

Конформационная подвижность фактора элонгации трансляции eEF1A1 человека

Д. С. Каниболоцкий¹, А. В. Новосильная, Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
Ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

negrutskii@imbg.org.ua

Методом моделирования по гомологии построена модель изоформы eEF1A1 фактора элонгации трансляции человека. Конформационная подвижность eEF1A1 изучена методом многократного моделирования молекулярной динамики. С использованием ковариационного анализа выделены наиболее существенные согласованные движения атомов. Определено, что взаимные движения первого и второго доменов могут приводить к закрытию щели между доменами и образованию новой «закрытой» конформации. Описаны аминокислотные остатки, обладающие наибольшей подвижностью C-атомов.

Ключевые слова: биосинтез белка, элонгация трансляции, молекулярная динамика белков.

Введение. Основная трансляционная роль eEF1A заключается в доставке аминоацил-тРНК к 80S рибосоме и участии в отборе корректной аминоацил-тРНК в рибосомном А сайте [1]. Предполагается, что eEF1A причастен и к каналированию деацилированной тРНК между аминоацил-тРНК синтетазами и рибосомами [2]. Кроме того, eEF1A может участвовать во многих процессах, на первый взгляд, не связанных с биосинтезом белка в клетках [3, 4].

Существуют как минимум две изоформы eEF1A млекопитающих, которые на 97 % гомологичны и на 93 % идентичны [5]. Функции этих изоформ в трансляции, по-видимому, мало отличаются, однако появляются данные, что различия между изоформами могут проявляться в их разном участии в клеточных сигнальных путях, в частности, при канцерогенезе [6–8]. Таким образом, весьма

важно изучить пространственные структуры высокомолекулярных изоформ eEF1A человека с тем, чтобы понять возможную структурную основу этих отличий. В данной работе рассматривается изоформа eEF1A1 человека.

Молекула eEF1A1 млекопитающих состоит из 462 аминокислотных остатков и имеет семь модифицированных остатков. Это N-триметиллизины (M3I) в 36-, 79- и 318-м положениях, N-диметиллизины (M2I) в 55-м и 165-м положениях, L-глутамил-5-глицерилфосфорилэтанолламины (GRE) в 301-м и 374-м положениях аминокислотной последовательности белка [9]. Пространственная структура eEF1A1 млекопитающих неизвестна, поскольку получить кристаллы этого белка не удалось. Вместе с тем знание трехмерной структуры eEF1A и динамики такой структуры в растворе абсолютно необходимо как для досконального понимания функционирования рибосомной фазы белкового синтеза у млекопитающих, так и для решения воп-

eEF1A1	1	MGKEKT	HINIVVIGHV	DSGKSTTTGH	LIYKCGGIDK	RTIEKFEKEA
Yeast	1	MGKEKS	HINVVVIGHV	DSGKSTTTGH	LIYKCGGIDK	RTIEKFEKEA
<i>S.sulfotarius</i>	1	MS-QKP	HLNLIVIGHV	DHGKSTLVGR	LLMDRGFIDE	KTV-KEAEEA
eEF1A1	47	AE-MGKGSFK	YAWVLDKLKA	ERERGITIDI	SLWKFETSKY	YVTIIDAPGH
Yeast	47	AE-LGKGSFK	YAWVLDKLKA	ERERGITIDI	ALWKFETPKY	QVTVIDAPGH
<i>S.sulfotarius</i>	45	AKKLGKESK	FAPLLDRLKE	ERERGVNTINL	TFMRFETKKY	FFTIIDAPGH
eEF1A1	96	RDFIKNMITG	TSQADCAVLI	VAAGVGEFEA	GISKNGQTRE	HALLAYTLGV
Yeast	96	RDFIKNMITG	TSQADCAILI	IAGGVGEFEA	GISKDGQTRE	HALLAFTLGV
<i>S.sulfotarius</i>	95	RDFVKNMITG	ASQADAAILV	VSACKGEYEA	GMSVEGQTRE	HIILAKTMGL
eEF1A1	146	KQLIVGVNKM	DSTEPYPYSQK	RYEEIVKEVS	TYIKKIGYNP	DTVAFVPISG
Yeast	146	RQLIVAVNKM	DSVK--WDES	RFQEIWKETS	NFIKKVGYNP	KTVPFVPISG
<i>S.sulfotarius</i>	145	DQLIVAVNKM	DLTEPPYDEK	RYKEIVDQVS	KFMRSYGFNT	NKVRFPVVA
eEF1A1	196	WNGDNMLEPS	ANMPWFKGWK	VTRKDGNASG	TTLLEALDCI	LP-PTRPDK
Yeast	194	WNGDNMIEAT	TNAPWYKWE	KETKAGVVKG	KTLLAIDAI	EQ-PSRPTDK
<i>S.sulfotarius</i>	195	PSGDNITHKS	ENMKWYNGPT	LEE-----	-----YLDQL	EL-PPKPVDK
eEF1A1	245	PLRLPLQDVY	KIGGIGTVPV	GRVETGVLKP	GMVVTF---A	PVNVTTEVKS
Yeast	243	PLRLPLQDVY	KIGGIGTVPV	GRVETGVIKP	GMVVTF---A	PAGVTTEVKS
<i>S.sulfotarius</i>	232	PLRIPIQDVY	SISGVTVPV	GRVESGVLKV	GDKIVF---M	PAGKVGEVRS
eEF1A1	292	VEMHHEALSE	ALPGDNVGFN	VKNVSVKDVR	RGNVAGDSKN	DPPMEAAGFT
Yeast	290	VEMHHEQLEQ	GVPGDNVGFN	VKNVSVKEIR	RGNVCGDAKN	DPPKGCNASF
<i>S.sulfotarius</i>	279	IETHHTKMDK	AEPGDNIGFN	VRGVEKKDIK	RGDVVG-HPN	NPPTVADEFT
eEF1A1	342	AQVIIL----	--NHFGQISA	GYAPVLDCHT	AHIACKFAEL	KEKIDRRSGK
Yeast	340	ATVIVL----	--NHFGQISA	GYSVLDCHT	AHIACRFDEL	LEKNDRRSGK
<i>S.sulfotarius</i>	328	ARIIVV----	--WHPTALAN	GYTPVLHVHT	ASVACRVSEL	VSKLDPRTGQ
eEF1A1	386	KLEDGPKFLK	SGDAAIVDMV	PGKPMCVESF	SDYPPLGRFA	VRDMRQTVAV
Yeast	384	KLEDHPKFLK	SGDAALVKFV	PSKPMCVESF	SEYPPLGRFA	VRDMRQTVAV
<i>S.sulfotarius</i>	372	EAEKNPQFLK	QGDVAIVKFK	PIKPLCVEKY	NEFPPLGRFA	MRDMGKTGVG
eEF1A1	436	GVIKAVDKKA	AGAGKVTKSA	QKAQKAK		
Yeast	434	GVIKSVDK-T	EKAAKVTKAA	QKAAK-K		
<i>S.sulfotarius</i>	422	GIIVDVKPK--	---AKVEIK			

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей факторов элонгации eEF1A1 человека [13], eEF1A дрожжей [14] и aEF1A архебактерии *Sulfolobus solfataricus* [15]

роса о механизмах взаимодействия eEF1A с множеством его белков-партнеров, не имеющих прямого отношения к трансляции.

