

УДК 57.085.23

Д. Каніболоцький, канд. хім. наук, О. Новосильна, пров. інж.,
Б. Негруцький, д-р біол. наук, М. Мірошніченко, д-р біол. наук

МОЛЕКУЛЯРНА ДИНАМІКА ДРУГОЇ ІЗОФОРМИ ФАКТОРА ЕЛОНГАЦІЇ ТРАНСЛЯЦІЇ 1А ЛЮДИНИ

Методом моделювання за гомологією побудована модель другої ізоформи фактора елонгації трансляції 1А (eEF1A2) людини. Методом моделювання молекулярної динаміки досліджено конформаційну рухливість eEF1A2. Встановлено, що білок характеризується значними неузгодженими коливаннями С α -атомів. Показано, що рухи першого та другого доменів можуть призводити до утворення нової "закритої" конформації. Одержані результати добре узгоджуються з літературними експериментальними даними.

The model of the second isoform of human translation elongation factor 1A (eEF1A2) was constructed using homology modelling method. The conformational mobility of the eEF1A2 was studied by means of molecular dynamics simulation. Amplified non-correlated motions of C α -atoms were characterised. It was determined that reciprocal mobility of domains I and II can lead to formation of a "closed" conformation. The obtained results are in good agreement with literature experimental data.

Вступ. Основна роль фактору елонгації трансляції 1А (eEF1A) полягає у транспортуванні аміноацил-тРНК до 80S рибосоми та участі у відборі коректної аміноацил-тРНК в А сайті рибосоми [1]. Існує дві ізоформи eEF1A ссавців, які ідентичні на 93% [2]. В даній роботі досліджено другу ізоформу фактору елонгації 1А (eEF1A2) людини.

Молекула eEF1A2 ссавців складається з 463 амінокислотних залишків і має чотири модифіковані залишки: N-триметиллізину (M3I) в положеннях 55 та 165 і L-глутаміл-5-гліцерилфосфорилетаноламіну (GPE) в положеннях 301 та 374 [2]. Просторова будова молекули eEF1A2 ссавців на даний час невідома, оскільки одержати кристали цього білка не вдалося. Одним з можливих пояснень складності кристалізації eEF1A2 є його висока конформаційна рухливість. Знання трьохмірної будови eEF1A2 та його динаміки у водному розчині є необхідним для досконалого розуміння функціонування рибосомної фази білкового синтезу у ссавців. Таким чином, завданням роботи було побудувати модель просторової структури eEF1A2 людини та дослідити рухливість молекули цього білка у розчині.

Наразі методом рентгеноструктурного аналізу досліджені eEF1A дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* [3, 4] та архебактерії *Sulfolobus solfataricus* [5]. Оскільки eEF1A2 людини ідентичний факторам елонгації 1А дріжджів та архебактерії на 79,6% та 52,2%, відповідно, це дає можливість використати ці білки як матриці для побудови моделі трьохмірної структури eEF1A2 людини.

Об'єкти та методи досліджень. Трьохмірна модель eEF1A2 людини була побудована за допомогою сервера Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). Одержана модель складається з 442 амінокислотних залишків від Gly2 до Lys443. Амінокислотні залишки дріжджового та архебактеріального факторів елонгації, які гомологічні залишкам 1 та 444-463 eEF1A2 людини, не визначені рентгенографічним методом, тому ці залишки не включені у остаточну модель eEF1A2.

Одержана модель eEF1A2 людини складається з трьох доменів (рис. 1а). До першого домену віднесені амінокислотні залишки Gly2-Pro238, до другого – Pro241-Ser329, до третього – Gln335-Lys443 [6]. Перший домен містить 8 β -тяжів, оточених 8 α -спіралями. Другий та третій домени мають вигляд β -діжок з 9 та 7 β -тяжів, відповідно. При цьому домен I і III, а також II і III розташовані щільно один до одного, тоді як між доменами I і II існує досить об'ємний простір, обмежений з боку домену I петлею Arg69-Leu77, а з боку домену II – послідовністю His295-Gly305.

