

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

**ШАЛАК В'ЯЧЕСЛАВ ФЕДОРОВИЧ**

**УДК 577.112; 577.217.535**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
МАКРОМОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПЛЕКСІВ І ЇХ КОМПОНЕНТІВ  
АПАРАТУ ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ У ССАВЦІВ**

**03.00.03 — молекулярна біологія**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук**

**КИЇВ-2025**

**Дисертацією є кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису, підготовлена у формі доповіді за сукупністю наукових статей.**

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

**Офіційні**

**опоненти:**

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

доктор біологічних наук, професор  
**Кучмеровська Тамара Муратівна**,  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, провідна наукова співробітниця відділу біохімії вітамінів і коензимів;

доктор біологічних наук, професор  
**Оболенська Марія Юріївна**  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
головна наукова співробітниця відділу ензимології білкового синтезу.

Захист відбудеться 30 вересня о 10.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150 та на сайті Інституту <https://imbg.org.ua/uk/specscicouncil>.

Автореферат розіслано “ \_\_\_\_ ” серпня 2025 року.

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



І.В. Крупська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Апарат біосинтезу білка в еукаріотичній клітині є просторово і структурно компартменталізованим, що забезпечує високу ефективність його функціонування. Однією з характерних особливостей вищих еукаріотів є існування двох стабільних трансляційних мультибілкових комплексів, що містять аміноацил-тРНК синтетази (ARS) та фактори елонгації трансляції (eEF) (*Gomez et al., 2020, Le Sourd et al., 2006*). Найбільший з цих комплексів має у своєму складі дев'ять аміноацил-тРНК синтетаз і три додаткових білка, названих p43, p38 і p18 (*Mirande et al., 1985*). До іншого стабільного комплексу входять валіл-тРНК синтетаза (VRS) і фактори елонгації трансляції  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$  групи eEF1B (*Bec et al., 1994*). Окрім цього, вважається, що в клітині певна кількість молекул комплексу eEF1B може існувати окремо. eEF1B і VRS-eEF1B можуть утворювати лабільні комплекси (відповідно eEF1H і VRS-eEF1H) при взаємодії з фактором eEF1A – ключовим G-білком циклу елонгації трансляції (*Sasikumar et al., 2012*). Існує два високогомологічних (97%) варіанти цього білка eEF1A1 і eEF1A2, які кодуються різними генами (*Lund et al., 1993*). Експресія їх є тканинспецифічною (*Lee et al., 1992, Knudsen et al., 1993*) і змінюється в процесі ембріонального розвитку організму (*Chambers et al., 1998*). eEF1A2 синтезується в нейронах, міоцитах і кардіоміоцитах, тоді як eEF1A1 – у всіх інших клітинах (*Kahns et al., 1998*). Було повідомлено, що eEF1A2 може виступати в ролі онкогену при розвитку раку яєчника і легенів (*Anand et al., 2002, Jia et al., 2021*). Важливо, що синтез цього білка не спостерігається в здорових тканинах цих органів. Окрім цього, відомо, що білки-паралоги eEF1A залучені до інших “нетрансляційних” процесів, як то перебудова цитоскелету, клітинний цикл, апоптоз, аутофагія, вірусна інфекція та інші, а також можуть бути пов'язаними з розвитком деяких патологічних станів організму (*детально розглянуто Negrutskii et al., 2023*). Отже, ґрунтовні дослідження відмінностей структурної організації eEF1A1 і eEF1A2 є необхідними як для чіткого розуміння їх ролі в процесі білкового синтезу, так і для аналізу потенційних механізмів виконання ними численних неканонічних функцій, а також для висвітлення їх участі в патологічних процесах, які можуть бути специфічними для кожного паралога.

Функція комплексу eEF1B в трансляції полягає у відновленні активної ГТФ-зв'язаної конформації факторів eEF1A1 і eEF1A2, необхідної для взаємодії з аміноацил-тРНК (*Merrick & Nyborg, 2000, Le Sourd et al., 2006*). Відомо, що субодиниці eEF1Ba і eEF1B $\beta$  відповідають за ГДФ/ГТФ обмін (GEF), тоді як eEF1B $\gamma$  є структурним компонентом цього комплексу (*Andersen et al., 2003, Le Sourd et al., 2006*). Важливо зазначити, що субодиниця eEF1B $\gamma$  підсилює активність eEF1Ba в 2-4 рази при утворенні комплексу між ними, але механізм такого впливу залишався невідомим (*Janssen et al., 1988, Bec et al., 1994*). Необхідно також зауважити, що у комплексі eEF1B з валіл-тРНК синтетазою може відбуватися безпосередня передача (channeling) валіл-тРНК від ферменту до eEF1A1\*GTP з утворенням відповідного потрійного комплексу (*Negrutskii et al., 1999*).

На сьогоднішній день, структура макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, комплексів eEF1H, eEF1B і VRS-eEF1B є достеменно невизначеними. Це також стосується структури і функції їх окремих компонентів, зокрема субодиниць eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , паралогів eEF1A1 і eEF1A2, які продовжують знаходитись у фокусі досліджень різних наукових груп у світі.

Білки макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз p43, p38 і p18, окрім структурної ролі, можуть виконувати додаткові неканонічні функції. Зокрема, білок p43, крім того, що безпосередньо взаємодіє з аргініл- і глутамініл-тРНК синтетазами в комплексі (*Quevillon et al., 1999, Robinson et al., 2000, Fu et al., 2014*), може бути попередником прозапального цитокіну ЕМАРІІ (*Quevillon et al., 1997*), який, як повідомляється, впливає на активацію моноцитів і ендотеліальних клітин (*Kao et al., 1992*). Однак, молекулярні механізми вивільнення біологічно активних білків (або фрагментів білків) з макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз залишаються нез'ясованими. Очевидно, що розуміння цих механізмів є важливим як з точки зору фундаментальної науки, так і прикладної біомедичної галузі.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводились в лабораторії білкового синтезу, а після її реорганізації - у відділі структурної та функціональної протеоміки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за такими бюджетними темами: «Роль неканонічних взаємодій компонентів трансляційного апарату в організації білкового синтезу у вищих еукаріотів» (2.2.4.9; №0101U009211, 2002–2005 рр), «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 вищих еукаріотів» (2.2.4.9, №0105U005340, 2006–2010 рр.), «Дослідження трансляційних наноконструкцій та їх компонентів» (2.2.4.9; №0110U000693, 2011–2015 рр), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744, 2016 - 2020 рр) та «Структурні та функціональні дослідження факторів елонгації трансляції вищих еукаріотів» (2.2.4.9; №0120U102238, 2021-2025 рр).

**Мета і завдання дослідження:** з'ясування особливостей структурної організації і функціональної активності комплексів факторів елонгації трансляції eEF1B та eEF1H, та їх окремих компонентів, а також функціональних особливостей білка p43 – компонента макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз ссавців.

#### **Завдання дослідження:**

1. Охарактеризувати просторову організацію фактора елонгації трансляції eEF1A1 і його комплексу з деацильованою тРНК в розчині методом малокутового розсіювання нейтронів.

2. Встановити структуру фактора елонгації трансляції eEF1A2 методом рентген-структурного аналізу і визначити особливості реакції обміну гуанінового нуклеотиду на цьому білку.
3. Виявити утворення неканонічного комплексу і взаємодії фактора елонгації трансляції eEF1A1 з деацильованою тРНК, фенілаланіл- і метіоніл-тРНК синтетазами.
4. Визначити вплив трансляційно-контрольованого білка пухлин (ТСТР) на активність фактора елонгації трансляції eEF1A1 в реакції обміну гуанінового нуклеотиду.
5. З'ясувати структурну організацію і функціональні особливості факторів елонгації трансляції eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , які утворюють макромолекулярний комплекс eEF1B.
6. Визначити сайти взаємодії між eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$  і побудувати модель просторової організації макромолекулярного комплексу eEF1B.
7. Охарактеризувати взаємодію білка p43 з аргініл-тРНК синтетазою і визначити його вплив на активність цього ферменту.
8. Визначити вплив каспази 7 на білок p43 в складі макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз *in vitro*.
9. Охарактеризувати протеолітичний фрагмент білка p43, який утворюється і вивільняється з клітин U937 в процесі апоптозу.
10. Визначити внутрішньоклітинну локалізацію довгої ізоформи білка p43.

**Об'єкт дослідження:** фактори елонгації трансляції eEF1A1 і eEF1A2 вищих еукаріот, комплекс eEF1B людини, який складається з eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$  субодиниць, білок p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз.

**Предмет дослідження:** особливості структурної організації факторів елонгації трансляції eEF1A1 і eEF1A2, їх функціональна активність, взаємодія з тРНК і білками-партнерами, просторова організація і функціональна активність комплексу eEF1B факторів елонгації трансляції і його окремих компонентів. Функція білка p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз в трансляції і його роль як попередника цитокін-подібних сигнальних молекул.

**Методи дослідження:** включають підходи генної інженерії (сайт-спрямований мутагенез і клонування кДНК фрагментів, створення генетичних конструкцій для синтезу цільових білків і репортерних конструкцій), молекулярно-біологічні підходи (ПЛР, електрофорез ДНК в агарозному гелі, створення штамів-продуцентів на основі бактерій і клітин людини, імуноблотинг, *in vitro* та *in vivo* pull-down), біохімічні підходи (афінна, іонообмінна хроматографія білків, гель фільтрація, визначення активності ферментів в реакції аміноацилювання тРНК, визначення активності факторів елонгації трансляції в реакції обміну гуанінових нуклеотидів, *in vitro* трансляція, визначення цитокінової активності білків, електрофорез білків в нативних і денатуруючих умовах), біофізичні (рентген-структурний аналіз, аналітичне

ультрацентрифугування білків, воднево-дейтерієвий обмін і мас-спектрометричний аналіз пептидів, круговий дихроїзм, спектрометрія), підходи клітинної біології (культивування і трансфекція клітин в культурі, МТТ-тест, конфокальна мікроскопія, проточна цитометрія), математичні підходи (моделювання просторової структури білків і білкових комплексів), статистичні підходи для кількісної обробки результатів з метою оцінки достовірності відмінностей ( $t$  - критерій Стьюдента).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше встановлено, що фактор елонгації трансляції eEF1A1 в ГДФ-зв'язаній формі має видовжену конформацію в розчині на відміну від його білка-паралога eEF1A2.

Вперше розшифровано кристалічну структуру фактора елонгації трансляції eEF1A2 і встановлено, що іони  $Mg^{2+}$  не впливають на реакцію обміну гуанінового нуклеотиду на цьому факторі.

Вперше показано, що eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній формі може утворювати неканонічний потрійний комплекс з деацильованою тРНК і четвертинний комплекс з фенілаланіл-тРНК синтетазою, а також збільшує початкову швидкість реакції, яку каталізує метіоніл-тРНК синтетаза. Виявлено взаємодію трансляційно-контрольованого білка пухлин (TCTP) з факторами елонгації трансляції eEF1A1 і субодиноцею eEF1B $\beta$ , що призводить до зниження швидкості реакції як спонтанного обміну, так і eEF1B $\beta$ -опосередкованого обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A1.

Вперше детально досліджено структурну організацію факторів елонгації eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , які утворюють макромолекулярний комплекс eEF1B. Визначено сайти взаємодії між субодиноцями eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\gamma$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , і встановлено, що структурний мотив типу «лейцинова застібка» eEF1B $\beta$  відповідає за тримеризацію цього білка, а також всього комплексу eEF1B, який має структурну організацію типу  $(\alpha\beta\gamma)_3$ . Показано, що eEF1B $(\alpha\beta\gamma)_3$  здатен зв'язувати до шести молекул eEF1A2, відповідно до кількості GEF-доменів в ньому. Вперше розкрито механізм стимуляції активності eEF1B $\alpha$  субодиноцею eEF1B $\gamma$  при утворенні комплексу між ними.

Встановлено, що N-кінцевий домен білка p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз взаємодіє з аргініл-тРНК синтетазою. Показано, що p43 не впливає на каталітичні параметри аргініл-тРНК синтетази і не збільшує її спорідненість до відповідної тРНК. Отже, білок p43 не є кофактором для цього ферменту.

Доведено, що інкубація макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з каспазою 7 *in vitro* призводить до розщеплення його p43 компоненту на два фрагменти. Його C-кінцевий фрагмент, який вивільняється з комплексу, є ідентичним ЕМАРІІ і здатен викликати хемотаксис моноцитів. Розщеплення p43 призводить до втрати його тРНК-зв'язувальної властивості.

Вперше виявлено, що індукція апоптозу в клітинах U937 призводить до появи і вивільнення з клітин іншого протеолітичного фрагменту білка p43, названого p43(ARF), який на 40 амінокислот довший ніж ЕМАРІІ. Показано, що,

на відміну від повнорозмірного p43, p43(ARF) і ЕМАРІІ не індукують експресію Е-селектину в ендотеліальних клітинах (HUVEC),

Вперше ідентифіковано новий трансляційний продукт гена, який кодує білок p43. Цей продукт має мітохондріальну локалізацію і є на 9 амінокислот довшим, ніж цитоплазматична ізоформа p43.

Результати представлені в дисертаційній роботі не тільки розширюють і поглиблюють сучасні теоретичні уявлення про функціонування апарату трансляції вищих еукаріот, але і мають практичне значення. Перш за все, розуміння відмінностей структурної організації і функціональної активності високогомологічних (97%) білків-паралогів eEF1A1 і eEF1A2 є важливим для розробки специфічних інгібіторів для eEF1A2, який вважається протоонкогенним білком або eEF1A1, який є важливим компонентом системи розмноження РНК-вірусів. Окрім цього, існування взаємодії eEF1A1 і eEF1B $\beta$  з трансляційно-контрольованим білком пухлин (TCTP) також пов'язує фактори елонгації трансляції з процесом злоякісної трансформації клітини. Така взаємодія може бути ще однією мішенню для розробки лікарських засобів нового покоління. Важливо зауважити, що білок p43 високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз є попередником цитокін-подібних молекул, які можуть грати роль певних сигналів, що забезпечують ефективне видалення апоптозних клітин імунною системою, уникаючи розвитку запального процесу. Використання таких цитокін-подібних молекул може бути перспективним для зменшення запального процесу в організмі. Матеріали дисертаційної роботи містять новітню наукову інформацію і, отже, використовуються в лекціях для навчання студентів і аспірантів різних біологічних спеціальностей, які слухають загальний чи спеціальний курс(и) з молекулярної біології, зокрема «Структура рибосом, етапи і регуляція біосинтезу білка», «Регуляція експресії генів на рівні трансляції».

**Особистий внесок здобувача.** Автором було проведено аналіз наукової літератури по проблематиці дисертаційної роботи, сформульовано мету і завдання дослідження. Автор особисто брав участь в отриманні основної частини представлених в дисертації експериментальних результатів, їх аналізу, науковій інтерпретації, узагальненні і підготовці до публікації. Написання текстів статей і їх обговорення проводилось в тісній співпраці з іншими співавторами роботи.

Деякі експерименти були виконані разом зі співавторами опублікованих робіт, зокрема співробітниками Інституту молекулярної біології і генетики НАН України к.б.н. Будкевич Т.В., к.б.н. Петрушенко З.М., к.б.н. Яремчук А.Д., к.б.н. Бондарчук Т.В., Ложко Д.М., Власенко Д.О.

Експерименти по малокутовому розсіюванню нейтронів (SANS) проводили на базі інституту Пола Шререра, Швейцарія (Paul Scherrer Institute, Switzerland), керівники роботи д-р Колбрехер (Dr. J. Kohlbrecher) і проф. Сердюк І.Н. (Prof. I.N. Serdyuk).

Кристалізацію і рентген-структурний аналіз eEF1A2 проводили на базі Університету Гренобль Альпи, Франція (University of Grenoble Alpes, France) і

Європейського синхротрону (European Synchrotron Radiation Facility), відповідальний за роботу д-р Т. Крепан (Dr. T. Crepin).

Дослідження взаємодії фактора елонгації трансляції eEF1A1 з метіоніл-тРНК синтетазою, ТСТР, а також цикл робіт по функціональній ролі білка p43 високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз проводились на базі Лабораторії ензимології і структурної біохімії, Франція (Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, CNRS, Gif-sur-Yvette, France), керівник групи д-р М. Міранд, члени групи, які брали участь у дослідженні і з якими автор має спільні публікації М. Камінська (M. Kaminska), Л. Гігу (L. Guigou), д-р К. Канс (Dr. C. Cans).

Дослідження воднево-дейтерієвого обміну білків з наступним мас-спектрометричним аналізом проводили на базі Інституту біохімії і біофізики Польської академії наук (Institute of Biochemistry and Biophysics, PAN, Poland), керівник лабораторії проф. М. Дадлез (Prof. M. Dadlez) за участі А. Фатальської (A. Fatalaska).

Автор висловлює щире подяку співробітникам Інституту молекулярної біології і генетики НАН України М. Вівчарик і Р. Ніколаєву за допомогу у вимірюванні спектрів кругового дихроїзму і флюоресценції білків.

Автор висловлює щире подяку д-ру Р. Щепановському з Міжнародного Інституту молекулярної і клітинної біології, Польща (R. Szczepanowski, International Institute of Molecular and Cell Biology, Poland), за допомогу в проведенні експериментів з аналітичного ультрацентрифугування.

Автор вдячний д-ру Марі-Поль Вот'є, Франція (Dr. Marie-Paule Wautier, Universite Paris 7 / Institut National de la Transfusion Sanguine, France) за допомогу в проведенні тесту з активації ендотеліальних клітин (HUVEC).

Автор вдячний д-ру Риті Мітнах-Краус і проф. Матіасу Клаусу (Dr. Rita Mitnacht-Kraus and Prof. Matthias Clauss, Max-Planck-Institute, Germany) за проведення експерименту з активації моноцитів.

Автор щиро вдячний проф. Єльській Г.В. за постійну підтримку і слушні поради під час виконання цієї дисертаційної роботи.

Автор висловлює щире подяку науковому консультанту проф. Негруцькому Б.С. за допомогу в обговоренні та підготовці матеріалів дисертаційної роботи.

**Апробація результатів роботи.** Основні положення роботи доповідались на міжнародних і вітчизняних конференціях, зокрема 18<sup>th</sup> International tRNA Workshop - "tRNA 2000" (2000, Cambridge, UK), Asilomar Conference on Aminoacyl-tRNA synthetases in Biology, Medicine & Evolution (2002, Pacific Grove, USA), 19<sup>th</sup> International tRNA Workshop (2002, Shanghai, China); 20<sup>th</sup> International tRNA Workshop (2003, Banz, Germany), 5<sup>ème</sup> Rencontre sifARN "ARN, le nouveau monde" (2004, Arcachon, France), 5<sup>th</sup> Parnas Conference "Molecular mechanisms of Cellular Signaling" (2005, Kyiv, Ukraine), "aaRS2008. International conference on aminoacyl-tRNA synthetase: from basic mechanisms to systems biology" (2008, Veyrier du Lac, France), International life sciences' students' conference (2009, Kyiv,

Ukraine), X, XI і XII Українських біохімічних конгрессах (2010, м. Одеса, 2014, м. Київ, 2019, м. Тернопіль, Україна), VII and VIII conferences of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine (2013, 2014, Kyiv, Ukraine), Combiom Final Scientific Meeting (2015, Kyiv, Ukraine), International Conference for the Young Scientists (CYS-2015) (2015, Kyiv, Ukraine), 41<sup>st</sup> FEBS congress “Molecular and systems biology for a better life” (2016, Ephesus/Kusadasi, Turkey), XII Відкритій конференції молодих вчених ІМБГ НАН України (2018, м. Київ).

**Публікації.** Результати дисертації викладено у 12 статтях (опублікованих у виданнях, віднесених до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports) та 18 тезах міжнародних конференцій та з’їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається з анотації, вступу, основної частини, яка має три розділи, висновків і додатку. Обсяг дисертації становить 169 сторінок.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Дисертацією є кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису, підготовлена у формі доповіді за сукупністю наукових статей, об’єднаних загальною тематикою по структурно-функціональній організації компонентів апарату трансляції у ссавців. В кожній статті наведено ґрунтовний аналіз наукової проблеми, запропоновано експериментальні підходи і отримано практичні результати, які детально описано та обговорено.

### Матеріали і методи дослідження

**Молекулярно-біологічні методи,** зокрема ПЛР ампліфікацію, рестрикцію і лігування ДНК фрагментів у відповідні вектори, аналіз рестрикційних фрагментів методом електрофорезу в агарозному гелі, використовували для створення генетичних конструкцій на основі векторів рЕТ16b, рЕТ28a,b,c, рGEX6p-1, рEGFP-N1. Всі генетичні конструкції були підтверджені секвенуванням. Синтез цільових рекомбінантних білків перевіряли в екстрактах трансформованих бактерій або трансфікованих клітин ссавців методом електрофорезу в поліакриламідному гелі за умов денатурації (*Laemmli, 1970*) та/або вестерн-блот аналізом з використанням відповідних антитіл. Первинне очищення цільових рекомбінантних 6×His-злитих білків з бактеріальних екстрактів проводили із застосуванням афінної хроматографії на Ni<sup>2+</sup>-зв’язаному матриксі (Ni-NTA, QIAGEN, ФРН), а GST-злитих білків на глутатіон-сефарозі (GE Healthcare, США). GST-частину рекомбінантного білка видаляли за допомогою PreScission протеази (GE Healthcare, США).

