



УДК 547.963.4'441.057:577.112.4

© 1992 г. И. А. Климова, Ю. Б. Алахов

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП
В ФАКТОРАХ ЭЛОНГАЦИИ EF-G МЕЗО- И ТЕРМОФИЛЬНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ

Институт белка РАН, Пушкино Московской обл.

В нативных и денатурирующих условиях проведены реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой и *n*-хлормеркурибензоатом факторов элонгации G из мезофильных бактерий *E. coli* и термофильных микроорганизмов *Thermus thermophilus* HB8 (TEF-G) и *T. thermophilus* VK (VKTEF-G). Разработан упрощенный метод выделения триптических фрагментов термофильных факторов элонгации TEF-G и VKTEF-G с *M* 75, 43 и 26 кДа, предусматривающий использование гель-фильтрации на колонке с ультрогелем АСА-44. Титрование сульфидрильными реагентами пептидов, устойчивых к дальнейшему действию трипсина, позволило локализовать единственную SH-группу в N-концевом участке молекулы термофильного EF-G (как TEF-G, так и VKTEF-G). Единственный остаток Cys располагается в N-концевых фрагментах с *M* 75 и 43 кДа. Исследование доступности сульфидрильных групп модифицирующим реагентом, а также изучение реакционной способности тиольных остатков рассматриваемых мезо- и термофильных белков и их пептидов позволили сделать вывод, что молекулы EF-G из термофильных микроорганизмов обладают большей компактностью и более тесным взаимодействием доменов в составе целой молекулы в интервале 20–30°С по сравнению с EF-G из *E. coli*.

Общими свойствами термофильных белков являются высокая термостабильность, устойчивость к протеиназам и денатурирующим агентам, низкое содержание остатков Cys [1–5]. Предполагают, что уменьшение количества сульфидрильных групп в термофильных белках обусловлено высокой реакционной способностью цистеина при повышенных температурах [5–8]. Так, например, TEF-Tu из *Thermus thermophilus* HB8 имеет только одну SH-группу по сравнению с тремя тиольными группами в факторах элонгации Tu из *E. coli* и *Bacillus stercorophilus* [1–4]. В отличие от изопропилмалатдегидрогеназы из *E. coli*, которая содержит 8 остатков Cys, в аналогичном ферменте из *T. thermophilus* HB8 сульфидрильные группы вообще не были найдены [6].

Свойства и функции цистеиновых остатков в полипептидной цепи фактора элонгации G из *E. coli* (EF-G) были ранее исследованы при титровании белка *n*-хлормеркури[¹⁴C]бензоатом (CMB), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной) кислотой (DTNB), *N*-этилмаленимидом [9, 10]. EF-G содержит три тиольные группы на 1 моль белка, одна из которых экспонирована в N-концевом участке молекулы и реактивна в нативных условиях [9, 11]. Две другие группы неактивны и титруются только при полной денатурации белка [9, 12]. Реактивная SH-группа EF-G не участвует во взаимодействии с гуаниловыми нуклеотидами, но существенна для связывания с рибосомой [9, 12].

Известно, что фактор элонгации G из экстремальных термофилов, *T. thermophilus* HB8 (TEF-G), также содержит экспонированную сульфидрильную группу [13, 14]. Аналогично наблюдаемому для EF-G моди-

Сокращения: EF-G, EF-Tu – факторы элонгации биосинтеза белка; CMB – *n*-хлормеркурибензоат; DTNB – 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная) кислота.

фикация SH-группы в TEF-G приводит к ингибированию взаимодействия белка с рибосомой [13]. Однако скорости модификации этой тиольной группы различными сульфгидрильными реагентами в обоих белках сильно различаются. Так, было показано, что N-этилmaleимид не модифицирует (в отличие от EF-G из *E. coli*) термофильный фактор при 30°С, но взаимодействует с ним при 60°С с ингибированием образования тройственного комплекса TEF-G-GTP-рибосома и GTP-азной реакции [14]. Цель настоящей работы заключается в сравнительном изучении реакционной способности SH-групп EF-G из мезофильных (*E. coli*) и двух термофильных микроорганизмов (*T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK).

1. Некоторые характерные черты штаммов *T. thermophilus*

Исторически сложилось, что наиболее полно изученным является фактор элонгации G из *E. coli* [10, 15–19].