Водневі атоми аміногруп залишків Lys55 і Lys165 було замінено на метильні групи, тоді як аміногрупи залишків Gln301 і Gln374 замінено на гліцерилфосфорилетаноламіні. Моделювання молекулярної динаміки проводили за допомогою пакету програм Gromacs 3.1.4. Силоне поле Gromos96 43a2 модифікували з додаванням параметрів для залишків N-триметиллізину та L-глутаміл-5-гліцерилфосфорилетаноламіну. Дані топології для нестандартних амінокислотних залишків одержані з використанням серверу PRODRG2 <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html>. З використанням програми pdb2gmx пакету Gromacs 3.1.4 до неуглецевих тяжких атомів приєднані атоми водню. Залишки аргініну, лізину, диметиллізину та N-кінцева аміногрупа були протоновані і отримали заряд +1. Карбоксильні групи залишків аспарагінової і глутамінової кислот та C-кінцевого залишку залишені депротонованими з зарядом -1. В результаті білок одержав сумарний заряд +5. Вибір атому азоту залишків гістидину, до якого приєднували протон, здійснювали з урахуванням оточення, так, щоб уникнути занадто малих відстаней від атома водню до інших атомів, з одного боку, і сприяти утворенню водневих та електростатичних ван-дер-ваальсових зв'язків – з іншого. Залишки гістидину 26, 136, 296, 349, 364 та 367 протоновані в положенні N δ , тоді як His7, 15, 95, 197 та 295 – в положенні N ϵ .

Модель білка розміщували у віртуальному боксі у формі зрізаного октаедру так, щоб відстань від білка до стінок боксу не перевищувала 1,5 нм. Бокс заповнювали моделями молекул води SPC (Single Point Charge). 72 молекули води замінили на іони натрію і 77 – на іони хлору для нейтралізації заряду системи і для моделювання іонної сили 0,1. Мінімізацію енергії системи здійснювали чередуванням алгоритмів "скоріший спуск" та "кон'югований градієнт". Врівноваження молекул розчинника проводили 500 пс, при цьому атоми білка були прив'язані до своїх вихідних координат. Вихідні швидкості атомів генерували з розподілення Максвела. Інтегрування рівняння руху здійснювали з кроком $2 \cdot 10^{-15}$ с. Для електростатичних взаємодій встановлена границя 0,9 нм, тоді як для ван-дер-ваальсових взаємодій встановлена подвійна границя: взаємодії на відстані до 0,9 нм враховувалися на кожному кроці інтегрування, а на відстані від 0,9 до 1,4 нм – на кожному десятому кроці. Електростатичні взаємодії за межами встановленої границі враховували згідно алгоритму PME (Particle-Mesh Ewald sum). Температуру та тиск підтримували рівними 298K та 1 атм за методом Берендсена. Після врівноваження моле-

кул розчинника проводили додаткову мінімізацію енергії системи. Основне моделювання молекулярної динаміки здійснювали з тими ж параметрами, що і врівноваження розчинника, за винятком обмеження координат атомів білка та контролю тиску. Координати записували у вихідний файл траєкторії кожну пікосекунду. Час врівноваження системи (~3000 пс) визначали за графіком середньоквадратичного відхилення поточної конформації від початкової як час досягнення плато. Час врівноваження не враховували при розрахунку середньоквадратичних флуктуацій α -атомів. Одержано сім траєкторій з різними початковими швидкостями атомів: траєкторії 1-4 довжиною 10000 пс, траєкторія 5 довжиною 4015 пс, траєкторія 6 (10419 пс) та 7 (10197 пс). Аналіз траєкторій проводився за такими параметрами:

1) Середньоквадратичне відхилення поточної конформації від початкової за α -атомами. Розрахунок проводили за допомогою програми *g_rms* з пакету Gromacs 3.1.4 після накладання поточних конформацій на початкову.

2) Відстань між центрами доменів (програма *g-dist*).

3) Мінімальна відстань та кількість контактів між залишками Arg69-Leu77 та His295-Gly305 (програма *g_mindist*).

4) Середньоквадратичні флуктуації α -атомів відносно середнього положення (програма *g_rmsf*). Оскільки структурні домени здатні обертатися один відносно одного, розрахунок проводили для кожного домену окремо після накладання поточних конформацій доменів на початкові. Для розрахунку брали ділянки траєкторій довжиною 6000 пс після врівноваження, а саме 4000-6000 пс для траєкторій 1-4, 6 та 7. Дані для різних траєкторій усереднювали.

