Liudkovska V., Tsuvariev O. Yu., Dadlez M., El'skaya A. V., Negrutskii 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

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Як було зазначено раніше, інформація про структуру комплексу факторів елонгації трансляції вищих еукаріот eEF1H є досить суперечливою, а його функціональні дослідження залишили багато відкритих питань. На сьогоднішній день просторові структури повнорозмірних субодиниць які входять до комплексу eEF1B залишалися невідомими. Наразі є доступною структурна інформація щодо ізольованих доменів субодиниць eEF1B α , eEF1B β та eEF1B γ , включаючи неопубліковані структури з Банку даних білків RCSB. Таким чином, ми доповнили наші власні експериментальні дані наявною структурною інформацією для побудови моделей структур окремих субодиниць та реконструкції просторової організації комплексу eEF1B.

eEF1B α людини - це мономерний білок помірно видовженої форми, що складається з N-, CAR- та GEF- доменів і довгої неупорядкованої лінкерної області між N- та CAR-доменами (рис. 3.2). Ми показали, що лінкерна область і CAR-домен є структурно динамічними елементами, що забезпечують конформаційну гнучкість для всієї молекули. Це дало нам змогу побудувати модель повнорозмірної eEF1B α .

З літературних джерел відомо, що eEF1B γ стимулює функціональну активність eEF1B α (5), але механізм цього феномену розкрито не було. В результаті експериментів з вкороченими варіантами субодиниці eEF1B α , ми показали, що видалення N-кінцевого домену прискорює швидкість обміну [H³]ГТФ/ГТФ на eEF1A у порівнянні з повнорозмірним eEF1B α . Більше того, таке видалення підвищує спорідненість білка з видаленим N-кінцевим доменом до eEF1A у порівнянні з повнорозмірним eEF1B α . Отже, N-кінцевий домен eEF1B α може заважати приєднанню eEF1A до GEF-домену і тим самим

зменшувати швидкість обміну гуанінового нуклеотиду. Таким чином, нами був запропонований наступний механізм eEF1B γ -опосередкованої стимуляції активності eEF1B α . Ми припускаємо, що N-кінцевий домен молекули eEF1B α має конформацію, яка частково перешкоджає взаємодії eEF1A з GEF-доменом. Формування комплексу між eEF1B γ та N-кінцевим доменом eEF1B α веде до певної конформаційної зміни в останньому, що робить GEF-домен повністю доступним для eEF1A (рис 4.1.).

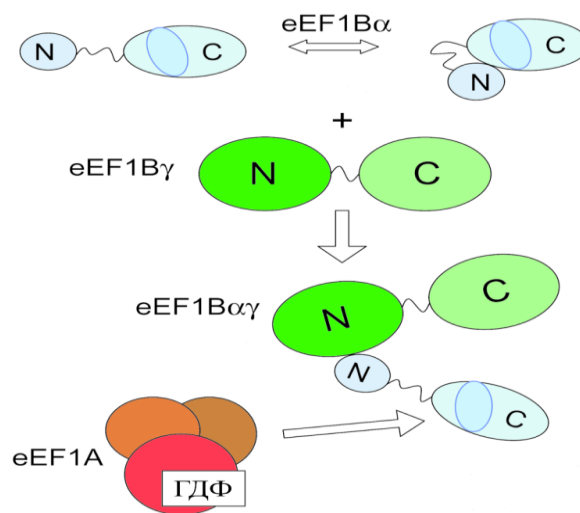


Рис. 4.1. Схема впливу субодиниці eEF1B γ на конформацію eEF1B α , що призводить до підвищення функціональної активності останнього. N- та C-кінцеві домени субодиниць позначені відповідними літерами.

В результаті усувається інгібуючий ефект N-кінцевого домену eEF1B α , тож комплекс eEF1B $\alpha\gamma$ в кілька разів швидше обмінює гуаніновий нуклеотид порівняно з індивідуальним eEF1B α (рис. 3.5). Іншим важливим висновком, який можна зробити з експериментів нативного електрофорезу, є те, що повнорозмірний eEF1B α має нижчу спорідненість до eEF1A1 порівняно з eEF1A2 (рис. 3.7). Таким чином, беручи до уваги низький рівень спонтанного вивільнення ГДФ з eEF1A2 та його більшу спорідненість до eEF1B α , ця ізоформа може бути більш залежною від активності фактора обміну гуанінового нуклеотиду, ніж eEF1A1.

На відміну від eEF1B α , eEF1B β проявляє здатність до самоасоціації (104). Використовуючи аналітичне ультрацентрифугування, ми виявили, що eEF1B β людини є стабільним тримером сильно витягнутої форми (Рис 3.8), і що за його тримеризацію відповідає LZ-мотив (рис. 3.13.). N-кінцевий домен eEF1B β не має суттєвої гомології з будь якими іншими білками, інформація про його вторинну і третинну структури не було опубліковано. Ми оптимізували процедуру експресії та очищення eEF1B β (1–77) і охарактеризували цей рекомбінантний білок. За допомогою гель-фільтрації та аналітичного ультрацентрифугування ми з'ясували, що eEF1B β (1–77) є мономером у розчині і має помірно видовжену форму або збільшений гідродинамічний об'єм (рис. 3.10). Аналіз спектрів КД виявив, що вторинна структура eEF1B β (1–77) складається переважно з α -спіралей та частково неупорядкованих елементів (таблиці 3.1 та 3.2). Що важливо, вміст α -спіралей eEF1B β (1–77) знижувався поступово і незначно (приблизно на 10%) під час нагрівання до 55°C (рис. 3.11, таблиці 3.1 та 3.2). Це вказує на те, що вторинна структура N-кінцевого домену eEF1B β залишилась збереженою в цих умовах. Висока швидкість включення дейтерію в eEF1B β (1–77) свідчить про відсутність в цьому фрагменті жорстко-структурованої третинної організації, тобто він не має ні гідрофобного ядра, ні мережі стійких водневих зв'язків (рис. 3.9в). На сьогоднішній день відома велика кількість білків, які не мають жорсткої тривимірної структури за фізіологічних умов (194). Ці, природно динамічні білки можуть бути представленими низкою різних конформацій, які швидко взаємоперетворюються (194). Одна з передбачуваних ролей подібних білків полягає у забезпеченні взаємодії з різноманітними партнерами в клітині (195). Отже, N-кінцевий домен eEF1B β є новим прикладом такої просторової організації. Цей білок, швидше за все, існує у розчині як набір динамічних конформацій, в яких його елементи вторинної структури, α -спіралі, можуть приймати різне положення в просторі, наприклад, як представлено на рис. 3.12.

Раніше було продемонстровано, що N-кінцевий фрагмент eEF1B β (залишки 1–150), включаючи власне N-кінцевий домен та LZ-мотив, взаємодіє з N-кінцевим доменом eEF1B γ (13). Оскільки роль LZ-мотиву полягає у забезпеченні тримеризації eEF1B β (рис. 3.13), можна припустити, що саме eEF1B β (1–77) може бути відповідальним за взаємодію з eEF1B γ . Справді, eEF1B β (1–77) утворює стійкий комплекс з eEF1B γ (рис. 3.28.). Наші висновки підтверджує наявна структура комплексу фрагменту 1–32 eEF1B β з N-кінцевим доменом eEF1B γ (PDB ID: 5JPO). Важливо відмітити, що в цій структурі eEF1B β (1–32) представлений двома α -спіралями, що відповідає нашим прогнозованим моделям eEF1B β (1–77) (рис. 3.12). Таким чином, ми визначили структурну організацію eEF1B β (1–77) та мотиву типу «лейцинова застібка», який має суперспіральну організацію.