Первоначально объектом исследований у термофильных бактерий был фактор элонгации G из *T. thermophilus* HB8, выделению, очистке и некоторым физико-химическим характеристикам которого посвящен ряд прекрасных обзоров [13, 14, 20, 21]. Мы в процессе работ с *T. thermophilus* обнаружили, что получаемая нами биомасса принадлежит другому родственному штамму. Предварительно штамм озаглавлен как *T. thermophilus* VK. Сотрудниками группы препаративной биохимии белков и группы структуры рибосомы Института белка АН СССР, а также японскими коллегами из Института технологии (Токио) были проведены микробиологические, генетические и биохимические исследования, которые позволили установить, что рассматриваемые штаммы *T. thermophilus* близки по своим культуральным, генетическим и физиолого-биохимическим свойствам, но имеют ряд существенных отличительных особенностей.

Анализ *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK микробиологическим тестом (рост на богатой и бедной среде с различными концентрациями NaCl и при различных температурах (75 и 80°С)) показал, что все культуральные и физиологические характеристики термофильных штаммов практически совпадают (неопубликованные данные С. В. Тищенко, Институт белка РАН, группа структуры рибосомы).

Рост штамма *T. thermophilus* HB8 на жидкой питательной среде характеризуется умеренным помутнением с образованием рыхлой, гладкой пленки, имеющей значительное сродство к стеклянным поверхностям. Штамм *T. thermophilus* HB8 содержит две кристические плазмиды: pTT8 (~6 МДа) и pVV8 (~47 МДа) [22]. Видимая агрегация клеток штамма *T. thermophilus* HB8 связана с наличием большой плазмиды pVV8. Потеря этой плазмиды приводит к потере способности агрегации [22]. Данное явление названо плазмидо-ассоциированной агрегацией в *T. thermophilus* HB8 [22].

Для штамма *T. thermophilus* VK не характерна плазмидо-ассоциированная агрегация. Генетическим анализом установлено, что термофил *T. thermophilus* VK вообще не содержит плазмид — ни pTT8, ни pVV8. По микробиологическим, генетическим и физиологическим параметрам изучаемый микроорганизм близок к штамму *T. thermophilus* 07 (pTT8⁺, pVV8⁺) (производное от *T. thermophilus* HB8) либо к лейцинауксотрофному штамму *T. thermophilus* BPL7 (pTT8⁺, pVV8⁺, Leu⁺) (ICR-191 — мутагенетическое производное BPL7) [22].

Методом полиаминного анализа показано (личное сообщение проф. I. Oshima, Tokyo Institute of Technology, Department of Life Science), что *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK не содержат и в состав полиаминов являются полными аналогами.

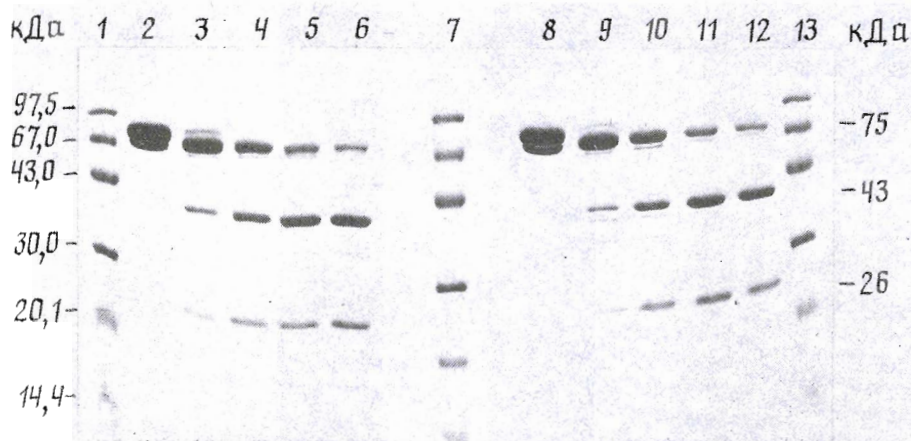


Рис. 1. Электрофоретический анализ в ПААГ в присутствии SDS продуктов триптического гидролиза через 0 (2, 8), 10 (3, 9), 30 (4, 10), 60 (5, 11), 180 мин (6, 12) VKTEF-G (2-6) и TEF-G (8-12). 1, 7, 13 - смесь стандартных белков: по убыванию молекулярных масс - фосфоорилаза, сывороточный альбумин, овальбумин, карбоангидраза, соевый ингибитор трипсина, α -лактальбумин. Цифры справа характеризуют молекулярные массы получаемых фрагментов, определяемые по Леммли [27]

Установлено, что ДНК *T. thermophilus* VK отличается от ДНК штамма *T. thermophilus* HB8 по содержанию G+C-пар на 15% (неопубликованные данные М. М. Юсупова, Институт белка РАН, группа структуры рибосомы).

Кроме того, рассматриваемые штаммы имеют различающийся рестрикционный набор эндонуклеаз (личное сообщение В. М. Крамарова, Центр молекулярной диагностики и лечения МЗ РФ).

