

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

Новосильна Олександра Валеріївна

УДК 577.2;

616-006;

СТРУКТУРНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ВІДМІННОСТІ ІЗОФОРМИ A1 ТА
ПРОТООНКОГЕННОЇ ІЗОФОРМИ A2 ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ
eEF1A

03.00.03 — молекулярна біологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник:
Негруцький Борис Сергійович
доктор біологічних наук,
професор

КИЇВ-2017

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	13
1.1 Ізоформи білків. Типи і функціональне значення	13
1.2 Ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A	17
1.3 Кальмодулін. Структура і функції	24
1.4. Актин. Структура і функції. Взаємодія з eEF1A	25
1.5 Sgt1. Структура і функції	27
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
2.1 Матеріали	29
2.2 Методи досліджень	30
2.2.1 Отримання eEF1A1 з печінки кроля	30
2.2.2 Отримання eEF1A2 з м'язів кроля	32
2.2.3 Визначення активності eEF1A в реакції ГДФ/[ЗН]ГДФ обміну	32
2.2.4 Отримання кальмодуліну з мозку великої рогатої худоби	33
2.2.5 Виділення та очищення доменів eEF1A	34
2.2.6 Культивування клітин НЕК293	36
2.2.7 Молекулярно-динамічні дослідження	36
2.2.8 Молекулярне моделювання білок-білкових комплексів	38
2.2.9 Гель-електрофорез білків за неденатуруючих умов	40
2.2.10 Гель-електрофорез білків за денатуруючих умов	40

2.2.11 Вестерн - блот аналіз	41
2.2.12 Ко-преципітація ендогенних клітинних білків та білків з ярликами	41
2.2.13 Диференційна скануюча мікрокалориметрія	44
2.2.14 Круговий дихроїзм	44
2.2.15 Аналітичне ультрацентрифугування	44
2.2.16 Малокутове розсіяння рентгенівських променів	45
2.2.17 Флуоресцентна спектроскопія	46
2.2.18 Полімеризація актину	46
2.2.19 Конфокальна мікроскопія актинових пучків	47
2.2.20 Атомно-силова мікроскопія актинових пучків	47
2.2.21 Детекція активних пучків методом низькошвидкісного центрифугування	48
2.2.22 Імунофлуоресцентне фарбування	48
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	50
3.1 Порівняння просторової організації ізоформ eEF1A	50
3.1.1 Дослідження молекулярної динаміки ізоформ eEF1A1 і eEF1A2	50
3.1.2 Порівняння стабільності ізоформ eEF1A за допомогою метода диференційної скануючої мікрокалориметрії	53
3.1.3 Дослідження ізоформ eEF1A методом кругового дихроїзму	54
3.1.4 Аналіз олігомерного стану двох ізоформ eEF1A	56
3.1.4.1 Оцінка розмірів та молекулярної маси eEF1A1 та eEF1A2	

за даними МРРП	56
3.1.4.2 Просторова організація димерів ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 характеризується різним ступенем компактності	59
3.1.4.3 Порівняння стійкості двох ізоформ eEF1A до дії сечовини	61
3.1.5 Порівняння поверхневої гідрофобності білків eEF1A1 та eEF1A2	62
3.2 Порівняння взаємодії ізоформ eEF1A з білками-партнерами	66
3.2.1 Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 із кальцій-зв'язуючими білками	66
3.2.1.1 Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з кальмодуліном (CaM) та S100A6 <i>in vitro</i>	66
3.2.1.2 Ідентифікація кальмодулін-зв'язуючих доменів eEF1A1	69
3.2.1.3 Вивчення впливу кальмодуліну на активність eEF1A в нуклеотидному обміні	70
3.2.1.4 Вивчення впливу кальмодуліну на tРНК-зв'язуючу активність eEF1A1	71
3.2.1.5 Моделювання комплексу eEF1A1-кальмодулін-Ca ²⁺	75
3.2.2. Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A із F-актином	77
3.2.3. Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з білком Sgt1	81
3.2.3.1. Дослідження взаємодії eEF1A з білком Sgt1 <i>in vitro</i>	82
3.2.3.2. Ідентифікація доменів Sgt1 та eEF1A1, що беруть участь у формуванні комплексу	85
3.2.3.3 Моделювання комплексу Sgt1-eEF1A1 <i>in silico</i>	88

3.2.3.4. Конкурування Sgt1 з РНК-ВТМ за місце зв'язування з	
еEF1A	90
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	96
ВИСНОВКИ	104
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	106

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- eEF1A - еукаріотний фактор елонгації трансляції 1A
eEF1A1 - перша ізоформа еукаріотного фактора елонгації трансляції 1A
eEF1A2 - друга ізоформа еукаріотного фактора елонгації трансляції 1A
eEF1B – еукаріотний фактор елонгації трансляції 1B
CaM - кальмодулін
NEPES – N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-етансульфонова кислота
PMSF – фенілметансульфонілфторид
PBS – фосфатно-солевий буфер
TEMED – тетраметилетилендіамід
АНС - 8-аніліно-1-нафталін сульфонат
ГДФ - гуанідиндіфосфат
ГТФ - гуанідинтрифосфат
ДСН – додецил сульфат натрію
ДТТ – дітіотрейтол
ІПТГ – ізопропіл- β -D-тіогалактоперонозид
мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота
МРРП– малокутове розсіяння рентгенівських променів.
ПААГ – поліакриламідний гель
тРНК – транспортна рибонуклеїнова кислота

ВСТУП

Актуальність теми. Останні дослідження в галузі аналітичної та кількісної протеоміки остаточно підтвердили, що доволі велика кількість білків в організмі ссавців існує у вигляді декількох ізоформ. Ці ізоформи кодуються різними генами або є сплайсованими варіантами продуктів того ж самого гена [1]. Незважаючи на швидкий інструментальний прогрес у ідентифікації ізоформ, причини їх існування та специфічні функції у більшості випадків залишаються достеменно невідомими. Відомо лише, що ізоформи можуть виконувати в організмі як однакові функції, так і абсолютно протилежні, наприклад, одна ізоформа певного білку може бути онкогенною, а інша – нейтральною, або навіть онкосупресорною [2]. У більшості випадків також невідомі причини тканинспецифічної і, іноді, взаємовиключної експресії ізоформ того ж самого білку.

Фактор елонгації трансляції ссавців eEF1A, завдяки здатності одночасно взаємодіяти із аміноацил-тРНК і А-сайтом 80S рибосоми, забезпечує ГТФ-залежну елонгацію поліпептидних ланцюжків на рибосомі. Цей білок у вищих хребетних представлений ізоформами eEF1A1 і eEF1A2, що демонструють 93% ідентичність та 97,5% гомологію [3]. Обидві ізоформи трансляційно активні, але з невідомої причини їх локалізація у тканинах ссавців в нормі є взаємовиключною. A2 в основному присутній у скелетних м'язах, серцевому м'язі, та в нейрональній тканині, eEF1A1 – у решті тканин.

В літературі є багато свідчень про неканонічні функції eEF1A. Цей білок може брати участь у сперматогенезі [4], клітинному циклі [5], шаперон-опосередкованої аутофагії [6], апоптозі [7], ліпотоксичній клітинній смерті [8], протеолізі [9] та модуляції цитоскелета [10]. Накопичуються дані щодо різної активності eEF1A1 і eEF1A2 в позатрансляційних процесах. Найбільш яскравою їх відмінністю в цьому аспекті є те, що eEF1A2 є протоонкогеном із антиапопотичними властивостями, в той час коли eEF1A1 є про-

апоптотичним білком [11–13]. Існування такої різниці дотепер не пояснено ні на структурному, ні на функціональному рівні. Отже, виявлення базових принципів структурної організації ізоформ та їх загальних функціональних відмінностей є важливим і актуальним.

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

Дисертація відповідає основному плану фундаментальних досліджень, які проводяться в лабораторії біосинтезу білка відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за бюджетними темами: «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 2010 – 2015 рр), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744 2016 - 2020 рр)

Мета і завдання дослідження. Основна мета роботи – виявити структурні та функціональні відмінності між ізоформами A1 та протоонкогенною ізоформою A2 фактора елонгації трансляції eEF1A.

Для виконання даної мети вирішували такі завдання:

1. Розкрити структурні відмінності ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 за допомогою біоінформатичних та фізико-хімічних методів.
2. Визначити особливості взаємодії ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 із сигнальним білком кальмодуліном.
3. Визначити особливості взаємодії ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 із білком цитоскелету актином.
4. Визначити особливості взаємодії ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 із мультфункціональним білком Sgt1.

Об'єкт дослідження: структурні і функціональні особливості не-онкогенної і прото-онкогенної ізоформ фактору елонгації трансляції eEF1A

Предмет дослідження: білок eEF1A та його ізоформи

Методи дослідження: Хроматографічні методи, методи оцінки структури білків (аналітичне ультрацентрифугування, розсіяння рентгенівських променів, мікрокалориметрія, круговий дихроїзм), біохімічні методи (визначення концентрації білків за методом Бредфорд, електрофорез білків та нуклеїнових кислот за денатуруючих і неденатуруючих умов, фракційне центрифугування), методи роботи з культурами клітин бактерій та ссавців, конфокальна та атомно-силова мікроскопія, імунологічні методи (ко-іммунопреципітація, ко-преципітація, Вестерн-блот аналіз).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше виявлено, що ізоформа eEF1A1 і прото-онкогенна ізоформа eEF1A2 відрізняються за просторовою організацією, за гідрофобністю та здатністю до формування димерів.

Вперше показано, що ізоформа eEF1A1 та прото-онкогенна ізоформа eEF1A2 неоднаково взаємодіють із F-актином, формуючи актинові пучки різної форми, що може мати значення для ролі eEF1A2 у канцерогенезі.

Вперше встановлено, що прото-онкогенна ізоформа eEF1A2, на відміну від eEF1A1, не здатна взаємодіяти із сигнальним білком кальмодуліном, та висунута оригінальна гіпотеза, що пояснює необхідність тканиноспецифічної експресії ізоформи eEF1A2.

Вперше виявлена відсутність взаємодії ізоформи eEF1A2 із мультифункціональним білком Sgt1 і показане можливе значення взаємодії Sgt1 та ізоформи eEF1A1 для системи ‘non-host’ антивірусного захисту.

Практичне значення одержаних результатів. Представлені результати розширюють сучасні уявлення про можливість істотних структурних і функціональних відмінностей дуже подібних за амінокислотною послідовністю білкових ізоформ. Одержання конкретної інформації стосовно нездатності або зміненої здатності прото-онкогенної ізоформи eEF1A2 до взаємодії із певними білками суттєво поліпшують розуміння її онкогенної

ролі у певних видах раку людини. Матеріали дисертаційної роботи використовувалися в спецкурсі «Синтез білка» для студентів Інституту біології НКДУ ім. Шевченка.

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором самостійно проаналізовано наукову літературу за темою досліджень. Разом із керівником розроблено програму проведення експериментів та підібрано методи для вирішення поставлених завдань. Наведені в роботі результати були отримані особисто або за безпосередньою участю здобувача. Біоінформатичні дослідження із моделювання просторової структури білків, молекулярної динаміки та докінгу білкових комплексів проводилися за участю к.б.н. Д. Каніболоцького (Інститут біології КНУ ім. Шевченка), М. Пидюри (Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України), Д.Власенка (наша лабораторія). Дослідження структури білків фізико-хімічними методами проводилися за участю д.б.н. І.Сердюка, к.б.н. Є.Тіктопуло, к.б.н. А.Тимченко (Інститут білка, Пушціно, Росія) і доктора М.Мерфі (Ліверпульський університет). Дослідження взаємодії ізоформ eEF1A із білком Sgt1 проводилися у співробітництві із проф. А.Філіпек (Ненські інститут, Варшава, Польща). Конфокальна мікроскопія ізоформ eEF1A і кальмодуліну проводилася за участю к.б.н. А.Хоруженко (ІМБГ НАН України). Дисертанткою особисто були проведені експерименти із дослідження структурної організації ізоформ методами фізико-хімічної біології, дослідження взаємодії білків методами різноспрямованого гель-електрофорезу, ко-преципітації, конфокальної та атомно-силової мікроскопії. Всім науковцям, з якими були проведені спільні експерименти, здобувачка вдячна за допомогу. Обговорення, аналіз та відображення результатів досліджень у наукових публікаціях було зроблено разом з науковим керівником д.б.н., професором Негруцьким Б.С., якому авторка висловлює щире подяку.

Дисертантка глибоко вдячна д.б.н., професору, академіку НАН України

Єльській Г.В. за допомогу та велику увагу до дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації: Основні положення дисертації апробовано на семінарах відділу механізмів трансляції генетичної інформації та наукових конференціях ІМБІГ НАНУ і представлено у вигляді усних та стендових доповідей на: Українському біохімічному з'їзді (Харків, Україна, 2006), Симпозіумі EMBO/SPINE2 «Внутрішньо неупорядковані білки. Характеристика та біологічне значення» (Будапешт, Угорщина, 2007), 6-ій Конференції Парнас (Краків, Польща, 2007), 2-му Українському конгресі з клітинної біології (Київ, Україна, 2007), Конференції молодих вчених, присвяченій 185-й річниці Грегора Менделя (Київ, Україна, 2007), Конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, Україна, 2008), 7-ій Конференції Парнас (Ялта, Крим, Україна, 2009), Конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2009), Курсі лекцій та семінарів FEBS/SFRR-E/IUBMB «Білкове забезпечення та оберт при старінні та захворюванні» (Острів Спецес, Греція, 2010), X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010), GDRI конференції «Від молекулярних до клітинних подій при патологіях людини.» (Париж, Франція, 2013), XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014), Міжнародному симпозіумі з клітинної біології разом з 4-им Українським конгресом з клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014), EMBO конференції «Білковий синтез та трансляційний контроль» (Хайдельберг, Німеччина, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 статей у фахових наукових журналах та тези 13 доповідей на наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів дослідження, аналізу і узагальнення результатів, висновків і списку використаної літератури. Основний зміст дисертації викладено на 127 сторінках машинописного тексту, містить 2

таблиці, 46 рисунків. Список використаної літератури охоплює 174 джерела.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ізоформи білків. Типи і функціональне значення

Ізоформи білків – близькоспоріднені генні продукти, які можуть виконувати як однакову, так і досить різні біологічні функції. Ізоформи можуть відрізнятися за своєю біологічною активністю, регуляторними властивостями, внутрішньоклітинним розташуванням, різною експресією у просторі і часі тощо. Білкові ізоформи є або продуктами одного гена або множини генів, які еволюціонували від одного гена-предку. Ізоформи продукуються за двома принципово різними механізмами: дуплікації генів і альтернативного сплайсингу.

У першому випадку генеруються множинні копії гена. Є принаймні три різних механізми, які можуть призводити до дуплікації генів. Це: нерівний кросинговер, при якому виснажується одна хроматида і додається одна або кілька копій до сестринської хроматиди під час мейозу; тандемні дуплікації в результаті помилки ДНК-реплікації; транслокація копії гена в нову хромосому, яка може відбуватися як з одного локусу гена, так і шляхом переміщення одного або більше копій тандемного повтору.

У випадку альтернативного сплайсингу один ген виробляє кілька мРНК, шляхом відокремлення екзонів пре-мРНК і їх повторного з'єднання. Механізми, відповідальні за генерування альтернативних екзонів включають: тандемні дуплікації з подальшою дивергенцією екзонів; транслокації з

одного або більше екзонів в новий контекст гена та мутації в інтроні або у фланкуючій послідовності, завдяки яким утворюються N-кінцеві, C-кінцеві або внутрішні екзони. Альтернативний сплайсинг еквівалентних гомологічних екзонів становить інтерес з еволюційної точки зору, тому що обмін гомологічними екзонами може дозволити тонкі модифікації функцій. Це контрастує із переважною більшістю альтернативних ізоформ, які генеруються за допомогою великих інсерцій чи делецій, або негомологічних замінів, які, вірогідно, генерують ізоформи з функціями, що радикально відрізняються від основної функції гена [1].

Поява ізоформ може відігравати фундаментальну роль в еволюції біологічного різноманіття. Можна вважати, що поява багатоклітинних організмів дала підґрунтя для появи ізоформ із спеціалізованими функціями. В літературі наводяться факти існування ізоформ білків різних класів, що виконують різні, і навіть протилежні функції.

Одним із прикладів цього є родина «scaffold білків» IQGAP (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein), яка складається з трьох еволюційно консервативних ізоформ [14]. Всі три ізоформи беруть участь у регуляції динаміки цитоскелету, внутрішньоклітинному сигналінгу та забезпеченні великої кількості білок-білкових взаємодій. IQGAP1 присутній в усіх тканинах, IQGAP2 існує в основному в печінці, а IQGAP3 у мозку, що вказує на можливість унікальних функцій кожної ізоформи [15]. Порівняльне вивчення здатності цих ізоформ взаємодіяти із білками-партнерами тільки почалося, але вже відомо, що всі ізоформи здатні взаємодіяти із актином [16–18] і кальмодуліном [16,19,20].

Існує і різниця між ізоформами – так IQGAP3 зв'язує тільки ERK1 [21], в той час коли IQGAP1 взаємодіє як із ERK1 [22] так і з ERK2 [23]. Також, методом ко-імунопреципітації було показано, що IQGAP3 взаємодіє із аніліном, в той час коли IQGAP1 і IQGAP2 не здатні взаємодіяти із цим

білком [24]. На клітинному рівні, інгібування мРНК IQGAP2 чи IQGAP3, на відміну від IQGAP1, зменшує ріст і довжину аксонів [15].

Загалом можна зауважити, що загальна кількість відомих білків-партнерів для ізоформи IQGAP1 є набагато більшою, ніж для IQGAP2 та IQGAP3 [14]. Функціональне значення такої різниці чекає на спеціальну перевірку.

Інший приклад - родина плакофілінів, що складається із трьох високогомологічних ізоформ. Плакофіліни донедавна вважалися лише структурними білками, що є компонентами десмосом і посилюють клітинну адгезію завдяки зв'язуванню із проміжними (intermediate) філаментами цитоскелету, але вони є також scaffold білками, що беруть участь у регуляції різноманітних клітинних процесів, а також спадкових хвороб та карциногенезу [25].

Ця родина є наочним прикладом унікальності кожної ізоформи, зокрема, нещодавно було показано, що плакофіліни розрізняються за клітинною локалізацією і кінетикою формування десмосом *de novo* і регулюються за допомогою різних механізмів. Функціонально, плакофілін 1 забезпечує стабільну міжклітинну ко-адгезію, у той час коли плакофілін 3 забезпечує динаміку процесів, що необхідна протягом тканинного гомеостазу і його корекцій [26].

Різну участь дуже близьких ізоформ у клітинному сигналінгу можна продемонструвати на прикладі трьох близько споріднених людських генів Kras (4A, 4B), Hras та Nras, які є основними членами супер-родини *ras*. Ці ізоформи, що кодуються трьома різними генами (H-, K-, N-*ras*), є високо гомологічними. Kras4A та Kras4B є продуктами диференційного сплайсингу екзонів. Відрізняються ці ізоформи між собою тільки невеликими С-кінцевими ділянками. Наприклад, Kras4B містить в цій ділянці полілізинову послідовність, яка є важливою для його трансформуючої активності, що є найбільш відмінною рисою цього білка серед *ras* ізоформ. Найостанніші 4 амінокислотних залишки з С-кінця різняться поміж чотирма ізоформами.

Встановлено, що вони відповідають за варіативність ліпідних пост-трансляційних модифікацій та субклітинну локалізацію *ras* ізоформ. Хоча вони майже ідентичні за своїми каталітичними, ефектор-зв'язуючими властивостями, але H-, N- та K-*ras* білки пов'язані з різними біологічними функціями в розвитку, клітинному рості та у ракових захворюваннях людини. Ці функціональні розходження, як вважається, зумовлені, принаймні частково, різною мембранною локалізацією *ras* ізоформ. Диференційний розподіл *ras* білків на клітинних мембранах може визначати унікальні просторово-часові моделі активації ефекторних шляхів, у тому числі силу та тривалість активації сигналу [27].

Інший приклад різної участі білкових ізоформ у сигналінгу – це ізоформи білку STAT5. Білки STAT (Signal transducers and activators of transcription) – це латентні цитоплазматичні фактори транскрипції, що зв'язують позаклітинні сигнали з експресією таргетних генів [28]. STAT5 прямо активується кіназою JAK2 downstream по відношенню до декількох цитокінових рецепторів і онкогенної тирозинової кінази BCR-ABL. Гематопоетичні клітини експресують дві висококонсервативні ізоформи STAT5 (STAT5A і STAT5B) [29]. Показано, що інгібування STAT5B за допомогою RNAi суттєво інгібує BCR-ABL-залежну клітинну проліферацію, і що білок STAT5B, а не STAT5A, є важливим для експресії BCL-XL в присутності BCR-ABL. Більш того, інгібування STAT5B, а не STAT5A, робило BCR-ABL-позитивні клітини людини чутливим до препарату іманітібу [30]. В іншій роботі показано різнонаправлену кореляцію експресії генів STAT5A і STAT5B із експресією різних генів, пов'язаних із відповіддю на ліки [31].

Ще одним прикладом різної участі ізоформ в сигналінгу є Rho-асоційовані кінази ROCK1 і ROCK2, що активуються ГТФазою Rho і контролюють перебудови цитоскелету. Показано, що, незважаючи на більш ніж 90% гомологію кіназних доменів, саме ізоформа ROCK2 відіграє

ексклюзивну роль у контролі пластичності Т-клітин і поляризації макрофагів [32].

Нещодавно показана диференційна роль ізоформ аденіннуклеотидтранслоказ в апоптозі та дерегуляція їхньої експресії в ракових пухлинах [2]. Родина цих білків представлена у людини чотирма гомологічними генами, експресія яких є не тільки тканино-специфічною, але й змінюється залежно від фізіологічного стану клітини.

Отже, можна зробити висновок, що наявність родин ізоформ білків свідчить про існування ще одного рівня регуляції клітинних процесів. Для переважної більшості білкових родин механізми ізоформно-специфічної регуляції не встановлені, і її розуміння або зовсім відсутнє, або, в кращому випадку, перебуває лише на феноменологічному рівні. Поглиблене вивчення функцій та специфічних білків-партнерів кожної такої ізоформи може надати фундаментальні знання, необхідні для розкриття ще невідомих механізмів регуляції різноманітних клітинних процесів. В цьому зв'язку достатню цікавість викликають ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A ссавців.

1.2 Ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A

Фактор елонгації трансляції 1A кодується консервативним помірком прокаріотами та еукаріотами сімейством генів. В більшості видів існує більше ніж одна копія в гаплоїдному геномі, та деякі з цих генів експресуються тканино-специфічно та залежно від стадії розвитку. Так, у *Escherichia coli* є два еквівалентних гена, що кодують гомолог eEF1A (EF-Tu) [33]. В дріжджах *Saccharomyces cerevisiae* та *Candida albicans* присутні два еквівалентних гени eEF1A (TEF1 та TEF2), а у *Schizosaccharomyces pombe* було виявлено навіть три еквівалентні гени [34–36]. У рослин кількість генів eEF1A ще вища, наприклад, виявлено 10-15 генів eEF1A у кукурудзи [37] та

9 генів EEF1A у бавовни [38]. У *Drosophila melanogaster* було знайдено два гени EEF1A, до того ж їх експресія залежить від фази розвитку [39]. Існує три гени EEF1A у *Xenopus laevis* [40] та п'ять у *Solea senegalensis* [41], які також експресуються по-різному протягом розвитку цих організмів.

Геном ссавців містить кілька послідовностей EEF1A, але тільки EEF1A1 та EEF1A2 активно транскрибуються. Решта генів вважаються ретропсевдогенами, такими що виникли з EEF1A1 [42–44]. В історичному аспекті, ген EEF1A2 вперше було ідентифіковано у щурів, на підставі його 78% гомології з людським EEF1A1 [45].

Гени EEF1A1 та EEF1A2 локалізовані на 6q14 та 20q13.3 хромосомах людини, відповідно [44]. В інтронах, промоторних областях 5'UTR та 3'UTR генів EEF1A1 та EEF1A2 спостерігається низький рівень подібності, однак кодуєчі ділянки цих генів подібні на 75%. До того ж, структура двох генів є досить консервативною [46,47]. EEF1A1 охоплює 3,5 kb і складається з 8 екзонів та 7 інтронів [48] в той час як ген EEF1A2 має приблизно 12 kb (включаючи 2 kb промоторну ділянку), проте і цей ген складається з 8 екзонів та 7 інтронів [47].

Фактор елонгації трансляції 1A (eEF1A) є одним із найбільш поширених білків в клітині [21,22]. У вищих еукаріотів eEF1A представлений двома тканиноспецифічними ізоформами eEF1A1 і eEF1A2 [18]. Ці ізоформи є дуже подібними за первинною структурою (на 97% гомологічними і на 92% ідентичними). Амінокислотні послідовності eEF1A1 і eEF1A2 наведені на рис. 1.1.

Щодо просторової структури – відома кристалічна структура eEF1A дріжджів в комплексі із фактором нуклеотидного обміну (рис. 1.2 а) [49].

Під час роботи над дисертацією, в нашій лабораторії була розшифрована структура eEF1A2 з м'язів кроля (рис.1.2 б) [50]. Закристалізувати eEF1A1 не вдалося, вочевидь, із причин, що будуть викладені в розділі «Експериментальна частина».

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
eEF1A1 H.sapiens  MGKEKTHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAEMGKGSFKYAWVLDKKAERERGITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIK
eEF1A2 H.sapiens  .....T.....I.....
Clustal Consensus *****;***:*****

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
eEF1A1 H.sapiens  NMITGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNGQTRHALLAYTLGVKQLIVGVNKMDSPEPPYSQKRYEEIVKEVSTYIKKIGYNPDTVAFVPISGWNGDN
eEF1A2 H.sapiens  .....A..E...D.....A.....A..P.....H...
Clustal Consensus *****;***:*****;***** **;*****:***

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
eEF1A1 H.sapiens  MLEPSANMPWFKGWKVKTRKDGNASGTTLLEALDCILPPTTRPTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPVNVTEVKSVMHHEALS
eEF1A2 H.sapiens  ....P.....E..E....VS...T.....I..R.....I.....
Clustal Consensus *****;*****;***** *****;*:*****:*****

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
eEF1A1 H.sapiens  EALPGDNVGFNVKNVSKDVRNGVAGDSKNDPPMEAAGFTAQVIILNHPGQISAGYAPVLDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKKLEDGPKFLKSGDAA
eEF1A2 H.sapiens  .....I.....C....S...Q...Q..S.....S..I.....N..S.....
Clustal Consensus *****;*****;***** **;*****:*****;***** ** *****

