



УДК 577.112.016

© 1994 Л. П. Мотуз, А. Н. Плотников, К. В. Коротков,
Ю. Б. Алахов

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ EF-2.
АНАЛИЗ ФРАГМЕНТОВ ОГРАНИЧЕННОГО ГИДРОЛИЗА EF-2,
ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ ТРИПСИНА И ЭЛАСТАЗЫ**

*Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и
Ю. А. Овчинникова РАН, Пущино Московской обл.*

Ключевые слова: фактор элонгации EF-2, ограниченный протеолиз, структурно-функциональные домены, трипсин, эластаза.

Ограниченный гидролиз EF-2 трипсином в мягких условиях приводит к расщеплению молекулы белка в N-концевой части, в участке фосфорилирования, по остаткам Arg⁵⁴ и Arg⁶⁵. Продукт трипсинолиза — фрагмент T1', содержащий остатки Thr⁵⁶ и Thr⁵⁸, фосфорилируемые в EF-2, также фосфорилируется EF-2-киназой. В фосфорилированном EF-2 расщепление трипсином происходит только по Arg⁶⁵, что вызывает снижение скорости его гидролиза трипсином по сравнению с нативным EF-2.

Расщепление EF-2 эластазой приводит к образованию двух фрагментов: E1 (60 кДа) и E2 (40 кДа). Фрагмент E1 (N-концевая часть белка) устойчив к дальнейшему действию эластазы и не расщепляется трипсином в неденатурирующих условиях. Кроме того, фрагмент E1 не способен фосфорилироваться EF-киназой. Фрагмент E2 (C-концевая часть молекулы) нестабилен в присутствии эластазы и сохраняет способность исходного EF-2 ADP-рибозилироваться A-фрагментом дифтерийного токсина в присутствии NAD⁺. Анализ EF-2 и его протеолитических фрагментов электрофорезом по О'Фарреллу показал, что модификация, обуславливающая наличие двух исходных изоформ EF-2 и не являющаяся следствием фосфорилирования и ADP-рибозилирования, находится в участке полипептидной цепи между 66-м и 506-м аминокислотными остатками.

Обсуждается возможность исследования формирования парциальных функциональных активностей EF-2 в рамках его отдельных структурных доменов с использованием для этих целей набора N-концевых фрагментов разной длины.

Эукариотический фактор элонгации EF-2 — мультифункциональный белок, на этапе элонгации полипептидной цепи участвующий в нескольких отдельных процессах: а) связывании комплекса EF-2·GTP с рибосомой в претранслокаци-

онном состоянии; б) транслокации пептидил-тРНК из А-участка на рибосоме в Р-участок; в) рибосомо- и EF-2-зависимом гидролизе GTP до GDP и неорганического фосфата; г) диссоциации комплекса EF-2·GDP·рибосома в посттранслокационном состоянии и последующем обмене EF-2-связанного GDP на GTP (для обзора см. [1, 2]).

Кроме того, EF-2 является ключевым белком, участвующим в регуляции эффективности трансляции на этапе элонгации за счет двух модификаций полипептидной цепи: фосфорилирования и ADP-рибозилирования. Было показано, что EF-2 может фосфорилироваться по остаткам треонина, расположенным в N-концевом районе полипептидной цепи, с помощью Ca⁺ кальмодулинзависимой протеинкиназы III, названной EF-2-киназой, что приводит к нарушению взаимодействия EF-2 с рибосомой в претранслокационном состоянии [3—7]. С другой стороны, EF-2 содержит модифицированный остаток гистидина (His⁷¹⁴-дифтамид). Этот остаток ADP-рибозилируется в присутствии NAD⁺ А-фрагментом дифтерийного токсина или клеточной ADP-рибозилтрансферазой [8—11]. Указанная модификация вызывает снижение сродства ADP-рибозилированного фактора к претранслоцированным рибосомам и уменьшение способности катализировать рибосомозависимый гидролиз GTP [12]. Наличие модификаций приводит к множественности изоформ фактора, обусловленной различной степенью фосфорилирования (три участка фосфорилирования) и ADP-рибозилирования [13]. Кроме того, исходный фактор EF-2 имеет две изоформы, структурные различия для которых не установлены [14].

Мультифункциональность фактора элонгации EF-2 и множественность его изоформ значительно затрудняют исследование механизмов его функционирования.

Для упрощения проблемы мы предлагаем исследовать отдельные структурные и/или функциональные домены, ответственные за формирование парциальных функциональных активностей. Такие домены можно получить, либо используя метод ограниченного протеолиза исходной молекулы, либо методами геной инженерии путем экспрессии соответствующих генных конструкций в живых или бесклеточных экспрессирующих системах. Имея в распоряжении набор N-концевых фрагментов различной длины, можно проследить за этапами формирования функциональных структур в ходе удлинения полипептидной цепи (иными словами, исследовать формирование пространственной структуры полипептидной цепи в ходе ее синтеза вплоть до завершения синтеза отдельного структурно-функционального домена), а также выяснить взаимное влияние отдельных доменов на создание функционально-активной структуры целого белка.