2. Ограниченный протеолиз термофильных EF-G и выделение триптических фрагментов

На близкое родство *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK указывают идентичные условия выделения и очистки термофильных факторов элонгации EF-G, а также абсолютное сходство путей ограниченного трипсинолиза обоих белков и получении их триптических пептидов. TEF-G и VKTEF-G выделены в гомогенном состоянии с помощью высокоэффективной иммуноаффинной хроматографии. Общий путь выделения представлен в работе [23].

Ограниченный триптический гидролиз обоих EF-G проводили в условиях дестабилизации мочевиной, описанных в работе [23]. Полученные результаты ясно указывают на сходство конформаций исследуемых термофильных EF-G. Из кинетических данных трипсинолиза (рис. 1) видно, что первоначальным актом является быстрое образование фрагмента с M 75 кДа, который далее распадается на два фрагмента с M 43 и 26 кДа, по своим молекулярным массам близкие к фрагментам T_2 и T_3 трипсинолиза EF-G на *E. coli* [11].

Для разделения смеси фрагментов ограниченного трипсинолиза наиболее удачным оказалось использование хроматографии на колонке с ультрогелем АсА-44. При этом удалось разделить все три фрагмента с M 75, 43 и 26 кДа и выделить их в электрофоретически гомогенном виде (рис. 2, 3). Условия выделения всех трех фрагментов идентичны для обоих EF-G.

Таким образом, ограниченный трипсинолиз EF-G, дестабилизированного мочевиной, приводит к фрагментам, несущим функциональную нагрузку, идентичную функциям фрагментов ограниченного трипсинолиза

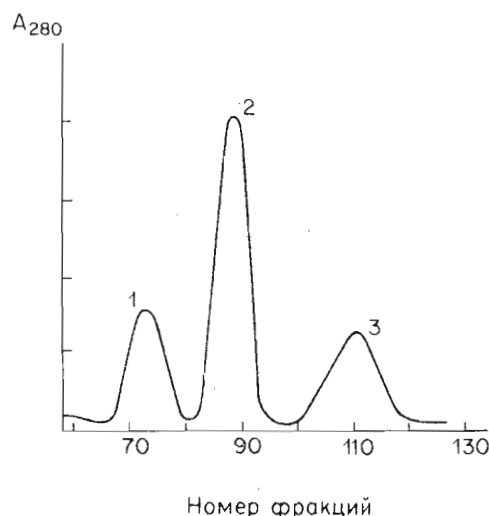


Рис. 2. Хроматография смеси фрагментов, полученной после триптического гидролиза TEF-G, на колонке (2,6×270 см) с ультогелем AcA-44, уравновешенным 20 мМ К-Na-фосфатным буфером, содержащим 50 мМ KCl, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,02% NaN₃, со скоростью элюции 35 мл/ч. Объем фракции 8 мл. Пики 1–3 соответствуют фрагментам с *M* 75, 43 и 26 кДа

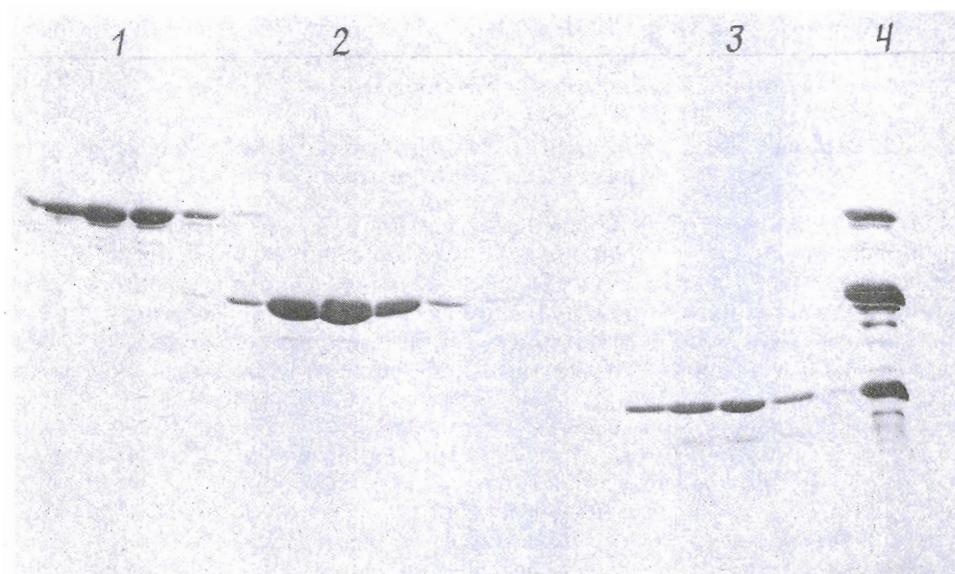


Рис. 3. Электрофоретический анализ в ПААГ в присутствии SDS продуктов хроматографического разделения фрагментов ограниченного трипсинолиза TEF-G. 1–3 – см. рис. 2; 4 – смесь фрагментов ограниченного трипсинолиза TEF-G. (Время трипсинолиза 180 мин)

EF-G из *E. coli* [23]. Известно, что полипептидная цепь термофильного EF-G имеет доменное строение, сходное со строением EF-G из *E. coli* [23, 24].

