

Характеристика физических свойств двух изоформ фактора элонгации трансляции eEF1A

А. В. Новосильная, А. А. Тимченко¹, Е. И. Тиктопуло¹, И. Н. Сердюк¹,
Б. С. Негруцкий, А. В. Ельская

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

¹Институт белка РАН
Ул. Институтская, 4, Пушкино, 142290, Россия

aleksnova@yahoo.com

Две тканеспецифические изоформы фактора элонгации трансляции 1A млекопитающих (eEF1A1 и eEF1A2) идентичны на 98 %. Однако некоторые их функции в организме кардинально отличаются, что в отдельных случаях может быть связано с индукцией канцерогенеза. Мы предположили, что незначительная разница в первичных последовательностях может, тем не менее, приводить к существенным различиям пространственной структуры изоформ eEF1A. Это, в свою очередь, может влиять на способность той или иной изоформы взаимодействовать с белками-партнерами. В данной работе методами дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и кругового дихроизма в областях дальнего и ближнего УФ установлено, что потенциально онкогенная изоформа eEF1A2 имеет более компактную пространственную структуру, чем eEF1A1, причем различия проявляются как на уровне как вторичной, так и третичной структуры белков.

Ключевые слова: фактор элонгации трансляции eEF1A, биосинтез белка, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, круговой дихроизм.

Введение. eEF1A – мультифункциональный белок, основная функция которого заключается в эффективной доставке аминоксил-тРНК к 80S рибосоме и участии в обеспечении корректного кодон-антикодонного взаимодействия в рибосомном А сайте [1]. Идентифицированы две тканеспецифические формы этого белка: eEF1A2, экспрессирующаяся только в нервной и мышечной тканях, и eEF1A1, обнаруженная во всех остальных тканях [2, 3]. Причина существования двух изоформ до сих пор не выяснена. Недавно установлено, что появление изоформы eEF1A2 в нехарактерной для нее ткани

непосредственно связано с индукцией канцерогенеза [4–8]. Каким образом белок eEF1A2, который на 98 % гомологичен обычному для этой ткани белку eEF1A1, может быть причастен к возникновению опухоли этой ткани, остается неизвестным. Мы предположили, что даже незначительные аминокислотные замены в изоформе eEF1A2 способны влиять на конформацию этой белковой глобулы, что может приводить к модификации известных и появлению новых функций. Ранее для проверки такого предположения нами проведен сравнительный анализ молекулярной динамики обеих изоформ этого белка, показавший возможность существования различий во вторичной структуре и

А. В. НОВОСИЛЬНАЯ, А. А. ТИМЧЕНКО, Е. И. ТИКТОПУЛО,
И. Н. СЕРДЮК, Б. С. НЕГРУЦКИЙ, А. В. ЕЛЬСКАЯ, 2007

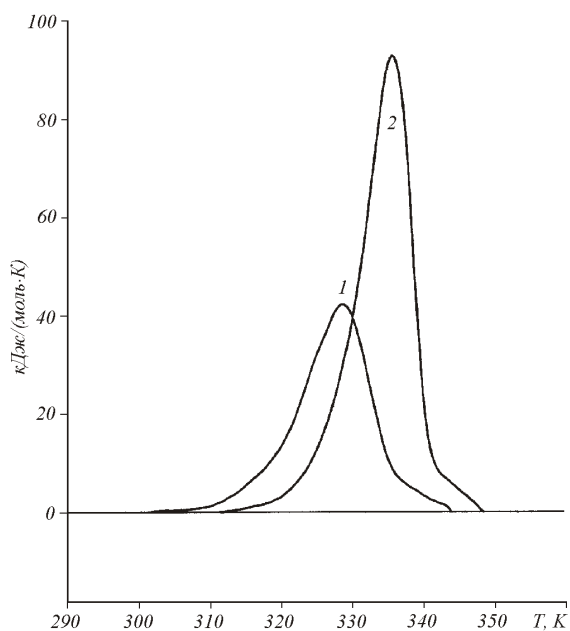


Рис. 1. Температурная зависимость избыточного теплопоглощения для eEF1A в 30 мМ трис-НСl, рН 7,5, содержащем 20 %-й глицерин, 6 мМ β -меркаптоэтанол, 1 мМ MgCl₂, 150 мМ KCl: 1 – кривая плавления eEF1A1; 2 – кривая плавления eEF1A2

динамике данных белковых глобул [9, 10]. В настоящей работе мы представляем экспериментальные данные сравнения изоформ eEF1A1 и eEF1A2 с использованием дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и кругового дихроизма (КД) в ближней и дальней УФ области.