Данная работа посвящена характеристике фрагментов, образующихся при ограниченном протеолизе EF-2 трипсином и элстазой, в рамках которых формируются отдельные структурно-функциональные домены. Известно, что N-концевая часть EF-2 содержит участок фосфорилирования, в ней также расположены участки, ответственные за связывание GTP и за проявление EF-2 GTP-азной активности [15, 16]. Кроме того, в этом домене, возможно, расположена часть участка, отвечающего за взаимодействие EF-2 с рибосомой, вторая часть этого участка, вероятно, формируется в С-концевом домене [15, 17].

Ранее было показано, что фактор элонгации EF-2, подобно другим факторам элонгации (EF-1α [18], EF-Tu [19] и EF-G [20—22]), при ограниченном протеолизе трипсином образует четыре основных полипептидных фрагмента [23, 24]. Первоначальное расщепление полипептидной цепи происходит по Arg⁶⁵ с образованием фрагментов T1 и T4 (82 и 10 кДа соответственно). Далее фрагмент T1 расщепляется по остаткам лизина Lys⁵⁷⁰/Lys⁵⁷¹ с образованием фрагментов T2 и T3, а T4 гидролизует до коротких пептидов. Связывание GTP с фактором приводит к увеличению экспонированности второго участка расщепления трипсином. Полипептиды T1 и T4 остаются связанными друг с другом и могут быть разделены только в денатурирующих условиях. Они, находясь в комплексе, способны формировать низкоаффинный комплекс с рибосомой и катализировать