**Біохімічні методи.** Препарат eEF1A1 отримували хроматографічним способом з екстракту печінки кроля як описано (*Shalak et al, 1997*), препарат

eEF1A2 – з екстракту м'язів кроля (*Yaremchuk et al, 2012*). Рекombінантні білки після афінної хроматографії піддавали додатковому очищенню на іонно-обмінній колонці HiTrap Q або S (1 мл, GE Healthcare, США) в градієнті NaCl. Деякі білки також очищали від домішок агрегатів за допомогою гель-фільтрації на колонці HiLoad Superdex 200 (1.6×60 см, 120 мл, GE Healthcare, США) або Superose 6 HR 10/30 (24 мл, GE Healthcare, США). Білки у хроматографічних фракціях аналізували з використанням гель-електрофорезу за умов денатурації (*Laemmli, 1970*). Найбільш очищені білкові фракції об'єднували і діалізували в буферному розчині, який містив 25-30 мМ Трис-HCl рН 7.5, 150 мМ NaCl, 55% гліцерин, 2-5 мМ 2-меркаптоетанол і зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Електрофорез білків і білкових комплексів в агарозному гелі (0.7, 1 або 1.5%) за нативних умов проводили в 89 мМ Трис-боратному буфері, рН 8.3 при кімнатній температурі. Гель фарбували Кумасі R-250 та відмивали у розчині, який містив 40% етанол і 3% оцтову кислоту.

Визначення взаємодії білок-тРНК методом «затримки в гелі» (EMSA – electrophoretic mobility shift assay). Зростаючі концентрації очищених білків інкубували з радіоактивно міченою [ $^{32}\text{P}$ ]тРНК в об'ємі 11 мкл, що містив 20 мМ Трис-HCl рН 7.5, 150 мМ NaCl, 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ 2-меркаптоетанол, 10% гліцерин і БСА в концентрації 0.1 мг/мл. Після інкубації при  $25^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв суміш ставили на лід і наносили на 6% поліакриламідний гель, приготовлений на буферному розчині, який містив 45 мМ Трис, 45 мМ борну кислоту, 1.25 мМ ЕДТО (етилен-діамін-тетраоцтова кислота) рН 8.3 і 5% гліцерин, для проведення електрофорезу при  $4^{\circ}\text{C}$ . Після електрофорезу гель фіксували, висушували та піддавали авторадіографії. Вільну та зв'язану з білком тРНК визначали кількісно за допомогою денситометричного аналізу. Оскільки кількість міченої тРНК є значно нижчою порівняно з кількістю білка, то концентрація білка, за якої половина тРНК входить до комплексу з ним, відповідає спостережному значенню константи дисоціації комплексу ( $K_{D(\text{спос})}$ ).

Початкову швидкість реакції аміноацілювання тРНК вимірювали при  $25^{\circ}\text{C}$  в інкубаційні суміші об'ємом 100 мкл, яка містила 20 мМ імідазол-HCl рН 7.5, 50-150 мМ KCl, 0.5 мМ ДТЕ, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 3 мМ АТФ, 50 мкМ [ $^{14}\text{C}$ ] амінокислота, 12 мкМ препарат індивідуальної тРНК (або 300 мкг сумарної тРНК дріжджів), 0.5 мг/мл БСА, каталітичні кількості ферменту (1-10 нМ). Реакцію зупиняли додаванням охолодженого 5% розчину три-хлороцтової кислоти, утворений осад наносили на фільтри GF/C (Whatman, ФРН) і промивали. Фільтри висушували і вміст радіоактивності визначали в сцинтиляційному лічильнику. Параметри  $K_m$  і  $k_{\text{cat}}$  розраховували з застосуванням нелінійної регресії теоретичного рівняння Міхаеліса-Ментен до експериментальних точок за допомогою програми KaleidaGraph (версія 3.6 Abelbeck Software).

Кінетику [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ обміну на eEF1A проводили відповідно до (*Crepin et al, 2014*) з використанням [ $^3\text{H}$ ]ГДФ (1500 Ci/mol, GE Healthcare, США). Константи швидкості обміну [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ першого порядку і спостережні константи обраховували в OriginPro 8 (OriginLab, США).

### **Біофізичні і структурні методи.**

Експерименти по аналітичному ультрацентрифугуванню білків і білкових комплексів проводили на ультрацентрифугузі ProteomeLab XL-I з ротором An-60 Ti при 4°C. Моніторинг седиментації здійснювали за допомогою цифрової камери на довжині хвилі опромінення комірки 280 нм. Використовували два види седиментаційного аналізу білків – швидкісну седиментацію і рівноважну седиментацію. При застосуванні швидкісної седиментації отримували набір седиментаційних кривих (сканування кожні – 4.5 хвилини), які аналізували в програмі SEDFIT з використанням математичної моделі безперервного розподілу дискретних частинок за розміром (*Schuck, 2000, 2003; Schuck et al, 2002*). В результаті швидкісного центрифугування отримували наступну інформацію: коефіцієнт седиментації ( $S$ ) білка (білкового комплексу), співвідношення коефіцієнтів тертя ( $f/f_0$ ) і, враховуючи цей параметр, визначали молекулярну масу білка (білкового комплексу). Додатково враховували співвідношення  $S_{max}/S$ , яке свідчить про форму білка (білкового комплексу), який седиментує, де  $S_{max}$  – це коефіцієнт седиментації ідеально сферичного білка (без молекул води), тоді як  $S$  – це експериментально визначений коефіцієнт седиментації в програмі SEDFIT.  $S_{max}$  вираховується по формулі  $S_{max} = 0.00361 \cdot (M_r)^{2/3}$ , де  $M_r$  – це теоретична молекулярна маса в Дальтонах. Білок є близьким до сферичної форми, якщо  $S_{max}/S = 1.2 - 1.4$ , помірно видовженої форми при  $S_{max}/S = 1.4 - 1.8$  і сильно видовженої форми при  $S_{max}/S > 1.8$  (*Erickson, 2009*). При рівноважній седиментації сканування комірки цифровою камерою відбувалось кожні 4 години. Досягнення стану рівноваги контролювали за допомогою програми SEDFIT. Седиментаційну криву, отриману для стану рівноваги білків (білкових комплексів), обраховували в програмі SEDPHAT (*Vistica et al, 2004*) з використанням математичної моделі для монодисперсних частинок в розчині, які не взаємодіють між собою, або моделі рівноваги мономер-димер. Результатом експерименту було визначення молекулярної маси білка (білкового комплексу) і, за наявності, константи дисоціації білкового комплексу.

Вимірювання спектрів кругового дихроїзму (КД) білків проводили на спектрополяриметрі JASCO-810 на довжинах хвиль від 190 до 260 нм, з кроком 0.5 нм та шириною каналу 1 нм, зі швидкістю 50 нм/хв. Значення середньої еліптичності на один амінокислотний залишок розраховували відповідно до (*Greenfield, 2006*). Отримані КД спектри аналізували у програмах CDNN та CONTINLL (*Bohm, 1992, Sreerama, 2000*) з метою визначення вмісту елементів вторинної структури в білку відповідно до (*Whitmore, 2004*).

HDX-MS (hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry) – вимірювання кінетики заміщення водню на дейтерій з наступним мас-спектрометричним аналізом виконували на мас-спектрометрі SYNAPT G2 HDMS (Waters, Milford, США) в режимі іонної мобільності. Досліджувані цільові білки інкубували з D<sub>2</sub>O (99.8% Cambridge Isotope Laboratories, Inc, Англія) впродовж 10 с, 1, 5, 25 хвилин та 2.5 години при 20°C. Для їх протеолітичного розщеплення додавали 2 мкл суміші протеаз з *Aspergillus saitoi* (Sigma-Aldrich) в 1% розчині мурашиної

кислоти. Ідентифікацію отриманих пептидів проводили з використанням ProteinLynx (PLGS, Waters, Milford, США) і обраховували за допомогою програми DynamX 3.0 (Waters, Milford, США). Подальший аналіз пептидів виконували за допомогою програми власної розробки лабораторії мас-спектрометричного аналізу Інституту біохімії і біофізики, Варшава, Польща.

Експерименти з малокутового розсіювання нейтронів (SANS) проводили у камері Інституту Поля Шеррера (Швейцарія). Кварцова кювета товщиною 1 мм витримувалась при 4 °С. Вимірювали інтенсивність ( $I$ ) розсіювання нейтронів від зміни величини хвильового вектора розсіювання ( $Q$ ).  $Q = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$ , де  $2\theta$  - кут розсіювання,  $\lambda$  - довжина хвилі нейтронів (0,6 нм). Діапазон векторів розсіювання становив 0.1-2.5 нм<sup>-1</sup>. При малих кутах розсіювання залежність інтенсивності ( $I$ ) від квадрату кута вектора розсіювання ( $Q^2$ ) можна наближено описати формулою Гін'є  $\lg I = \lg I(0) - 1/3 \cdot Rg^2 \cdot Q^2$  (Guinier et al, 1955). Із лінійної залежності ( $I$ ) від ( $Q^2$ ) визначаються параметри  $I(0)$  – інтенсивність при нульовому куті розсіювання і  $Rg^2$ , де  $Rg$  – це радіус гірації (інерції) білкової молекули в розчині. Молекулярну масу білка ( $M_r$ ) вираховували з використанням значення  $I(0)$  і концентрації білка ( $C$ ) відповідно до (Svergun et al, 1988).

Кристали комплексу eEF1A2\*GDP отримували, як описано раніше (Yaremchuk et al, 2012). Дані дифракції збирали на ID14-4 (ESRF, Франція) та обробляли за допомогою пакету XDS (Kabsch, 2010). Модель eEF1A2\*GDP побудовано та уточнено за допомогою програми для кристалографії CCP4i (REFMAC, COOT). Структурні файли та координати комплексу eEF1A2\*ГДФ були депоновані в Protein Data Bank під номером 4C0S.

Просторові 3D моделі білків створювали в програмі Modeller (version 9.14) (Webb, 2014, Fiser et al, 2000), далі проводили їх вдосконалення в програмі ModRefiner (Xu, 2011) і перевірку на web-сервері MolProbity (Chen et al, 2010). Покращення моделей (refinement) робили на сервері з мінімізації енергії YASARA (Krieger et al, 2009). Структурні моделі візуалізували і аналізували в програмі UCSF Chimera (Pettersen, 2004).

Докінг *in silico* між eEF1B $\beta$  та eEF1B $\gamma$  виконували на web-сервері PatchDock (Dubovny et al, 2002, Schneidman-Duhovny et al, 2005). Симетричний докінг для мономерів eEF1B $\beta$  здійснювали на web-сервері SymmDock (Schneidman-Duhovny et al, 2005), далі уточнювали у програмі FireDock (Mashiach et al, 2008). Молекулярні інтерфейси між білками аналізували і візуалізували на web-сервері Cocomaps (Vangone et al, 2011).

### **Методи клітинної біології.**

Промоноцитарну клітинну лінію людини U937 (ATCC, США) вирощували в середовищі RPMI з додаванням 10% ембріональної телячої сироватки, 2 мМ глютаміну, 100 мкг/мл пеніциліну і стрептоміцину. Для індукції апоптозу клітини інкубували в середовищі без сироватки. Розвиток апоптозу оцінювали по фрагментації ДНК в клітинах та розщепленню полі(АДФ-рибозо) полімерази.

Ендотеліальні клітини пупкової вени людини (HUVEC) культивували в середовищі M199, що містило сироватку людини АВ (15%), до досягнення

конфлуентності. Експресію Е-селектину на ендотеліальних клітинах вимірювали, як описано раніше (Wautier, 1999),

Для визначення внутрішньоклітинної локалізації білків, клітини лінії HeLa-ST (ATCC, США) трансфікували конструкціями на основі вектора pEGFP-N1 (BD Biosciences, США) у 8-лункових камерах LabTek II (NalgeNunc, США) із застосуванням реагенту Effectene (Qiagen, США). За клітинами спостерігали на конфокальному мікроскопі Leica TCS SP2 (ФРН).

Субклітинне фракціонування клітинних екстрактів U937 проводили, в основному, як описано раніше (Neupert, 2007), застосовуючи центрифугування при різних швидкостях. Отримані цитоплазматичну і мітохондріальну фракції аналізували за допомогою вестерн-блоту.

## Результати дослідження та їх обговорення

### Розділ 1. Структурна організація факторів елонгації трансляції ссавців eEF1A1 та eEF1A2. Неканонічні взаємодії eEF1A1

#### *Некомпактна просторова організація фактора елонгації трансляції eEF1A1 в розчині.*

Фактор елонгації трансляції 1A прокаріотичних організмів був детально досліджений на структурному рівні (Kjeldgaard et al, 1993; Nissen et al, 1995; Song et al, 1999). На відміну, еукаріотичні організми були представлені лише однією роботою, в якій було описано структуру eEF1A дріжджів в комплексі з GEF-доменом eEF1B $\alpha$  (Andersen et al, 2000). eEF1A дріжджів складається із трьох доменів і має просторову форму, близьку до сферичної, з розрахованим радіусом гірації  $R_g = 2.55$  нм. Інформація про структурну організацію паралогів eEF1A1/2 вищих еукаріот на момент початку наших досліджень була відсутня. Для оцінки просторової організації eEF1A1 ссавців в розчині ми застосували метод малокутового розсіювання нейтронів (SANS). Ми показали, що значення  $R_g$  для eEF1A1\*ГДФ, розраховане із графіка Гін'є (рис.1), не залежить від його концентрації і становить  $5.2 \pm 0.2$  нм, що свідчить про видовжену конформацію цього білка в розчині.

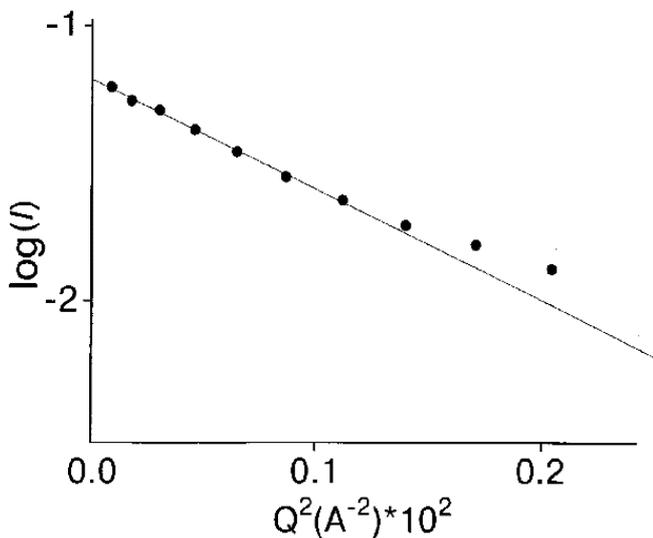


Рис. 1. Залежність інтенсивності ( $I$ ) розсіювання нейтронів від величини хвильового вектора розсіювання ( $Q$ ) в координатах Гін'є ( $\log I$  від  $Q^2$ ), екстрапольована на нульову концентрацію eEF1A\*ГДФ.

Для порівняння EF-Tu має  $R_g = 2.3-2.48$  нм (Serdyuk et al, 1996; Bilgin et al, 1998), eEF1A дріжджів має  $R_g = 2.55$  нм, що приблизно вдвічі менше радіусу гірації eEF1A1\*ГДФ ссавців. Молекулярна маса цього білка розрахована із значення інтенсивності розсіювання екстрапольованого на нульовий кут розсіювання  $[I(0)/C]$ , де  $C$ -концентрація білка] становить  $48.6 \pm 2.0$  кДа, що відповідає масі мономера eEF1A1, визначеній по його амінокислотній послідовності (50.34 кДа). Кут нахилу прямої вказує на відсутність агрегатів в препараті eEF1A\*ГДФ при його концентраціях в межах 40-120 мкМ (2-6 мг/мл).

Додаткову інформацію про просторову форму eEF1A1\*ГДФ в розчині можна отримати з графіка залежності інтенсивності кривої розсіювання нейтронів від модуля вектора розсіювання в координатах Краткі (Kratki, 1963) (рис. 2).

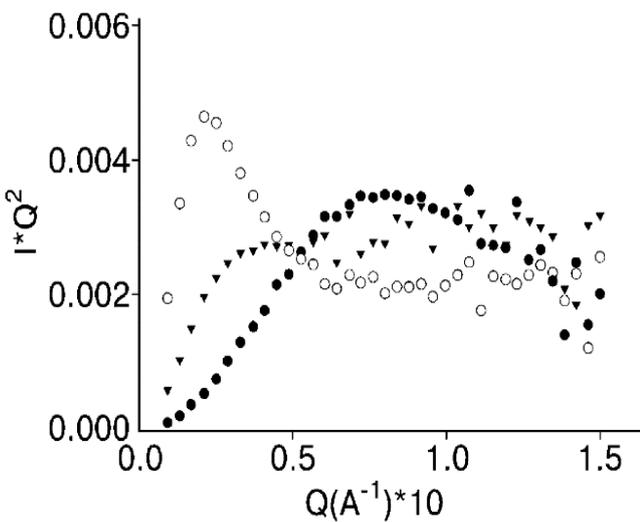


Рис. 2. Залежність інтенсивності ( $I$ ) нейтронного розсіювання від величини хвильового вектора розсіювання ( $Q$ ) в координатах Краткі ( $I \cdot Q^2$  від  $Q$ ). тРНК (•), eEF1A1\*ГДФ (▼) і eEF1A1\*ГДФ:тРНК - 3:1 (○).

Важливо, що крива розсіювання eEF1A1\*ГДФ на рис. 2 має чітко виражене плато, що є типовим для білків з некомпактною структурною організацією (Glatter and Kratky, 1982). Наявність неструктурованих ділянок в білковій молекулі може бути однією з причин такої некомпактної конформації. При додаванні тРНК до препарату eEF1A1\*ГДФ утворюється комплекс між ними, що призводить до зміни інтенсивності розсіювання нейтронів (рис. 2). Поява чіткого піку розсіювання на цій кривій може вказувати на компактизацію eEF1A1 при взаємодії з молекулою тРНК.

### ***Кристалграфічна структура фактора елонгації трансляції eEF1A2 і особливості реакції обміну гуанінового нуклеотиду на цьому білку.***

На сьогоднішній день, всі спроби отримати кристал eEF1A1 лишаються безуспішними. Причиною такої невдачі можуть бути саме неструктуровані ділянки в його складі, які, навіть, у випадку їх обмеженої локальної динаміки, можуть унеможливити утворення кристалу. На відміну, eEF1A2 ссавців виявився придатним для кристалізації, отже, його кристалічна структура в ГДФ-зв'язаній конформації була побудована і оптимізована з роздільною здатністю 2.7 Å (рис. 3).

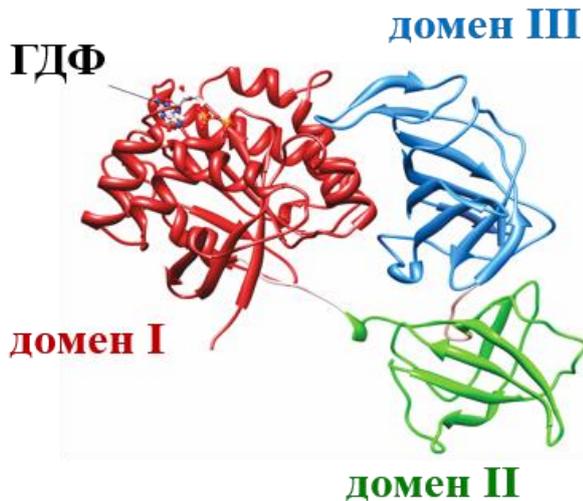


Рис. 3. Кристалічна структура (загальний вигляд) фактора елонгації трансляції eEF1A2 в ГДФ-зв'язаній конформації (PDB: 4C0S). Три структурних домени наявні в молекулі eEF1A2: домен I (амінокислотні залишки 4–234), домен II (амінокислотні залишки 241–328) і домен III (амінокислотні залишки 337–445), які сполучені між собою лінкерними ділянками. Сайт зв'язування ГДФ розташований у першому домені білка.

Радіус гірації eEF1A2\*ГДФ розрахований по атомним координатам в програмі Crysol (*Svergun et al, 1995*) становить 2.44 нм, що є близьким до значень Rg бактеріального і дріжджового аналогів, згаданих вище, і є приблизно вдвічі меншим радіусу гірації eEF1A1\*ГДФ, визначеного за допомогою SANS в розчині.