Для внесения большей ясности в понимание различий и сходств белков-аналогов факторов элонгации G из *E. coli* и двух штаммов *T. thermo-*

philus мы провели титрование как целых белков, так и их триптических фрагментов с помощью СМВ и DTNB.

3. Реакционная способность сульфгидрильных групп в факторах элонгации EF-G

В работе [14] приведены данные аминокислотного анализа фактора элонгации G из *T. thermophilus* HB8, согласно которым молекула TEF-G содержит один остаток цистеина. Кроме того, авторами показано, что в 8 М гуанидингидрохлориде в термофильном EF-G с помощью [¹⁴C]СМВ титруется только одна тиольная группа, а после восстановления (расщепления дисульфидной связи) сульфитом натрия — еще около двух. На этом основании авторы делают вывод о наличии в белке одной дисульфидной связи. Как опубликовано в работе [23], мы модифицировали с помощью СМВ в различных денатурирующих условиях (6 М гуанидингидрохлориде, 8 М мочевины, 0,2% SDS) факторы, а также эти белки после обработки различными восстанавливающими реагентами: 2-меркаптоэтанолом, сульфитом натрия и дитионитом натрия. Нами было установлено, что после восстановления белков количество модифицируемых тиольных групп не увеличивается и остается равным трем [23]. Это свидетельствует, с одной стороны, об отсутствии в молекуле фактора элонгации дисульфидной связи, а с другой — о трех SH-группах на 1 моль белка.

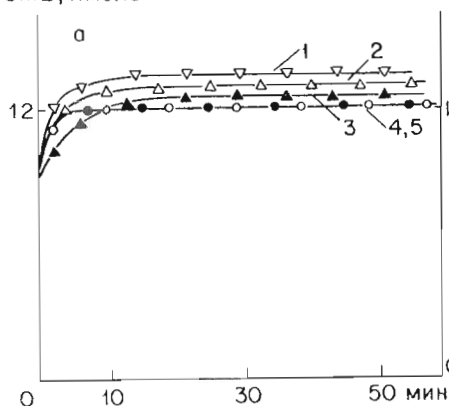
Однако многочисленные свидетельства пониженного количества тиольных групп в белках термофильных бактерий [1–8], и прежде всего *T. thermophilus* HB8 [3, 4, 6], наличие одного остатка Cys в недавно опубликованной первичной структуре фактора элонгации G из *T. thermophilus* HB8 [24] и, с другой стороны, достоверные факты об избыточном титровании SH-групп белков при работе с *n*-меркурибензоатами [20, 23, 25, 26] привели нас к необходимости постановки повторных экспериментов по химической модификации сульфгидрильными реагентами термофильных и мезофильных EF-G (штаммов *T. thermophilus* HB8, *T. thermophilus* VK и *E. coli*).

Факторы элонгации EF-G из *E. coli*, TEF-G из *T. thermophilus* HB8 и VKTEF-G из *T. thermophilus* VK содержат по одной модифицируемой с помощью СМВ тиольной группе. Данная SH-группа является высокореакционноспособной (для всех факторов модификация завершается за 1–1,5 мин) (рис. 4а, кривые 1–3). Следует подчеркнуть, что термофильные факторы элонгации в тех же самых нативных условиях модифицируются подоацетамидом, подоацетатом, *N*-этилмалеимидом, дитиодипиридином [16, 20] и DTNB (рис. 5а, кривые 2, 3) с низкой эффективностью (не более 0,3 SH-групп).

При денатурации TEF-G и VKTEF-G 6 М гуанидингидрохлоридом (или 8 М мочевиной) как в одном, так и в другом факторе G с помощью СМВ также титруется по одной тиольной группе на 1 моль белка, что позволяет сделать вывод о наличии в обоих термофильных факторах EF-G одной SH-группы.