      410     420     430     440     450     460
eEF1A1 H.sapiens  IVDMPGKPMCVESFSDDYPLGRFAVRDMRQTVAVGVIKAVDKKAAGAKVTKSAQKAQKAK-
eEF1A2 H.sapiens  ..E.....Q.....N..E..SG.....GK
Clustal Consensus **:*****:***** **;*:*****

```

Рис.1.1. Порівняння первинних структур ізоформ A1 і A2 фактора елонгації трансляції eEF1

Незважаючи на це, дуже висока гомологія ізоформ eEF1A дозволяє заключити, що як в одній, так і в іншій ізоформі є три структурні домени (домен I, домен II і домен III). Домен I складається з перших 234 залишків, включає як альфа спіралі, так і бета-складки і має топологію складки Росмана. Домен II (залишки 241–328) і домен III (залишки 337–445) складаються тільки із бета структур.

Експресія ізоформ eEF1A у переважній більшості випадків є не тільки тканинспецифічною, але й взаємовиключною. eEF1A1 присутній у більшості тканин організму, за виключенням нейрональних і м'язових [51], де його замінює eEF1A2. Друга ізоформа знайдена також у серцевому м'язі [52] і у деяких високоспеціалізованих клітинах [53]. Про важливість наявності eEF1A2 в таких тканинах свідчить таке генетичне порушення як wasted мутація мишей. Ця мутація спричиняє wasted syndrome або синдром виснаження, який характеризується гіпоторофією, неврологічними та імунологічними порушеннями, починаючи з 21 дня після народження; на 28

день такі тварини гинуть. Це зумовлюється делецією локусу *EEF1A2* в wasted мишах, що веде до ліквідації експресії цього гена [53,54].

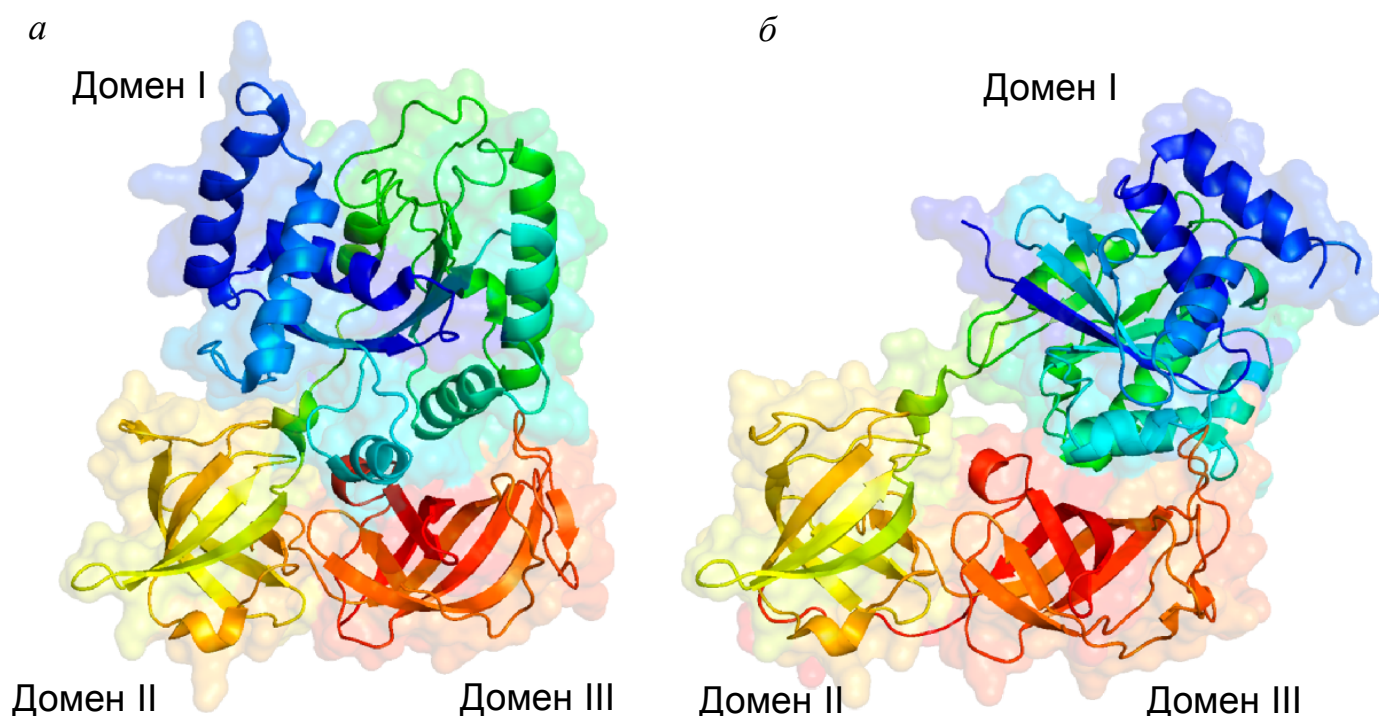


Рис.1.2. Схематична презентація кристалічних структур (а) eEF1A дріжджів (PDB:1G7C) та (б) eEF1A2 з м'язів кроля (PDB:4C0S)

Трансляційна функція ізоформ eEF1A полягає у забезпеченні коректної кодон-антикодонової взаємодії мРНК і тРНК. Для цього, eEF1A*ГТФ формує комплекс із різними аміноацил-тРНК. Такі комплекси взаємодіють із А сайтом 80S рибосоми, в ході чого відбувається відбір тієї аміноацил-тРНК, антикодон якої відповідає кодону мРНК, що знаходиться в А сайті. Після пересвідчення у правильності відбору, в молекулі eEF1A відбувається гідроліз ГТФ, що забезпечує незворотність процесу. Аміноацил-тРНК залишається в А сайті рибосоми, а білок eEF1A, що перейшов у ГДФ-форму із дещо зміненою конформацією, втрачає зв'язок із рибосомою, а згодом і з аміноацил-тРНК, і дисоціює у розчин. Обмін ГДФ на нову молекулу ГТФ

може відбуватися спонтанно і повільно, але практично завжди в клітинах цей процес стимулюється комплексом факторів нуклеотидного обміну eEF1B. Після підзарядки новою молекулою ГТФ, eEF1A може брати участь у новому раунді елонгації поліпептиду на рибосомі.

Виходячи із загальних міркувань, трансляційні функції ізоформ eEF1A1 і eEF1A2, що експресуються у тканинах взаємовиключно, не повинні суттєво відрізнятися. Це було підтверджено в досліджах із трансляції *in vitro* [55]. Але деякі особливості взаємодії ізоформ із іншими компонентами апарату трансляції все ж існують. Так, спорідненість eEF1A2 до тРНК є дещо більшою, ніж eEF1A1 [56]. Константа швидкості дисоціації ГДФ від eEF1A1 є в декілька разів вищою, ніж для eEF1A2 [55]. eEF1A1 має нижчу афінність до EF1B α , ніж eEF1A2 [57], і взагалі, в цій роботі зроблено припущення, що eEF1A2 більше залежить від факторів нуклеотидного обміну, ніж eEF1A1. У цьому зв'язку цікавим може бути спостереження, що швидкість елонгації поліпептидного ланцюгу (транзитний час рибосоми) є меншою у нейронах, де експресується тільки eEF1A2, ніж у гліальних клітинах, де функціонує тільки eEF1A1 [58,59].

Отже, деякі деталі у виконанні ізоформами eEF1A1 і eEF1A2 трансляційної функції можуть відрізнятися, і це, наприклад, може забезпечувати більш повільний, і, як наслідок, більш точний синтез білків у нейронах. Але загальна трансляційна функція є тією ж самою у eEF1A1 і eEF1A2.

eEF1A виконує багато допоміжних функцій в клітині, наприклад, він залучається до сперматогенезу [4], прогресії клітинного циклу [5], шаперон-опосередкованої аутофагії [6], апоптозу [7] і ліпотоксичної клітинної смерті [8]. Також, він пов'язаний з протеолізом [9] та модуляцією цитоскелета [10]. Таким чином, eEF1A може бути важливою сполучною ланкою, що об'єднує різні клітинні процеси в цитоплазмі як фізично, так і функціонально. Те, яким чином eEF1A розподіляється між різними процесами в клітині, залишається

неясним. В принципі, хоча ізоформи eEF1A і можуть брати участь в відмінних клітинних процесах, все ж таки можна було б очікувати схожості функцій, які виконуються двома дуже схожими білками. Проте недавні повідомлення показали можливість виняткової участі конкретної ізоформи eEF1A в комплексах як з трансляційними, так і нетрансляційними партнерами. Наприклад, на відміну від eEF1A1, не вдалося виявити взаємодію eEF1A2 з ГТФ-обмінюючою субодиницею фактора елонгації eEF1B в дріжджовій подвійній системі мутантів [60]. Що стосується неканонічних ролей, було виявлено, що білок eEF1A2 має більшу здатність, ніж eEF1A1, до взаємодії з SH2 і SH3 доменами різних сигнальних молекул [61]. eEF1A2, а не eEF1A1, специфічно зв'язує пероксіредоксін 1, що сприяє стійкості клітин від окисного стресу [62], а також взаємодіє з пухлинним супресором p16^{INK4a} [63].

Незважаючи на те, що ізоформа eEF1A2 зазвичай не присутня в інших тканинах, крім м'язової та нервової, було виявлено значно підвищений рівень її експресії в людських карциномах різної локалізації [64]. Зокрема, було визначено, що eEF1A2 надекспресується приблизно в 30% пухлин яєчника [65]. Ці дані було підтверджено результатами, отриманими на матрицях у 500 зразках пухлин яєчника людини, які показали високий рівень експресії eEF1A2 приблизно в 30% всіх первинних пухлин яєчників [66]. Приблизно 50% серозних, 30% ендометріальних, 19% муциозних, і 8% світлоклітинних пухлин демонстрували підвищений рівень експресії eEF1A2. Ектопічна експресія eEF1A2 в клітинах світлоклітинної карциноми SK-OV-3 підвищувала їх проліферативну активність та здатність до формування пухлиноподібних сфероїдів в крапельній культурі клітин [66]. Більш того, встановлено, що надлишкова експресія eEF1A2 призводила до набування фібробластами миші (NIH3T3) онкогенного потенціалу, як видно із значного прискорення росту карциноми яєчників в ксенографтних мишах [66].

В клітинах раку молочної залози таких як аденокарцинома (MCF-7 і

MDA-MB-361) та карцинома молочної залози (T-47, MDA-MB-453, і DU 4475) спостерігалися суттєві зміни в експресії eEF1A2 (приблизно в 10-100 разів) [67]. Також, помірне або значне збільшення експресії eEF1A2 спостерігалось в 40 з 63 пухлин молочної залози людини [68]. Крім того, було виявлено високий рівень білка eEF1A2 в 60% первинних пухлини молочної залози, який не залежав від присутності маркера HER-2, розміру пухлини, стану лімфатичних вузлів, і експресії естрогенового рецептора. Було зроблено висновок, що eEF1A2 може бути важливим прогностичним маркером раку молочної залози [69].

У тканині раку легені було проведено комбінаторний аналіз за допомогою геномно/транскриптомних мікрочіпів, протеоміки та тканинних мікрочіпів, за допомогою якого ідентифіковано 45 183 потенційних онкогенів. З них 587 генів (31%) були відібрані в шести різних типах ліній аденокарциноми легенів (H23, H229, H1792, SK-LU-1, H522, і H1563). З них відібрали 42 білки, що виявилися надекспресованими в ракових клітинах в порівнянні з нормальними клітинами [70]. Нарешті, були визначені чотири гена (PRDX1, EEF1A2, CALR і KCIP-1), в яких підвищена експресія білка корелювала з підвищеним рівнем відповідної мРНК. Аналіз зразків аденокарциноми легені за допомогою тканинних мікрочіпів показав надекспресію генів EEF1A2 і KCIP-1, яка корелювала із ступенем злоякісності пухлин, стадією захворювання та меншою виживаністю пацієнтів.

Існують також дані, що eEF1A2 надекспресується та проявляє онкогенні властивості у пухлинах іншої локалізації [65]. Природа онкогенної дії eEF1A2 достеменно не виявлена, але відомо, що онкогенність eEF1A2 скоріш за все не пов'язана з ампліфікацією гена, мутаціями в кодуючій послідовності, або змінами в метилуванні гена, тобто пов'язані з раком властивості можуть бути притаманні білковій молекулі як такий. Відомо, що eEF1A2 індукує продукцію філоподій в клітинних лінях гризунів і людини, і

підсилює клітинну інвазію і міграцію [71,72], тобто його роль може бути пов'язана з участю у ремоделюванні актину і рухливості клітин. Також, на відміну від eEF1A1, eEF1A2 проявляє антиапоптозну дію [11,62,73–75].

Серед причин різниці функціональної поведінки двох дуже гомологічних білків можуть бути їх різна просторова організація та різна здатність до взаємодії із певними клітинними партнерами. Отже, ціллю нашої роботи і було виявити структурний фундамент функціональної різниці ізоформ eEF1A1 і eEF1A2, а також показати, як це може впливати на взаємодію обох ізоформ із такими білками-партнерами, як кальмодулін, актин і Sgt1.

1.3 Кальмодулін. Структура і функції

Кальмодулін - це білок із молекулярною масою 16,7 кДа, присутній у всіх еукаріотичних клітинах. Кальмодулін є одним із найбільш розповсюджених кальцій-зв'язуючих білків [76]. В присутності іонів кальцію відбувається конформаційна перебудова молекули кальмодуліну, яка і обумовлює функцію цього білка (рис.1.3).

Кальмодулін бере участь у різних клітинних процесах, які включають запалення, метаболізм, апоптоз, скорочення гладких м'язів, внутрішньоклітинний рух, короткострокову і довгострокову пам'ять, ріст нервів, рухливість клітин, ріст, проліферацію, імунну відповідь та інші [77]. Існують два механізми біологічної дії кальмодуліну. Перший полягає в тому, що цей білок активує Ca^{2+} /CaM залежну кіназу, і відповідно впливає на всі процеси, що контролює ця кіназа. Другий механізм - це безпосереднє зв'язування кальмодуліну із білками-мішенями [78]. На теперішній час відомо більше 40 мішеней кальмодуліну в клітинах людини.

Відомо, що eEF1A різного походження також здатен зв'язувати кальмодулін у кальцій-залежний спосіб [79–82]. Тому, за наявності взаємодії

між CaM і eEF1A у вищих еукаріотів, формування таких комплексів може дозволити безпосередньо порівняти наявність і ступінь взаємодії з CaM ізоформ eEF1A1 і eEF1A2.

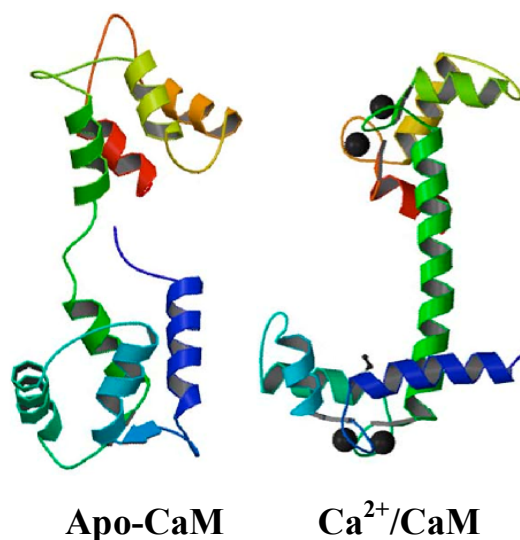


Рис. 1.3. Конформаційна перебудова кальмодуліну у присутності іонів кальцію

1.4. Актин. Структура і функції. Взаємодія з eEF1A

Актин – це білок цитоскелету, що може існувати у глобулярній формі (а), у якості філаментів (б) або навіть пучків цих філаментів (в). Ці типи представлено на рис. 1.4.

Актиновий цитоскелет є критичним компонентом для динаміки клітинної поведінки, наприклад для зміни форми і рухливості клітин [83]. Актинові філаменти сприяють клітинній (в тому числі нейронній) фізіології в загальному контексті - в тому числі у визначенні форми та морфології практично всіх клітин, сприяючи як хемотаксису, так і рухливості клітин, регулюючи розростання невритів, синаптичні зв'язки, а також везикулярний рух і організовуючи численні інші клітинні функції і поведінку організму [84]. Регуляція актинових філаментів (F-актину) цитоскелету залежить від

різноманітних молекулярних механізмів, які пов'язані з актин-асоційованими білками, найбільш відомі з яких - Arp 2/3 комплекс та ADF/кофілін, також з модуляторами сигналіngu – родиною Rho ГТФаз і з різноманітними позаклітинними лігандами і рецепторами [85–87]. Загалом, ці молекулярні компоненти контролюють динаміку F-актину як в фізіологічному так і в патологічному контекстах.

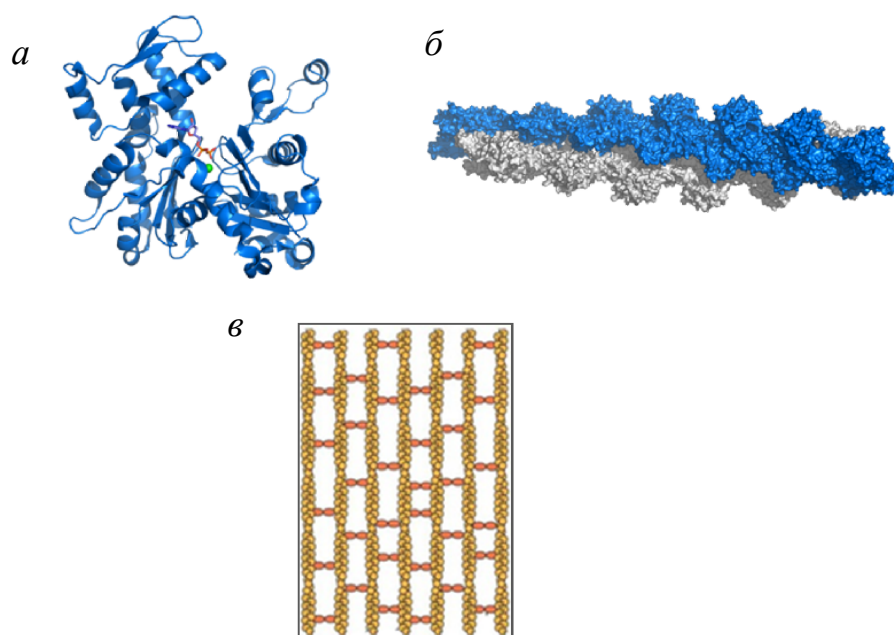


Рис. 1.4. Форми існування актину. *a* – глобулярна форма, *б* - філаменти, *в*- актинові пучки

Актинові пучки - це сукупність лінійних актинових філаментів, які зшиваються “actin-bundling” білками. Механізми збірки і динаміки таких пучків достеменно не зрозумілі [83]. До переліку різних “actin-bundling” білків входять, наприклад, білки фасцин та роздвоєний в щетинках дрозофіли, вілін, фімбрин та еспін в мікрворсинках кишківника, та еспін і фімбрин в стереоциліях внутрішнього вуха [88–92]. Звісно, цей перелік є далеко не вичерпним. Зокрема, здатність зв'язувати F-актин і формувати

пучки має і eEF1A нижчих еукаріотів, таких як *Dictyostelium discoideum* [93], *Tetrahymena thermophila* [94] та *Saccharomyces cerevisiae* [95]. Вплив eEF1A на динаміку цитоскелету було показано також на ооцитах морського їжака [96] та *Xenopus* [97]. Також був продемонстрований інгібуючий ефект кальмодуліну на утворення актинових пучків [96,98] та формування димеру eEF1A, необхідного для утворення актинових пучків [82]. Були також отримані непрямі свідчення на користь впливу eEF1A на ремоделінг актинового цитоскелету у клітинах ссавців. Наприклад, було показано, що ізоформа A2 активує Akt та стимулює Akt-залежне ремоделювання актину, інвазію і клітинну міграцію [71] та стимулює утворення філоподій за рахунок активації PI4KIIIbeta та, відповідно, збільшення кількості цитозольного та мембран-зв'язаного фосфатидилінозиту-4,5 біфосфату [72].

1.5 Sgt1. Структура і функції

Продукт гена SGT1 (супресор G2 алелю Skp1) був вперше ідентифікований в клітинах дріжджів як білок, який може зв'язувати SKP1 і активувати одночасно CBF3 кінетохор і SCF убіквітинлігазиний комплекс. У середовищі з низькою іонною силою, білок Sgt1 має тенденцію до утворення димерів. Білок складається з трьох структурно незалежних доменів: TPR (tetraatricopeptide repeats domain), CS (Sgt1-containing domain) та SGS (Sgt1-specific domain), і двох менш консервативних варіабельних областей (VR1 і VR2) [99].

Білок Sgt1 зв'язує деякі кальцій-зв'язуючі білки сімейства S100 [100] і при підвищених концентраціях Ca²⁺ і в присутності S100A6, транслокується в ядро клітини [101,102]. Sgt1 бере участь в збірці кінетохора і в прогресії клітинного циклу [103,104]. Крім того, як ко-шаперон, Sgt1 зв'язується з деякими білками теплового шоку, такими як Hsp90 і Hsp70 [105–107]. Його

взаємодія з Hsp90 [105,108] може грати певну роль в правильному функціонуванні кінетохорного комплексу CBF3 [109,110]. Важливо відзначити, що в рослинах комплекс SGT1 з його ко-шаперонами допомагає підтримувати належний рівень деяких резистентних (R) білків і бере участь у протівірусному захисному сигналінгу [111–114]. Крім того, Sgt1 грає певну роль в «господар-незалежній» резистентності [115], що дозволяє припустити, що цей білок може бути загальним фактором в боротьбі з хворобами, стримуючи вірусне розмноження за ще невідомим механізмом [116].

Оскільки eEF1A також може відігравати певну роль у розповсюдженні вірусів, досить цікаво вивчити, чи взаємодіє цей білок з Sgt1, і, якщо так, то чи буде однаковою взаємодія з цим білком обох ізоформ eEF1A.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали

У роботі було використано такі реактиви: коктейль інгібіторів протеаз “Complete” (“Roche”, США); Трис, HEPES, SDS (“Helicon”, Росія); акриламід (“Bio-Rad” США); BSA (“Pierce” США); β-меркаптоетанол, гліцерин, (“Merck”, Німеччина); TEMED, PMSF (фенілметилсульфонілфлуорид), бромфеноловий синій, кумасі R-250, кумасі G-250, N,N-метиленбісакріламід, DTT, (“Serva”, Німеччина); Immobilon Western хемілюмінесцентний субстрат (Millipore, США); PVDF мембрана (“Millipore” США); триптон, дріжджовий екстракт (“Difco”, США); поживне середовище DMEM, сироватка теляти, антибіотики пеніцилін/стрептоміцин, трипсин, PBS, DAPI, (“Sigma-Aldrich”, США.); антитіла проти eEF1A, актину (“Upstate”, США); антитіла проти His-tag і GST тРНК дріжджів (“Boehringer Mannheim”, Німеччина), β-меркаптоетанол, гліцин, гліцерин, NH₄Cl, MgCl₂, (“Merck”, Німеччина); акриламід (двічі перекристалізований), TEMED, PMSF, (“Serva”, Німеччина); ДЕАЕ-целюлоза, фосфоцелюлоза P11 (“Whatman”, Великобританія); персульфат натрію, бромфеноловий синій, кумасі R-250 та G-250, гідроксиапатит Macro-Prep ceramic HA (type I) , BioGel A-5m (“Bio-Rad”, США); Q-сефароза, SP-сефароза, сефакрил S-400, (“Pharmacia”, Швеція); нітроцелюлозні фільтри “Sartorius-GmbH” (діаметр пор 0,45 μm) (Німеччина); сцинтиляційна рідина OptiPhase “HiSafe” (“SED”, Великобританія); центрифужні пробірки з мембраною для концентрування білка Centricon (“Amicon”, США); Решта реактивів було маркіровано, як “х.ч” або “ос.ч”. Для

приготування розчинів використовували деіонізовану воду.

У роботі було використано наступне обладнання: Препаративна центрифуга 5810R (“Eppendorf”, Німеччина), центрифуги Biofuge Pico та Fresco (“Heraeus”, Німеччина), Спектрофотометр BioMate 5 (“Thermo Electron”, США); лічильник радіоактивності, рентгенівська плівка (AGFA), змішувач Vortex (BioSan), прилад для вологого електропереносу (“Amersham Bioscience”, США), горизонтальний шейкер Mini Rocker MR-1 (BioSan), ультразвуковий гомогенізатор (BioLogics, Inc.), термостатуємий шейкер (BioSan), мікроскоп Leica (Carl Zeiss, Австрія), атомно-силовий мікроскоп Molecular Force Probe-3D (MFP-3D) (Asylum Research, USA), конфокальний мікроскоп Zeiss LSM510, фільтрувальна установка (Sartorius, Німеччина), рН-метр “Mettler Toledo, спектрополяриметр JASCO-600 (Japan), скануючий мікрокалориметр SCAL-1 (SCAL Co. Ltd., Росія), флуориметр Cary Eclipse (Varian), ультрацентрифуга Beckman Optima XL-I, малокутова камера BL-15A Photon Factory (Цукуба, Японія), центрифуга “Beckman” J-21C.

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Отримання eEF1A1 з печінки кроля. Всі процедури проводили при +4оС. Приготування постмітохондріального супернатанту. Печінку кроля гомогенізували в буфері, що містив 50 мМ Tris-HCl рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 15 % гліцерин, 6 мМ β-меркаптоетанол, 1 мМ PMSF, у гомогенізаторі PT-1 протягом 1 хвилини. Гомогенат центрифугували 40 хвилин при 11000 об/хв. (центрифуга “Beckman” J-21C).

Гель-фільтрація на сефакрилі S-400. Постмітохондріальний супернатант наносили на колонку з сефакрилом S-400, попередньо урівноважену буфером А: 25 мМ КН₂РО₄ рН 7.5, 1 мМ MgCl₂, 15% гліцерин, 6 мМ β-

меркаптоетанол. Гель-фільтрацію проводили при швидкості струму буферного розчину 80 мл/год. Активність eEF1A визначали по реакції ГДФ/[³H]ГДФ обміну. Найбільш активні фракції об'єднували.

Хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі. Білковий розчин після об'єднання активних фракцій наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою DE-52, попередньо врівноважену буфером А. Колонку промивали тим же буфером.

Хроматографія на SP-сефарозі. Фракцію білків, що не зв'язалися з колонкою, одразу наносили на колонку з SP-сефарозою, урівноважену буфером А. Для видалення слабо зв'язаних білків колонку промивали буфером А та буфером А, що містив 70 мМ КСl, до зникнення оптичного поглинання на довжині хвилі 280 нм. Для елюції білків, зв'язаних з SP-сефарозою, використовували лінійний градієнт КСl від 70 до 320 мМ у буфері А. Фракції, найбільш збагачені на eEF1A, згідно з результатами електрофорезу в 12% денатуруючому ПААГ, об'єднували та діалізували 12 год проти буферу Б (буфер А з 20% вмістом гліцерину).

Хроматографія на гідроксиапатиті. Розчин після діалізу наносили на колонку з гідроксиапатитом, попередньо врівноважену буфером Б. Для видалення слабо зв'язаних білків колонку промивали тим же буфером та буфером Б, що містив 50 мМ КН₂РО₄, до зникнення оптичного поглинання при довжині хвилі 280 нм. Елюцію білків проводили в градієнті КН₂РО₄ від 50 до 180 мМ в буфері Б. Чистоту фактора елонгації визначали методом електрофорезу в 12% ПААГ в денатуруючих умовах. Найбільш активні і збагачені фракції об'єднували, діалізували 12 год проти буферу В (буфер А з 25% вмістом гліцерину).

Концентрування. Розчин eEF1A1 після діалізу наносили на колонку з SP-сефарозою (1 мл), урівноважену буфером В. Білок елюювали буфером В, що містив 0,5 М КСl. Концентрований розчин очищеного eEF1A1 діалізували далі 12 год в буфері складу: 25 мМ Tris-HCl рН 7.5, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ КСl, 25% гліцерин, 2 мМ ДТТ. Зберігали в рідкому азоті протягом року без втрати

активності.

Концентрацію очищеного eEF1A1 визначали за поглинанням при довжині хвилі 280 нм, приймаючи, що $\varepsilon^{1\%} = 0,9$ о.е.

2.2.2 Отримання eEF1A2 з м'язів кроля.

eEF1A2 виділяли за схемою, аналогічною схемі виділення eEF1A1 (див. розділ 2.2.1), за виключенням хроматографії на сефакрилі S-400 (постміхондріальний супернатант одразу наносили на колонку з ДЕАЕ-целюлозою). На відміну від eEF1A1, eEF1A2 при хроматографії на SP-сефарозі елюювався одним піком при концентрації 190 мМ КСl.

Концентрацію білку визначали за поглинанням при довжині хвилі 280 нм, приймаючи, що $\varepsilon^{1\%} = 0,838$ о.е.

Із 100 г м'язів кроля в середньому одержували 4 мг eEF1A2. Ступінь очистки eEF1A2 за даними електрофорезу в 12% ПААГ в денатуруючих умовах складала 95%.

2.2.3 Визначення активності eEF1A в реакції ГДФ/[³Н]ГДФ обміну.

Інкубаційна суміш в об'ємі 78 μ л містила: 40 мМ Tris-HCl pH 7.5, 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NH₄Cl, 20 μ М [³Н]ГДФ (1500Ci/mol), 25% гліцерин. Останнім у суміш вносили частково чи високоочищений eEF1A, кінцева концентрація якого складала 0,2-2 μ М.

Реакцію проводили протягом 5 хвилин при +37°C і зупиняли додаванням 1 мл холодного буферного розчину: 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 10 мМ MgCl₂, 100 мМ NH₄Cl, 10 мМ β -меркаптоетанол.

Розведені проби відразу наносили на нітроцелюлозні фільтри ("Sartorius", діаметр пор 0,45 μ м) і обережно тричі промивали по 1 мл того ж буферу.

Фільтри висушували, вміст радіоактивності визначали в толуольному сцинтиляторі "ЖС-103" на лічильнику RackBeta 1219 ("LKB-Wallac").

Ефективність обрахунку [^3H] на фільтрах складала 25%.

2.2.4 Отримання кальмодуліну з мозку великої рогатої худоби.

Кальмодулін отримували за методикою, що описана в [117]. Всі процедури за виключенням високотемпературної обробки та гідрофобної хроматографії на феніл-сефарозі проводили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Приготування постмітохондріального супернатанту. Мозок корови подрібнювали та гомогенізували в двох об'ємах буферу для гомогенізації (50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 2 мМ β -меркаптоетанол, 1 мМ EDTA, 0,5 мМ PMSF) у гомогенізаторі PT-1 протягом 1 хвилини. Гомогенат центрифугували 40 хв при 11000 об/хв (центрифуга "Beckman" J-21C).

Осадження білків шляхом висолювання та ізоелектропреципітації. До профільтрованого через марлю супернатанту за постійного перемішування додавали $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 60% насичення. Далі за допомогою 6М оцтової кислоти доводили pH розчину до 4.1, що є ізоелектричною точкою CaM, і залишали не менше ніж на 2 год для формування осаду. Преципітовані білки осаджали центрифугуванням 30 хв при 11000 об/хв (центрифуга "Beckman" J-21C). Осад розчиняли в мінімальному об'ємі буферу, що містив 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 2 мМ β -меркаптоетанол. pH розчину доводили до 7.5 1М розчином Tris і знову центрифугували за тих самих умов для видалення нерозчинних білків.

Високотемпературна обробка. Отриманий супернатант інкубували невеликими порціями по 5 хв на киплячій бані й охолоджували на льоду. Для осадження денатурованих білків об'єднаний розчин центрифугували 60 хв при 3500 об/хв.

