

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Інституту молекулярної біології і генетики  
НАН України



**АНОТОВАНИЙ ЗВІТ**  
**про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проєкту**  
**із виконання наукових досліджень і розробок**  
**ВСТАНОВЛЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ СТРУКТУРНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ КОМПЛЕКСУ**  
**ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ EEF1В ЛЮДИНИ**

**Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених**  
**Рєєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0028**

**Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.02/0028 «Встановлення особливостей структурної організації комплексу факторів елонгації трансляції eEF1В людини»**  
Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу **Підтримка досліджень провідних та молодих учених** протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

**1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ**

Тривалість виконання Проєкту  
Початок – 21 жовтня 2020 р.;  
Закінчення – 2021 рік.

Загальна вартість Проєкту: 5 467 000 грн

Вартість Проєкту по роках, грн.:  
1-й рік 1 617 000  
2-й рік 3 850 000

**2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ**

до виконання Проєкту залучено 6 виконавців та 2 особи допоміжного персоналу, з них:  
доктори наук 1;  
кандидати наук 2;  
інші працівники 5.

**3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(І)**  
**СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ**

**Грантоотримувач:** Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
03143, м.Київ, вул. Заболотного, 150

## 4. ОПИС ПРОЄКТУ

### 4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Мета проєкту - вперше розкрити просторову організацію елонгаційного комплексу трансляції eEF1В людини, який є ключовим білковим комплексом, що бере участь у стадії елонгації поліпептиду на рибосомі.

### 4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

Створення моделі просторової структури субодиниці eEF1В $\alpha$  комплексу eEF1В.

Створення моделі просторової структури субодиниці eEF1В $\beta$  комплексу eEF1В.

Створення моделі просторової структури субодиниці eEF1В $\gamma$  комплексу eEF1В.

Розкриття просторової організації цілого комплексу eEF1В.

Створення атомарної моделі просторової структури комплексу eEF1В.

### 4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

На сьогодні відомості про просторову структуру трансляційного комплексу eEF1В майже відсутні, його функціонування описується за аналогією з прокаріотним функціональним еквівалентом. Такі знання мають велике фундаментальне значення для поліпшення розуміння механізмів трансляції в клітинах людини та сприятимуть виявленню молекулярної природи захворювань, пов'язаних із мутаціями його субодиниць.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Буде отримана ексклюзивна інформація про точну стехіометрію субодиниць у комплексі eEF1В. Вперше стане доступною детальна структурна динаміка цих важливих неглобулярних компонентів трансляційного апарату людини. Поєднання молекулярно-біологічних, біофізичних та обчислювальних підходів дозволить створити 3D моделі всіх субодиниць окремо і представити першу модель комплексу eEF1В людини в цілому.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Методологія проєкту базується на поєднанні біохімічних, біофізичних та обчислювальних підходів для реконструкції просторової організації трансляційного комплексу eEF1В. Зокрема, використовуються експресія та хроматографічна очистка білків, мутагенез рекомбінантних білків, аналітичне центрифугування, воднево-дейтерієвий обмін із наступною мас-спектрометрією, молекулярні моделювання та докінг.

## 5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

### 5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Було проведено порівняльний аналіз раніше нами отриманих і нових даних щодо структурної динаміки та мультимерності eEF1В $\alpha$  та даних рентгеноструктурного аналізу доменів цього білка, зокрема, отримані нові дані стосовно динаміки просторової структури цього білка, зроблено висновок, що цей білок скоріш за все є мономером у розчині *in vitro*, що складається із структурованих доменів, з'єднаних дуже мобільною лінкерною ділянкою. Ця інформація послугувала базисом для моделювання повнорозмірної структури цього білка. Моделі просторової структури eEF1В $\alpha$ , включаючи неструктуровані ділянки цього білка, були згенеровані програмою Modeler. Було отримано більше п'ятдесяти структур eEF1В $\alpha$ , які відрізнялися тільки відносною орієнтацією доменів. Відбір найкращої моделі здійснювали за критерієм видовженості модельної структури. Подальше вдосконалення моделі із високим розрішенням для найкращої перебаченої 3D моделі проводили за допомогою ModRefiner. Перевірку моделі проводили з використанням веб сервера MolProbity, модель вдосконалювали за допомогою сервера YASARA. В результаті було створено молекулярну модель повнорозмірного білка eEF1В $\alpha$ . Використання разом даних молекулярного моделювання і воднево-дейтерієвого обміну із подальшою мас-спектрометрією дозволило зробити висновок про те, що eEF1В $\alpha$  є неглобулярним білком, який містить три різних домени, поєднані двом гнучкими лінкерними ділянками. Отже, вперше побудована тривимірна модель динамічної структури субодиниці

eEF1B $\alpha$  мультимолекулярного комплексу eEF1B, що має велике самостійне наукове значення і, крім того, є необхідним етапом для побудування просторової структури всього комплексу eEF1B, що є загальною метою проєкту.