Таким образом, задача данного исследования состояла в построении модели пространственной структуры eEF1A1 человека и изучении молекулярной динамики этого белка в растворе.

К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа исследованы eEF1A дрожжей

Saccharomyces cerevisiae [10, 11] и архебактерий *Sulfolobus solfataricus* [12]. Поскольку аминокислотная последовательность eEF1A1 человека гомологична дрожжевому и архебактериальному факторам элонгации 1A на 80,7 и 53,1 %, соответственно (рис. 1), данные матрицы использовали для построения модели трехмерной структуры eEF1A1.

Методом моделирования молекулярной динамики в интервале 10 нс изучена конформационная

подвижность eEF1A1. Получены шесть траекторий с разными начальными скоростями атомов. Определены наиболее подвижные участки структуры белка. С использованием ковариационного анализа выделены наиболее существенные согласованные движения атомов. Установлено, что взаимное приближение домена II и «верхней части» домена I в ряде случаев приводит к закрытию щели между доменами I и II и образованию новой, закрытой конформации eEF1A1. Показано, что переход между открытой и закрытой конформациями белка является обратимым. Подобные изменения конформации eEF1A могут быть причастны к обнаруженной нами ранее компактизации молекулы eEF1A при взаимодействии с тРНК [16].

Материалы и методы. Трехмерная модель eEF1A1 человека построена с использованием сервера Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) [17], а также кристаллографических структур eEF1A дрожжей *S. cerevisiae* (PDB коды 1ije, 1ijf, 1g7c [11], 1f60 [10]) и aEF1A архебактерии *S. solfataricus* (1jny [12]) в качестве матриц (рис. 1). Полученная модель состоит из 442 аминокислотных остатков (а. о.) от Gly2 до Lys443. N-концевые аминокислотные последовательности дрожжевого и архебактериального белков не были определены рентгеноструктурным методом, поэтому гомологичная последовательность белка человека не включена в конечную модель.

Остатки лизина 36, 79 и 318 заменили на триметиллизины, тогда как Lys55 и Lys165 – на диметиллизины, меняя соответствующие водородные атомы на метильные группы. NH₂-группы остатков Gln301 и Gln374 замещены на глицерилфосфорилэтанолламинные [9].

Большую часть моделирования молекулярной динамики проводили на расчетных кластерах Киевского национального университета имени Тараса Шевченко (www.cluster.univ.kiev.ua) и Института кибернетики имени академика Глушкова НАН Украины (cluster.icyb.kiev.ua). Молекулярную динамику моделировали с помощью пакета программ Gromacs 3.1.4 [18]. Силовое поле Gromos96 [19] модифицировали, добавляя параметры для остатков N-метиллизина (Mlz), N-диметиллизина, N-триметиллизина и L-глутамил-5-глицерилфосфорилэта-

ноламина. Данные топологии для нестандартных аминокислотных остатков получены с использованием сервера PRODRG2 <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/prodrgr.html> [20]. С помощью программы pdb2gmx пакета Gromacs 3.1.4 к неуглеродным тяжелым атомам добавляли атомы водорода. Остатки аргинина, лизина, диметиллизина и N-концевая аминокислотная группа белка получили заряд +1 протонированием. Карбоксильные группы остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот и C-концевого остатка белка были оставлены в депротонированном состоянии с зарядом -1. Остаток His7 протонирован по атому N, поскольку в случае протонирования в положении N атом водорода будет расположен на меньшем расстоянии к группе СН остатка Tyr86, чем сумма Ван-дер-Ваальсовых радиусов. Остатки гистидина 15 и 95 протонированы по положению N, потому что атомы N этих остатков образуют водородные связи с пептидными атомами водорода аминокислот Asp17 и Asp97 соответственно. His26, His296 и His367 протонированы по атомам N, что позволяет протонам электростатически взаимодействовать с карбонильными атомами кислорода своего же остатка. His136 протонирован по положению N, так как атом N образует водородную связь с амидной группой боковой цепи Gln132. Остаток His295 протонирован по азоту-, что позволяет протону взаимодействовать с азотом- остатка His296. His349 протонирован в позиции N, потому что протон при атоме N будет находиться на меньшем расстоянии от группы СН₂ остатка Met429, чем сумма Ван-дер-Ваальсовых радиусов. Остаток His364 определен как N-протонированный, поскольку в этом случае протон может взаимодействовать с атомом серы остатка Cys363.

Модель белка помещали в бокс в форме усеченного октаэдра объемом 1256,34 нм³. Минимальное расстояние от модели до стенок бокса составило 1,5 нм, что позволило белку свободно двигаться и минимизировало артефактную периодичность [21, 22]. В бокс было добавлено 39557 моделей молекул воды SPC (Single Point Charge) [23]. Для нейтрализации заряда системы и имитации ионной силы 0,1 моль/л соответственно 69 и 74 молекулы воды заменили на ионы натрия и хлора. Позиции для расположения ионов выбирали исходя из распределе-

ния Пуассона-Больцмана. Затем минимизировали энергию системы с использованием чередования алгоритмов «скорейший спуск» и «конъюгированный градиент» до достижения градиента энергии менее $100 \text{ кДж/моль}^{-1} \text{ нм}^{-1}$). После этого в течение 500 пс уравнивали молекулы растворителя, за это время атомы белка были привязаны к своим исходным координатам с помощью дополнительного гармонического силового поля. Начальные скорости атомов генерировали в соответствии с распределением Максвелла.

Интегрирование уравнения движения Ньютона осуществляли по алгоритму попеременного опережения с шагом $2 \cdot 10^{-15} \text{ с}$. Валентные связи белка ограничивали с помощью алгоритма LINCS [24]. Для электростатических взаимодействий установлен предел отсекания 0,9 нм, тогда как для Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий устанавливали двойной предел отсекания: взаимодействия на расстоянии до 0,9 нм учитывали на каждом шагу интегрирования, тогда как взаимодействия на расстоянии от 0,9 до 1,4 нм – на каждом 10-м шагу. Дальние электростатические взаимодействия учитывали по алгоритму PME [25].