Хроматографія на феніл-сефарозі. Дану процедуру проводили за кімнатної температури. До отриманого на попередній стадії супернатанту додавали 1М CaCl_2 до кінцевої концентрації 5 мМ, нагрівали його до кімнатної температури та наносили на колонку з феніл-сефарозою CL4B, що

була врівноважена буфером А (50 мМ Tris-HCl рН 7.5, 2 мМ β -меркаптоетанол, 0,1 мМ CaCl_2). Колонку відмивали від білків, що не зв'язувалися, буфером А та буфером А, який містив 0,5 М NaCl, до зникнення оптичного поглинання при довжині хвилі 280 нм. Елюцію кальмодуліну здійснювали буфером Б (50 мМ Tris-HCl рН 7.5, 2 мМ β -меркаптоетанол, 3 мМ EGTA). Збирали фракції, що мали найбільшу оптичну густину при 280 нм.

Концентрування. Розчин CaM, отриманий в результаті проведення хроматографії на феніл-сефарозі, наносили на колонку з Q-сефарозою (1 мл), попередньо врівноважену буфером Б. Білок елюювали буфером Б, що містив 0,5 М KCl. Концентрований розчин CaM діалізували 12 год проти буферу, що містив 25 мМ Tris-HCl рН 7.5, 10% гліцерин, 6 мМ β -меркаптоетанол.

Концентрацію CaM визначали за поглинанням при довжині хвилі 280 нм приймаючи, що $\epsilon 1\% = 0,177$ о.е.

2.2.5 Виділення та очищення доменів eEF1A.

Поживні середовища для росту бактеріальних клітин. Середовище Лурія Бертрані (LB) містило 1% бактотриптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl рН 7.0. Для приготування LB агару до середовища LB додавали бактоагар (1,5%) .Ампіцилін готували в концентрації 100 мг/мл у дистільованій воді та зберігали при -20°C . Використовували в кінцевій концентрації 50 мкг/мл.

Трансформація бактеріальних клітин. До компетентних клітин додавали 100 нг вектору рGEX-5x-1 зі вставками ДНК, що кодували домени eEF1A (D1-GST, D1+2-GST, D2+3-GST), перемішували та інкубували на льоду 30 хв. Після цього, пробірку з пробією переносили у водяну баню та витримували 1,5 хв. при температурі 42°C . Після цього, пробу знов охолоджували на льоду (5 хв) та додавали до клітин попередньо розігріте до 37°C середовище LB та інкубували у термостаті 1 годину при 37°C . Після

цього клітини висівали на чашку Петрі з LB агаром, який містив 100 мкг/мл ампіциліну. Бактерії вирощували у термостаті протягом ночі при 37°C.

Індукція експресії рекомбінантних білків в клітинах E. coli. 20 мл середовища LB з ампіциліном інокулювали клітинами BL21(DE3)pLysE *E. coli*, які було трансформовано вектором pGEX-5x-1 з вставками, що кодували домени eEF1A та вирощували протягом ночі 37°C при інтенсивному перемішуванні. Суспензію клітин розводили в 1 літрі LB середовища з додаванням антибіотику та культивували за тих же умов до досягання оптичної густини $OD_{600} = 0,6$. Після цього, для індукції експресії рекомбінантного білка, в середовище додавали розчин IPTG до кінцевої концентрації 1мМ. Інкубацію проводили протягом 5 годин при 30°C. Після інкубації клітини збирали центрифугуванням при 4000g впродовж 20 хв та заморожували осад при -70°C.

Очищення рекомбінантних білків методом афінної хроматографії. Розчиняли осад клітин на льоду в буфері PBS (140 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,8 мМ KH_2PO_4). Лизис клітин здійснювали за допомогою ультразвукового дезінтегратору, 5 раундів по 15 сек. Екстракт збирали центрифугуванням при 10000g 5 хв. Після центрифугування, супернатант наносили на хроматографічну колонку з глутатіон агарозою зі швидкістю 800 мл/хв, попередньо урівноваженою буфером PBS. Носій промивали буфером PBS. Зв'язаний білок елюювали буфером для елюції (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 20 мМ глутатіон). Очищений білок діалізували проти 1 л буфера, що містив 30 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 15% гліцерин, 1 мМ $MgCl_2$, 6 мМ меркатоетанол, упродовж ночі при 4°C. Концентрацію білка вимірювали при $\lambda=280$ нм. Чистоту препарату перевіряли методом електрофорезу у ПААГ у денатуруючих умовах за методом Лемлі. Очищений препарат білка зберігали у рідкому азоті.

2.2.6 Культивування клітин HEK293. Клітинну лінію HEK293 (нирка ембріона людини) культивували при 37°C у зволоженій атмосфері, що містила 5% CO₂. Клітини вирощували в середовищі DMEM з додаванням 10% FBS (Life Technologies, Inc.), L-глутаміну (2 мМ), пеніциліну (50 U/мл) та стрептоміцину (0,25 мкг/мл). У випадку культивування клітин HEK293, що стабільно надекспресували eEF1A1 або eEF1A2, додатково добавляли генетицин (Г418) (200мкг/мл). При досягненні клітинами конфлуентності 70% - 80% їх пересівали у розведенні 1 до 20. Відбирали культуральне середовище, клітини промивали PBS та інкубували в розчині Трипсин-ЕДТА (Sigma, США) протягом 2 – 4 хв при кімнатній температурі. Потім клітини ресуспендували в середовищі DMEM з додаванням усіх компонентів та розносили на нові культуральні чашки.

2.2.7 Молекулярно-динамічні дослідження. Трьохмірні моделі eEF1A1 і eEF1A2 людини були побудовані за допомогою сервера Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>). Отримані моделі склалися з 442 амінокислотних залишків від Gly2 до Lys443. Амінокислотні залишки дріжджового та архебактеріального факторів елонгації, які гомологічні залишкам 1 та 444-462(3) eEF1A1 і eEF1A2 людини, не визначені рентгенографічним методом, тому ці залишки не включені у остаточні моделі. Моделі обох білків складаються з трьох доменів. До першого домену віднесені амінокислотні залишки Gly2-Pro238, до другого - Pro241-Ser329, до третього - Gln335-Lys443 (6). Першій домен містить 8 β-тяжів, оточених 8 α-спіралями. Другий та третій домени мають вигляд β-діжок з 9 та 7 β-тяжів, відповідно. При цьому домени I і III, а також II і III розташовані щільно один до одного, тоді як між доменами I і II існує досить об'ємний простір, обмежений з боку домену I петлею Arg69-Leu77, а з боку домену II – послідовністю His295-Gly305.

Для врахування можливого впливу відомих пост-трансляційних

модифікацій водневі атоми аміногруп залишків лізину 36, 79, 318 в eEF1A1 і 55 і 165 в eEF1A2 було замінено на триметильні групи, а 55 і 165 лізини в eEF1A1 замінено на N-диметиллізини. Аміногрупи залишків Gln301 і Gln374 замінено на гліцерилфосфорилетаноламінні (GPE). Моделювання молекулярної динаміки проводили за допомогою пакету програм Gromacs 3.1.4. Силове поле Gromos 96 43a2 модифікували з додаванням параметрів для залишків N-триметиллізину та L-глутаміл-5-гліцерилфосфорилетаноламіну. Дані топології для нестандартних амінокислотних залишків одержані з використанням серверу PRODRG2 <http://davamc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>.

З використанням програми pdb2gmx пакета Gromacs 3.1.4 до неуглецевих важких атомів приєднані атоми водню. Залишки аргініну, лізину, диметиллізину та N-кінцева аміногрупа були протоновані і отримали заряд +1. Карбоксильні групи залишків аспарагінової і глютамінової кислот та C-кінцевого залишку залишені депротонованими з зарядом -1. В результаті білок одержав сумарний заряд +5. Вибір атому азоту залишків гістидину, до якого приєднували протон, здійснювали з урахуванням оточення, так, щоб уникнути занадто малих відстаней від атома водню до інших атомів, з одного боку, і сприяти утворенню водневих та електростатичних ван-дер-ваальсових зв'язків – з іншого. Залишки гістидину 26, 136, 296, 349, 364 та 367 протоновані в положенні N σ , тоді як His7, 15, 95, 197 та 295 – в положенні N ϵ .

Моделі білків розміщували у віртуальному боксі у формі зрізаного октаедру так, щоб відстань від білка до стінок боксу не перевищувала 1,5нм. Об'єми боксів були 1253.76 і 1303.49 nm³ для eEF1A1 і eEF1A2, відповідно. Різниця в об'ємі боксів пояснюється різною орієнтацією модифікацій GPE і присутністю різних за розміром амінокислотних залишків (Mly/M31165, Ala/Pro206, Thr/Glu217, Asp/Glu220, M31/Lys318) на поверхні eEF1A1 і eEF1A2. Бокс заповнювали моделями молекул води SPC (Single Point Charge). 72 молекули води замінили на іони натрію і 77 – на іони хлору для

нейтралізації заряду системи і для моделювання іонної сили 0,1. Мінімізацію енергії білка здійснювали чергуванням алгоритмів “скоріший спуск” та “кон’югований градієнт”. Врівноваження молекул розчинника проводили 500пс, при цьому атоми білку були прив’язані до своїх вихідних координат. Вихідні швидкості атомів генерували з розподілення Максвела. Інтегрування рівняння руху здійснювали з кроком $2 \cdot 10^{-15}$ с. Для електростатичних взаємодій встановлена границя 0,9нм, тоді як для ван-дер-ваальсових взаємодій встановлена подвійна границя: взаємодії на відстані до 0,9 нм враховувалися на кожному кроці інтегрування, а на відстані від 0,9 до 1,4нм – на кожному десятому кроці. Електростатичні взаємодії за межами встановленої границі враховували згідно алгоритму PME (Particle-Mesh Ewald sum). Температуру та тиск підтримували рівними 298К и 1атм за методом Берендсена. Після врівноваження молекул розчинника проводили додаткову мінімізацію енергії молекул розчинника. Основне моделювання молекулярної динаміки здійснювали з тими ж параметрами, що і врівноваження розчинника, за винятком обмеження координат атомів білка та контролю тиску. Координати записували у вихідний файл траєкторії кожну пікосекунду. Час врівноваження системи визначали за графіком середньоквадратичного відхилення поточної конформації від початкової як час досягнення плато. Час врівноваження не враховували при розрахунку середньоквадратичних флуктуацій C_{α} -атомів. Одержано шість траєкторій для eEF1A1 - 1 (10000 ps), 2 (10466 ps), 3 (7110 ps), 4 (10514 ps), 5 (9920 ps) and 6 (10297 ps), і сім траєкторій для eEF1A2 - 7 (10000 ps), 8 (10000 ps), 9 (10000 ps), 10 (4015 ps), 11 (10417 ps), 12 (10197 ps), and 13 (10000 ps). Різні початкові швидкості були обрані для різних траєкторій.

2.2.8 Молекулярне моделювання білок-білкових комплексів. Просторову структуру TPR домену білка SGT1 людини було передбачено сервером I-Tasser методом одночасної багатопотоковості [118]. Як шаблон для

моделювання eEF1A1 ссавців використовували структуру дріжджового eEF1A (PDB ID: 1IJF) [119]. Модель була використана для молекулярного докінгу. Докінг аналіз проводили з використанням веб-серверу ClusPro 2.0 (<http://cluspro.bu.edu/>) [120–122]. При моделюванні, орієнтація eEF1A зберігалася незмінною, в той час коли TPR домену SGT1, як ліганду, було дозволено обертання і переміщення. Програма генерує ряд уявних комплексів, і оцінює їх поверхневу комплементарність за допомогою багатоступінчатого протоколу, який включає в себе докінг жорсткого тіла, фільтрацію, базовану на енергії, кластеризацію і оптимізацію геометрії. Були відібрані кращі 30 конформацій з найнижчими енергіями і з найбільшими за розмірами кластерами. Оскільки не було попередньої інформації щодо хімічної природи взаємодії, 10 кращих рішень кластерів із збалансованого ранжирування варіантів були відібрані для подальшого аналізу. Остаточні конформації були відібрані на основі балів і узгодження з біохімічними даними. Аналіз взаємодіючих інтерфейсів було зроблено за допомогою веб-серверу PDBePISA (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/) [123]. Стереохімію вихідних моделей і докінгових комплексів було перевірено з використанням пакета MolProbity [124]. Рисунки робилися в PyMOL версії 1.5 (DeLano Scientific <http://www.pymol.org/>). Розрахунки електростатичного поверхневого потенціалу проводилися шляхом вирішення рівняння Пуассона-Больцмана в PyMOL адаптованому PoissoneBoltzmannSolver (APBS) інструменті [125]. Аналіз взаємодіючих інтерфейсів проводився, використовуючи програмне забезпечення VMD [126], вбудовану мову сценаріїв Python.

Моделювання eEF1A1 за гомологією було проведено за допомогою онлайн ресурсу MODELLER [127], що міститься на UCSF RBVI. Кристалічна структура eEF1A2 (PDB ID:4C0S) була використана в ролі шаблону. Програмне забезпечення UCSF Chimera 1.10.2 [128] використовувалося як графічний інтерфейс для запуску програми MODELLER онлайн.

Молекулярний докінг виконувався в програмі Molsoft ICM Pro 3.8-3 [129]. Алгоритм розрахунку засновувався на силовому полі ECEPP/3, з урахуванням вільної енергії сольватації та вкладу ентропії. Конформаційні вибірки ґрунтувалися на алгоритмі Монте-Карло – процедура з випадковим вибором певної конформації у внутрішньому координатному просторі, з послідовним переходом до нової випадкової позиції, незалежно від попередньої позиції, але відповідно до заданого безперервного розподілу ймовірностей. Для кожного стану була виконана додаткова повна локальна мінімізація.

2.2.9 Гель-електрофорез білків за неденатуруючих умов. Горизонтальний неденатуруючий гель, що містив 7% поліакриламід та 5% гліцерин, проводили в трис-боратному буфері, рН 7,4 при 100V протягом 2 годин при 25°C в саморобному пристрої. Лунки було зроблено в центральній частині гелю, щоб забезпечити рух білків із риним поверхневим зарядом у різні боки. Перед електрофорезом зразки інкубувалися в буфері для зв'язування 10 хвилин при 37°C. Після електрофорезу, гель фарбували в Кумасі R-250 або проводили Вестерн-блот аналіз в неденатуруючих умовах в Трис-гліциновому буфері, рН 8,3 використовуючи TransBlot Turbo апарат для переносу.

2.2.10 Гель-електрофорез білків за денатуруючих умов. Однакову кількість білків фракціонували за допомогою 12% ПААГ електрофорезу в денатуруючих умовах, вперше описаного Лемлі [130]. Для приготування розділяючого гелю змішували 30% розчин акриламід (акриламід:N,N'метилен біс-акриламід 37.5:1), ddH₂O, 1,5 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 10% розчин ДСН до кінцевої концентрації 375 мМ та персульфат амонію (0,1%). Полімерізація акриламід у ініціювалася додаванням TEMED (0.1 %). Зразки для нанесення готувались наступним чином: 3 частини клітинного лізату чи розчину білка змішувалася з 1 частиною 4x буферу для зразків (125

мМ Трис-НСl, рН 6.8, 20 % glycerol, 4 % ДСН, 0,2 М ДТТ, 0,1 % бромфеноловий синій), прогрівали 5 хв при 95°C. Електрофорез проводили в електрофорезному буфері при фіксованій силі струму 20-30 мА в електрофорезному буфері (25 мМ Трис-НСl, рН 8.3, 195 мМ гліцин, 0,1 % ДСН).

2.2.11 Вестерн - блот аналіз. Білки фракціонували електрофорезом в 12.5% ПААГ за методом Лемлі [130], потім переносили на нітроцелюлозні мембрани. Мембрани блокували 5% сухим знежиреним молоком у PBS-T протягом однієї години з наступною інкубацією з відповідними первинними антитілами. Після цього мембрану промивали буфером PBS-T три рази по 5 хвилин і інкубували ще годину в розчині вторинних антитіл відповідної специфічності з подальшою відмивкою. Після цього, мембрана оброблялася ECL реагентом (Millipore, США) та експонувалася на рентгенівську плівку або детектувалася за допомогою апарату ChemiDoc (Bio-Rad). Денситометричний аналіз сигналів проводили, використовуючи Scion Image.

2.2.12 Ко-преципітація ендогенних клітинних білків та білків з ярликами.

Преципітація з клітин HEK293. Клітини HEK293, що стабільно експресували eEF1A1, культивували, як описано в розділі (2.2.6). Для ко-преципітації eEF1A1 з Sgt1, клітини трансфікували плазмідною ДНК, що кодує Sgt1 з ярликом 3xFLAG (p3xFLAG-CMV-10-Sgt1) [102] або пустим вектором (p3xFLAGCMV-10), що кодує тільки 3xFLAG, використовуючи Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Для преципітації клітинні лізати гомогенізували в буфері, що містив 10 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,1% Тритон X-100, 3 мМ MgCl₂ та коктейль інгібіторів протеаз (Roche). Потім лізати центрифугували при 12000 об/хв на настільній центрифусі Eppendorf та наносили по 250 мкг (концентрацію визначали за методом Бредфорд [131]) на Sgt1-CNBr смолу .

Для ко-імунопреципітації, по 1000 мкг сумарного білка з фракцій супернатантів, отриманих з лізатів клітин НЕК293, що експресували eEF1A1 та Sgt1-3xFLAG чи 3xFLAG, змішували з 40 мкл анти-FLAG агарози (Sigma). Інкубували 2 години при 4°C, потім агарозу промивали 4 рази тим самим буфером. Білки елюювали 0,1М гліцином, рН 3,0, осаджували ацетоном і аналізували вестерн-блотом, використовуючи анти eEF1A антитіла.

In vitro преципітація. Очищений eEF1A1 або лізат з стабільноекспресуючих eEF1A1 клітин НЕК293 наносили на Sgt1-CNBr сефарозу або на CNBr сефарозу (контроль) в буфері, що містив 10мМ Тріс, рН 7,5, 20% гліцерин, 1 мМ MgCl₂, 6мМ β-ME, 0,1% Тритон X-100 та інгібітор протеаз (Roche) при кімнатній температурі. Після двохгодинної інкубації сефарозу промивали тим самим буфером, який містив 50 мМ NaCl. Білки, що зв'язалися, елюювали буфером, що містив 150 мМ NaCl.

His-tag преципітація. 15 мкл Ni-NTA агарози (Qiagen) врівноважували в буфері, що містив 50 мМ Тріс-HCl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ імідазол, 0,05% NP-40, а потім інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі з 20 мкг His-міченого SGT1 або його фрагментів (TPR, TPR-CS або SGS). Незв'язані білки видаляли центрифугуванням (400 g протягом 5 хв). В якості контролю використовували Ni-NTA агарозу без будь-якого білка. Інкубували протягом 1 год при кімнатній температурі з eEF1A1 при повільному перемішуванні. Потім Ni-NTA агарозу промивали тим самим буфером, щоб видалити незв'язаний eEF1A1 і, нарешті, білки, що зв'язалися зі смолою, елюювали буфером, що містив 300 мМ імідазол. Зразки аналізували за допомогою електрофорезу в SDS-ПААГ з подальшим Вестерн-блотом, з антитілами проти eEF1A.

Лізати клітин НЕК293, що надекспресували eEF1A1-His, готували в буфері для лізису, що містив 50 мМ Тріс-HCl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 10 мМ

імідазол і суміш інгібіторів протеаз (Roche). Потім лізати центрифугували при 12000 об/хв протягом 20 хв на настільній центрифугі Eppendorf. Супернатант наносили на Ni-NTA агарозу, врівноважену буфером для лізису. Інкубували 1 год при 4° С при перемішуванні, потім послідовно промивали буфером для промивання I (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM імідазол) і буфером для промивання II (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM імідазол). Після цього, носій врівноважувався буфером для зв'язування (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) з додаванням 1 mM CaCl₂ або 1 mM EGTA. Проби інкубували протягом 1 години при 4° С при перемішуванні і промивали тим же самим буфером. Зв'язані білки елюювали SDS -буфером для зразків і аналізували за допомогою SDS-PAGE.

GST преципітація. Очищений кальмодулін діалізували проти буфера, що містив 30 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20% гліцерин, 1 mM MgCl₂, 6 mM 2-меркаптоетанол з додаванням 1 mM CaCl₂ або 1 mM EGTA і інкубували з GST або GST-злитими доменами eEF1A1, зв'язаними з глутатіон-сефарозою 4B(GE Healthcare). Сефарозу промивали тим же самим буфером три рази. Зразки елюювали зі смоли за допомогою буфера для елюції (20 mM відновлений глутатіон, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Кальмодулін детектували за допомогою анти-кальмодулін антитіл (NovusBio).

15 мкг GST або GST-мічених доменів eEF1A1 інкубували з 20 мкл глутатіон-сефарози протягом 1 год при кімнатній температурі в буфері А (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 6 mM 2-меркаптоетанол). Супернатант видаляли, а носій промивали кілька разів буфером А, після чого інкубували в буфері А, що містив 5% БСА протягом 1 год при кімнатній температурі. Сефарозу промивали п'ять разів буфером А. Потім, актин (15мкг) в буфері, що містив 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂ та 1 mM АТФ, додавали в кожний зразок. Проби інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Супернатант обережно видаляли. Сефарозу

промивали п'ять разів буфером А. Білки елюювали буфером для елюції (50 мМ Тріс-НСІ, рН 8,0, 20 мМ глутатіон). Актин детектували антитілами проти актину (SantaCruz Biotechnology, Inc).

2.2.13 Диференційна скануюча мікрокалориметрія. Калориметричні вимірювання проводили в прецизійному скануючому мікрокалориметрі SCAL-1 (SCAL Co.Ltd.) в скляних чарунках об'ємом 0,3 мл, зі швидкістю 1,0 К за 1 хвилину при надлишковому тиску 2 атмосфери. Перед вимірюваннями проводили діаліз усіх зразків проти буферу А (20 мМ Тріс-НСІ, рН 7,5, 50 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 6 мМ 2-меркаптоетанол). Концентрація білків, що використовувалися для калориметричних вимірювань складала 2,3-2,5 мг/мл. Термодинамічний аналіз профілю надлишку теплоємності проводився відповідно [132].

2.2.14 Круговий дихроїзм. Порівняння третинної структури білків проводили із використанням спектроскопії кругового дихроїзму (КД) на спектрополяриметрі JASCO – 600 (Японія) в діапазонах довжин хвиль від 250-310 нм (близький УФ-спектр). Значення молярної еліптичності розраховували з рівняння:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{вим}} M_{\text{зал}} / (LC),$$

в якому С – концентрація білка (мг/мл), L – довжина оптичного шляху кювети (мм), $[\theta]_{\text{вим}}$ – виміряна еліптичність (градуси) и $M_{\text{зал}}$ – середня молекулярна маса залишку пептиду (Да), розрахована з його амінокислотної послідовності. Вимірювання проводили в 1 мм кюветі при концентрації білку 1 мг/мл.

2.2.15 Аналітичне ультрацентрифугування. Експерименти проводили на центрифугі Beckman Optima XL-I. Зразки центрифугували 40 хвилин при 50 000 об/хв при 20 °С, з 8 секундними інтервалами часу та 0,003 см роздільною здатністю без затримки між скануванням. Седиментацію проводили в двох-секторній кюветі використовуючи ротор An60. Концентрація білків становила

1-1,5 мг/мл. Седиментаційні дані оброблялися за допомогою програми SEDFIT [133]. Експериментальні s -значення були скориговані для стандартного стану води при 20°C (щільність розчинника 1,0561 г/см³ і в'язкість 1,984 сп) [134]. Седиментаційний коефіцієнт білків з відомою третинною структурою обраховувався за допомогою програми "HydroPro" [135]. Парціальний питомий об'єм білків отримувався з амінокислотного складу і складав 0,743 см³/г.

2.2.16 Малокутове розсіяння рентгенівських променів. Вимірювання проводили у малокутовій камері BL-15A на Photon Factory (Цукуба, Японія). Розчини білків у термостатованих кюветах із слюдяними віконцями піддавали рентгенівському опромінюванню при довжині хвилі 1,503 Å при кімнатній температурі. Для запобігання деградації білків зберігали і аналізували короткі скани. Дистанція між зразком та джерелом випромінювання була 2,35 м. Діапазон векторів розсіяння Q був від 0,011 до 0,15 Å⁻¹ ($Q=4\pi\sin\theta/\lambda$, де λ довжина хвиль променів, 2θ кут розсіяння). Дані реєстрували 2D CCD X-гау детектором [136], враховуючи нестабільність детекції, нелінійний відклик і контраст [137]. Для розрахунку молекулярних мас білків на основі початкової ординати кривої розсіяння проводили вимірювання розсіяння білка порівняння - альбуміну. Ізоформи eEF1A в діапазоні концентрацій 2-4 мг/мл досліджували в буфері, що містив 30 мМ Tris-HCl pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ KCl, 6 мМ 2-меркаптоетанол, 20 μМ GDP і 20% гліцерин.

Зразки кривих SAXS для молекулярних структур із відомими атомними координатами аналізували програмою CRY SOL [138]. Використовували координати дріжджового eEF1A (PDB ID код 1F60).