Материалы и методы. *Выделение и характеристика eEF1A.* Белок eEF1A1 получен из печени кролика с использованием комбинации ионообменной хроматографии и гель-фильтрации, как описано ранее [11], с небольшими изменениями.

Белок eEF1A2 выделен из мышц кролика по аналогичной схеме, исключая первую стадию очистки – хроматографию на сефакрил S-400, что не повлияло на чистоту препарата.

Активность eEF1A определяли в реакции ГДФ/[³H]ГДФ обмена [12].

Дифференциальная сканирующая калориметрия. Калориметрические измерения проводили в прецизионном сканирующем микрокалориметре SCAL-1 (SCAL Co.Ltd., РФ) в ячейках из стекла объемом 0,3 мл со скоростью 1,0 К за 1 мин при избыточном давлении 2 атм [13]. Перед измерениями

осуществляли диализ всех образцов против соответствующего буфера. Концентрация белков, использованных для калориметрических измерений, составляла 2,3–2,5 мг/мл. Термодинамический анализ профиля избытка теплоемкости проведен согласно [14].

Измерение кругового дихроизма белков в областях дальнего и ближнего УФ. Вторичную структуру белков изучали методом спектроскопии кругового дихроизма (КД) на спектрополяриметре JASCO-600 (Япония) в диапазонах длин волн 190–250 нм (дальний УФ спектр) и 250–310 нм (ближний УФ спектр). Значения молярной эллиптичности рассчитывали из уравнения

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

где C – концентрация белка (мг/мл); L – длина оптического пути кюветы (мм); $[\theta]_{\text{изм}}$ – измеренная эллиптичность (градусы) и $M_{\text{ост}}$ – средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности. Дальний УФ-спектр измеряли в 0,1-мм кювете, а ближний – в 1-мм кювете при концентрации белка 1 мг/мл.

Результаты и обсуждение. *Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия.* Метод дифференциальной сканирующей микрокалориметрии позволяет измерить и сравнить термодинамические параметры, характеризующие конформационные изменения, которые претерпевают белки в процессе тепловой денатурации [14, 15].

Проведенный ранее компьютерный анализ молекулярной динамики изоформ eEF1A показал, что конформационные изменения молекулы eEF1A1 могут происходить в основном за счет междоменных взаимодействий, тогда как для eEF1A2 характерна более закрытая конформация [9,10]. Следовательно, можно было ожидать, что сравнение термодинамических параметров двух изоформ eEF1A будет информативным для выявления разницы в тепловой стабильности и энтальпии денатурации. Поскольку стабильность молекулы белка тесно связана с его структурой, то подобный анализ термодинамических параметров может свидетельствовать либо о разнице, либо о сходстве их структур, а также о степени компактности этих белков.