Температуру и давление в боксе поддерживали равными 298 К и 1 атм по методу Берендсена [26] с временами релаксации 0,1 и 0,5 пс соответственно. После уравнивания растворителя дополнительно минимизировали энергию системы. Затем осуществляли основное моделирование молекулярной динамики белка с теми же параметрами, что и уравнивание растворителя, за исключением привязки координат белка к исходным и контроля давления. Координаты белка записывали в конечный файл траектории каждую пикосекунду. Время уравнивания системы определяли как время достижения плато на графике среднеквадратичного отклонения текущих конформаций белка относительно исходной. Время уравнивания не учитывали при ковариационном анализе и при расчете среднеквадратичных флуктуаций С-атомов.

Проведены шесть разных расчетов молекулярной динамики и получены траектории, отличающиеся начальными скоростями атомов: траектория один продолжительностью 10000 пс, траектория два – 10466 пс, три – 7110 пс, четыре – 10514 пс,

пять – 9920 пс и шесть – 10297 пс. Траектории анализировали по следующим параметрам:

1) среднеквадратичное отклонение текущей конформации белка от начальной по С-атомам (расчет проводили с помощью программы `g_rms` из пакета Gromacs 3.1.4 после наложения текущих конформаций на начальную перед основным моделированием молекулярной динамики);

2) расстояние между центрами доменов (программа `g_dist`) (координаты центров доменов определяли как среднее значение координат всех С-атомов соответствующего домена);

3) минимальное расстояние и количество контактов между аминокислотными остатками Arg69-Leu77 и His295-Gly305, находящимися с противоположных сторон щели между доменами I и II (программа `g_mindist`);

4) среднеквадратичные флуктуации С-атомов относительно среднего положения после наложения текущих конформаций белка на начальную конформацию перед основным моделированием молекулярной динамики (программа `g_rmsf`) (поскольку домены способны вращаться относительно друг друга, среднеквадратичные флуктуации рассчитывали для каждого домена отдельно и после наложения текущих конформаций доменов на начальные; для расчета выбирали участки траекторий продолжительностью 6000 пс после уравнивания системы);

5) проведен ковариационный анализ [27] согласованных движений С-атомов (программы `g_covar`, `g_anaeig` и `g_analyse`).

По графикам среднеквадратичного отклонения конформаций белка (рис. 3, а) была отобрана траектория 2 как наиболее стабильная, после чего с помощью программы `g_rms` построена матрица M среднеквадратичных отклонений для выбранной траектории. Каждый элемент матрицы M_{ij} представляет собой значение среднеквадратичного отклонения по С-атомам между двумя конформациями белка в моменты времени i и j . Таким образом, матрица M имеет размерность $n \times n$, где n – количество пикосекунд в траектории. Матрицу визуализировали так, чтобы каждый ее элемент представлял собой точку с цветом от белого до черного в зависимости от соответствующего числового зна-

чения. Определен участок визуализированной матрицы, имеющий вид светлого квадрата и характеризующийся конформациями с малыми среднеквадратичными отклонениями относительно друг друга (2500–10466 пс). Для соответствующего отрезка траектории построена ковариационная матрица C с элементами

$$C_{k,l} = \langle x_k(t) \langle x_k(t) \rangle \rangle \langle x_l(t) \langle x_l(t) \rangle \rangle, \quad (1)$$

где стрелки над выражениями обозначают векторные величины; угловые скобки – среднее значение; знак « $\langle \rangle$ » здесь – скалярное произведение; x – координата; t – время; k и l – одно из измерений (x , y или z) для одного из атомов. Ковариационная матрица имеет размерность $3 \times 3m$, где m – общее количество C -атомов в белке, т. е. 442. Если два атома движутся вдоль одной из декартовых осей абсолютно несогласованно, то соответствующий элемент матрицы будет равен нулю. Если же движения одного атома полностью повторяют движения другого, то элемент матрицы будет равен значению среднеквадратичной флуктуации атома. Поскольку атомы движутся синхронно сами с собой, диагональ ковариационной матрицы содержит значения среднеквадратичных флуктуаций атомов вдоль декартовых осей.

Ковариационная матрица диагонализуется с использованием ортонормированной матрицы R :

$$C = R \text{diag}(\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m) R^T, \quad (2)$$

где столбцы матрицы R являются собственными векторами матрицы C , которым соответствуют собственные числа $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_m$. Первые собственные векторы, характеризующиеся максимальными собственными числами, отражают глобальные согласованные движения атомов. Однако ковариационный анализ возможно провести и в случае полной хаотичности движения атомов белка. Тогда проекция траектории на каждый k -й собственный вектор будет косинусоидой с периодом $t = k/2$, где t – длина анализируемой

части траектории в пс. Поэтому для оценки качества проведенного ковариационного анализа с помощью программы `g_analyse` рассчитывали степени косинусоидальности проекций траектории на собственные векторы. Степень косинусоидальности равна единице, если проекция траектории полностью совпадает с косинусоидой соответствующего периода и, следовательно, соответствующие движения атомов полностью хаотичны. Если же движения атомов, соответствующие проекции траектории на собственный вектор, полностью согласованы, степень косинусоидальности равна нулю. Таким образом, степень косинусоидальности можно рассматривать как долю хаотичности движений атомов вдоль соответствующего собственного вектора.

Для визуализации траекторий и графического анализа полученных конформаций использовали программы VMD [28] и Swiss-PDB Viewer [29].

Результаты и обсуждение. Модель состоит из трех доменов. Первый домен содержит восемь α -тяжей (Thr6-Ile13, Trp78-Thr82, Tyr85-Ala92, Cys111-Ala118, Gln147-Asn153, Ala189-Ile193, Trp214-Arg218 и Gly221-Gly225), образующих α -складчатый слой, окруженный восьмью β -спиралями (Lys20-Lys30, M3136-Glu48, Ala57-Glu68, Asp97-Thr104, Val120-Ala125, Thr133-Leu143, Gln164-Ile181 и Leu228-Asp233).

Второй домен имеет форму β -бочонка и состоит из α -тяжей Leu248-Leu250, Asp252-Ile256, Gly260-Val267, Met276-Ala281, Val285-Val289, Ser291-Met294, Glu297-Leu299, Asp306-Val312 и Asn324-Ser329.