Структури димерів конструювали через обертання мономерів на відповідні кути Ейлера, дозволяючи контакти мономер-мономер. 729 димерних структур було проаналізовано. Підгонку розрахованих та

експериментальних даних SAXS проводили, мінімізуючи значення χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{\text{exp}}(Q_j) - cI_{\text{calc}}(Q_j)}{\sigma(Q_j)} \right]^2, \text{ де } N - \text{ це кількість експериментальних точок,}$$

c - фактор налаштування, I_{exp} і $I_{\text{calc}}(Q_j)$ - експериментальна і розрахована інтенсивності відповідно, $\sigma(Q_j)$ - експериментальна похибка переносу імпульсу Q_j .

2.2.17 Флуоресцентна спектроскопія. Для визначення поверхневих гідрофобних властивостей eEF1A використовувався флуоресцентний барвник 8-аніліно-1-нафталін сульфонат (АНС). Вільний АНС дуже слабо флуоресцює у воді, але при його взаємодії з гідрофобними ділянками білка квантовий вихід флуоресценції різко зростає. АНС (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 μM) змішували з 6 μM eEF1A1 чи eEF1A2 в 30 мМ Тріс-НСІ, рН 7,5, що містив 20% гліцерину, 1 мМ MgCl_2 , 6мМ β -меркаптоетанол. І навпаки, eEF1A (0-20 мкМ) додавали до 4 мкМ АНС. Флуоресцентні спектри були записані за допомогою флуоресцентного спектрофотометру Cary Eclipse (Varian) при 25°C , довжина хвилі збудження 360 нм , емісія сканувалася від 400 до 600 нм , довжина шляху 1 см.

Відносна флуоресценція (F_R) розраховувалася відповідно до рівняння:

$$F_R = (F - F_0)/F_0,$$

де F - інтенсивність флуоресценції АНС зв'язаного з білком і F_0 - інтенсивність флуоресценції вільного АНС в буфері. F_R відкладали на графіку проти концентрації eEF1A чи АНС. Індекс поверхневої гідрофобності білка було отримано шляхом вимірювання нахилу кривої залежності інтенсивності флуоресценції відносно концентрації білка. Для обрахунку використовували програму GraphPad Prism 5 [139].

2.2.18 Полімеризація актину. Актин із скелетних м'язів кроля було отримано від Cytoskeleton Inc, розчинено згідно з інструкцією виробника до

концентрації 10 mg/ml та поділено на аліквоти по 2 μ l.

Одну аліквоту ресуспендували до кінцевої концентрації 0,2 mg/ml в General actin buffer (5mM Tris-HCl pH 8.0, 0,2mM ATP, 0,5 mM DTT) та інкубували на льоду 60 хвилин. Після цього, актин центрифугували 14000 об/хв, 15 хвилин при 4°C. До 100 μ l актину додавали 10 μ l буферу для полімеризації (500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10mM ATP) для формування F-актину. На цьому етапі додавали ізоформи eEF1A у співвідношенні 5:1 (актин: eEF1A). Зразки інкубували при кімнатній температурі 1 годину.

2.2.19 Конфокальна мікроскопія актинових пучків. Актин полімеризували, як описано вище, в присутності чи відсутності ізоформ eEF1A у співвідношенні 5:1. Актинові філаменти були помічені фалоїдином-FITC (Sigma-Aldrich) (молярне співвідношення 1:1). 50 μ l розчину наносили на покривне скельце і залишали сохнути при кімнатній температурі. Зображення знімалися за допомогою конфокального мікроскопу Zeiss LSM510 з 63x масляною імерсійною лінзою (C-Apochromat 63x/1.2 W Corr).

2.2.20 Атомно-силова мікроскопія актинових пучків. Актин полімеризували, як описано вище, в присутності або відсутності ізоформ eEF1A у співвідношенні 5:1. Актинові філаменти були стабілізовані фалоїдином-FITC (Sigma-Aldrich) (молярне співвідношення 1:1). Зразки абсорбували на свіжо-сколоту слюду протягом 10 хвилин, надлишки рідини видаляли. Зразки промивали 3 рази 100 μ l високо-очищеною водою і залишили сохнути на повітрі при кімнатній температурі. Всі зображення отримували за допомогою атомно-силового мікроскопу Molecular Force Probe-3D (MFP-3D) (Asylum Research, USA). Мікроскоп використовували в АС режимі з Olympus AC240 кантилевером, маючи номінальні значення для сталої пружності і резонансної частоти 2 N/m та 70 kHz відповідно. Зображення були отримані при швидкості сканування в 1,0 Hz та амплітудою

500 mV. Інтегральні і пропорційні посилення були оптимізовані емпірично під час сканування.

2.2.21 Детекція активних пучків методом низькошвидкісного центрифугування. Вплив білків на формування актинових пучків досліджували методом ко-седиментації із актином за допомогою низькошвидкісного центрифугування [140]. eEF1A1 і кальмодулін діалізували проти буфера, що містив 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 6 mM 2-меркаптоетанол. Актин інкубували із еквімолярною концентрацією eEF1A1 (4μM) в присутності різних концентрацій кальмодуліну в загальному об'ємі 20 μl 30 хв і кімнатній температурі. Об'єм кожного зразку доводили тим же буфером. До суміші додавали KCl (кінцева концентрація 50mM), MgCl₂ (кінцева концентрація 2 mM) і ATP (кінцева концентрація 1 mM). Зразки центрифугували при 13000 об/хв протягом 15 хв. Супернатанти і осаді солюбілізували у стандартному буфері для зразків для денатуруючого електрофорезу, проводили гель-електрофорез із наступним фарбуванням Coomassie Blue. Інтенсивність смуг актину аналізували програмою GelQuant.NET (biochemlabsolutions.com).

2.2.22 Імунофлуоресцентне фарбування. Імунофлуоресцентне фарбування проводили використовуючи клітини НЕК293. Клітини культивували на покривних скельцях, попередньо покритих полі-L-лізином (50 мг/мл) протягом 24 год, а потім фіксували за допомогою 3% параформальдегіду в ІССН буфері (120 mM PIPES, 50 mM HEPES, 20 mM EDTA, 8 mM MgCl₂, pH 6,9) протягом 20 хв при кімнатній температурі. Потім, покривні скельця обробляли 50 mM NH₄Cl протягом 10 хв, після чого клітини пермеабілізувалися протягом 4 хв при 4°C з 0,1% тритоном X-100 в ІССН

буфері. На наступному етапі клітини інкубувалися в PBS буфері, що містив 3% БСА протягом 1 год, а потім фарбувалися протягом 2 годин при кімнатній температурі. В експериментах по виявленню колокалізації eEF1A з кальмодуліном використовували мишачі моноклональні анти-eEF1A (1: 250) і кролячі моноклональні анти-Cam (1:250) антитіла, що візуалізовувалися за допомогою PE (phycoerythrin)-кон'югованих антитіл з кози проти мишачого IgG і FITC (fluorescein isothiocyanate)-кон'югованих козячих антитіл проти кролячого IgG (1:1000), відповідно. В експериментах по виявленню колокалізації eEF1A з білком SGT1 використовували моноклональні анти-SGT1 антитіла (1:100) та моноклональні анти-eEF1A антитіла (1:100), що візуалізовувалися за допомогою допомогою Alexa Fluor 488 і Alexa Fluor 555 (1: 200).

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of mammalian translation elongation factor eEF1A2. / Yaremchuk, V. F. Shalak, O. V. Novosylna, B. S. Negrutskii, T. Crépin, A. V. El'skaya, and M. Tukalo. // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 2012; 68(Pt 3): 295–297.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як було зазначено у огляді літератури, у вищих еукаріотів eEF1A представлений двома тканиноспецифічними ізоформами eEF1A1 і eEF1A2. Ці ізоформи є дуже подібними за первинною структурою, але можуть відрізнятися за позатрансляційними функціями. Механізми та роль взаємовиключної тканиноспецифічної експресії цих ізоформ невідомі, але порушення тканиноспецифічності, зокрема, поява eEF1A2 в неспецифічній для цього білка тканині людини, напряду пов'язана із пухлиноутворенням [64]. Механізм дії прото-онкогенної ізоформи eEF1A2 досі невідомий. Ми вважаємо, що такий механізм може бути пов'язаним із різною здатністю ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 взаємодіяти із певними клітинними білками, яка, в свою чергу може обумовлюватися, зокрема, різною просторовою структурою ізоформ.

Отже, як перший крок у напрямку в'яснення ролі тканиноспецифічної експресії та механізмів онкогенної дії саме ізоформи eEF1A2 ми вирішили дослідити можливу різницю просторової організації білків eEF1A1 і eEF1A2 та вплив такої потенційної різниці на взаємодію із білками, що відповідають за клітинну організацію та регуляцію.

3.1 Порівняння просторової організації ізоформ eEF1A

3.1.1 Дослідження молекулярної динаміки ізоформ eEF1A1 і eEF1A2.

Вважається, що навіть незначні амінокислотні заміни в одній ізоформі в порівнянні з іншою можуть впливати на конформацію такої білкової глобули,

що може приводити до модифікації існуючих та появи нових функцій. Порівняти особливості просторової структури двох ізоформ eEF1A досить важко, оскільки кристалічна структура ізоформи eEF1A2 стала відома тільки нещодавно, а кристалу eEF1A1 для рентгенівського аналізу досі не отримано. Тому на початковому етапі дисертаційної роботи було вирішено провести порівняльний аналіз молекулярної динаміки білків eEF1A1 та eEF1A2, розраховуючи на те, що такий підхід допоможе виявити певну різницю конформаційної динаміки просторових структур двох ізоформ. Аналіз проводили, як описано в розділі Матеріали і Методи. Як матрицю для побудування моделей обох ізоформ використовували кристалічну структуру дріжджового eEF1A, оскільки на час проведення цих досліджень кристалічна структура білка eEF1A2 ще не була відома.

Підсумовані результати наведено в табл. 3.1. Видно, що середнє значення $rmsd$ молекули eEF1A1 є більшим, ніж $rmsd$ eEF1A2, тобто фінальна конформація eEF1A1 в розчині більш суттєво відходить від конформації початкової моделі, ніж eEF1A2. Крім того, оскільки $rmsd$ eEF1A1 характеризується більшим значенням розсіяння σ , ніж $rmsd$ eEF1A2, молекула eEF1A1 має в розчині більше конформаційного простору, ніж eEF1A2. Навпаки, $rmsds$ окремих доменів демонструють більше розсіяння σ в молекулі eEF1A2 в порівнянні з eEF1A1. Це вказує, що внутрішній рух доменів може бути більшим в молекулі eEF1A2. Найбільша різниця в мобільності двох ізоформ спостерігалася для домену III. Отже, молекула eEF1A1 характеризується збільшеною рухливістю всього білка (міждоменна рухливість) у той час коли eEF1A2 демонструє підвищену рухливість індивідуальних доменів молекули.

Таблиця 3.1.

**Середні значення і середньоквадратичні відхилення параметрів,
розрахованих з траєкторій MD після 4000 ps**

Параметр	eEF1A1		eEF1A2	
	$M \pm 2 S$	σ	$M \pm 2 S$	σ
rmsd C_{α} -атомів для цілого білку	0,36540 \pm 0,00058	0,05404	0,35817 \pm 0,00045	0,04326
rmsd C_{α} -атомів для домену I	0,30890 \pm 0,00026	0,02438	0,31012 \pm 0,00040	0,03861
rmsd C_{α} -атомів для домену II	0,18125 \pm 0,00030	0,02758	0,18347 \pm 0,00042	0,04051
rmsd C_{α} -атомів для домену III	0,17547 \pm 0,00014	0,01277	0,20157 \pm 0,00024	0,02270

Збільшена рухливість білка eEF1A1 дозволяє зробити передбачення, що конформація цього білка є більш відкритою, ніж eEF1A2. Загалом, можна зробити висновок, що, незважаючи на дуже велику гомологію амінокислотних послідовностей, динаміка просторових структур двох ізоформ білка, які були побудовані на основі тієї ж самої вихідної моделі, відрізняється. Це свідчить про принципову можливість існування конформаційної різниці між ізоформами eEF1A1 і eEF1A2, що базується на

їх дещо відмінних амінокислотних послідовностях. Це передбачення було надалі перевірено за допомогою біофізичних методів.

3.1.2 Порівняння стабільності ізоформ eEF1A за допомогою метода диференційної скануючої мікрокалориметрії. Наступним етапом досліджень стала експериментальна перевірка наявності конформаційної різниці між двома ізоформами. Метод диференційної скануючої мікрокалориметрії дозволяє вимірювати і порівнювати термодинамічні параметри, що характеризують конформаційні зміни білків в процесі теплової денатурації. Можна очікувати, що порівняння термодинамічних параметрів двох ізоформ eEF1A буде інформативним для виявлення різниці в тепловій стабільності й ентальпії денатурації цих білків. Оскільки стабільність молекули білка вочевидь залежить від його структури, аналіз термодинамічних параметрів двох ізоформ може свідчити як про різницю або подібність їх структур, так і про ступінь компактності цих білків.

Температурні залежності надмірної парціальної теплоємності eEF1A1 і eEF1A2 представлені на рис. 3.1. Дійсно, теплоти денатурації, що визначаються

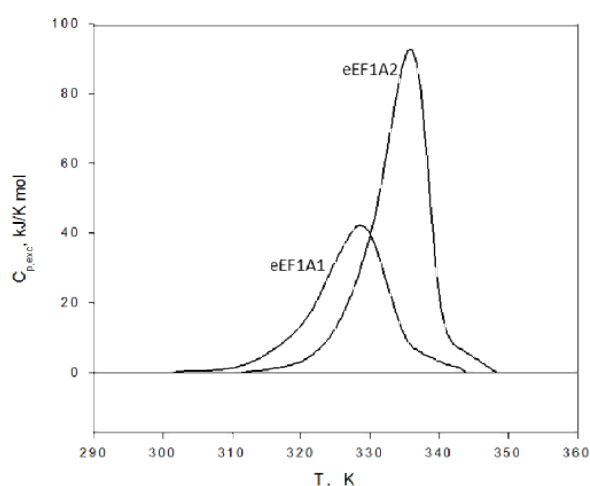


Рис. 3.1 Профіль плавлення ізоформ A1 і A2, отриманий за допомогою диференційної скануючої мікрокалориметрії

площею піка теплопоглинання, відрізняються майже вдвічі для двох ізоформ. В той час, коли для eEF1A1 $\Delta H_{\text{заг}} = 580,0 \text{ kJ/mol}$, для eEF1A2 $\Delta H_{\text{заг}}$ складає 910.0 kJ/mol . З профілю кривих також видно, що плавлення молекули eEF1A1 починається значно раніше, ніж плавлення молекули eEF1A2. Значення температури максимуму переходу складають для eEF1A1 55.5°C , для eEF1A2 62.7°C . В той же час напівширина переходу, яка визначається на напіввисоті піку, дорівнює $\Delta T = 11.0^\circ\text{C}$ для eEF1A1, а для eEF1A2 $\Delta T = 8.1^\circ\text{C}$. Отже, істотне підвищення ентальпії денатурації і зменшення напівширини переходу під час плавлення білка eEF1A2 в порівнянні з eEF1A1 свідчить про більш компактну конформацію ізоформи eEF1A2, тобто про різницю просторових структур цих білків.

3.1.3 Дослідження ізоформ eEF1A методом кругового дихроїзму. Спектр кругового дихроїзму (КД) в «близькому» ультрафіолеті (250-350 нм) може надати інформацію про просторову структуру білка. В цій області спостерігаються чутливі до третинної структури білка сигнали КД хромофорів - ароматичних амінокислот і дисульфідних зв'язків. Сигнали в області 250-270 нм є характерними для залишків фенілаланіну, сигнали в області 270-290 нм властиві тирозину, і сигнали, що знаходяться в області 280-300 нм, притаманні триптофану. Дисульфідні зв'язки дають слабкі сигнали скрізь увесь близько ультрафіолетовий спектр. Зважаючи на те, що розташування в первинній послідовності і загальна кількість ароматичних амінокислот в гомологічних на 97.5% ізоформах практично однакові (присутня тільки одна заміна Phe на Ser в ізоформі eEF1A2), за допомогою цього методу здається можливим проаналізувати ідентичність або різницю в третинній структурі цих ізоформ. Спектри КД білків eEF1A1 і eEF1A2 в області близького УФ представлені на рис. 3.2. Встановлено, що у ізоформ eEF1A спостерігається різниця КД сигналів по всьому спектру «близької» УФ-області. Якщо зміни КД сигналів в характерній для Phe області і можуть

бути частковим наслідком різниці в 393 положенні первинних послідовностей ізоформ (Phe393 в eEF1A1 чи Ser393 в eEF1A2), то різниця в решті спектру є прямим наслідком змін в третинній структурі цих білків. Таким чином, дані КД в «близькому» УФ свідчать на користь існування певної різниці у третинній структурі ізоформ eEF1A1 і eEF1A2.

Таким чином, вперше біофізичними методами проведено порівняльний аналіз стабільності та третинної структури двох тканинспецифічних ізоформ eEF1A. Отримані дані свідчать на користь того, що ці параметри двох білків дійсно відрізняються, при чому структура ізоформи eEF1A2 може бути більш компактною, ніж eEF1A1.

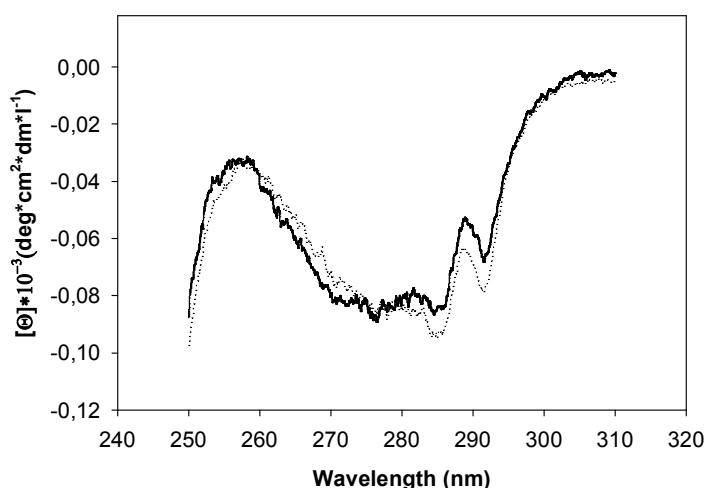


Рис.3.2. Дослідження ізоформ eEF1A методом кругового дихроїзму в «близькому» УФ. eEF1A1 – суцільна лінія, eEF1A – пунктирна лінія

Наступним етапом досліджень стала безпосередня оцінка просторової організації двох білків методом малокутового розсіяння рентгенівських променів (МРРП).

3.1.4 Аналіз олігомерного стану двох ізоформ eEF1A

3.1.4 1 Оцінка розмірів та молекулярної маси eEF1A1 та eEF1A2 за даними МРРП. На рисунку 3.3 представлені криві розсіяння білків eEF1A1 і eEF1A2 в координатах Гін'є, що дозволяють оцінити середні розміри частинок та їх молекулярну масу. Розраховані значення радіусів інерції (R_g) і молекулярних мас (M) представлені в таблиці 3.2.

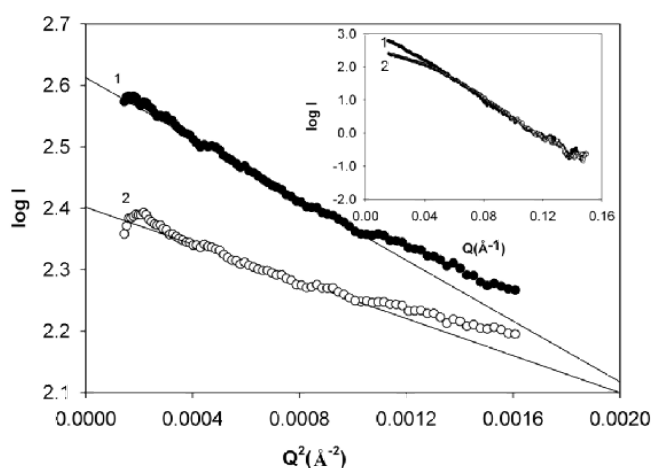


Рис. 3.3. Графіки Гін'є (залежності $\log I$ від Q^2) для визначення середніх розмірів частинок з кривої МРРП для eEF1A1 (1-чорні круги), та eEF1A2 (2-білі круги). На врізці – ті ж залежності у більш широкому діапазоні Q^2

Порівняння експериментальних значень молекулярних мас із розрахованими з амінокислотного складу для обох ізоформ свідчить, що білок eEF1A2 в розчині є практично гомогенним, в той час коли eEF1A1 схильний до асоціації. Дані седиментаційного аналізу, наведені на рис 3.4, підтверджують присутність асоціатів в препараті eEF1A1. Найкраща апроксимація даних седиментації для eEF1A1 була отримана за використання

моделі із трикомпонентним розподілом (мономер, димер і тример), rmsd 0,0072. Коефіцієнт седиментації фракції димерів становив 5,6S, що відповідало молекулярній масі компактного димера глобулярного білка із молекулярною масою 50 kDa.

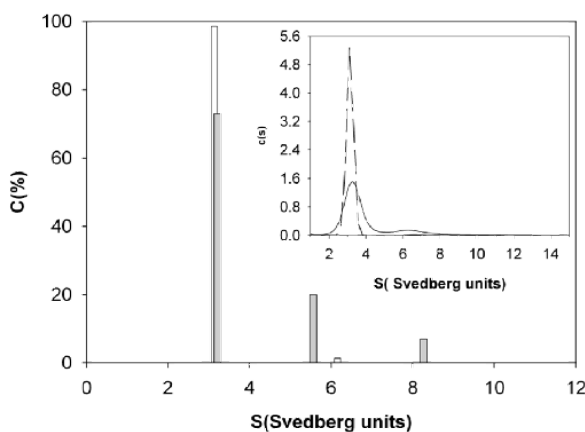


Рис. 3.4. Розподіл дискретних значень коефіцієнтів седиментації для A1 (зафарбовані стовбці, rmsd 0,0072) і A2 (порожні стовбці, rmsd 0,0074). Значення коефіцієнтів седиментації були 3.3 та 3,18 S, відповідно. На вставці показані безперервні розподілу коефіцієнтів седиментації eEF1A1 (суцільна лінія, rmsd 0,0156) та A2 (пунктирна лінія, rmsd 0,0131)

Видно, що фракція димерів є суттєво більшою у препараті eEF1A1. Функція парного розподілу $P(r)$ для eEF1A1 характеризується двома додатковими плечима, які, найбільш вірогідно, відповідають димеру і тримеру (рис. 3.5), існування яких підтверджено седиментаційними даними (рис. 3.4), в той час коли $P(r)$ для eEF1A2 є типовим для глобулярного білка.

Отже, наші дані можуть бути інтерпретовані як такі, що демонструють більшу здатність eEF1A1 до самоасоціації в порівнянні із eEF1A2. Необхідно зауважити, що аналогічну поведінку білків при малокутовому рентгенівському розсіянні ми спостерігали із трьома різними препаратами ізоформ. Оскільки метод розсіяння рентгенівських променів потребує

відносно великих концентрацій білків, що вивчаються, винайдену тенденцію необхідно було перевірити за зменшених концентрацій білків. Для цього було використано гель-електрофорез за умов, що не денатурують білки. Показана істотна гетерогенність препарату eEF1A1 в порівнянні із відносно гомогенним

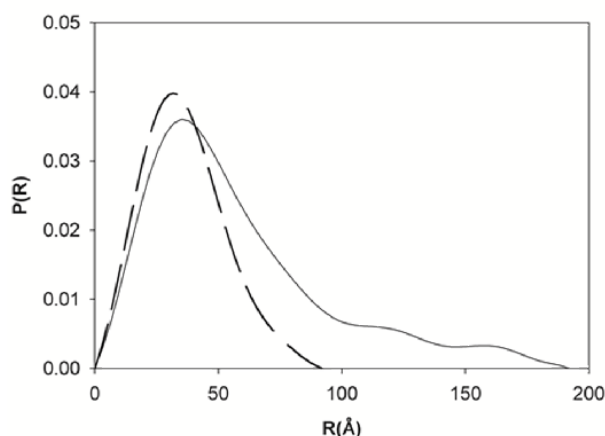


Рис.3.5 Графік функцій парного розподілу для eEF1A1 (лінія) і eEF1A2 (пунктир), розрахований із даних малокутового розсіяння рентгенівських променів

препаратом eEF1A2 за нативних умов, що можна інтерпретувати як наслідки дисоціації димерів eEF1A1 у гелі (рис. 3.6). На тому ж рисунку показано, що у денатуруючому гелі обидва білки є гомогенними.

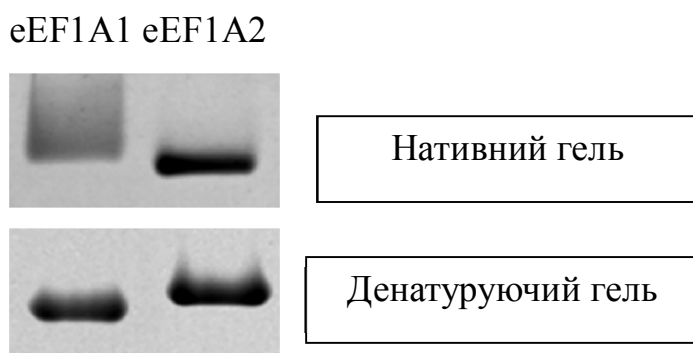


Рис. 3.6. Препарат eEF1A1 є гетерогенним у нативному гелі, але гомогенним у денатуруючому гелі

Значення радіусів інерції і молекулярних мас досліджуваних білків

Protein	M (kDa) (calc.)	M (kDa) (exp.)	R_g (Å) (calc.)	R_g (Å) (Guinier)	R_g (Å) (Kratky)
eEF1A (yeast)	48.1	–	25		
eEF1A1 (rabbit liver)	50.2	82 ± 4		41.4±1.0	36.9±2.0
eEF1A2 (rabbit muscles)	50.6	58±4		29.1±1.0	27.9±2.0

Експериментальні значення були розраховані з графіків Гінье і Краткі. Розсіювання з дріжджового eEF1A розраховувалося з використанням опублікованої PDB структури цього білка (1F60). Відсутню С-кінцеву частину апроксимували двома α -спіралями, що лежать на білковому тілі. Обчислений внесок цієї частини в розсіювання був незначний. Для того, щоб уникнути внеску макромолекулярних асоціатів (тримерів та вищих асоціатів), змодельовані криві були підігнані до експериментальних у діапазоні $Q > 1/R_g$, де R_g - радіус гірації мономера. Значення Q були в діапазоні від 0,025 до 0,15 \AA^{-1} .

3.1.4.2 Просторова організація димерів ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 характеризується різним ступенем компактності. Для того, щоб зрозуміти, чи може відрізнятися між собою просторова організація димерів eEF1A1 і eEF1A2, експериментальні дані розсіяння необхідно підлаштувати до аналогічних, але розрахункових даних для мономера і димера шляхом вирішення системи лінійних рівнянь. Для мінімізації розходження між

експериментальними і розрахунковими кривими розсіяння було використано алгоритм найменших квадратів. Було проаналізовано 729 різних структур димерів, і на основі аналізу були обрані структури, що відповідають кривим із найкращою підгонкою.

Результати для eEF1A1 ($\chi^2 = 0.31$) представлені на рис. 3.7. В цьому випадку, вагова фракція димерів дорівнює 0,8. Модель структури такого димера з $R_g = 37.3 \text{ \AA}$ наведена на рис. 3.7.

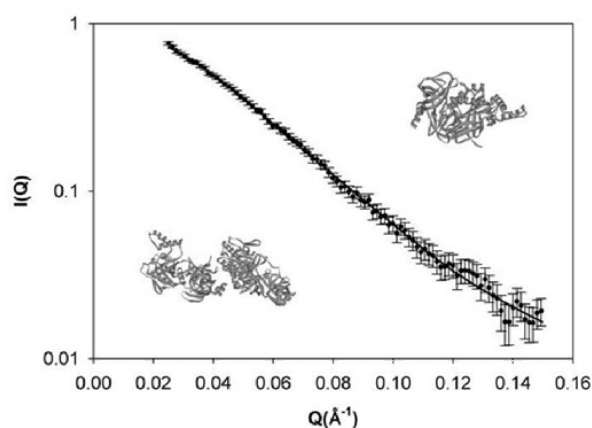


Рис. 3.7. Найкраща підгонка ($\chi^2 = 0,31$) експериментальної та теоретичної кривих для eEF1A1 передбачає вагову частку димерів 0,80

Результати аналогічного підлаштування, проведеного для eEF1A2 ($\chi^2 = 0,29$), представлені на рис. 3.8. В цьому випадку, вагова фракція димерів дорівнює 0,28. Модель структури димера eEF1A2 з $R_g = 33,7 \text{ \AA}$ представлена на рис. 3.8.

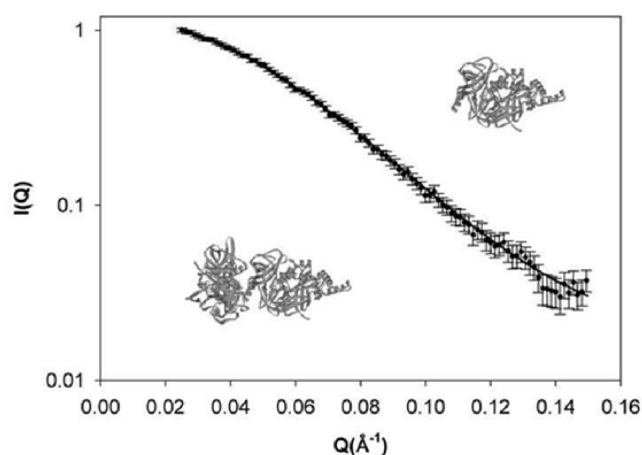


Рис. 3.8. Найкраща підгонка ($\chi^2 = 0,29$) експериментальної та теоретичної кривих для eEF1A2 передбачає вагову частку димерів 0,28

Отже, препарати eEF1A1 і eEF1A2 відрізняються як за відносною кількістю димерів, так і за радіусом гірації таких димерів. Найбільш розповсюджена в організмі ізоформа eEF1A1 значно більш схильна до формування димерів. До того ж просторова організація цієї ізоформи характеризується меншим рівнем компактності як в мономерній, так і в димерній формі.

Таким чином, показано, що ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A, eEF1A1 і eEF1A2 мають неоднакову просторову організацію, і ці відмінності зберігаються і у структурі димерів цих молекул. Крім того, ці ізоформи демонструють різну здатність до самоасоціації, а саме, eEF1A1 має набагато більшу тенденцію до асоціації і формування димерів, ніж eEF1A2.

3.1.4.3 Порівняння стійкості двох ізоформ eEF1A до дії сечовини. Метод малокутового рентгенівського розсіяння дозволяє вивчати не тільки структуру макромолекул в розчині, але і стабільність такої структури до дії денатуруючих агентів. Для глобулярних білків найкращим індикатором компактної структури є наявність максимуму на кривій розсіяння, побудованій в координатах Краткі [141]. Ми дослідили стабільність структур обох ізоформ під дією сечовини. Сечовина є найбільш придатним денатуруючим агентом для рентгенівських вимірювань, оскільки переважно не впливає на електронну щільність розчинника і його поглинання. На рисунку 3.9 представлені криві розсіяння в координатах Краткі для білків eEF1A1 і eEF1A2 при різних концентраціях сечовини.

З рисунка видно, що білок eEF1A1 втрачає компактність при концентрації сечовини 2-3М. В той же час eEF1A2 втрачає компактність при концентрації сечовини 3-4М. Таким чином, фактор eEF1A1 є менш стабільним до дії сечовини, ніж eEF1A2, що знов таки свідчить про більшу неструктурованість цього білка у розчині.

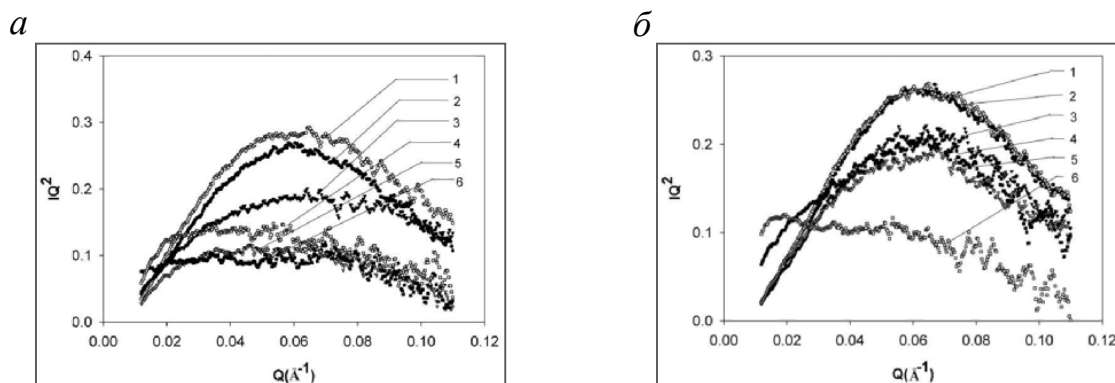


Рис.3.9 Графіки Краткі для eEF1A1 (а) і eEF1A2 (б) при різних концентраціях сечовини: 1 – без сечовини, 2 - 1М, 3 - 2М, 4 - 3М, 5 - 4М, 6 - 5М

3.1.5. Порівняння поверхневої гідрофобності білків eEF1A1 та eEF1A2.