Як було зазначено раніше, структуру C-кінцевого домену eEF1B β (залишки 153-281) було вирішено за допомогою ЯМР (87). Отже, отримані нами дані дозволили нам створити структурну модель тримеру eEF1B β (рис. 3.16), яка узгоджується з даними Н/D-MS (рис. 3.9в). Таким чином, eEF1B β людини - це витягнута тримерна молекула, в якій мономери утримуються разом за допомогою спіраль-спіральної взаємодії мотиву типу «лейцинова застібка». C-кінцевий фрагмент кожного мономера, що містить лінкер, домени CAR та GEF, розташовані з одного боку цієї молекули, а α -спіральні N-кінцеві фрагменти кожного мономера розташовані на протилежному боці (рис. 3.16).

Ми вперше експериментально показали, що рекомбінантний eEF1B β може пришвидшувати обмін [H³]ГТФ/ГТФ не тільки на eEF1A1, але і на eEF1A2. На відміну від eEF1B α , видалення N-кінцевого домену eEF1B β не впливає суттєво на швидкість реакції обміну, за винятком випадку, коли було видалено частину CAR-домену. Це свідчить про те, що CAR-домен може впливати певним чином на зв'язування eEF1A з GEF-доменом. Проте, таке припущення потребує додаткового підтвердження. Відсутність впливу видалення N-кінцевого домену eEF1B β на швидкість обміну гуанінового

нуклеотиду свідчить про те, що він не набуває конформації, яка може заважати зв'язуванню GEF-домену eEF1B β з фактором eEF1A.

Цікаво, що швидкість обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1B β на факторі eEF1A1 вища за швидкість обміну eEF1B α і співставна зі швидкістю обміну комплексом eEF1B $\alpha\gamma$ (рис. 3.5, рис 3.18). В цей же час швидкість обміну гуанінового нуклеотиду на факторі eEF1A2 близька по значенню у eEF1B α , eEF1B β та eEF1B $\beta\gamma$, проте майже втричі нижча за швидкість обміну комплексом eEF1B $\alpha\gamma$ (рис. 3.5, рис 3.18). Це може свідчити про різницю в механізмах взаємодії між ізоформами фактора eEF1A та субодиницями комплексу eEF1B. Дослідження такої різниці потребує подальших експериментів.

Ми також показали, що eEF1B γ людини - це помірно видовжений білок (рис. 3.23), який містить два ригідно-структуровані домени, з'єднані довгою структурно динамічною ділянкою (рис. 3.29б,г). Завдяки структурно динамічній лінкерній області модель eEF1B γ може бути представлена ансамблем конформацій, де N- та C-кінцеві домени набувають різної просторової орієнтації відносно один одного. Залежно від концентрації білка, eEF1B γ може утворювати суміш мономерів та димерів, стабільних димерів та суміш димерів та тетрамерів (рис. 3.21, 3.22.).

Дослідження реконструйованих *in vitro* подвійних комплексів eEF1B $\alpha\gamma$, eEF1B $\beta\gamma$ та потрійного комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ показало, що eEF1B $\alpha\gamma$ має тенденцію утворювати дигетеродимери (рис. 3.27а) тоді як eEF1B $\beta\gamma$ суміш тригетеродимер-гексагетеродимер, а eEF1B $\alpha\beta\gamma$, відповідно, суміш тригетеротример-гексагетеротример (рис. 3.27б,в). Тригетеротримерну організацію комплексу eEF1B $\alpha\beta\gamma$ забезпечує субодиниця eEF1B β . Формування більших олігомерів, найімовірніше, зумовлено взаємодією eEF1B γ /eEF1B γ (рис. 3.21, 3.22.). Постає питання, в якому вигляді існує eEF1B в умовах *in vivo* – тригетеротример, гексагетеротример, чи можлива присутність обох видів комплексів? Наразі важко відповісти на це питання без проведення додаткових експериментів. Враховуючи те, що реконструкція

подвійних і потрійного комплексів з окремих субодиниць *in vitro* проводилась при відносно високих концентраціях останніх, а саме 10 мкМ для подвійних комплексів і 8 мкМ для потрійного комплексу, ми не змогли уникнути утворення олігомерів більш високого порядку як «побічних продуктів» реконструкції. В умовах *in vivo* досягти таких концентрацій окремих субодиниць є малоймовірним. По різних оцінках їх концентрація не перевищує 1-2 мкМ. Тому ми вважаємо, що мінімально можливим комплексом з трьох субодиниць α , β і γ є утворення типу $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$, яке налічує в своєму складі шість GEF-доменів. Проте, ми не можемо заперечувати можливість утворення в клітинах комплексу типу $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_6$, як і подвійних комплексів типу $eEF1B(\alpha\gamma)_2$ чи $eEF1B(\beta\gamma)_6$ за рахунок взаємодії між γ -субодиниціями. Такі комплекси матимуть в своєму складі іншу кількість GEF-доменів, але це також дасть змогу компартменталізувати їх в місцях, де відбувається інтенсивний білковий синтез задля відновлення активної форми $eEF1A^*ГТФ$. Таким чином, ми пропонуємо модель зі стехіометрією $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$ як основний комплекс факторів елонгації трансляції групи 1B. Структурну роль у цьому комплексі відіграють два білки: $eEF1B\beta$, який є стабільним гомотримером (рис. 3.8), та $eEF1B\gamma$, який одночасно зв'язує $eEF1B\beta$ та $eEF1B\alpha$ (рис. 3.25). Як уже згадувалося раніше, ідея тригетеротримерної організації комплексу $eEF1B\alpha\beta\gamma$ була висловлена давно (12), проте жодних експериментальних доказів, які б підтверджували цю гіпотезу, представлено не було.

За допомогою сайт-спрямованого мутагенезу та H/D-MS аналізу, ми окреслили ділянки, які беруть участь у взаємодії на субодиницях $eEF1B\alpha$, $eEF1B\beta$ та $eEF1B\gamma$ (рис. 3.29, рис. 3.30, рис.3.31). Дані H/D-MS, отримані для комплексу $eEF1B\alpha\gamma$, добре корелюють з кристалічною структурою комплексу N-кінцевих доменів $eEF1B\alpha\gamma$ (PDB ID: 5DQS). У цій структурі домен $eEF1B\alpha$ контактує з $eEF1B\gamma$ через ділянку (D21-V29) і третю α -спіраль (C50-I59). Дійсно, пептиди, що складають ці дві області, стають більш захищеними від обміну H/D при зв'язуванні з $eEF1B\gamma$ (рис. 3.30а,б). Крім того, спостерігається також підвищення захисту для пептидів з першої (S8-Y18) і другої (N32-S42)

α -спіралей та другої петлі (S43-A47), які не взаємодіють безпосередньо з eEF1V γ , але можуть сприяти утворенню належній конформації зв'язуючої поверхні. Це справедливо принаймні для першої α -спіралі (S8-Y18) eEF1V α , оскільки її видалення унеможливорює взаємодію з eEF1V γ (рис. 3.29а). Відповідно до структури 5DQS, дві області eEF1V γ безпосередньо взаємодіють з eEF1V α : петля (K147-E155) та α -спіраль (N186-N196). Дійсно, наші дані H/D-MS виявляють дві області eEF1V γ , що містять амінокислотні залишки 140-160 та 180-190, які зазнають найбільшого впливу і стають менш доступними для проникнення дейтерію при взаємодії з eEF1V α (рис. 3.30в,г).

