



УДК 577.217.34

АФФИННАЯ МОДИФИКАЦИЯ РИБОСОМ *ESCHERICHIA COLI*
НЕГИДРОЛИЗУЕМЫМ АНАЛОГОМ GTP— γ -[4-N-(2-ХЛОРЭТИЛ)-N-МЕТИЛАМИНОБЕНЗИЛ]АМИДОМ GTP

Бабкина Г. Т., Владимиров С. Н., Карнова Г. Г.

Новосибирский институт биорганической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР

Показано, что γ -амидное производное GTP — γ -[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]амид GTP ($\text{ClRCH}_2\text{NHpppG}$) — является негидролизуемым аналогом GTP в EF-Tu-зависимой GTP-азной реакции рибосом. С помощью $\text{ClR}^{[14\text{C}]}\text{CH}_2\text{NHpppG}$ осуществлена аффинная модификация рибосом в составе комплекса 70S рибосома-poly(U)·tPНК^{Phe} (P-сайт)·Phe-tPНК^{Phe}·EF-Tu·ClR^{[14C]}}CH₂NHpppG. Модификации ClR^{[14C]}}·CH₂NHpppG в составе такого шестикомпонентного комплекса подвергаются как 50S, так и 30S субчастицы, причем степень модификации 50S субчастиц существенно превышает степень модификации 30S. Модификации подвергаются рибосомные белки L17, L21, S16, S21 в рPНК обеих субчастиц. В составе 50S субчастицы 23S рPНК модифицируется предпочтительнее, чем рибосомные белки. Сколько-нибудь заметной модификации фактора Tu в составе шестикомпонентного комплекса не обнаружено.

Одним из важнейших этапов трансляции в прокариотической клетке является EF-Tu·GTP-зависимое связывание аминоксил-тPНК в акцепторном участке рибосомы (А-участке). В настоящее время считается общепринятым, что процесс связывания в А-участке состоит по крайней мере из двух стадий. Вначале аминоксил-тPНК связывается с рибосомой в виде тройного комплекса аминоксил-тPНК·EF-Tu·GTP. В этом состоянии индуцируется гидролиз связанного с EF-Tu GTP до GDP и неорганического фосфата. Результатом гидролиза GTP является освобождение EF-Tu·GDP из рибосомы и фиксация аминоксил-тPНК в А-сайте. При замене GTP на его негидролизуемый аналог можно зарегистрировать промежуточное состояние, в котором индуцируется гидролиз GTP. Использование реакционноспособных нерасщепляемых аналогов GTP дает возможность получить информацию о локализации каталитического центра гидролиза GTP, сопровождающего EF-Tu-зависимое связывание аминоксил-тPНК в А-участке рибосомы. В настоящее время практически отсутствуют данные о структурной организации каталитического центра гидролиза GTP в EF-Tu-зависимой реакции на рибосомах и имеются лишь немногочисленные противоречивые данные по локализации каталитического центра гидролиза GTP в комплексах 70S рибосом с фактором EF-G [1, 2].

В данной работе изучена способность γ -[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламинобензил]амида GTP ($\text{ClRCH}_2\text{NHpppG}$) и его оксипроизводного γ -[4-N-(2-оксипропил)-N-метиламинобензил]амида GTP ($\text{OHRCH}_2\text{NHpppG}$) стимулировать EF-Tu-зависимое связывание аминоксил-тPНК с рибосомами и исследована аффинная модификация рибосом ClR^{[14C]}}CH₂NHpppG в составе шестикомпонентного комплекса 70S рибосома-poly(U)·tPНК^{Phe} (P-участок)·Phe-tPНК^{Phe}·EF-Tu·ClR^{[14C]}}CH₂NHpppG.

γ -Амидные аналоги GTP ($\text{ClRCH}_2\text{NHpppG}$ и $\text{OHRCH}_2\text{NHpppG}$) были получены по методу, основанному на превращении нуклеозидтрифосфатов под действием карбодимидов в высокореакционноспособные фосфорилирующие соединения — циклические замещенные триметафосфаты, из которых далее при обработке соответствующими амнами легко могут быть получены различные амиды нуклеозидтрифосфатов [3, 4].