Гідрофобність є основним чинником, що визначає білкову агрегацію [142], таким чином, здатність ізоформи A1 до агрегації може вказувати на підвищену ліпофільність цього білка. Для експериментальної перевірки цього припущення було проведено порівняльний аналіз поверхневої гідрофобності білків eEF1A1 і eEF1A2 шляхом титрування флуоресцентним індикатором гідрофобності АНС (1-анилін-8-нафталинсульфонат) [139,143]. Рис. 3.10 показує, що білок eEF1A1 більш ефективно, ніж білок eEF1A2, зв'язує АНС, що свідчить про більшу гідрофобність його поверхні. Рівень гідрофобності поверхні оцінювали відповідно до [143]. Умовний показник поверхневої гідрофобності складав 2,26 для eEF1A1 та 0,27 для eEF1A2. Треба відмітити, що якщо брати до уваги загальну шкалу гідрофобності для різних клітинних білків [143], ані eEF1A1, ні eEF1A2 не належать до істотно гідрофобних білків. Проте різниця гідрофобних коефіцієнтів для eEF1A1 та eEF1A2 є важливою, оскільки вказує на наявність додаткової гідрофобної ділянки (-ок) у ізоформи eEF1A1 в порівнянні із eEF1A2, що може пояснювати, зокрема, підвищений

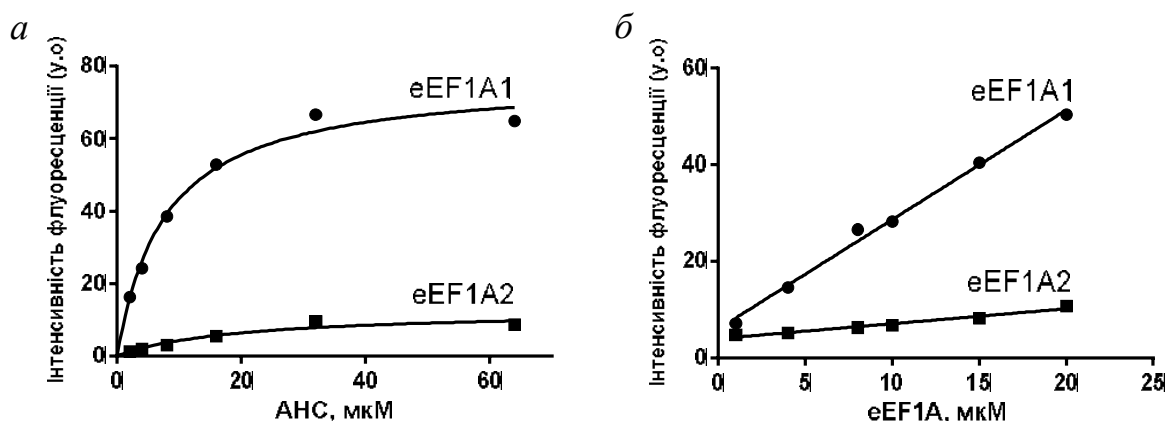


Рис. 3.10. (а) Титрування eEF1A1 та eEF1A2 (концентрація білків 6 мкМ) зростаючою кількістю АНС. (б) Зміна відносної флуоресценції 4 мкМ АНС при додаванні різних концентрацій eEF1A1 чи eEF1A2

рівень самоасоціації цього білка, на що вказувалося раніше, та забезпечення його взаємодії з різними білками партнерами. Слід зазначити, що саме присутність додаткових гідрофобних ділянок може бути відповідальною за взаємодію білка із специфічними клітинними лігандами.

Отже, базуючись на отриманих даних, ми висунули гіпотезу, що необхідність виключної тканиноспецифічної експресії ізоформи eEF1A2 може обумовлюватися особливостями просторової структури цієї ізоформи, що забезпечують або специфічні для eEF1A2 взаємодії або, навпаки, відсутність взаємодій, притаманних іншій ізоформі eEF1A1, із білками-партнерами. Серед таких білків-партнерів можуть бути й ті, що мають відношення до росту пухлини, зокрема, сигнальні білки і білки цитоскелету. У наступних розділах буде проведено порівняльний аналіз особливостей взаємодії eEF1A1 і eEF1A2 як з вже відомими для eEF1A1 (актин, кальмодулін), так і ідентифікованими вперше нами (Sgt1, S100A6) білками-партнерами.

Висновки до підрозділу 3.1:

Моделювання молекулярної динаміки показало принципову можливість існування різниці в структурній організації двох ізоформ eEF1A. Для ізоформи eEF1A1 більш характерна міжмолекулярна рухливість, що може свідчити про меншу компактність цього білку.

Показано, що молекули ізоформ eEF1A можуть мати різну просторову організацію. Істотне підвищення ентальпії денатурації і зменшення напівширини переходу під час плавлення білка eEF1A2 в порівнянні з eEF1A1 свідчить про більш компактну конформацію ізоформи eEF1A2. eEF1A1 є менш стійким до дії сечовини, ніж eEF1A2, що свідчить про більшу неструктурованість цього білка у розчині.

Встановлено що ізоформи eEF1A1 і eEF1A2 демонструють різну здатність до самоасоціації, а саме, eEF1A1 має більшу тенденцію до реасоціації і формування димерів, ніж eEF1A2. Відмінності eEF1A1 і eEF1A2 зберігаються у структурі димерів цих молекул, тобто димер eEF1A2 є більш компактним, ніж димер eEF1A1.

До того ж поверхня eEF1A1 є більш гідрофобною, ніж eEF1A2, що вказує на наявність додаткової гідрофобної ділянки (-ок) у ізоформи eEF1A1 в порівнянні із eEF1A2. Це пояснює підвищений рівень самоасоціації цього білка та може бути важливим для забезпечення різної взаємодії ізоформ із різними білками партнерами в контексті ракових клітин.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Multiple molecular dynamics simulation of the isoforms of human translation elongation factor 1A reveals reversible fluctuations between "open" and

"closed" conformations and suggests specific for eEF1A1 affinity for Ca²⁺-calmodulin. / Kanibolotsky D. S., Novosyl'na O. V., Abbott C. M., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. // *BMC Struct Biol.* 2008, 8:4.

2. Characterization of physical properties of two isoforms of translation elongation factor 1A. / Novosyl'na O.V., Timchenko A. A., Tiktopulo E. I., Serdyuk I. N., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. // *Biopolym Cell.* 2007;23(5):386-390.
3. Different oligomeric properties and stability of highly homologous A1 and proto-oncogenic A2 variants of mammalian translation elongation factor eEF1 / Timchenko A. A., Novosyl'na O. V., Prituzhalov E. A., Kihara H., El'skaya A. V., Negrutskii B. S., Serdyuk I. N. // *Biochemistry-USA.* 2013;52(32):5345-53
4. Specific features of protein biosynthesis in higher eukaryotes. / El'skaya A. V., Negrutskii B. S., Shalak V. F., Vislovukh A. A., Vlasenko D. O., Novosyl'na A. V., Lukash T. O., Veremieva M. V. // *Biopolym. Cell,* 2013;29(3):177-187

3.2 Порівняння взаємодії ізоформ eEF1A з білками-партнерами

3.2.1 Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 із кальцій-зв'язуючими білками.

3.2.1.1 Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з кальмодуліном (CaM) та S100A6 *in vitro*. Для вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з CaM ми використали метод двонаправленого горизонтального поліакриламідного гелю-електрофорезу в неденатуруючих умовах. Цей метод виявився досить зручним і інформативним завдяки природним особливостям обох білків-партнерів, а саме: їх різним поверхневим зарядом і різним розміром. Ізоформи eEF1A (~50кДа) мають ізоелектричну точку в лужному діапазоні (близько 9), і рухаються в гелі у напрямку катоду, тоді як CaM (17кДа) має $pI \sim 4$ і, відповідно, рухається в бік аноду. Це дає змогу чітко зафіксувати зсув смуги одного з партнерів в результаті утворення комплексу. На рис. 3.11 показано титрування ізоформ eEF1A (3 μM) зростаючими кількостями CaM в присутності іонів кальцію. При додаванні кальмодуліну до eEF1A1 спостерігалось зменшення інтенсивності смуги eEF1A1 та формування комплексу, який рухався в бік аноду. Навпаки,

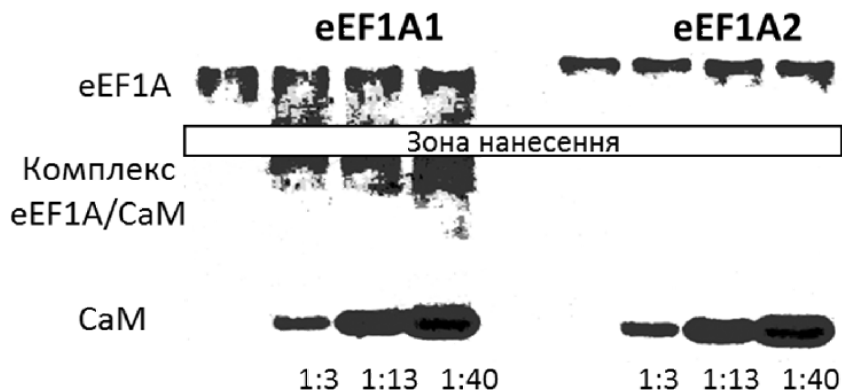


Рис. 3.11. Кальмодулін утворює комплекс із ізоформою eEF1A1 і не взаємодіє із eEF1A2. 1:3, 1:13, 1:40 - молярне співвідношення eEF1A/CaM

формування комплексу eEF1A2 із кальмодуліном не спостерігалось навіть при тридцятикратному молярному надлишку останнього.

Для відповіді на питання, чи властива дискримінація eEF1A2 також іншим кальцій-зв'язуючим білкам, ми вибрали білок S100A6, який також є кальцій-зв'язуючим білком, але відрізняється за своєю структурою від CaM. Взаємодія eEF1A з S100A6 також вивчалася за допомогою методу зсуву смуги у гелі. Як видно з рис. 3.12, для S100A6 спостерігалася така ж сама картина, як і для CaM, а саме, у випадку додавання S100A6 до eEF1A1 відбувалося помітне зменшення інтенсивності смуги, а у випадку eEF1A2 формування комплексу не спостерігалось.

Отже, можна припустити, що eEF1A1 має здатність до зв'язування різних Ca²⁺-зв'язуючих білків, у той час як ізоформа eEF1A2 не здатна до такої взаємодії.

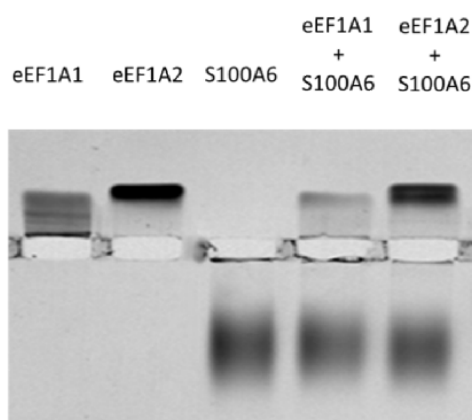


Рис. 3.12. Ізоформа eEF1A1 взаємодіє із білком S100A6, в той час, коли eEF1A2 не здатна до такої взаємодії

Наступним кроком стала перевірка цього припущення в клітинах ссавців. На рис. 3.13 представлені дані ко-преципітації eEF1A1-His і ендогенного CaM з лізату клітин HEK293 на Ni-NTA агарозі.

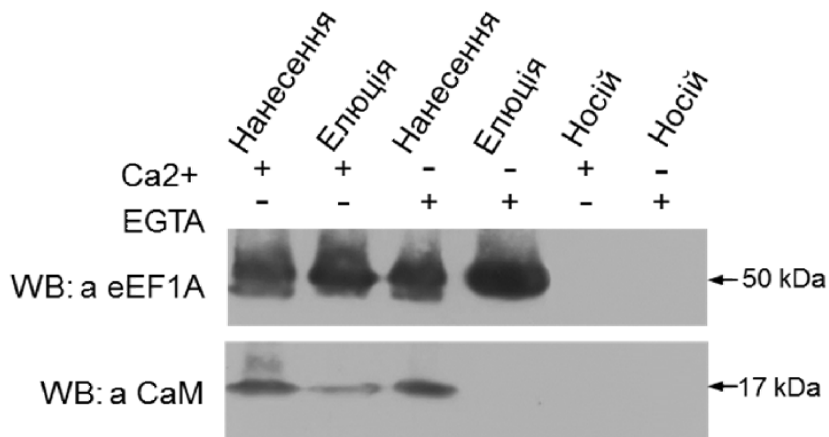


Рис. 3.13. eEF1A1-His, зв'язаний із Ni-NTA-агарозою, взаємодіє із CaM в лізаті клітин HEK293 людини у присутності іонів кальцію, і втрачає таку здатність за додавання EGTA

Вочевидь, взаємодія між цими білками відбувається і в екстрактах клітин нирки людини. Більш того, рис. 3.13 показує, що формування комплексу eEF1A1 із CaM відбувається у присутності іонів кальцію і не відбувається за додавання EGTA, сполуки, що зв'язує вільний кальцій у розчині. Цей факт свідчить про можливість регулювання взаємодії eEF1A1 із CaM іонами кальцію. Також було показано, що ендогенні eEF1A1 і кальмодулін можуть бути ко-локалізовані в клітинах HEK293 (рис. 3.14).

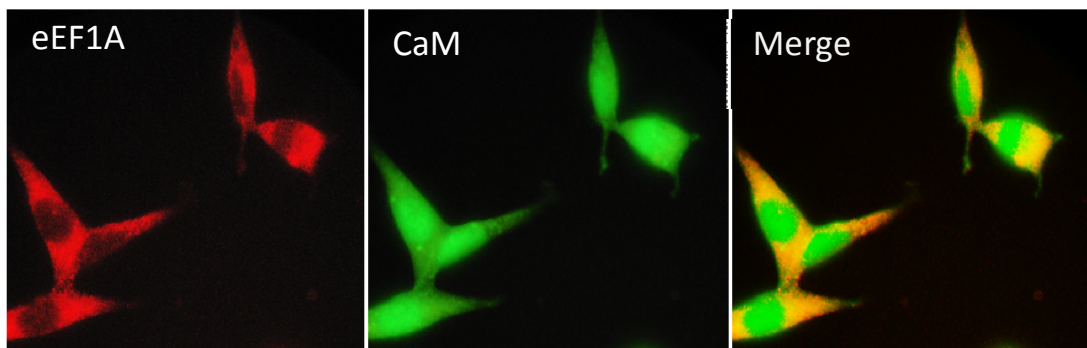


Рис. 3.14 Колокалізація eEF1A з кальмодуліном в клітинах HEK293

3.2.1.2 Ідентифікація кальмодулін-зв'язуючих доменів eEF1A1. Для розуміння молекулярного базису виключної взаємодії із CaM ізоформи eEF1A1, а також того, де саме в молекулі eEF1A1 може бути розташований сайт зв'язування CaM, було використано відомий ресурс CalmodulinTargetDatabase, який передбачає сайти зв'язування CaM в білках з досить великою долею ймовірності [144]. Показано, що в молекулі eEF1A1 існують дві ділянки високої ймовірності зв'язування з CaM (311-327 - домен II і 422-437 - домен III). Тільки одну таку ділянку, до того ж із меншими ступенем вірогідності було передбачено у молекулі eEF1A2 (427-437 - домен III) (рис.3.15).

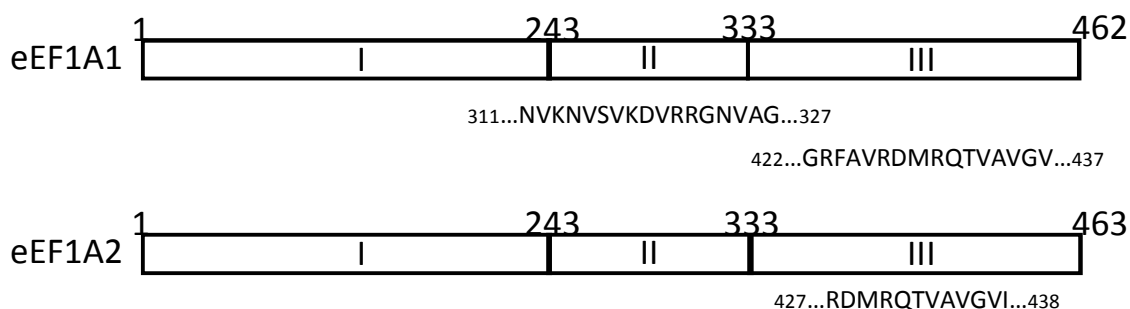


Рис. 3.15. Схематичне представлення структури ізоформ eEF1A ссавців. Три домени eEF1A позначені I, II і III відповідно. Потенційні сайти зв'язування кальмодуліну в білках eEF1A1 і eEF1A2 позначені символами амінокислот

Для експериментального визначення домену eEF1A1, який взаємодіє із кальмодуліном, були використані експресовані в *E.coli* конструкти делеційних мутантів eEF1A1, що містили домен I, домени I+II або домени II+III. Оскільки всі ці конструкти містили також GST-tag, для експериментів з ко-преципітації була використана глутатіон-сефароза. Експресовані домени сорбували на цей носій, потім інкубували із кальмодуліном, промивали і перевіряли наявність зв'язаного кальмодуліну, використовуючи антитіла до

кальмодуліну. На рис. 3.16 представлені результати експерименту.

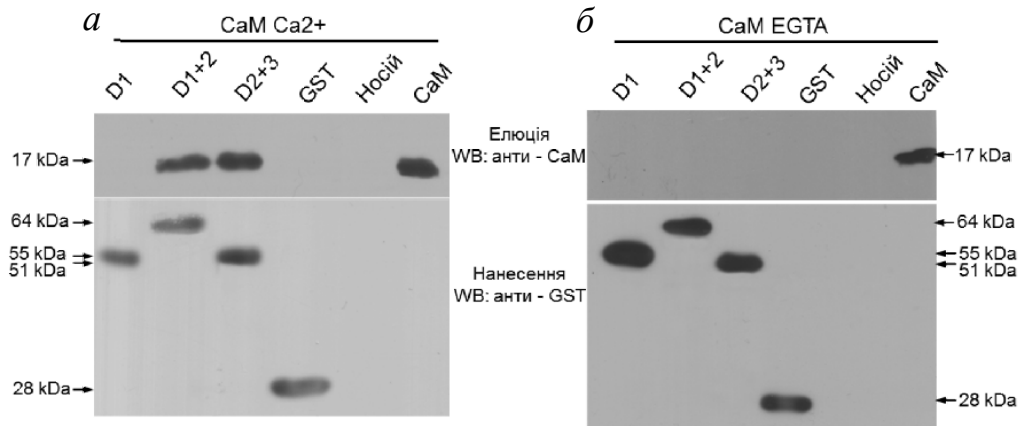


Рис. 3.16. Домен II і, можливо, домен III eEF1A1 взаємодіють із кальмодуліном. Різні конструкти доменів, зв'язані із глутатіон-сефарозою, інкубували з кальмодуліном, промивали і проводили елюцію 20 мМ глутатіоном. Експерименти проводили за присутності 1 мМ CaCl₂ (а) або 1 мМ EGTA (б)

Видно, що з кальмодуліном взаємодіяли пептиди, що містять домени I+II і II+III. Ці результати є прямим підтвердженням взаємодії із кальмодуліном домену II і не виключають взаємодії із кальмодуліном домену III eEF1A1. Отже, біоінформатичні передбачення отримали експериментальну підтримку. Важливо, що така взаємодія спостерігалася тільки за присутності іонів кальцію, оскільки додавання EGTA виключало таку взаємодію.

3.2.1.3 Вивчення впливу кальмодуліну на активність eEF1A в нуклеотидному обміні. Який функціональний сенс може мати взаємодія eEF1A1 із CaM? Зважаючи на те, що CaM – поширений сенсор кальцієвого сигналу, який має регуляторний вплив на багато клітинних процесів, ми вирішили перевірити, чи буде він впливати на основну біологічну активність

eEF1A1. На рис. 3.17 показана залежність зв'язування eEF1A1 з ГДФ із додаванням зростаючих кількостей СаМ.

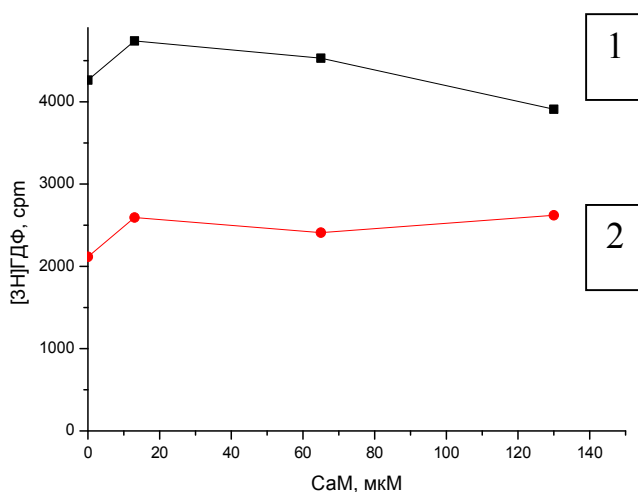


Рис. 3.17. Зв'язування [³H]GDP білками eEF1A1 (1) і eEF1A2 (2) в присутності зростаючих концентрацій кальмодуліну. Концентрація eEF1A1 і eEF1A2 – 1,3 мкМ

Як видно з рисунку, додавання СаМ до реакційної суміші жодним чином не впливало на здатність eEF1A1 зв'язувати нуклеотид. Також, СаМ не впливав на швидкість ГДФ/[³H]ГДФ обміну в реакції нуклеотидного обміну, в присутності чи за відсутності фактора нуклеотидного обміну eEF1Bα (рис. 3.18). Отже, безпосередній вплив СаМ на активність eEF1A1, скоріш за все, відсутній.

3.2.1.4 Вивчення впливу кальмодуліну на тРНК-зв'язуючу активність eEF1A1. Один із механізмів впливу кальмодуліну на клітинні процеси є його безпосереднє зв'язування із білками-мішенями. Оскільки різниця у здатності eEF1A1 і eEF1A2 взаємодіяти із СаМ є очевидною, важливо оцінити, чи може взаємодія із СаМ перешкоджати eEF1A1 взаємодіяти із трансляційними партнерами цього білка, що в свою чергу, може впливати на активність цього білка в елонгації. Для цього необхідно перевірити, чи перекриваються одне із

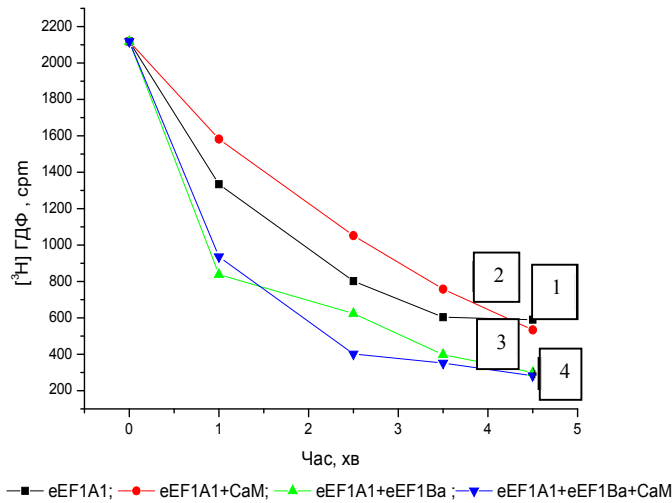


Рис.3.18. Кінетика обміну нуклеотидів в eEF1A1 в присутності CaM. 1 – тільки eEF1A1, 2–eEF1A1+CaM, 3–eEF1A1+eEF1Ba, 4 – eEF1A1+eEF1Ba+CaM. Концентрація eEF1A1 - 0,9 мкМ, концентрація CaM - 8,7 мкМ, концентрація eEF1Ba – 0,1мкМ

іншим сайти взаємодії eEF1A1 із CaM, тРНК і фактором елонгації eEF1Ba . Сайти взаємодії із тРНК і eEF1Ba були передбачені, виходячи з кристалічних структур відповідних комплексів (PDB ID: 1b23, 1F60) [3,145,146]. Дійсно, було показано перекривання сайту зв'язування CaM із сайтами зв'язування тРНК або eEF1Ba (рис. 3.19).

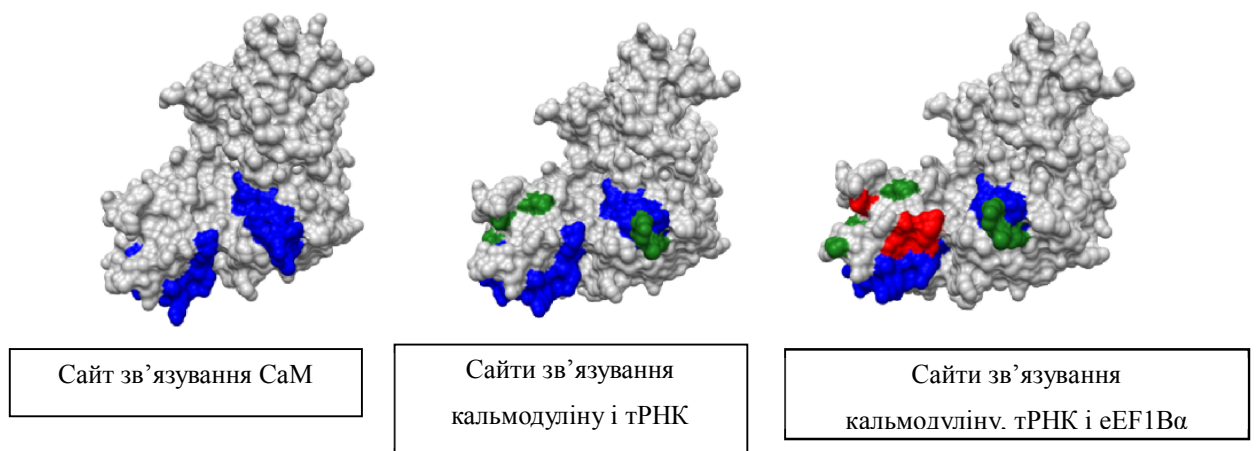


Рис. 3.19. Сайти зв'язування кальмодуліну, тРНК і eEF1Ba в eEF1A частково перекриваються

Отже, взаємодії CaM, тРНК і фактора нуклеотидного обміну eEF1Ba із eEF1A1 можуть бути взаємовиключними. Для експериментальної перевірки цього припущення, тобто принципової можливості впливу CaM на здатність eEF1A1 зв'язувати тРНК, було проведено наступний експеримент. Спочатку було преформовано комплекс ($[^{32}\text{P}]$ тРНК^{Leu}-eEF1A1). Потім до цього комплексу додавали зростаючі концентрації CaM. Як видно з рис 3.20, із додаванням зростаючих кількостей CaM та в присутності сталої кількості тРНК та eEF1A1, спостерігалося зменшення інтенсивності смуги eEF1A1 (рис. 3.21), та, навпаки, збільшення інтенсивності вільної радіоактивно-міченої тРНК (рис. 3.22).

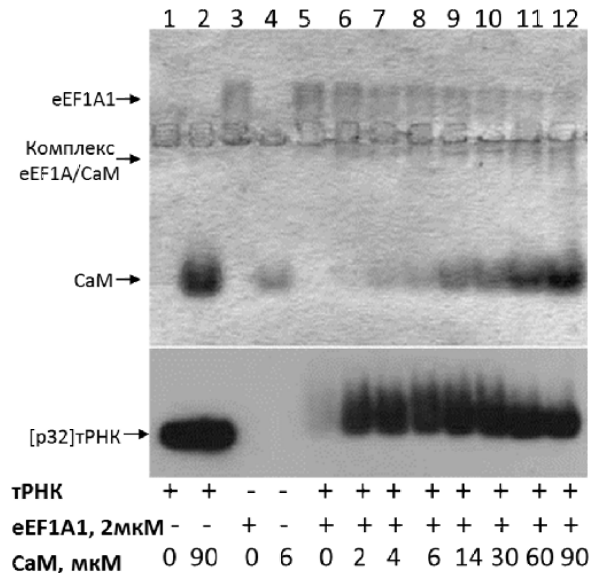


Рис. 3.20. Кальмодулін вивільнює тРНК із комплексу з eEF1A1. «Нативний» горизонтальний поліакриламідний гель (верхня панель). Авторадіограф гелю (нижня панель)

eEF1A1 і тРНК формували стабільний комплекс, який не входив до гелю, тому цей комплекс було неможливо детектувати на ауторадіографі. В цьому випадку в гелі спостерігається тільки мала кількість $[^{32}\text{P}]$ тРНК (рис.3.22, смуга 5). Після додавання кальмодуліну інтенсивність смуг, що відповідають вільній тРНК, істотно зростала, що свідчить про витіснення

кальмодуліном тРНК із комплексу з eEF1A1. Таке витіснення можна спостерігати вже при еквімолярному співвідношенні CaM:eEF1A1 (рис.3.22, смуги 6-12).

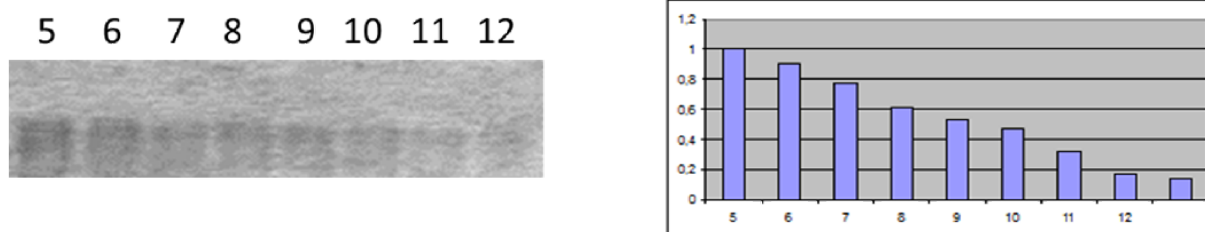


Рис. 3.21. Зникнення смуги вільного eEF1A1 за рахунок формування комплексу з CaM. Денситометрия гелю, що представлений на рис. 3.20

За більших концентрацій кальмодуліну взаємодія eEF1A1 з тРНК повністю припинялась (рис.3.22, смуги 11-12), і зсуву смуг більше не спостерігалось. Взаємодія кальмодуліну із eEF1A1 відображається зворотнім зв'язком між зростанням концентрації кальмодуліну і зниженням інтенсивності смуг eEF1A1 (3.21 смуги 6-12). Отже, конкуренція між кальмодуліном і тРНК за eEF1A1 цілком можлива.

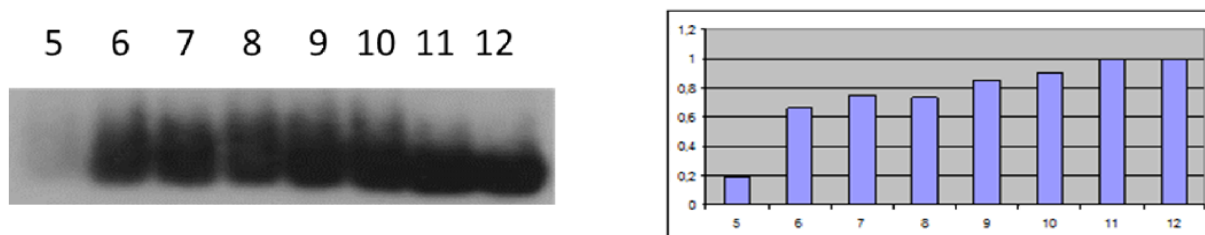


Рис. 3.22. Вивільнення тРНК із комплексу з eEF1A1 під впливом CaM. Денситометрия гелю гелю, представленого на рис. 3.20

Таким чином, отримані дані вперше демонструють принципову можливість впливу CaM на витіснення eEF1A1 з комплексу з тРНК, тобто

вказують на можливий механізм участі CaM в регуляції елонгації білкового синтезу у вищих еукаріотів. Відсутність взаємодії CaM із ізоформою eEF1A2 підтверджує неможливість такої регуляції в присутності eEF1A2. Зважаючи на виключну присутність тканинспецифічної ізоформи eEF1A2 у збудливих тканинах ссавців, цей факт може свідчити про існування певного механізму захисту білкового синтезу від впливу постійних змін концентрацій кальцію в спеціалізованих клітинах, де експресується тільки eEF1A2. Цей механізм буде більш детально обговорено у розділі «Обговорення результатів».

3.2.1.5 Моделювання комплексу eEF1A1-кальмодулін-Ca²⁺. Як біоінформатичні так і експериментальні дані свідчать про участь CBSDII (calmodulin binding site of domain II) і CBSDIII (calmodulin binding site of domain III) у взаємодії eEF1A1 з кальмодуліном. Отже ці епітопи і було вибрано для молекулярного докінгу. Структура eEF1A1 була змодельована на основі нещодавно вирішеної кристалічної структури eEF1A2 [50]. Як зазначено вище, просторова організація eEF1A1 і eEF1A2 в індивідуальному стані, їх гідрофобність і здатність утворювати димери можуть бути різними. eEF1A1 може мати видовжену форму, в той час як eEF1A2 являє собою компактний білок. Проте, відомо, що «видовжені» білки, в тому числі eEF1A1, приймають компактну конформацію при взаємодії з лігандом [147,148]. Саме тому ми вважаємо, що компактна рентгенівська структура eEF1A2 може бути використана в якості наближення для моделювання компактною структурою eEF1A1 в комплексі з кальмодуліном. Як уже згадувалося вище, незначні амінокислотні заміни в послідовності CBSDII і CBSDIII можуть нести відповідальність за очевидну нездатність eEF1A2 взаємодіяти з кальмодуліном.

Комплекс білка IQCG (IQ Мотив, що містить G) і Ca²⁺-зв'язаного кальмодуліну (PDB ID: 4M1L) було обрано в якості референсного для докінгу eEF1A1 з кальмодуліном. В процесі докінгу модель eEF1A1 була статичною,

а молекула кальмодуліну могла обертатися. Візуальна оцінка виявила ряд аналогічних комплексів, наближених до біоінформатичного передбачення. Ця група комплексів показувала одну молекулу кальмодуліну, прикріплену до обох передбачених сайтів зв'язування в eEF1A1. Репрезентативна модель показана на рис. 3.23 А. У цьому комплексі, залишки 315 - 323 утворюють інтерфейс між

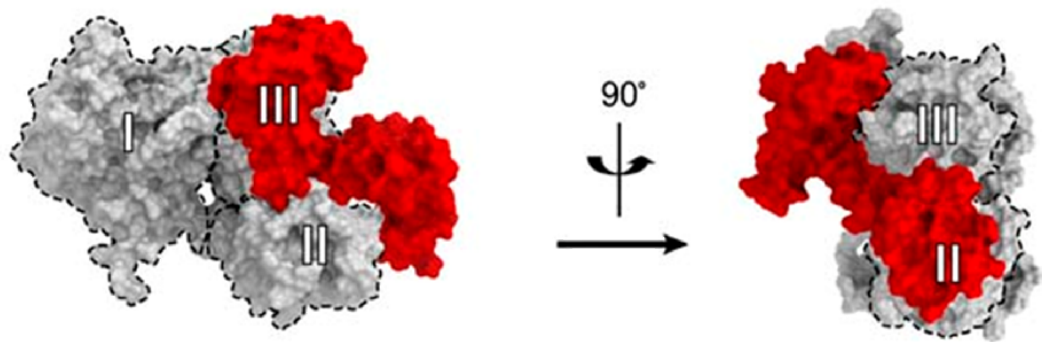


Рис. 3.23 Моделювання комплексу eEF1A1-кальмодулін. Репрезентативна модель взаємодії eEF1A1 з кальмодуліном із залученням обох передбачених Calmodulin Target Database сайтів зв'язування в доменах II і III. eEF1A1 сірого кольору і його домени позначено цифрами. Кальмодулін позначений червоним

доменом II моделі eEF1A1 і С-кінцем "руки" кальмодуліну, що добре узгоджується з біоінформатично передбаченим CBSDII (рис. 3.15). Існування CBSDIII також корелює з докінговою моделлю. Три залишки (430-RQT-432), які розташовані в центрі CBSDIII, створюють контакти з протилежного боку «руки» молекули кальмодуліну. Важливо відзначити, що залишки, які фланкують регіон 430-RQT-432 CBSDIII, не експоновані, вони або прикриті альфа спіраллю домену I, або заховані в домені III (як Phe424 і Val426). Деякі додаткові взаємодіючі кластери можуть бути знайдені в домені I, один з яких розташований біля консервативного залишку Thr72 в області SWITCH I (Arg69 і Ile71). Проте, ці контакти, ймовірно, є досить слабкими, оскільки

вони не важливі для структурної взаємодії (рис. 3.16). Кількість залишків, які беруть участь у формуванні інтерфейсу складає 27 для eEF1A1 і 28 для кальмодуліну. Область інтерфейсу взаємодії дорівнює $812,6 \text{ \AA}^2$. Ступінь специфічності взаємодії (P-значення) 0,469 вказує, що значення ΔiG є типовим для даного типу інтерфейсу.

3.2.2. Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A із F-актином. Наступне питання – чи може виявлена нами різниця в просторовій структурі прото-онкогенної і не онкогенної ізоформ eEF1A впливати на їх взаємодію із білками цитоскелета. Протягом останніх років з'явилися дані про можливість зв'язування із актином eEF1A з нижчих еукаріотів [149]. Оскільки амінокислотні послідовності молекул факторів елонгації різного походження є досить консервативними, цілком можливо, що взаємодія із актином буде спостерігатися і у відповідних білків ссавців.

Для порівняння здатності ізоформ eEF1A до реорганізації актинового цитоскелету, зокрема, до утворення актинових пучків, було використано атомно-силову (АСМ) та конфокальну мікроскопію.

Для того, щоб F-актин не деполімеризувався та тримався на підкладці, він був закріплений на поверхні за допомогою фалоїдину-FITC, який зв'язується з актином безпосередньо в місці з'єднання його субодиниць, таким чином стабілізуючи його. Всі АСМ-зображення були отримані, використовуючи напівконтактний режим сканування (режим переривчастого контакту – tapping mode). Зображення зроблені в топографічному Z режимі та реконструйовані у 3-D зображенні. У якості підкладки використовували слюду або графіт. На (рис. 3.24 a-в) показані АСМ зображення актину в присутності чи за відсутності ізоформ eEF1A, отримані на слюді. Рисунок 3.24 a показує актин, стабілізований фалоїдином. Як можна бачити, актинові філаменти рівномірно розподілені по поверхні та мають приблизно

однаковий розмір. На рисунках 3.24 б і 3.24 в показано вплив eEF1A1 та eEF1A2, відповідно, на організацію актинових філаментів. При додаванні до актину eEF1A1 чи eEF1A2 на АСМ зображеннях спостерігалися чітко виражені скручені структури. Тобто, обидві ізоформи стимулюють формування пучків актинових філаментів *in vitro*.

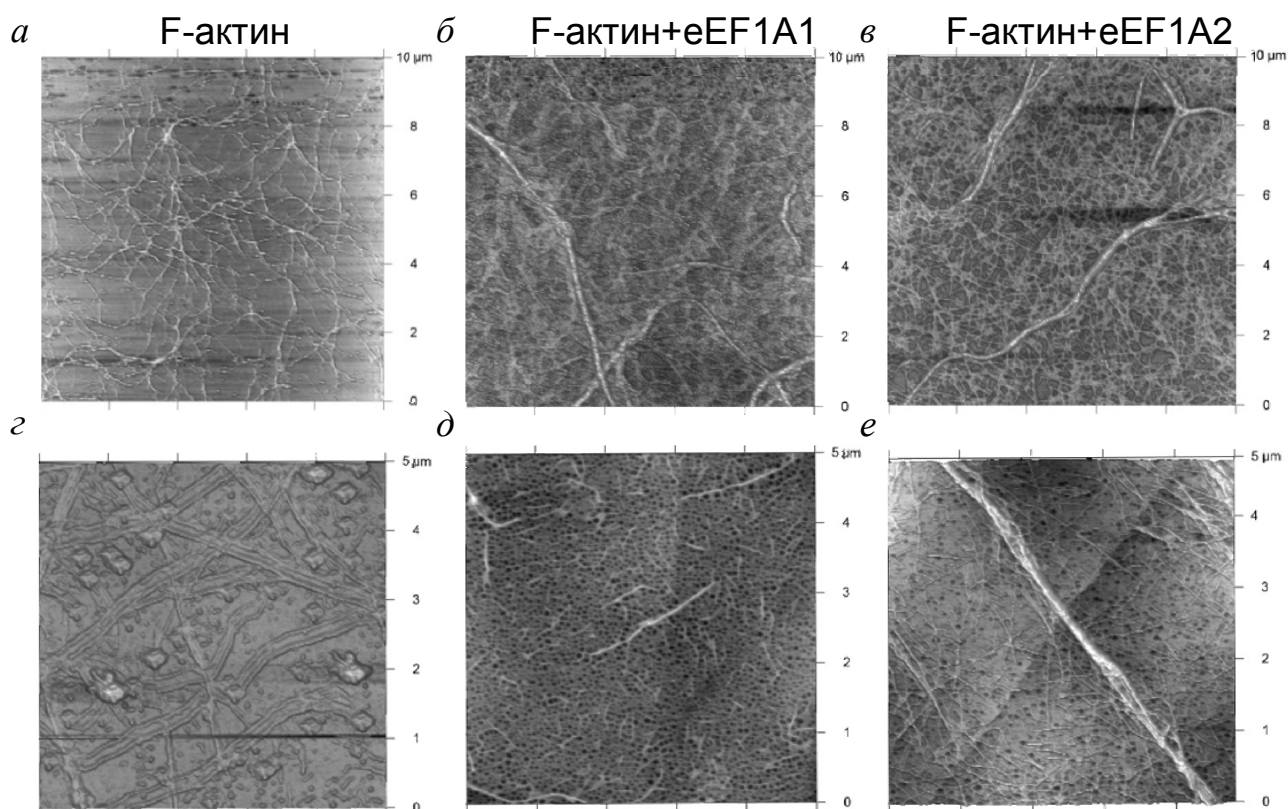


Рис. 3.24. Атомно-силова мікроскопія F-актину, стабілізованого фалоїдіном на слюді (а-в) та графіті (г-е)

Аналогічні результати отримані при використанні графіту у якості підкладки (рис. 3.24 г-е). На рисунках наведено типові експерименти із багатьох проведених. В усіх випадках, за використання як слюди, так і графіту у якості підкладки, ми спостерігали появу актинових пучків при додаванні ізоформ eEF1A. Слід відмітити, що у присутності eEF1A2

спостерігали тенденцію до утворення більшої кількості актинових пучків, ніж у присутності eEF1A1.

Для оцінки можливої різниці отриманих у присутності ізоформ eEF1A1 або eEF1A2 актинових пучків в цілому, були проведені дослідження за допомогою конфокальної мікроскопії. У даному випадку F-актин стабілізували за допомогою фалоїдіну, міченого FITC. Обидві ізоформи eEF1A стимулювали утворення актинових пучків, що відрізнялися за формою. Результати наведено на рис. 3.25.

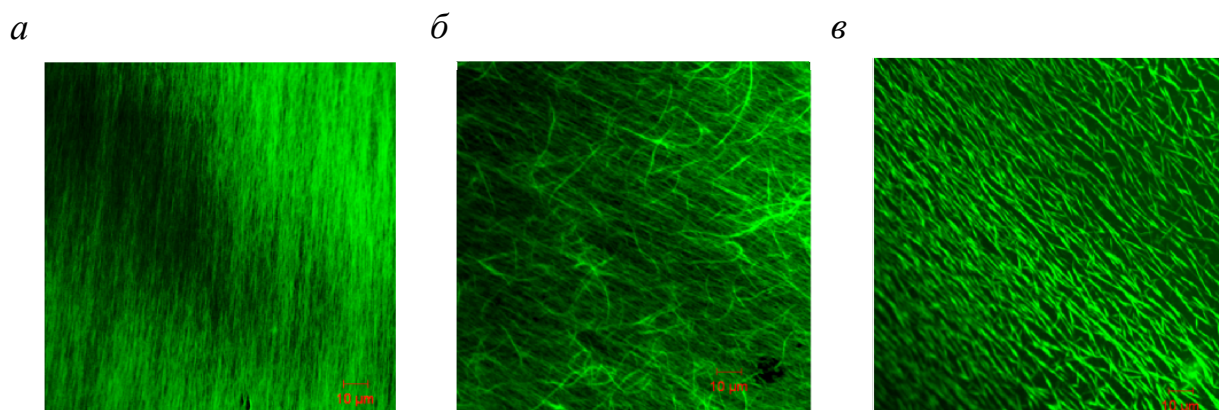


Рис. 3.25. Конфокальна мікроскопія F-актину, стабілізованого фалоїдином-FITC (а), у присутності ізоформ eEF1A1(б) або eEF1A2 (в)

Наступне питання - чи може кальмодулін мати регуляторний вплив на взаємодію eEF1A1 із актиновими філаментами? Першим кроком на шляху вивчення цього питання стало дослідження локалізації актин-зв'язувальних сайтів в молекулі eEF1A1. Для цього знов були використані вкорочені мутантні білки, що містили домен I, домени I+II і домени II+III eEF1A1. Методом ко-імунопреципітації було показано, що актин взаємодіє виключно із доменом III eEF1A1(рис. 3.26).

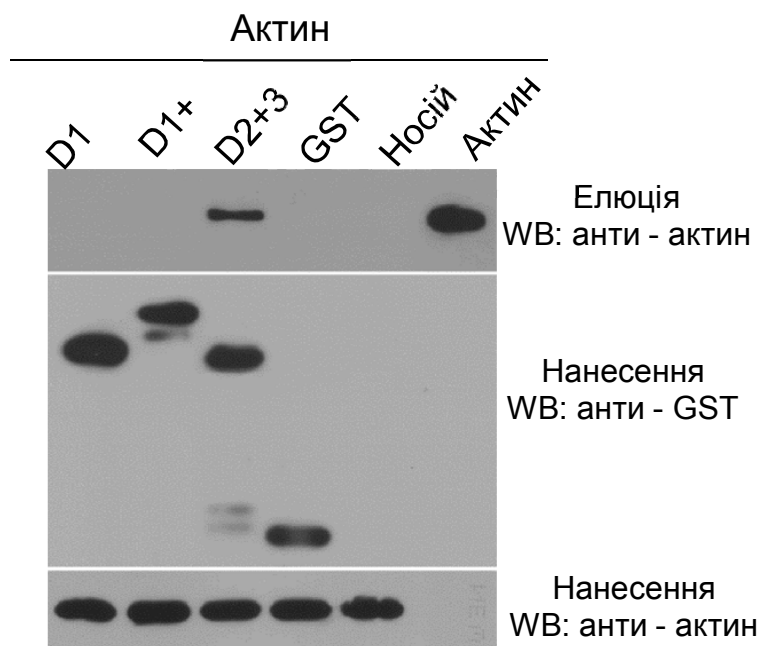


Рис. 3.26. Ко-преципітація актину з різними доменами eEF1A1

Оскільки основний сайт взаємодії eEF1A1 з кальмодуліном також локалізований у домені III (рис. 3.16.), цілком можлива конкуренція між актином і кальмодуліном за зв'язування із eEF1A1. Для перевірки цього було проведено експерименти з вивчення можливості Ca^{2+} -залежного впливу кальмодуліну на здатність eEF1A1 формувати актинові пучки. Таку здатність вивчали за допомогою низькошвидкісного центрифугування. В основі методу лежить здатність актинових пучків, на відміну від актинових філаментів та глобулярного актину, осаджуватися низько швидкісним центрифугуванням.

На рис. 3.27 наведені результати репрезентативного експерименту. Видно, що у присутності eEF1A1 більша частина актину переходить у форму високомолекулярних пучків і осаджується під час центрифугування. Присутність СаМ приводить до зменшення кількості актину у осаді, причому цей ефект спостерігається тільки, якщо СаМ знаходиться у кальцій-зв'язаній формі.

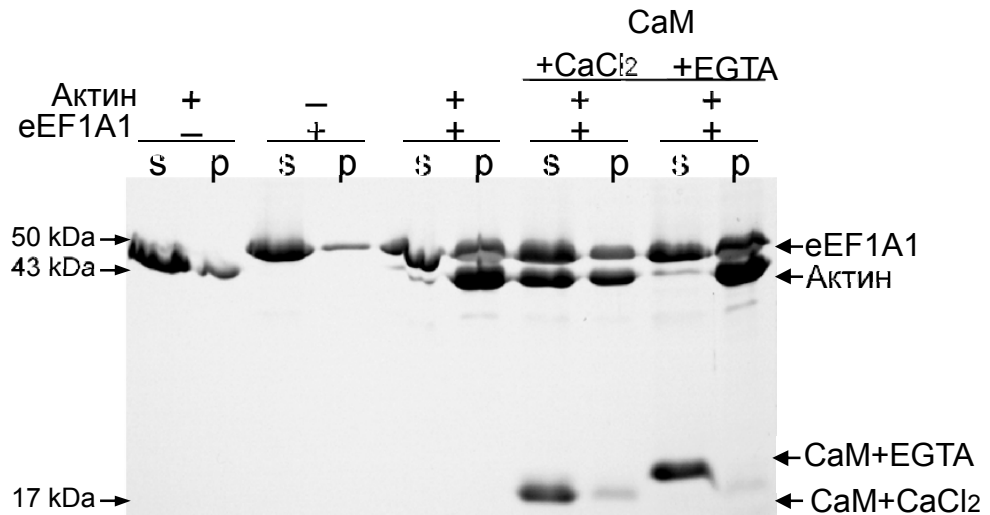


Рис.3.27. Вплив кальмодуліну на формування актинових пучків в присутності eEF1A1. Метод низькошвидкісної ко-седииментації