В присутствии 6 М гуанидингидрохлорида (или 8 М мочевины) в EF-G из *E. coli* СМВ модифицирует три сульфгидрильные группы (рис. 4б, кривая 1). Аналогичные данные получены при модификации фактора G из *E. coli* с помощью DTNB в присутствии различных денатурирующих агентов (рис. 5б, кривая 4). Результаты спектрофотометрического титрования TEF-G и VKTEF-G в 6 М GuHCl (или 8 М мочевины) с помощью DTNB показали, что степень модификации этим реагентом как в нативных (рис. 5а, кривые 2, 3), так и в денатурирующих условиях (рис. 5б, кривые 5, 6) низка. Предполагается, что единственный остаток Cys EF-G из *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK частично экранирован, ви-

СМВ, нмоль



СМВ, нмоль

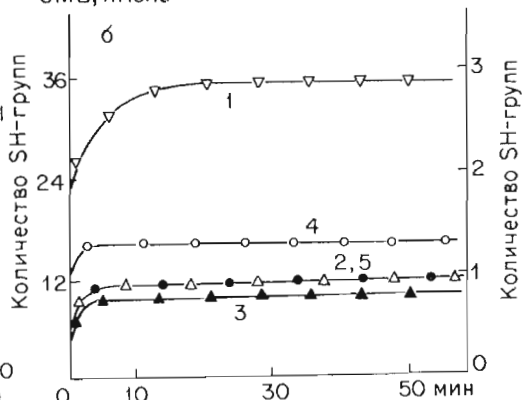
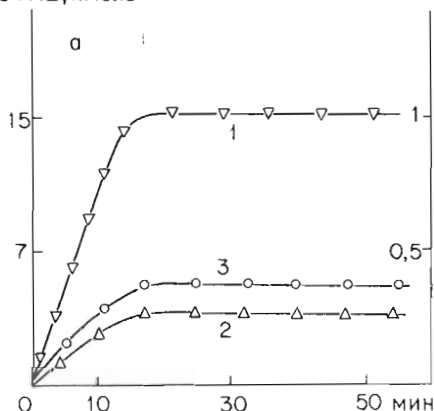


Рис. 4. Кривые спектрофотометрического титрования EF-G и его триптического фрагмента с M 75 кДа с помощью СМВ в нативных (а) и денатурирующих условиях (6 М GuHCl) (б): EF-G (1); TEF-G (2); VKTEF-G (3); 75-кДа фрагмент TEF-G (4) и VKTEF-G (5). Условия: 50 мМ К-фосфат, pH 7,2

DTNB, нмоль



DTNB, нмоль

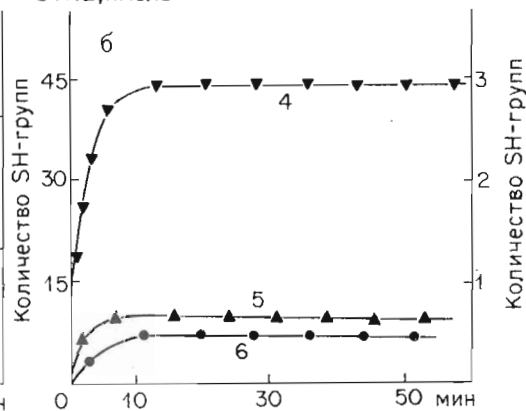


Рис. 5. Кинетика модификации факторов элонгации EF-G (1), TEF-G (2) и VKTEF-G (3) с помощью DTNB в нативных (а) и денатурирующих условиях (6 М GuHCl) (б). Условия (а): 20 мМ трис-HCl, pH 8,0-8,1; 1 мМ Na_2EDTA

ду компактности термобильных молекул, и поэтому остается малодоступным в реакции с DTNB.

Аналогично целым молекулам термобильных факторов EF-G DTNB в нативных и денатурирующих условиях практически не модифицирует триптический фрагмент с M 75 кДа TEF-G (рис. 6, кривые 1, 3). Известно [13, 14, 21], что фрагмент с M 75 кДа образуется в результате отщепления 10-15 аминокислотных остатков от N-конца полипептидной цепи TEF-G. Этот полипептид обладает способностью G-фактора к несвязанной GTP-азной реакции и к стимуляции синтеза полифенилаланина на рибосомах с poly(U) в качестве матрицы, по-видимому, вследствие сохранения необходимой конформации для функционирования [13, 14, 21].