Особливістю структури eEF1A2\*ГДФ є відсутність прямої взаємодії цього білка з іоном  $Mg^{2+}$  (рис. 4а), що кардинально відрізняється від кристалічної структури EF-Tu (рис. 4б).

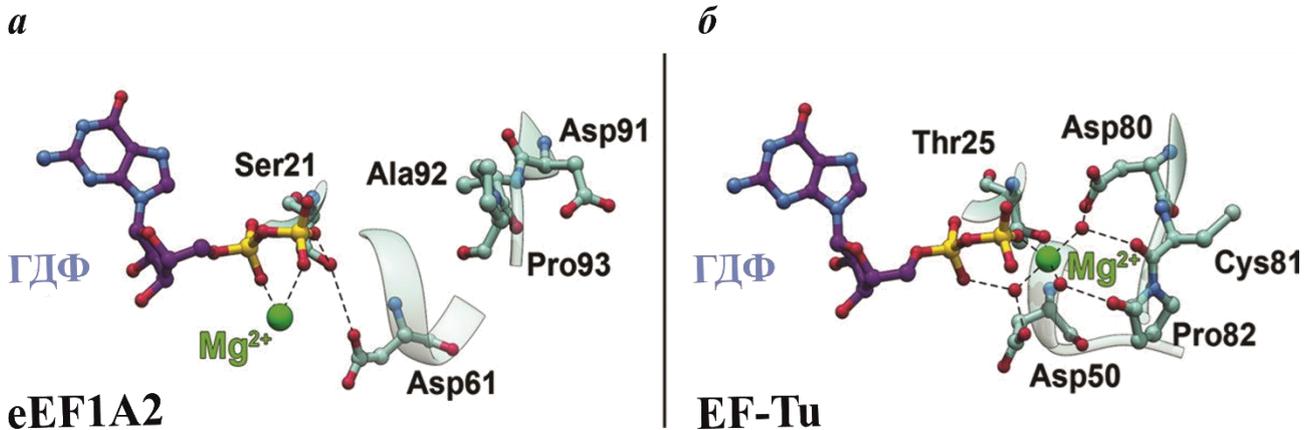


Рис. 4. Збільшене зображення сайту зв'язування ГДФ на молекулі eEF1A2 (а) і EF-Tu (б). Електростатична взаємодія іонів магнію позначена пунктиром.

Як видно з рис. 4а,  $Mg^{2+}$  взаємодіє лише з атомами кисню  $\alpha$ - і  $\beta$ -фосфатних груп ГДФ, що, теоретично, не має впливати, або впливає незначно на силу зв'язування нуклеотиду з eEF1A2. На відміну, EF-Tu має кілька контактів своїх амінокислотних залишків з  $Mg^{2+}$  (рис. 4б), що пояснює значну роль останнього у зв'язуванні ГДФ. Дійсно,  $Mg^{2+}$  мав лише незначний вплив як на спонтанний (рис. 5а), так і на eEF1 $\alpha$ -залежний (рис. 5б) обмін нуклеотидів на молекулі eEF1A2. Значення  $k_1$  для спонтанного [ $^3H$ ]ГДФ/ГДФ обміну на молекулі eEF1A2 становили  $5.6 \pm 0.3 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$  та  $4.4 \pm 0.5 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ , тоді як спостережні константи швидкості реакції eEF1 $\alpha$ -опосередкованого обміну

становили  $6.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  та  $10.0 \pm 0.5 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  у присутності 10 мМ  $\text{Mg}^{2+}$  або EDTO, відповідно.

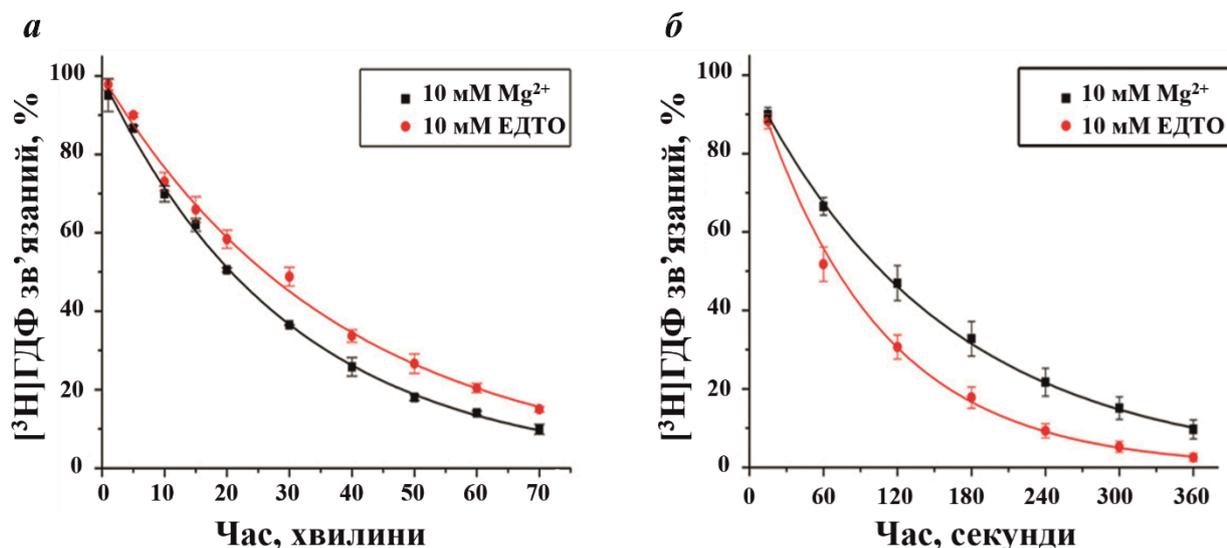


Рис. 5. Кінетика спонтанного (а) і eEF1A $\alpha$ -залежного (б)  $[^3\text{H}]\text{ГДФ}/\text{ГДФ}$  обміну на молекулі eEF1A2 в присутності  $\text{Mg}^{2+}$  (чорний колір) або EDTO (червоний колір). Концентрація eEF1A2 становила 692 нМ і eEF1A $\alpha$  - 4 нМ. Концентрація  $\text{Mg}^{2+}$  і EDTO була 10 мМ. Якість математичного аналізу експериментальних даних з використанням експоненціальної функції становила  $R^2 > 0.999$  для обох реакцій. Точки на графіках показують середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення.

Отже, кінетичні експерименти не показують суттєвого впливу іонів магнію на швидкість реакції обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A2, що узгоджується з його кристалічною структурою в ГДФ-зв'язаній конформації.

### ***Взаємодія eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній формі з деацильованою тРНК і феніланіл-тРНК синтетазою.***

Канонічна схема циклу елонгації трансляції еукаріот вибудовувалась по аналогії з прокаріотами на основі експериментальних даних, отриманих на цих організмах (Weijland *et al.*, 1992). Однак, по мірі накопичення експериментів стало зрозуміло, що існують суттєві відмінності молекулярних механізмів трансляції у прокаріотичній і еукаріотичній системах. Відомо, що у бактерій фактор елонгації EF-Tu в ГДФ-зв'язаній формі взаємодіє з аміноацил-тРНК і утворений потрійний комплекс (Nissen *et al.*, 1995) є субстратом для синтезу білка на рибосомі. Паралоги фактора елонгації трансляції eEF1A (eEF1A1/2), які є еукаріотичними аналогами EF-Tu, також виконують цю функцію, однак, поряд з цим, мають здатність до формування так званих «неканонічних» комплексів, невласних для бактеріальної системи. Прикладами таких взаємодій є комплекси eEF1A1\*ГДФ(ГТФ) з деацильованою тРНК, а також з аміноацил-тРНК синтетазами.



агарозному гелі (рис. 7). Після завершення міграції, одну половину гелю фарбували Кумасі для виявлення локалізації білків, а іншу – експонували на рентгенівську плівку для детекції тРНК<sup>Phe</sup>. Змішування всіх компонентів призводило до утворення комплексу, в якому знаходилась мічена [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup> (рис. 7, доріжка 5), і який мігрував в гелі з найбільшою затримкою, як свідчить фарбування Кумасі (рис. 7, доріжка 2). Заміна eEF1A1 на EF-Tu не призводила до утворення подібного четвертинного комплексу. Комплексоутворення між eEF1A1\*ГДФ, тРНК<sup>Phe</sup> і PheRS було досліджено також за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (BIAcore), який дозволив визначити кількісні характеристики цих взаємодій.

eEF1A1*ГДФ	-	+	-	-	+
PheRS	+	+	-	+	+
тРНК <sup>Phe</sup>	+	+	+	+	+
	1	2	3	4	5

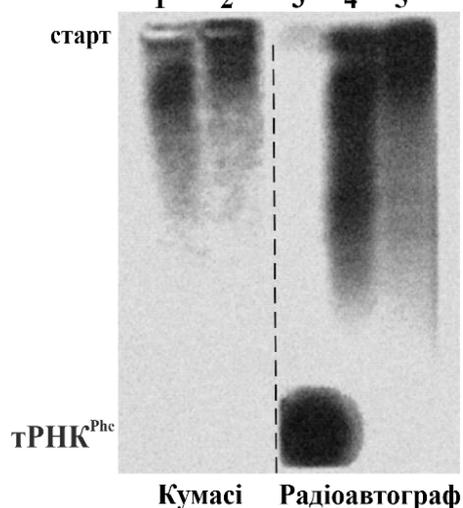


Рис. 7. Утворення eEF1A1\*ГДФ\*[<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup>\*PheRS комплексу. Електрофореграма розділення білкових і білково-нуклеїнових комплексів в 0.7% агарозному гелі. [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup> (3 пмоль) інкубували з 10 пмоль PheRS (доріжки 1, 4) або сумішшю 10 пмоль PheRS та 10 пмоль eEF1A1\*ГДФ (доріжки 2, 5) при 37°C протягом 10 хв і вносили в лунки гелю. На доріжку 3 наносили тільки [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup>. Електрофорез проводили протягом 2 годин при 4°C. Для фарбування білків застосовували Кумасі (доріжки 1, 2). [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Phe</sup> візуалізували за допомогою авторадіографії (доріжки 3, 4, 5).

Важливо відмітити, що взаємодія між eEF1A1\*ГДФ і PheRS може відбуватися і за відсутності тРНК<sup>Phe</sup>. Спостережна константа дисоціації цього комплексу становила  $K_{D(\text{спос})} = 21$  нМ, що вказує на високу афінність між цими білками.

### **Взаємодія eEF1A1 з метіоніл-тРНК синтетазою.**

У ссавців, метіоніл-тРНК синтетаза (MetRS) є одним із компонентів макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз (Mirande et al., 1982, 1991). Окрім каталітичного домену, до складу ферменту входять додаткові домени, а саме N-кінцевий, що забезпечує асоціацію з синтетазним комплексом, і C-кінцевий типу “helix-turn-helix”, який має тРНК-зв’язувальні властивості (Cahuzac et al., 2000).  $K_{D(\text{спос})}$  комплексу MetRS і тРНК<sup>Met</sup> визначена методом затримки в гелі становила 0.1 мкМ, тоді як вкорочена форма MetRS без C-кінцевого домену (MetRSΔC) показала значно нижчу афінність до тРНК<sup>Met</sup> ( $K_{D(\text{спос})} = 4$  мкМ). Також, розрахована константа Міхаеліса  $K_M$  (тРНК<sup>Met</sup>) для MetRS була в 9 раз нижчою, ніж для MetRSΔC. Це свідчить про те, що наявність C-кінцевого домену в цьому ферменті забезпечує його високу афінність до свого

тРНК субстрату. Однак, поряд з цим, каталітична активність повнорозмірної MetRS ( $k_{cat} = 0.15 \pm 0.04 \text{ c}^{-1}$ ) була в 16 раз нижчою, ніж його вкороченої форми MetRS $\Delta C$  ( $k_{cat} = 2.4 \pm 0.5 \text{ c}^{-1}$ ) (рис. 8). Тобто, наявність С-кінцевого домену в складі MetRS не тільки підвищує його афінність до тРНК<sup>Met</sup>, але і уповільнює дисоціацію продукту Met-тРНК<sup>Met</sup> з ферменту, що зменшує його  $k_{cat}$ . Додавання зростаючих концентрацій eEF1A1\*ГДФ (2-500нМ) до інкубаційної суміші підвищувало початкову швидкість реакції аміноацилювання тРНК<sup>Met</sup> (часовий проміжок від 0 до 15 хв), яку каталізує MetRS, і не впливало на реакцію, яку каталізує MetRS $\Delta C$  (рис. 8). Варто відзначити, що вплив на активність MetRS не залежав від того, ГДФ чи ГТФ був зв'язаний з eEF1A1. На відміну від MetRS, ефект від присутності eEF1A1\*ГДФ/ГТФ в реакційній суміші з MetRS $\Delta C$  починав спостерігатись лише після 20 хвилини проходження ферментативної реакції. Однак цей вплив не стосується безпосередньо роботи ферменту, а полягає у захисті продукту реакції Met-тРНК<sup>Met</sup> від спонтанного гідролізу завдяки утворенню потрійного комплексу з eEF1A1\*ГДФ/ГТФ.

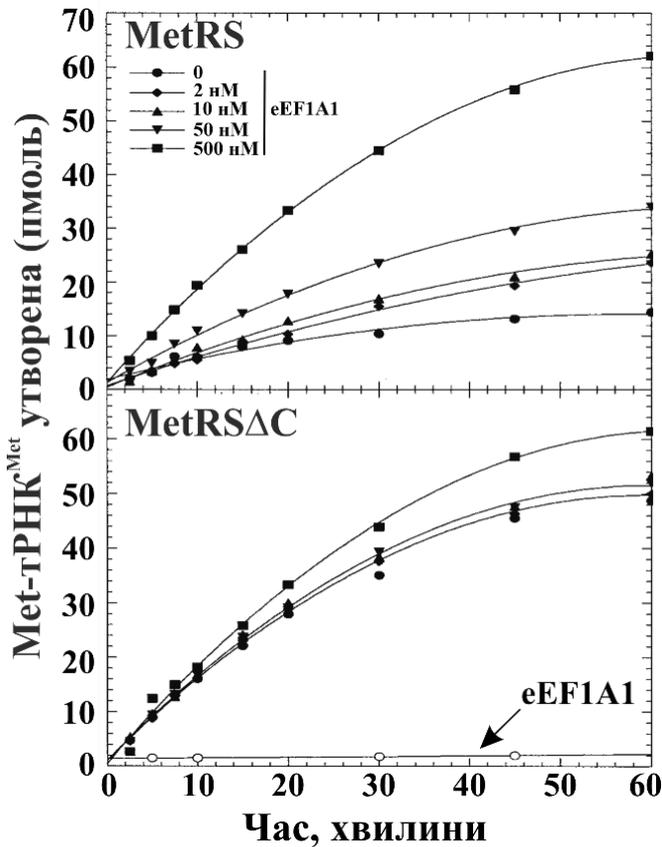


Рис. 8. Вплив eEF1A1\*ГДФ на активність MetRS і MetRS $\Delta C$ . Реакційна суміш містила 10 нМ MetRS, 1 нМ MetRS $\Delta C$  і 12 мкМ тРНК<sup>Met</sup>. Утворення продукту Met-тРНК<sup>Met</sup> не спостерігалось у присутності 500 нМ eEF1A1\*ГДФ (нижня панель). До ферментів додавали концентрацію eEF1A1\*ГДФ в межах від 2 до 500 нМ.

Важливо зазначити, що eEF1A1\*ГДФ має афінність до аміноацил-тРНК, подібну до eEF1A1\*ГТФ (Roobol et al., 1978; Crechet et al., 1986), який, як відомо, формує канонічний потрійний

комплекс в циклі елонгації. Отже, ми виявили ще один фермент, поряд з PheRS (попередній розділ) і ValRS (Negrutskii et al., 1999) в родині аміноацил-тРНК синтетаз еукаріот, який взаємодіє з eEF1A1. Така взаємодія може бути необхідною для забезпечення векторного (channeling) перенесення аміноацил-тРНК фактором eEF1A від місця її синтезу (аміноацил-тРНК синтетази) до місця її використання (рибосоми) (Stapulionis et al., 1995).

### ***Взаємодія eEF1A1 з трансляційно-контрольованим білком пухлин.***

Translationally controlled tumor protein (TCTP) – трансляційно контрольований білок пухлин, також відомий як фактор вивільнення гістаміну (HRF) або фортилін – це багатофункціональний білок, який є присутнім в клітинах практично усіх еукаріотичних організмів (Bommer & Kawakami, 2021). Цей білок бере участь у багатьох біологічних процесах на клітинному рівні, таких як реакція на стрес, поділ, ріст і розвиток клітин (Bommer 2017). Порушення регуляції експресії TCTP відбувається при різних патологіях, таких як канцерогенез, серцево-судинні, алергічні та імунні розлади (Bommer & Kawakami, 2021). Просторова структура TCTP є подібною до структури білків MSS4 та DSS4 – маленьких шаперонів, що зв'язуються з G-білками сімейства Rab (Thaw et al, 2001). Серед білків-партнерів, які взаємодіють з TCTP ми виявили білки апарату трансляції, зокрема eEF1A1 і eEF1B $\beta$ . Взаємодія між білками була підтверджена як ко-імунопреципітацією *in vivo*, так і зв'язуванням *in vitro* (pull-down). Функціональне значення асоціації TCTP та eEF1A1 ми досліджували шляхом моніторингу впливу TCTP на швидкість дисоціації [ $^3$ H]ГДФ з комплексу eEF1A1\* $^3$ H]ГДФ у присутності неміченого ГДФ (рис. 9). Ми прагнули визначити, чи TCTP переважно зв'язується з ГДФ-зв'язаною формою фактора (і зміщує рівновагу у бік утворення eEF1A1\*ГДФ), чи асоціюється з безнуклеотидною формою eEF1A1. При 150 мкМ концентрації неміченого ГДФ, дисоціація [ $^3$ H]ГДФ з eEF1A1 відбувалася за моноекспоненціальною кінетикою, з періодом напіврозпаду комплексу 12 хв і константою швидкості дисоціації  $k_{-1} = 1.40 \pm 0.06 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  (рис. 9a).

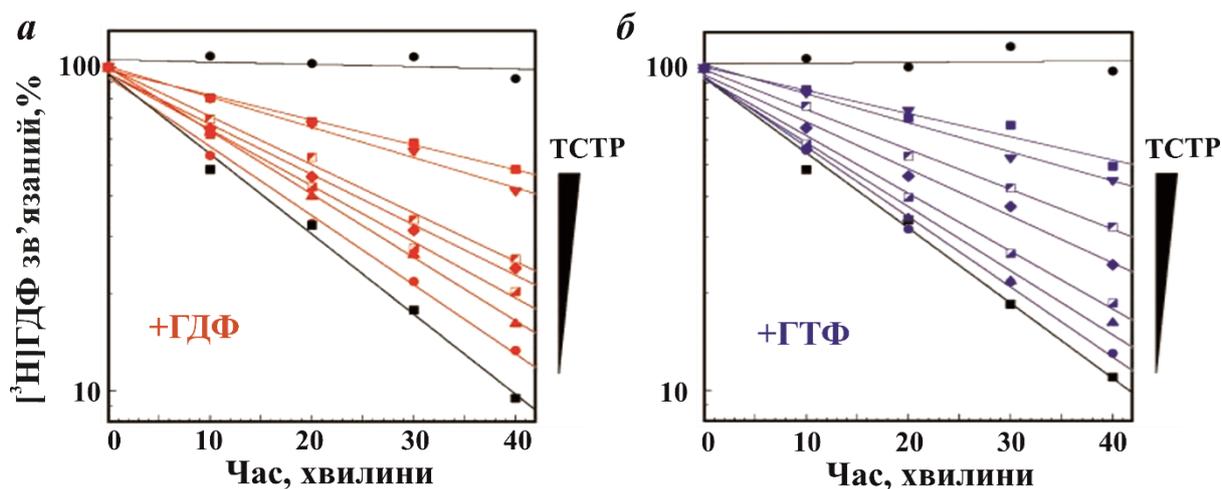


Рис. 9. Вплив TCTP на обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A1. Кінетику обміну проводили при 0°C. Інкубіційна суміш містила 350 нМ eEF1A1\* $^3$ H]ГДФ комплекс, 150 мкМ немічені ГДФ (a) або ГТФ (б) за відсутності TCTP (■) або зі збільшенням кількості TCTP (кінцеві концентрації 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 2 і 3 мкМ, які позначені червоними і синіми символами на (a) і (б), відповідно). За відсутності неміченого нуклеотиду комплекс eEF1A1\* $^3$ H]GDP (●) залишався стабільним протягом всього часу інкубації.

