

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут молекулярної біології і генетики

Новосильна Олександра Валеріївна



УДК 577.2 + 616-006

**Структурні та функціональні відмінності ізоформи А1 та протоонкогенної
ізоформи А2 фактора елонгації трансляції eEF1A**

03.00.03 — молекулярна біологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

КИЇВ-2017

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в лабораторії біосинтезу білка відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м.Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Негруцький Борис Сергійович**, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, завідувач лабораторії біосинтезу білка відділу механізмів трансляції генетичної інформації.

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

доктор біологічних наук, доцент **Калачнюк Лілія Григорівна** Національний університет біоресурсів і природокористування України, професор кафедри біохімії імені академіка М.Ф. Гулого

Захист відбудеться 25 квітня о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 В Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного 150.

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

Автореферат розіслано “24” березня 2017 року.

Вчений секретар
спеціалізованої ради

кандидат біологічних наук, с.н.с.

І.В.Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Сучасні 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 (Cai et al. 2016). Незважаючи на швидкий інструментальний прогрес у ідентифікації ізоформ, причини їх існування та специфічні функції у більшості випадків залишаються достеменно невідомими. Відомо лише, що ізоформи білків 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 (Brenner et al. 2011). 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 (Soares et al. 2009). Обидві ізоформи трансляційно активні, але з невідомої причини їх локалізація у тканинах ссавців в нормі є взаємовиключною. eEF1A2 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 (Tash et al. 2008), клітинному циклі (Mishra et al. 2007), шаперон-опосередкованій аутофагії (Bandyopadhyay et al. 2010), апоптозі (Lamberti et al. 2004), ліпотоксичній клітинній смерті (Borradaile et al. 2006), протеолізі (Chen and Madura 2005) та перебудовах цитоскелету (Jeganathan et al. 2008). Накопичуються дані щодо різної активності eEF1A1 і eEF1A2 в позатрансляційних процесах. Найбільш яскравою їх відмінністю в цьому аспекті є те, що ізоформа eEF1A2 демонструє антиапоптотичну дію і стає онкогенною, коли з'являється в незвичній для неї тканині, в той час коли eEF1A1 є про-апоптотичним білком (Talapatra, Wagner, and Thompson 2002; Ruest, Marcotte, and Wang 2002; Duttaroy et al. 1998). Існування такої різниці дотепер не пояснено ні на структурному, ні на функціональному рівні. Отже, вивчення базових принципів структурної організації ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 та їх загальних функціональних відмінностей є важливим і актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках бюджетних тем лабораторії біосинтезу білка відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України «Особливості функціонування та множинність форм фактора елонгації трансляції 1 еукаріотів» (2.2.4.9, №0105U005340 2006 – 2010 рр.), «Дослідження трансляційних нанокомплексів та їх компонентів» (2.2.4.9; №0110U000693 2010 – 2015 рр.), «Дослідження факторів елонгації трансляції ссавців у біосинтезі білка та інших клітинних процесах» (2.2.4.9, №0115U003744 2016-2020 рр.).

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 мультифункціональним 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 (хроматографія, 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 ізоформи eEF1A1 та eEF1A2 неоднаково взаємодіють із F-актином, формуючи актинові пучки різної форми, що може мати значення для ролі eEF1A2 у канцерогенезі.

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

Вперше виявлена відсутність взаємодії ізоформи eEF1A2 із мультифункціональним білком Sgt1 і показане можливе значення взаємодії Sgt1 та ізоформи eEF1A1 для 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 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 дисертації 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 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, Пуціно, Росія) і доктора М.Мерфі (Ліверпульський університет, Ліверпуль, Велика Британія). 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, із 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 щирю подяку.

Дисертантка глибоко вдячна д.б.н., професору, академіку НАН України Єльській Г.В. за допомогу та велику увагу до дисертаційної роботи.

Апробація результатів роботи. Основні положення дисертації апробовано на семінарах відділу механізмів трансляції генетичної інформації та наукових конференціях ІМБГ 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-й Конференції Парнас (Ялта, Україна, 2009), Конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» (Київ, Україна, 2009), Курсі лекцій та семінарів FEBS/SFRRE/UBMB «Білкове забезпечення та оберт при старінні та захворюванні» (о. Спецес, Греція, 2010), X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, Україна, 2010), конференції GDRI «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-м 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 та 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 джерел.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали і методи дослідження.

eEF1A1 виділяли з печінки кроля, використовуючи хроматографічну очистку на сефакрилі S-400, ДЕАЕ-целюлозі, SP-сефарозі та гідроксиапатиті. eEF1A2 виділяли з м'язів кроля за аналогічною схемою, за виключенням хроматографії на сефакрилі S-400. Активність eEF1A визначали в реакції ГДФ/[³H]ГДФ обміну (Yaremchuk et al. 2012).

Кальмодулін отримували з мозку великої рогатої худоби за методикою, що описана в (Gopalakrishna and Anderson 1982). Білки S100A6 і Sgt1 та його домени: TPR (1-138), TPR+CS (1-224), SGS (225-333) було надано Др. А. Філіпек (Інститут експериментальної біології ім. Ненцького ПАН, Варшава, Польща). [³²P]-мічену тРНК^{Leu} було люб'язно надано к.б.н. П. Футерніком (ІМБГ НАНУ, Київ, Україна). Препарат вірусу тютюнової мозаїки був люб'язно наданий к.б.н. Ю.Зубиком та к.б.н. Т.Шевченко (ННЦ "Інститут біології" Київського національного Університету ім.Т.Г. Шевченка, Київ, Україна).

Генноінженерні конструкції для експресії доменів eEF1A1 (*Homo sapiens*): D1 (1-243), D1+D2 (1-333), D2+D3 (244-462) були люб'язно надані Др. Ш.Кнудсен (Орхуський університет, Орхус, Данія). Домени eEF1A1 було експресовано у вигляді GST-злитих білків в *E. coli* (штам BL-DE3) та очищено на глутатіонсефарозі 4В (GE Healthcare Life Sciences).

Клітинну лінію НЕК293 культивували 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 НЕК293, що стабільно надекспресували eEF1A1 або eEF1A2, додатково добавляли генетицин (Г418) (200мкг/мл).

Горизонтальний електрофорез у неденатуруючому гелі, що містив 7% поліакриламід та 5% гліцерин, проводили в трис-боратному буфері, рН 7,4 при 100V протягом 2 год при 25°C в саморобному пристрої. Після електрофорезу гель фарбували Кумасі R-250 або проводили Вестерн-блот аналіз в Трис-гліциновому буфері, рН 8,3, використовуючи TransBlot Turbo апарат для переносу.

Калориметричні вимірювання проводили в прецизійному скануючому мікрокалориметрі SCAL-1 (SCAL Co.Ltd.). Термодинамічний аналіз профілю

надлишку теплоємності проводився відповідно до (Privalov and Potekhin 1986).

Малокутове розсіяння рентгенівських променів проводили у малокутовій камері BL-15A при довжині хвилі 1,503 Å (Photon Factory, Цукуба, Японія). Діапазон векторів розсіяння Q був від 0,011 до 0,15 Å⁻¹. Дані реєстрували 2D CCD X-ray детектором (Amemiya et al. 1995), враховуючи нестабільність детекції, нелінійний відклик і контраст відповідно до (Ito et al. 2005).

Експерименти з аналітичного ультрацентрифугування проводили на центрифугі Beckman Optima XL-I. Зразки центрифугували 40 хв при 50 000 об/хв при 20 °С, з інтервалами часу 8 сек та 0,003 см роздільною здатністю, без затримки між скануванням.

Для визначення поверхневих гідрофобних властивостей білків eEF1A1 та eEF1A2 використовували флуоресцентний барвник 8-аніліно-1-нафталін сульфонат (АНС). Спектри були записані за допомогою спектрофотометру Cary Eclipse (Varian) при 25°C, довжина хвилі збудження 360 нм.

