

4. Федорова А.И. Практикум по экологии и охране окружающей среды : Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.Н. Никольская. – М.: Гуманит. изд. центр «ВЛАДОС», 2001. – 288 с.
5. Бязров Л.Г. Лишайники в экологическом мониторинге / Бязров Л.Г. – М.: Научный мир, 2002. – 336 с.

ВИДІЛЕННЯ ТА ПЕРЕВІРКА КАТАЛІТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ МУТАНТНИХ ФОРМ α -СУБОДИНИЦІ ЛЮДСЬКОГО ФАКТОРУ ЕЛОНГАЦІЇ 1В

Андрєєва О.І.

*Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка*

Науковий керівник – Шалак В.Ф., кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України

Еукаріотичний фактор елонгації трансляції 1В (eEF1B) бере участь у першому етапі елонгаційного циклу біосинтезу білка в еукаріотів. Зокрема, він забезпечує каталіз обміну гуаніннуклеотидів фактору елонгації 1 А (eEF1A) задля його участі у наступному елонгаційному циклі, адже саме активна ГТФ-форма eEF1A здатна переносити аміноацильовану тРНК до А-сайту рибосоми. Щодо структури eEF1B, то у людини даний фактор складається із 3 субодиноць – α , β та γ (F. Mansilla, 2002). Перші дві субодиноць є каталітичними, тим часом третя – є структурною, але є дані щодо її залучення у модуляцію рівня активності каталітичних субодиноць (Т. Trościuk, 2014).

eEF1B α – найменша субодиноць комплексу. У людини вона налічує 225 амінокислот та складається з двох доменів. N-кінцевий домен білка залучений до взаємодії із γ -субодиноцею фактору 1В. Тим часом С-кінцевий домен є каталітичним із активним центром, сформованим останніми амінокислотами. Зокрема вважається, що ключову роль у процесі каталізу має передостанній лізин-205 eEF1B α (за послідовністю *Saccharomyces cerevisiae*) (G. R. Andersen, 2000).

Щоб оцінити ступінь важливості С-кінцевих амінокислот eEF1B α щодо його здатності проводити каталіз було сконструйовано дві мутантні форми білка. Перша отримана мутантна форма є вкороченою та містить 1-208 амінокислоти природнього білка. Водночас, виходячи з літературних даних щодо важливості передостаннього лізину для каталітичної активності фактору eEF1B α *Saccharomyces cerevisiae*, вирішили перевірити важливість даної амінокислоти для α -субодиноць людського фактору. Тому була сконструйована її друга мутантна форма – eEF1B α (K224A), яка є повнорозмірною, але містить точкову мутацію. В результаті останньої лізин-224 був замінений на аланін.

Отже, постала мета отримати препаративні кількості наведених вище мутантних форм eEF1B α та перевірити їх каталітичну активність задля визначення ролі певних С-кінцевих амінокислот даного білка у процесі обміну гуаніннуклеотидів на факторі eEF1A. Для реалізації мети були поставлені такі завдання:

1) отримати чистий препарат вкороченого мутантного білка His-eEF1В α (1-208);

2) виділити та очистити інший мутант eEF1В α (K224A), який містить точкову мутацію (лізін-224 замінений на аланін);

3) перевірити каталітичну активність двох мутантних форм eEF1В α .

Повнорозмірний мутантний білок eEF1В α (K224A) був заклонований у вектор pGEX-6p-1 (GE Healthcare, Швеція) та експресувався злитим із GST-міткою на N-кінці у клітинах штаму BL21(DE3)pLysS (Stratagene, США) при додаванні 0,5 мМ IPTG (Carl Roth, Німеччина) протягом 3 год за 37°C. Тим часом ген мутантного білка eEF1В α (1-208) був заклонований у плазмідний вектор pET28a (Novagen, Німеччина), який забезпечує експресію цільового білка, злитим із полігістидиною міткою з N-кінця. Експресію His-eEF1В α (1-208) проводили у клітинах BL21-Gold (Agilent Technologies, США) протягом 16 годин за температури 20°C при додаванні 0,5 мМ IPTG (Carl Roth, Німеччина). Після екстракції білкові препарати чистили методом афінної хроматографії на носії Ni-NTA (Qiagen, США) для білка з His-міткою та на носії глутатіон-сефарозі (Sigma-Aldrich, США) для GST-eEF1В α (K224A). GST-мітку від білка eEF1В α (K224A) видаляли шляхом додавання до білкового препарату PreScission протеази (GE Healthcare, Швеція).

Надалі мутанти чистили методом аніонообмінної хроматографії на колонці HiTrap Q Sepharose (1 мл, GE Healthcare, Швеція). Білкову суміш елюювали у 250-450 мМ градієнті NaCl. Після цього отримані білкові препарати досліджували на наявність агрегатів за допомогою гель-фільтрації на Superose 6 HR 10/30 колонці (24 мл, GE Healthcare, Швеція). Аналіз фракцій білків проводили за допомогою денатуруючого електрофорезу в ПААГ. В результаті всіх етапів очистки було отримано 1,86 мкг білка eEF1В α (K224A) та 1,3 мкг білка His-eEF1В α (1-208), що є достатнім для проведення подальших маніпуляцій із ними задля перевірки їх активності.

Отримані очищені мутантні форми eEF1В α надалі вивчали на предмет кінетики обміну [^3H]ГДФ/ГДФ на другій ізоформі фактору елонгації 1A під час 4 незалежних експериментів для кожного мутанту. Дані оцінювались із застосуванням експоненційної функції ($y=A_1 \times \exp(-x/t_1)+y_0$) у програмі OriginPro 8 (OriginLab, США). Значення похибок були означені як стандартні відхилення.

В результаті аналізу отриманих кінетичних кривих гуаніннуклеотид обмінювальної здатності мутантних форм eEF1В α було отримано наступні значення констант швидкості реакції першого порядку: $3 \pm 0,01 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ для eEF1В α (K224A), $3 \pm 2,4 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ для His-eEF1В α (1-208) та $9 \pm 0,25 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ для eEF1В α . Значення константи для мутанта His-eEF1В α (1-208) має значну похибку, що є свідченням необхідності збільшення часу проведення експерименту. Але аналіз самої кінетичної кривої для даного мутанта вказує на низьку швидкість проходження реакції та, відповідно, на майже повну втрату каталітичної активності. Це є свідченням необхідності останніх амінокислот білка для проведення каталізу. Тим часом для eEF1В α (K224A) спостерігається уповільнення обміну майже в 2 рази у порівнянні із швидкістю обміну повнорозмірної субодиниці, що вказує на важливість передостаннього лізину для перебігу каталітичної реакції. Тим не менш, варто відзначити, що заміни лише однієї амінокислоти недостатньо для повної втрати каталітичної активності білком, що дає поштовх для пошуку інших значущих амінокислотних залишків для уточнення механізму дії eEF1В α .