Кристалічна структура N-кінцевого фрагмента eEF1V β (залишки 1-32), у комплексі з N-кінцевим доменом eEF1V γ , також є в базі даних (PDB ID: 5JPO). Відповідно до цієї структури, дві α -спіралі фрагмента eEF1V β утворюють комплекс із тетрамером N-кінцевого домену eEF1V γ . Перша α -спіраль розташовується між двома N-кінцевими доменами eEF1V γ , а друга занурена в заглибину третього N-кінцевого домену. Важливо зазначити, що збільшення захисту від обміну H/D спостерігалось також для перших 30 амінокислотних залишків eEF1V β у комплексі з eEF1V γ (рис. 3.31а,б). Однак, кристалічна структура не узгоджується з нашими даними, які вказують на еквімолярну стехіометрію взаємодії між eEF1V β та eEF1V γ (рис. 3.24, нижня панель). Швидше за все, комплекс фрагменту eEF1V β з тетрамером N-кінцевого домену eEF1V γ є артефактом кристалізації. Це може бути пов'язано з коротким розміром фрагменту, який використовувався для кристалізації та тенденцією N-кінцевого домену eEF1V γ до утворення олігомерів при високій концентрації білка. Щоб подолати цю розбіжність, ми застосували процедуру молекулярного докінгу та визначили взаємну орієнтацію N-кінцевих доменів eEF1V β та eEF1V γ у стехіометричному комплексі 1:1. Згідно з найкращою моделлю, перша та друга α -спіралі N-кінцевого фрагменту eEF1V β у зігнутій конформації занурюються в заглибину N-кінцевого домену eEF1V γ (рис. 3.33).

eEF1V є першим прикладом білкового комплексу, що поєднує шість GEF-доменів. Ці домени знаходяться на C-кінцях eEF1V α та eEF1V β

субодиниць комплексу і пов'язані з відповідними N-кінцевими частинами за допомогою структурно динамічних лінкерів (рис. 3.34). Такі структурні особливості дозволяють існувати такій просторовій конформації, яка може забезпечити безперешкодний доступ молекул eEF1A до всіх GEF-доменів у комплексі (рис. 3.35б). Таким чином, відповідно нашим результатам стехіометрія важкої форми комплексу eEF1H представлена на рис 4.2. і є наступною: eEF1B($\alpha\beta\gamma$)₃/6×eEF1A2.

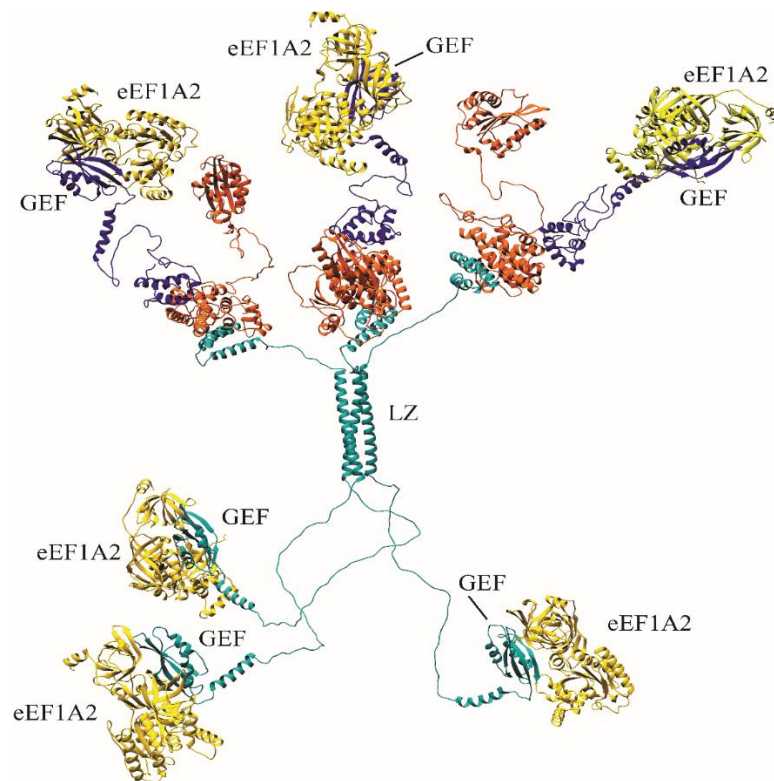


Рис. 4.2. Схематичне зображення структурної організації комплексу eEF1H.

Фактор eEF1A (позначений жовтим) взаємодіє з GEF-доменами субодиниці eEF1B β (позначена зеленим), та eEF1B α (позначена синім), які в свою чергу через свої N-кінцеві домени (Nt) взаємодіють з N-кінцевим доменом субодиниці eEF1B γ (позначена помаранчевим). С-кінцевий домен eEF1B γ (Ct) розташований вільно у просторі. Комплекс тримеризується за рахунок мотиву типу «лейцинова застібка» (LZ) субодиниці eEF1B β .

Молекули фактора eEF1A схематично зображені в комплексі з GEF-доменами α і β субодиниць комплексу eEF1B людини без проведення молекулярного докінгу, але по шаблону відомої структури комплексу eEF1A і GEF-домену eEF1B α дріжджів (номер структури 1G7C).

Очевидно, що такий мультибілковий комплекс є недавнім еволюційним надбанням, оскільки субодиниця eEF1B β , послідовність якої містить мотив типу «лейцинова застібка», присутня лише у багатоклітинних тваринних організмах від кнідаріїв до ссавців, тоді як її немає у відомих послідовностях грибів та рослин (3). Його поява може бути обумовлена необхідністю у підвищенні ефективності білкового синтезу, оскільки об'ємна клітина вищих еукаріот вимагає певної компартменталізації метаболічних компонентів у цитоплазмі. Отже, одним очевидним поясненням існування комплексу з кількома GEF-доменами може бути необхідність підтримувати високу ефективність переведення eEF1A в активну ГТФ-конформацію в процесі елонгації трансляції.

Субодиниці, що входять до складу комплексу eEF1B, широко експресуються в різних клітинних лініях і тканинах, а також на різних етапах розвитку організму (14). Останніми роками збільшується кількість інформації про зміни в експресії субодиниць eEF1B у низці захворювань, при старінні, тощо (16). Так у щурів з діабетом спостерігалось 3-кратне збільшення кількості eEF1B β в підшлунковій залозі (15) що може підвищити ймовірність олігомеризації комплексу eEF1B. Було показано, що під час старіння знижується рівень субодиниць eEF1B α (196) і eEF1B β (197,198), а також eEF1A1 (196) у клітинах людини, що може свідчити про загальне пригнічення синтезу білка під час старіння, проте, як це відображається на структурі та стехіометрії субодиниць у комплексі eEF1B невідомо. Цікаво, що дієта з високим вмістом ненасичених жирних кислот під час вагітності та лактації спричинила більш ніж 5-кратне збільшення кількості eEF1B γ в печінці новонароджених щурів (199). Також спостерігали, що рівень еспресії

субодиниць eEF1B β і eEF1B γ в мозку і печінці мишей був вищий у пренатальний період, порівняно з постнатальним (14), але, чи впливає таке підвищення на олігомерний стан комплексу eEF1B, не вивчалось. Підвищення рівня експресії субодиниць eEF1B β і eEF1B γ , але не eEF1B α відзначалося при плоскоклітинному раку порожнини рота (200), кардіоезофегальному раку (57) та раку легенів (139), що також може бути передумовою формування «нетипового» комплексу eEF1B.