Таким чином, нами експериментально підтверджена можливість конкуренції кальмодуліну і актину за eEF1A1. Цей факт розкриває нову, непередбачувану раніше можливість Ca^{2+} -індукованої регуляції канонічних та/або неканонічних функцій eEF1A1. Взаємодія eEF1A1 з тРНК і взаємодія eEF1A1 з актином можуть контролюватися кальмодуліном у Ca^{2+} -залежний спосіб, в той час коли на аналогічні взаємодії eEF1A2 кальмодулін не впливає. Тобто, при появі в незвичній для цього білка тканині, комплекси eEF1A2 можуть перебувати поза традиційною регуляцією, що може дозволити цій ізоформі, на відміну від eEF1A1, брати участь в інших клітинних процесах, пов'язаних, наприклад, із онкогенною трансформацією.

3.2.3. Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з білком Sgt1. Важливим аспектом, що залишився нерозглянутим, було виявлення питання, чи може дискримінація між ізоформами eEF1A мати більш загальний характер, тобто проявлятися під час взаємодії не тільки із партнерами eEF1A, що залучені у клітинний сигналінг та цитоскелетну реорганізацію. Ми запропонували, що одним із таких можливих партнерів може бути білок Sgt1. Відомо, що цей білок має ко-шаперонні властивості [105–107], взаємодіє з кальцій-

зв'язуючими білками [100] та бере участь у системі антивірусного захисту [111–114], тобто бере участь в тих же самих процесах, що і eEF1A. Отже, цілком можлива або синергічна, або конкурентна дія eEF1A і Sgt1, що може супроводжуватися формуванням комплексу між цими білками.

3.2.3.1. Дослідження взаємодії eEF1A з білком Sgt1 in vitro. З метою вивчення можливості взаємодії eEF1A з Sgt1 було проведено два різних експерименту з ко-преципітації (рис. 3.28).

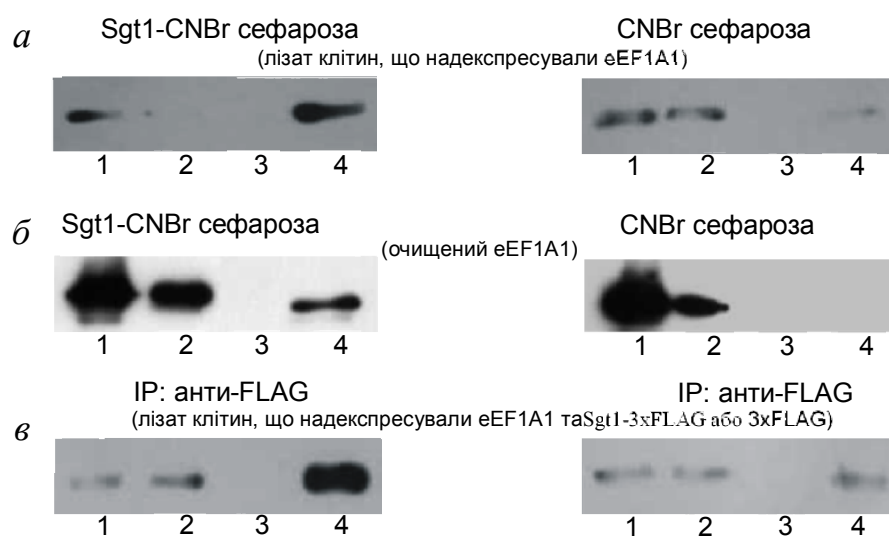


Рис. 3.28. Взаємодія Sgt1 та eEF1A1 в клітинах HEK293. Преципітація з використанням Sgt1-CNBR або CNBR сефарози і лізату клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1 (а) або з очищеним білком eEF1A1 (б). Ко-імунопреципітація з використанням анти-FLAG агарози і білкового лізату, отриманого з клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1, трансфікованих плазмідною, що кодувала Sgt1-3xFLAG (ліва панель) або 3xFLAG (права панель) (в). Доріжки: 1 - сумарна фракція (те, що наносили на сефарозу), 2 - фракція, що не зв'язалася, 3 - остання промивка, 4 - елюція

У першому з них, лізат, отриманий з клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1, наносили на Sgt1-CNBr сефарозу та на CNBr

сефарозу без пришитого білку для контролю неспецифічного зв'язування. Елюція eEF1A1 з Sgt1-CNBr сефарози відбувалася у буфері з високою іонною силою, що свідчить про формування специфічного eEF1A1-Sgt1 комплексу. (рис. 3.28 *а*, ліва панель, смуга 4). У другому експерименті, очищений eEF1A1 наносили на Sgt1-CNBr афінну смолу або на пусту CNBr смолу (контроль). Видно, що так само, як і в першому експерименті, eEF1A1 взаємодівав із Sgt1 (рис. 3.28 *б*, ліва панель, смуга 4).

Врешті, ми перевірили, чи може існувати комплекс eEF1A1-Sgt1 в клітинах. Для цього клітини людини, що надекспресували eEF1A1, були трансфіковані плазмідною, що кодувала Sgt1-3xFLAG чи 3xFLAG, після цього проводилася ко-імунопреципітація на анти-FLAG смолу. Як видно з рис. 3.28 *в*, eEF1A1 взаємодівав з Sgt1-3xFLAG і в клітинах.

Взаємодію між eEF1A1 та Sgt1 було підтверджено також методами ІФА (рис. 3.29 *а*) та конфокальної мікроскопії (рис. 3.29 *б*).

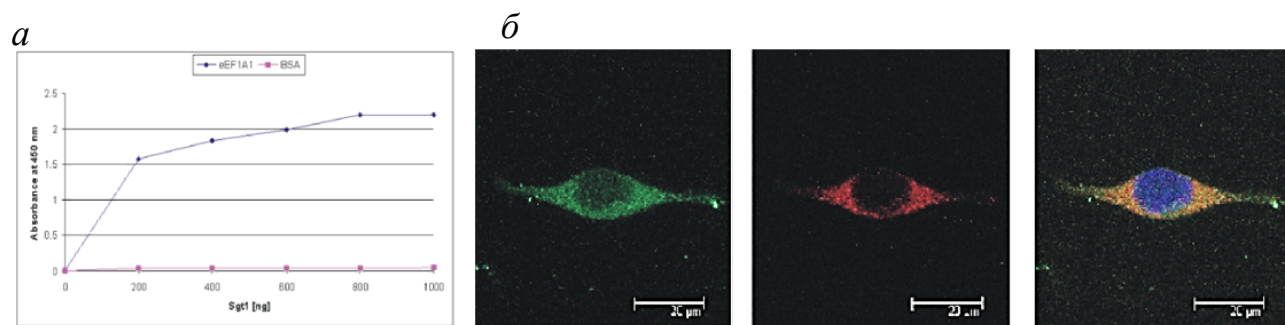


Рис 3.29. Формування комплексу Sgt1 і eEF1A1. (*а*) Імуноферментний аналіз. Зв'язування Sgt1 з eEF1A1 оцінювали з використанням антитіл проти Sgt1. (*б*) Ко-локалізація Sgt1 з eEF1A1 в клітинах HEK293. Подвійне імунофлуоресцентне фарбування. Sgt1 (зелений) , eEF1A1 (червоний), ядра (синій) кольори

Для того, щоб оцінити здатність ізоформи eEF1A2 до взаємодії з Sgt1,

очищені eEF1A1 та eEF1A2 титрували зростаючими кількостями Sgt1. Формування комплексу аналізували за допомогою горизонтального гелі-електрофорезу в неденатуруючих умовах з подальшим вестерн-блот аналізом (рис. 3.30). Умови електрофорезу підбирали таким чином, щоб по різному заряджені eEF1A1/eEF1A2 і Sgt1 рухалися в протилежних напрямках в гелі. Комплекс Sgt1 та eEF1A1 починав формуватися при молярному співвідношенні 1:1, в той час коли комплекс Sgt1 з eEF1A2 взагалі не детектувався навіть при восьмикратному надлишку Sgt1.

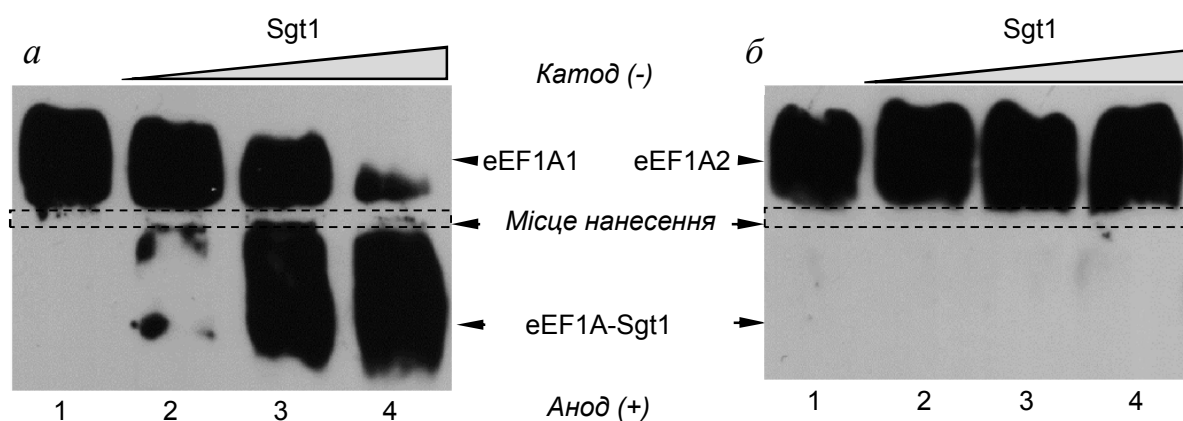


Рис. 3.30. Ізоформа eEF1A2 не утворює комплекс з Sgt1. Вестерн-блот аналіз нативного гелю, оброблений антитілами проти eEF1A, 1,3 мкМ eEF1A1(a) або eEF1A2 (б) змішували з 1,3 мкМ, 4 мкМ чи з 10,6 мкМ Sgt1. Доріжки: 1 - eEF1A, 2 - eEF1A і Sgt1 (1:1), 3 - eEF1A і Sgt1 (1:3), 4 - eEF1A і Sgt1 (1:8). Білок eEF1A мігрує в бік катоду, Sgt1 і комплекс Sgt1-eEF1A мігрують в бік аноду

Отже, у випадку взаємодії із Sgt1 також спостерігається дискримінація між ізоформами eEF1A. Для того, щоб підійти до в'яснення можливого функціонального сенсу такої дискримінації, необхідно було детально охарактеризувати взаємодію Sgt1 із eEF1A1.

3.2.3.2. Ідентифікація доменів Sgt1 та eEF1A1, що беруть участь у формуванні комплексу. Як Sgt1, так і eEF1A1 складаються з декількох структурних доменів. Отже, для локалізації сайтів взаємодії двох білків було використано низку делеційних мутантів (рис. 3.31).

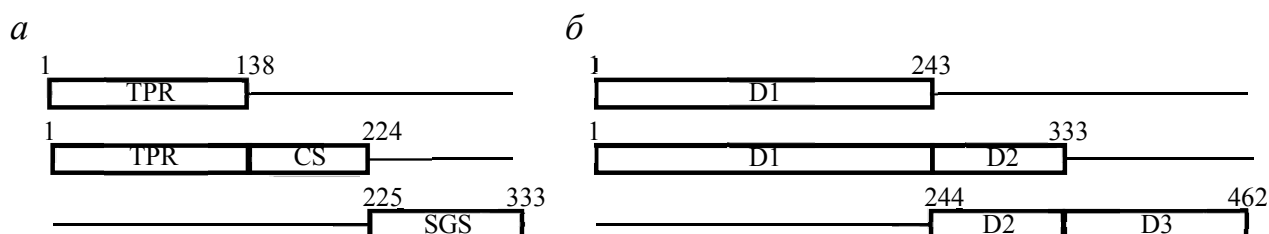


Рис. 3.31. Схематичне зображення використаних делеційних мутантів Sgt1 (а) та eEF1A1 (б)

Щоб точніше локалізувати сайт взаємодії, були використані конструкції, що містять окремо домени TPR, TPR+CS і SGS білка Sgt1 та домени I, I+II і II+III білка eEF1A1. Здатність доменів Sgt1 зв'язувати повнорозмірний eEF1A1 оцінювали за допомогою ко-преципітації, використовуючи Ni-NTA агарозу, зв'язану з Sgt1-His чи з відповідними доменами цього білка. Результати вестерн-блот аналізу показали, що TPR та TPR+CS домени взаємодіють з eEF1A1, а SGS не взаємодіє (рис. 3.32.).

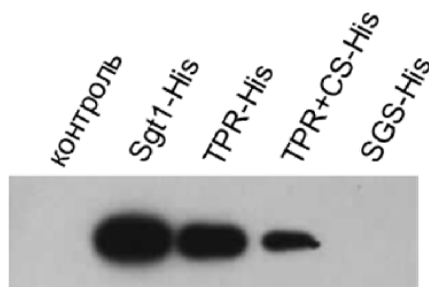


Рис. 3.32. Взаємодія Sgt1 і його доменів з eEF1A1. Очищений eEF1A1 наносили на смолу Ni-NTA (контроль) або Ni-NTA смоли з Sgt1-His та його доменами. Вестерн-блот робили з анти-eEF1A антитілами

Ці результати було підтверджено додатковим експериментом за допомогою гель-електрофорезу в неденатуруючих умовах (рис. 3.33. *a*). Більше того, домени Sgt1 не взаємодіяли з eEF1A2, що є додатковим доказом незначної спорідненості eEF1A2 до Sgt1 (рис. 3.33. *б*).

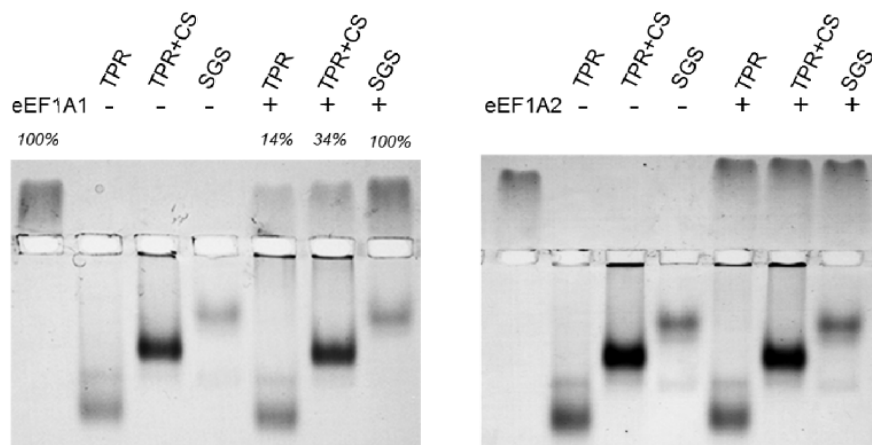


Рис. 3.33. Гель-електрофорез за неденатуруючих умов eEF1A1 (*a*) та eEF1A2 (*б*) з доменами Sgt1. У відсотках представлені дані денситометричного аналізу інтенсивності смуг

Для визначення сайту взаємодії eEF1A1 з Sgt1, було проведено ко-преципітацію відповідних доменів eEF1A, використовуючи смолу Ni-NTA, зв'язану із Sgt1-His. Результати вестерн-блот аналізу показали, що D1+D2 та D2+D3 взаємодіють з Sgt1 (рис. 3.34). Оскільки взаємодія домену D1 з Sgt1 була відсутня, зроблено висновок, що внесок у формування комплексу роблять домени D2 та D3 eEF1A1.

Зважаючи на те, що перший домен eEF1A1 є нуклеотид-зв'язуючим, відсутність взаємодії між цим доменом та Sgt1, може свідчити про те, що формування комплексу з Sgt1 не впливає на ГДФ-зв'язувальну функцію eEF1A1.

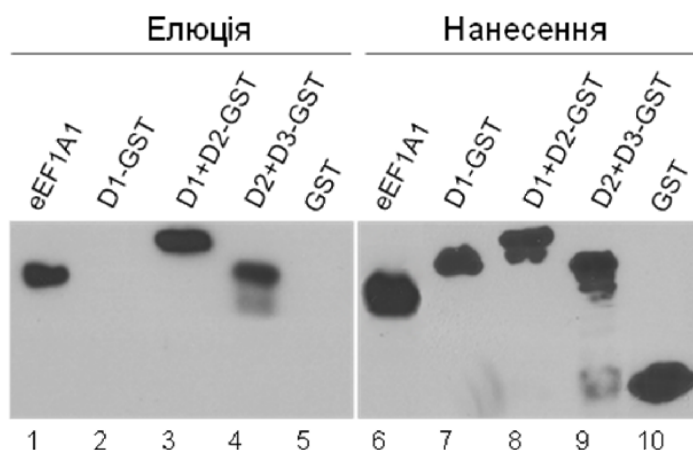


Рис. 3.34. Взаємодія eEF1A1 і його доменів з Sgt1. Повнорозмірний eEF1A1 або його домени, зшиті з GST, наносили на Ni-NTA агарозу з Sgt1 – His. Вестерн-блот робили з анти-GST антитілами для виявлення доменів GST-eEF1A1 (смуги 2-5, 7-10), і з анти-eEF1A антитілами для детекції eEF1A1 (доріжка 1, 6)

З метою перевірки цього припущення було проведено аналіз ГДФ/ ^3H -ГДФ обміну в молекулі eEF1A. Дійсно, титрування eEF1A1 зростаючими до 10-кратного надлишку кількостями Sgt1 не впливало на здатність eEF1A1 зв'язувати ГДФ (рис. 3.35).

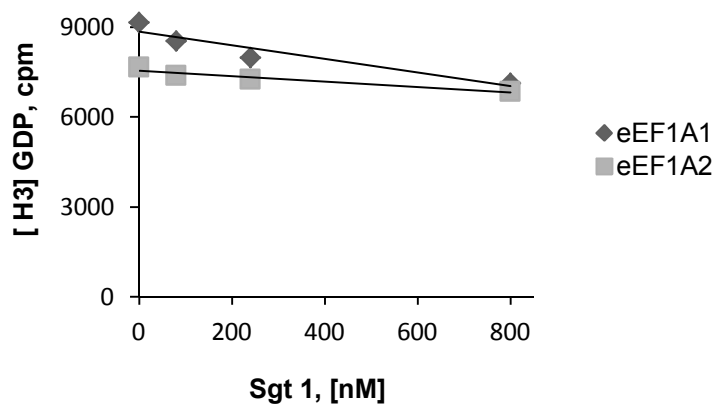


Рис. 3.35. Sgt1 не впливає на ^3H ГДФ/ГДФ обмін у eEF1A1 і eEF1A2

3.2.3.3 Моделювання комплексу Sgt1-eEF1A1 in silico. Для того, щоб наблизитися до розуміння молекулярних механізмів взаємодії, модель комплексу eEF1A1-Sgt1 була отримана in silico. Беручи до уваги експериментальні дані по визначенню доменів обох білків, залучених у формування комплексу, був зроблений молекулярний докінг цих двох білків. Для аналізу було взято 10 найкращих комплексів, передбачених веб-сервером ClusPro. Візуальний аналіз комплексів виявив ряд аналогічних рішень: #2, #4, #5, #6, #8, та #9 (рис. 3.36 а). Показано, що у комплексі TPR домен білка Sgt1 може взаємодіяти із доменом D3 eEF1A1, тобто вищевказані 6 рішень добре узгоджувались з експериментальними даними. Хоча аналіз цих рішень чітко вказує на локалізацію інтерфейсу на білку eEF1A1, важко визначити орієнтацію TPR домена білка Sgt1 вздовж ущелини, що утворюється на D2-D3 інтерфейсі eEF1A1. TPR домен може в протилежних орієнтаціях взаємодіяти із поверхнею eEF1A1 (моделі #2 та #9 та, навпаки, моделі #4, #5, #6, #8 (рис. 3.36 а).

Щоб прояснити цей момент, точний аналіз взаємодіючих інтерфейсів проводили за допомогою веб-сервера PDBePISA. Для шести відібраних комплексів, середня кількість залишків, які беруть участь у формуванні інтерфейсу, дорівнювала 46 ± 3 для eEF1A1 та 42 ± 5 для TPR домену Sgt1. Площі взаємодіючих поверхонь були наступними : #2-1547Å, #4-1420Å, #5-1651Å, #6-1585Å, #8-1487Å та #9-1341Å. Ступінь специфічності інтерфейсу (р-значення) дуже близьке до 1,0 ($0,95 \pm 0,03$). $P \geq 0,5$ означає, що інтерфейс eEF1A1 є менш гідрофобним, ніж очікувалося, що підтверджується великою кількістю передбачених сольових містків, що формуються на інтерфейсі. Це може вказувати на істотний внесок електростатичних сил до забезпечення цієї взаємодії: 24, 13, 27, 23, 11 та 18 таких контактів формувалися в комплексах #2, #4, #5, #6, #8 та #9, відповідно. Найбільш ймовірний комплекс показано на рис. 3.36 б.

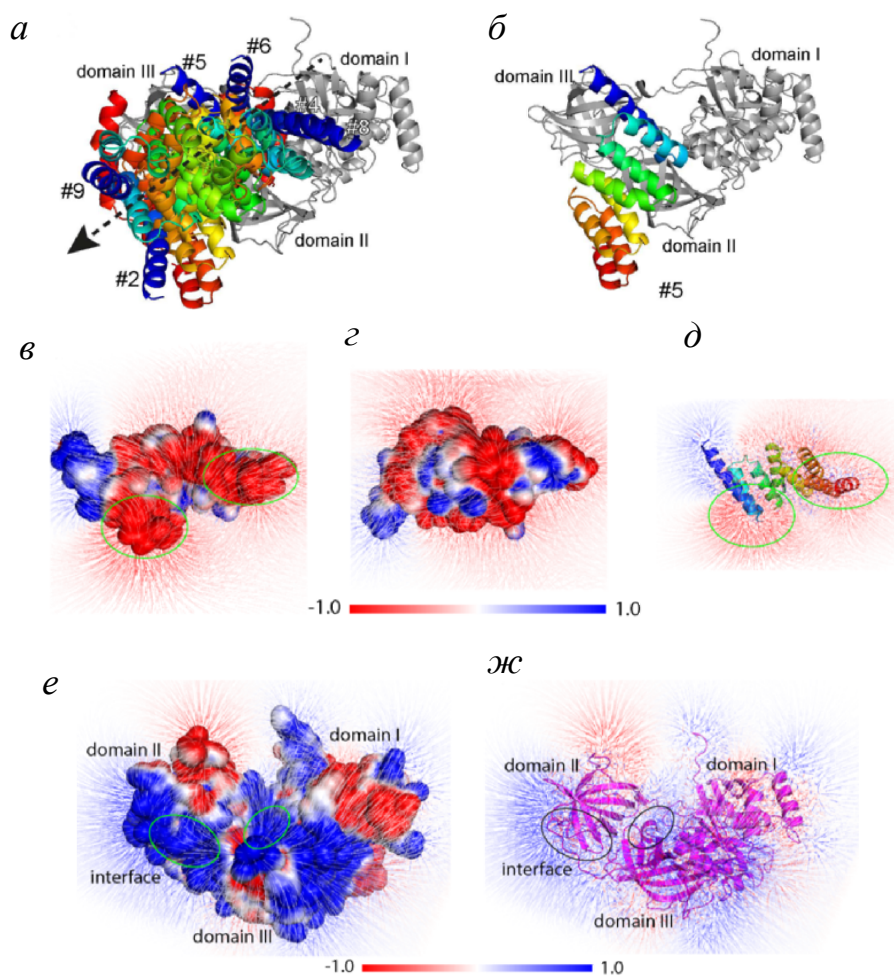


Рис. 3.36 Моделювання комплексу eEF1A1-Sgt1. (а). Структурна суперпозиція найкращих комплексів # 2, # 4, # 5, # 6, # 8 і # 9. N-кінцеві частини TPR домену білка Sgt1 позначені відповідними номерами комплексів. eEF1A1 зафарбований сірим кольором і його домени позначені римськими цифрами. TPR домен Sgt1 забарвлений в кольори веселки, синім позначений N-кінець, червоним С-кінець. (б). Комплекс # 5, який являє собою найбільш вірогідну модель взаємодії TPR домену Sgt1 з eEF1A1. (в). Бік "інтерфейсу" TPR домену Sgt1. (г). Протилежна інтерфейсу поверхня TPR домену Sgt1. (д). Схематична репрезентація вторинної структури TPR домену Sgt1 в тій самій орієнтації, що і в (а). (е). Запропоновані взаємодіючі інтерфейси eEF1A1. (ж). Репрезентація вторинної структури тієї ж самої поверхні. Негативні і позитивні потенціали забарвлені в червоний і синій кольори, відповідно

Важливо відзначити, що електростатичні сили, вірогідно, відіграють істотну роль у взаємодії між eEF1A1 та Sgt1. Негативно заряджена поверхня TPR домену (рис. 3.36. *в-д*) нагадує негативно заряджений остов тРНК та взаємодіє з позитивно зарядженою зв'язуючою поверхнею D2 та D3 доменів eEF1A1 (рис. 3.36 *е, ж*). Домени D2 та D3, як відомо, беруть участь у взаємодії eEF1A1 з негативно зарядженими тРНК та тРНК-подібними структурами вірусної РНК [131,140].

Амінокислотні залишки обох білків, які ймовірно беруть участь у взаємодії в комплексі #5, зображені на рис. 3.37.

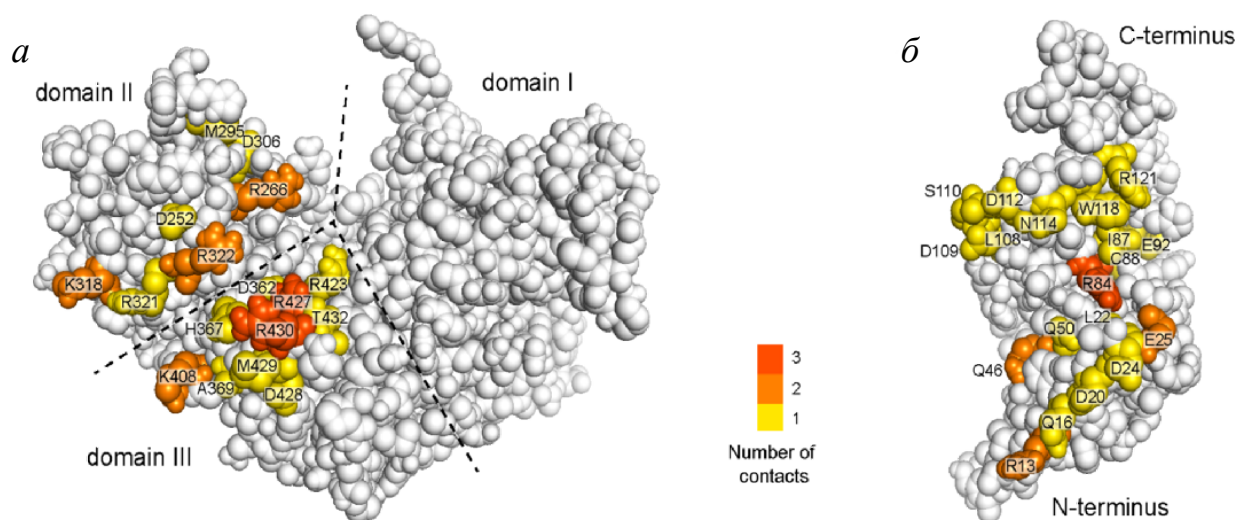


Рис.3.37. Амінокислотні залишки, що знаходяться на інтерфейсі комплексу eEF1A-Sgt1. (а). Поверхня інтерфейсу eEF1A. (б). Поверхня інтерфейсу TPR домену Sgt1. Залишки, що формують інтерфейс, забарвлені від жовтого кольору до червоного, відповідно до кількості контактів, що залучаються до формування комплексу

3.2.3.4. Конкурування Sgt1 з РНК-ВТМ за місце зв'язування з eEF1A.

Відомо, що eEF1A є кофактором вірусної реплікації для різних груп вірусів від ВІЛ до вірусу кущистої карликовості томата [150]. Sgt1 є одним з головних компонентів антивірусної захисної системи [151]. Оскільки

змодельована взаємодія eEF1A1-Sgt1 передбачала можливість того, що TRP домен Sgt1 мімікрує негативно заряджену поверхню РНК, було важливо перевірити експериментально, чи може Sgt1 конкурувати з вірусною РНК за eEF1A1.

Для перевірки можливості формування комплексів eEF1A1 та eEF1A2 з РНК-ВТМ було використано гель-електрофорез в неденатуруючих умовах. В присутності РНК-ВТМ спостерігався зсув смуг відповідних eEF1A1 та eEF1A2 в бік аноду, що свідчило про утворення комплексів eEF1A1 і eEF1A2 з РНК-ВТМ (рис. 3.38). Для ізоформи eEF1A2 було виявлено більш виражену спорідненість до РНК-ВТМ, що корелює з відомою більш високою здатністю eEF1A2 зв'язувати тРНК [152].

РНК-ВТМ (мкг)	-	0,25	1	-	0,25	1
1,3 мкг eEF1A2	-	-	-	+	+	+
1,3 мкг eEF1A1	+	+	+	-	-	-

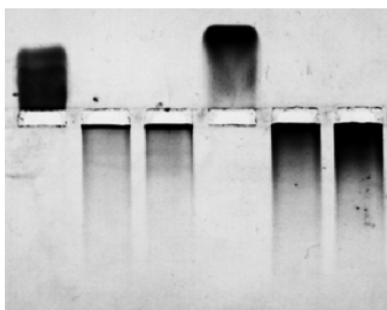


Рис. 3.38. eEF1A1 і eEF1A2 взаємодіють з РНК-ВТМ. Аналіз взаємодії проводили методом зсуву смуги в неденатуруючому гелі з подальшим фарбуванням Кумасі діамантовим синім

Результати експерименту, у якому вивчали можливість конкурування eEF1A1 з вірусною РНК показані на рис. 3.39. Видно, що формування комплексу eEF1A1 - РНК-ВТМ викликало зсув смуги eEF1A1 в нативному гелі в бік аноду. В цьому випадку, значна кількість eEF1A1 залишалася у кишені гелю і, відповідно, не переносилася на мембрану для Вестерн блоту.

Проте, додавання Sgt1 до комплексу eEF1A1 з РНК-ВТМ викликало повторну появу смуги eEF1A1 в гелі. В цьому випадку значна кількість eEF1A1 витіснялася із комплексу з РНК і формувала комплекс з Sgt1. Ці дані вказують на принципову можливість витіснення eEF1A1 білком Sgt1 з комплексу eEF1A1-РНК-ВТМ.

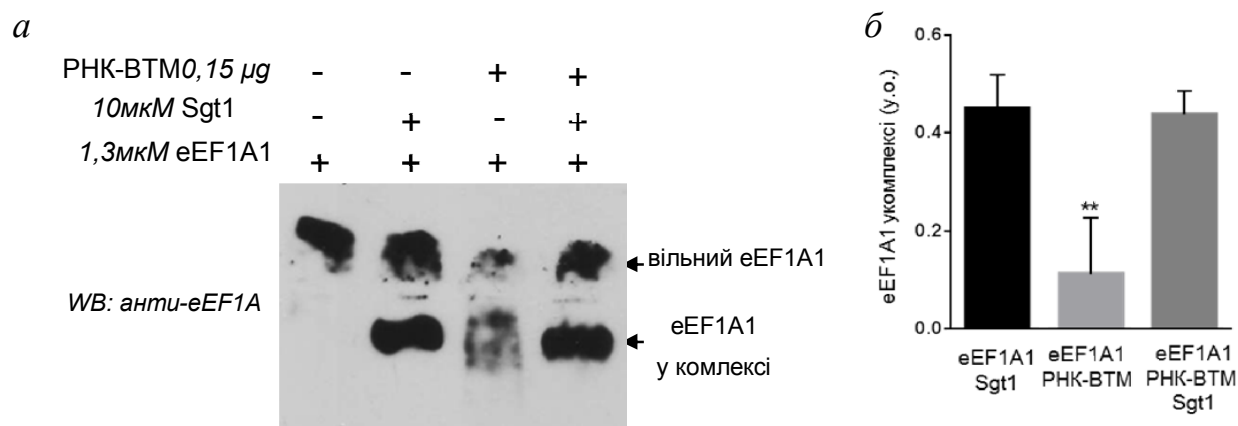


Рис. 3.39. Sgt1 конкурує з РНК-ВТМ за місце зв'язування з eEF1A1. (*a*). Вестерн блот аналіз «нативного» гелю із анти-eEF1A антитілами. (*б*). Денситометричний аналіз комплексів eEF1A1. Загальну інтенсивність фарбування eEF1A1 у комплексах eEF1A1-RNA-ВТМ і eEF1A1-Sgt1-RNA-ВТМ аналізували за допомогою двовибіркового t-критерію, $p=0.0020$; $n=4$. Стандартні відхилення показані. Для обчислень було використано програмне забезпечення GraphPad Prism 6,01

Конкурентний характер взаємодії Sgt1 і РНК-ВТМ із eEF1A1 показано пул-даун експериментом, у якому надлишок РНК-ВТМ негативно впливав на зв'язування eEF1A1 з Sgt1 (рис. 3.40).

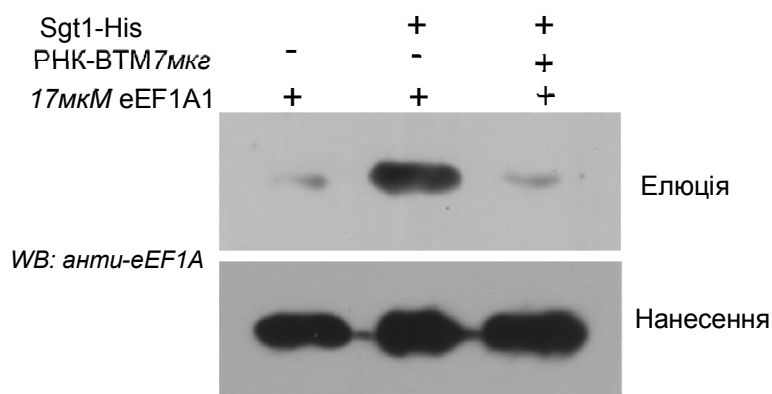


Рис. 3.40. Надлишок РНК-ВТМ перешкоджає утворенню комплексу eEF1A1-Sgt1. Вестерн-блот аналіз eEF1A1, преципітованого зі смолою Ni-NTA з іммобілізованим Sgt1-His

Подвійний комплекс Sgt1 та РНК-ВТМ не було виявлено методом зсуву смуги в гелі в неденатуруючих умовах (рис. 3.41). Також, як і очікувалося, конкуренція між Sgt1 та РНК-ВТМ за eEF1A2 була відсутня (рис. 3.41).

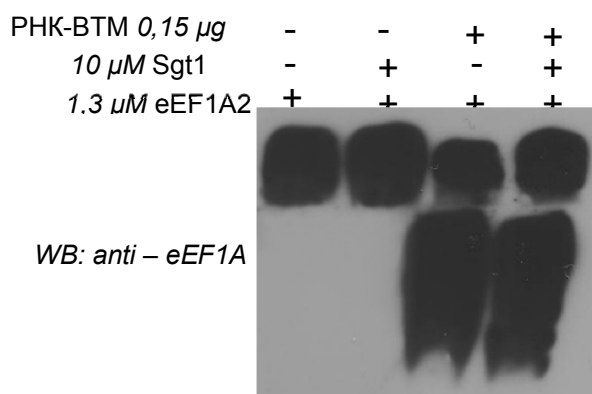


Рис. 3.41. Sgt1 не впливає на утворення комплексу РНК-ВТМ з eEF1A2. eEF1A2 і РНК-ВТМ інкубували протягом 5 хв при 37⁰С в буфері для зв'язування (30 мМ Трис-НСl, рН 7,5; 20% гліцерину, 2 мМ MgCl₂, 6 мМ β -МЕ; 0,1 мМ ГТФ, 150 мМ NaCl,). Sgt1, або рівний об'єм буфера для зв'язування, додавали і інкубували протягом ще 10 хвилин при 37⁰С. Зразки аналізували за допомогою електрофорезу в гелі з наступним Вестерн-блот аналізом, з використанням анти-eEF1A антитіл

Отже, нами було визначено нового партнера eEF1A1, білок Sgt1. Взаємодія eEF1A1-Sgt1 була продемонстрована з використанням як очищених білків, так і клітинних лізатів. Потенційні сайти взаємодії були визначені за допомогою делеційних мутантів обох білків. Моделювання комплексу показало наявність геометричної відповідності поверхонь eEF1A1 і TPR домену білка Sgt1, стабілізовану низкою сольових містків та високим ступенем відповідності заряджених поверхонь, що свідчить про певний вклад електростатичних взаємодій у стабілізацію комплексу. Це вказує на можливість конкуренції між білком Sgt1 і РНК за позитивно заряджену поверхню eEF1A1. Слід однак зазначити, що, оскільки поверхневі заряди eEF1A1 і eEF1A2, ймовірно, дуже близькі, різниця у взаємодії двох ізоформ eEF1A з Sgt1 скоріш за все забезпечується за рахунок певних неелектростатичних взаємодій. В цьому зв'язку можна згадати дещо підвищену поверхневу гідрофобність молекули eEF1A1 у порівнянні з eEF1A2 (рис. 3.10), що може бути важливою для взаємодії з повнорозмірним білком Sgt1.

Висновки до підрозділу 3.2:

Показано, що eEF1A1 має здатність до зв'язування певних членів родини Ca^{2+} -зв'язуючих білків, у той час як eEF1A2 не демонструє такої взаємодії.

Передбачено та експериментально ідентифіковано ділянки eEF1A1, що беруть участь у взаємодії з кальмодуліном. На основі цих даних побудована молекулярна модель взаємодії eEF1A1 з кальмодуліном.

Показано, що в присутності ізоформ eEF1A формуються актинові пучки різної форми.

Експериментально підтверджена можливість конкуренції кальмодуліну і актину за eEF1A1. Цей факт розкриває нову, непередбачувану раніше можливість Ca^{2+} -індукованої регуляції канонічних та/або неканонічних

функцій eEF1A1.

Показано принципову можливість впливу CaM на витіснення eEF1A1 з комплексу з тРНК, що вказує на можливий механізм участі CaM в регуляції елонгації білкового синтезу у вищих еукаріотів. Брак взаємодії CaM із ізоформою eEF1A2 свідчить на користь неучасті eEF1A2 в такій регуляції.

Визначено нового партнера eEF1A, білок Sgt1. Показано, що ця взаємодія притаманна тільки ізоформі eEF1A1, що продемонстровано як на рівні очищених білків, так і клітинних лізатів. Потенційні сайти взаємодії eEF1A1-Sgt1 були визначені за допомогою делеційних мутантів обох білків. Моделювання комплексу показало наявність геометричної та електростатичної відповідності поверхонь eEF1A1 і Sgt1. Показана принципова можливість конкуренції Sgt1 і вірусної РНК за eEF1A1, що може бути важливим для системи антивірусного захисту організму.

Результати досліджень, поданих в підрозділі, опубліковані в працях:

1. Comparison of the ability of mammalian eEF1A1 and its oncogenic variant eEF1A2 to interact with actin and calmodulin. / Novosylina O., Doyle A., Vlasenko D., Murphy M., Negrutskii B., El'skaya A. // *Biol Chem.* 2017;398(1):113-124.
2. Truncation of the A, A*, A' helices segment impairs the actin bundling activity of mammalian eEF1A1. / Vlasenko D. O, Novosylina O. V, Negrutskii B. S, El'skaya A. V. // *FEBS Lett. Elsevier*; 2015;589(11):1187–93.
3. Translation elongation factor eEF1A1 is a novel partner of a multifunctional protein Sgt1. / Novosylina O., Jurewicz E., Pydiura N., Goral A., Filipek A., Negrutskii B., El'skaya A. // *Biochimie*; 2015;119:137–45.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Отже, під час виконання роботи нами було вперше отримано дані, що свідчать про існування істотної конформаційної різниці між двома дуже подібними ізоформами eEF1A, які сильно відрізняються за своїм онкогенним потенціалом. Що може бути підґрунтям відмінності просторової організації двох високогомологічних білків? По-перше, відомо, що заміна кількох амінокислотних залишків кардинально міняє просторову організацію білка [153,154], це, вочевидь, може мати місце і для ізоформ eEF1A. По-друге, різниця у просторовій структурі ізоформ може бути викликана неоднаковістю пост-трансляційних модифікацій, яка може проявлятися як на рівні тієї ж самої модифікації (наприклад, ди- або триметилування), так і за рахунок появи певної модифікації тільки у одній ізоформі. Відомо, що кілька залишків лізину є диметильованими або триметильованими в eEF1A [155], також є ознаки того, що ізоформи можуть відрізнятися між собою кількістю метильованих лізинів і рівнем їх модифікації [55], що може впливати, зокрема, на гідрофобність білкової поверхні. Важливе значення може мати також наявність або відсутність фосфорилування певних амінокислотних залишків ізоформ. Наприклад, нещодавно було показано, що здатність на 85% ідентичних гістонових деацетилаз 1 і 2 до формування гомодимеру пов'язана зі статусом їх фосфорилування [156]. Крім того, ефект фосфорилування може впливати на локальну конформацію певних ділянок молекули. Оскільки ізоформи eEF1A1 і eEF1A2 мають як ті самі, так і різні сайти фосфорилування [157], можливість впливу цієї модифікації на підвищену здатність eEF1A1 до димерізації та/або взаємодії із певними білками-партнерами також не виключена.

Ми виявили, що прото-онкогенний білок eEF1A2 має компактну просторову організацію, в той час коли білок eEF1A1 перебуває у «розгорнутій» формі, що, до того ж має більш гідрофобну поверхню. Підвищена гідрофобність білка eEF1A1 може бути причиною його більшої схильності до самоасоціації. Дійсно, нами показано різну здатність ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 до формування димерів, причому просторова організація димерів ізоформи eEF1A1 є менш компактною, ніж димерів онкогенної ізоформи eEF1A2. Функціональна роль димерів eEF1A достеменно невідома. Цікаво, що трансляційна роль димерів бактеріального аналога - EF-Tu*GTP- була запропонована декілька років тому [158], однак ця концепція не мала подальшого розвитку. Необхідно зазначити, що у нещодавніх експериментах з криоелектронної мікроскопії трансляційних комплексів було показано, що eEF1A1 взаємодіє із рибосомою у мономерній формі [159]. Цілком ймовірно, що димери eEF1A можуть бути важливими для виконання певних нетрансляційних функцій, наприклад, для формування актинових пучків. Базуючись на отриманій в нашій лабораторії кристалічній структурі димеру ізоформи eEF1A2 [50] нами була запропонована модель формування актинових тяжів за участю димерів eEF1A (рис 4.1).

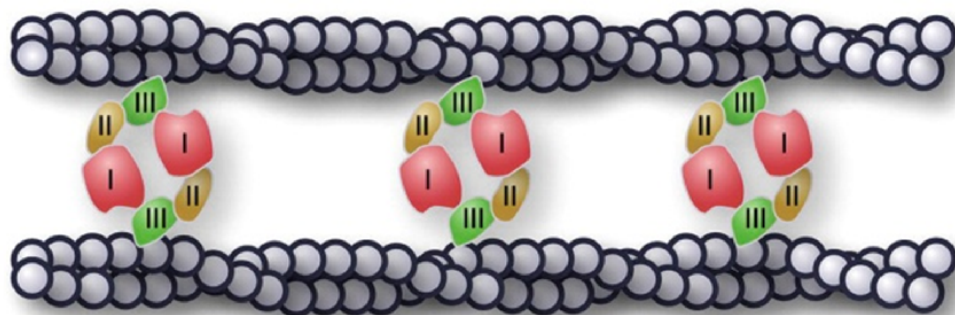


Рис. 4.1 Модель залучення димерів eEF1A до пучкування актинових філаментів. Домен III кожного димеру зв'язується з актиновими філаментами, в той час коли домен I контактує з доменом III протилежного ланцюга для стабілізації димера

Принципова відмінність цієї моделі від тих, що існували раніше [160], полягає в тому, що з актином взаємодіє тільки домен III eEF1A, оскільки саме це виходить з наших експериментальних даних (Рис. 3.27), а взаємодія між актиновими філаментами здійснюється за рахунок димерів eEF1A, що складаються із мономерів, розташованих «голова до хвосту». Також, нещодавно було запропоновано роль димеризації eEF1A у фосфорилування його залишку Ser21 Raf кіназою, з подальшим впливом на проліферацію клітин і апоптоз [161].

Необхідно відзначити, що, беручи до уваги шкалу гідрофобності різних клітинних білків [143] можна зробити висновок, що ані eEF1A1 (умовний показник гідрофобності = 2,265), ні eEF1A2 (умовний показник гідрофобності = 0,27) не належать до істотно гідрофобних білків. Для порівняння, поверхнева гідрофобність лізоциму, овальбуміну і бета-лактоглобуліну була 2,26; 12,0; 468 відповідно [143]. Більшу гідрофобність eEF1A1, ніж eEF1A2, можна пояснити експонуванням певної ліпофільної області на поверхні молекули, яка закрита у A2. Високий ступінь консервативності послідовностей ізоформ eEF1A свідчить на користь того, що практично кожна міні-поверхня білкової молекули є залученою до важливих білок-білкових взаємодій, як це вже показано для деяких білкових молекул. Оскільки білок eEF1A1 має «розтягнуту» форму у розчині, експонує назовні деякі гідрофобні ділянки і здатен суттєво змінювати конформацію в результаті взаємодії із партнером, ця ізоформа може взаємодіяти з самими різними білками, в той час, коли комунікаційні здатності більш глобулярної ізоформи A2 в цитоплазмі можуть бути дещо більш обмеженими. Але глобулярність білка eEF1A2, ймовірно, є ексклюзивно важливою для деяких інших взаємодій – характерна форма молекули eEF1A2 може забезпечувати основу для, наприклад, її специфічної взаємодії з пероксиредоксином, що забезпечує стійкість клітин до індукованої оксидативним стресом смерті [62]. Нещодавно було показано, що eEF1A2 здатен активувати фосфатиділінозитол