Стимулирование аналогами GTP EF-Tu-зависимого связывания Phe-tРНК^{Phe} в шестикомпонентный комплекс рибосома-tРНК^{Phe} (Р-участок) · poly(U) · EF-Tu-аналог GTP · Phe-tРНК^{Phe}

GTP или его аналог	Связывание	
	моль [¹⁴ C]Phe-tРНК ^{Phe} на 1 моль рибосом	моль [¹⁴ C]аналога GTP на 1 моль рибосом
GTP	0,60	—
[¹⁴ C]GTP	—	0,042
CIR[¹⁴ C]CH ₂ NHpppG	—	0,66
ОНRCH ₂ NHpppG	0,58	—
GMPPCP *	0,42	—
CIR[¹⁴ C]CH ₂ NHpppG **	—	0,10

* 5'-Гуанилил-(β,γ-метилен)дифосфат.

** В присутствии 50-кратного избытка GTP по отношению к аналогу GTP.

Для EF-Tu-зависимого связывания [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с комплексом рибосома · poly(U) · tРНК^{Phe} (в Р-участке) использовали немеченый ОНРCH₂NHpppG, являющийся нереакционноспособным аналогом CIRCH₂ · NHpppG. Образовавшийся комплекс выделяли на нитроцеллюлозных фильтрах и определяли степень связывания [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с рибосомами. Из табл. 1 видно, что степень EF-Tu-зависимого связывания [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с рибосомами в присутствии ОНРCH₂NHpppG близка к степени связывания в присутствии GTP или GMPPCP (взятого в качестве контроля). Следовательно, замена GTP на γ-амидное производное GTP не сказывается на связывании [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} с рибосомами. В отдельном эксперименте проводили EF-Tu-зависимое связывание с рибосомами немеченой Phe-tРНК^{Phe}, используя CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG. Комплекс выделяли центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере 1 (см. «Экспериментальную часть»). Оказалось, что радиоактивная метка включается во фракцию рибосом, т. е. наблюдается образование шестикомпонентного комплекса, в котором γ-амидное производное GTP не гидролизует. Степень связывания CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG с рибосомами близка к степени связывания [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} в таких же условиях, в то время как в опытах с GTP степень связывания [¹⁴C]GTP с рибосомами вследствие гидролиза GTP составляет ~2% степени связывания [¹⁴C]Phe-tРНК^{Phe} (табл. 1). В присутствии 50-кратного избытка GTP степень включения ¹⁴C-радиоактивности (при использовании CIR · [¹⁴C]CH₂NHpppG и немеченой Phe-tРНК^{Phe}) во фракцию рибосом, найденная в опытах с центрифугированием соответствующей смеси (см. «Экспериментальную часть») в линейном градиенте концентрации сахарозы, уменьшается примерно в 6–7 раз, что свидетельствует о специфичности связывания γ-амидного аналога GTP с рибосомами. Следовательно, γ-амидные аналоги GTP представляют новый класс аналогов GTP, не расщепляемых в EF-Tu-зависимой GTP-азной реакции.

Присоединение ароматического остатка к γ-фосфатной группе GTP через фосфамидную связь не мешает узнаванию остатка GTP фактором EF-Tu и образованию тройного комплекса аналог GTP · EF-Tu · аминокцил-tРНК, но в то же время препятствует гидролизу GTP в сопряженной реакции связывания аминокцил-tРНК с рибосомой в А-участке. Аффинную модификацию рибосом CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG в составе комплекса рибосома · tРНК (Р-участок) · poly(U) · Phe-tРНК^{Phe} · EF-Tu · CIR[¹⁴C]CH₂NH · pppG проводили, инкубируя реакционную смесь в буфере 1 в течение 90 мин при 37° С. По окончанию инкубации шестикомпонентный комплекс отделяли от избытка несвязавшихся компонентов ультрацентрифугированием через 10% сахарозу в буфере 1. В контрольных экспериментах в реакционной смеси либо присутствовал 50-кратный избыток GTP по отношению к CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG, либо отсутствовал фактор EF-Tu. Вы-

Относительная степень модификации компонентов комплекса
рибосома · rPHK · poly(U) · EF-Tu · Phe-tPHK^{Phe} · CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG

Субчастица	Степень модификации субчастиц, моль остатков реагента на 1 моль субчастиц	Относительная степень модификации, %	
		rPHK	белки
30S	0,1	19	81
50S	0,2	63	37 *