Третий домен, также в форме β -бочонка, содержит следующие α -тяжи: Gly339-Leu347, Tyr357-Cys363, Ala366-Asp380, Lys385-Gly390, Asp398-Gly407, Gly422-Asp428 и Gln431-Lys443. При этом домены I и III, а также II и III расположены плотно друг к другу, тогда как между доменами I и II имеется довольно объемное пространство, ограниченное со стороны I домена петлей Arg69-Leu77, а со стороны II домена – остатками His295-Gly305 (рис. 2, а).

В данной работе к домену I отнесены аминокислотные остатки от Gly2 до Pro238 включительно, поскольку Pro238 является последним из непрерыв-

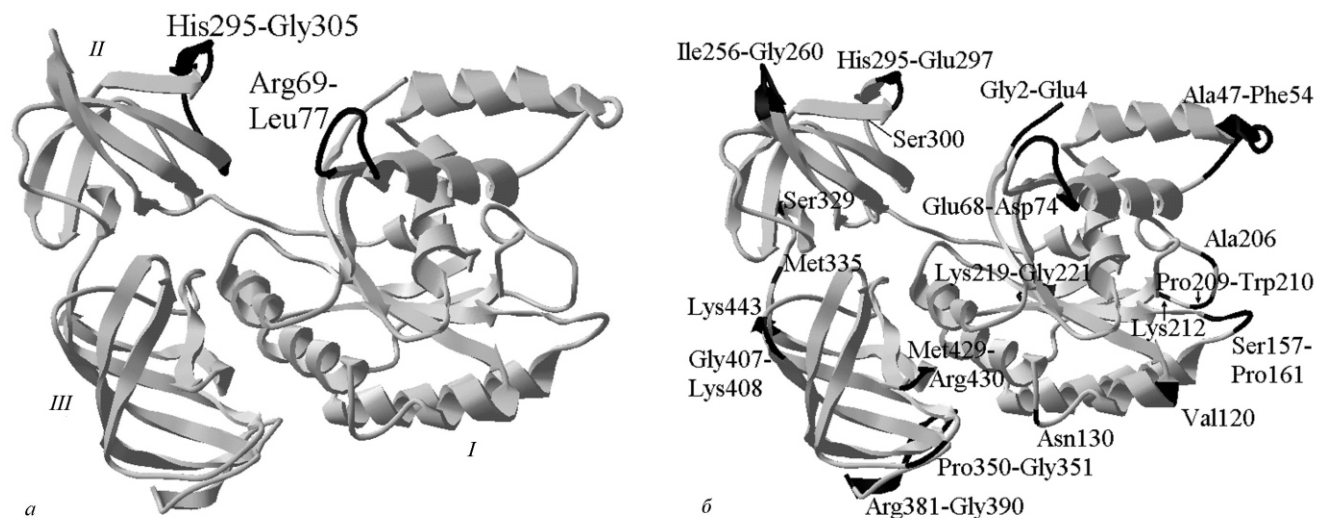


Рис. 2. Модель трехмерной структуры eEF1A1 человека: *a* – домены I, II и III (последовательности Arg69-Leu77 и His295-Gly305, находящиеся на противоположных сторонах впадины между доменами I и II, выделены черным цветом); *б* – аминокислотные остатки со среднеквадратичными флуктуациями, превышающими 0,14 нм в домене I; 0,11 нм – в домене II и 0,09 нм – в домене III (выделены черным цветом)

ного ряда остатков петли Cys234-Arg247, находящихся на расстоянии суммы Ван-дер-Ваальсовых радиусов от остатков другой цепи домена I (для Pro238 – Asp110). Аналогично Pro241 является первым остатком цепи Cys234-Arg247, расположенным на расстоянии суммы Ван-дер-Ваальсовых радиусов от остатка другой цепи домена II (Gly270), поэтому Pro241 был определен как первый остаток домена II. Ser329 принят за конец домена II, поскольку он является последним остатком -тяжа Asn324-Ser329. Первым остатком домена III выбран Met335, находящийся на расстоянии суммы Ван-дер-Ваальсовых радиусов от Cys411. Такой выбор границ доменов позволил минимизировать артефактную повышенную подвижность на концах доменов при наложении каждой текущей конформации домена на начальную.

Изучение методом молекулярной динамики всего набора конформаций достаточно большого трехдоменного белка, каковым является eEF1A1, может потребовать слишком длинных траекторий в микросекундном временном интервале. Однако в процессе моделирования молекулярной динамики белок может принимать артефактные денатурированные конформации и нельзя исключить, что при наличии только одной траектории эти конформации могут интерпретироваться как нативные. Так-

же чем длиннее траектория, тем больше накапливается статистических ошибок. Поэтому в данной работе использован метод многократного моделирования молекулярной динамики [30, 31], основанный на получении большого количества относительно коротких траекторий с разными начальными скоростями атомов. Этот метод позволяет существенно снизить время расчета, расширить статистический базис, оценить качество отдельных траекторий, сравнивая их с полной совокупностью данных, а также минимизировать артефакты, вызванные силовым полем [32, 33].

Зависимость от времени среднеквадратичных отклонений текущих конформаций белка eEF1A1 от начальных показана на рис. 3, *a*. Значительная вариативность данных свидетельствует о большом конформационном пространстве (наборе конформаций) eEF1A1 в водном растворе. Наименьшим разбросом значений среднеквадратичного отклонения характеризуется траектория 2. По матрице среднеквадратичных отклонений определено, что наиболее стабильным в траектории 2 является участок 2500–10466 пс, поэтому ковариационный анализ был проведен именно для данного участка.

Значения собственных чисел и степеней косинусоидальности проекций траекторий для шести первых собственных векторов этого участка траек-