На сьогоднішній день у людей було зареєстровано щонайменше два випадки мутантних варіантів гена *EEF1B2*, який кодує eEF1B α . У першому випадку було показано, що гомозиготна мутація в *EEF1B2* призведе до втрати екзону (201). У другому, передбачалося, що гомозиготна мутація (p.Ser128*) спричинить нонсенс-опосередкований розпад, що призводить до відсутності білка (202). В обох випадках патологічні варіанти *EEF1B2* призвели до помірної інтелектуальної вади у пацієнтів. Повна втрата функції білка eEF1B α була пов'язана з дефектом трансляції, який не міг бути компенсований наявністю eEF1B β . Однак трансляція - це універсальний процес для всіх клітин. Для пояснення патологічних неврологічних наслідків у разі мутації *EEF1B2* було висунуто гіпотезу, що нейрони більш чутливі до пошкодження компонентів трансляційного апарату, ніж інші типи клітин (77). Беручи до уваги, що нейрон-специфічна ізоформа eEF1A2 більше залежить від обміну ГДФ/ГТФ, ніж eEF1A1 (203), можна припустити, що належне функціонування комплексу eEF1B може бути критичним для ефективною трансляції в нейронах.

Таким чином, описана четвертинна організація комплексу eEF1B може надати важливу структурну основу для подальших дослідження процесу білкового синтезу як в нормальних клітинах на різних етапах життя організму, так і в клітинах з патологічними змінами.

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 N/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 N/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 N/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-доменів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПЕРШОДЖЕРЕЛ

1. Dever TE, Green R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(7).
2. Andersen GR, Nissen P, Nyborg J. Elongation factors in protein biosynthesis. Vol. 28, *Trends in Biochemical Sciences.* 2003.
3. le Sourd F, Boulben S, le Bouffant R, Cormier P, Morales J, Belle R, et al. eEF1B: At the dawn of the 21st century. Vol. 1759, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression.* 2006.
4. Prokaryotic and eukaryotic translation factors. *Ad Hoc Nomenclature Subcommittee Report. Biochimie.* 1996;78(11–12):1119–22.
5. Bec G, Kerjan P, Waller JP. Reconstitution in vitro of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 $\beta\gamma\delta$ complex. Essential roles of the NH₂-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 δ subunit in complex formation. *Journal of Biological Chemistry.* 1994;269(3).
6. Janssen GMC, Moller W. Kinetic studies on the role of elongation factors 1 β and 1 γ in protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry.* 1988;263(4).
7. Negrutskii BS, Shalak VF, Kerjan P, El'skaya A v., Mirande M. Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1 α in the complex with EF-1H. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(8).
8. Merrick WC. Eukaryotic protein synthesis: Still a mystery. Vol. 285, *Journal of Biological Chemistry.* 2010.
9. Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. Vol. 3, *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* 2012.

10. Janssen GMC, van Damme HTF, Kriek J, Amons R, Moller W. The subunit structure of elongation factor 1 from *Artemia*. Why two α - chains in this complex? *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(50).
11. Sheu GT, Traugh JA. A structural model for elongation factor 1 (EF-1) and phosphorylation by protein kinase CKII. *Mol Cell Biochem*. 1999;191(1–2).
12. Minella O, Mulner-Lorillon O, Bec G, Cormier P, Bellé R. Multiple phosphorylation sites and quaternary organization of guanine-nucleotide exchange complex of elongation factor-1 (EF-1 $\beta\gamma\delta$ /ValRS) control the various functions of EF-1 α . Vol. 18, *Bioscience Reports*. 1998.
13. Mansilla F, Friis I, Jadidi M, Nielsen KM, Clark BFC, Knudsen CR. Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. *Biochemical Journal*. 2002;365(3).
14. Cao Y, Portela M, Janikiewicz J, Doig J, Abbott CM. Characterisation of translation elongation factor eEF1B subunit expression in mammalian cells and tissues and co-localisation with eEF1A2. *PLoS One*. 2014;9(12).
15. Jiang YL, Ning Y, Ma XL, Liu YY, Wang Y, Zhang Z, et al. Alteration of the proteome profile of the pancreas in diabetic rats induced by streptozotocin. *Int J Mol Med*. 2011;28(2).
16. Negrutskii B. Non-translational Connections of eEF1B in the Cytoplasm and Nucleus of Cancer Cells. Vol. 7, *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020.
17. Voorhees RM, Ramakrishnan V. Structural basis of the translational elongation cycle. Vol. 82, *Annual Review of Biochemistry*. 2013.
18. Pérez-Bercoff R. *Protein biosynthesis in eukaryotes*. Plenum Press. 1982;26.
19. Korostelev AA. A deeper look into translation initiation. Vol. 159, *Cell*. 2014.
20. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Vol. 234, *Gene*. 1999.

21. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Vol. 11, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010.
22. Ghosh HP, Ghosh K. Specificity of the initiator methionine tRNA for terminal and internal recognition. *Biochem Biophys Res Commun.* 1972;49(2).
23. Kozak M, Shatkin AJ. Identification of features in 5' terminal fragments from reovirus mRNA which are important for ribosome binding. *Cell.* 1978;13(1).
24. Francis Poulin and Nahum Sonenberg. Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes. Madame Curie Bioscience Database; 2000. 33–45 p.
25. Zaher HS, Green R. Fidelity at the Molecular Level: Lessons from Protein Synthesis. Vol. 136, *Cell.* 2009.
26. W.C. Merrick and J. Nyborg. Translational Control Of Gene Expression. Nahum Sonenberg, John W.B. Hershey, Michael B. Mathews, editors. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. 89–126 p.
27. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* 2012.
28. Knudsen Sm, Frydenberg J, Clark Bfc, Leffers H. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 α isoforms: Isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 α . *Eur J Biochem.* 1993;215(3).
29. Pan J, Ruest LB, Xu S, Wang E. Immuno-characterization of the switch of peptide elongation factors eEF1A-1/EF-1 α and eEF1A-2/S1 in the central nervous system during mouse development. *Developmental Brain Research.* 2004;149(1).

30. Lee S, Francoeur AM, Liu S, Wang E. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 α gene family. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(33).
31. Bosutti A, Scaggiante B, Grassi G, Guarnieri G, Biolo G. Overexpression of the elongation factor 1A1 relates to muscle proteolysis and proapoptotic p66(ShcA) gene transcription in hypercatabolic trauma patients. *Metabolism*. 2007;56(12).
32. Tomlinson VAL, Newbery HJ, Bergmann JH, Boyd J, Scott D, Wray NR, et al. Expression of eEF1A2 is associated with clear cell histology in ovarian carcinomas: Overexpression of the gene is not dependent on modifications at the EEF1A2 locus. *Br J Cancer*. 2007;96(10).
33. Kjeldgaard M, Nissen P, Thirup S, Nyborg J. The crystal structure of elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus* in the GTP conformation. *Structure*. 1993;1(1).
34. Song H, Parsons MR, Rowsell S, Leonard G, Phillips SEV. Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *J Mol Biol*. 1999;285(3).
35. Nissen P, Thirup S, Kjeldgaard M, Nyborg J. The crystal structure of Cys-tRNA(Cys)-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure*. 1999;7(2).
36. Vitagliano L, Masullo M, Sica F, Zagari A, Bocchini V. The crystal structure of *Sulfolobus solfataricus* elongation factor 1 α in complex with GDP reveals novel features in nucleotide binding and exchange. *EMBO Journal*. 2001;20(19).
37. Kobayashi K, Kikuno I, Kuroha K, Saito K, Ito K, Ishitani R, et al. Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(41).