Существуют определенные различия в титровании с помощью DTNB (как в нативных, так и в денатурирующих условиях) фрагмента с M 75 кДа из *T. thermophilus* VK и его аналога из *T. thermophilus* HB8 (рис. 6, кривые 2, 4). Если при модификации DTNB фрагмента TEF-G с

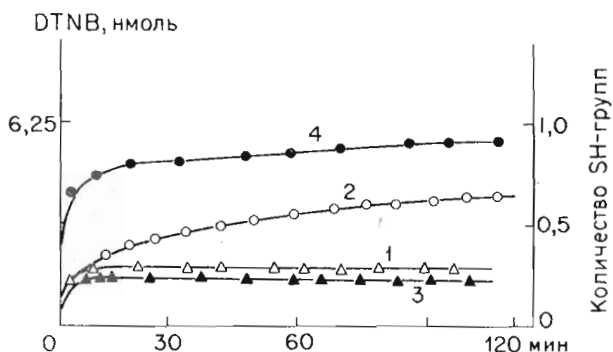


Рис. 6. Кривые спектрофотометрического титрования с помощью DTNB фрагмента с M 75 кДа TEF-G (1, 3) и VKTEF-G (2, 4) в нативных (1, 2) и денатурирующих условиях (3, 4). Условия как на рис. 5

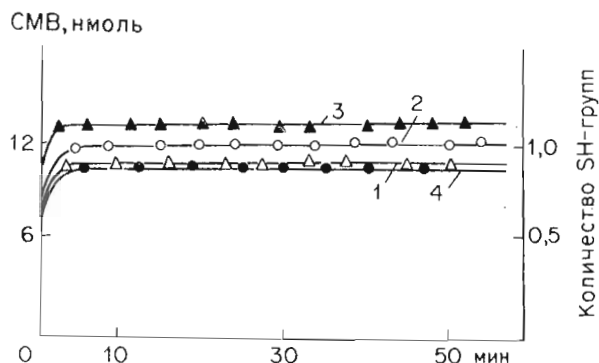


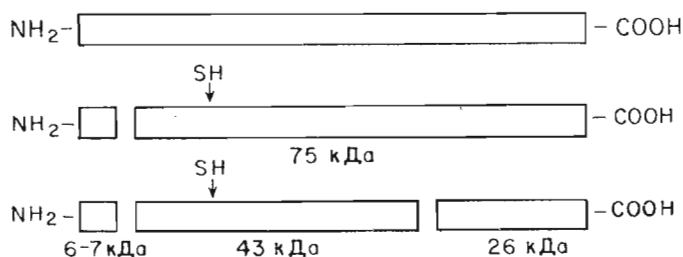
Рис. 7. Кинетика модификации триптического фрагмента с M 43 кДа TEF-G (1, 3) и VKTEF-G (2, 4) с помощью CMV в нативных (1, 2) и денатурирующих условиях (3, 4). Нативные условия: 50 мМ К-фосфат, pH 7,2

M 75 кДа в нативном состоянии, как и в случае целой молекулы, титруется $\sim 0,3$ SH-группы на 1 моль пептида (рис. 6, кривая 1), то у аналогичного фрагмента VKTEF-G при тех же условиях модифицируется 0,6 SH-группы на 1 моль фрагмента (рис. 6, кривая 2). При денатурации структуры 6 М гуанидингидрохлоридом (или 8 М мочевиной) для фрагмента с M 75 кДа из *T. thermophilus* HB8 картина практически не меняется (рис. 6, кривая 3), тогда как в случае такого же фрагмента из *T. thermophilus* VK модификация заканчивается через 2 ч, при этом титруется 0,8–1,0 SH-группы на 1 моль фрагмента (рис. 6, кривая 4). Полученные данные позволяют предположить, что EF-G из *T. thermophilus* HB8 обладает более компактной структурой белка, чем его аналог из *T. thermophilus* VK.

При титровании *n*-хлормеркурибензоатом триптических фрагментов TEF-G и VKTEF-G с M 43 кДа (см. рис. 7) обнаружилось, что единственный остаток Cys термофильных факторов элонгации G находится на этих фрагментах. Это позволило определить положение SH-группы в полипептидной цепи исследуемых белков (см. схему). Кривые титрования фрагментов-аналогов с помощью CMV идентичны (см. рис. 7).

Результаты модификации триптических фрагментов с M 43 кДа обоих термофильных факторов как в нативном, так и в денатурированном состоянии DTNB (рис. 8) сходны с титрованием с помощью этого реагента целых факторов элонгации G (рис. 5а, б) и их фрагментов с

TEF-G (или VKTEF-G)



Расположение фрагментов ограниченного трипсинолиза и локализация SH-группы по полипептидной цепи фактора элонгации G из *T. thermophilus*

M 75 кДа (рис. 6). Ограниченная доступность SH-групп во фрагментах с *M* 43 кДа к реакции с DTNB можно объяснить особенностями организации целых молекул EF-G. Для фактора элонгации G из *E. coli* методами КД и микрокалориметрии было показано, что соответствующие фрагменты сохраняют компактную структуру в составе целой молекулы и существуют в виде независимых структурных единиц или доменов [17]. Сходные данные получены и для EF-G из *T. thermophilus* HB8 (И. А. Раппаров, В. В. Филимонов, С. Ю. Вепьяминов, неопубликованные данные).