При додаванні ТСТР (від 0,2 до 3 мкМ) період напіврозпаду міченого комплексу збільшився до 39 хв і спостережна константа швидкості його дисоціації зменшилась до  $k_{\text{спос}} = 0.43 \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ . Аналогічний експеримент було проведено у присутності 150 мкМ ГДФ в реакційній суміші (рис. 9б). Визначені константи швидкості дисоціації становили  $k_{-1} = 1.30 \pm 0.07 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$  і  $k_{\text{спос}} = 0.40 \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ , які є близькими до значень, отриманих в присутності ГДФ. Отже, додавання ТСТР зменшує швидкість обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A1 і свідчить про переважне зв'язування ним саме eEF1A1\*ГДФ форми. Оскільки серед білків-партнерів ТСТР було виявлено також eEF1B $\beta$ , ми провели експеримент з метою визначення впливу ТСТР на реакцію eEF1B $\beta$ -опосередкованого [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ обміну на молекулі eEF1A1 (рис. 10).

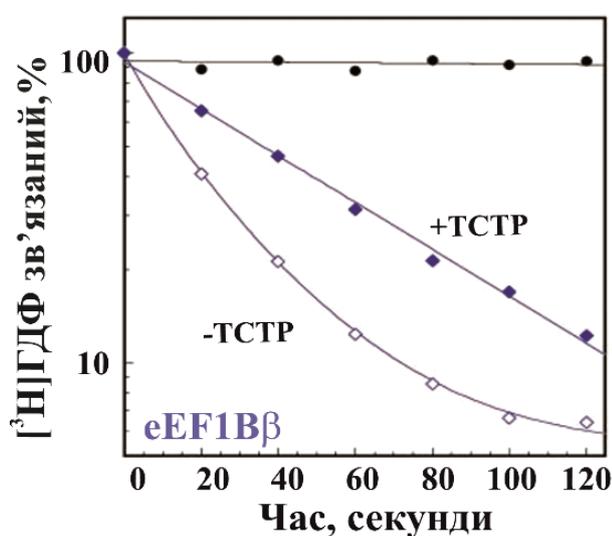


Рис. 10. ТСТР інгібує реакцію eEF1B $\beta$ -опосередкованого обміну гуанінового нуклеотиду на eEF1A1. Кінетику обміну проводили при 0°C. Інкубаційна суміш містила 350 нМ eEF1A1\* $^3\text{H}$ ]ГДФ комплекс, 150 мкМ немічений ГДФ, 50 нМ eEF1B $\beta$  за відсутності або у присутності 2 мкМ ТСТР. За відсутності неміченого нуклеотиду комплекс eEF1A1\* $^3\text{H}$ ]GDP (●) залишався стабільним протягом всього часу інкубації.

З отриманих даних можна зробити висновок, що ТСТР стабілізує eEF1A1\*ГДФ форму і конкурує з eEF1B $\beta$  за зв'язування з eEF1A1.

## Розділ 2. Структурна організація комплексу факторів елонгації трансляції eEF1B людини. Структурно-функціональна характеристика його субодиниць

### Особливості структурної організації і функціональної активності субодиниці eEF1Ba.

eEF1Ba є найменшою за розміром субодиницею мультибілкового комплексу факторів елонгації трансляції групи 1B, яка відповідає за обмін гуанінового нуклеотиду на молекулах eEF1A1/2. Очищений рекомбінантний eEF1Ba характеризували різними експериментальними методами, серед яких найбільш інформативними виявились швидкісна і рівноважна седиментація (Cole et al., 2008), а також воднево-дейтерієвий обмін з мас-спектрометричним аналізом (HDX-MS) (Oganesyan et al., 2018, Engen et al., 2009). За допомогою швидкісної седиментації ми встановили, що в препараті eEF1Ba є молекули одного типу, які мають коефіцієнт седиментації  $S_w = 0.93\text{S}$ . Враховуючи

оптимальне співвідношення коефіцієнтів тертя  $f/f_0=1.64$ , молекулярна маса eEF1Ba становила 25.5 кДа, що співпадає з теоретично розрахованою масою мономеру – 25.5 кДа. Співвідношення  $S_{\max}/S=1.6$  вказує на помірну видовженість молекули eEF1Ba. Рівноважна седиментація, яка дозволяє визначити молекулярну масу білка, незважаючи на форму його молекули, підтвердила результат швидкісної седиментації. Згідно цього методу, молекулярна маса eEF1Ba склала  $26.3 \pm 2.6$  кДа. Отже, в розчині субодиниця eEF1Ba є мономерним білком помірно видовженої форми.

В складі eEF1Ba вирізняють два структурних домени (N- і С-кінцевий) з'єднаних між собою лінкером і CAR регіоном (рис. 11a).

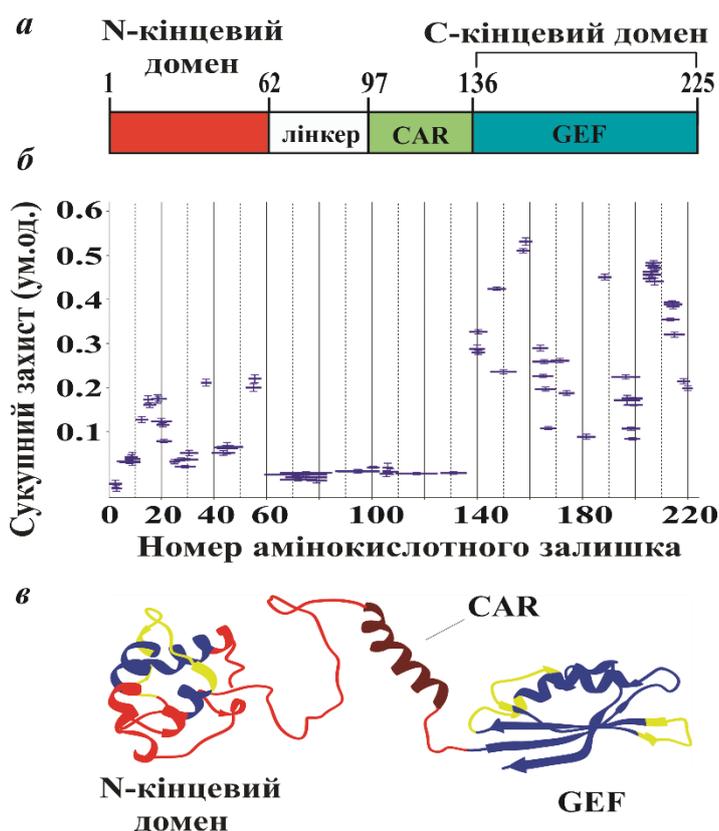
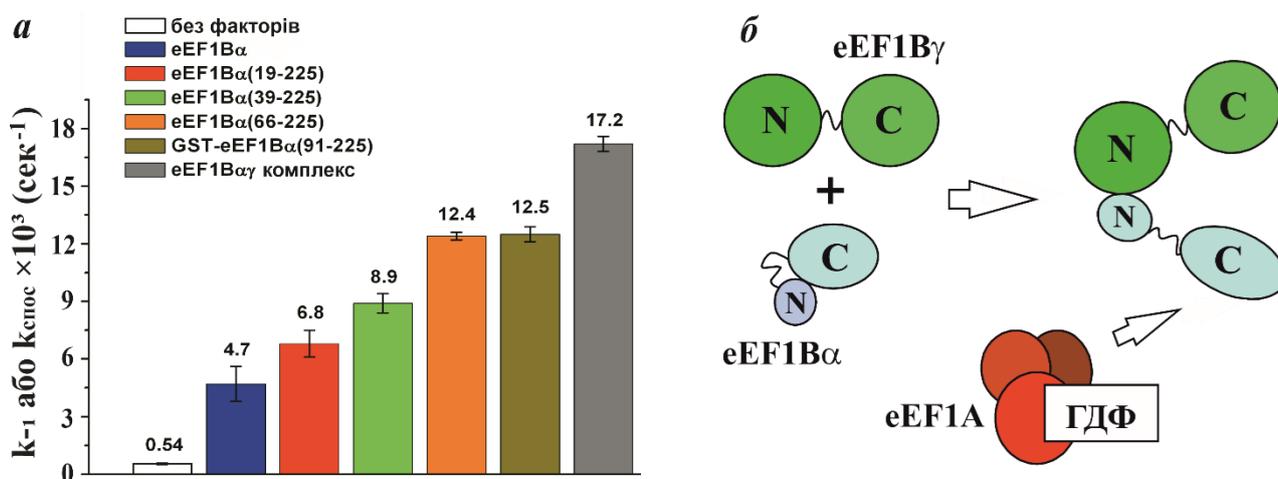


Рис. 11. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в eEF1Ba людини і модель його просторової організації. (а) схема доменної організації eEF1Ba. (б) Результати HDX-MS для eEF1Ba. Значення сукупного захисту пептидів від включення дейтерію відповідно до амінокислотної послідовності білка. (в) Модель просторової організації eEF1Ba. Регіони білка зі значенням сукупного захисту більше 0,15 умовних одиниць позначені синім кольором, менше 0,05 умовних одиниць – червоним кольором, від 0,05 до 0,15 умовних одиниць – жовтим. Темно-червоним кольором відмічено домен CAR, який був змодельований як  $\alpha$ -спіраль.

Задля отримання більш детальної інформації стосовно структурної організації eEF1Ba ми застосували метод HDX-MS, який дає можливість встановити наявність ригідно-структурованих доменів і динамічних ділянок в білку (рис. 11б). Пептиди, які знаходяться на ділянці від 60-ї до 138-ї амінокислоти, не мали захисту від проникнення дейтерію, в той час як переважна частина пептидів GEF-домени виявили значний ступінь захисту (рис. 11б). N-кінцевий домен (ділянка 0-58) складається з пептидів всіх типів, тобто пептиди без захисту, із помірним і сильним захистом. Результати HDX-MS добре корелюють з структурною моделлю eEF1Ba (рис. 11в). Позначені синім ділянки  $\alpha$ -спіралей N-кінцевого домену,  $\alpha$ -спіралі і  $\beta$ -листок GEF-домени, які мають значення сукупного захисту вище 0.15 ум. од., є ригідно-структурованими і формують «корові» частини цих доменів. Неструктуровані петлі з прилеглими частинами  $\alpha$ -спіралей мають помірний (0.05 – 0.15 ум.од.) або відсутній (<0.05 ум.од.) захист, що свідчить про їх більш динамічні властивості (рис. 11б, в).

Таким чином, eEF1B $\alpha$  має в своєму складі два ригідно-структурованих домени (N-кінцевий та GEF), з'єднаних динамічними лінкером та CAR-доменом.

Відомо, що N-кінцевий домен eEF1B $\alpha$  взаємодіє з N-кінцевим доменом eEF1B $\gamma$  з утворенням стійкого комплексу між двома білками (*van Damme et al., 1991, Perez et al., 1998*). Ця взаємодія призводить до підвищення швидкості реакції обміну гуанінового нуклеотиду субодиницею eEF1B $\alpha$  (*Bec et al., 1994*). Це означає, що N-кінцевий домен eEF1B $\alpha$  якимось чином впливає на функцію його GEF-домену, але механізм такого впливу залишався незрозумілим. Щоб розв'язати це питання, ми створили лінійку вкорочених з N-кінця форм eEF1B $\alpha$ , перевірили їх в реакції обміну [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ на молекулі eEF1A2 і порівняли з активністю повнорозмірного білка (рис. 12a).



**Рис. 12. (а)** Порівняльна діаграма спостережних констант швидкості ( $k_{\text{кат}}$ ) реакції обміну [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ у присутності eEF1B $\alpha$ , його вкорочених форм і комплексу eEF1B $\alpha\gamma$  на факторі eEF1A2. Цифри над стовпчиками показують середні значення констант швидкості реакції, розраховані по чотирьох незалежних кінетичних експериментах, довірчими інтервалами позначено величини стандартного відхилення. **(б)** Схема впливу субодиниці eEF1B $\gamma$  на конформацію eEF1B $\alpha$ , що призводить до підвищення функціональної активності останнього. N- та C-кінцеві домени субодиниць позначені відповідними літерами.

Виявилось, що поступове вкорочення eEF1B $\alpha$  з N-кінця приводить до збільшення швидкості [ $^3\text{H}$ ]ГДФ/ГДФ обміну на факторі eEF1A2. Повне видалення N-кінцевого домену eEF1B $\alpha$  має подібний ефект на реакцію, як і формування комплексу eEF1B $\alpha\gamma$ . Окрім цього, за допомогою гелелектрофорезу в нативних умовах ми показали, що C-кінцевий фрагмент eEF1B $\alpha$ , а саме eEF1B $\alpha$ (66-225), має більшу спорідненість до eEF1A2, ніж повнорозмірна субодиниця. Це дало нам змогу запропонувати механізм підсилюючої дії eEF1B $\gamma$  на активність eEF1B $\alpha$ : при формуванні комплексу eEF1B $\alpha\gamma$  N- та C-кінцеві домени eEF1B $\alpha$  змінюють своє положення у просторі так, що відкривається більш вільний доступ до взаємодії останнього з фактором eEF1A (рис. 12б).

### Особливості структурної організації субодиниці eEF1B $\beta$

#### Визначення структурної організації N-кінцевого домену субодиниці eEF1B $\beta$

Відомо, що N-кінцевий домен eEF1B $\beta$  бере участь у білок-білкових взаємодіях в комплексі eEF1B (Mansilla *et al.*, 2002), але його структура, зокрема фрагменту з амінокислотними залишками 1-77, довгий час залишалась невідомою. Аналіз рекомбінантного eEF1B $\beta$ (1-77) виявив, що молекулярна маса, оцінена методом гель-фільтрації, становить 20 кДа, тоді як результати рівноважної седиментації показали, що цей білок є мономером, з масою  $9.13 \pm 0.4$  кДа, що відповідає теоретично розрахованому значенню (9.5 кДа). Це свідчить про те, що N-кінцевий домен eEF1B $\beta$ , скоріш за все, має розгорнуту просторову організацію.

Вторинну структуру eEF1B $\beta$ (1-77) ми визначили за допомогою методу кругового дихроїзму в діапазоні температур від 24 до 55°C (рис. 13а). Аналіз КД спектру, записаного при 24°C, за допомогою програми CDNN показав, що 78% послідовності eEF1B $\beta$ (1-77) складається з  $\alpha$ -спіральної ділянок, тоді як інша частина є неструктурованою. Поступове підвищення температури до 55°C плавно зменшує (загалом до 10%) вміст  $\alpha$ -спіралей і, відповідно, збільшує вміст неструктурованих ділянок. За допомогою I-TASSER Suite (Yang *et al.*, 2015) ми створили кілька моделей N-кінцевого домену eEF1B $\beta$ , три найкращі з яких представлені на рис. 13б. Всі моделі відповідали результатам КД щодо вмісту  $\alpha$ -спіралей та неструктурованих ділянок, і відрізнялись між собою лише їх просторовою орієнтацією.

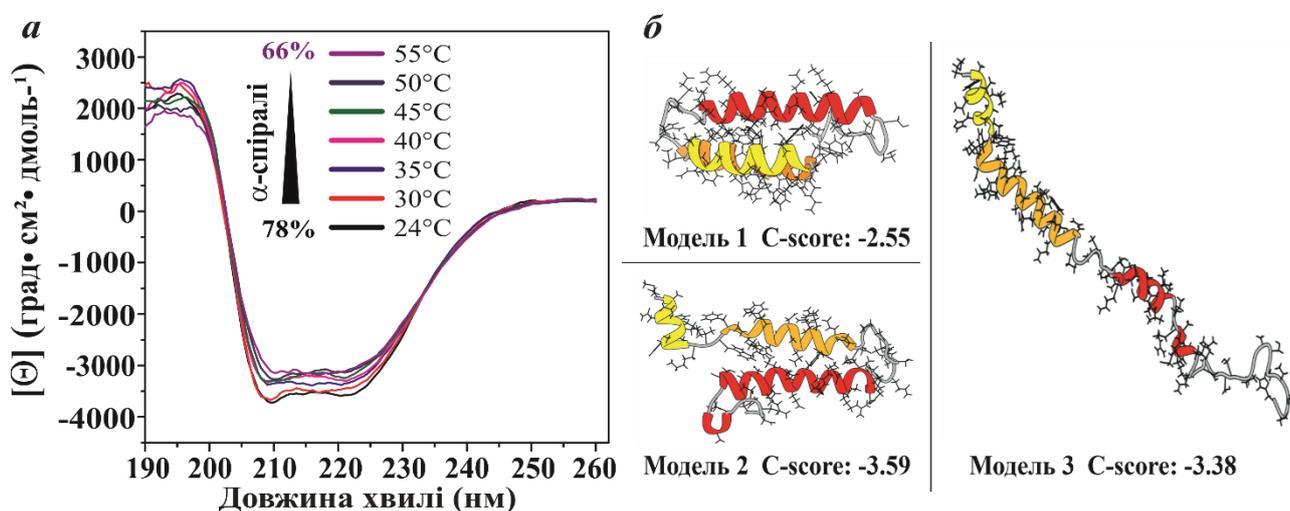


Рис. 13. (а) Спектри кругового дихроїзму eEF1B $\beta$ (1-77) записані при різних температурах і представлені у вигляді графіку залежності середньої еліптичності на один амінокислотний залишок  $[\Theta]$  від довжини хвилі. (б) Моделі структурної організації домену eEF1B $\beta$ (1-77), створені за допомогою I-TASSER. Бічні ланцюги амінокислот зображено у вигляді структурних радикалів. Критерій якості моделі C-score I-TASSER вказаний на рисунку.

Застосування HDX-MS для N-кінцевого домену eEF1B $\beta$  показало повну відсутність захисту від проникнення дейтерію, що підтверджує відсутність

ригідно-структурованих ділянок і динамічну просторову організацію елементів його вторинної структури. Отже, всі моделі eEF1B $\beta$ (1-77) можуть відповідати дійсності, але для моделювання просторової структури повнорозмірного eEF1B $\beta$  була обрана Модель 1 з найкращим довірчим критерієм C-score.

*Встановлення структурної організації повнорозмірного білка eEF1B $\beta$ .* Субодиниця eEF1B $\beta$  є другим білком в комплексі eEF1B, який має здатність обмінювати гуаніновий нуклеотид на молекулах eEF1A1/2. За допомогою швидкісної седиментації ми визначили коефіцієнт седиментації  $S_w=1.84\pm 0.04S$ , співвідношення  $f/f_0=1.97\pm 0.07$  і молекулярну масу цього білка, яка становила  $92\pm 4$  кДа. Це значення є близьким до теоретичної маси тримера eEF1B $\beta$  –  $95.7$  кДа. Важливо, що розраховане співвідношення коефіцієнтів  $S_{max}/S$  склало  $2.02\pm 0.04$ , що є характерним для сильно витягнутих білків. Молекулярна маса eEF1B $\beta$ , оцінена методом рівноважної седиментації, склала  $97.6\pm 2.4$  кДа, що узгоджується з результатом швидкісної седиментації. Таким чином, ми з'ясували, що рекомбінантний eEF1B $\beta$  в розчині є стабільним тримером сильно видовженої форми. В складі eEF1B $\beta$  вирізняють два основних структурних домени: N-кінцевий і GEF-домен, між яким знаходяться мотив типу «лейцинова застібка» (LZ-мотив), лінкерний регіон і CAR-домен (рис. 14a).

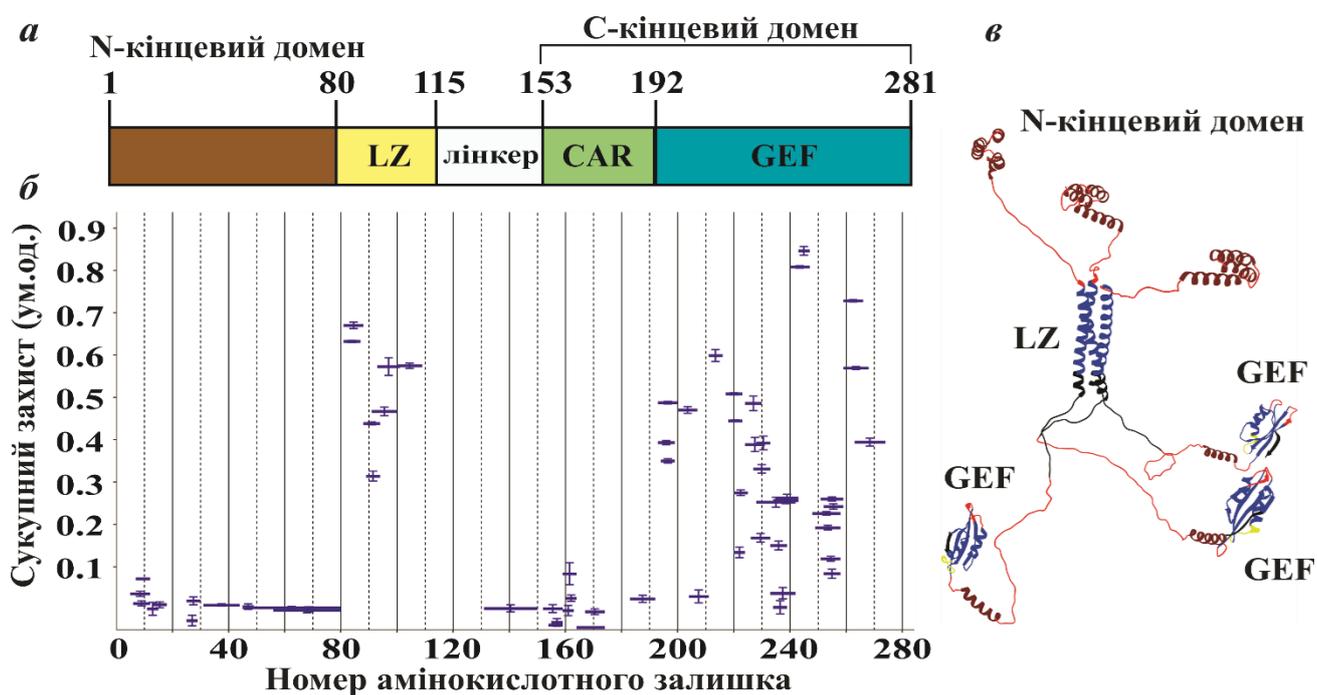


Рис. 14. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в eEF1B $\beta$  людини і модель його просторової організації. (а) схема доменної організації eEF1B $\beta$ . (б) Результати HDX-MS для eEF1B $\beta$ . Значення сукупного захисту пептидів від включення дейтерію відповідно до амінокислотної послідовності білка. (в) Модель просторової організації тримеру eEF1B $\beta$ . Регіони білка зі значенням сукупного захисту більше 0,15 умовних одиниць позначені синім кольором, менше 0,05 умовних одиниць - червоним кольором, від 0,05 до 0,15 умовних одиниць – жовтим. Темно-червоним кольором відмічено домен CAR, який був змодельований як  $\alpha$ -спіраль.