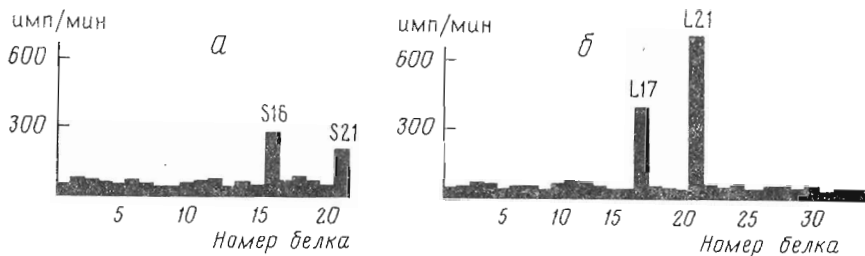
* Белки + 5S rPHK.

деленный шестикомпонентный комплекс разрушали центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в условиях диссоциации и разделения 70S рибосом на субчастицы. Распределение метки ¹⁴C между субчастицами приведено в табл. 2. Видно, что алкилирование CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG в составе шестикомпонентного комплекса приводило к модификации обеих рибосомных субчастиц, причем степень модификации 50S субчастиц была в 2 раза выше, чем для 30S. Анализ степени модификации рибосомных субчастиц показал высокую эффективность алкилирования: за 90 мин при 37° С ~70% реагента, находящегося в комплексе (с учетом степени превращения реагента (~75%) в активную промежуточную частицу [5]), ковалентно присоединялось к рибосомам.

В контрольном эксперименте, выполненном в присутствии 50-кратного избытка GTP по отношению к CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG, включения ¹⁴C-радиоактивности в рибосомы практически не наблюдалось (степень модификации 70S рибосом была менее 0,01 моль остатков реагента на 1 моль рибосом). Очевидно, что в этом случае шестикомпонентный комплекс с участием CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG не образовывался, а имело место EF-Tu · GTP-зависимое связывание Phe-tPHK^{Phe} в А-участке 70S рибосом. Степень модификации 70S рибосом в отсутствие фактора Tu также была очень низкой и составляла ~0,03 моль остатка реагента на 1 моль рибосом. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о специфичной модификации рибосом CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG в составе шестикомпонентного комплекса. Анализ степени модификации rPHK и рибосомных белков в субчастицах проводили после ультрацентрифугирования рибосомных субчастиц в градиенте концентрации сахарозы в условиях диссоциации субчастиц на rPHK и белки в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Как видно из табл. 2, в 30S субчастицах основная доля модификации (до 80%) приходилась на рибосомные белки, а в 50S субчастицах предпочтительнее модифицировалась 23S rPHK. При центрифугировании 50S субчастиц в градиенте концентрации сахарозы в присутствии SDS рибосомные белки практически не отделяются от 5S rPHK [6], поэтому 37% радиоактивности, обнаруженной во фракции белков, фактически могут относиться как к белкам, так и к 5S rPHK.

Для анализа распределения радиоактивности между белками рибосомные белки и фактор EF-Tu выделяли из шестикомпонентного комплекса по окончании алкилирования путем обработки его 67% уксусной кислотой. Для разрушения фосфамидной связи в остатках реагента, ковалентно связанных с белками, их выдерживали 1 ч в 67% уксусной кислоте при 37° С. Анализ модифицированных белков проводили двумерным электрофорезом в полиакриламидном геле.

Из диаграммы распределения радиоактивности ¹⁴C между рибосомными белками, модифицированными CIR[¹⁴C]CH₂NHpppG, видно, что метка ¹⁴C включается в белок L21 и в меньшей степени в белки L17, S16 и S21 (рисунок). Сколь угодно заметная модификация фактора EF-Tu не обнаружена. Известно, что GTP связывается с фактором Tu до его присоединения к рибосоме. Поэтому очевидно, что центр связывания GTP должен находиться на самом EF-Tu. Однако гидролиз GTP до GDP и ортофосфата происходит после присоединения тройного комплекса EF-Tu ·



Распределение метки ^{14}C между рибосомными белками 30S (а) и 50S (б) субчастиц после модификации их $\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}$ в составе шестикомпонентного комплекса