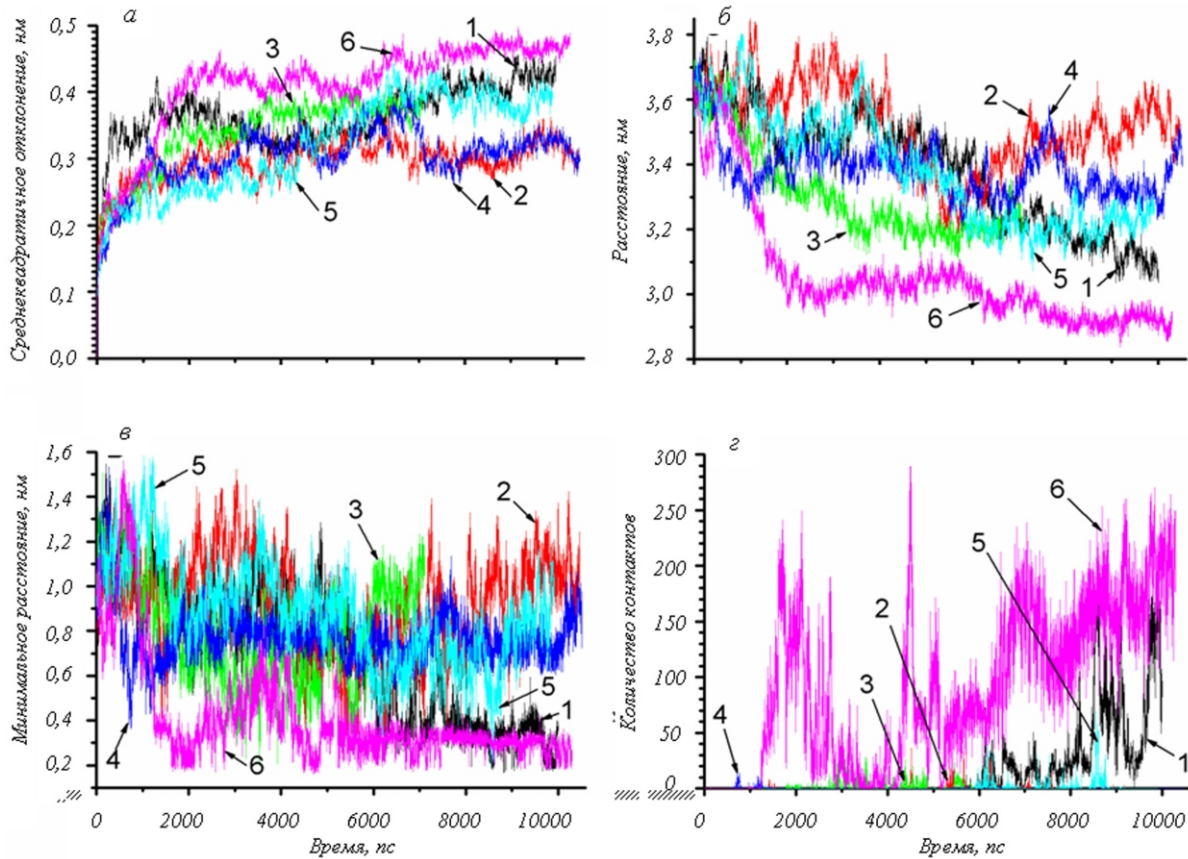


Рис. 3. Результаты анализа траекторий молекулярной динамики eEF1A1 человека: *a* – среднее квадратичное отклонение текущих конформаций белка относительно начальной по C - атомам; *б* – расстояние между центрами доменов I и II; *в* – минимальное расстояние между аминокислотными последовательностями Arg69-Leu77 и His295-Gly305; *г* – количество межатомных контактов между последовательностями Arg69-Leu77 и His295-Gly305. 1 – 6 – траектории 1–6 соответственно

Собственные числа и степени косинусоидальности проекций траекторий для шести первых собственных векторов участка 2500–10466 пс траектории 2

Номер собственного вектора	Собственное значение	Степень косинусоидальности
1	2,92577	0,0337375
2	1,68434	0,0250312
3	0,688702	0,00184525
4	0,468017	0,001109
5	0,326925	0,0284407
6	0,282979	0,0273437

тории 2 приведены в таблице. Видно, что степень косинусоидальности принимает значения от 0,00111 до 0,0337. Это свидетельствует о высоком качестве проведенного ковариационного анализа. Первый собственный вектор траектории 2 (рис. 4, *a*) характеризуется взаимным приближением доме-

нов I и II, причем в домене I в соответствующем движении участвует преимущественно «верхняя» его часть: «хвост» Gly2-Lys5, α -спирали M3L-Glu48 и Ala57-Glu68, петли Cys31-Asp32, Met49-Tyr56 и Arg69-Leu77. Проекция траектории 2 на второй собственный вектор (рис. 4, *б*) описывается вращением «верхней» части домена I вокруг горизонтальной оси, вращениями оставшейся части домена I и домена II вокруг вертикальных осей, а также колебательными движениями аминокислотных остатков в «нижней» части домена III: Gln352, Leu375-Lys376, Leu387-Gly390 и Met429-Arg430. Остатки Leu375-Lys376 и Leu387-Gly390 входят в состав α -шпильки Leu375-Gly390, остатки Met429-Arg430 находятся на конце α -шпильки Gly422-Val437, тогда как Gln352 расположен в неупорядоченной петле Asn348-Gly356. Проекция траектории на третий собственный вектор (рис. 4, *в*)