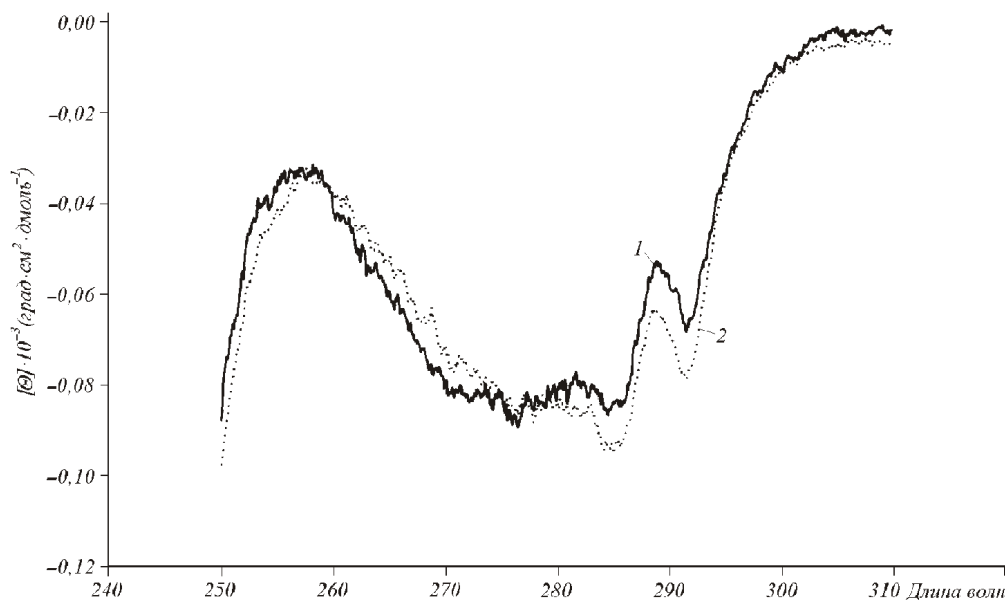


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма изоформ eEF1A в ближней УФ-области: 1 – eEF1A1; 2 – eEF1A2

Температурные зависимости избыточной парциальной теплоемкости eEF1A1 и eEF1A2 представлены на рис. 1. Оказалось, что теплоты денатурации, определяемые площадью пика теплопоглощения, отличаются для двух изоформ почти вдвое. Если для eEF1A1 $H_{\text{общ}} = 580,0$ кДж/моль, то для eEF1A2 $H_{\text{общ}}$ составляет 910,0 кДж/моль. Из кривых плавления также видно, что молекула eEF1A1 начинает плавиться значительно раньше, чем молекула eEF1A2. Значения температуры максимума перехода составляют для eEF1A1 55,5 °С, для eEF1A2 – 62,7 °С. При этом температура полуширины перехода (T), определяемая на полувисоте пика, равна 11,0 °С для eEF1A1 и 8,1 °С для eEF1A2. Таким образом, можно сделать вывод о том, что молекулы изоформ eEF1A определенно имеют различающуюся пространственную структуру. Существенное увеличение энтальпии денатурации и уменьшение полуширины перехода при плавлении белка eEF1A2 по сравнению с eEF1A1 свидетельствуют о более компактной конформации изоформы eEF1A2, что и было предсказано ранее на основании данных молекулярной динамики [9, 10].

Круговой дихроизм в ближней УФ области. Спектр КД в ближней УФ области (250–350 нм) дает определенную информацию о пространственной структуре белка. В этой области к третичной струк-

туре белка чувствительны сигналы КД хромофоров – ароматических аминокислот и дисульфидных связей.

Сигналы в области 250–270 нм характерны для остатков фенилаланина, в области 270–290 нм – свойственны тирозину и сигналы, находящиеся в области 280–300 нм, присущи триптофану. Дисульфидные связи дают слабые сигналы по всему ближайшему УФ спектру [16, 17].

Учитывая, что расположение в первичной последовательности и общее количество ароматических аминокислот в гомологичных на 98 % изоформах практически одинаковы (есть только одна замена Phe на Ser в изоформе eEF1A2), а общее количество этих аминокислот в eEF1A1 (eEF1A2) составляет: Trp – 5(5), Tyr – 12(12), Phe – 14(13), то с помощью указанного метода представляется возможным показать идентичность или различия в третичной структуре этих изоформ.

Спектры КД белков eEF1A1 и eEF1A2 в области ближнего УФ представлены на рис. 2. Установлено, что у изоформ eEF1A наблюдается разница в КД сигналах по всему спектру ближней УФ-области. Если изменения КД сигналов в характерной для Phe области и могут быть частичным следствием отличия в 393-м положении первичных последовательностей изоформ (Phe393 в eEF1A1 или Ser393 в

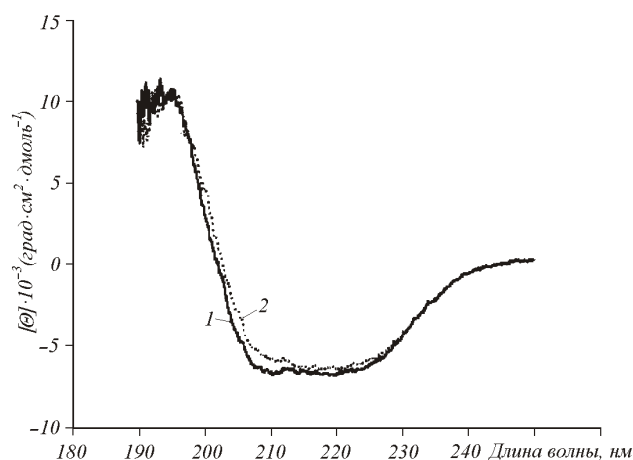


Рис. 3. Спектры кругового дихроизма eEF1A в дальней УФ-области: 1 – eEF1A1; 2 – eEF1A2

eEF1A2), то разница в остальной части спектра является прямым результатом изменений в третичной структуре этих белков. Таким образом, данные КД в ближней УФ области свидетельствуют в пользу существования определенных различий третичной структуры изоформ eEF1A1 и eEF1A2.