Дослідження впливу ізоформ eEF1A на формування актинових пучків проводили, використовуючи актин із скелетних м'язів кроля (Cytoskeleton Inc, USA). F-актин формували додаванням буферу для полімеризації (500 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10mM ATP). Для мікроскопічних досліджень додатково додавали фалоїдин-FITC (Sigma-Aldrich). Конфокальну мікроскопію актинових пучків проводили за допомогою конфокального мікроскопу Zeiss LSM510 з 63x масляною імерсійною лінзою (C-Apochromat 63x/1,2 W Corr). Атомно-силову мікроскопію актинових пучків проводили за допомогою атомно-силового мікроскопу Molecular Force Probe-3D (MFP-3D) (Asylum Research, USA). Дослідження формування актинових пучків методом ко-седиментації вивчали за допомогою низькошвидкісного центрифугування (Okamoto et al. 2007).

Результати досліджень та їхнє обговорення

Порівняння стабільності ізоформ eEF1A за допомогою метода диференційної скануючої мікрокалориметрії. Метод диференційної скануючої мікрокалориметрії дозволяє вимірювати і порівнювати термодинамічні параметри, що характеризують конформаційні зміни білків в процесі теплової денатурації. 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. 1. Теплоти денатурації, що визначаються 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 білка eEF1A1 починається при суттєво нижчій температурі, ніж eEF1A2. Значення температури максимуму переходу складають для eEF1A1 55,5°C, для eEF1A2 62,7°C. В той же час напівширина фазового 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 може свідчити про більш компактну

конформацію ізоформи eEF1A2, тобто про певну різницю просторових структур цих білків. Це припущення корелює із молекулярно-динамічними розрахунками, які показують більшу конформаційну рухливість білка eEF1A1, ніж eEF1A2.

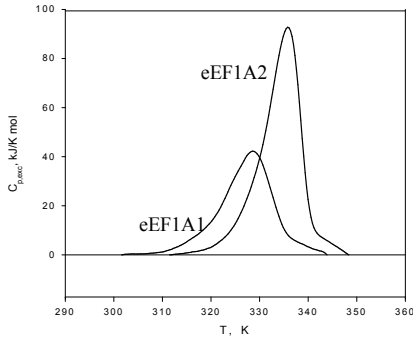


Рис. 1. Профіль плавлення ізоформ eEF1A, отриманий за допомогою диференційної скануючої мікрокалориметрії

Оцінка розмірів та молекулярної маси eEF1A1 та eEF1A2 за даними малокутового розсіяння рентгенівських променів (МРРП). На рис. 2 представлені криві розсіяння білків eEF1A1 і eEF1A2 в координатах Гінье, що дозволяють оцінити середні розміри частинок та їх молекулярну масу. Оскільки експериментально визначені методом МРРП значення молекулярної маси і радіусу гірації молекули eEF1A1 (82 ± 4 кДа, $41,4 \pm 1,0 \text{ \AA}$) суттєво перевищують близькі до теоретично розрахованих відповідні параметри eEF1A2 (58 ± 4 кДа, $29,1 \pm 1,0 \text{ \AA}$), можна припустити, що білок eEF1A1 є більш схильним до самоасоціації, ніж eEF1A2.

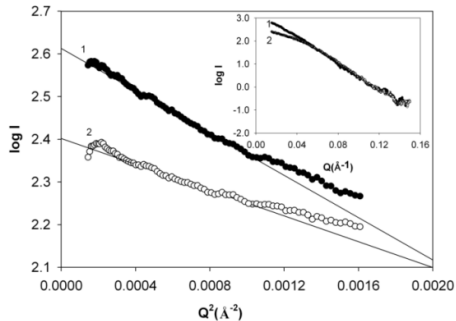


Рис. 2. Графіки Гінье (залежності $\log I$ від Q^2) для визначення середніх розмірів частинок з кривої МРРП для eEF1A1 (1-чорні круги), та eEF1A2 (2-білі круги). На врізці – ті ж залежності у більш широкому діапазоні Q^2

Дані седиментаційного аналізу, наведені на рис 3, підтверджують присутність асоціатів в препараті eEF1A1.

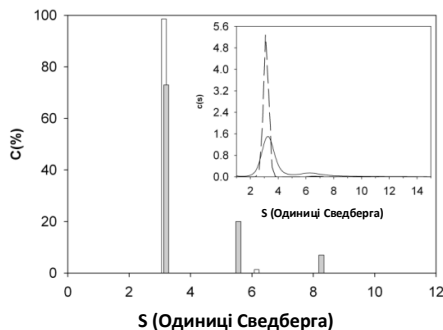


Рис. 3. Розподіл дискретних значень коефіцієнтів седиментації для A1 (зафарбовані стовбці) і A2 (порожні стовбці). На вставці показані безперервний розподіл коефіцієнтів седиментації eEF1A1 (суцільна лінія, rmsd 0,0156) eEF1A2 (пунктирна лінія, rmsd 0,0131)

Найкраща апроксимація даних седиментації для eEF1A1 була отримана за використання моделі із трикомпонентним розподілом (мономер, димер і тример), $\text{rmsd } 0,0072$. Коефіцієнт седиментації фракції димерів становив $5,6S$, що відповідало молекулярній масі компактного димера глобулярного білка із молекулярною масою 50 kDa . 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.4), про існування яких свідчать і седиментаційні дані (рис.3), в той час коли $P(r)$ для eEF1A2 є типовим для глобулярного білка.

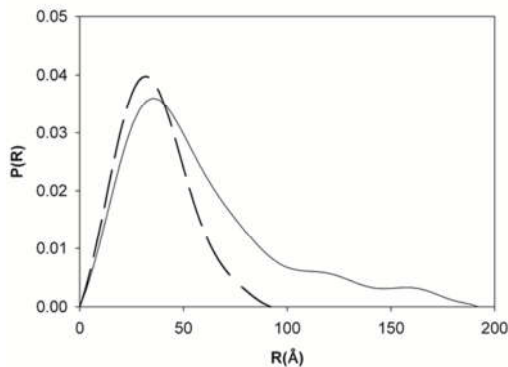


Рис. 4 Графік функцій парного розподілу для eEF1A1 (лінія) і eEF1A2 (пунктир), розрахований із даних малокутового розсіяння рентгенівських променів

Отже, дані калориметрії говорять про менш компактну конформацію ізоформи eEF1A1, ніж eEF1A2, у той час коли МРРП і седиментаційний аналіз ізоформ свідчать про більшу здатність eEF1A1 до формування димерів у порівнянні із eEF1A2. Важливо, що аналогічні результати були отримані із трьома різними препаратами ізоформ.

Просторова організація димерів ізоформ eEF1A1 і eEF1A2 характеризується різним ступенем компактності. Для того, щоб зрозуміти, чи може відрізнитися 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. 5 а. В цьому випадку, вагова доля фракції димерів дорівнює $0,8$. Модель структури такого димера з $R_g = 37,3 \text{ \AA}$ наведена на рис. 5 а. Результати аналогічного підлаштування, проведеного для eEF1A2 ($\chi^2 = 0,29$), представлені на рис. 5 б. В цьому випадку, вагова фракція димерів дорівнює $0,28$. Модель більш компактної структури димера eEF1A2 з $R_g = 33,7 \text{ \AA}$ представлена на рис. 5 б.

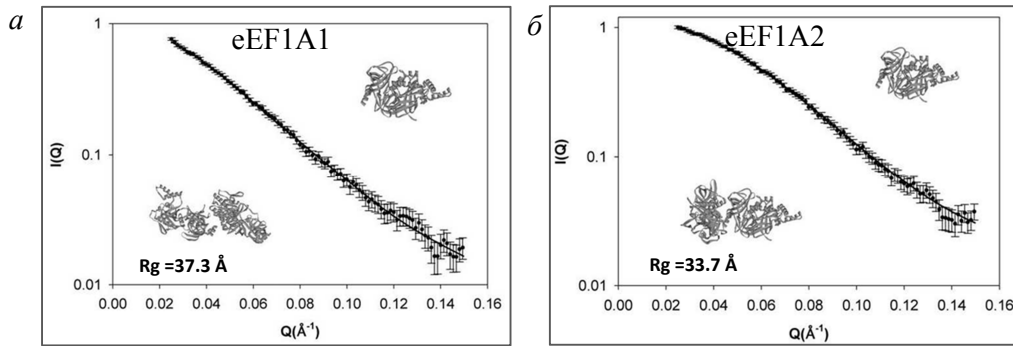


Рис. 5. Найкраща підгонка експериментальної та теоретичної кривих МРРП для димерів (а) eEF1A1 ($\chi^2 = 0,31$) та (б) eEF1A2 ($\chi^2 = 0,29$). На врізці представлено розраховані моделі димерів

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, які до того ж мають менш компактну форму, ніж димери eEF1A2.