38. Kobayashi K, Saito K, Ishitani R, Ito K, Nureki O. Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 α complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(18).
39. Martin Schmeing T, Voorhees RM, Kelley AC, Gao YG, Murphy IV F v., Weir JR, et al. The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science* (1979). 2009;326(5953).
40. Villa E, Sengupta J, Trabuco LG, LeBarron J, Baxter WT, Shaikh TR, et al. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(4).
41. Budkevich T v., Giesebrecht J, Behrmann E, Loerke J, Ramrath DJF, Mielke T, et al. Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: A eukaryotic-specific ribosome rearrangement. *Cell.* 2014;158(1).
42. Crepin T, Shalak VF, Yaremchuk AD, Vlasenko DO, McCarthy A, Negrutskii BS, et al. Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(20).
43. Kaziro Y. The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. Vol. 505, *BBA Reviews On Bioenergetics.* 1978.
44. Негруцький Б.С. Організація білкового синтезу у вищих еукаріотів. Київ: Обереги; 2001. p. 5–166.
45. Förster C, Limmer S, Ribeiro S, Hilgenfeld R, Sprinzl M. Ternary complex between elongation factor Tu•GTP and Phe-tRNAPhe. *Biochimie.* 1993;75(12).
46. Slobin LI. The inhibition of eucaryotic protein synthesis by procaryotic elongation factor Tu. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981;101(4).
47. Mateyak MK, Kinzy TG. eEF1A: Thinking outside the ribosome. Vol. 285, *Journal of Biological Chemistry.* 2010.

48. Doyle A, Crosby SR, Burton DR, Lilley F, Murphy MF. Actin bundling and polymerisation properties of eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A), histone H2A-H2B and lysozyme in vitro. *J Struct Biol.* 2011;176(3).
49. Morita K, Bunai F, Numata O. Roles of three domains of *Tetrahymena* eEF1A in bundling F-actin. *Zoolog Sci.* 2008;25(1).
50. Pittman YR, Kandl K, Lewis M, Valente L, Linzy TG. Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B α . *Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(7).
51. Shiina N, Gotoh Y, Kubomura N, Iwamatsu A, Nishida E. Microtubule severing by elongation factor 1 α . *Science* (1979). 1994;266(5183).
52. Khacho M, Mekhail K, Pilon-Larose K, Pause A, Côté J, Lee S. EEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery. *Mol Biol Cell.* 2008;19(12).
53. Calado A, Treichel N, Müller EC, Otto A, Kutay U. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO Journal.* 2002;21(22).
54. Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, Saffrich R, Paraskeva E, Hartmann E, et al. Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO Journal.* 2002;21(22).
55. Chuang SM, Chen L, Lambertson D, Anand M, Kinzy TG, Madura K. Proteasome-Mediated Degradation of Cotranslationally Damaged Proteins Involves Translation Elongation Factor 1A. *Mol Cell Biol.* 2005;25(1).
56. Lukash TO, Turkivska H v., Negrutskii BS, El'skaya A v. Chaperone-like activity of mammalian elongation factor eEF1A: Renaturation of aminoacyl-

- tRNA synthetases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2004;36(7).
57. Veremieva M, Khoruzhenko A, Zaicev S, Negrutskii B, El'skaya A. Unbalanced expression of the translation complex eEF1 subunits in human cardioesophageal carcinoma. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(3).
 58. Dapas B, Tell G, Scaloni A, Pines A, Ferrara L, Quadrifoglio F, et al. Identification of different isoforms of eEF1A in the nuclear fraction of human T-lymphoblastic cancer cell line specifically binding to aptameric cytotoxic GT oligomers. *Eur J Biochem*. 2003;270(15).
 59. Piazzzi M, Bavelloni A, Faenza I, Blalock W, Urbani A, D'Aguanno S, et al. eEF1A Phosphorylation in the Nucleus of Insulin-stimulated C2C12 Myoblasts. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9(12).
 60. Davis WG, Blackwell JL, Shi PY, Brinton MA. Interaction between the Cellular Protein eEF1A and the 3'-Terminal Stem-Loop of West Nile Virus Genomic RNA Facilitates Viral Minus-Strand RNA Synthesis. *J Virol*. 2007;81(18).
 61. Li Z, Pogany J, Panavas T, Xu K, Esposito AM, Kinzy TG, et al. Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology*. 2009;385(1).
 62. Chertova E, Chertov O, Coren L v., Roser JD, Trubey CM, Bess JW, et al. Proteomic and Biochemical Analysis of Purified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Produced from Infected Monocyte-Derived Macrophages. *J Virol*. 2006;80(18).
 63. Gillardon F. Interaction of elongation factor 1-alpha with leucine-rich repeat kinase 2 impairs kinase activity and microtubule bundling in vitro. *Neuroscience*. 2009;163(2).

64. Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, Aigner J, Köhler A, Jastrzebska E, et al. The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet.* 2008;123(2).
65. Ditzel HJ, Masaki Y, Nielsen H, Farnaes L, Burton DR. Cloning and expression of a novel human antibody-antigen pair associated with Felty's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(16).
66. Choi S, Cho K, Kim J, Yea K, Park G, Lee J, et al. Comparative proteome analysis using amine-reactive isobaric tagging reagents coupled with 2D LC/MS/MS in 3T3-L1 adipocytes following hypoxia or normoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(1).
67. Borradaile NM, Buhman KK, Listenberger LL, Magee CJ, Morimoto ETA, Ory DS, et al. A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death. *Mol Biol Cell.* 2006;17(2).
68. Chen E, Proestou G, Bourbeau D, Wang E. Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1 α protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000;259(1).
69. Anand N, Murthy S, Amann G, Wernick M, Porter LA, Cukier IH, et al. Gene encoding protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 2002;31(3).
70. Tomlinson VAL, Newbery HJ, Wray NR, Jackson J, Larionov A, Miller WR, et al. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. *BMC Cancer.* 2005;5.
71. Li R, Wang H, Bekele BN, Yin Z, Caraway NP, Katz RL, et al. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach. *Oncogene.* 2006;25(18).

72. Cao H, Zhu Q, Huang J, Li B, Zhang S, Yao W, et al. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(1).
73. Pecorari L, Marin O, Silvestri C, Candini O, Rossi E, Guerzoni C, et al. Elongation Factor 1 alpha interacts with phospho-Akt in breast cancer cells and regulates their proliferation, survival and motility. *Mol Cancer.* 2009;8.
74. Giudici F, Petracci E, Nanni O, Bottin C, Pinamonti M, Zanconati F, et al. Elevated levels of eEF1A2 protein expression in triple negative breast cancer relate with poor prognosis. *PLoS One.* 2019;14(6).
75. Schlaeger C, Longerich T, Schiller C, Bewerunge P, Mehrabi A, Toedt G, et al. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2008;47(2).
76. Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 2006;97(1).
77. McLachlan F, Sires AM, Abbott CM. The role of translation elongation factor eEF1 subunits in neurodevelopmental disorders. Vol. 40, *Human Mutation.* 2019.
78. Shultz LD, Sweet HO, Davisson MT, Coman DR. "Wasted", a new mutant of the mouse with abnormalities characteristic of ataxia telangiectasia. *Nature.* 1982;297(5865).
79. Chambers DM, Peters J, Abbott CM. The lethal mutation of the mouse wasted (wst) is a deletion that abolishes expression of a tissue-specific isoform of translation elongation factor 1 α , encoded by the *Eef1a2* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8).