HDX-MS аналіз очищеного рекомбінантного eEF1B $\beta$  дозволив визначити ригідно-структуровані регіони в цьому білку, пептиди яких мають високий ступінь захисту від включення дейтерію (рис. 14б). Це зокрема, LZ-мотив (амінокислотні залишки 81-110) і GEF-домен (амінокислотні залишки 200-280). Інші ділянки, а саме пептиди N-кінцевого домену (амінокислотні залишки 1-80), лінкерної області та CAR-домену (амінокислотні залишки 131-181) мають близьке до нульового значення захисту (рис. 14б), що вказує на їх динамічні властивості. Раніше ми встановили, що саме LZ-мотив відповідає за тримеризацію eEF1B $\beta$  (Trosiuk et al, 2016). Структурну модель тримерного LZ-мотиву ми створили за допомогою CCBUILDER 2.0 (Wood ma Woolfson, 2018), а структурну модель N-кінцевого домену eEF1B $\beta$  було описано вище. Для моделювання мономеру eEF1B $\beta$  використовували програму Modeller, а сервер SymmDock – для симетричного моделювання тримеру цього білка. Найкращу модель тримеру eEF1B $\beta$  представлено на рис. 14в. Результати HDX-MS добре узгоджуються з представленою моделлю (рис. 14б, в). Ригідно-структуровані ділянки (суперспіраль LZ-мотиву і GEF-домен), позначені синім кольором, мають значення сукупного захисту вище 0.15 ум. Інші пептиди eEF1B $\beta$  мають помірний захист (0.05 – 0.15 ум.од.) або взагалі не захищені (<0.05 ум.од.) від включення дейтерію і належать або до лінкерних регіонів, або до динамічних  $\alpha$ -спіральних ділянок (N-кінцевий, CAR-домен). Отже, поєднання експериментального та біоінформатичного підходів дозволило нам вперше створити просторову модель eEF1B $\beta$ , в якій три його мономери з'єднуються в стійкий тример за рахунок мотиву «лейцинова застібка». Загальна форма тримера eEF1B $\beta$  є видовженою, його N- та C-кінцеві частини, завдяки довгим лінкерним регіонам, можуть бути орієнтованими в просторі довільним чином.

### **Особливості структурної організації субодиниці eEF1B $\gamma$ .**

eEF1B $\gamma$  є субодиницею eEF1B комплексу, яка, як вважається на цей час, виконує лише структурну функцію, взаємодіючи з eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\beta$  (Andersen et al., 2003, Le Sourd et al., 2006). За допомогою седиментаційного аналізу рекомбінантного eEF1B $\gamma$  ми встановили, що цей білок має схильність до утворення димерів, а потім і мультимерів, в залежності від його концентрації.

eEF1B $\gamma$  складається з двох структурних доменів (N- і C-кінцевого), які з'єднані між собою довгим лінкерним регіоном (Рис. 15а). HDX-MS аналіз eEF1B $\gamma$  (Рис. 15б) показав, що більшість пептидів, що входять до складу цих доменів, мають високі значення захисту від включення дейтерію. Це означає, що N- і C-кінцевий домени є ригідно-структурованими. На відміну, лінкерний регіон (амінокислотні залишки 210-300) eEF1B $\gamma$  має близький до нульового захист і, таким чином, проявляє динамічні властивості.

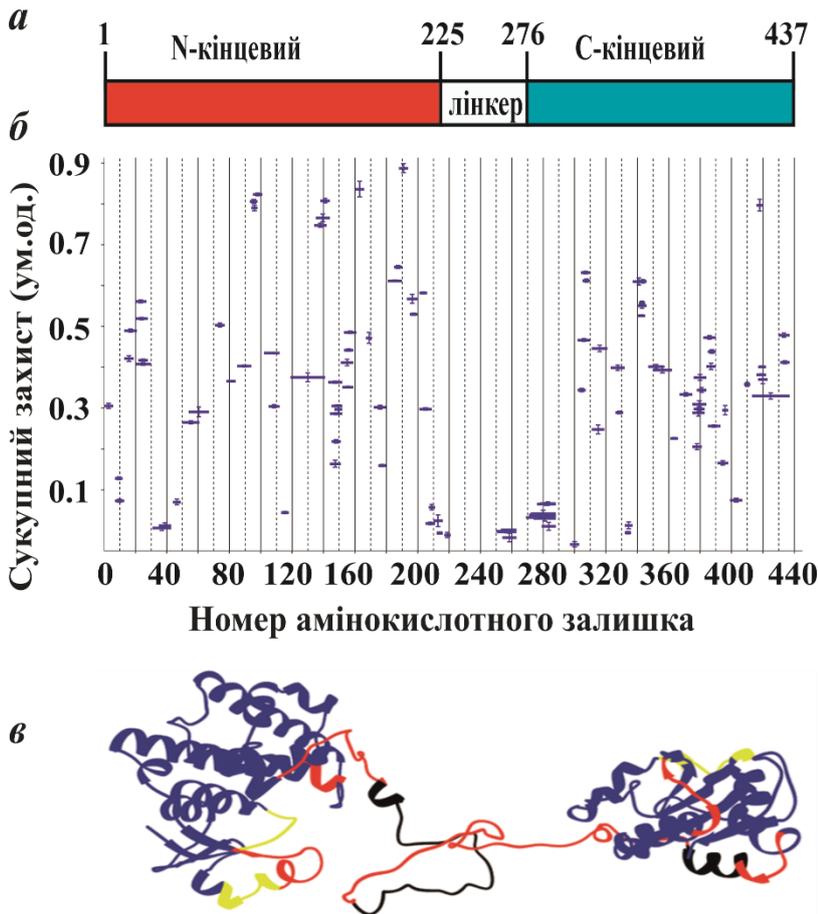


Рис. 15. Визначення динамічних і ригідно-структурованих ділянок в eEF1B $\gamma$  людини і модель його просторової організації. (а) схема доменної організації eEF1B $\gamma$ . (б) Результати HDX-MS для eEF1B $\gamma$ . Значення сукупного захисту пептидів від включення дейтерію відповідно до амінокислотної послідовності білка. (в) Модель просторової організації eEF1B $\gamma$ . Регіони білка зі значенням сукупного захисту більше 0.15 умовних одиниць позначені синім кольором, менше 0.05 умовних одиниць – червоним кольором, від 0.05 до 0.15 умовних одиниць – жовтим.

Просторова модель повнорозмірного eEF1B $\gamma$  (рис. 15в) добре узгоджується з даними HDX-MS аналізу (рис. 15б). N- і C-кінцеві домени були змодельовані у вигляді компактних глобул, а лінкерний регіон – як довга неструктурована ділянка.

#### **Встановлення четвиртинної організації комплексу eEF1B людини.**

Для точного картування сайтів взаємодії між субодинами комплексу eEF1B ми також застосували метод HDX-MS. Спочатку обраховували значення захисту пептидів від включення дейтерію для кожної субодинами окремо, а потім для них же у складі подвійних eEF1B $\alpha\gamma$  і eEF1B $\beta\gamma$  чи потрійного eEF1B $\alpha\beta\gamma$  комплексів. За різницею цих значень розраховували диференційний сукупний захист для всіх пептидів кожної з субодинами (рис. 16). При утворенні комплексу eEF1B $\alpha\gamma$  для більшості пептидів N-кінцевого домену eEF1B $\alpha$  ми спостерігали зростання значень сукупного захисту, що свідчить про збільшення структурної жорсткості всього N-кінцевого домену цього білка при зв'язуванні з eEF1B $\gamma$  (рис. 16а). В свою чергу, лише вузькі ділянки субодинами eEF1B $\gamma$  (амінокислотні залишки 144-161 та 170-190) виявились більш захищеними від включення дейтерію при взаємодії з eEF1B $\alpha$  (рис. 16в). Отже, ми визначили зони контакту між двома білками на їх N-кінцевих доменах, тоді як інші ділянки обох білків не показали змін швидкості воднево-дейтерієвого обміну (рис. 16а, в).

При утворенні комплексу eEF1B $\beta$  $\gamma$  лише короткі пептиди, що охоплюють амінокислотні залишки 11-29 eEF1B $\beta$  (рис. 16б), показали збільшення диференційного сукупного захисту. Вони належать до другої  $\alpha$ -спіралі N-кінцевого домену eEF1B $\beta$ .

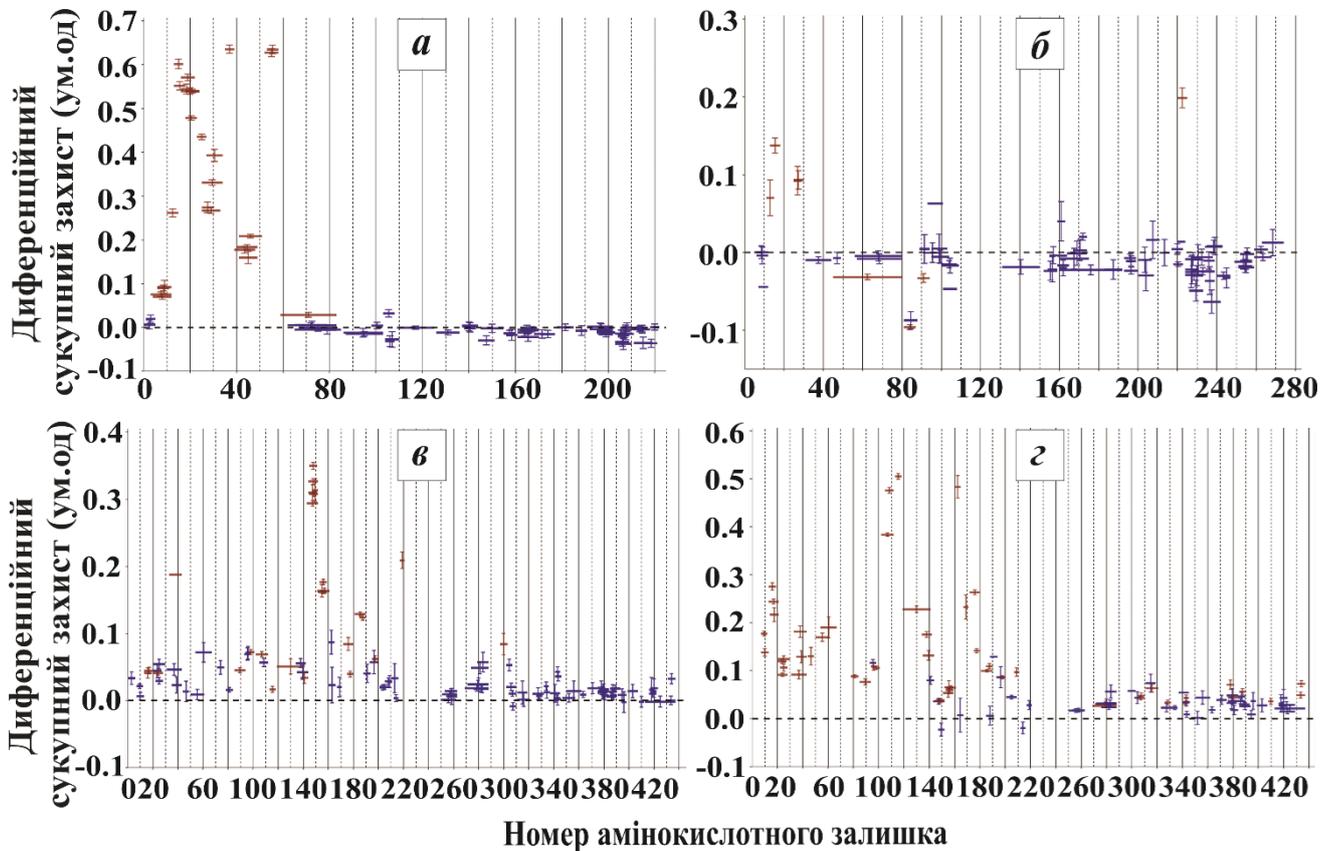


Рис. 16. Визначення ділянок eEF1Ba (a) і eEF1B $\beta$  (б), які зміцнюють свій захист від включення дейтерію при взаємодії з eEF1B $\gamma$ , а також визначення ділянок eEF1B $\gamma$ , які зміцнюють свій захист при взаємодії з eEF1Ba (в) і eEF1B $\beta$  (г). На графіках коричневим кольором позначені пептиди, які змінили значення диференційного сукупного захисту при утворенні комплексу з партнером. Синім позначено пептиди, диференційний сукупний захист яких залишився без суттєвих змін.

В свою чергу eEF1B $\beta$  при утворенні комплексу з eEF1B $\gamma$  викликає підвищення диференційного сукупного захисту більшості пептидів N-кінцевого домену останнього (амінокислотні залишки 7-190), за виключенням згаданої вище ділянки, яка відповідає за взаємодію з eEF1Ba. Отже, майже увесь N-кінцевий домен eEF1B $\gamma$  зазнає збільшення структурної жорсткості при взаємодії з eEF1B $\beta$  (рис. 16г). На основі різних експериментальних підходів і з використанням алгоритмів для білок-білкового докінгу ми створили просторову модель три-гетеро-тримерного комплексу eEF1B( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub>, представлена на рис. 17.

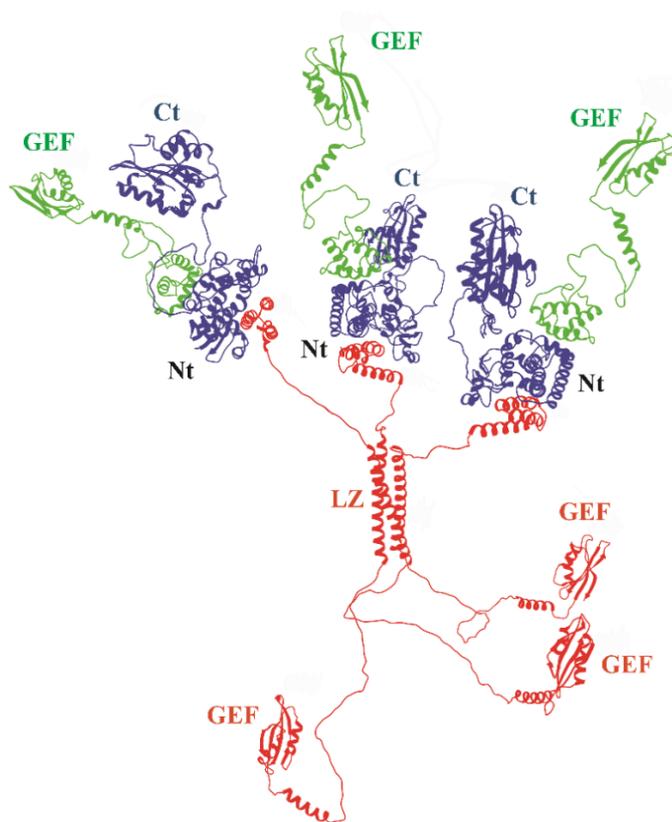


Рис. 17. Четвертинна організація комплексу  $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$ . Субодиноця  $eEF1B\alpha$  зображена зеленим,  $eEF1B\beta$  - червоним, а  $eEF1B\gamma$  - синім кольоом. GEF - домен обміну гуанінового нуклеотиду, Nt та Ct - відповідне позначення N- і C-кінцевих доменів, LZ - мотив типу «лейцинова застібка».

Всі білки комплексу  $eEF1B$  мають в своєму складі як глобулярні домени, так і довгі неструктуровані ділянки, що робить цей комплекс загалом некомпактним. Структурну роль в ньому виконують дві субодиноці, зокрема  $eEF1B\gamma$ , яка взаємодіє з  $eEF1B\alpha$  і  $eEF1B\beta$ , а також  $eEF1B\beta$ , яка робить цей

комплекс три-гетретримерним. Як видно з рис. 17, у складі комплексу присутні шість GEF-доменів, які відповідають за обмін гуанінового нуклеотиду на молекулі  $eEF1A$ . За допомогою гель-електрофорезу в нативних умовах ми перевірили стехіометрію взаємодії  $eEF1A2$  з комплексом  $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$  і встановили, що одна молекула комплексу може утримувати до шести молекул  $eEF1A2$ . Це значення відповідає кількості GEF-доменів в його структурі (рис. 18).

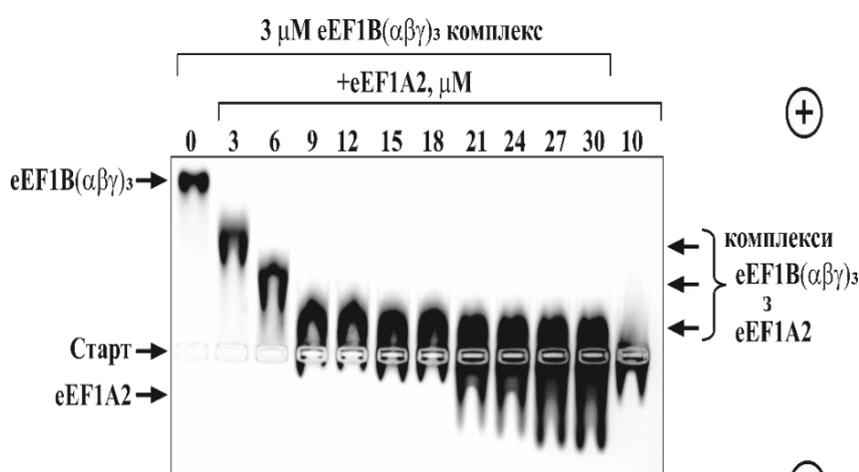


Рис. 18. Взаємодія комплексу  $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$  з  $eEF1A2$ .

Електрофореграма розділення білкових комплексів утворених при змішуванні  $eEF1B(\alpha\beta\gamma)_3$  з вказаними концентраціями  $eEF1A2$ . Після інкубації суміш білків розділяли за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі за нативних умов. Білки фарбували за допомогою Кумасі.

### Розділ 3. Дуалізм p43: тРНК-зв'язувальний білок макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз і прекурсор цитокін-подібних білків. Мітохондріальна локалізація довгої ізоформи білка p43

*p43 – тРНК-зв'язувальний білок аміноацил-тРНК синтетазного комплексу, який взаємодіє з аргініл-тРНК синтетазою, однак не впливає на її каталітичну активність.*

Аргініл-тРНК синтетаза (ArgRS) є одним з дев'яти ферментів комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, який також містить три додаткові білки p43, p38 і p18 (Khan et al., 2020). Відомо, що С-кінцевий домен білка p43 має властивість зв'язувати тРНК різної специфічності (Quevillon et al., 1997). Раніше також було показано, що рекомбінантний p43 утворює комплекс з ArgRS (Robinson et al., 2000). Це дало підстави висунути припущення, що p43 може модулювати каталітичну активність ArgRS (Park et al., 1999). Перш за все, за допомогою методу імунопреципітації ми перевірили яка ділянка білка p43 безпосередньо взаємодіє з цим ферментом і встановили, що цю роль виконує його N-кінцевий домен, тоді як його С-кінцевий тРНК-зв'язувальний домен не бере участі у взаємодії. Наступним завданням було визначити наскільки утворення комплексу між p43 і ArgRS може вплинути на тРНК-зв'язувальну здатність останньої. Як свідчить рис. 19, ArgRS має відносно слабку спорідненість до тРНК<sup>Arg</sup> ( $K_{D(\text{спос})} = 4 \text{ мкМ}$ ), тоді як рекомбінантний білок p43 має значно вищу спорідненість ( $K_{D(\text{спос})} = 0.5 \text{ мкМ}$ ). Результатом змішування двох білків є утворення комплексу між ними, але це призводить лише до незначного зменшення спостережної константи  $K_{D(\text{спос})} = 0.2 \text{ мкМ}$ .