Порівняння стійкості двох ізоформ eEF1A до дії сечовини. Метод МРРП 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 (Semisotnov et al. 1996). Ми дослідили стабільність структур обох ізоформ eEF1A під дією сечовини, яка є найбільш придатним денатуруючим агентом для рентгенівських вимірювань, оскільки переважно не впливає на електронну щільність розчинника і його поглинання. На рис. 6 представлені криві розсіяння двох білків в координатах Краткі при різних концентраціях сечовини.

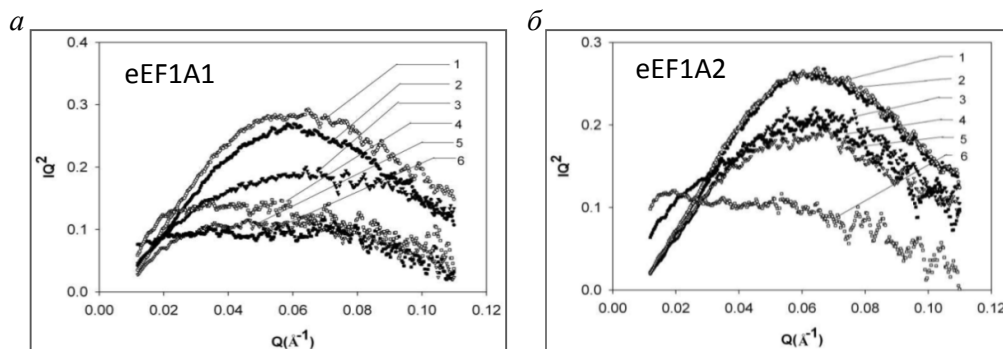


Рис. 6. Графіки Краткі для eEF1A1 (а) і eEF1A2 (б) при різних концентраціях сечовини: 1 – без сечовини, 2 - 1М, 3 - 2М, 4 - 3М, 5 - 4М, 6 - 5М

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, eEF1A1 є менш стабільним до дії сечовини, ніж eEF1A2, що

знов таки свідчить про більшу неструктурованість цього білка у розчині.

Порівняння поверхневої гідрофобності білків eEF1A1 та eEF1A2.

Гідрофобність є основним чинником, що визначає білкову агрегацію (Pechmann et al. 2009), тобто здатність ізоформи eEF1A1 до агрегації може пояснюватися підвищеною ліпофільністю 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) (Chaudhuri, Das, and Sinha 1993; Kato and Nakai 1980). Рис. 7 показує, що eEF1A1 більш ефективно, ніж eEF1A2, зв'язує АНС, що свідчить про більшу гідрофобність його поверхні, тобто про можливість існування на ній додаткової гідрофобної ділянки (-ок).

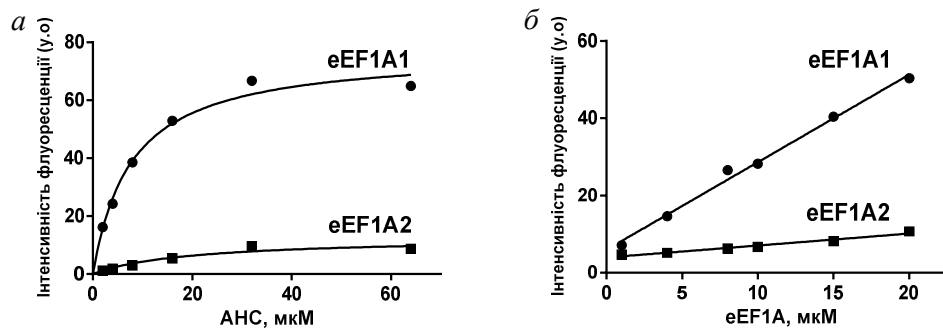


Рис. 7. (а) Титрування eEF1A1 та eEF1A2 (концентрація білків 6 мкМ) зростаючою кількістю АНС. (б) Зміна відносної флуоресценції 4 мкМ АНС при додаванні різних концентрацій eEF1A1 чи eEF1A2

Це пояснює, зокрема, підвищений рівень самоасоціації eEF1A1 та може забезпечувати специфічні саме для цієї ізоформи взаємодії з різними білками-партнерами та іншими клітинними лігандами.

Таким чином, за допомогою фізико-хімічних методів показано, що протонкогенна і тканиноспецифічна ізоформа eEF1A2 має більш компакту форму в порівнянні із eEF1A1 як у мономерному, так і у димерному стані, що корелює із меншим рівнем поверхневої гідрофобності цієї молекули. Натомість eEF1A1 демонструє набагато більшу здатність до формування димерів, ніж eEF1A2.

Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з кальмодуліном (CaM). Для вивчення взаємодії ізоформ eEF1A з CaM ми використали метод двонаправленого горизонтального поліакриламідного гель-електрофорезу за неденатуруючих умов. Ізоформи eEF1A (~50кДа) мають ізоелектричну точку в лужному діапазоні (близько 9), і рухаються в гелі у напрямку катоду, тоді як CaM (17кДа) має $pI \sim 4$, відповідно, рухається в бік аноду. Це дає змогу чітко зафіксувати зміну мобільності одного з партнерів в результаті утворення комплексу. На рис. 8 показано титрування ізоформ eEF1A (3 мкМ) зростаючими кількостями CaM в присутності іонів кальцію. При додаванні CaM до eEF1A1 спостерігалось зменшення інтенсивності смуги eEF1A1 та формування комплексу, який рухався в бік аноду. Навпаки, формування комплексу eEF1A2 із

кальмодуліном не спостерігалось навіть при тридцятикратному молярному надлишку останнього.

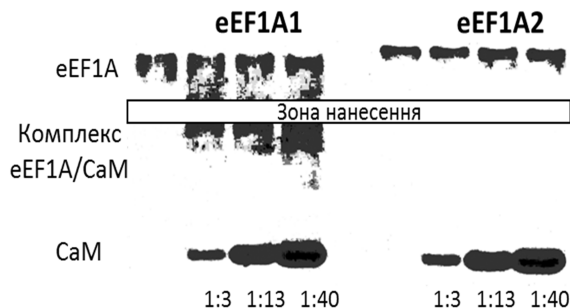


Рис. 8. CaM утворює комплекс із eEF1A1 і не взаємодіє із eEF1A2. 1:3, 1:13, 1:40 - молярне співвідношення eEF1A/CaM

Слід зазначити, що виключна взаємодія eEF1A1, на відміну від eEF1A2, спостерігалась і з іншим кальцій-зв'язуючим білком S100A6, що відрізняється за своєю структурою від CaM. Отже, можна припустити, що eEF1A1 має здатність до зв'язування різних Ca^{2+} -зв'язуючих білків, у той час як ізоформа eEF1A2 не здатна до такої взаємодії.

Наступним кроком стала перевірка наявності взаємодії eEF1A1 з CaM в лізатах клітин ссавців. На рис. 9 представлені дані ко-преципітації eEF1A1-His і ендogenous CaM з лізату клітин HEK293 на Ni-NTA агарозі.

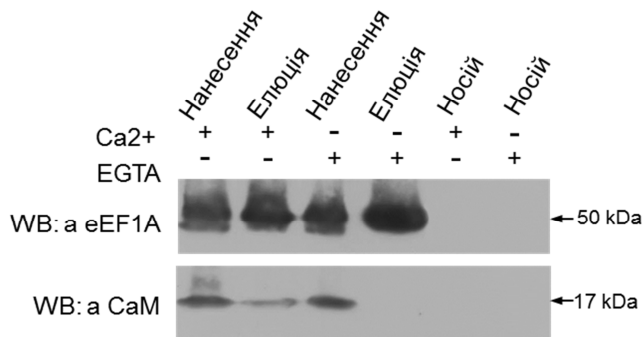


Рис. 9. eEF1A1-His, зв'язаний із Ni-NTA-агарозою, взаємодіє із CaM в лізаті клітин HEK293 людини у присутності іонів кальцію, і втрачає таку здатність за додавання EGTA

Отже, показано взаємодію між цими білками в екстрактах клітин нирки людини. Більш того, з рис. 9 видно, 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.