80. Cao S, Smith LL, Padilla-Lopez SR, Guida BS, Blume E, Shi J, et al. Homozygous EEF1A2 mutation causes dilated cardiomyopathy, failure to thrive, global developmental delay, epilepsy and early death. *Hum Mol Genet.* 2017;26(18).
81. Nakajima J, Okamoto N, Tohyama J, Kato M, Arai H, Funahashi O, et al. De novo EEF1A2 mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability, autistic behaviors and epilepsy. *Clin Genet.* 2015;87(4).
82. Inui T, Kobayashi S, Ashikari Y, Sato R, Endo W, Uematsu M, et al. Two cases of early-onset myoclonic seizures with continuous parietal delta activity caused by EEF1A2 mutations. *Brain Dev.* 2016;38(5).
83. Lam WWK, Millichap JJ, Soares DC, Chin R, McLellan A, Fitzpatrick DR, et al. Novel de novo EEF1A2 missense mutations causing epilepsy and intellectual disability. *Mol Genet Genomic Med.* 2016;4(4).
84. Carvalho MDGDC, Carvalho JF, Merrick WC. Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1984;234(2).
85. Andersen GR, Pedersen L, Valente L, Chatterjee I, Kinzy TG, Kjeldgaard M, et al. Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the Yeast elongation factor complex eEF1A:eEF1B α . *Mol Cell.* 2000;6(5).
86. Jeppesen MG, Ortiz P, Shepard W, Kinzy TG, Nyborg J, Andersen GR. The Crystal Structure of the Glutathione S-Transferase-like Domain of Elongation Factor 1B γ from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(47).
87. Wu H, Wang C, Gong W, Wang J, Xuan J, Perrett S, et al. The C-terminal region of human eukaryotic elongation factor 1B δ . *J Biomol NMR.* 2016;64(2).

88. Vanwetswinkel S, Kriek J, Andersen GR, Güntert P, Dijk J, Canters GW, et al. Solution Structure of the 162 Residue C-terminal Domain of Human Elongation Factor 1 β γ . *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(44).
89. Wu H, Gong W, Yao X, Wang J, Perrett S, Feng Y. Evolutionarily conserved binding of translationally controlled tumor protein to eukaryotic elongation factor 1B. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(14).
90. Sanders J, Raggiaschi R, Morales J, Möller W. The human leucine zipper-containing guanine-nucleotide exchange protein elongation factor-1 δ . *BBA - Gene Structure and Expression*. 1993;1174(1).
91. Hiraga K, Suzuki K, Tsuchiya E, Miyakawa T. Cloning and characterization of the elongation factor EF-1 β homologue of *Saccharomyces cerevisiae*. EF-1 β is essential for growth. *FEBS Lett*. 1993;316(2).
92. Kamiie K, Yamashita T, Taira H, Kidou SI, Ejiri SI. Interaction between elongation factors 1 β and 1 γ from *bombyx mori* silk gland. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003;67(7).
93. van Damme HTF, Amons R, Karssies R, Timmers CJ, Janssen GMC, Möller W. Elongation factor 1 β of *artemia*: Localization of functional sites and homology to elongation factor 1 δ . *BBA - Gene Structure and Expression*. 1990;1050(1–3).
94. Damme H Van, Amons R, Janssen G, Möller W. Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1 β γ . *Eur J Biochem*. 1991;197(2).
95. Kamiie K, Taira H, Kobayashi K, Yamashita T, Kidou S ichiro, Ejiri S ichiro. Expression of elongation factor 1 β ' in *escherichia coli* and its interaction with elongation factor 1 α from silk gland. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1999;63(4).
96. Pérez JMJ, Kriek J, Dijk J, Canters GW, Möller W. Expression, purification, and spectroscopic studies of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor, EF-1 β . *Protein Expr Purif*. 1998;13(2).

97. Pérez JM, Siegal G, Kriek J, Hård K, Dijk J, Canters GW, et al. The solution structure of the guanine nucleotide exchange domain of human elongation factor 1 β reveals a striking resemblance to that of EF-Ts from *Escherichia coli*. *Structure*. 1999;7(2).
98. Andersen GR, Valente L, Pedersen L, Kinzy TG, Nyborg J. Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1B α complex. *Nat Struct Biol*. 2001;8(6).
99. Pittman YR, Valente L, Jeppesen MG, Andersen GR, Patel S, Kinzy TG. Mg²⁺ and a key lysine modulate exchange activity of eukaryotic translation elongation factor 1B α . *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(28).
100. Hershey JWB. Translational control in mammalian cells. Vol. 60, *Annual Review of Biochemistry*. 1991.
101. Vitagliano L, Ruggiero A, Masullo M, Cantiello P, Arcari P, Zagari A. The crystal structure of *Sulfolobus solfataricus* elongation factor 1 α in complex with magnesium and GDP. *Biochemistry*. 2004;43(21).
102. JANSSEN GMC, MÖLLER W. Elongation factor 1 $\beta\gamma$ from *Artemia* Purification and properties of its subunits. *Eur J Biochem*. 1988;171(1–2).
103. Bellé R, Derancourt J, Poulhe R, Capony JP, Ozon R, Mulner-Lorillon O. A purified complex from *Xenopus* oocytes contains a p47 protein, an *in vivo* substrate of MPF, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 γ and EF-1 β . *FEBS Lett*. 1989;255(1).
104. Sheu GT, Traugh JA. Recombinant Subunits of Mammalian Elongation Factor 1 Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(52).
105. Amons R, Guerrucci MA, Karssies RH, Morales J, Cormier P, Möller W, et al. The leucine-zipper in elongation factor EF-1 δ , a guanine-nucleotide

- exchange protein, is conserved in *Artemia* and *Xenopus*. *BBA - Gene Structure and Expression*. 1994;1218(3).
106. Delalande C, Monnier A, Minella O, Genevière AM, Mulner-Lorillon O, Bellé R, et al. Developmental regulation of elongation factor-1 δ in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. *Exp Cell Res*. 1998;242(1).
 107. Cormier P, Osborne HB, Morales J, Bassez T, Minella O, Poulhe R, et al. Elongation factor 1 contains two homologous guanine-nucleotide exchange proteins as shown from the molecular cloning of beta and delta subunits. Vol. 21, *Nucleic Acids Research*. 1993.
 108. Guerrucci MA, Monnier A, Delalande C, Bellé R. The Elongation factor-1 δ (EF-1 δ) originates from gene duplication of an EF-1 β ancestor and fusion with a protein-binding domain. *Gene*. 1999;233(1–2).
 109. Jones MK, Anantharamaiah GM, Segrest JP. Computer programs to identify and classify amphipathic α helical domains. *J Lipid Res*. 1992;33(2).
 110. Alber T. Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2(2).
 111. Sang Lee J, Gyu Park S, Park H, Seol W, Lee S, Kim S. Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291(1).
 112. Chiu WC, Chang CP, Wang CC. Evolutionary basis of converting a bacterial tRNA synthetase into a yeast cytoplasmic or mitochondrial enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(36).
 113. Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N, et al. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(SUPPL. 2).