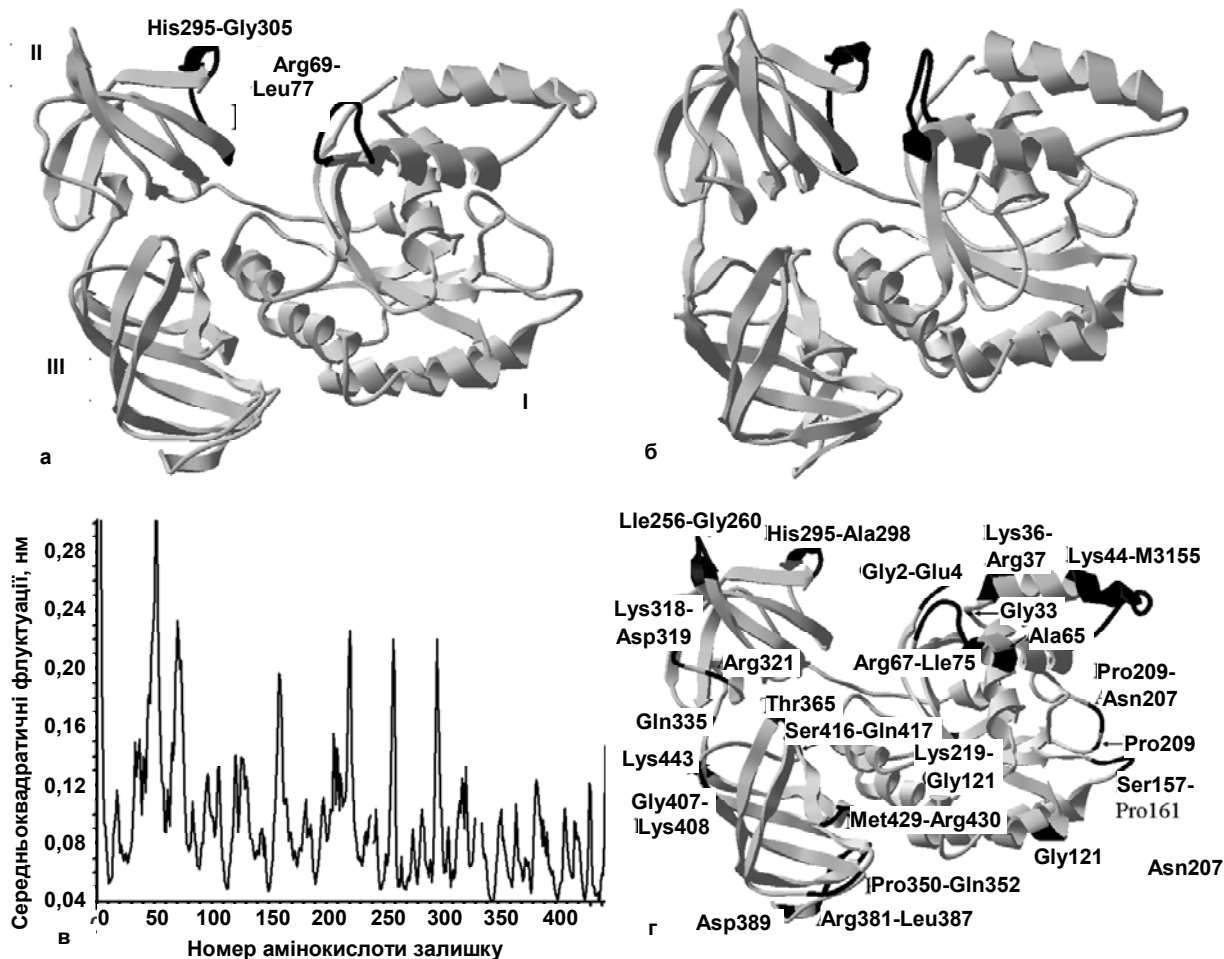


Рис. 1. Трьохмірна структура та середньоквадратичні флуктуації α -атомів фактору елонгації трансляції eEF1A2 людини.
а – відкрита конформація, ділянки Arg69-Leu77 та His295-Gly305, що знаходяться з протилежних боків щілини між домонами I та II, виділені чорним кольором, римськими цифрами позначені номери доменів,
б – закрита конформація на 8000пс траєкторії 4, чорним кольором показані ділянки Arg69-Leu77 та His295-Gly305,
в – середньоквадратичні флуктуації α -атомів (дані усереднені по траєкторіях),
г – амінокислотні залишки з середньоквадратичними флуктуаціями α -атомів більше 0,14нм в домені I, більше 0,11нм в домені II та більше 0,09нм в домені III