Ідентифікація CaM-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 (Yar et al. 2000). 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 меншим ступенем вірогідності, було передбачено у молекулі eEF1A2 (427-437 - домен III) (рис.10).

Для експериментальної перевірки біоінформатичних передбачень були використані експресовані в *E.coli* конструкти делеційних мутантів eEF1A1, що містили домен I, домени I+II або домени II+III цього білку. 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 CaM, промивали і перевіряли на наявність зв'язаного CaM,



Рис. 10. 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

використовуючи анти-CaM антитіла. Видно, що з CaM взаємодіяли пептиди eEF1A1, що відповідають доменам I+II та II+III (рис.11).

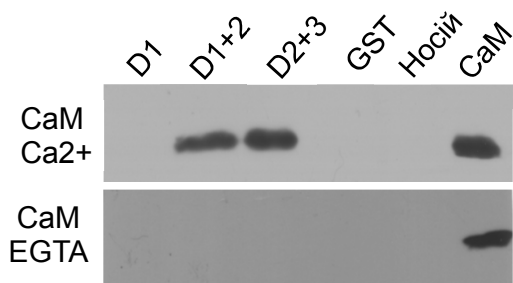


Рис. 11. Домен II і, можливо, домен III eEF1A1 взаємодіють із CaM. Експерименти проводили за присутністю 1 мМ CaCl₂ (верхня панель) або 1 мМ EGTA (нижня панель)

Ці результати є прямим підтвердженням взаємодії із CaM домену II і не виключають взаємодії із CaM домену III. Отже, біоінформатичні передбачення отримали експериментальну підтримку. Важливо відзначити, що така взаємодія спостерігалася тільки за присутності іонів кальцію.

Вивчення впливу CaM на тРНК-зв'язуючу активність eEF1A1. Одним із механізмів впливу CaM на клітинні процеси є його безпосереднє зв'язування із білками-мішенями. Оскільки різниця у здатності eEF1A1 і eEF1A2 взаємодіяти із CaM є очевидною, важливо оцінити, чи може взаємодія із CaM перешкоджати eEF1A1 взаємодіяти із трансляційними партнерами цього білка, що в свою чергу, може впливати на активність цього білку в елонгації. Для цього необхідно перевірити, чи перекриваються сайти взаємодії eEF1A1 із CaM, тРНК і фактором елонгації eEF11Ba. Сайти взаємодії eEF1A1 із тРНК і eEF11Ba були передбачені, виходячи з кристалічних структур відповідних комплексів прокариотів і нижчих еукаріотів (PDB ID: 1b23, 1F60) (Andersen et al. 2000; Nissen et al. 1999; Soares et al. 2009). Дійсно, спостерігалася перекривання сайту зв'язування CaM із сайтами зв'язування тРНК або eEF1Ba (рис. 12).

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 ($[^{32}\text{P}]\text{тРНК}^{\text{Лей}} \cdot \text{eEF1A1}$). Потім до цього комплексу

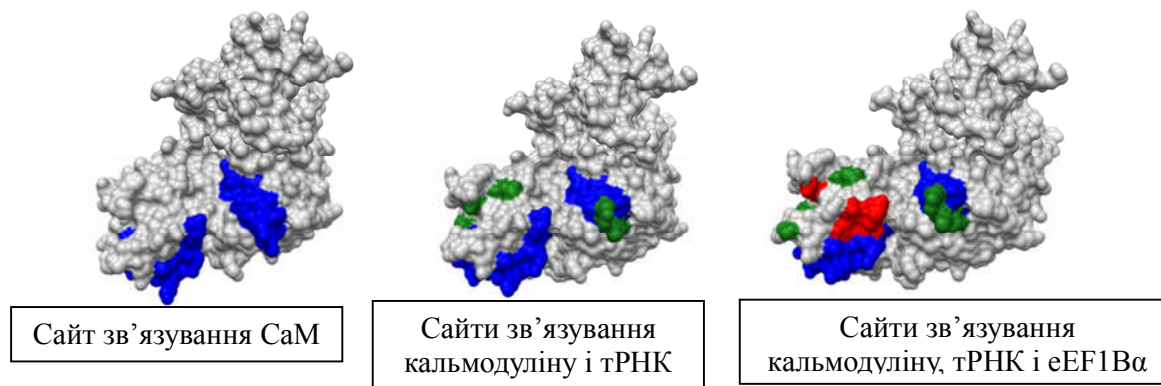


Рис. 12. Сайти зв'язування кальмодуліну, тРНК і eEF1Bα в eEF1A частково перекриваються

додавали зростаючі концентрації CaM. Як видно з рис 13, при збільшенні концентрації CaM, спостерігалось зменшення інтенсивності смуги eEF1A1,

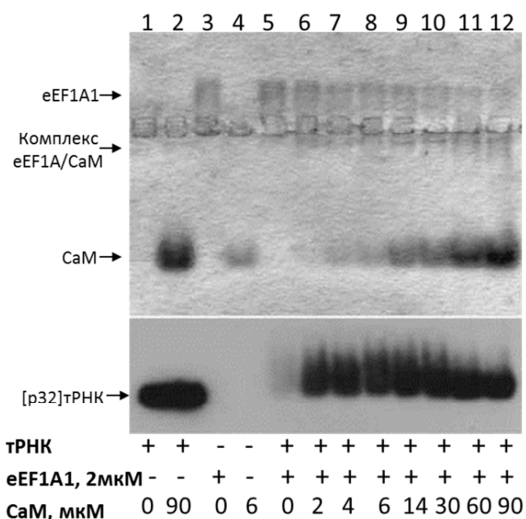


Рис. 13. CaM вивільнює тРНК із комплексу з eEF1A1. «Нативний» горизонтальний поліакриламідний гель - верхня панель. Авторадіограф гелю - нижня панель

та, навпаки, збільшення інтенсивності вільної радіоактивно-міченої тРНК, що свідчило про розпад комплексу eEF1A1*тРНК та формування комплексу eEF1A1*CaM. 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 тканиноспецифічної 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.

Вивчення взаємодії ізоформ eEF1A із F-актином. Протягом останніх років з'явилися дані про можливість eEF1A зв'язувати актин (Mateyak and Kinzy 2010). Оскільки зв'язок перебудов цитоскелету із розповсюдженням ракових клітин в організмі вже очевидний, важливим є питання – чи по-різному протоонкогенна і неонкогенна ізоформи eEF1A ссавців взаємодіють із білками цитоскелету, зокрема з актином.

Для порівняння здатності ізоформ eEF1A до реорганізації актинового цитоскелету, зокрема, до утворення актинових пучків, було використано атомно-силову (АСМ) та конфокальну мікроскопії. На рис. 14 *a-в* показані АСМ зображення актину в присутності чи за відсутності ізоформ eEF1A. Як можна бачити, актинові філаменти рівномірно розподілені по поверхні та мають приблизно однаковий розмір. 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*. Для оцінки можливої різниці форми актинових пучків, отриманих у присутності eEF1A1 або eEF1A2, були проведені дослідження за допомогою конфокальної мікроскопії (рис. 14 *г-е*). Видно, що у присутності eEF1A1 формувалися довгі і тонкі пучки F-актину, тоді як за присутності eEF1A2 пучки були більш короткими і товстими.