Оскільки було відомо, що інша субодиниця комплексу eEF1B, eEF1B $\beta$ , є мультимерним білком, наступним завданням проєкту було вивчення рівня мультимеризації eEF1B $\beta$  методом аналітичного ультрацентрифугування (АЦ) у швидкісному та рівноважному режимах. Щоб виявити точну кількість мономерів в олігомерній структурі eEF1B $\beta$ , ми провели аналіз швидкості седиментації білка eEF1B $\beta$  при трьох різних концентраціях білку. Із врахуванням найбільш відповідного коефіцієнту тертя ( $f/f_0$ )  $1.97 \pm 0.07$ , молекулярну масу eEF1B $\beta$  можна було оцінити як  $92 \pm 4$  kDa, що є близьким до теоретичної молекулярної маси тримера. Значення гідродинамічного параметру  $S_{max}/S$ , що дорівнювало  $2.02 \pm 0.04$ , було характерним для неглобулярних і дуже видовжених білків. Для більш точного встановлення молекулярної маси повнорозмірного білка eEF1B $\beta$  було проведено рівноважне центрифугування при трьох концентраціях білку і при двох швидкостях седиментації. Розрахована при використанні незалежного аналізу шести сканів з однією швидкістю молекулярна маса eEF1B $\beta$  дорівнювала  $101.2 \pm 3.9$  kDa. Мультишвидкісний аналіз при трьох концентраціях eEF1B $\beta$  показав значення молекулярної маси цього білка  $97.6 \pm 2.4$  kDa, що є дуже близьким до теоретичної молекулярної маси тримеру ( $95.7$  kDa). Отже, результати вимірювання швидкості седиментації і дані рівноважної седиментації дозволяють заключити, що повнорозмірний рекомбінантний eEF1B $\beta$  поводить себе у розчині як стабільний тример і, найбільш ймовірно, належить до родини неглобулярних білків дуже подовженої форми.

Для розуміння структури eEF1B $\beta$  людини і подальшого створення генно-інженерних конструкцій вкорочених мутантних форм цього білка у первинній структурі цього білку були визначені чотири консервативні ділянки: N--кінцевий домен (залишки 1-80), мотив «лейцинової застібки» (LZ) (залишки 80-115), CAR домен (залишки 153-192), і каталітичний GEF домен (залишки 192-281), поєднані лінкерними ділянками. Відповідно були зконструйовані і продуковані делеційні мутантні білки, що містять ці домени у різних комбінаціях. Було передбачено, що саме ділянка LZ може відповідати за тримеризацію цілого білка, отже мутантний білок, що містив цей домен і білок GST, був проаналізований методом швидкісної ультраседиментації. При найкращому за відповідністю коефіцієнту тертя ( $f/f_0$ )  $1.1$ , розрахунки молекулярних мас білків в цих фракціях надали значення  $107$  і  $183$  kDa, що відповідало тримерній (теоретична молекулярна маса  $95.2$  kDa) та гексамерній (теоретична молекулярна маса  $190.4$  kDa) формі цього білка, відповідно. Наявність гексамерів можна було пояснити відомою з літератури здатністю білка GST формувати димери. Таким чином, гексамери найбільш вірогідно являють собою димери тримерів мутантного білка. Отже, отримані дані прямо свідчать про залучення мотиву LZ до тримеризації білка eEF1B $\beta$ . Щоб дослідити можливий внесок до формування тримерів прилеглої до мотиву LZ лінкерної ділянки, був використаний інший мутантний білок, що містив лінкерну ділянку, домен CAR і каталітичний домен GEF, але не включав мотиву LZ. Була проведена мультишвидкісна рівноважна седиментація, яка напевне показала, що цей білок є мономерним, з молекулярною масою  $21.7 \pm 0.7$  kDa, що відповідає значенню теоретичної молекулярної маси цього білка ( $19.2$  kDa). Отже, внесок лінкерної ділянки до мультимеризації білка eEF1B $\beta$  можна було виключити. Узяті разом, отримані результати чітко вказують на те, що саме мотив LZ ексклюзивно відповідає за тримеризацію білка eEF1B $\beta$ .

Отже, можна заключити, що всі заплановані завдання цього етапу успішно виконані.

## **5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами**

Науково-технічна продукція відсутня.

## **5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)**

Не стосується.

#### 5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

Виконання першого етапу проєкту, зокрема побудова просторової моделі динамічної структури субодиниці eEF1Ba та розшифрування кількісного рівня мультимеризації субодиниці eEF1Bβ із подальшою ідентифікацією структурної ділянки, що відповідає за цю мультимеризацію, є суттєвим внеском до побудови просторової моделі динамічної структури трансляційного комплексу факторів елонгації eEF1B. Розробка експериментально обґрунтованої моделі просторової організації комплексу елонгації трансляції eEF1B може стати проривом у розумінні основних механізмів забезпечення ефективності елонгації синтезу білка у великому об'ємі клітин людини. Знання цієї структури забезпечить підстави для створення відсутньої на сьогодні молекулярної схеми взаємодії комплексу eEF1B з його основним трансляційним аналогом - eEF1A. Більше того, ця структура може лягти у основу подальших досліджень взаємодії двох великих комплексів етапу елонгації трансляції - eEF1B та високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз (НМСА), які можливо між собою утворюють суперкомплекс. Дослідження суперкомплексу eEF1B-НМСА може стати наступним великим кроком у розумінні основних принципів організації компартменталізованого білкового синтезу людини. З практичного боку, зважаючи на те, що виявлені мутації в субодиницях eEF1B призводять до неврологічних розладів, знання про просторову організацію eEF1B на атомарному рівні може мати потенційне значення для розробки фундаменту персоналізованого лікування пов'язаних генетичних захворювань.

Анотований звіт не містить відомостей, заборонених до відкритого опублікування.

#### **Науковий керівник Проєкту**

зав. відділом структурної і функціональної  
протеоміки

(посада)

Негруцький Б.С.

ПІБ



(підпис)