$\cdot\text{GTP}$ -аминоацил-тРНК к рибосоме. Следовательно, можно было бы полагать, что в формировании GTP -азного центра принимает участие как EF-Tu , так и рибосома. С другой стороны, в работах [7, 8] показано, что антибиотик кирромицин индуцирует собственную GTP -азную активность EF-Tu без рибосомы. На основании этих данных можно считать, что присоединение EF-Tu в составе тройного комплекса с GTP и аминокцил-тРНК к рибосоме активирует собственный GTP -азный центр EF-Tu , а сама рибосома не имеет готового GTP -азного центра. Однако результаты экспериментов с антибиотиком кирромицином не исключают того, что GTP -азный центр фактора Tu не вполне завершен и какие-то рибосомные компоненты принимают непосредственное участие в его завершении. Полученные в настоящей работе данные по аффинной модификации рибосом $\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}$ в составе шестикомпонентного комплекса рибосома $\cdot\text{poly}(\text{U})\cdot\text{тРНК}^{\text{Phe}}$ (Р-участок) $\cdot\text{EF-Tu}\cdot\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}\cdot\text{Phe-тРНК}^{\text{Phe}}$ свидетельствуют о том, что в формировании GTP -азного центра участвуют компоненты рибосомы, причем в большей степени, по-видимому, 23S РНК и белок L21. Для объяснения отсутствия модификации EF-Tu $\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}$ в составе шестикомпонентного комплекса следует обратить внимание на одну существенную особенность процесса аффинной модификации: реакционноспособные фрагменты аффинных реагентов могут вступать в реакцию лишь с ограниченным набором боковых групп белков, в случае алкилирования — только с нуклеофильными центрами. Если при образовании комплекса 70S рибосома $\cdot\text{poly}(\text{U})\cdot\text{тРНК}^{\text{Phe}}$ (Р-участок) $\cdot\text{EF-Tu}\cdot\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}\cdot\text{Phe-тРНК}^{\text{Phe}}$ группа $\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NH}$ оказалась в области расположения переакционноспособных боковых радикалов аминокислотных остатков факторного белка, то модификация EF-Tu могла не проявиться, несмотря на то что $\text{ClR}[^{14}\text{C}]\text{CH}_2\text{NHpppG}$ находился в контакте с EF-Tu .

Экспериментальная часть

Рибосомы выделены из *E. coli* MRE-600 по [9] и любезно предоставлены В. И. Махио (ЛИЯФ АН СССР, г. Гатчина). Фактор элонгации $\text{EF-Tu}\cdot\text{GDP}$ выделяли по [10], EF-Tu , свободный от GDP , получали по [11]. Аминоацилирование тРНК^{Phe} проводили по [12]. $\text{Poly}(\text{U})$, ATP и GTP — препараты фирмы Reanal (Венгрия), [^{14}C]фонилаланин (360 мКи/ммоль) — производства СССР, 5'-гуанилил-(β - γ -метилен)дифосфат (GMPPCP) — продукт фирмы Boehringer Mannheim (ФРГ). 4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино[^{14}C]бензиламин (25 мКи/ммоль) получен по [13, 14]. γ -[4-N-(2-хлорэтил)-N-метиламино][^{14}C]бензиламид GTP и его оксипроизводное (25 мКи/ммоль) синтезированы по [3, 4].

Связывание Phe-тРНК^{Phe} с рибосомами в присутствии GTP или аналогов GTP. Смесь, содержащую 12 пмоль 70S рибосом, 0,4 OE_{260} $\text{poly}(\text{U})$, 0,5 OE_{260} тРНК в 60 мкл буфера 1 (50 мМ трис- HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl_2 , 150 мМ NH_4Cl , 12 мМ β -меркаптоэтанол или 5 мМ дитиотреит), инкубировали 15 мин при 30° С, затем к смеси добавляли тройной комплекс (120 пмоль EF-Tu , 40 пмоль $\text{Phe-тРНК}^{\text{Phe}}$, 1500 пмоль GTP или аналога GTP в 50 мкл буфера 1), предварительно выдержанный при 0° С в течение 10 мин. После инкубации в течение 15 мин при 25° С реакционную смесь разбавляли 3 мл холодного буфера, содержащего 50 мМ трис- HCl (pH 7,5), 50 мМ NH_4Cl , 10 мМ MgCl_2 , немедленно фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр, промывая 3 раза по 3 мл тем же буфером, и высушивали. Радиоактивность считали в толуольном сцинтиляторе на счетчике Mark-3 (Nuclear Chicago, США). Этот