Исследование кинетики модификации фрагмента с *M* 43 кДа из *T. thermophilus* VK и его аналога из *T. thermophilus* HB8 (рис. 8) с помощью DTNB подтверждает ранее сделанный вывод о меньшей компактности молекулы VKTEF-G по сравнению с молекулой TEF-G.

Таким образом, учитывая данные по модификации сульфгидрильными реагентами, можно утверждать, что факторы элонгации G из штаммов *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK по основным физико-химическим характеристикам близки к EF-G из *E. coli* и имеют аналогичную организацию. Более высокая устойчивость к действию протеиназ и модифицирующим агентам в интервале температур 20–30°С обусловлена, по-видимому, большей компактностью и жесткостью как всей молекулы, так и составляющих ее доменов.

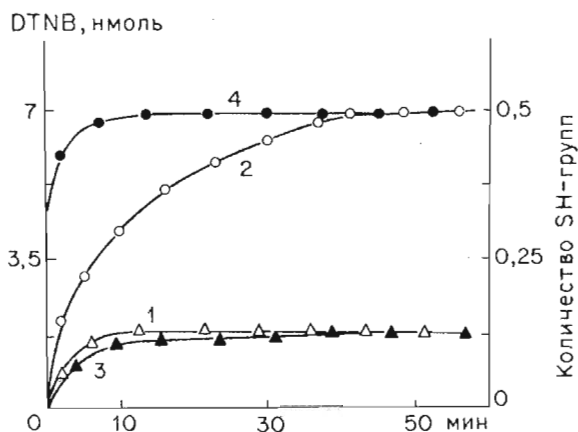


Рис. 8. Кривые спектрофотометрического титрования с помощью DTNB триптического фрагмента с *M* 43 кДа TEF-G (1, 3) и VKTEF-G (2, 4) в нативных (1, 2) и денатурирующих условиях (3, 4). Условия как на рис. 5

Экспериментальная часть

В работе использованы [^{14}C]GTP, [^3H]GTP (Amersham, Англия), *n*-хлормеркурибензоат (СМВ) (Calbiochem, США), 5,5'-дитиобис(2-нитробензоат) (DTNB) (Merck, ФРГ), додецилсульфат натрия (SDS) (Serva, ФРГ), гуанидингидрохлорид (GuHCl) (Fluka, Швейцария), мочевины (Serva, ФРГ), сефадекс G-25, сефароза DEAE CL-6B (Pharmacia, Швеция), ультрагель HA, ультрагель AcA-44 (LKB, Швеция), трисин (Serva, ФРГ). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Клетки *T. thermophilus* HB8 и *T. thermophilus* VK были выращены при 75°С, собраны на $1/2$ логарифмической фазы роста и хранились в замороженном состоянии при -20°С.

Гомогенный препарат EF-G из *E. coli* получали от НПО «Биолар», (г. Олайне, Латвия).

Для выделения термofilных факторов элонгации G была использована методика, опубликованная в работе [23].

Ограниченный триптический гидролиз TEF-G, VKTEF-G и разделение фрагментов триптического гидролиза проводили в условиях, описанных в работе [23], с некоторыми модификациями. Для препаративного получения фрагментов ограниченного трипсинолиза к раствору белка (2 мг/мл) в буфере, содержащем 0,1 М трис-HCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 3 М мочевины, pH 8,1, добавляли раствор трипсина в воде (1 мг/мл) в соотношении 1:35 (по весу) и смесь инкубировали 3 ч при 37°С. Реакцию останавливали добавлением раствора соевого ингибитора (1:1,5), после чего смесь хроматографировали на колонке (2,6×270 см) с ультрагелем AcA-44 (рис. 1). Собранные фракции анализировали с помощью электрофореза в ПААГ по Леммли [27].

Концентрации EF-G и его фрагментов измеряли спектрофотометрически, используя величины удельного поглощения при 280 нм ($A_{1\text{ см}}^{0,1\%}$) для EF-G, фрагментов с *M* 75, 43 и 26 кДа, равные 0,84, 0,8, 0,95 и 0,58 соответственно.