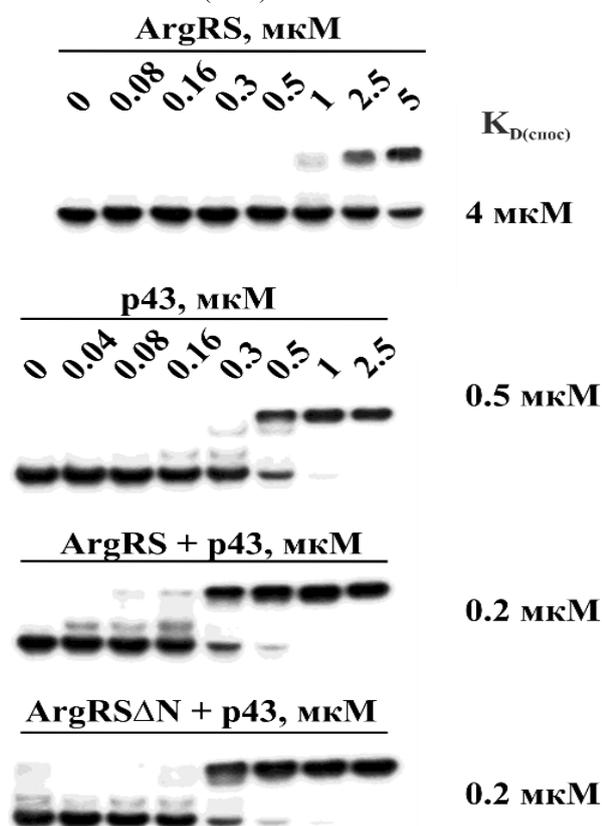


Рис. 19. Утворення комплексу ArgRS-p43 не впливає значною мірою на зв'язування тРНК<sup>Arg</sup>. [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Arg</sup> інкубували з ArgRS (0,08-5 мкМ), p43 (0,04-2,5 мкМ, або з сумішшю ArgRS + p43 та ArgRS $\Delta$ N + p43 (0,04-2,5 мкМ кожного білка). Після електрофорезу у 6% нативному поліакриламідному гелі (4°C) положення міченої тРНК візуалізували за допомогою авторадіографії. Значення  $K_{D(\text{спос})}$  вказані праворуч.

Подібні значення  $K_{D(\text{спос})}$  було отримано при змішуванні p43 і вкороченої форми ArgRS $\Delta$ N, коли комплекс між білками не утворюється (рис. 19). Отже, утворення комплексу ArgRS-p43 не призводить до синергічного ефекту, тобто до

значущого збільшення афінності комплексу до тРНК<sup>Arg</sup> в порівнянні з білком р43. Ми також перевірили, чи зможе вплинути ArgRS на здатність білка р43 зв'язувати тРНК іншої специфічності і встановили, що при використанні міченої тРНК<sup>Met</sup> її афінність до білка р43 залишалась без значних змін у присутності як ArgRS так і ArgRSΔN.

Зрештою, для оцінки впливу р43 на каталітичну активність ArgRS ми використовували комплекс аміноацил-тРНК синтетаз, оброблений каспазою 7, яка не діє на ArgRS, але відщеплює від білка р43 його С-кінцевий домен, відповідальний за зв'язування з тРНК (Shalak et al., 2001). Каталітичні параметри, визначені як в реакції АТФ-РРі обміну так і в реакції аміноацилювання тРНК, для ArgRS в складі нативного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз і комплексу, обробленого каспазою 7, достовірно не відрізнялися (табл. 1).

Таблиця 1.

**Порівняння каталітичних констант аргініл-тРНК синтетази в інтактному мульти-аміноацил-тРНК синтетезному комплексі і комплексі, обробленому каспазою 7.**

	Тип реакції з тРНК <sup>Arg</sup>	
	АТФ-пірофосфатний обмін	аміноацилювання тРНК <sup>Arg</sup>
	ArgRS в інтактному комплексі	
$K_M$ (μM)	0.006 ± 0.001	0.20 ± 0.02
$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	1.1 ± 0.2	0.16 ± 0.03
$k_{cat}/K_M$ (с <sup>-1</sup> *μM <sup>-1</sup> )	183	0.8
	ArgRS у комплексі, обробленому каспазою 7	
$K_M$ (μM)	0.008 ± 0.002	0.20 ± 0.02
$k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )	1.4 ± 0.2	0.13 ± 0.03
$k_{cat}/K_M$ (с <sup>-1</sup> *μM <sup>-1</sup> )	175	0.65

***С-кінцевий домен білка р43 вивільняється із макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз під дією каспази 7 і є ідентичним до ЕМАРІІ.***

Endothelial monocyte activating polypeptide II (EMAPII) – це білок, виділений з периферійної області фібросаркоми мишей, який мав масу 18 кДа і властивості прозапального цитокіну, зокрема був здатним активувати моноцити і ендотеліальні клітини (Cao et al., 1992, 1994). При більш детальному дослідженні виявилось, що амінокислотна послідовність ЕМАРІІ є ідентичною С-кінцевому домену білка р43, який входить до складу макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз (Quevillon et al., 1997). Також, з'явилися дані про те, що ЕМАРІІ може утворюватися шляхом протеолізу його білка-попередника в клітинах, які увійшли у фазу апоптозу (Knies et al., 1998). До специфічних протеаз, які активуються в клітині під час апоптозу, відносяться каспази (McIlwain et al., 2013). Ми протестували кілька рекомбінантних каспаз на їх здатність розщеплювати білок р43 у комплексі аміноацил-тРНК синтетаз. Як видно з рис. 20 каспаза 7 ефективно розщеплює р43 в складі комплексу, тоді як

її специфічний інгібітор Z-DEVD-CMK (benzyloxycarbonyl-Asp-Glu-Val-Asp-chloromethyl ketone) запобігає такому розщепленню (рис. 20а і б).

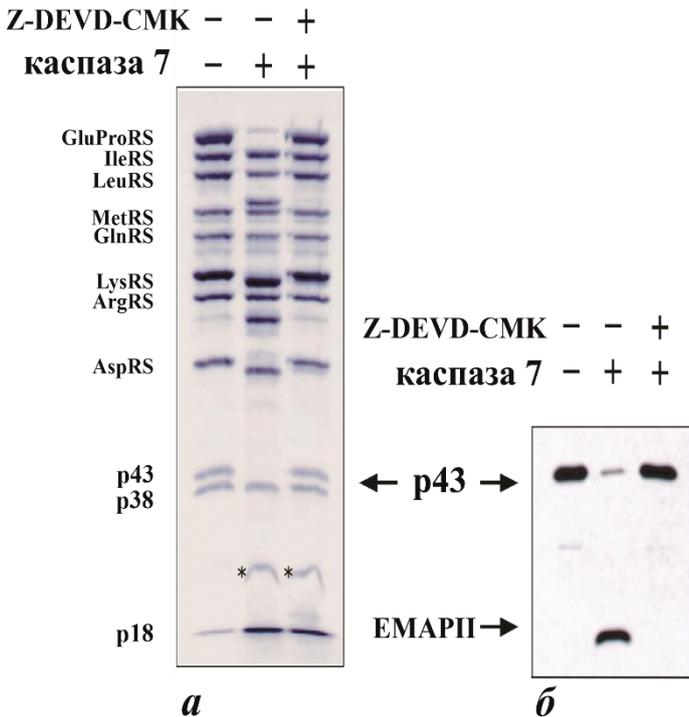


Рис. 20. р43 компонент макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз є субстратом для каспази 7. Електрофореграма комплексу (1,5 мкг) після обробки каспазою 7 (50 одиниць) у відсутності і присутності її інгібітора Z-DEVD-CMK (0,1 мкМ). Після інкубації протягом 90 хв при 37°C зразки аналізували за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах, фарбування Кумасі (а) і вестерн-блоту з використанням антитіл, специфічних до С-кінцевого домену білка р43 (б). Поліпептид, позначений зірочкою, відповідає субодиниці каспази 7 (а).

Один з продуктів розщеплення р43 розпізнається антитілами проти С-кінцевого домену і відповідає орієнтовній масі ЕМАРІІ (18 кДа). Гель-фільтрація обробленого каспазою 7 комплексу аміноацил-тРНК синтетаз показала, що С-кінцевий домен білка р43 вивільняється з комплексу і знаходиться у фракції вільних білків, тоді як N-кінцевий домен залишається у складі комплексу. Ми визначили сайт розщеплення білка р43 каспазою 7, який є характерним для цього типу протеаз: ...ASTD↓SKPIDA... Отже, послідовність С-кінцевого фрагменту р43 починається з SKPIDA... і точно збігається з N-кінцевою послідовністю цитокіну ЕМАРІІ, виділеного з периферійної області фібросаркоми мишей (Kao *et al.*, 1992). Так як р43 є тРНК-зв'язувальним білком, ми дослідили, як розщеплення каспазою 7 вплинуло на цю здатність (рис. 21).

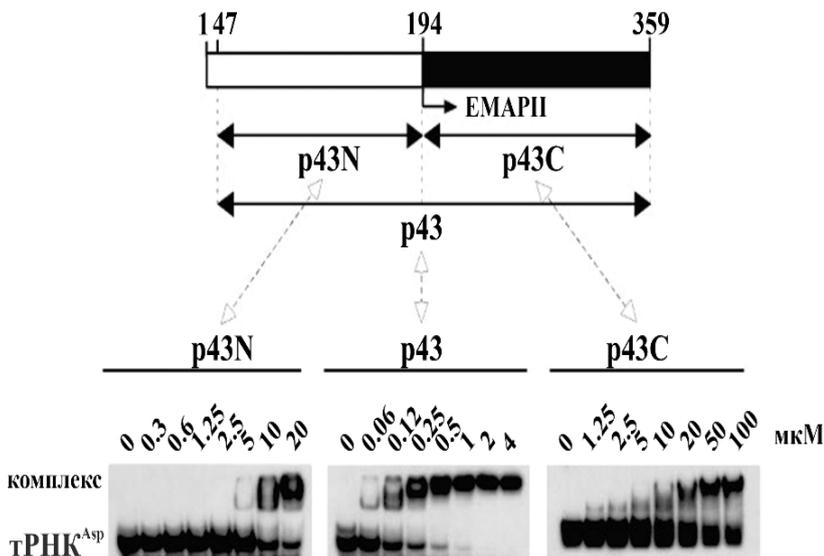


Рис. 21. Розщеплення білка р43 каспазою 7 призводить до втрати його спорідненості до тРНК. [<sup>32</sup>P]тРНК<sup>Asp</sup> інкубували з білком р43 або з його очищеними N- (р43N) чи С-кінцевим (р43С) доменом у вказаних концентраціях. Після електрофорезу у 6% нативному поліакриламідному гелі (4°C) положення міченої тРНК візуалізували за допомогою авторадіографії.

$K_{D(\text{спос})}$  комплексу p43 з міченою тРНК становила 0,2 мкМ. На відміну, його p43N і p43C домени утворювали більш лабільні комплекси з тРНК і їх спостережні  $K_{D(\text{спос})}$  дорівнювали 7.5 мкМ і 40 мкМ, відповідно (рис. 21). Отже, розщеплення p43 каспазою 7 призводить до руйнації сайту зв'язування тРНК на цьому білку.

Цитокінову активність ЕМАРІІ оцінювали за його спроможністю стимулювати міграцію моноцитів людини (рис. 22). Хемотаксис моноцитів спостерігався вже при концентрації 0.01 нг/мл і досягав максимуму при 1 нг/мл.

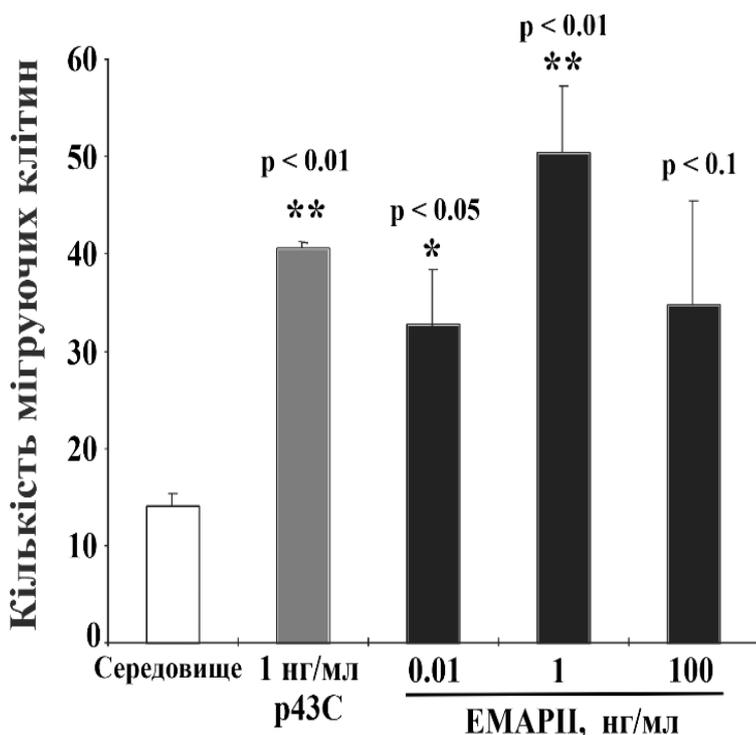


Рис. 22. ЕМАРІІ викликає хемотаксис моноцитів. Моноцити периферійної крові додавали у верхній відсік модифікованої камери Бойдена. Зразки ЕМАРІІ, отриманого з комплексу після розщеплення каспазою 7 (ЕМАРІІ), або рекомбінантного С-кінцевого домену p43 (p43C) додавали в нижні відсіки камери і інкубували протягом 1 год при 37°C, після чого мігруючі клітини забарвлювали та рахували. Результати показують середнє значення  $\pm$  стандартна похибка для трьох незалежних експериментів. Статистичну значущість результатів оцінювали

за допомогою непарного t-критерію Ст'юдента.

Отриманий результат є подібним до описаної раніше активності ЕМАРІІ, очищеного з оточення пухлинної тканини (Kao et al., 1992).

**Характеристика p43(ARF) – протеолітичного фрагменту білка p43, який утворюється в процесі апоптозу клітин в культурі.**

Дослідження протеолітичного розщеплення білка p43 продовжили на клітинних лініях за умов індукції апоптозу. Відомо, що промоноцити людини лінії U937 зазнають апоптозу під час інкубації у середовищі без сироватки (Wright et al., 1992). Клітини U937 інкубували у безсироватковому середовищі і через певні проміжки часу готували зразки клітинних екстрактів і інкубаційного середовища для наступного вестерн-блот аналізу. Як представлено на рис. 23, після 52 годин інкубації як в клітинних екстрактах, так і в середовищі спостерігається поява фрагмента масою 22-24 кДа, який розпізнається антитілами, специфічними до С-кінцевого фрагменту білка p43 (рис. 23a і б). Початок фрагментації ДНК на нуклеосоми і розщеплення ферменту PARP (полі(АДФ-рибозо) полімерази) – двох характерних ознак розвитку апоптозу –

також спостерігався через 52 годин після вилучення сироватки з клітинного середовища (рис. 23*в* і *г*).

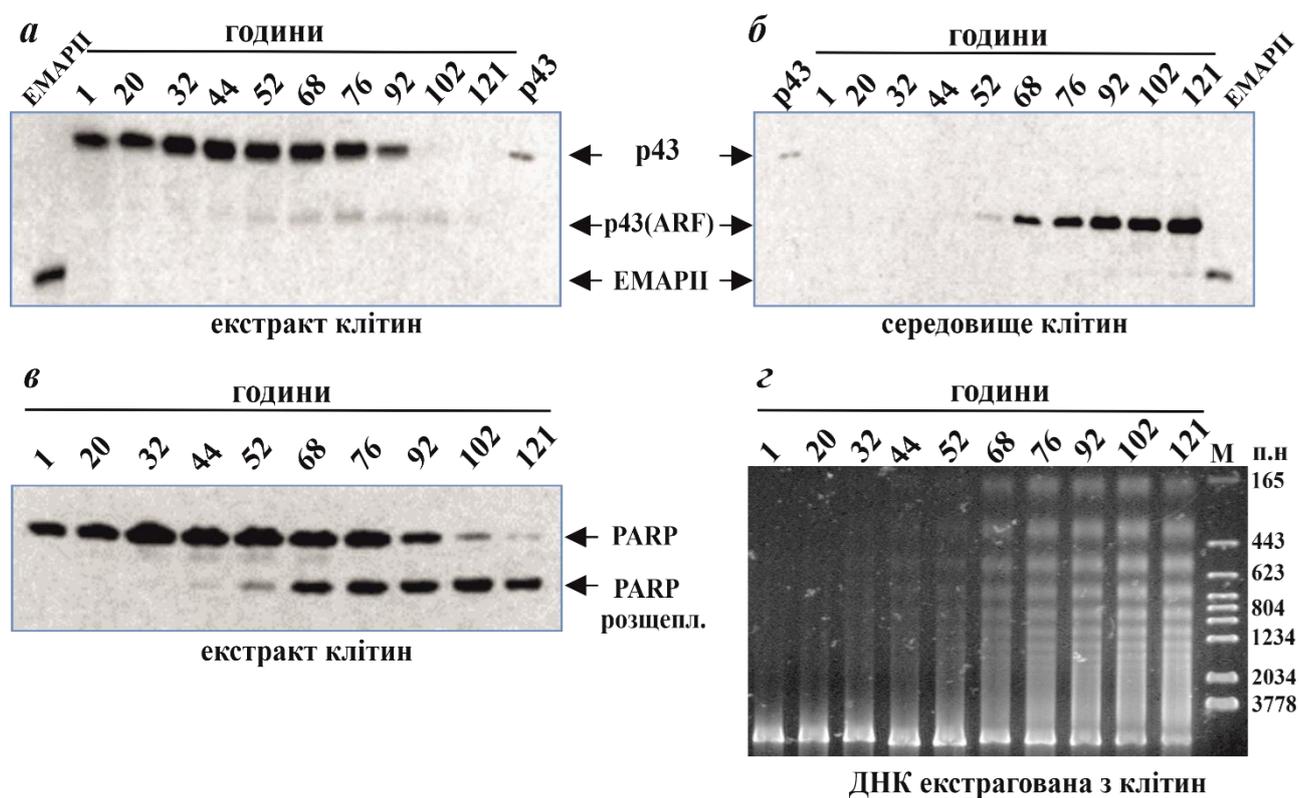


Рис. 23. Кінетика розвитку апоптозу в клітинах U937 на середовищі без сироватки. Зразки екстрактів клітин (*а*) та інкубаційного середовища (*б*) аналізували методом вестерн-блоту з антитілами проти р43С. Як маркери використовували рекомбінантні р43 та EMAPII. За розщепленням PARP (113 кДа) з утворенням 89 кДа фрагменту в екстрактах клітин спостерігали за допомогою вестерн-блоту застосовуючи антитіла проти PARP (*в*). Фрагментацію ДНК в клітинах U937 аналізували методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, фарбування бромідом етидію (*г*).

Однак, фрагмент р43, який утворювався під час апоптозу клітин U937, не відповідав за розміром EMAPII (18 кДа) (рис. 23*а* і *б*). Визначення N-кінцевої послідовності (SGTK...) цього протеолітичного фрагменту дало змогу встановити новий сайт розщеплення р43 (... TTVS↓SGTK...), який не відповідав жодному з відомих сайтів, які використовують каспази. Пізніше іншою лабораторією було показано, що кальпаїн-1 розщеплює білок р43 в цьому місці (Hui-Yan Lei et al., 2015). Отже, довжина нового протеолітичного фрагменту була на 40 амінокислотних залишків більшою, ніж у EMAPII, і його розрахована молекулярна маса становила 22,5 кДа. Ми назвали цей фрагмент р43(ARF) від "apoptosis released factor". Очищений рекомбінантний р43(ARF) був здатен утворювати стабільний комплекс з міченою тРНК із  $K_{D(\text{спос})} = 6 \text{ нМ}$  (рис. 24), яка є значно меншою за константи, визначені для повнорозмірного р43 і EMAPII (див. вище).