Круговой дихроизм в дальней УФ области. Важно было установить, сопровождаются ли локальные отличия пространственных структур изоформ eEF1A изменениями во вторичной структуре этих белков. Информацию о вторичной структуре белков можно получить при помощи КД спектроскопии в дальней УФ области спектра (190–250 нм). При этих длинах волны хромофорами являются пептидные связи и сигнал возникает, когда они расположены в регулярном структурном окружении. Характерная форма и величина КД спектра в основном обусловлены α -спиральными структурами в молекуле белка [18].

Нами измерены спектры КД eEF1A1 и eEF1A2 в дальней УФ области (рис. 3). Показано, что у изоформы eEF1A2 наблюдается возрастание максимума пика молярной эллиптичности по отношению к eEF1A1 в области 210 нм. Поскольку эта часть спектра характерна для α -спиральных участков, увеличение КД сигнала при длине волны 210 нм свидетельствует о некоторой потере спиральности во вторичной структуре белка eEF1A2. Это согласуется с частичным разрушением α -спирали Lys36-Glu48, предсказанным ранее моделированием

молекулярной динамики изоформы eEF1A2 [9, 10].

Таким образом, впервые биофизическими методами проведен сравнительный анализ пространственных структур двух тканеспецифических изоформ eEF1A, одна из которых вовлечена в онкогенез при раке яичника и легких человека [4, 5, 7, 8]. Показано, что структура изоформы eEF1A2 более компактна и характеризуется частичным разрушением α -спирали, по-видимому, в участке Lys36-Glu48. Наблюдаются также различия в третичной структуре изоформ белка. Данные особенности пространственной организации могут приводить к экспонированию функциональных участков в молекуле eEF1A2, способных взаимодействовать с сигнальными молекулами, что может быть одной из причин онкогенности этой изоформы трансляционного фактора.

Представленная работа является одной из первых, где показано, что гомологичные на 98 % изоформы природных белков могут иметь различную пространственную организацию. Для определения функциональных различий белковых изоформ важно, вероятно, не только изменения в первичной структуре, проявляющиеся, например, в появлении новых доменов либо в удалении или появлении новых сайтов посттрансляционных модификаций, но и изменения их пространственной организации. Эти данные помогут расширить направление поиска фундаментальных основ существования различных изоформ одного и того же белка.

Авторы признательны Фонду фундаментальных исследований МОН Украины, а также организациям INTAS и Wellcome Trust за финансовую поддержку. Авторы выражают благодарность Б. С. Мельнику за измерения спектров КД.

A. V. Novosylna, A. A. Timchenko, E. I. Tiktopulo, I. N. Serdyuk, B. S. Negrutskii, A. V. El'skaya

Characterization of physical properties of two isoforms of translation elongation factor 1A

Summary

Two tissue-specific isoforms of mammalian translation elongation factor 1A, eEF1A1 and eEF1A2, are 98 % similar. However, some of their functions in the organism are different which in some cases could lead to the induction of carcinogenesis. We supposed that slight difference of primary sequences may cause significant

differences of spatial structures of eEF1A isoforms affecting, in its turn, the ability of one or another isoform to interact with protein partners. The differential scanning microcalorimetry and circular dichroism in «near» and «far» UV regions were used to determine that potentially oncogenic eEF1A2 isoform possesses a more compact spatial organization than eEF1A1, and the differences are revealed at the levels of both secondary and tertiary structure of proteins.