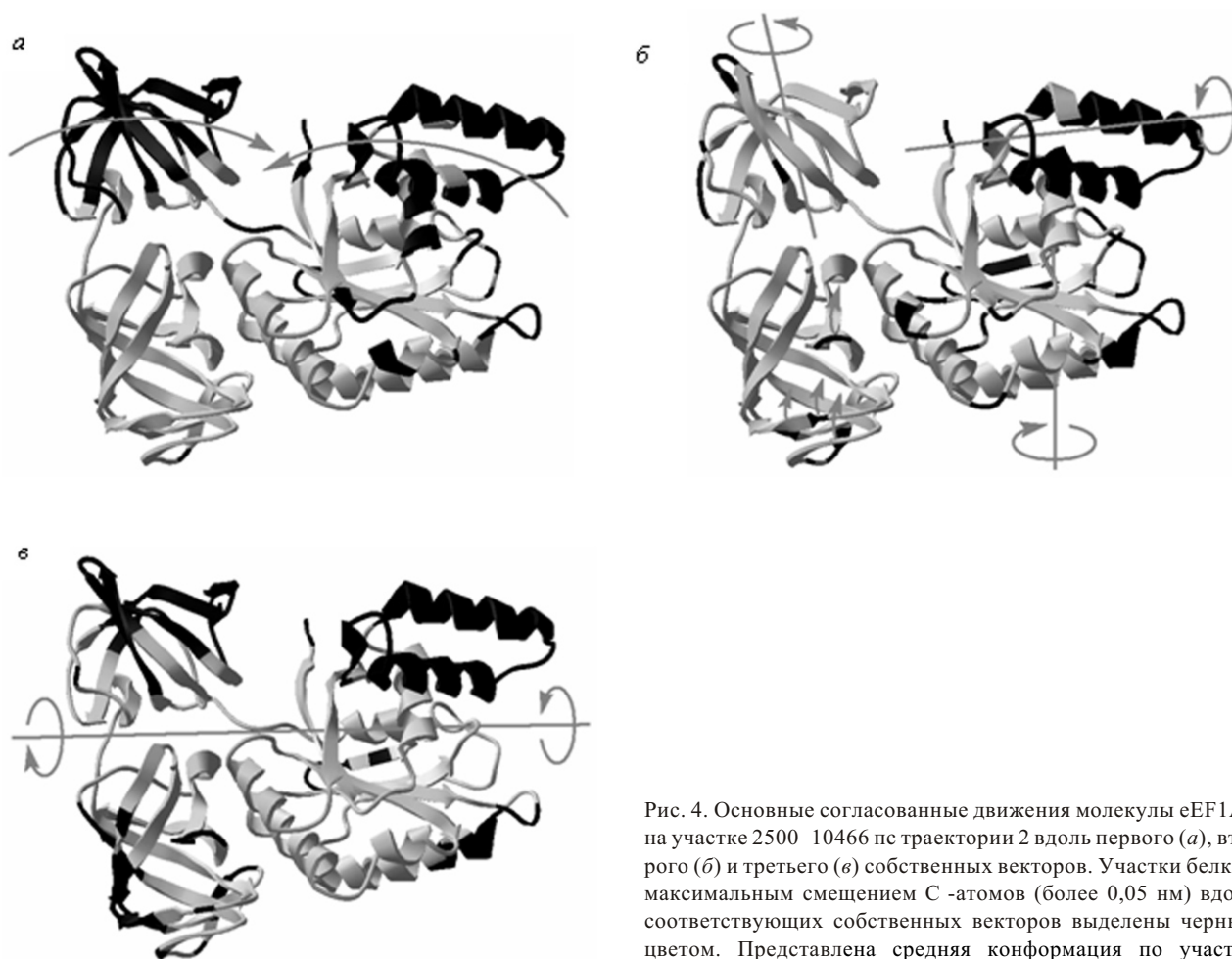


Рис. 4. Основные согласованные движения молекулы eEF1A1 на участке 2500–10466 пс траектории 2 вдоль первого (а), второго (б) и третьего (в) собственных векторов. Участки белка с максимальным смещением С-атомов (более 0,05 нм) вдоль соответствующих собственных векторов выделены черным цветом. Представлена средняя конформация по участку 2500–10466 пс

характеризуется вращением домена I, с одной стороны, и доменов II и III как единого целого, – с другой, вокруг одной горизонтальной оси, но в противоположных направлениях.

Для анализа выявленных наиболее сильных согласованных движений, т. е. взаимного приближения доменов I и II, рассчитывали расстояния между центрами указанных доменов (рис. 3, б). Из сопоставления рис. 3, а, и рис. 3, б, можно сделать вывод об обратной корреляции между среднеквадратичным отклонением конформаций относительно исходной и расстоянием между доменами I и II. Так, траектории, характеризующиеся максимальными значениями среднеквадратичных отклонений (б и 1), показывают наименьшее расстояние между доменами I и II. И наоборот, траектории, имеющие наименьшие значения среднеквадратичного откло-

нения (2 и 4), демонстрируют наибольшие междоменные расстояния. Таким образом, отклонение белка от исходной конформации сопровождается сближением доменов I и II, и средние конформации по траекториям отличаются меньшим расстоянием между указанными доменами, чем исходная конформация. Следует отметить, что расстояния между доменами I и III и между доменами II и III существенно не изменяются.

Взаимное сближение доменов I и II приводит к уменьшению щели между доменами, т. е. фактически между аминокислотными остатками Arg69-Leu77 и His295-Gly305, находящимися на границе щели со стороны I и II доменов соответственно (рис. 2, а). Минимальное расстояние и количество межатомных контактов между указанными остатками показаны соответственно на рис. 3, в, г. Для

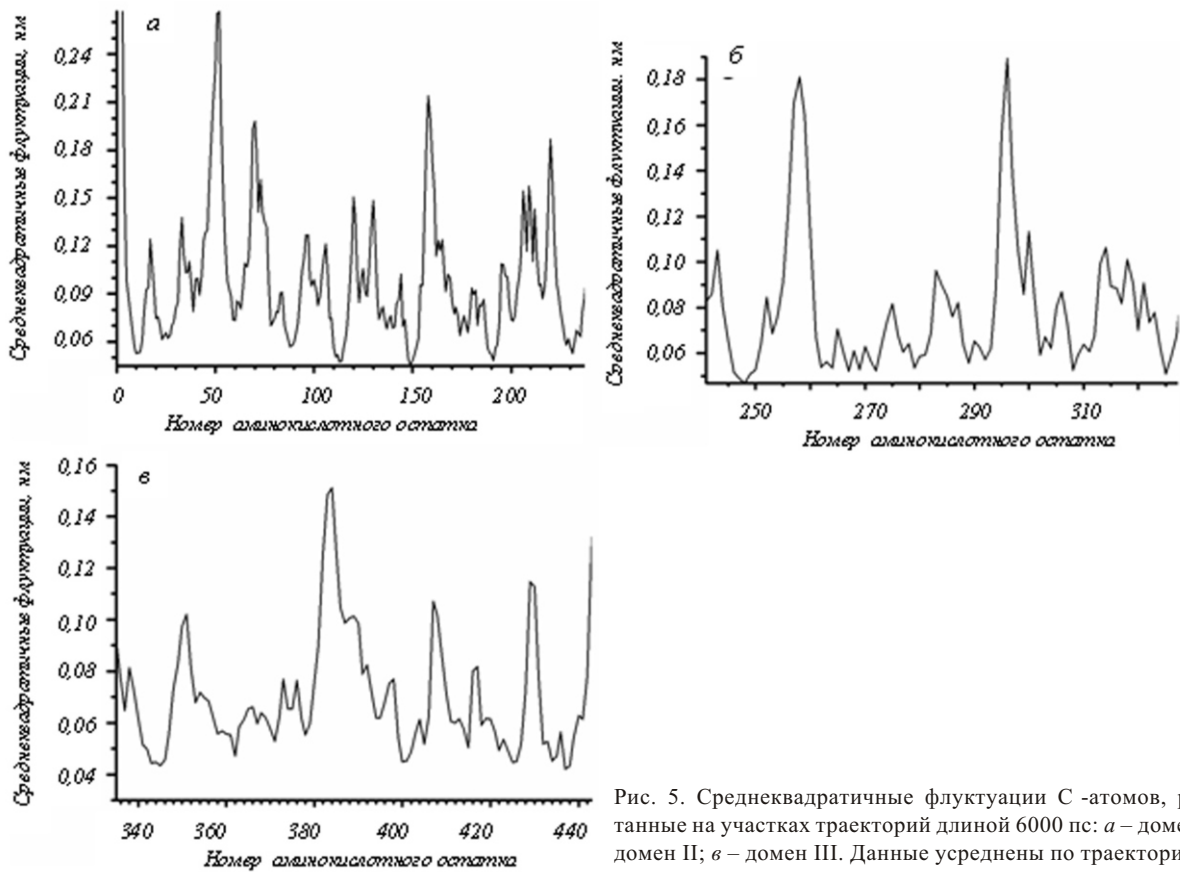


Рис. 5. Среднеквадратичные флуктуации С-атомов, рассчитанные на участках траекторий длиной 6000 пс: а – домен I; б – домен II; в – домен III. Данные усреднены по траекториям