метод анализа применяли тогда, когда использовали [^{14}C]Phe-тРНК^{Phe} и немеченые ГТР и аналог ГТР или [^{14}C]ГТР и немеченую Phe-тРНК^{Phe}. В случае радиоактивного γ -амидного аналога ГТР и немеченой Phe-тРНК^{Phe} (реакционная смесь в 100 мкл буфера 1 содержала 48 пмоль рибосом и соответствующие количества остальных компонентов) комплексы выделяли центрифугированием в линейном градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере 1 (центрифуга Spinco L8-75M, Beckman, США, ротор SW-40; 17 ч, 26 000 об/мин, 4° С). По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали по 0,7 мл и измеряли оптическую плотность и радиоактивность в каждой фракции.

Аффинная модификация в составе комплекса рибосома-poly(U)-тРНК (в Р-участке) Phe-тРНК^{Phe}-EF-Tu-CIR[^{14}C]CH₂NHpppG. Шестикомпонентный комплекс получали как описано выше. Затем реакционную смесь, содержащую 7,35 нмоль рибосом, 294 ОЕ₂₆₀ poly(U), 376 ОЕ₂₆₀ тРНК, 16,5 нмоль EF-Tu, 11 нмоль Phe-тРНК^{Phe} и 730 нмоль CIR[^{14}C]CH₂NHpppG в буфере 1 (объем 10 мл), инкубировали 90 мин при 37° С. В опыте по ингибированию алкилирования рибосом реакционная смесь в объеме 1,7 мл содержала дополнительно 50-кратный избыток ГТР по отношению к реагенту, который был добавлен к комплексу рибосома-poly(U)-тРНК (в Р-участке) в виде смеси EF-Tu, Phe-тРНК^{Phe}, ГТР, CIR[^{14}C]CH₂NHpppG, предварительно выдержанной 10 мин при 0° С. В контрольном опыте (без добавления EF-Tu) смесь 240 пмоль 70S рибосом, 7 ОЕ₂₆₀ poly(U) и 10 ОЕ₂₆₀ в 500 мкл буфера 1 выдерживали 15 мин при 30° С, а затем добавляли к ней 9800 пмоль CIR[^{14}C]CH₂NHpppG и инкубировали 90 мин при 37° С. Рибосомные комплексы после модификации осаждали из реакционной смеси ультрацентрифугированием на центрифуге VAC-600 (ГДР) в течение 7 ч в буфере 1 с 10% сахарозой [15] (ротор 8×35, 38 000 об/мин при 4° С).

Степень модификации рибосомных субчастиц анализировали центрифугированием рибосом в условиях диссоциации на субчастицы [16] в градиенте концентрации сахарозы (10–30%) в буфере 2 (20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 0,5 мМ MgCl₂, 0,2 М NH₄Cl, 2 мМ β -меркаптоэтанол) на центрифуге Spinco L8-75M (ротор SW-27; 23 000 об/мин, 17 ч, 4° С). По окончании центрифугирования содержимое пробирок фракционировали как описано выше, во фракциях просчитывали радиоактивность. К фракциям субчастиц добавляли 2 М MgCl₂ до концентрации 20 мМ и субчастицы осаждали 0,7 объема холодного этанола. Осадки отделяли центрифугированием и растворяли в 100 мкл буфера 3, содержащего 1% SDS, 2 мМ β -меркаптоэтанол, 25 мМ трис-НСl, рН 7.5.

Анализ относительной степени модификации рРНК и белков рибосомных субчастиц проводили по [6]. Растворы субчастиц в буфере 3 (100 мкл) наслаивали на градиент концентрации сахарозы (5–20%) в буфере 4, содержащем 0,1% SDS, 2 мМ EDTA, 6 мМ β -меркаптоэтанол, 25 мМ трис-НСl (рН 7.5), и центрифугировали 17 ч при 4° С на центрифуге Spinco L8-75 (ротор SW-40; 36 000 об/мин). После окончания центрифугирования содержимое пробирок фракционировали как описано выше.