Keywords: translation elongation factor eEF1A1, protein biosynthesis, differential scanning microcalorimetry, circular dichroism

О. В. Новосильна, О. О. Тимченко, Є. І. Тиктопуло,
І. М. Сердюк, Б. С. Негруцький, Г. В. Єльська

Характеристика фізичних властивостей двох ізоформ фактора елонгації трансляції eEF1A

Резюме

Дві тканиноспецифічні ізоформи фактора елонгації 1A ссавців (eEF1A1 і eEF1A2) ідентичні на 98 %. Але деякі їхні функції в організмі значно різняться, що в окремих випадках може бути пов'язано з індукцією канцерогенезу. Ми припустили, що незначна різниця у первинних послідовностях може призводити до суттєвих відмінностей у просторовій структурі ізоформ eEF1A. Це, в свою чергу, може впливати на здатність тієї чи іншої ізоформи взаємодіяти з білками-партнерами. В даній роботі методами диференційної сканувальної мікрокалориметрії і кругового дихроїзму на ділянках далекого і ближнього УФ встановлено, що потенційно онкогенна ізоформа eEF1A2 має компактнішу просторову структуру, ніж eEF1A1, причому відмінності проявляються на рівні як вторинної, так і третинної структури білків.

Ключові слова: фактор елонгації трансляції eEF1A, біосинтез білка, диференційна сканувальна мікрокалориметрія, круговий дихроїзм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Negrutskii B. S., Deutscher M. P. Channeling of aminoacyl-tRNA for protein synthesis *in vivo* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1991.–**88**.–P. 4991–4995.
2. Knudsen S. M., Frydenberg J., Clark B. F. C., Leffers H. Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha // Eur. J. Biochem.–1993.–**215**.–P. 549–554.
3. Lee S., Wolfrain L. A., Wang E. Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development // J. Biol. Chem.–1993.–**268**.–P. 24453–24459.
4. Lee J. M. The role of protein elongation factor eEF1A2 in ovarian cancer // Reprod. Biol. Endocrinol.–2003.–**1**.–P. 69.
5. 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.
6. 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.
7. Zhu H., Lam D. C., Han K. C., Tin V. P., Suen W. S., Wang E., Lam W. K., Cai W. W., Chung L. P., Wong M. P. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines // Cancer Lett.–2007.–**245**.–P. 303–314.
8. Li R., Wang H., Bekele B. N., Yin Z., Caraway N. P., Katz R. L., Stass S. A., Jiang F. Identification of putative oncogenes in lung adenocarcinoma by a comprehensive functional genomic approach // Oncogene.–2006.–**25**.–P. 2628–2635.
9. Каниболоцький Д., Новосильна О., Негруцький Б., Мірошниченко М., Єльська Г. Вивчення конформаційної рухливості ізоформи eEF1A2 фактора елонгації трансляції 1A людини // Вісн. нац. ун-ту імені Тараса Шевченка. Сер. біологія.–2007.–Вип. 49–50.–С. 12–15.
10. Каниболоцький Д. С., Новосильная А. В., Негруцький Б. С., Єльська А. В. Конформаційна подвижність фактора елонгації трансляції eEF1A1 человека // Біополімери і клітина.–2007.–**23**, № 4.–С. 307–317.
11. Shalak V. F., Budkevich T. V., Negrutskii B. S., El'skaya A. V. A fast and effective method for purification of elongation factor 1A from rabbit liver // Ukr. Biokhim. Zh.–1997.–**69**.–P. 104–109.
12. Carvalho M. D., Carvalho J. F., Merrick W. C. Biological characterization of various forms of elongation factor 1 from rabbit reticulocytes // Arch. Biochem. and Biophys.–1984.–**234**.–P. 603–611.
13. Senin A. A., Potekhin S. A., Tiktopulo E. I., Filomonov V. V. Differential Scanning Microcalorimeter SCAL-1 // J. Therm. Anal. Calorimetry.–2000.–**62**.–P. 153–160.
14. Privalov P. L., Potekhin S. A. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins // Meth. Enzymol.–1986.–**131**.–P. 4–51.
15. Sturtevant J. M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–1977.–**74**.–P. 2236–2240.
16. Gething M.-J., Davidson R. E. Chorismate mutase/prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K12. Effect of phenylalanine, NaCl and pH on the protein conformation // Eur. J. Biochem.–1978.–**86**.–P. 159–164.
17. Plunkett G., Clarence A. Ryan reduction and carboxamidomethylation of the single disulfide bond of proteinase inhibitor I from potato tubers. Effects on stability, immunological properties, and inhibitory activities // J. Biol. Chem. 1980.–**255**.–P. 2752–2775.
18. Тиноко И., Заур К., Вэнг Д., Паглицы Д. Физическая химия. Принципы и применение в биологических науках // Техносфера.–2005.–P. 584–587.

УДК 577.217

Надійшла до редакції 21.05.07