траекторий 1 и 6 величина минимального расстояния уменьшается до суммы Ван-дер-Ваальсовых радиусов на 6100 и 1300 пс соответственно (рис. 3, в), тогда как количество межатомных контактов при этом резко увеличивается от нуля до 20–280 (рис. 3, г). Таким образом, образуется полностью закрытая конформация белка без щели между доменами I и II. При этом переход в закрытую конформацию является обратимым. Так, на траектории 6 белок возвращается в открытую конформацию на 2900 пс, а затем опять переходит в закрытую конформацию на 4300 пс. На траектории 5 белок принимает закрытую конформацию только на короткий промежуток времени (8500–8600 пс). Ранее методом малоуглового рассеяния нейтронов нами показано, что молекула eEF1A1 становится более компактной в присутствии тРНК [16]. Можно предположить, что закрытая конформация eEF1A1 стабилизируется взаимодействием с молекулой тРНК.

Для описания диффузионных, несогласованных движений С-атомов рассчитывали их среднеквад-

ратичные флуктуации относительно среднего положения. Расчет проводили для каждого домена отдельно на стабильных участках траекторий длиной 6000 пс: 4000–10000 пс для траекторий 1, 2, 4 и 6, 1110–7110 пс для траектории 3 и 3920–9920 пс для траектории 5. Данные были усреднены по траекториям (рис. 5). Аминокислотные остатки, обладающие среднеквадратичными флуктуациями больше 0,14 в домене I, больше 0,11 в домене II и больше 0,09 в домене III показаны на рис. 2, б, черным цветом. Разные значения порога среднеквадратичных флуктуаций связаны с разным размером доменов: чем больше домен, тем больше среднеквадратичные флуктуации С-атомов. Как видно из рис. 5, а, и 2, б, в первом домене наибольшей подвижностью обладают аминокислотные остатки в неупорядоченных участках (Gly2-Glu4, Met49-Phe54, Arg69-Asp74, Asn130, Ser157-Pro161, Ala206, Pro209, Trp210, Lys212), на концах α -спиралей вблизи неупорядоченных участков (Ala47-Glu48, Glu68 и Val120), а также на конце β -спильки

Trp214-Gly225 (Lys219-Gly221). В домене II самыми подвижными являются аминокислотные остатки Ile256-Gly260 и His295-Glu297, образующие концы α -спилек Asp252-Val264 и Val292-Leu299 соответственно, а также Ser329 на C-конце домена (рис. 5, б, и 2, б). В домене III наибольшей подвижностью обладают аминокислотные остатки Arg381-Gly390 и Met429-Arg430, расположенные в α -спилках Leu375-Gly390, Gly422-Val437, а также Met335, Pro350, Gly351, Lys408 в неупорядоченных участках и Gly407, Lys443 на концах α -тяжей (рис. 5, в, и 2, б).

Таким образом, впервые построена модель и проанализирована молекулярная динамика одного из основных компонентов аппарата трансляции – фактора элонгации трансляции 1A человека. Для этого использован метод многократной симуляции молекулярной динамики. Показано, что основная подвижность молекулы проявляется на уровне закрытия–открытия пространства между I и II структурными доменами. Возможность компактизации молекулы eEF1A подтверждается ранее полученными экспериментальными данными. Описаны наиболее подвижные участки молекулы eEF1A, располагающиеся во всех трех структурных доменах белка.

Авторы благодарят А. А. Судакова (радиофизический факультет Киевского национального университета имени Тараса Шевченко) и А. А. Якубу (Института кибернетики имени В. М. Глушкова НАН Украины) за техническую поддержку в проведении расчетов. Авторы также признательны д-ру Эбботту (Центр молекулярной медицины Эдинбургского университета) за обсуждение рукописи и ценные замечания. Работа частично финансировалась Фондом фундаментальных исследований Министерства науки и образования Украины, INTAS и фондом Wellcome Trust (Великобритания).

D. S. Kaniolotsky, A. V. Novosil'naya, B. S. Negrutskii, A. V. El'skaya

Conformational mobility of human translation elongation factor A1

Summary

A model of the eEF1A1 isoform of human translation elongation factor 1A has been proposed using a homology modelling method. The conformational mobility of eEF1A1 has been studied by means of multiple molecular dynamics simulation. The most essential coordinated motions in the protein have been identified using the

covariance analysis of atom trajectories. It has been determined that reciprocal flexibility of domains I and II can lead to disappearance of the gap between the domains and to formation of a «closed» conformation of the protein. The amino acid residues, which are characterised by maximal flexibility of C α -atoms, have been described.

Keywords: protein synthesis, translation elongation, protein molecular dynamics.

Д. С. Каниболоцький, А. В. Новосильна, Б. С. Негруцький, Г. В. Єльська

Конформаційна рухливість фактора елонгації трансляції eEF1A1 людини

Резюме

Методом моделювання за гомологією побудовано модель ізоформи eEF1A1 фактора елонгації трансляції людини. Конформаційну рухливість eEF1A1 вивчено методом багаторазового моделювання молекулярної динаміки. З використанням коваріаційного аналізу виділено найістотніші узгоджені рухи атомів. Визначено, що взаємні рухи першого і другого доменів можуть призводити до закриття щілини між доменами та до утворення нової «замкненої» конформації. Описано амінокислотні залишки з найбільшою рухливістю C-атомів.