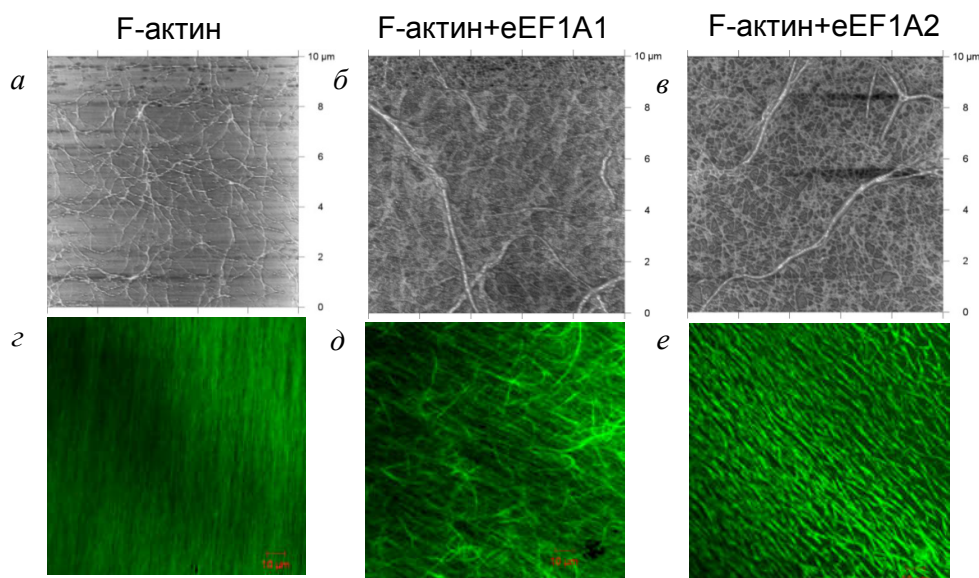


Рис. 14. (a-в) Атомно-силова мікроскопія, (г-е) конфокальна мікроскопія F-актину у присутності ізоформ eEF1A1 або eEF1A2

Наступне питання - чи може CaM мати регуляторний вплив на взаємодію eEF1A1 ссавців із актиновими філаментами? Методом ко-імунопреципітації було показано, що актин взаємодіє виключно із доменом III eEF1A1 (рис. 15). Оскільки сайт взаємодії eEF1A1 з CaM також може бути локалізований у домені III (рис. 11), цілком можлива конкуренція між актином і кальмодуліном за зв'язування із eEF1A1. Для експериментальної перевірки такої можливості методом низькошвидкісного центрифугування було перевірено, чи впливає

Ca^{2+} -CaM на здатність eEF1A1 формувати актинові пучки. В основі цього підходу лежить здатність актинових пучків, на відміну від актинових філаментів та глобулярного актину, осаджуватися низькошвидкісним центрифугуванням. Видно, що у присутності eEF1A1 більша частина актину.

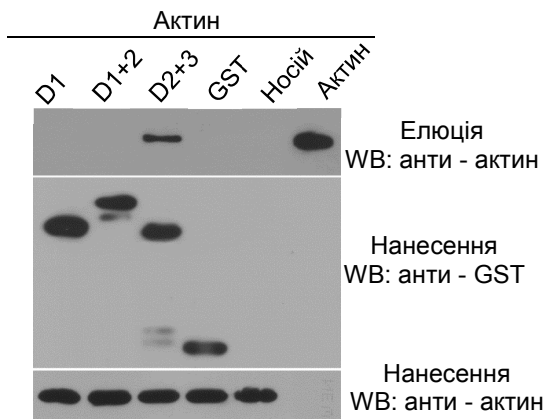


Рис. 15. Ко-преципітація актину з різними доменами eEF1A1

переходить у форму високомолекулярних пучків і осаджується під час центрифугування (рис. 16). Додавання CaM приводить до зменшення кількості актину у осаді, причому цей ефект спостерігається тільки, якщо CaM знаходиться у Ca^{2+} -зв'язаній формі.

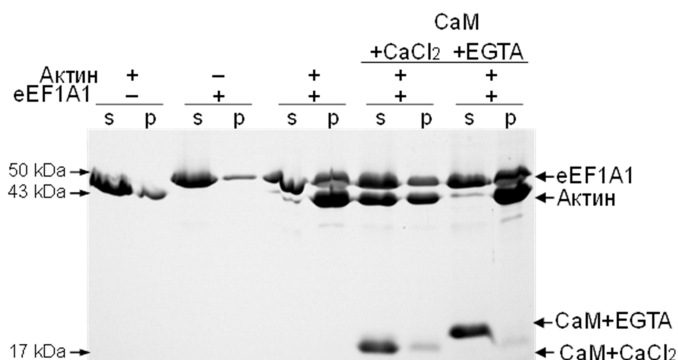


Рис.16. Вплив CaM на формування актинових пучків в присутності eEF1A1. Метод низькошвидкісної ко-седииментації. s – супернатант, p – осад

Таким чином, прямо підтверджена можливість конкуренції CaM 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 CaM у Ca^{2+} -залежний спосіб, в той час коли на аналогічні взаємодії eEF1A2 CaM не впливає. Тобто, при появі в незвичній для цього білка тканині, eEF1A2 може 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.

Дослідження взаємодії eEF1A з білком Sgt1. Оскільки мультифункціональний білок Sgt1 бере участь в тих же самих

позатрансляційних процесах, що і eEF1A, цілком можлива або синергічна, або конкурентна дія eEF1A і Sgt1, що може супроводжуватися формуванням комплексу між цими білками. З метою вивчення можливості взаємодії eEF1A з Sgt1 було проведено досліди з ко-преципітації. У одному лізаті, отриманий з клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1, наносили на сефарозу із імобілізованим Sgt1. Елюція eEF1A1 відбувалася у буфері з високою іонною силою, що свідчить про формування специфічного eEF1A1-Sgt1 комплексу (рис. 17 а, ліва панель, смуга 4). У іншому експерименті на Sgt1-сефарозу наносили очищений eEF1A1 (рис. 17 б, ліва панель, смуга 4). Знову взаємодія eEF1A1 із Sgt1 була очевидною. 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 проводили ко-імунопреципітацію на анти-FLAG смоли. Як видно з рис. 17 в, eEF1A1 взаємодіяв з Sgt1-3xFLAG і в клітинах людини.

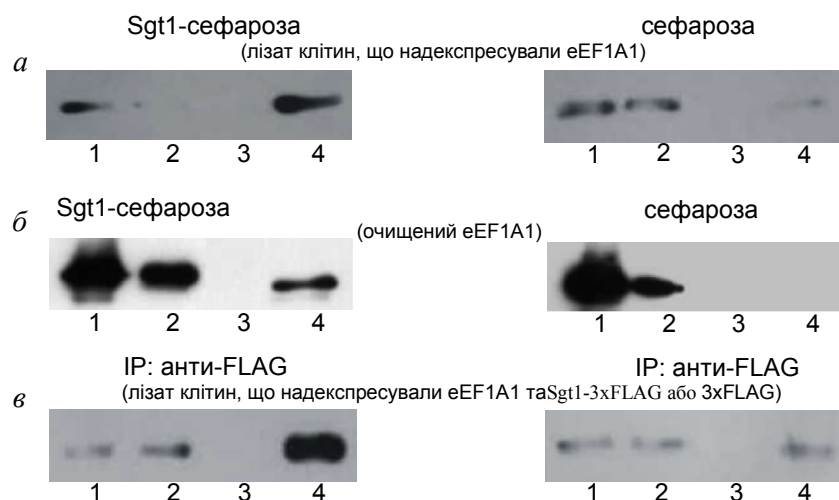


Рис. 17. Взаємодія Sgt1 та eEF1A1. Преципітація з використанням Sgt1-сефарози і лізату клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1 (а) або з очищеним білком eEF1A1 (б). Ко-імунопреципітація з використанням анти-FLAG агарози і білкового лізату, отриманого з клітин HEK293, що надекспресували eEF1A1, трансфікованих 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

Для того, щоб оцінити можливість безпосередньої взаємодії обох білків, а також здатність ізоформи eEF1A2 до взаємодії з Sgt1, очищені eEF1A1 та eEF1A2 титрували зростаючими кількостями очищеного Sgt1. Формування комплексу аналізували за допомогою горизонтального гелі-електрофорезу в неденатуруючих умовах з подальшим вестерн-блот аналізом (рис. 18). 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.

Отже, у випадку взаємодії із Sgt1 також спостерігається дискримінація між ізоформами eEF1A, до того ж взаємодія eEF1A1 з Sgt1 не опосередкована іншими білками лізату. Для того, щоб підійти до виявлення можливого функціонального сенсу такої дискримінації, необхідно детально охарактеризувати взаємодію Sgt1 із eEF1A1.