4-кіназу III бета і стимулювати таким чином формування філоподій [71]. Однак слід зазначити, що в цих роботах безпосереднє порівняння ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 ніколи не проводилося.

Отже, незважаючи на те, що ізоформи eEF1A1 і eEF1A2 мають однаковим чином взаємодіяти із трансляційними партнерами, вони можуть мати в клітинах різний спектр нетрансляційних білків-партнерів. Звісно, достатня частина пула неканонічних білків-партнерів залишається загальною для двох ізоформ, але можуть виникати і істотні відмінності. Саме здатність тієї чи іншої ізоформи взаємодіяти або не взаємодіяти з тим чи іншим клітинним білком може пояснити, чому білок eEF1A2, а не гомологічний з ним на 97.5% білок eEF1A1, проявляє онкогенні властивості.

Таким чином, необхідно було вирішити питання, чи можлива в принципі різна взаємодія двох високогомологічних білків eEF1A1 і eEF1A2 із білками партнерами, що можуть бути задіяними до здійснювання їх певних нетрансляційних функцій. Для цього було порівняно здатність eEF1A1 і eEF1A2 взаємодіяти із декількома клітинними білками, що є представниками групи сигнальних білків (кальмодулін), групи білків цитоскелету (актин) і групи білків антивірусного захисту (Sgt1). Виявлено, що прото-онкогенна і тканиноспецифічна ізоформа eEF1A2 не здатна до взаємодії із кальмодуліном і Sgt1, хоча зберігає спроможність взаємодіяти з актином. Цікаво, що форма актинових пучків, що формуються у присутності eEF1A1 або eEF1A2, суттєво відрізняється – у присутності eEF1A2 спостерігається формування товстих і коротких пучків, а у присутності eEF1A1 – подовжених і тонкіших, що може бути важливим для прояву специфічних функцій eEF1A2, пов'язаних із реорганізацією цитоскелету, у тому числі у ракових клітинах.

Взаємодії eEF1A1, що є неможливими для eEF1A2, були детально охарактеризовані. Так, була теоретично передбачена і експериментально підтверджена доменна локалізація сайтів зв'язування кальмодуліну в молекулі eEF1A1. Оскільки ці сайти перекривалися із сайтами зв'язування з

eEF1A1 його функціональних партнерів в білковому синтезі, ми передбачили, що зв'язування кальмодуліну може перешкоджати формуванню функціональних комплексів eEF1A1. Дійсно, була показана конкуренція між кальмодуліном і тРНК за eEF1A1 *in vitro*. Не виключено, що аналогічна конкуренція відбувається і з фактором нуклеотидного обміну, оскільки сайти взаємодії тРНК і eEF1B α в молекулі eEF1A1 розташовані дуже близько (рис. 3.19). Наявність такої конкуренції відкриває нові, непередбачувані раніше можливості у розумінні кальцій-опосередкованого метаболічного контролю трансляції. Крім того, нами показано, що кальмодулін перешкоджає eEF1A1 скручувати актинові філаменти. Цей факт вказує на ще одну можливий механізм участі кальцію в регуляції актинового цитоскелету.

Наступний білок, що вивчався, і з яким взаємодіє тільки eEF1A1, – це багатофункціональний білок Sgt1. Взаємодію eEF1A1 з Sgt1 було продемонстровано як на рівні клітинного лізату, так і очищених білків. Потенційні сайти зв'язування були визначені з використанням делеційних мутантів обох білків. Моделювання комплексу показало геометричну відповідність поверхонь eEF1A1 та Sgt1, стабілізовану досить великою кількістю сольових містків. Площа контакту в молекулі Sgt1 заряджена негативно, в той час коли контактний інтерфейс eEF1A1 в основному є позитивним. Цікаво, що такого роду взаємодія є більш характерною для білково-нуклеїнових комплексів. Відомо, що eEF1A є РНК зв'язуючим білком, який взаємодіє з тРНК, еукаріотною мРНК та вірусною РНК.

Отже, виникло питання, чи може Sgt1 конкурувати з такими РНК за зв'язування з eEF1A? Ми вирішили, що логічним буде перевірити на конкуренцію за зв'язування саме вірусну РНК, оскільки відомо, що Sgt1 залучається до так званих «господар-залежної» і «господар-незалежної» систем антивірусного захисту [115]. Механізм участі Sgt1 в «господар-залежному» захисті вивчено відносно добре, зокрема показано, що він пов'язаний з ко-шаперонною активністю Sgt1, білками теплового шоку та

специфічними R білками. Проте, спосіб участі Sgt1 в «господар-незалежному», тобто видо-незалежному захисті в рослинах та інших еукаріотних організмах, залишається неясним. Цілком можливо, що такий захист може включати взаємодію Sgt1 із високо консервативним eEF1A, оскільки відомо, що eEF1A підвищує продуктивність вірусних частинок через взаємодію з геномною вірусною РНК і РНК-залежною РНК полімеразою [150]. Взаємодія Sgt1 може запобігати зв'язуванню eEF1A1 з вірусною РНК. Ми показали, що така конкуренція дійсно можлива, щонайменше її було продемонстровано у експериментах *in vitro*. Показано також, що така конкуренція може мати зворотній характер, що передбачає необхідність збільшення експресії Sgt1 в організмі для боротьби з вірусною атакою. Ми не знайшли в літературі даних щодо впливу вірусної інфекції на рівень експресії Sgt, але таке передбачення цілком можливо перевірити експериментально у наступних дослідженнях.

Залишилися без відповіді ще два важливих і цікавих питання: - чому у вищих хребетних з'являється ізоформа eEF1A2, і чому дві високогомологічні ізоформи існують в організмі в різних тканинах, окремо одна від іншої.

Вважається, що представники однієї родини генів еволюційно відбираються і зберігаються тому, що вони продукують змінні рівні білків в часі і просторі еукаріотної клітини [162,163]. Але ко-експресія ізоваріантів білків в тих же самих клітинах в той же самий час може мати особливе значення, якщо ізоформи функціонально відрізняються хоча б за одним параметром (наприклад, зв'язування субстрата чи кофактора).

Ізоформи eEF1A1 і eEF1A2 характеризуються взаємовиключною тканинспецифічною експресією. Відносно довготривалу сумісну експресію eEF1A1 і eEF1A2 в тієї ж самій тканині спостерігали тільки за ненормальних для цій тканини умов, таких як карциногенез (незвичайна присутність eEF1A2) [65,68] або денервація/регенерація м'язів (незвичайна поява eEF1A1) [164,165]. Також були повідомлення про появу eEF1A1 в eEF1A2-

експресуючих нейронах де A1 залучався до процесу довготривалої потенціації та пригнічення синапсів [166–168]. Якщо ці ізоформи можуть по-різному взаємодіяти із білками-партнерами, як показано в цій дисертації, то одночасна поява двох високогомологічних ізоформ eEF1A в тканині, в якій в нормі присутня тільки одна з таких ізоформ, може приводити до реалізації деяких нових, незвичайних для цієї тканини, білок-білкових взаємодій, включаючи ті, що залучені до клітинного сигналінгу та підтримання форми клітини. Це, в свою чергу, може викликати не завжди сприятливі для даного типу клітин наслідки, як у разі eEF1A2- індукованого онкогенезу.

На наше здивування, ізоформа eEF1A2 виявилася менш здатною до взаємодій із кальцій-залежними сигнальними білками, ніж eEF1A1. Ми показали принципову можливість Ca^{2+} -залежного впливу кальмодуліну на взаємодію ізоформи eEF1A1 із трансляційними компонентами (рис.3.19). Якщо взяти до уваги, що ізоформа eEF1A2 експресується виключно в збудливих тканинах, таких як нервова і м'язова, в яких дуже активно відбуваються процеси, пов'язані з передачею Ca^{2+} -сигналу і високою активністю Ca^{2+} -зв'язуючих білків [43,46], то можна припустити, що ця ізоформа є менш чутливою (порівняно з A1) до Ca^{2+} -залежного клітинного контролю, що робить процес трансляції більш толерантним до постійних змін концентрації Ca^{2+} . Це дає підстави вважати, що однією із причин еволюційного виникнення eEF1A2 і тканино-специфічної експресії цієї ізоформи є необхідність захистити трансляцію мРНК в деяких спеціалізованих клітинах від впливу регулярних змін концентрацій кальцію, необхідних для функціонування цих клітин, тобто забезпечити в них сталий рівень біосинтезу білків.

В ракових клітинах роль eEF1A2 не настільки однозначна. Ми показали, що eEF1A2, на відміну від eEF1A1, не здатний формувати комплекс з ко-шапероном Sgt1, який бере участь в клітинному поділі. Більш висока здатність eEF1A2, в порівнянні з eEF1A1, до зв'язування з РНК може

сприяти збільшенню рівня трансляції деяких пухлиноспецифічних мРНК в присутності eEF1A2, особливо з урахуванням того, що інші білки (такі, наприклад, як Sgt1 і кальмодулін) не можуть заважати зв'язуванню eEF1A2 з РНК, на відміну від аналогічного зв'язування eEF1A1. Крім того, аналіз опублікованих фосфопротеомних даних показує, що тирозинові залишки, які зазвичай фосфорилуються у eEF1A1, не є модифікованими у eEF1A2 в ракових тканинах [74]. Ці дані можуть свідчити про певну резистентність eEF1A2 до клітинної регуляції, тобто не виключено, що, після появи цієї ізоформи в пухлинах, eEF1A2 функціонує певним чином автономно і незалежно від клітинного контролю.

Відомо, що експресія прото-онкогена eEF1A2 може спорадично індукуватися в тих тканинах, де в нормі присутня тільки ізоформа eEF1A1 [64,65,70,169–172]. Ми вважаємо, що в тканинах пухлин новоявлена ізоформа eEF1A2 завдяки своїм структурним особливостям може уникати eEF1A1-адаптованого регулювання, тобто діяти неконтрольованим або неправильно контрольованим шляхом, набуваючи, таким чином, онкогенних властивостей. Можливі механізми, залучені до цього, будуть предметом подальших досліджень. Можна припустити, що певну роль в цьому відіграє виявлений нами специфічний вплив eEF1A2 на процес утворення актинових скруток, оскільки неправильна регуляція формування актинових тяжів може бути одним із ключових моментів, зокрема, в процесі метастазування [173,174].

ВИСНОВКИ

Показано, що дві високогомологічні за амінокислотною послідовністю ізоформи фактора елонгації трансляції eEF1A, одна із яких прото-онкогенна, відрізняються за просторовою організацією та здатністю взаємодіяти із важливими клітинними партнерами. Висунуто гіпотезу, яка пояснює тканино-специфічну експресію ізоформи eEF1A2 в міоцитах, кардіоміоцитах і нейронах.

1. Із використанням методів розсіяння рентгенівських променів, диференційної скануючої мікрокалориметрії, аналітичного ультрацентрифугування та флуоресцентної спектроскопії показано, що просторова організація, гідрофобність і олігомерний стан ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 істотно відрізняються. eEF1A2 має менш гідрофобну поверхню, є більш компактним і менш здатним до димеризації білком.

2. Охарактеризовано комплекс eEF1A1-кальмодулін, показано, що взаємодія ізоформи eEF1A1 із цим сигнальним білком може призводити до його конкуренції з тРНК. Прото-онкогенна ізоформа eEF1A2 не здатна взаємодіяти із кальмодуліном і, відповідно, не підлягає кальмодулін-опосередкованій регуляції.

3. Встановлено, що як ізоформа eEF1A1, так і ізоформа eEF1A2 здатні стимулювати формування пучків F-актину, але форма цих пучків у присутності різних ізоформ відрізняється. Показано, що кальмодулін інгібує формування актинових пучків в присутності eEF1A1. На основі експериментальних даних висунута нова модель участі димеру eEF1A у формуванні скруток актинових філаментів.

4. Встановлено, що ізоформа eEF1A1 формує комплекс із мультифункціональним білком Sgt1, а ізоформа eEF1A2 не здатна до такої взаємодії. Охарактеризовано комплекс eEF1A1-Sgt1, запропонована його роль у антивірусному захисті.

5. Отримані дані свідчать на користь того, що завдяки нездатності взаємодіяти із кальцій-зв'язуючими білками, eEF1A2 забезпечує в міоцитах, кардіоміоцитах і нейронах сталий кальцій-незалежний білковий синтез. Саме це і може бути причиною виключної експресії ізоформи eEF1A2 в цих клітинах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Gunning P.W. Protein Isoforms and Isozymes / P.W. Gunning // eLS. – 2005
2. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer / C renner, K Subramaniam, C Pertuiset, et al. // *Oncogene*. – 2011. – № 8. – P. 883–895
3. Structural models of human eEF1A1 and eEF1A2 reveal two distinct surface clusters of sequence variation and potential differences in phosphorylation / Dinesh C Soares, Paul N Barlow, Helen J Newbery, et al. // *PLoS One*. – 2009. – № 7. – P. e6315
4. A novel potent indazole carboxylic acid derivative blocks spermatogenesis and is contraceptive in rats after a single oral dose / Joseph S Tash, Barbara Attardi, Sheri A Hild, et al. // *Biol. Reprod.* – 2008. – № 6. – P. 1127–1138
5. Structural insights into the interaction of the evolutionarily conserved ZPR1 domain tandem with eukaryotic EF1A, receptors, and SMN complexes / Ashwini K Mishra, Laxman Gangwani, Roger J Davis, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – № 35. – P. 13930–13935
6. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy / Urmi Bandyopadhyay, Sunandini Sridhar, Susmita Kaushik, et al. // *Mol. Cell*. – 2010. – № 4. – P. 535–547
7. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article / A Lamberti, M Caraglia, O Longo, et al. // *Amino Acids*. – 2004. – № 4. – P. 443–448
8. A critical role for eukaryotic elongation factor 1A-1 in lipotoxic cell death / Nica M Borradaile, Kimberly K Buhman, Laura L Listenberger, et al. // *Mol. Biol. Cell*. – 2006. – № 2. – P. 770–778

9. Chen L. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue / Li Chen, Kiran Madura // *Cancer Res.* – 2005. – № 13. – P. 5599–5606
10. Eukaryotic elongation factor 1A2 cooperates with phosphatidylinositol-4 kinase III beta to stimulate production of filopodia through increased phosphatidylinositol-4,5 biphosphate generation / Sujeeve Jeganathan, Anne Morrow, Anahita Amiri, et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – № 14. – P. 4549–4561
11. Talapatra S. Elongation factor-1 alpha is a selective regulator of growth factor withdrawal and ER stress-induced apoptosis / S Talapatra, J D O Wagner, C B Thompson // *Cell Death Differ.* – 2002. – № 8. – P. 856–861
12. Ruest L.-B. Peptide elongation factor eEF1A-2/S1 expression in cultured differentiated myotubes and its protective effect against caspase-3-mediated apoptosis / Louis-Bruno Ruest, Richard Marcotte, Eugenia Wang // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 7. – P. 5418–5425
13. Apoptosis rate can be accelerated or decelerated by overexpression or reduction of the level of elongation factor-1 alpha / A Duttaroy, D Bourbeau, X L Wang, et al. // *Exp. Cell Res.* – 1998. – № 1. – P. 168–176
14. Hedman A.C. The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton / Andrew C Hedman, Jessica M Smith, David B Sacks // *EMBO Rep.* – 2015. – № 4. – P. 427–446
15. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth / Shujie Wang, Takashi Watanabe, Jun Noritake, et al. // *J. Cell Sci.* – 2007. – № Pt 4. – P. 567–577
16. IQGAP1 integrates Ca²⁺/calmodulin and Cdc42 signaling / Y D Ho, J L Joyal, Z Li, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – № 1. – P. 464–470

17. The mechanism for regulation of the F-actin binding activity of IQGAP1 by calcium/calmodulin / Scott C Mateer, Amanda E McDaniel, Valerie Nicolas, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 14. – P. 12324–12333
18. IQGAP2 functions as a GTP-dependent effector protein in thrombin-induced platelet cytoskeletal reorganization / Valentina A Schmidt, Lesley Scudder, Craig E Devoe, et al. // *Blood.* – 2003. – № 8. – P. 3021–3028
19. IQ-motif selectivity in human IQGAP2 and IQGAP3: binding of calmodulin and myosin essential light chain / Erwan Atcheson, Elaine Hamilton, Sevel Pathmanathan, et al. // *Biosci. Rep.* – 2011. – № 5. – P. 371–379
20. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases / S Brill, S Li, C W Lyman, et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – № 9. – P. 4869–4878
21. IQGAP3 promotes EGFR-ERK signaling and the growth and metastasis of lung cancer cells / Ying Yang, Wei Zhao, Qing-Wen Xu, et al. // *PLoS One.* – 2014. – № 5. – P. e97578
22. Roy M. IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling / Monideepa Roy, Zhigang Li, David B Sacks // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – № 18. – P. 7940–7952
23. Roy M. IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity / Monideepa Roy, Zhigang Li, David B Sacks // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 17. – P. 17329–17337
24. Involvement of IQGAP family proteins in the regulation of mammalian cell cytokinesis / Makoto Adachi, Asami Kawasaki, Hisashi Nojima, et al. // *Genes Cells.* – 2014. – № 11. – P. 803–820
25. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling / Amanda

- E Bass-Zubek, Lisa M Godsel, Mario Delmar, et al. // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2009. – № 5. – P. 708–716
26. Keil R. Antagonistic regulation of intercellular cohesion by plakophilins 1 and 3 / R. Keil, K. Rietscher, M. Hatzfeld // *J. Invest. Dermatol.* – 2016
27. Quinlan M.P. Isoform-specific ras functions in development and cancer / Margaret P Quinlan, Jeffrey Settleman // *Future Oncol.* – 2009. – № 1. – P. 105–116
28. Brain STAT5 signaling and behavioral control / I.C. Furigo et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2016
29. Rani A. STAT5 in Cancer and Immunity / Aradhana Rani, John J Murphy // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2016. – № 4. – P. 226–237
30. BCR-ABL affects STAT5A and STAT5B differentially / Michael Schaller-Schonitz, David Barzan, Andrew J K Williamson, et al. // *PLoS One.* – 2014. – № 5. – P. e97243
31. Lamba V. STAT5A and STAT5B have opposite correlations with drug response gene expression / V. Lamba, B. Jia, F. Liang // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016
32. Isoform-specific targeting of ROCK proteins in immune cells / A. Zanin-Zhorov et al. // *Small GTPases.* – 2016. – P. 1–5
33. Jaskunas S.R. Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu in E coli / S R Jaskunas, L Lindahl, M Nomura // *Nature.* – 1975. – № 5526. – P. 458–462
34. Schirmaier F. Identification of two genes coding for the translation elongation factor EF-1 alpha of S cerevisiae / F Schirmaier, P Philippsen // *EMBO J.* – 1984. – № 13. – P. 3311–3315

35. Sundstrom P. Sequence analysis and expression of the two genes for elongation factor 1 alpha from the dimorphic yeast *Candida albicans* / P Sundstrom, D Smith, P S Sypherd // *J. Bacteriol.* – 1990. – № 4. – P. 2036–2045
36. Comprehensive cloning of *Schizosaccharomyces pombe* genes encoding translation elongation factors / K Mita, M Morimyo, K Ito, et al. // *Gene.* – 1997. – № 2. – P. 259–266
37. Carneiro N.P. The eEF1A gene family is differentially expressed in maize endosperm / N P Carneiro, P A Hughes, B A Larkins // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – № 6. – P. 801–813
38. Molecular characterization and expression analysis of nine cotton GhEF1A genes encoding translation elongation factor 1A / Wen-Liang Xu, Xiu-Lan Wang, Hong Wang, et al. // *Gene.* – 2007. – № 1. – P. 27–35
39. Two genes encode related cytoplasmic elongation factors 1 alpha (EF-1 alpha) in *Drosophila melanogaster* with continuous and stage specific expression / B Hovemann, S Richter, U Walldorf, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1988. – № 8. – P. 3175–3194
40. Three genes under different developmental control encode elongation factor 1-alpha in *Xenopus laevis* / M K Dje, A Mazabraud, A Viel, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – № 12. – P. 3489–3493
41. Molecular characterization and expression analysis of five different elongation factor 1 alpha genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup): differential gene expression and thyroid hormones dependence during metamorphosis / Carlos Infante, Esther Asensio, Jose Pedro Canavate, et al. // *BMC Mol. Biol.* – 2008. – P. 19
42. Retropseudogenes constitute the major part of the human elongation factor 1

- alpha gene family / H O Madsen, K Poulsen, O Dahl, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – № 6. – P. 1513–1516
43. Lee S. Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development / S Lee, L A Wolfrain, E Wang // *J. Biol. Chem.* – 1993. – № 32. – P. 24453–24459
44. Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q133 / A Lund, S M Knudsen, H Vissing, et al. // *Genomics.* – 1996. – № 2. – P. 359–361
45. Isolation and characterization of the rat chromosomal gene for a polypeptide (pS1) antigenically related to statin / D K Ann, I K Moutsatsos, T Nakamura, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1991. – № 16. – P. 10429–10437
46. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha / S M Knudsen, J Frydenberg, B F Clark, et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – № 3. – P. 549–554
47. The human elongation factor 1 A-2 gene (EEF1A2): complete sequence and characterization of gene structure and promoter activity / C Bischoff, S Kahns, A Lund, et al. // *Genomics.* – 2000. – № 1. – P. 63–70
48. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha / T Uetsuki, A Naito, S Nagata, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1989. – № 10. – P. 5791–5798
49. Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1Balpha complex / G R Andersen, L Valente, L Pedersen, et al. // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – № 6. – P. 531–534
50. Mammalian translation elongation factor eEF1A2: X-ray structure and new features of GDP/GTP exchange mechanism in higher eukaryotes / Thibaut

- Crepin, Vyacheslav F Shalak, Anna D Yaremchuk, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – № 20. – P. 12939–12948
51. Characterization of the statin-like S1 and rat elongation factor 1 alpha as two distinctly expressed messages in rat / D K Ann, H H Lin, S Lee, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – № 2. – P. 699–702
52. Tissue-specific expression in mammalian brain, heart, and muscle of S1, a member of the elongation factor-1 alpha gene family / S Lee, A M Francoeur, S Liu, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – № 33. – P. 24064–24068
53. Translation elongation factor eEF1A2 is essential for post-weaning survival in mice / H J Newbery, D H Loh, J E O'Donoghue, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – № 39. – P. 28951–28959
54. In vivo characterization of the role of tissue-specific translation elongation factor 1A2 in protein synthesis reveals insights into muscle atrophy / Jennifer Doig, Lowri A Griffiths, David Peberdy, et al. // *FEBS J.* – 2013. – № 24. – P. 6528–6540
55. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein / S Kahns, A Lund, P Kristensen, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – № 8. – P. 1884–1890
56. Futernyk P. V. Interaction of different tRNAs with translation elongation factors 1A from lower and higher eukaryotes / P. V. Futernyk, B.S. Negrutskii, A. V. El'skaya // *Biopolym. Cell.* – 2009. – № 6. – P. 457–465