Ключові слова: біосинтез білка, елонгація трансляції, молекулярна динаміка білків.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*–1998.–**60**.–P. 47–78.
2. *Petrushenko Z. M., Budkevich T. V., Shalak V. F., Negrutskii B. S., El'skaya A. V.* Novel complexes of mammalian translation elongation factor eEF1AGDP with uncharged tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. Implications for tRNA channeling // *Eur. J. Biochem.*–2002.–**269**.–P. 4811–4818.
3. *Thornton S., Anand N., Parcell D., Lee J.* Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis // *J. Mol. Med.*–2003.–**18**.–P. 536–548.
4. *Ejiri S.* Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization // *Biosci. Biotechnol. Biochem.*–2002.–**66**.–P. 1–21.
5. *Kahns S., Lund A., Kristensen P., Knudsen C. R., Clark B. F., Cavallius J., Merrick W. C.* The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein // *Nucl. Acids Res.*–1998.–**26**.–P. 1884–1890.
6. *Anand N., Murthy S., Amann G., Wernick M., Porter L. A., Cukier I. H., Collins C., Gray J. W., Diebold J., Demetrick D. J., Lee J. M.* Protein elongation factor eEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer // *Nat. Genet.*–2002.–**31**.–P. 301–305.
7. *Tomlinson V. A., Newbery H. J., Wray N. R., Jackson J., Larionov A., Miller W. R., Dixon J. M., Abbott C. M.* Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours // *BMC Cancer.*–2005.–**5**.–P. 113.
8. *Kulkarni G., Turbin D. A., Amiri A., Jeganathan S., Andrade-Navarro M. A., Wu T. D., Huntsman D. G., Lee J. M.*

- Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer // *Breast Cancer Res. Treat.*—2007.—**102**.—P. 31–41.
9. Dever T. E., Costello C. E., Owens C. L., Rosenberry T. L., Merrick W. C. Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine // *J. Biol. Chem.*—1989.—**264**.—P. 20518–20525.
 10. Andersen G. R., Pedersen L. Valente L., Chatterjee I., Kinzy T. G., Kjeldgaard M., Nyborg J. Structural basis for nucleotide exchange and competition with tRNA in the yeast elongation factor complex Eef1A:Eef1Ba // *Mol. Cell.*—2000.—**6**.—P. 1261.
 11. Andersen G. R., Valente L., Pedersen L., Kinzy T. G., Nyborg J. Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the Eef1A-Eef1Balpha complex // *Nat. Struct. Biol.*—2001.—**8**.—P. 531–534.
 12. Vitagliano L., Masullo M., Sica F., Zagari A., Bocchini V. The crystal structure of *Sulfolobus solfataricus* elongation factor 1 alpha in complex with Gdp reveals novel features in nucleotide binding and exchange // *EMBO J.*—2001.—**20**.—P. 5305.
 13. Uetsuki T., Naito A., Nagata S., Kaziro Y. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-1 alpha // *J. Biol. Chem.*—1989.—**264**.—P. 5791–5798.
 14. Norbeck J., Blomberg A. Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins // *Yeast.*—1997.—**13**.—P. 1519–1534.
 15. She Q., Singh R. K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M. J., Chan-Weiher C. C., Clausen I. G., Curtis B. A., De Moors A., Erauso G., Fletcher C., Gordon P. M., Heikamp-de Jong I., Jeffries A. C., Kozera C. J., Medina N., Peng X., Thi-Ngoc H. P., Redder P., Schenk M. E., Theriault C., Tolstrup N., Charlebois R. L., Doolittle W. F., Duguet M., Gaasterland T., Garrett R. A., Ragan M. A., Sensen C. W., Van der Oost J. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—**98**.—P. 7835–7840.
 16. Budkevich T. V., Timchenko A. A., Tiktopulo E. I., Negrutskii B. S., Shalak V. F., Petrushenko Z. M., Aksenov V. L., Willumeit R., Kohlbrecher J., Serdyuk I. N., El'skaya A. V. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution // *Biochemistry.*—2002.—**41**.—P. 15342–15349.
 17. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server // *Nucl. Acids Res.*—2003.—**31**.—P. 3381–3385.
 18. Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. GROMACS. 3.0: a package for molecular simulation and trajectory. Analysis // *J. Mol. Mod.*—2001.—**7**.—P. 306–317.
 19. Schuler L. D., Daura X., van Gunsteren W. F. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase // *J. Comput. Chem.*—2001.—**22**.—P. 1205–1218.
 20. Schuettelkopf A. W., van Aalten D. M. F. PRODRG – a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes // *Acta Crystallogr. D.*—2004.—**60**.—P. 1355–1363.
 21. Hunenberger P. H., McCammon J. A. Effect of artificial periodicity in simulations of biomolecules under Ewald boundary conditions: a continuum electrostatics study // *Biophys. Chem.*—1999.—**78**.—P. 69–88.
 22. Weber W., Hunenberger P. H., McCammon J. A. Molecular dynamics simulations of a polyalanine octapeptide under Ewald boundary conditions: influence of artificial periodicity on peptide conformation // *J. Phys. Chem. B.*—2000.—**104**.—P. 3668–3675.
 23. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., van Gunsteren W. F., Hermans J. Interaction models for water in relation to protein hydration // *Intermolecular Forces* / Ed. B. Pullman.—Dordrecht: D. Reidel Publ. Company, 1981.—P. 331–342.
 24. Hess B., Bekker H., Berendsen H. J. C., Fraaije J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations // *J. Comp. Chem.*—1997.—**18**.—P. 1463–1472.
 25. Essman U., Perela L., Berkowitz M. L., Darden T., Lee H., Pedersen L. G. A smooth particle mesh Ewald method // *J. Chem Phys.*—1995.—**103**.—P. 8577–8592.
 26. Berendsen H. J. C., Postma J. P. M., DiNola A., Haak J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath // *J. Chem. Phys.*—1984.—**81**.—P. 3684–3690.
 27. Hess B. Convergence of sampling in protein simulations // *Phys. Rev. E.*—2002.—**65**.—P. 1–10.
 28. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD – visual molecular dynamics // *J. Mol. Graphics.*—1996.—**14**.—P. 33–38.
 29. Guex N., Peitsch M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // *Electrophoresis.*—1997.—**18**.—P. 2714–2723.
 30. Louise-May S., Auffinger P., Westhof E. Calculation of nucleic acid conformation // *Curr. Opin. Struct. Biol.*—1996.—**6**.—P. 289–298.
 31. Auffinger P., Louise-May S., Westhof E. Multiple molecular dynamics simulations of the anticodon loop of tRNA^{Asp} in aqueous solution with counterions // *J. Amer. Chem. Soc.*—1995.—**117**.—P. 6720–6726.
 32. Auffinger P., Louise-May S., Westhof E. Molecular dynamics simulations of the anticodon hairpin of tRNA^{Asp}: structuring effects of C–H O hydrogen bonds and of long-range hydration forces // *J. Amer. Chem. Soc.*—1996.—**118**.—P. 1181–1189.
 33. Vaiana A. C., Westhof E., Auffinger P. A molecular dynamics simulation study of an aminoglycoside/A-site RNA complex: conformational and hydration patterns // *Biochimie.*—2006.—**88**.—P. 1061–1073.

УДК 577.152.61

Надійшла до редакції 11.01.07