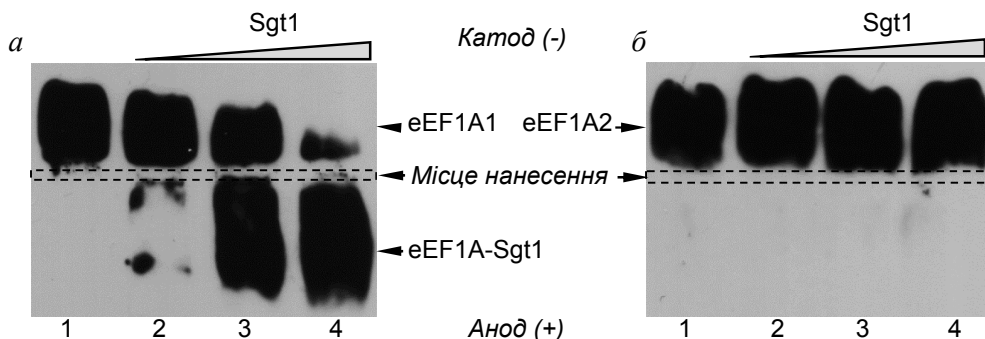


Рис. 18. Ізоформа eEF1A2 не утворює комплекс з Sgt1. Вестерн-блот аналіз нативного гелю, оброблений антитілами проти eEF1A. eEF1A1 (a) або eEF1A2 (б). Доріжки: 1 - eEF1A, 2 - eEF1A і Sgt1 (1:1), 3 - eEF1A і Sgt1 (1:3), 4 - eEF1A і Sgt1 (1:8)

Ідентифікація доменів Sgt1 та eEF1A1, що беруть участь у формуванні комплексу. Як Sgt1, так і eEF1A1 складаються з декількох структурних доменів. Щоб локалізувати сайт взаємодії, були використані конструкти, що містять окремо домени TPR, TPR+CS і SGS білка Sgt1 (рис. 19 a) та домени I, I+II і II+III білка eEF1A1 (рис. 10). 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. 19 б).

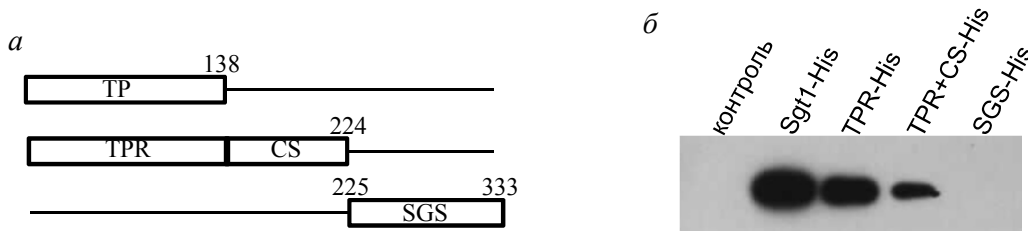


Рис. 19. Взаємодія Sgt1 і його доменів з eEF1A1. (a) Схематичне зображення використаних делеційних мутантів Sgt1. (б) Ко-преципітація eEF1A1 із різними доменами Sgt1. Вестерн-блот з анти-eEF1A антитілами

Для визначення сайту взаємодії eEF1A1 з Sgt1, було проведено ко-преципітацію відповідних доменів eEF1A, використовуючи Ni-NTA сефарозу,

зв'язану із Sgt1-His. Результати вестерн-блот аналізу показали, що D1+D2 та D2+D3 взаємодіють з Sgt1 (рис. 20). Оскільки взаємодія домену D1 з Sgt1 була відсутня, можна припустити, що у формуванні комплексу беруть участь домени D2 та D3.

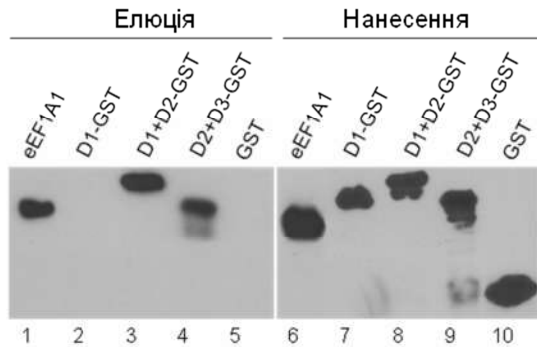


Рис. 20. Взаємодія eEF1A1 і його доменів з Sgt1. Вестерн-блот з анти-GST антитілами для виявлення доменів GST-eEF1A1 (смуги 2-5, 7-10), і з анти-eEF1A антитілами для детекції eEF1A1 (доріжки 1, 6)

Конкуренція Sgt1 з РНК вірусу мозаїки тютюна (РНК-ВТМ) за зв'язування з eEF1A. Відомо, що eEF1A є кофактором вірусної реплікації для різних груп вірусів, від ВІЛ до вірусу куцистої карликовості томату (Li et al. 2013). Sgt1 є одним з головних компонентів антивірусної захисної системи (Meldau, Baldwin, and Wu 2011). Дані молекулярного докінгу комплексу eEF1A1*Sgt-1 передбачили можливість того, що TRP домен Sgt1 може взаємодіяти із eEF1A1, мімікуючи негативно заряджену поверхню РНК. Отже, було важливо перевірити експериментально, чи може Sgt1 конкурувати з вірусною РНК за eEF1A1. Формування комплексу eEF1A1 з РНК-ВТМ викликало зсув смуги eEF1A1 в нативному гелі (рис.21).

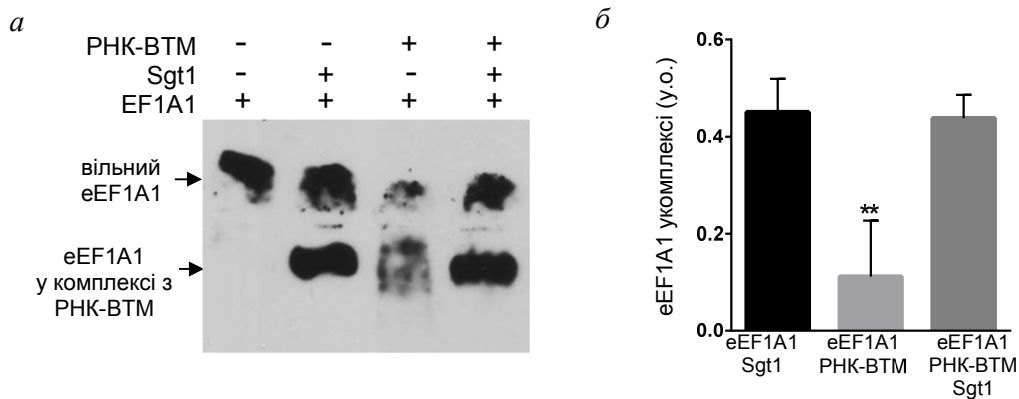


Рис. 21. Sgt1 конкурує з РНК-ВТМ за місце зв'язування з eEF1A1. (а). Вестерн блот аналіз «нативного» гелю із анти-eEF1A антитілами. (б). Денситометричний аналіз комплексів eEF1A1. Для статистичної обробки використовували двовибірковий t-критерій, $p=0,0020$; $n=4$

При цьому значна кількість eEF1A1 залишалася у кишені гелю і, відповідно, не переносилася на мембрану під час Вестерн блот аналізу. Проте, додавання Sgt1 до комплексу eEF1A1 з РНК-ВТМ приводило до повторної появи 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.

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. 22). Ці дані свідчать про можливість нового механізму антивірусної дії Sgt1, що полягає у його конкуренції із вірусною РНК за білок eEF1A1.

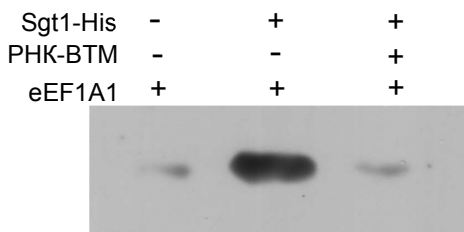


Рис. 22. Надлишок РНК-ВТМ перешкоджає утворенню комплексу eEF1A1-Sgt1. Вестерн-блот аналіз eEF1A1, преципітованого зі смолою Ni-NTA з іммобілізованим Sgt1-His

Отже, 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, то можна припустити, що ця ізоформа є менш чутливою (порівняно з A1) до Ca^{2+} -залежного клітинного контролю, що робить процес трансляції більш стійким 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 ще далека від визначеності. Ми припускаємо, що в тканинах пухлин 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, зокрема, різний вплив ізоформ на перебудови актинового цитоскелету, стануть предметом подальших досліджень.