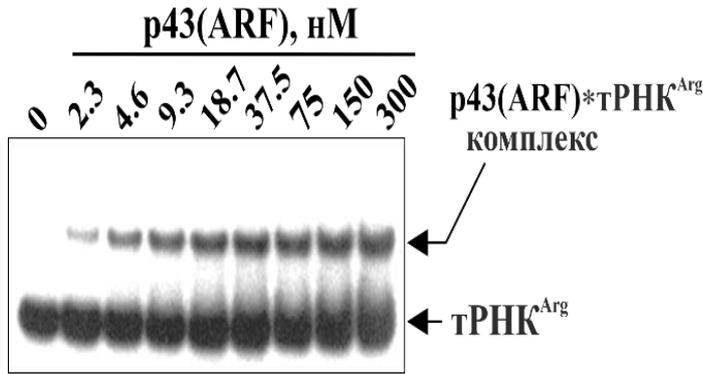


Рис. 24. Утворення комплексу між р43(ARF) і тРНК. Мічену  $[^{32}\text{P}]\text{тРНК}^{\text{Arg}}$  інкубували з білком у вказаних концентраціях. Після електрофорезу у 6% нативному поліакриламідному гелі ( $4^\circ\text{C}$ ) положення міченої тРНК візуалізували за допомогою авторадіографії. Спостережене значення  $K_D$  вираховували з графіку залежності концентрації зв'язаної з білком тРНК від концентрації р43(ARF).

Цитокинову активність р43(ARF) визначали по індукції синтезу Е-електину в клітинах HUVEC, який є одним із маркерів запального процесу (*Delomenie et al., 1993*). Для порівняння, індукцію синтезу Е-селектину також визначали в присутності р43 і ЕМАРІІ (рис. 25).

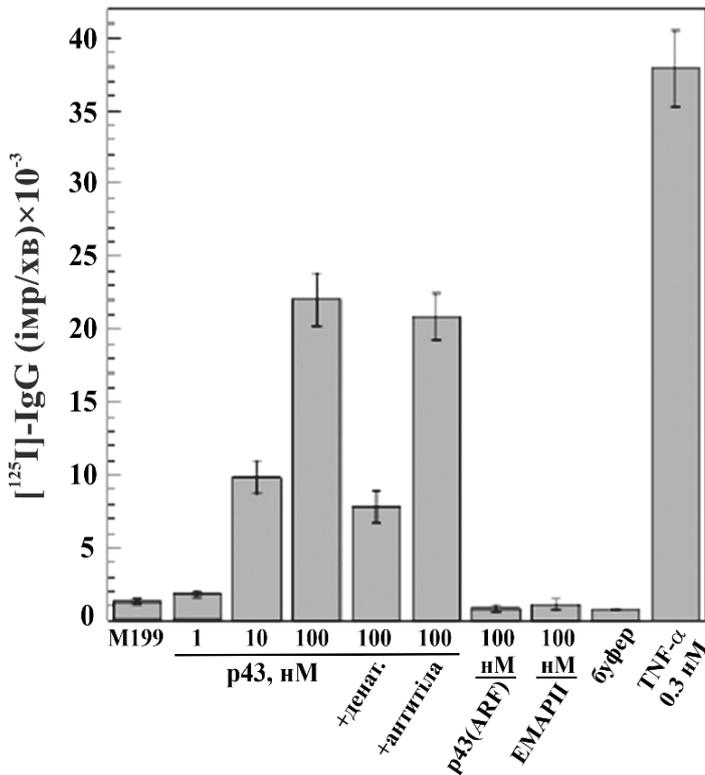


Рис. 25. Індукція експресії Е-селектину в клітинах HUVEC у присутності рекомбінантних р43, р43(ARF) та ЕМАРІІ. Синтез молекул Е-селектину контролювали за допомогою двоетапного радіоімунного аналізу. Спершу проводили інкубацію з вказаними кількостями різних білків, потім клітини промивали та інкубували з радіоактивно міченими антитілами. Денатовану форму р43 отримували нагріванням при  $100^\circ\text{C}$ , 10 хв (+денат). Також р43 обробляли анти-р43 антитілами 1 год при  $25^\circ\text{C}$  і додавали до клітин (+антитіла). Як негативний контроль використовували середовище без добавок (M199) і середовище, яке містить буфер для розведення білків (буфер). Позитивним контролем

активації HUVEC був фактор некрозу пухлин (TNF- $1\alpha$ ). Кожен вимір виконували в п'яти повторах; результати вказані як середнє значення  $\pm$  стандартна похибка.

Додавання зростаючих концентрацій р43 до клітинного середовища призводило до збільшення експресії Е-селектину, в той час як обробка клітин HUVEC 100 нМ р43(ARF) або ЕМАРІІ не мала ефекту (рис. 25). Якщо р43 піддавали нагріванню ( $100^\circ\text{C}$ , 10 хв) перед інкубацією, то експресія Е-селектину зменшувалася більш ніж в два рази. Попередня інкубація р43 з антитілами проти р43 мала лише незначний ефект (рис. 25). Отже, лише повнорозмірний білок р43 активував ендотеліальні клітини, тоді як його протеолітичні фрагменти

p43(ARF) і ЕМАРІІ не виявили такої здатності. Повнорозмірний p43 знаходиться в складі мультисинтезазного комплексу і може опинитися назовні клітини в разі її пошкодження чи некрозу і, таким чином, взяти участь у розвитку запальної реакції. Розщеплення p43 на два фрагменти в процесі апоптозу призводить до втрати його активності як прозапального цитокіну.

### **Відкриття мітохондріальної локалізації довгої ізоформи білка p43.**

мРНК, яка кодує білок p43, представлена в базі даних NCBI під номером NM\_001142416.2. В послідовності цієї мРНК містяться два потенційних стартових кодони AUG в одній рамці зчитування, які розташовані на відстані 27 нуклеотидів один від одного. Відомо, що білок p43, який входить до аміноацил-тРНК синтезазного комплексу, синтезується з другого AUG кодону (рис. 26, верхня панель) і має в своєму складі 312 амінокислот (p43M10). До початку цієї роботи жодних експериментальних даних, які б демонстрували функціональність першого AUG кодону в якості стартового, представлено не було. Для визначення внутрішньоклітинної локалізації довгої ізоформи білка p43, яка синтезується з першого AUG кодону, ми створили конструкцію, що дозволяє синтезувати білок p43M1 злитим з зеленим флуоресцентним білком GFP в клітинах людини. Трансфіковані цією конструкцією клітини аналізували з використанням конфокальної мікроскопії (рис. 26).

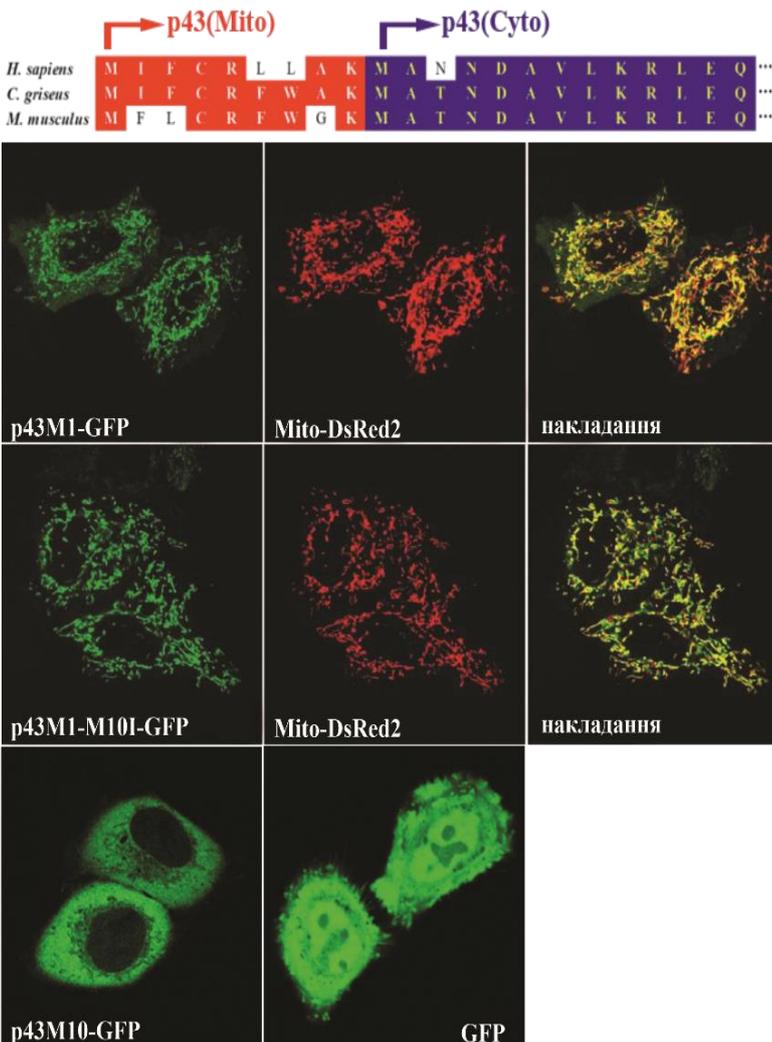


Рис. 26. Колокалізація довгої ізоформи p43(M1)-GFP з мітохондріями і цитоплазматична локалізація p43(M10)-GFP.

Клітини HeLa-ST були котрансфіковані плазмідами pEGFP-N1/p43(M1), pEGFP-N1/p43(M10) і pEGFP-N1/p43(M1-M10I), в якій провели заміну кодону метіоніну на кодон ізолейцину (M10I), а також плазмідом pDsRed2-Mito, яка експресує мітохондріальний білковий маркер. Внутрішньоклітинну локалізацію GFP-злитих білків і вільного GFP визначали за допомогою методу конфокальної мікроскопії. При колокалізації зеленого сигналу GFP і червоного DsRed2 утворюється жовтий колір. На верхній панелі представлено порівняння фрагментів амінокислотних послідовностей білка p43 людини, китайського хом'ячка і миші.

Як видно з рис. 26, зелений сигнал GFP-p43M1 в клітинах HeLa добре перкривається з червоним сигналом мітохондріального маркера (панель “накладання”, жовтий колір), тоді як для p43M10-GFP характерна рівномірна дифузна локалізація в цитоплазмі з виключенням із ядра. Заміна 10 метіоніну на ізолейцин (M10I) шляхом сайт-спрямованого мутагенезу покращує якість колокалізації химерного мутантного білка з мітохондріями, знижуючи фоновий зелений колір в клітинах (рис. 26). Отже, трансляційний продукт, який синтезується на мРНК білка p43 з першого AUG кодону, має мітохондріальну локалізацію в клітинах HeLa.

Щоб переконатися, що білок p43 знаходиться не на поверхні, а безпосередньо в матриксі мітохондрій, ми перевірили його вміст в очищеній мітохондріальній фракції (рис. 27). Маркером мітохондріальної фракції був цитохром *c*, цитоплазматичної – аспартіл-тРНК синтетаза (рис. 27а). Відносну кількість цитоплазматичного та мітохондріального варіантів p43 визначали за допомогою вестерн-блоту (рис. 27а). Інтенсивність сигналів оцінювали кількісно і встановили, що вміст мітохондріальної ізоформи p43 становить близько 2% від загальної кількості цього білка в клітині. Невелика кількість цієї ізоформи в клітинах корелює з слабким Козак контекстом її стартового кодону в мРНК, а саме ...cgcUucAUGA..., тоді як контекст другого стартового кодону є сильним ...gcaAaaAUGG..., що має забезпечувати більш ефективну ініціацію на ньому.

Інкубація ізольованих мітохондрій у присутності трипсину не вплинула на вміст білка p43 в них (рис. 27б). Тоді як надлишок екзогенно доданого рекомбінантного p43 повністю деградував після інкубації в присутності трипсину (рис. 27б). Ці результати підтверджують висновок про внутрішньо-мітохондріальну локалізацію довгої ізоформи білка p43.

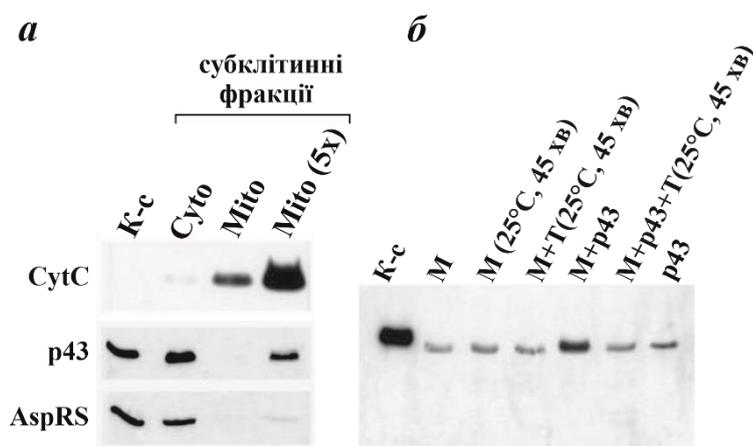


Рис. 27. Білок p43 в очищених мітохондріях. (а) Цитоплазматична (Cyto) або мітохондріальна (Mito) фракції, отримані після субклітинного фракціонування екстракту клітин U937, аналізували методом вестерн-блоту з використанням антитіл проти p43, AspRS (як маркер цитоплазми) або проти цитохрому *c* (CytC) в якості маркеру мітохондрій. Доріжки Cyto та Mito містили еквівалентну кількість вихідного екстракту клітин U937. Доріжка Mito(5x) містила 5-кратний надлишок фракції Mito. (б) Мітохондрії (M), очищені з клітин U937, інкубували при 25°C протягом 45 хв за відсутності або у присутності трипсину (M+T) з концентрацією 0,1 мг/мл, а також за відсутності або у присутності очищеного рекомбінантного білка p43 з концентрацією 1 мкг/мл (M+p43) і у присутності трипсину (M+p43+T). Зразки аналізували методом вестерн-блоту з антитілами проти p43. Очищений комплекс аміноацил-тРНК синтетази (К-с) та рекомбінантний білок p43 (p43) використовували як контроль.

та Mito містили еквівалентну кількість вихідного екстракту клітин U937. Доріжка Mito(5x) містила 5-кратний надлишок фракції Mito. (б) Мітохондрії (M), очищені з клітин U937, інкубували при 25°C протягом 45 хв за відсутності або у присутності трипсину (M+T) з концентрацією 0,1 мг/мл, а також за відсутності або у присутності очищеного рекомбінантного білка p43 з концентрацією 1 мкг/мл (M+p43) і у присутності трипсину (M+p43+T). Зразки аналізували методом вестерн-блоту з антитілами проти p43. Очищений комплекс аміноацил-тРНК синтетази (К-с) та рекомбінантний білок p43 (p43) використовували як контроль.

Отже, ми встановили, що перший AUG кодон в матричній РНК білка р43 є функціональним стартовим кодоном і ініціація трансляції на ньому призводить до утворення довшої на 9 амінокислот ізоформи, яка транспортується в мітохондрії. Так як цитоплазматичний р43 проявляє тРНК-зв'язувальні властивості, логічно припустити, що і його довга ізоформа також буде мати таку здатність. В цьому випадку роль довгої ізоформи білка р43 може полягати в транспортуванні молекул тРНК до мітохондрій. Не виключено також, що р43М1 може утворювати комплекс з однією або кількома аміноацил-тРНК синтетазами в мітохондріях і виконувати роль їх кофактора, знову ж таки як тРНК-зв'язувальний білок. Однак, всі ці припущення потребують подальшого експериментального підтвердження.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі встановлено просторову організацію факторів елонгації трансляції, які утворюють мультибілковий комплекс eEF1H, зокрема eEF1A2 (кристалічна структура), eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$  та їх тригетеротримерний комплекс eEF1B( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub> (у розчині). Також визначені важливі функціональні особливості цих факторів і білка р43 комплексу аміноацил-тРНК синтетаз, як пов'язані, так і не пов'язані із білковим синтезом. Отримані дані є значним фундаментальним внеском у розуміння структурної організації і функціонування дорибосомного етапу елонгації трансляції у ссавців.

1. За допомогою метода малокутового розсіювання нейтронів встановлено, що фактор елонгації eEF1A1 в ГДФ-зв'язаній формі має видовжену конформацію в розчині. Його радіус гірації становить  $5.2 \pm 0.2$  нм, що в два рази більше, ніж радіус гірації бактеріального і дріжджового аналогів.
2. Отримано кристалографічну структуру фактора елонгації трансляції eEF1A2 в комплексі з ГДФ. Показано, що цей білок має тридоменну будову і, на відміну від eEF1A1, близьку до сферичної просторову конформацію з розрахованим радіусом гірації 2.44 нм. Встановлено, що іони  $Mg^{2+}$  не впливають на реакцію обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A2, що контрастує з бактеріальним фактором елонгації трансляції.
3. Показано, що eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній формі може утворювати неканонічний потрійний комплекс з деацильованою тРНК і четвертинний комплекс з тРНК і фенілаланіл-тРНК синтетазою, а також збільшує початкову швидкість реакції, яку каталізує метіоніл-тРНК синтетаза.
4. Встановлено, що трансляційно-контрольований білок пухлин (ТСТР) взаємодіє з факторами eEF1A1 і eEF1B $\beta$ . Зв'язування ТСТР з цими білками призводить до зниження швидкості реакції як спонтанного, так і eEF1B $\beta$ -опосередкованого обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A1.

5. Встановлено структурну організацію трансляційних факторів eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ . Показано, що всі білки мають в своєму складі як компактно згорнуті структурні домени, так і довгі неструктуровані ділянки. eEF1B $\alpha$  є мономерним білком, eEF1B $\beta$  утворює гомотример сильно видовженої форми, тоді як eEF1B $\gamma$ , в залежності від концентрації, може утворювати димери і мультимери більш високого порядку. Розкрито механізм стимуляції активності eEF1B $\alpha$  субодиницею eEF1B $\gamma$ : взаємодія N-кінцевих доменів eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\gamma$  усуває аутоінгібіторний ефект N-кінцевого домену eEF1B $\alpha$ , який частково перешкоджає взаємодії eEF1A з GEF-доменом.
6. Визначено сайти взаємодії між субодиницями eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\gamma$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , які знаходяться на N-кінцевих ділянках цих білків. Встановлено, що структурний мотив «лейцинова застібка» відповідає за тримеризацію eEF1B $\beta$ , а також всього комплексу eEF1B, який, відповідно, має структурну організацію типу ( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub>. Показано, що eEF1B( $\alpha\beta\gamma$ )<sub>3</sub> здатен зв'язувати до шести молекул eEF1A2, відповідно до кількості GEF-доменів в ньому.
7. Встановлено, що N-кінцевий домен білка p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз взаємодіє з аргініл-тРНК синтетазою. Показано, що p43 не впливає на каталітичні параметри аргініл-тРНК синтетази і не збільшує її спорідненість до відповідної тРНК. Отже, білок p43 не є кофактором для цього ферменту.
8. Доведено, що інкубація макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з каспазою 7 *in vitro* призводить до розщеплення його p43 компоненту на два фрагменти. Його C-кінцевий фрагмент, який вивільняється з комплексу, є ідентичним ЕМАРІІ і здатен викликати хемотаксис моноцитів. Розщеплення p43 призводить до втрати його тРНК-зв'язувальної властивості.
9. Вперше виявлено, що індукція апоптозу в клітинах U937 призводить до появи і вивільнення з клітин іншого ніж ЕМАРІІ протеолітичного фрагменту білка p43. Цей фрагмент, названий p43(ARF), має найвищу афінність до тРНК в порівнянні з повнорозмірним p43 і ЕМАРІІ. Встановлено, що повнорозмірний p43 викликає активацію ендотеліальних клітин, тоді як p43(ARF) і ЕМАРІІ не мають такого ефекту. Це свідчить на користь ролі білка p43 в якості прозапального цитокіну.
10. Вперше ідентифіковано новий трансляційний продукт гена, який кодує білок p43. Цей продукт має мітохондріальну локалізацію завдяки 9 додатковим N-кінцевим амінокислотним залишкам, і його вміст становить приблизно 2% від загальної кількості p43 в клітині.

## ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**Статті** (фахові видання, віднесені до першого і другого кuartилів (Q1 і Q2) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports):

1. Budkevich TV, Timchenko AA, Tiktopulo EI, Negrutskii BS, **Shalak VF**, Petrushenko ZM, Aksenov VL, Willumeit R, Kohlbrecher J, Serdyuk IN, El'skaya AV. (2002). Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution. *Biochemistry*. 41(51):15342-9. doi:10.1021/bi026495h. (Дисертантом особисто проведено очищення препаративних кількостей фактора елонгації трансляції eEF1A1 і визначено його функціональну активність in vitro різними тестами).
2. Срепін Т, **Shalak VF**, Yaremchuk AD, Vlasenko DO, McCarthy A, Negrutskii BS, Tukalo MA, El'skaya AV. (2014). Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 42(20):12939-48. doi:10.1093/nar/gku974. (Дисертантом особисто проведено частину експериментальних досліджень, зокрема підготовку білка до кристалізації, експерименти по обміну гуанінового нуклеотиду, аналіз та інтерпретування отриманих результатів та їх підготовку до публікації).
3. Petrushenko ZM, Budkevich TV, **Shalak VF**, Negrutskii BS, El'skaya AV. (2002). Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1A\*GDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling. *Eur J Biochem*. 269(19):4811-8. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03178.x. (Дисертантом особисто проведено очищення препаративних кількостей фактора елонгації трансляції eEF1A1 і фенілаланіл-тРНК синтетази і визначено їх функціональну активність in vitro).
4. Kaminska M, **Shalak V**, Mirande M. (2001). The appended C-domain of human methionyl-tRNA synthetase has a tRNA-sequestering function. *Biochemistry*. 40(47):14309-16. doi:10.1021/bi015670b. (Дисертантом особисто отримано високо очищений препарат фактора елонгації трансляції eEF1A1 проведено серію експериментів по взаємодії цього білка з метіоніл-тРНК синтетазою).
5. Cans C, Passer BJ, **Shalak V**, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N, Allanic D, Tufino R, Argentini M, Moras D, Fiucci G, Goud B, Mirande M, Amson R, Telerman A. (2003). Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(24):13892-7. doi:10.1073/pnas.2335950100. (Дисертантом особисто проведено частину експериментальних досліджень, зокрема експерименти по обміну гуанінового нуклеотиду, білок-білкові взаємодії (pull-down) аналіз та імуноблотинг, інтерпретування отриманих результатів та їх підготовку до публікації).