Рибосомные белки и фактор EF-Tu выделяли непосредственно из шестикомпонентного комплекса (после модификации CIR[^{14}C]CH₂NHpppG) обработкой его 67% уксусной кислотой. Белковый материал выдерживали 1 ч в 67% уксусной кислоте при 37° С для гидролиза фосфамидной связи в остатках реагента, ковалентно связанных с белками. Анализ рибосомных белков и фактора EF-Tu проводили двумерным гелем-электрофорезом по [16]. В контрольном эксперименте определяли положение на электрофореграмме фактора EF-Tu. Для этого осуществляли электрофорез смеси немодифицированных 70S рибосомных белков, содержащей EF-Tu.

ЛИТЕРАТУРА

1. Girshovich A. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. // Eur. J. Biochem. 1976. V. 69. № 2. P. 321–328.
2. Maasen J. A., Moller W. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 8. P. 2777–2783.
3. Бабкина Г. Т., Зарытова В. Ф., Кнорре Д. Г. // Биоорг. химия. 1975. Т. 1. № 5. С. 611–615.
4. Babkina G. T., Jonak J., Rychlik I. // Biochem. et biophys. acta. 1982. V. 698. № 1. P. 116–127.
5. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тугеева Н. Г., Чумилова Т. А. // Бисорган. химия. 1977. Т. 3. № 2. С. 210–214.
6. Vladimirov S. N., Graifer D. M., Karpova G. G. // FEBS Lett. 1981. V. 135. № 1. P. 155–158.
7. Chinali G., Wolf H., Parmeggiani A. // Eur. J. Biochem. 1977. V. 75. № 1. P. 55–65.
8. Sander G. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 6. P. 865–870.
9. Krilov S. V., Makhno V. I., Semenov Yu. P. // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. № 1. P. 183–196.
10. Arai K. I., Kawakita M., Kaziro Y. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 21. P. 7029–7037.
11. Kruse T. A., Siboska G. E., Clark B. F. C. // Biochimie. 1982. V. 64. № 4. P. 279–284.
12. Babkina G. T., Graifer D. M., Karpova G. G., Matasova N. B. // FEBS Lett. 1983. V. 153. № 2. P. 303–306.
13. Великова А. М., Вахрушева Т. Е., Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г., Курбатов В. А. // Молекулярн. биология. 1969. Т. 3. Вып. 2. С. 210–219.
14. Богачев В. С., Веньямина А. Г., Гринева Н. И., Ломакина Т. С. // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1970. Вып. 6. С. 110–116.

15. Бабкина Г. Т., Карпова Г. Г., Марасова Н. Б. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 18. Вып. 5. С. 1287—1296.
16. Gimautdinova O. I., Karpova G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. // Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. № 14. P. 3465—3481.

Поступила в редакцию
16.XII.1986

После доработки
22.VI.1987

AFFINITY LABELLING OF THE *ESCHERICHIA COLI* RIBOSOMES
WITH AN UNHYDROLISABLE GTP ANALOGUE — GUANOSINE
5'-TRIPHOSPHATE γ -[4-N-(2-CHLOROETHYL)-N-METHYLAMINO BENZYL]-
AMIDE

BABKINA G. T., VLADIMIROV S. N., KARPOVA G. G.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Substituted γ -amides of GTP viz. GTP γ -[4-N-(2-chloro- and γ -[4-N-(2-hydroxyethyl)-N-methylaminobenzyl]amide (ClRCH₂NHpppG and OHRCH₂NHpppG, resp.) were shown to be unhydrolyzable GTP analogues in the EF-Tu-dependent GTP-ase reaction of ribosomes. The reactive analogue, ClRCH₂NHpppG, was used for affinity labelling within the 70S ribosome-poly(U)·tRNA^{Phe}(P-site)·Phe-tRNA^{Phe}·EF-Tu·ClR[¹⁴C]CH₂·NHpppG complex. Both 50S and 30S subunits were thus labelled but 50S subunit was modified considerably more than 30S subunit. Labelled were proteins L17, L21, S16, S21, and rRNA of both subunits, 23C rRNA within 50C subunit being labelled preferentially as compared with 50C proteins. No labelling of EF-Tu within the complex was detected.