57. A non-catalytic N-terminal domain negatively influences the nucleotide exchange activity of translation elongation factor 1Balpha / Tetiana V Trosiuk, Vyacheslav F Shalak, Roman H Szczepanowski, et al. // *FEBS J.* – 2015. – № 3. – P. 484–497
58. Brain-derived neurotrophic factor enhances the basal rate of protein synthesis

- by increasing active eukaryotic elongation factor 2 levels and promoting translation elongation in cortical neurons / Nobuyuki Takei, Mihoko Kawamura, Yuta Ishizuka, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – № 39. – P. 26340–26348
59. Glutamate regulates eEF1A phosphorylation and ribosomal transit time in Bergmann glial cells / Iliana Barrera, Marco Flores-Mendez, Luisa C Hernandez-Kelly, et al. // *Neurochem. Int.* – 2010. – № 7. – P. 795–803
60. Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system / Francisco Mansilla, Irene Friis, Mandana Jadidi, et al. // *Biochem. J.* – 2002. – № Pt 3. – P. 669–676
61. A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules / Ganna Panasyuk, Ivan Nemazanyy, Valeriy Filonenko, et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2008. – № 1. – P. 63–71
62. Chang R. Mouse translation elongation factor eEF1A-2 interacts with Prdx-I to protect cells against apoptotic death induced by oxidative stress / Ruying Chang, Eugenia Wang // *J. Cell. Biochem.* – 2007. – № 2. – P. 267–278
63. Tumor suppressor p16(INK4a) inhibits cancer cell growth by downregulating eEF1A2 through a direct interaction / Mee-Hyun Lee, Bu Young Choi, Yong-Yeon Cho, et al. // *J. Cell Sci.* – 2013. – № Pt 8. – P. 1744–1752
64. Lee M.-H. eEF1A2 as a putative oncogene / Mee-Hyun Lee, Young-Joon Surh // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2009. – P. 87–93
65. Protein elongation factor eEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer / Nisha Anand, Sabita Murthy, Gudrun Amann, et al. // *Nat. Genet.* – 2002. – № 3. – P. 301–305
66. The prognostic significance of elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer /

- Dixie E Pinke, Steve E Kalloger, Tanja Francetic, et al. // *Gynecol. Oncol.* – 2008. – № 3. – P. 561–568
67. Expression profile of eukaryotic translation factors in human cancer tissues and cell lines / Pius Joseph, Christina M O’Kernick, Sreekumar Othumpangat, et al. // *Mol. Carcinog.* – 2004. – № 3. – P. 171–179
68. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours / Victoria A L Tomlinson, Helen J Newbery, Naomi R Wray, et al. // *BMC Cancer.* – 2005. – P. 113
69. Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer / Geeta Kulkarni, Dmitry A Turbin, Anahita Amiri, et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2007. – № 1. – P. 31–41
70. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach / R Li, H Wang, B N Bekele, et al. // *Oncogene.* – 2006. – № 18. – P. 2628–2635
71. eEF1A2 activates Akt and stimulates Akt-dependent actin remodeling, invasion and migration / A Amiri, F Noei, S Jeganathan, et al. // *Oncogene.* – 2007. – № 21. – P. 3027–3040
72. Jeganathan S. Binding of elongation factor eEF1A2 to phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and phosphatidylinositol 4-phosphate generation / Sujeeve Jeganathan, Jonathan M Lee // *J. Biol. Chem.* – 2007. – № 1. – P. 372–380
73. Blockade of BFA-mediated apoptosis in macrophages by the HIV-1 Nef protein / W Abbas, K A Khan, A Kumar, et al. // *Cell Death Dis.* – 2014. – P. e1080
74. Rapid up-regulation of peptide elongation factor EF-1alpha protein levels is an immediate early event during oxidative stress-induced apoptosis / E Chen,

- G Proestou, D Bourbeau, et al. // *Exp. Cell Res.* – 2000. – № 1. – P. 140–148
75. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival / Alison M Day, Jonathon D Brown, Sarah R Taylor, et al. // *Mol. Cell.* – 2012. – № 3. – P. 398–408
76. Chin D. Calmodulin: a prototypical calcium sensor / D Chin, A R Means // *Trends Cell Biol.* – 2000. – № 8. – P. 322–328
77. Ray K. Calcium-Sensing Receptor: Trafficking, Endocytosis, Recycling, and Importance of Interacting Proteins / Kausik Ray // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* – 2015. – P. 127–150
78. Kursula P. The many structural faces of calmodulin: a multitasking molecular jackknife / Petri Kursula // *Amino Acids.* – 2014. – № 10. – P. 2295–2304
79. Characterization and identification of calmodulin and calmodulin binding proteins in hemocyte of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) / Panjana Sengprasert, Piti Amparyup, Anchalee Tassanakajorn, et al. // *Dev. Comp. Immunol.* – 2015. – № 2. – P. 87–97
80. Kaur K.J. Protein translation elongation factor-1 alpha from *Trypanosoma brucei* binds calmodulin / K J Kaur, L Ruben // *J. Biol. Chem.* – 1994. – № 37. – P. 23045–23050
81. Durso N.A. A calmodulin-sensitive interaction between microtubules and a higher plant homolog of elongation factor-1 alpha / N A Durso, R J Cyr // *Plant Cell.* – 1994. – № 6. – P. 893–905
82. Tetrahymena eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) bundles filamentous actin through dimer formation / Fumihide Bunai, Kunie Ando, Hironori Ueno, et al. // *J. Biochem.* – 2006. – № 3. – P. 393–399

83. Cofilin-mediated actin dynamics promotes actin bundle formation during *Drosophila* bristle development / Jing Wu, Heng Wang, Xuan Guo, et al. // *Mol. Biol. Cell.* – 2016. – № 16. – P. 2554–2564
84. Actin filaments-A target for redox regulation / C. Wilson et al. // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2016
85. The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity / Christian Gonzalez-Billault, Pablo Munoz-Llancao, Daniel R Henriquez, et al. // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2012. – № 7. – P. 464–485
86. Hung R.-J. Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly / Ruei-Jiun Hung, Jonathan R Terman // *Cytoskeleton (Hoboken).* – 2011. – № 8. – P. 415–433
87. Pollard T.D. Actin, a central player in cell shape and movement / Thomas D Pollard, John A Cooper // *Science.* – 2009. – № 5957. – P. 1208–1212
88. Tilney L.G. F actin bundles in *Drosophila* bristles I Two filament cross-links are involved in bundling / L G Tilney, M S Tilney, G M Guild // *J. Cell Biol.* – 1995. – № 3. – P. 629–638
89. Bretscher A. Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus / A Bretscher, K Weber // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1979. – № 5. – P. 2321–2325
90. Bretscher A. Fimbrin, a new microfilament-associated protein present in microvilli and other cell surface structures / A Bretscher, K Weber // *J. Cell Biol.* – 1980. – № 1. – P. 335–340
91. Small espin: a third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli / J R Bartles, L Zheng, A Li, et al. // *J. Cell Biol.* – 1998. – № 1. – P. 107–119

92. The deaf jerker mouse has a mutation in the gene encoding the espin actin-bundling proteins of hair cell stereocilia and lacks espins / L Zheng, G Sekerkova, K Vranich, et al. // *Cell*. – 2000. – № 3. – P. 377–385
93. Isolation of an abundant 50,000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae* / M Demma, V Warren, R Hock, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1990. – № 4. – P. 2286–2291
94. Kurasawa Y. Characterization of F-actin bundling activity of *Tetrahymena* elongation factor 1 alpha investigated with rabbit skeletal muscle actin / Y Kurasawa, Y Watanabe, O Numata // *Zoolog. Sci.* – 1996. – № 3. – P. 371–375
95. Gross S.R. Translation elongation factor 1A is essential for regulation of the actin cytoskeleton and cell morphology / Stephane R Gross, Terri Goss Kinzy // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – № 9. – P. 772–778
96. Fujimoto H. Elongation factors are involved in cytokinesis of sea urchin eggs / Hirotaka Fujimoto, Issei Mabuchi // *Genes Cells*. – 2010. – № 2. – P. 123–135
97. Microtubule severing by elongation factor 1 alpha / N Shiina, Y Gotoh, N Kubomura, et al. // *Science*. – 1994. – № 5183. – P. 282–285
98. F-actin bundling activity of *Tetrahymena* elongation factor 1 alpha is regulated by Ca²⁺/calmodulin / Y Kurasawa, K Hanyu, Y Watanabe, et al. // *J. Biochem.* – 1996. – № 4. – P. 791–798
99. SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex / K Kitagawa, D Skowyra, S J Elledge, et al. // *Mol. Cell*. – 1999. – № 1. – P. 21–33
100. Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calcylin) and other

- S100 proteins / Marcin Nowotny, Magdalena Spiechowicz, Beata Jastrzebska, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – № 29. – P. 26923–26928
101. Prus W. S100A6 mediates nuclear translocation of Sgt1: a heat shock-regulated protein / Wiktor Prus, Anna Filipek // *Amino Acids.* – 2011. – № 4. – P. 781–787
102. Nuclear translocation of Sgt1 depends on its phosphorylation state / Wiktor Prus, Magdalena Zabka, Pawel Bieganowski, et al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2011. – № 12. – P. 1747–1753
103. Sgt1 acts via an LKB1/AMPK pathway to establish cortical polarity in larval neuroblasts / Ryan O Andersen, Doug W Turnbull, Eric A Johnson, et al. // *Dev. Biol.* – 2012. – № 1. – P. 258–265
104. Davies A.E. Hsp90-Sgt1 and Skp1 target human Mis12 complexes to ensure efficient formation of kinetochore-microtubule binding sites / Alexander E Davies, Kenneth B Kaplan // *J. Cell Biol.* – 2010. – № 2. – P. 261–274
105. Human Sgt1 binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 domain and not the tetratricopeptide repeat domain / Young-Tae Lee, Jaison Jacob, Wojciech Michowski, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 16. – P. 16511–16517
106. Hsp70 is a new target of Sgt1--an interaction modulated by S100A6 / Magdalena Spiechowicz, Alicja Zylicz, Pawel Bieganowski, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – № 4. – P. 1148–1153
107. Sgt1 has co-chaperone properties and is up-regulated by heat shock / Magdalena Zabka, Wieslawa Lesniak, Wiktor Prus, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – № 1. – P. 179–183
108. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis / Akira Takahashi, Catarina Casais, Kazuya Ichimura, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2003. – № 20. – P. 11777–

11782

109. Sgt1 dimerization is required for yeast kinetochore assembly / Parmil K Bansal, Amanda Nourse, Rashid Abdulle, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – № 6. – P. 3586–3592
110. Sgt1 is required for human kinetochore assembly / Peter Steensgaard, Massimiliano Garre, Ivan Muradore, et al. // *EMBO Rep.* – 2004. – № 6. – P. 626–631
111. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity / Cristina Azevedo, Shigeyuki Betsuyaku, Jack Peart, et al. // *EMBO J.* – 2006. – № 9. – P. 2007–2016
112. Structural and functional analysis of SGT1 reveals that its interaction with HSP90 is required for the accumulation of Rx, an R protein involved in plant immunity / Marta Boter, Beatrice Amigues, Jack Peart, et al. // *Plant Cell.* – 2007. – № 11. – P. 3791–3804
113. Type I J-domain NbMIP1 proteins are required for both Tobacco mosaic virus infection and plant innate immunity / Yumei Du, Jinping Zhao, Tianyuan Chen, et al. // *PLoS Pathog.* – 2013. – № 10. – P. e1003659
114. SGT1 interacts with the Prf resistance protein and is required for Prf accumulation and Prf-mediated defense signaling / Joanna Kud, Zhulu Zhao, Xinran Du, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2013. – № 3. – P. 501–505
115. Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants / Jack R Peart, Rui Lu, Ari Sadanandom, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – № 16. – P. 10865–10869
116. Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by

- independent pathways / Ken Komatsu, Masayoshi Hashimoto, Johji Ozeki, et al. // *Mol. Plant. Microbe. Interact.* – 2010. – № 3. – P. 283–293
117. Gopalakrishna R. Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose affinity chromatography / R Gopalakrishna, W B Anderson // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1982. – № 2. – P. 830–836
118. Roy A. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction / Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang // *Nat. Protoc.* – 2010. – № 4. – P. 725–738
119. Multiple molecular dynamics simulation of the isoforms of human translation elongation factor 1A reveals reversible fluctuations between “open” and “closed” conformations and suggests specific for eEF1A1 affinity for Ca²⁺-calmodulin / Dmitry S Kanibolotsky, Oleksandra V Novosyl’na, Catherine M Abbott, et al. // *BMC Struct. Biol.* – 2008. – P. 4
120. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes / Stephen R Comeau, David W Gatchell, Sandor Vajda, et al. // *Bioinformatics.* – 2004. – № 1. – P. 45–50
121. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials / Dima Kozakov, Ryan Brenke, Stephen R Comeau, et al. // *Proteins.* – 2006. – № 2. – P. 392–406
122. Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SDU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19 / Dima Kozakov, David R Hall, Dmitri Beglov, et al. // *Proteins.* – 2010. – № 15. – P. 3124–3130
123. Krissinel E. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state / Evgeny Krissinel, Kim Henrick // *J. Mol. Biol.* – 2007. – № 3. – P. 774–797

124. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids / Ian W Davis, Andrew Leaver-Fay, Vincent B Chen, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – № Web Server issue. – P. W375-83
125. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome / N.A. Baker, D. Sept, S. Joseph [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – № 18. – P. 10037–41
126. Humphrey W. VMD: visual molecular dynamics / W Humphrey, A Dalke, K Schulten // *J. Mol. Graph.* – 1996. – № 1. – P. 27-28-38
127. Sali A. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints / A Sali, T L Blundell // *J. Mol. Biol.* – 1993. – № 3. – P. 779–815
128. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis / Eric F Pettersen, Thomas D Goddard, Conrad C Huang, et al. // *J. Comput. Chem.* – 2004. – № 13. – P. 1605–1612
129. ICM-A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation / R. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 1994. – № 5. – P. 488–506
130. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U K Laemmli // *Nature.* – 1970. – № 5259. – P. 680–685
131. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M M Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – P. 248–254
132. Privalov P.L. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins / P L Privalov, S A Potekhin // *Methods Enzymol.* – 1986. – P. 4–51

133. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling / P Schuck // *Biophys. J.* – 2000. – № 3. – P. 1606–1619
134. Gulbis J.M. *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics and function*, by Igor N Serdyuk, Nathan R Zaccai and Joseph Zaccai / J.M. Gulbis // *Crystallogr. Rev.* – 2011. – № 1. – P. 57–60
135. Ortega A. Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models / A Ortega, D Amoros, J Garcia de la Torre // *Biophys. J.* – 2011. – № 4. – P. 892–898
136. Large-aperture TV detector with a beryllium-windowed image intensifier for x-ray diffraction / Y. Amemiya et al. // *Rev. Sci. Instrum.* – 1995. – № 2
137. Correction Method and Software for Image Distortion and Nonuniform Response in Charge-Coupled Device-Based X-ray Detectors Utilizing X-ray Image intensifier / K. Ito et al. // *Jpn. J. Appl. Phys.* – 2005. – № 12R. – P. 8684
138. Svergun D. *{\it CRY SOL}* {--} a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates / D. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch // *J. Appl. Crystallogr.* – 1995. – № 6. – P. 768–773
139. Kato A. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins / A Kato, S Nakai // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – № 1. – P. 13–20
140. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure / Ken-Ichi Okamoto, Radhakrishnan Narayanan, Sang H Lee, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – № 15. – P. 6418–6423

141. Protein globularization during folding A study by synchrotron small-angle X-ray scattering / G V Semisotnov, H Kihara, N V Kotova, et al. // *J. Mol. Biol.* – 1996. – № 4. – P. 559–574
142. Physicochemical principles that regulate the competition between functional and dysfunctional association of proteins / Sebastian Pechmann, Emmanuel D Levy, Gian Gaetano Tartaglia, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – № 25. – P. 10159–10164
143. Chaudhuri T.K. Surface hydrophobicity of a low molecular weight basic trypsin subtilisin inhibitor from marine turtle eggwhite / T K Chaudhuri, K P Das, N K Sinha // *J. Biochem.* – 1993. – № 6. – P. 729–733
144. Calmodulin target database / K L Yap, J Kim, K Truong, et al. // *J. Struct. Funct. Genomics.* – 2000. – № 1. – P. 8–14
145. Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex eEF1A:eEF1Balpha / G R Andersen, L Pedersen, L Valente, et al. // *Mol. Cell.* – 2000. – № 5. – P. 1261–1266
146. The crystal structure of Cys-tRNA^{Cys}-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA / P Nissen, S Thirup, M Kjeldgaard, et al. // *Structure.* – 1999. – № 2. – P. 143–156
147. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution / T V Budkevich, A A Timchenko, E I Tiktopulo, et al. // *Biochemistry.* – 2002. – № 51. – P. 15342–15349
148. Structural Analysis of E coli hsp90 reveals dramatic nucleotide-dependent conformational rearrangements / Andrew K Shiau, Seth F Harris, Daniel R Southworth, et al. // *Cell.* – 2006. – № 2. – P. 329–340
149. Mateyak M.K. eEF1A: thinking outside the ribosome / Maria K Mateyak, Terri Goss Kinzy // *J. Biol. Chem.* – 2010. – № 28. – P. 21209–21213

150. The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis / Dongsheng Li, Ting Wei, Catherine M Abbott, et al. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2013. – № 2. – P. 253–66
151. Meldau S. For security and stability: SGT1 in plant defense and development / Stefan Meldau, Ian T Baldwin, Jianqiang Wu // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – № 10. – P. 1479–1482
152. Different oligomeric properties and stability of highly homologous A1 and proto-oncogenic A2 variants of mammalian translation elongation factor eEF1 / Alexander A Timchenko, Oleksandra V Novosylna, Eugenij A Prituzhalov, et al. // *Biochemistry.* – 2013. – № 32. – P. 5345–5353
153. A minimal sequence code for switching protein structure and function / Patrick A Alexander, Yanan He, Yihong Chen, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – № 50. – P. 21149–21154
154. The design and characterization of two proteins with 88% sequence identity but different structure and function / Patrick A Alexander, Yanan He, Yihong Chen, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – № 29. – P. 11963–11968
155. Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine / T E Dever, C E Costello, C L Owens, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1989. – № 34. – P. 20518–20525
156. Protein kinase CK2 regulates the dimerization of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 during mitosis / Dilshad H Khan, Shihua He, Jenny Yu, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2013. – № 23. – P. 16518–16528
157. Negrutskii B. From global phosphoproteomics to individual proteins: the case of translation elongation factor eEF1A / Boris Negrutskii, Dmytro

- Vlasenko, Anna El'skaya // *Expert Rev. Proteomics.* – 2012. – № 1. – P. 71–83
158. How many EF-Tu molecules participate in aminoacyl-tRNA binding and peptide bond formation in *Escherichia coli* translation? / M Ehrenberg, A M Rojas, J Weiser, et al. // *J. Mol. Biol.* – 1990. – № 4. – P. 739–749
159. Structural snapshots of actively translating human ribosomes / Elmar Behrmann, Justus Loerke, Tatyana V Budkevich, et al. // *Cell.* – 2015. – № 4. – P. 845–857
160. Morita K. Roles of three domains of *Tetrahymena* eEF1A in bundling F-actin / Kenya Morita, Fumihide Bunai, Osamu Numata // *Zoolog. Sci.* – 2008. – № 1. – P. 22–29
161. Raf kinases mediate the phosphorylation of eukaryotic translation elongation factor 1A and regulate its stability in eukaryotic cells / C Sanges, C Scheuermann, R P Zahedi, et al. // *Cell Death Dis.* – 2012. – P. e276
162. Kandasamy M.K. Functional nonequivalency of actin isoforms in *Arabidopsis* / Muthugapatti K Kandasamy, Elizabeth C McKinney, Richard B Meagher // *Mol. Biol. Cell.* – 2002. – № 1. – P. 251–261
163. Kandasamy M.K. Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues / Muthugapatti K Kandasamy, Elizabeth C McKinney, Richard B Meagher // *Cell Motil. Cytoskeleton.* – 2002. – № 1. – P. 22–32
164. Changes in protein levels of elongation factors, eEF1A-1 and eEF1A-2/S1, in long-term denervated rat muscle / Abdelnaby Khalyfa, Bruce M Carlson, Eduard I Dedkov, et al. // *Restor. Neurol. Neurosci.* – 2003. – № 1–2. – P. 47–53
165. Overexpression of the elongation factor 1A1 relates to muscle proteolysis

- and proapoptotic p66(ShcA) gene transcription in hypercatabolic trauma patients / Alessandra Bosutti, Bruna Scaggiante, Gabriele Grassi, et al. // *Metabolism*. – 2007. – № 12. – P. 1629–1634
166. mGluR-dependent long-term depression is associated with increased phosphorylation of S6 and synthesis of elongation factor 1A but remains expressed in S6K-deficient mice / Marcia D Antion, Lingfei Hou, Helen Wong, et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 2008. – № 9. – P. 2996–3007
167. Huang F. The mRNA for elongation factor 1alpha is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression / Fen Huang, Jennifer K Chotiner, Oswald Steward // *J. Neurosci.* – 2005. – № 31. – P. 7199–7209
168. Hashimoto K. Neurite outgrowth mediated by translation elongation factor eEF1A1: a target for antiplatelet agent cilostazol / Kenji Hashimoto, Tamaki Ishima // *PLoS One*. – 2011. – № 3. – P. e17431
169. Regulation and functional role of eEF1A2 in pancreatic carcinoma / Haixia Cao, Qi Zhu, Jia Huang, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – № 1. – P. 11–16
170. Lee J.M. The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer / Jonathan M Lee // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2003. – P. 69
171. Proto-oncogenic isoform A2 of eukaryotic translation elongation factor eEF1 is a target of miR-663 and miR-744 / A Vislovukh, G Kratassiouk, E Porto, et al. // *Br. J. Cancer*. – 2013. – № 11. – P. 2304–11
172. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines / Hong Zhu, David Chi Leung Lam, Kam Chu Han, et al. // *Cancer Lett.* – 2007. – № 1–2. – P. 303–314

173. Hashimoto Y. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis / Yosuke Hashimoto, Maddy Parsons, Josephine C Adams // Mol. Biol. Cell. – 2007. – № 11. – P. 4591–4602
174. Stevenson R.P. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance / Richard P Stevenson, Douwe Veltman, Laura M Machesky // J. Cell Sci. – 2012. – № Pt 5. – P. 1073–1079