114. Kawaguchi Y, Bruni R, Roizman B. Interaction of herpes simplex virus 1 alpha regulatory protein ICP0 with elongation factor 1delta: ICP0 affects translational machinery. *J Virol.* 1997;71(2).
115. Xiao H, Neuveut C, Benkirane M, Jeang KT. Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 δ delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(2).
116. Kawaguchi Y, van Sant C, Roizman B. Eukaryotic Elongation Factor 1 δ Is Hyperphosphorylated by the Protein Kinase Encoded by the U L 13 Gene of Herpes Simplex Virus 1 . *J Virol.* 1998;72(3).
117. Kawaguchi Y, Matsumura T, Roizman B, Hirai K. Cellular Elongation Factor 1 δ Is Modified in Cells Infected with Representative Alpha-, Beta-, or Gammaherpesviruses. *J Virol.* 1999;73(5).
118. Kato K, Kawaguchi Y, Tanaka M, Igarashi M, Yokoyama A, Matsuda G, et al. Epstein-Barr virus-encoded protein kinase BGLF-4 mediates hyperphosphorylation of cellular elongation factor 1 δ (EF-1 δ): EF-1 δ is universally modified by conserved protein kinases of herpesviruses in mammalian cells. *Journal of General Virology.* 2001;82(6).
119. Gao Q, Yang C, Ren C, Zhang S, Gao X, Jin M, et al. Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Delta Inhibits the Nuclear Import of the Nucleoprotein and PA-PB1 Heterodimer of Influenza A Virus. *J Virol.* 2020;95(2).
120. Maessen GDF, Amons R, Zeelen JP, Möller W. Primary structure of elongation factor 1 γ from *Artemia*. *FEBS Lett.* 1987;223(1).
121. Cormier P, Osborne HB, Morales J, Bassez T, Poulhe R, Mazabraud A, et al. Molecular cloning of *Xenopus* elongation factor 1 γ , major M-phase promoting factor substrate. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(23).

122. Sanders J, Maassen JA, Möller W. Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(22).
123. Kumabe T, Sohma Y, Yamamoto T. Human cDNAs encoding elongation factor 1 γ and the ribosomal protein L19. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(10).
124. Vanwetswinkel S, Kriek J, Andersen GR, Dijk J, Siegal G. ^1H ^{15}N and ^{13}C resonance assignments of the highly conserved 19 kDa C-terminal domain from human elongation factor 1 β [2]. Vol. 26, *Journal of Biomolecular NMR.* 2003.
125. Koonin E v., Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Mushegian AR, Bork P, et al. Eukaryotic translation elongation factor 1 γ contains a glutathione transferase domain—Study of a diverse, ancient protein super family using motif search and structural modeling. *Protein Science.* 1994;3(11).
126. Achilonu I, Siganunu TP, Dirr HW. Purification and characterisation of recombinant human eukaryotic elongation factor 1 gamma. *Protein Expr Purif.* 2014;99.
127. Billaut-Mulot O, Schöneck R, Fernandez-Gomez R, Taibi A, Capron A, Pommier V, et al. Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma. *Biol Cell.* 1994;82(1).
128. Kamiie K, Nomura Y, Kobayashi S, Taira H, Kobayashi K, Yamashita T, et al. Cloning and expression of bombyx mori silk gland elongation factor 1 γ in escherichia coli. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66(3).
129. Chen CJ, Traugh JA. Expression of recombinant elongation factor 1 beta from rabbit in *Escherichia coli*. Phosphorylation by casein kinase II. *BBA - Gene Structure and Expression.* 1995;1264(3).

130. Bec G, Kerjan P, Zhan XD, Waller JP. Valyl-tRNA synthetase from rabbit liver. I. Purification as a heterotypic complex in association with elongation factor 1. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(35).
131. Kim S, Kellner J, Lee CH, Coulombe PA. Interaction between the keratin cytoskeleton and eEF1B γ affects protein synthesis in epithelial cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(10).
132. Al-Maghrebi M, Brulé H, Padkina M, Allen C, Holmes WM, Zehner ZE. The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1 γ and HAX-1. Vol. 30, *Nucleic Acids Research*. 2002.
133. Pisani C, Onori A, Gabanella F, Delle Monache F, Borreca A, Ammassari-Teule M, et al. EEF1B γ binds the Che-1 and TP53 gene promoters and their transcripts. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2016;35(1).
134. Liu D, Sheng C, Gao S, Jiang W, Li J, Yao C, et al. EEF1B γ is a positive regulator of NF-kB signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(2).
135. Mulner-Lorillon O, Cormier P, Cavadore JC, Morales J, Poulhe R, Bellé R. Phosphorylation of *Xenopus* elongation factor-1 γ by cdc2 protein kinase: Identification of the phosphorylation site. *Exp Cell Res*. 1992;202(2).
136. Janssen GMC, Maessen GDF, Amons R, Moller W. Phosphorylation of elongation factor 1 β by an endogenous kinase affects its catalytic nucleotide exchange activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(23).
137. Bellé R, Minella O, Cormier P, Morales J, Poulhe R, Mulner-Lorillon O. Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by cdc2 kinase. Vol. 1, *Progress in cell cycle research*. 1995.

138. Delalande C, Bellé R, Cormier P, Mulner-Lorillon O. Transient increase of a protein kinase. Activity identified to CK2 during sea urchin development. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;266(2).
139. Veremieva M, Kapustian L, Khoruzhenko A, Zakharychev V, Negrutskii B, El'skaya A. Independent overexpression of the subunits of translation elongation factor complex eEF1H in human lung cancer. *BMC Cancer.* 2014;14(1).
140. Chi KF, Jones D v., Frazier ML. Expression of an elongation factor 1 γ -related sequence in adenocarcinomas of the colon. *Gastroenterology.* 1992;103(1).
141. Mimori K, Mori M, Akiyoshi T, Tanaka S, Sugimachi K. The overexpression of elongation factor 1 gamma mRNA in gastric carcinoma. *Cancer.* 1995;75(6 S).
142. Everley PA, Krijgsveld J, Zetter BR, Gygi SP. Quantitative cancer proteomics: Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. *Molecular and Cellular Proteomics.* 2004;3(7).
143. Joseph P, O'Kernick CM, Othumpangat S, Lei YX, Yuan BZ, Ong TM. Expression profile of eukaryotic translation factors in human cancer tissues and cell lines. *Mol Carcinog.* 2004;40(3).
144. Jacob ANK, Kandpal G, Kandpal RP. Isolation of expressed sequences that include a gene for familial breast cancer (BRCA2) and other novel transcripts from a five megabase region on chromosome 13q12. *Oncogene.* 1996;13(1).
145. Domingueti CB, Castilho DAQ, de Oliveira CE, Janini JBM, González-Arriagada WA, Salo T, et al. Eukaryotic translation elongation factor 1 δ , N-terminal propeptide of type I collagen and cancer-associated fibroblasts are prognostic markers of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;130(6).