Результати та їх обговорення. За результатами аналізу траєкторій молекулярної динаміки eEF1A2 встановлено, що існує обернена кореляція між середньоквадратичними відхиленнями та відстанями між домонами I і II. Так, траєкторія 4 характеризується найбільшими значеннями середньоквадратичного відхилення і найменшими відстанями між домонами I та II, траєкторія 5 має найменші

середньоквадратичні відхилення та найбільші міждомени відстані, траєкторії 3 властиві малі значення середньоквадратичного відхилення та великі значення відстані між домонами I та II. Таким чином, відхилення білка від вихідної конформації супроводжується зближенням доменів I і II. Слід зазначити, що відстані між домонами I і II та між II і III істотно не змінюються.

Взаємне зближення доменів I та II призводить до зменшення щільності між доменами, тобто, фактично між залишками Arg69-Leu77 та His295-Gly305, що знаходяться по краях щільності з боку доменів I та II. Мінімальна відстань між залишками Arg69-Leu77 і His295-Gly305 для траєкторій 1, 2 та 4 зменшується до суми ван-дер-ваальсових радіусів на 9000, 6700 та 1900пс, відповідно. При цьому різко збільшується кількість міжатомних контактів між Arg69-Leu77 та His295-Gly305 практично від нуля до 100-400. Таким чином утворюється повністю закрита конформація eEF1A2 без щільності між доменами I і II (рис. 1б). Слід зазначити, що перехід у закрити конформацію є оборотним, і білок може повернутися назад у відкриту конформацію. Так, eEF1A2 на траєкторії 2 вперше переходить у закрити конформацію на 1060пс, після чого знов переходить у відкриту конформацію і остаточно переходить у закрити форму на 6700 пс. На траєкторіях 3 та 7 eEF1A2 існує у закритій конформації лише короткі проміжки часу 6350-6650 та 7500-7900пс, відповідно. На траєкторії 4 перший перехід у закрити конформацію спостерігається на 1300пс, на 1765пс білок повертається у відкриту форму, на 1900пс знов переходить у закрити і ще раз намагається повернутися у відкриту конформацію на 6584пс.

Раніше було встановлено методом малокутового розсіювання нейтронів, що молекула eEF1A1 стає більш компактною у присутності тРНК [7]. Можна припустити, що аналогічним чином більш компактна закрита конформація eEF1A2 стабілізується своїми біологічними лігандами.

З рис. 1в видно, що найбільші значення середньоквадратичних флуктуацій α -атомів характеризують домен I, найменші – домен III. Це пов'язано з різним розміром доменів: чим більше домен, тим більші значення середньоквадратичних флуктуацій. Амінокислотні залишки з середньоквадратичними флуктуаціями α -атомів більше 0,14нм в домені I, більше 0,11 нм в домені II та більше 0,09нм в домені III, показані на рис. 1 г. Як видно з рисунку, в домені I найбільшими величинами середньоквадратичних флуктуацій (більше 0,14нм) характеризуються амінокислотні залишки у неупорядкованих ділянках (Gly2-Glu4, Gly33, Met49-M3155, Arg69-Ile75, Ser157-Pro161, Pro207-Asn207), на кінці β -шпильки Trp214-Gly225 (Lys219-Gly221) та деякі залишки на α -спіралях (Lys36-Arg37, Lys44-Glu48, Ala65, Arg67-Glu68, Gly121). Слід підкреслити, що залишки Gly33, Lys36-Arg37, Lys44-M3155, Ala65, Arg67-Ile75 знаходяться на рухливій ділянці Cys31-Leu77, яка складається з трьох петель Cys31-Asp35, Met49-Tyr56, Arg69-Leu77 та двох α -спіралей Lys36-Glu48, Ala57-Glu68. Ця ділянка знаходиться з іншого боку щільності відносно домену II та здатна рухатися як єдине ціле. Значною мірою зменшення і закриття щільності між доме-