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.

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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Characterization of physical properties of two isoforms of translation elongation factor 1A. / Novosylina 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. *(Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, проведення та аналіз результатів біофізичних експериментів)*
2. Молекулярна динаміка другої ізоформи фактора елонгації трансляції 1А людини. / Каниболоцький Д.С., Новосильна О.В., Негруцький Б.С., Мірошніченко М.С. // Вісник національного університету ім. Т.Г.Шевченка «Вісник біологія»/-2007. №49, 37-39. *(Особистий внесок здобувача: підготовка матриці для моделювання, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
3. Конформационная подвижность фактора элонгации трансляции eEF1A1 человека. / Каниболоцкий Д.С., Новосильная А.В., Негруцкий Б.С., Ельская А.В. // Биополимеры и клетка.- 2007. – 23, 4. – 307-318. *(Особистий внесок здобувача: підготовка матриці для моделювання, аналіз отриманих даних, підготовка статті до друку)*
4. 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. *(Особистий внесок здобувача: порівняльний аналіз отриманих моделей, вивчення комплексів eEF1A з кальмодуліном)*
5. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of mammalian translation elongation factor eEF1A2. / Yaremchuk, V. F. Shalak, O. V. Novosyl'na, 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. *(Особистий внесок здобувача: участь у розробці та проведенні процедури виділення ізоформи eEF1A2 з м'язів кроля)*
 6. 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 *(Особистий внесок здобувача: експерименти щодо характеристики двох ізоформ eEF1A біофізичними методами, аналіз взаємодії ізоформ eEF1A з кальмодуліном)*
 7. 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 *(Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, підготовка зразків та проведення експериментів по порівнянню властивостей двох ізоформ eEF1A, аналіз отриманих результатів)*
 8. Translation elongation factor eEF1A1 is a novel partner of a multifunctional protein Sgt1. / Novosyl'na O., Jurewicz E., Pydiura N., Goral A., Filipek A., Negrutskii B., El'skaya A. // Biochimie; 2015;119:137–45. *(Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, отримання доменів eEF1A, дослідження взаємодії двох ізоформ eEF1A з білком Sgt1, аналіз отриманих результатів)*
 9. Truncation of the A, A*, A' helices segment impairs the actin bundling activity of mammalian eEF1A1. / Vlasenko D. O., Novosyl'na O. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. // FEBS Lett. Elsevier; 2015;589(11):1187–93. *(Особистий внесок здобувача: отримання доменів eEF1A1, експериментальне порівняння впливу eEF1A і ΔeEF1A на утворення актинових пучків, визначення домену eEF1A1, відповідального за взаємодію з актином, аналіз отриманих результатів)*
 10. Comparison of the ability of mammalian eEF1A1 and its oncogenic variant eEF1A2 to interact with actin and calmodulin. / Novosyl'na O., Doyle A., Vlasenko D., Murphy M., Negrutskii B., El'skaya A. // Biol Chem. 2017;398(1):113-124. *(Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A та доменів eEF1A1, отримання кальмодуліну, дослідження здатності ізоформ eEF1A взаємодіяти з актином, кальмодуліном та білком S100A6, аналіз отриманих результатів)*
 11. Analysis of conformation differences of the normal and oncogenic isoforms of eEF1A1. / Novosyl'na O., Kanibolotsky D., Serdyuk I., Timchenko A., Tiktopulo E., Negrutskii B.. // 6th Parnas Conference, 30th May – 3^d June 2007, Krakow,

- Poland. Acta Biochimica Polonica. Vol.54 P.24-25 (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, біоінформатичне та біофізичне порівняння двох ізоформ eEF1A*)
12. Structural and functional comparison of two isoforms of translation elongation factor 1A (eEF1A). / Novosylna O., Kanibolotsky D., Gavrylenko S., Serdyuk I., Timchenko A., Tiktopulo E., Negrutskii B. // Conference of Young Scientists dedicated to the 185th anniversary of Gregor Mendel Kyiv (Ukraine) Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23, № 4. - С. 281 (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, біофізичне порівняння двох ізоформ eEF1A*)
 13. Comparison of the structure and functions of two isoforms of the mammalian translation elongation factor 1A. / Novosylna O., Kanibolotsky D., Gavrylenko S., Serdyuk I., Timchenko A., Tiktopulo E., Negrutskii B. // Збірник тез. 2-ий з'їзд українського товариства клітинної біології.- 2007.-С.165 (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, порівняння просторової форми двох ізоформ eEF1A біофізичними методами*)
 14. The importance of intrinsic disorder for normal and oncogenic isoforms of eEF1A. / Novosylna O., Gavrylenko S., Serdyuk I., Timchenko A., Tiktopulo E., Negrutskii B. // EMBO/SPINE 2 Workshop. Intrinsic unfolded proteins. Characterization and biological significance., Budapest (Hungary), 2007-P56. (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, біоінформатичний аналіз неструктурованих областей двох ізоформ eEF1A, біофізичне порівняння двох ізоформ eEF1A*)
 15. Вивчення особливостей просторової структури ізоформ фактора елонгації трансляції 1A ссавців та їх комплексів з лігандами. / О.В.Новосильна О.О.Тимченко, Є.І. Тиктопуло, І. М. Сердюк, Б.С.Негруцький. // Матеріали конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», Дніпропетровськ (Україна), 2008-P67 (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, отримання кальмодуліну, порівняння особливостей структури двох ізоформ та їх здатності взаємодіяти з лігандом*)
 16. Calmodulin-binding activity of mammalian translation elongation factor 1A isoforms. / Novosylna O., Serdyuk I., Timchenko A. // VIIth Parnas Conference on Biochemistry and Molecular Biology, 2009. (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, отримання кальмодуліну, порівняння кальмодулін-зв'язуючих властивостей ізоформ eEF1A*)
 17. Дослідження характеру адсорбції ізоформ фактора елонгації трансляції 1A ссавців на поверхні з різною енергетикою. / Близнюк В., Новосильна О. // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2009 (*Особистий внесок здобувача:отримання ізоформ eEF1A, підготовка препаратів для атомно силової мікроскопії, аналіз отриманих даних*)
 18. eEF1A: does size really matter? / Novosylna O., Timchenko A., Tiktopulo E., Serdyuk I., Kimura K., Kihara H., Negrutskii B. // FEBS/SFRR-E/IUBMB Advanced Lecture Course "Protein maintenance and turnover in ageing &

- diseases" Spetses island, Greece, 4-10 June, 2010 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, порівняльний аналіз структур двох ізоформ eEF1A*)
19. Ізоформи eEF1A: пошук підґрунтя для функціональної відмінності. / Новосильна О., Тимченко О., Сердюк І., Негруцький Б. // X Український біохімічний з'їзд (Одеса, Україна, 2010) Укр. біохім. Журн., т. 82, №4, 2010 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, порівняння особливостей взаємодії з лігандами та просторової структури двох ізоформ eEF1A*)
20. Structure of mammalian proto-oncogene eEF1A2 and its functional implications. / B. Negrutskii, V. Shalak, A. Yaremchuk, T. Crepin, O. Novosylina, D. Vlasenko, M. Tukalo, A. El'skaya. // Biopolym. Cell. 2013; 29(5 supplementary) Materials of GDRI meeting "From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies" Paris, France 17-18 October 2013 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, порівняння особливостей взаємодії з лігандами та просторової структури двох ізоформ eEF1A*)
21. Translation elongation factor eEF1A is a novel partner of Sgt1. / Novosylina O., Jurewicz E., Pydiura N., Goral A., Filipek A., Negrutskii B., El'skaya A. // XI український біохімічний конгрес Ukr. Biochem. J., 2014, Vol. 86, №5 (Suppl. 1): 35 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A та його доменів, порівняння особливостей взаємодії двох ізоформ eEF1A з білком Sgt1*)
22. The role of Sgt1 as an eEF1A-binding protein is important for viral defense. / Novosylina O., Jurewicz E., Pidiura N., Goral A., Filipek A., Negrutskii B., El'skaya A. // International Symposium on Cell Biology jointly with 4th Ukrainian Congress for Cell Biology, September 17-20, 2014:6 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A, порівняння особливостей взаємодії двох ізоформ eEF1A з білком Sgt1*)
23. 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. 2016 Aug EMBO conference: protein synthesis and translation control, Heidelberg, Germany, 09-13 Sep 2015:245 (*Особистий внесок здобувача: отримання ізоформ eEF1A та його доменів, отримання кальмодуліну, проведення експериментів по визначенню здатності ізоформ eEF1A взаємодіяти з актином, кальмодуліном та білком S100A6*)

АНОТАЦІЯ

Новосильна О.В. Структурні та функціональні відмінності ізоформи A1 та протоонкогенної ізоформи A2 фактора елонгації трансляції eEF1A. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.03 — молекулярна біологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2017.