146. Joseph P, Lei YX, Ong TM. Up-regulation of expression of translation factors - A novel molecular mechanism for cadmium carcinogenesis. Vol. 255, Molecular and Cellular Biochemistry. 2004.
147. Ong LL, Er CPN, Ho A, Aung MT, Yu H. Kinectin anchors the translation elongation factor-1 δ to the endoplasmic reticulum. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(34).
148. Ong LL, Lin PC, Zhang X, Chia SM, Yu H. Kinectin-dependent assembly of translation elongation factor-1 complex on endoplasmic reticulum regulates protein synthesis. Journal of Biological Chemistry. 2006;281(44).
149. Jiang S, Wolfe CL, Warrington JA, Norcum MT. Three-dimensional reconstruction of the valyl-tRNA synthetase/elongation factor-1H complex and localization of the δ subunit. FEBS Lett. 2005;579(27).
150. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 1990;96(1).
151. Yaremchuk A, Shalak VF, Novosylina O v., Negrutskii BS, Crépin T, Elskaya A v., et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of mammalian translation elongation factor eEF1A2. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2012;68(3).
152. Shalak VF, Budkevich T v., Negrutskii BS, El'skaia A v. A fast and effective method for purification of elongation factor 1 α from rabbit liver. Ukr Biokhim Zh. 1997;69(2).
153. U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227.
154. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. Biophys J. 2000;78(3).

155. Schuck P, Perugini MA, Gonzales NR, Hewlett GJ, Schubert D. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: Strategies and application to model systems. *Biophys J*. 2002;82(2).
156. Schuck P. On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal Biochem*. 2003;320(1).
157. Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. Vol. 11, *Biological Procedures Online*. 2009.
158. Vistica J, Dam J, Balbo A, Yikilmaz E, Mariuzza RA, Rouault TA, et al. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. *Anal Biochem*. 2004;326(2).
159. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 2007;1(6).
160. Böhm G, Muhr R, Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering, Design and Selection*. 1992;5(3).
161. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem*. 2000;287(2).
162. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(WEB SERVER ISS.).
163. Venyaminov SY, Vassilenko KS. Determination of protein tertiary structure class from circular dichroism spectra. *Anal Biochem*. 1994;222(1).
164. Webb B, Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014;2014.

165. Fiser A, Do RKG, Šali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*. 2000;9(9).
166. Xu D, Zhang Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. *Biophys J*. 2011;101(10).
167. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(1).
168. Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. Vol. 77, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2009.
169. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25(13).
170. Kozlowski LP, Bujnicki JM. MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(1).
171. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules BT - *Algorithms in Bioinformatics*. In: *Algorithms in Bioinformatics*. 2002.
172. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(SUPPL. 2).
173. Mashiach E, Schneidman-Duhovny D, Andrusier N, Nussinov R, Wolfson HJ. FireDock: a web server for fast interaction refinement in molecular docking. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Web Server issue).

174. Vangone A, Spinelli R, Scarano V, Cavallo L, Oliva R. COCOMAPS: A web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. Vol. 27, *Bioinformatics*. 2011.
175. Cole JL, Lary JW, P. Moody T, Laue TM. Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. Vol. 84, *Methods in Cell Biology*. 2008.
176. Oganessian I, Lento C, Wilson DJ. Contemporary hydrogen deuterium exchange mass spectrometry. Vol. 144, *Methods*. 2018.
177. Engen JR. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. Vol. 81, *Analytical Chemistry*. 2009.
178. Marcsisin SR, Engen JR. Hydrogen exchange mass spectrometry: What is it and what can it tell us? *Anal Bioanal Chem*. 2010;397(3).
179. Skinner JJ, Lim WK, Bédard S, Black BE, Englander SW. Protein dynamics viewed by hydrogen exchange. *Protein Science*. 2012;21(7).
180. Zhu S, Shala A, Bezginov A, Sljoka A, Audette G, Wilson DJ. Hyperphosphorylation of intrinsically disordered tau protein induces an amyloidogenic shift in its conformational ensemble. *PLoS One*. 2015;10(3).
181. Pedersen L, Andersen GR, Knudsen CR, Kinzy TG, Nyborg J. Crystallization of the yeast elongation factor complex eEF1A-eEF1B α . *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2001;57(1).
182. O'Shea EK, Klemm JD, Kim PS, Alber T. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* (1979). 1991;254(5031).
183. Kelly S, Price N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;1(4).
184. Arai M, Kuwajima K. Role of the molten globule state in protein folding. Vol. 53, *Advances in Protein Chemistry*. 2000.

185. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. Vol. 12, Nature Methods. 2014.
186. Reshetnyak YK, Koshevnik Y, Burstein EA. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys J*. 2001;81(3).
187. Sheluho D, Ackerman SH. An Accessible Hydrophobic Surface Is a Key Element of the Molecular Chaperone Action of Atp11p. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(43).
188. Chaudhary AP, Vispute NH, Shukla VK, Ahmad B. A comparative study of fibrillation kinetics of two homologous proteins under identical solution condition. *Biochimie*. 2017;132.
189. Lupas AN, Bassler J. Coiled Coils – A Model System for the 21st Century. Vol. 42, Trends in Biochemical Sciences. 2017.
190. Wood CW, Woolfson DN. CCBUILDER 2.0: Powerful and accessible coiled-coil modeling. *Protein Science*. 2018;27(1).
191. Wood CW, Bruning M, Ibarra AA, Bartlett GJ, Thomson AR, Sessions RB, et al. CCBUILDER: An interactive web-based tool for building, designing and assessing coiled-coil protein assemblies. *Bioinformatics*. 2014;30(21).
192. Kwong PD, Wyatt R, Desjardins E, Robinson J, Culp JS, Hellmig BD, et al. Probability analysis of variational crystallization and its application to gp120, the exterior envelope glycoprotein of type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1). *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(7).
193. Lamzin VS, Perrakis A. Current state of automated crystallographic data analysis. Vol. 7, Nature Structural Biology. 2000.
194. Uversky VN, Dunker AK. Understanding protein non-folding. Vol. 1804, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2010.

195. Sajó R, Toke O, Hajdú I, Jankovics H, Micsonai A, Dobó J, et al. Structural plasticity of the *Salmonella* FliS flagellar export chaperone. *FEBS Lett.* 2016;590(8).
196. Byun HO, Han NK, Lee HJ, Kim KB, Ko YG, Yoon G, et al. Cathepsin D and eukaryotic translation elongation factor 1 as promising markers of cellular senescence. *Cancer Res.* 2009;69(11).
197. Xing W, Gao W, Su H, Wang S, Zhang J, Mao G, et al. Salidroside influences the cellular cross-talk of human fetal lung diploid fibroblasts: A proteomic approach. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2018;58.
198. Takano M, Otani M, Kaji T, Sano K, Hamada-Kanazawa M, Matsuyama S. Proteomic analysis of mouse choroid plexus cell line ECPC-4 treated with lipid A. *Inflammation Research.* 2016;65(4).
199. Novak EM, Lee EK, Innis SM, Keller BO. Identification of novel protein targets regulated by maternal dietary fatty acid composition in neonatal rat liver. *J Proteomics.* 2009;73(1).
200. Flores IL, Kawahara R, Miguel MCC, Granato DC, Domingues RR, Macedo CCS, et al. EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Clin Sci.* 2016;130(10).
201. Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature.* 2011;478(7367).
202. Larcher L, Buratti J, Héron-Longe B, Benzacken B, Pipiras E, Keren B, et al. New evidence that biallelic loss of function in EEF1B2 gene leads to intellectual disability. *Clin Genet.* 2020;97(4).
203. Kahns S, Lund A, Kristensen P, Knudsen CR, Clark BFC, Cavallius J, et al. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: Cloning of the cDNA and characterization of the protein. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(8).