нами I і II здійснюється саме завдяки рухам ділянки Cys31-Leu77. В домені II найбільші середньоквадратичні флуктуації (>0,11нм) характерні для залишків Ile256-Gly260 та His295-Ala298, які знаходяться на кінцях β -шпильок Asp252-Val264 та Val292-Leu299, а також для Lys318-Asp319 та Arg321 у неупорядкованому ланцюзі Lys313-Gly323. Найбільшу рухливість у третьому домені (середньоквадратичні флуктуації більше 0,09нм) показують залишки Thr365, Arg381-Leu387, Asp389, Met429-Arg430, що знаходяться в β -шпильках Tyr357-Phe373, Leu375-Gly390, Gly422-Val437, а також залишки Gln335, Pro350-Gln352, Lys408, Ser416-Gln417 в неупорядкованих ділянках та Gly407, Lys443 на кінцях β -тяжів.

Висновки. В даній роботі побудована тривимірна модель другої ізоформи фактору елонгації трансляції 1А людини. Методом моделювання молекулярної динаміки в інтервалі 10нс досліджено конформаційну рухливість eEF1A2. Одержано сім траєкторій з різними початковими швидкостями атомів. Показано, що взаємне зближення доменів I та II може призводити до закриття щільності між цими доменами та утворення нової закритої конформації, при цьому перехід у закрити конформацію є оборотним. Подібні зміни конформації можуть брати участь у виявленні для першої ізоформи фактору елонгації компактизації при зв'язуванні з тРНК [7]. Описані найбільш рухливі амінокислотні залишки в кожному з структурних доменів eEF1A2.

Основна частина моделювання молекулярної динаміки проводилася на обчислювальному кластері Київського національного університету імені Тараса Шевченка (www.cluster.univ.kiev.ua). Автори вдячні канд.фіз.-мат.наук О.О. Судакову (радіофізичний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка) за технічну підтримку у проведенні розрахунків.

1. Negrutskii B.S., El'skaya A.V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. – 1998. – V. 60. – P. 47–78.
2. Kahns S., Lund A., Kristensen P. et al. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein // Nucleic Acids Res. – 1998. – V. 26, N 8. – P. 1884–1890.
3. Andersen G.R., Pedersen L. Valente L. et al. Structural Basis for Nucleotide Exchange and Competition with tRNA in the Yeast Elongation Factor Complex Eef1A-Eef1B // Mol. Cell. – 2000. – V. 6. – P. 1261.
4. Andersen G.R., Valente L., Pedersen L. et al. Crystal Structures of Nucleotide Exchange Intermediates in the Eef1A-Eef1Balpha Complex // Nat. Struct. Biol. – 2001. – V. 8. – N 6. – P. 531–534.
5. Vitagliano L., Masullo M., Sica F. et al. 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. – V. 20. – P. 5305.
6. Каниболоцкий Д.С., Новосильная А.В., Неграуцкий Б.С., Ельская А.В. Конформационная подвижность фактора элонгации трансляции eEF1A1 человека // Биополимеры и клетка. – 2007. – Т 23, № 4. – с. 307–317.
7. Budkevich T.V., Timchenko A.A., Tiktopulo E.I. et al. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – N 51. – P. 15342–15349.

Надійшла до редколегії 05.02.07

УДК 578.3

А. Коренєва, асп.,
Л. Міщенко, д-р біол. наук

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ХВОРОБ PANAX GINSENG C.A. MEYER

Проведено моніторинг культурних фітоценозів *Panax ginseng* C.A. Mey. Виділено вірус із насіння та плодів хворих рослин женьшеню. За допомогою методу електронної мікроскопії встановлені форма та розміри вірусних часток.

Monitoring of cultural phytocenoses of *Panax ginseng* C.A. Mey. is carried out. Virus from the seeds and fruits of infected ginseng plants is isolated. The form and length of particles were established with electron microscopy method.

Вступ. Третина лікувальних засобів, що використовуються у сучасній медицині, виготовляється з лікарсь-

ких рослин. Природні сполуки з рослин також застосовуються в харчовій, парфумерній та інших галузях [5].

© Коренєва А., Міщенко Л., 2007