6. Troisiuk TV, **Shalak VF**, Szczepanowski RH, Negrutskii BS, El'skaya AV. (2016). A non-catalytic N-terminal domain negatively influences the nucleotide exchange activity of translation elongation factor 1Ba. *FEBS J.* 283(3):484-97. doi:10.1111/febs.13599. (Дисертант керував виконанням загального обсягу експериментальних досліджень, а також особисто виконав частину експериментальної роботи, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, оформлення статті).
7. Bondarchuk TV, Lozhko DM, **Shalak VF**, Fatalska A, Szczepanowski RH, Dadlez M, Negrutskii BS, El'skaya AV. (2019). The protein-binding N-terminal domain of human translation elongation factor 1B $\beta$  possesses a dynamic  $\alpha$ -helical structural organization. *Int J Biol Macromol.* 126:899-907. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.220 (Дисертант керував виконанням загального обсягу експериментальних досліджень, а також особисто виконав частину експериментальної роботи, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, оформлення статті).
8. Bondarchuk TV, **Shalak VF**, Lozhko DM, Fatalska A, Szczepanowski RH, Liudkovska V, Tsuvariev OY, Dadlez M, El'skaya AV, Negrutskii BS. (2022). Quaternary organization of the human eEF1B complex reveals unique multi-GEF domain assembly. *Nucleic Acids Res.* 50(16):9490-9504. doi: 10.1093/nar/gkac685. (Дисертант керував виконанням загального обсягу експериментальних досліджень, а також особисто виконав частину експериментальної роботи, аналіз та інтерпретування отриманих результатів, оформлення статті).
9. Guigou L, **Shalak V**, Mirande M. (2004). The tRNA-interacting factor p43 associates with mammalian arginyl-tRNA synthetase but does not modify its tRNA aminoacylation properties. *Biochemistry.* 43(15):4592-600. doi:10.1021/bi036150e. (Дисертантом особисто проведено частину експериментальних досліджень, зокрема, очищення ферментів і вимірювання їх каталітичних характеристик, аналіз та інтерпретування отриманих результатів).
10. **Shalak V**, Kaminska M, Mitnacht-Kraus R, Vandenabeele P, Clauss M, Mirande M. (2001). The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem.* 276(26):23769-76. doi:10.1074/jbc. (Дисертантом особисто проведено основні експериментальні дослідження з мультисинтетазним комплексом мишей, рекомбінантним білком p43 мишей і людини, аналіз результатів та їх підготовку до публікації).
11. **Shalak V**, Guigou L, Kaminska M, Wautier MP, Wautier JL, Mirande M. (2007). Characterization of p43(ARF), a derivative of the p43 component of multiaminoacyl-tRNA synthetase complex released during apoptosis. *J Biol Chem.* 282(15):10935-43. doi:10.1074/jbc.M611737200 (Дисертантом особисто проведено основну частину експериментальних досліджень, зокрема всю роботу з культурами клітин, імуноблотинг, взаємодію білків з тРНК, активацію ендотеліальних клітин, аналіз та інтерпретування отриманих результатів та їх підготовку до публікації).

12. **Shalakh V**, Kaminska M, Mirande M. (2009). Translation initiation from two in-frame AUGs generates mitochondrial and cytoplasmic forms of the p43 component of the multisynthetase complex. *Biochemistry*. 48(42):9959-68. doi:10.1021/bi901236g (*Дисертантом особисто проведено більшу частину експериментальних досліджень, зокрема створення ДНК конструкцій, трансфекцію клітин і конфокальну мікроскопію, субклітинне фракціонування, аналіз та інтерпретування отриманих результатів та їх підготовку до публікації*).

### Тези доповідей на конференціях:

1. **V. Shalakh**, J.C. Robinson, P. Vandenabeele and M. Mirande. The p43 component of the multisynthetase complex is a precursor of the EMAP II cytokine. 18<sup>th</sup> International tRNA Workshop - "tRNA 2000". 2000. April 8-12. Queen's College, Cambridge, UK. *Публікація тез, постерна доповідь*.
2. M. Kaminska, **V. Shalakh**, J.C. Robinson, P. Kerjan and M. Mirande. From protein synthesis to apoptosis. The p43 component of the multisynthetase complex: a molecular switch. 18<sup>th</sup> International tRNA Workshop - "tRNA 2000". 2000. April 8-12, Queen's College, Cambridge, UK. *Публікація тез, усна доповідь*.
3. M. Kaminska, **V. Shalakh** and M. Mirande. Human methionyl-tRNA synthetase is a processive enzyme. Asilomar Conference on Aminoacyl-tRNA synthetases in Biology, Medicine & Evolution. 2002. January 13-18. Pacific Grove, CA, USA. *Публікація тез, постерна доповідь*.
4. M. Kaminska, M. Francin, **V. Shalakh** and M. Mirande. Role of the general RNA-binding domains appended to mammalian aminoacyl-tRNA synthetases. 19<sup>th</sup> International tRNA Workshop. 2002. April 6-1. Shanghai, China. *Публікація тез, усна доповідь*.
5. **Vyacheslav Shalakh**, Ludovic Guigou and Marc Mirande. The p43 subunit of the multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex: structure and function. 20<sup>th</sup> International tRNA Workshop. 2003. October 2-7. Banz, Germany. *Публікація тез, постерна доповідь*.
6. **V. Shalakh**, M.-P. Golinelli-Cohen, Ludovic Guigou and Marc Mirande. La machinerie traductionnelle et l'apoptose: fonction duale d'un cofacteur des aminoacyl-tRNA synthetases. 5<sup>ème</sup> Rencontre sifARN "ARN, le nouveau monde". 2004. Octobre 10 -13. Arcachon, France. *Публікація тез, усна доповідь*.
7. **V. F. Shalakh**, A.V. El'skaya, M. Mirande. The multi-aminoacyl-tRNA synthetase complex: link between protein synthesis and apoptosis. 5<sup>th</sup> Parnas Conference "Molecular mechanisms of Cellular Signaling". 2005. April 26-29. Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь*.
8. M. Kaminska, **V. Shalakh**, S. Havrylenko, L. Guigou, R. Freguja and M. Mirande. Human aminoacyl-tRNA synthetases: role of the eukaryotic-specific, protein-protein and protein-RNA interaction domains. aaRS2008. International conference on aminoacyl-tRNA synthetase: from basic mechanisms to systems biology.

- September 7-11. 2008. Veyrier du Lac, France. *Публікація тез, постерна доповідь.*
9. V. V. Liudkovska, **V.F. Shalak**. Complex of translation elongation factors (eEF-1H): in vitro reconstitution from recombinant proteins. International life sciences' students' conference. August 19-23. 2009. Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь.*
  10. **V. Shalak**, V. Liudkovska, A. Timchenko, B. Negrutskii. Interaction between subunits of translation elongation factor 1B: two approaches to study their complexes in vitro. X Український біохімічний з'їзд. 13-17 вересня. 2010. м. Одеса, Україна. *Публікація тез, усна доповідь.*
  11. Trosiuk T.V., **Shalak V. F.** Construction and expression of deletion mutants of translation elongation factors eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$ , eEF1B $\gamma$ . VII conference of Young Scientists of the Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine. 28-29 May 2013. Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь.*
  12. Trosiuk T.V., **Shalak V. F.** The interaction of truncated forms of translation elongation factor eEF1B $\gamma$  with eEF1B $\alpha$  and eEF1B $\beta$ . VIII Conference of Young Scientists of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine Dedicated to 90<sup>th</sup> anniversary of P.G. Kostyuk. 20-21 May 2014. Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь.*
  13. Trosiuk T.V., **Shalak V. F.** Dissection of translation elongation factor eEF1B $\gamma$ : creation of deletion mutants to study its interaction with protein partners in vitro. XI Український біохімічний конгрес. 6-10 жовтня 2014 р. м. Київ. *Публікація тез, усна доповідь.*
  14. **V. Shalak**, R. Szczepanowski, L. Kapustian, J. Debski, L. Porubleva, T. Trosiuk, A. Nehelia, I. Shrubkovskij, M. Dadlez, M. Bochtler, B. Negrutskii. Combiom Final Scientific Meeting. 16-17 April 2015. Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь.*
  15. Bondarchuk T.V., **Shalak V.F.** Leucine-zipper motif is responsible for the multimerization of translation elongation factor 1B $\beta$ . International Conference for the Young Scientists (CYS-2015), 21-25 September 2015, Kyiv, Ukraine. *Публікація тез, усна доповідь.*
  16. Bondarchuk T. V., **Shalak V.F.** Structural and functional features of translation elongation factor 1B alpha. 41<sup>st</sup> FEBS congress "Molecular and systems biology for a better life", September 03-08, 2016, Ephesus/Kusadasi, Turkey. *Публікація тез, постерна доповідь.*
  17. **В'ячеслав Шалак**, Тетяна Бондарчук. Неглобулярні білки з неструктурованими ділянками: точне визначення молекулярної маси, агрегатного стану і локалізації неструктурованих ділянок. XII Відкрита конференція молодих вчених ІМБГ НАН України. 15-16 травня 2018 року. м. Київ. *Публікація тез, ключова доповідь.*
  18. T.V. Bondarchuk, **V.F. Shalak**, A. Fatal'ska, D.M. Lozhko, R.H. Shchepanovskyi, M. Dadlez, B.S. Negrutskii, A.V. El'skaya. The new model of structural organization of the human translation elongation complex eEF1B. XII Український біохімічний конгрес. 30 вересня-4 жовтня 2019 р. м. Тернопіль. Україна. *Публікація тез, усна доповідь.*

## АНОТАЦІЯ

**Шалак В.Ф. Структурно-функціональна організація макромолекулярних комплексів і їх компонентів апарату елонгації трансляції у ссавців.** – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису, підготовлена у формі доповіді за сукупністю наукових статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 — молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. Київ, 2025.

У дисертаційній роботі представлено широкомасштабні дослідження просторової структури і особливостей функціонування компонентів двох основних макромолекулярних комплексів, що працюють на дорибосомному етапі трансляції ссавців.

Отримані експериментальні результати виявили низку нових аспектів структурно-функціональної організації компонентів апарату трансляції ссавців зокрема відмінності просторової організації високо гомологічних білків-паралогів eEF1A1 та eEF1A2, неканонічних взаємодій фактора елонгації eEF1A1, четвертинної організації комплексу eEF1B, подвійної функціональної ролі білка p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз. Встановлено, що фактор елонгації трансляції eEF1A1 в ГДФ-зв'язаній формі має видовжену конформацію в розчині з радіусом гірації  $5.2 \pm 0.2$  нм, що більш ніж в 2 рази перевищує обрахований радіусу гірації кристалографічної структури його білка-паралога eEF1A2 в комплексі з ГДФ. Розшифровано кристалічну структуру фактора елонгації трансляції eEF1A2, який складається з трьох доменів і має близьку до сферичної просторову конформацію. Встановлено, що іони  $Mg^{2+}$  не впливають на реакцію обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A2. Показано, що eEF1A1 у ГДФ-зв'язаній формі може утворювати неканонічний потрійний комплекс з деацильованою тРНК і четвертинний комплекс з фенілаланіл-тРНК синтетазою, а також збільшує початкову швидкість реакції, яку каталізує метіоніл-тРНК синтетаза. Виявлено взаємодію трансляційно-контрольованого білка пухлин (TCTP) з факторами елонгації трансляції eEF1A1 і субодиницею eEF1B $\beta$ . Зв'язування TCTP з eEF1A1 призводить до зниження швидкості реакції як спонтанного, так і eEF1B $\beta$ -опосередкованого обміну гуанінового нуклеотиду на молекулі eEF1A1. Вперше детально досліджено структурну організацію факторів елонгації eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , які утворюють макромолекулярний комплекс eEF1B. Визначено сайти взаємодії між субодиницями eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\gamma$ , eEF1B $\beta$  і eEF1B $\gamma$ , і встановлено, що мотив «лейциновий застібка» eEF1B $\beta$  відповідає за тримеризацію цього білка, а також всього комплексу eEF1B, який має структурну організацію типу  $(\alpha\beta\gamma)_3$ . Показано, що eEF1B $(\alpha\beta\gamma)_3$  здатен зв'язувати до шести молекул eEF1A2, відповідно до кількості GEF-доменів в ньому. Таке унікальне структурне об'єднання факторів обміну гуанінового нуклеотиду в одному комплексі може забезпечувати ефективне відновлення активної ГТФ-зв'язаної конформації

eEF1A в процесі елонгації трансляції у вищих еукаріот. Вперше розкрито механізм стимуляції активності eEF1B $\alpha$  субодиницею eEF1B $\gamma$  при утворенні комплексу між ними. Конформація N-кінцевого домену eEF1B $\alpha$  частково перешкоджає взаємодії eEF1A з GEF-доменом, що знижує швидкість обміну гуанінового нуклеотиду. Зв'язування N-кінцевих доменів eEF1B $\alpha$  і eEF1B $\gamma$  усуває цей інгібіторний ефект. Встановлено, що N-кінцевий домен білка p43 макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз взаємодіє з аргініл-тРНК синтетазою. Показано, що p43 не впливає на каталітичні параметри аргініл-тРНК синтетази і не збільшує її спорідненість до відповідної тРНК. Отже, білок p43 не є кофактором для цього ферменту. Доведено, що інкубація макромолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз з каспазою 7 *in vitro* призводить до розщеплення його p43 компоненту на два фрагменти. Його C-кінцевий фрагмент, який вивільняється з комплексу, є ідентичним ЕМАРІІ і здатен викликати хемотаксис моноцитів. Розщеплення p43 призводить до втрати його тРНК-зв'язувальної властивості. Виявлено, що індукція апоптозу в клітинах призводить до появи і вивільнення з клітин іншого протеолітичного фрагменту білка p43, названого p43(ARF), який на 40 амінокислот довший ніж ЕМАРІІ. Показано, що обидва p43(ARF) і ЕМАРІІ не індукували експресію Е-селектину на ендотеліальних клітинах (HUVEC), тоді як повнорозмірний p43 таку індукцію викликав. Протеоліз білка p43 дозволяє уникнути активації ендотеліальних клітин і, як наслідок, можливого розвитку запальної реакції в організмі. Вперше ідентифіковано новий трансляційний продукт гена, який кодує білок p43. Цей продукт має мітохондріальну локалізацію і є на 9 амінокислот довшим ніж цитоплазматична ізоформа p43. Кількість мітохондріальної ізоформи складає приблизно 2% від загальної кількості p43 в клітині.

**Ключові слова:** тРНК, аміноацил-тРНК синтетази, G-білки, фактори обміну гуанінового нуклеотиду (GEF), фактори елонгації трансляції, мультибілкові комплекси, білок-білкові взаємодії, білок-нуклеїнові взаємодії, цитокіни, ЕМАРІІ, клітинні сигнальні шляхи, канцерогенез, експресія генів, апоптоз.

## SUMMARY

**Shalak V.F. Structural and functional organization of the macromolecular complexes and their components of the mammalian translation elongation apparatus.** Qualifying scientific work based on a collection of the author's scientific articles.

Thesis submitted for the degree of Doctor of Biological Sciences in Biology, specialty 03.00.03 – Molecular Biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2025.

This thesis presents a large-scale study of structural organization and functional properties of the components of two major macromolecular complexes that operate at the pre-ribosomal stage of mammalian translation.

The obtained experimental results revealed a number of new aspects of the structural and functional organization of the components of mammalian translation apparatus, including differences in the spatial organization of the highly homologous eEF1A1 and eEF1A2 protein-paralogs, non-canonical interactions of the elongation factor eEF1A1, quaternary organization of the eEF1B complex, and the dual functional role of the p43 protein involved into macromolecular complex of aminoacyl-tRNA synthetases. We have found that the translation elongation factor eEF1A1 in the GDF-bound form has an elongated conformation in solution with a radius of gyration  $5.2 \pm 0.2$  nm, which is more than 2 times larger than the radius of gyration of its paralog, the eEF1A2\*GDF complex, in a crystal. We have deciphered the crystal structure of eEF1A2, which has a three-domain fold and a spherical-like conformation. We have also found that  $Mg^{2+}$  ions do not affect the guanine-nucleotide exchange reaction on the eEF1A2 molecule. We have demonstrated that eEF1A1 in the GDP-bound state can form a non-canonical ternary complex with deacylated tRNA and a quaternary complex with phenylalanyl-tRNA synthetase, and it also increases the initial rate of reaction catalyzed by methionyl-tRNA synthetase. We have revealed the interaction of the translationally controlled tumor protein (TCTP) with the translation elongation factors eEF1A1 and eEF1B $\beta$ . The binding of TCTP to eEF1A1 leads to a decrease of the reaction rate of both spontaneous and eEF1B $\beta$ -mediated guanine-nucleotide exchange on the eEF1A1 molecule.

For the first time, we have studied in detail the structural organization of the elongation factors eEF1B $\alpha$ , eEF1B $\beta$  and eEF1B $\gamma$  involved into eEF1B macromolecular complex. We have identified the sites of interaction between eEF1B $\alpha$  and eEF1B $\gamma$ , eEF1B $\beta$  and eEF1B $\gamma$ , and we established that the “leucine zipper” motif of eEF1B $\beta$  is responsible for the trimerization of this protein, as well as the entire eEF1B complex, which has a structural organization of the  $(\alpha\beta\gamma)_3$  type. We have shown that eEF1B $(\alpha\beta\gamma)_3$  is able to bind up to six eEF1A2 molecules, according to the number of GEF domains in the complex. Such, so far, unique structural assembly of the guanine-nucleotide exchange factors within a stable complex may ensure an efficient conversion of eEF1A from the GDP-bound state to the active GTP-bound conformation in higher eukaryotes. For the first time, we have revealed the mechanism of eEF1B $\gamma$ -mediated stimulation of eEF1B $\alpha$  activity upon a complex formation between them. The conformation of the N-terminal domain of eEF1B $\alpha$  partially prevents the interaction of eEF1A with the GEF domain, which reduces the rate of guanine-nucleotide exchange. Binding of the N-terminal domains of eEF1B $\alpha$  and eEF1B $\gamma$  eliminates this inhibitory effect.

We have established that the N-terminal domain of p43 interacts with arginyl-tRNA synthetase. We have shown that p43 does not affect the catalytic parameters of arginyl-tRNA synthetase and does not increase its affinity for the cognate tRNA. Thus, the p43 protein is not a cofactor for this enzyme.

We have shown that incubation of the macromolecular complex of aminoacyl-tRNA synthetases with caspase 7 *in vitro* leads to cleavage of its p43 component into two fragments. The resulting C-terminal fragment, identified as EMAPII, is released from the complex and exhibits cytokine-like activity in a monocyte chemotaxis assay,

while the N-terminal fragment remains within the complex. Cleavage of p43 leads to the loss of its tRNA-binding property.

We have demonstrated, for the first time, that the induction of apoptosis in U937 cells leads to the appearance and release of another proteolytic fragment of p43 protein, named p43(ARF), which is 40 amino acids longer than EMAPII. We have shown that both p43(ARF) and EMAPII do not induce E-selectin expression in endothelial cells (HUVEC), whereas full-length p43 does. Proteolysis of p43 protein in apoptotic cells prevents activation of endothelial cells and, consequently, avoids possible development of an inflammatory response in organism.

We have identified, for the first time, a new translational product of the p43-encoding gene. This product has mitochondrial localization and is 9 amino acids longer than the cytoplasmic isoform of p43. The amount of the mitochondrial isoform is approximately 2% of the total amount of p43 in the cell.

**Keywords:** tRNA, aminoacyl-tRNA synthetases, G-proteins, guanine nucleotide exchange factors (GEFs), translation elongation factors, multiprotein nanocomplexes, protein-protein interactions, protein-nucleic acid interactions, cytokines, EMAPII, cell signaling pathways, carcinogenesis, gene expression, apoptosis.