Для титрования сульфгидрильных групп EF-G и триптических фрагментов в качестве модифицирующих агентов использовали DTNB [28] и СМВ [29]. Реакционную способность SH-групп определяли, снимая кинетическую зависимость хода модификации при 10-кратном избытке реагента. При определении общего количества тиольных групп и измерении их доступности титрование проводили в присутствии 8 М мочевины или 6 М гуанидингидрохлорида. Титрование SH-групп DTNB осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl, 1 мМ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH 8,1, а реакции с СМВ — в 50 мМ К-фосфате, pH 7,2. Общий объем реакционной смеси во всех случаях равен 400 мкл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amelunxen R. E., Muddock R. // Microbial Life in Extreme Environments / Ed. Kasher D. I. N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 217-278.
2. Argos P., Rossmann M. G., Grau U., Zuber H., Frank G., Tratschin I. D. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 25. P. 5698-5703.
3. Seidler C., Peter M., Meissner F., Sprinzl M. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 22. P. 9263-9277.
4. Kaziro A., Shimizu M., Tomita K. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 170. № 1/2. P. 93-98.
5. Friedman S. M. // Biochemistry of Thermophily / Ed. Friedman S. M. N. Y.: Acad. Press, 1978.
6. Kagawa Y., Nojima H., Nukiwa N., Ishizuka M., Nakajama T., Yasuhara T., Tanaka T., Oshima T. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 5. P. 2956-2960.
7. Kasher D. I. // Microbial Life in Extreme Environments / Ed. Kasher D. I. N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 216.
8. Brock Th. D. // Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures / Ed. Brock Th. D. N. Y.: Acad. Press, 1978. P. 72.

9. Arai N., Arai K., Nakamura Sh., Kaziro Y. // Biochemistry (Tokyo). 1977. V. 82. № 3. P. 1029-1046.
10. Rochrbach M. S., Bodley J. W. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 4. P. 930-933.
11. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревич О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. // Биоорган. химия. 1977. Т. 3. № 10. С. 1333-1344.
12. Kaziro Y. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 505. № 1. P. 95-127.
13. Arai K., Ota Y., Arai N., Nakamura Sh., Henneke C., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 509-519.
14. Arai K., Arai N., Nakamura Sh., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 521-531.
15. Kaziro Y., Ione-Yokosawa N., Kawakita M. // Biochemistry. 1972. V. 72. № 4. P. 853-863.
16. Hishinema F., Tanata T., Sakuchi K. // J. Gen. Microbiol. 1978. V. 104. P. 193-199.
17. Alakhov Yu. B., Stengrevics O. A., Filimonov V. V., Vengaminov S. Yu. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 585-591.
18. Rochrbach M. S., Bodley J. W. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 17. P. 6831-6836.
19. Алахов Ю. Б. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 1029-1046.
20. Nakamura Sh., Ohta Sh., Arai K., Arai N., Oshima T., Kaziro Y. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 92. № 2. P. 533-543.
21. Гарбер М. Б., Решетникова С. Э. // Биоорган. химия. 1982. Т. 15. № 11. С. 1572-1575.
22. Mather M., Fee I. A. // Plasmid. 1990. V. 24. P. 45-56.
23. Кашипаров И. А., Климова И. А., Алахов Ю. Б. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 293-303.
24. Яцник А. В., Ворожейкина Д. П., Матвеев Н. И. // Биохимия. 1990. Т. 55. Вып. 9. С. 1539-1552.
25. Овчинников Ю. А., Алахов Ю. Б., Бундулис Ю. П., Бундуле М. А., Винокуров Л. М., Мотуз Л. П., Козлов В. П. // Биоорган. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 343.
26. Горчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977. С. 121-122.
27. Leamli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 880-885.
28. Habeeb A. F. S. A. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 457-464.
29. Riordan I. F., Vallee B. L. // Meth. Enzymol. 1972. V. 25. P. 449-453.

Поступила в редакцию
14.XI.1991
После доработки
25.II.1992

I. A. KLIMOVA, Yu. B. ALAKHOV

REACTIVITY OF SULPHYDRYL GROUPS IN ELONGATION FACTORS G OF MESO- AND THERMOPHILIC MICROORGANISMS

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region*

Native and denatured conditions have been used for carrying out reactions of elongation factors G from mesophilic bacteria of *E. coli* and thermophilic microorganisms of *Thermus thermophilus* HB8 and *T. thermophilus* VK with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid and *p*-chloromercuribenzoate. The only Cys residue is located in the N-terminal tryptic fragments with *M* 75 and 43 kDa of thermophilic EF-G. The studies of the accessibility of sulphhydryl groups to modifying agents as well as the investigation of reactivity of thiol residues of the considered meso- and thermophilic proteins and their peptides led us to conclusion that molecules of EF-G from thermophilic microorganisms are more compact and the interaction of domains within the molecule is closer in the temperature range of 20-30°C as compared with those of EF-G from *E. coli*.