Дисертацію присвячено дослідженню структурних і функціональних відмінностей двох подібних на 97.5% ізоформ фактора елонгації трансляції eEF1A. Показано, що прото-онкогенна ізоформа eEF1A2 має менш гідрофобну поверхню, є більш компактним і менш здатним до димерізації білком, ніж ізоформа eEF1A1. Показано, що eEF1A1 та eEF1A2 індукують пучки F-актину різної форми, що може мати значення для ролі eEF1A2 у канцерогенезі. eEF1A2, на відміну від eEF1A1, не взаємодіє із сигнальним білком кальмодуліном та мультифункціональним білком Sgt1. На основі отриманих даних висунуто гіпотезу, що однією із причин тканино-специфічної експресії eEF1A2 є необхідність унебезпечити 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.

Ключові слова: eEF1A, ізоформи, просторова організація білків, кальмодулін, F-актин, білок Sgt1, білок-білкові взаємодії.

АННОТАЦИЯ

Новосильная А.В. Структурные и функциональные различия изоформы A1 и протоонкогенной изоформы A2 фактора элонгации трансляции eEF1A. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.03 - молекулярная биология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию структурных и функциональных различий двух подобных на 97.5% изоформ фактора элонгации трансляции eEF1A. Показано, что прото-онкогенная изоформа eEF1A2 имеет менее гидрофобную поверхность, является более компактным и менее способным к димеризации белком, чем eEF1A1. eEF1A1 и eEF1A2 индуцируют пучки F-актина различной формы, что может иметь значение для роли eEF1A2 в канцерогенезе. eEF1A2, в отличие от eEF1A1, не взаимодействует с сигнальным белком кальмодулином и мультифункциональным белком Sgt1. На основании полученных данных выдвинуто гипотезу, что одной из причин тканеспецифической экспрессии eEF1A2 является необходимость защитить трансляцию мРНК в некоторых специализированных клетках от воздействия изменений концентраций кальция, необходимых для функционирования этих клеток, то есть для обеспечения в них стабильного белкового синтеза.

Ключевые слова: eEF1A, изоформы, пространственная организация белков, кальмодулин, F-актин, белок Sgt1, белок-белковые взаимодействия.

SUMMARY

Novosylina O.V. Structural and functional differences of A1 and proto-oncogenic A2 isoforms of translation elongation factor eEF1A. - Manuscript.

Thesis for Philosophy Doctor (PhD) degree in Biology, speciality 03.00.03 – molecular biology. – Institute of Molecular Biology and Genetics of National

Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2017.

The thesis is devoted to the study of the structural and functional differences of the two highly homologous isoforms of the translation elongation factor eEF1A.

eEF1A catalyses codon-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of 80S ribosome. eEF1A performs also a variety of so-called non-canonical functions in the organism resulting in the interaction with actin, tubulin, calmodulin, components of ubiquitin-dependent proteolytic system, various regulatory proteins and viral RNA, participating in differentiation, apoptosis and cancerogenesis. Thus, eEF1A may provide important link between protein synthesis and other cellular processes. Mammalian genomes contain about 50 eEF1A-like loci, but only two of these are actively transcribed genes. The two eEF1A isoforms, referred to as eEF1A1 and eEF1A2, share 92% identity and 98% similarity. The expression of the isoforms is tissue- and development-specific and mutually exclusive. eEF1A1 is expressed almost ubiquitously, although to a very low extent in eEF1A2-expressing tissues. eEF1A2 is exclusively expressed in terminally differentiated cells (skeletal muscle, brain and heart). eEF1A2 is anti-apoptotic protein and becomes oncogenic when appears in uncommon tissues while eEF1A1 is a pro-apoptotic protein.

First, the structural parameters of eEF1A1 and eEF1A2 were studied. Differential scanning microcalorimetry showed that enthalpy of denaturation for eEF1A1 ΔH_{total} was 580,0 kJ/mol, while for eEF1A2 ΔH_{total} was 910,0 kJ/mol, so the almost two-times difference was observed. The value of temperature maximum for transition was 55,5°C for eEF1A1 and 62,7°C for eEF1A2. These data suggest more compact conformation of eEF1A2 than eEF1A1. This idea was supported by lesser stability of eEF1A1 than eEF1A2 against urea found by X-ray scattering. Another set of the X-ray scattering measurements produced the following values for molecular mass and radius of gyration for eEF1A1 (82±4 kDa, 41,4±1,0Å) and eEF1A2 (58±4 kDa, 29,1±1,0Å), suggesting that eEF1A1 was more self-association prone than eEF1A2. Increased ability of eEF1A1 to dimerize was confirmed by analytical ultracentrifugation. Also, by X-ray scattering the dimers of eEF1A1 were found to be less compact than the dimers of eEF1A2. Finally, the eEF1A2 protein had less hydrophobic surface than eEF1A1, as shown by fluorescent microscopy measurement in the presence of ANS. Summarizing, it is found that proto-oncogenic isoform eEF1A2 is more compact than eEF1A1 both in monomeric and in dimeric states which correlates with lesser surface hydrophobicity of the former. Instead, eEF1A1 shows greater capability to form the dimers than eEF1A2.

Since the multifunctional protein Sgt1 takes part in the same non-translational cellular processes as eEF1A, the synergic or competitive action of these proteins is quite possible. We checked if the interaction between these proteins indeed exists and found the complexes of eEF1A1 and Sgt1 in vitro and in cellulo. Importantly, eEF1A2 did not interact with Sgt1. The interacting domains of eEF1A1 (domains II and III) and Sgt1 (domains TPR and TPR+CS) were identified by use of truncated protein mutants. As eEF1A is a co-factor of replication for different viruses while Sgt1 is one of the components of antiviral defense we checked the ability of these

proteins to compete for viral mRNA. Indeed, the competitive character of the interaction of Sgt1/viral RNA with eEF1A1 was shown by both direct in vitro measurement of the complexes in native gel and pull-down experiments suggesting possible significance of the interaction of Sgt1 and eEF1A1 for antiviral protection system.

The eEF1A1 and eEF1A2 isoforms were shown to interact differently with F-actin, forming the actin bundles of various shapes as documented by confocal microscopy studies. It may be essential for the role of eEF1A2 in carcinogenesis.

The eEF1A1 rather than eEF1A2 isoform was found to be able to form a complex with calmodulin in vitro. Importantly, the eEF1A1-calmodulin complexes were formed in Ca^{2+} -dependent way both in vitro and in cellulo. The calmodulin binding sites of eEF1A1 were suggested bioinformatically and confirmed experimentally. A possibility of competition of calmodulin and tRNA for eEF1A1 was shown. Furthermore, calmodulin inhibited the eEF1A1-mediated actin bundling. Thus, calmodulin can interfere with both translational and non-translational functions of eEF1A1.

The original hypothesis was proposed, stating that the tissue-specific A2 isoform may be less important (compared to A1) for Ca^{2+} -modulated cellular control and which may make translation less prone to the conditions of permanent changes in Ca^{2+} concentrations in muscle, myocardial and neuronal tissues, where A2 is expressed as the only eEF1A isoform.

Keywords: eEF1A, protein isoforms, spatial organization of proteins, translation elongation, calmodulin, actin bundles, Sgt1 protein, protein-protein interactions