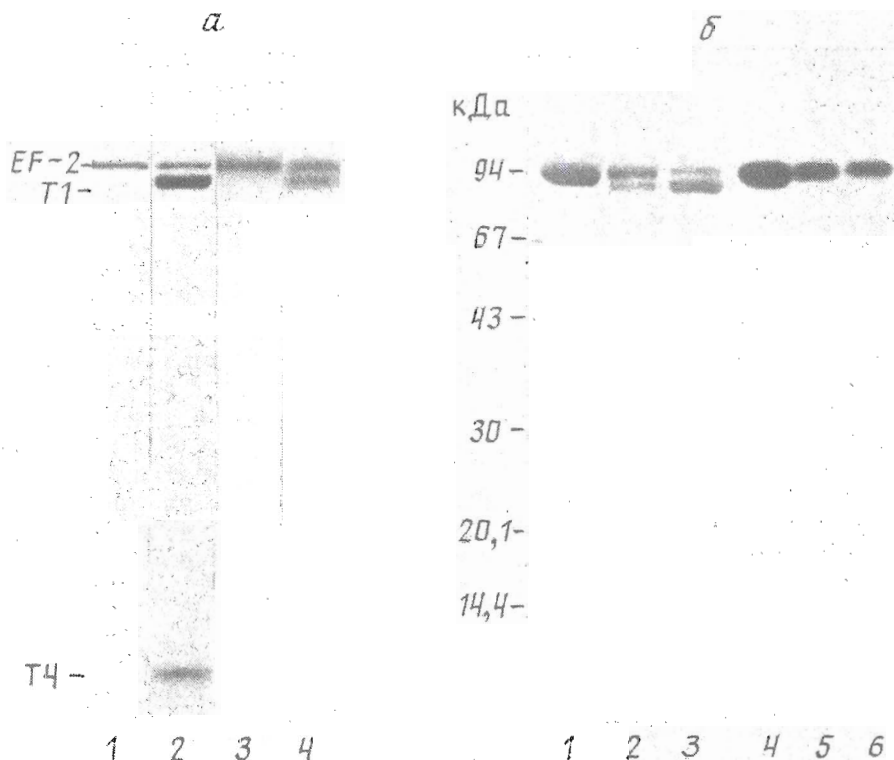


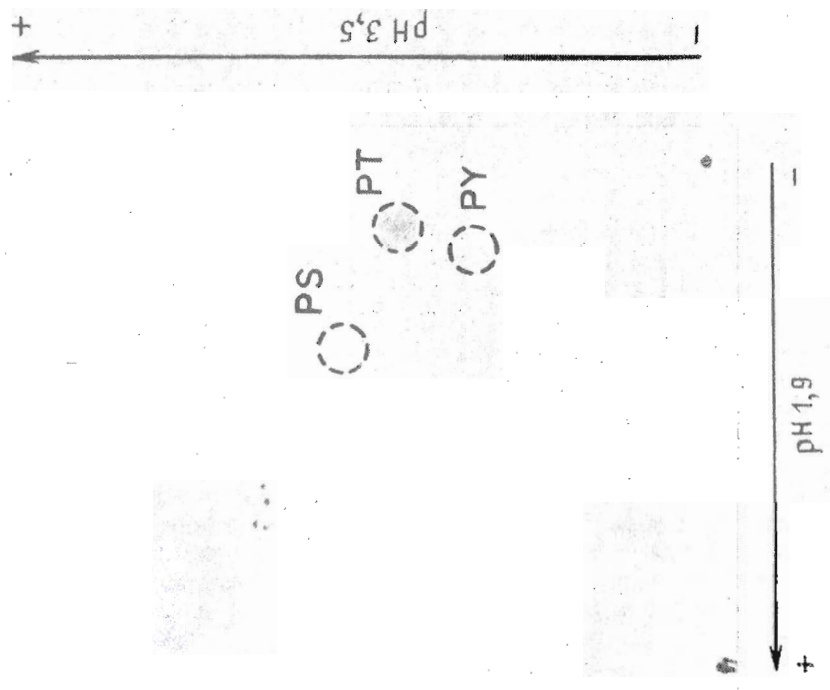
Рис. 1. SDS-электрофорез в ПААГ: *a* — фосфорилированных EF-2-киназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ фактора EF-2 (1, 3) и фрагментов его ограниченного трипсинолиза (2, 4); *b* — фосфорилированного EF-2 (1, 4) и продуктов расщепления трипсином фосфорилированного EF-2 в течение 10 (2, 5) и 30 мин (3, 6). Дорожки 1, 2 (*a*) и 1—3 (*b*) — окрашивание кумасси; 3, 4 (*a*) и 4—6 (*b*) — радиоавтограф соответствующих гелей

гидролиз GTP [23]. Было также показано, что фосфорилирование EF-2 приводит к защите полипептидной цепи от расщепления трипсином по Arg⁶⁵, а с другой стороны, в результате расщепления по Arg⁶⁵ полипептидная цепь полностью теряет способность фосфорилироваться [24].

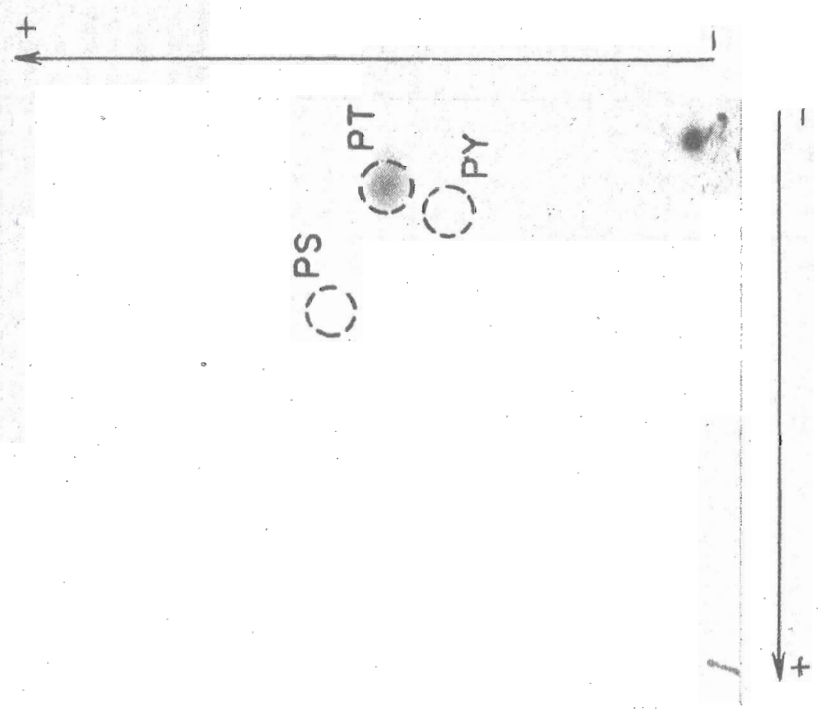
В наших экспериментах были использованы более мягкие по сравнению с работой [24] условия расщепления EF-2 трипсином (30 °С, соотношение фермент — субстрат 1 : 100), в результате чего образуются только фрагменты Т1 и Т4 и не происходит деградация фрагмента Т4 до коротких пептидов (рис. 1*a*, 1, 2). Полученная смесь фрагментов была подвергнута фосфорилированию EF-2-киназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, и продукты фосфорилирования анализировались SDS-электрофорезом с последующей автордиографией. Оказалось, что радиоактивная метка не включается во фрагмент Т4 (как и в работе [24]), но в отличие от данных, приведенных в этой работе, наблюдается включение метки не только в EF-2, но и во фрагмент Т1 (рис. 1*a*, 4). Однако, когда фосфорилированию был подвергнут образец более глубокого трипсинолиза EF-2 (практически полное исчезновение полосы, соответствующей EF-2, и появление фраг-

Рис. 2. Анализ фосфоаминокислот $^{32}\text{P}[\text{EF-2}]$ (*a*) и $^{32}\text{P}[\text{T1}]$ (*b*). Условия выделения фосфорилированных образцов, гидролиза и разделения фосфоаминокислот двумерным электрофорезом в тонком слое целлюлозы — см. «Экспер. часть». Обведенные кружки указывают положения добавленных стандартов, окрашенных пингидрином: фосфосерин (PS), фосфотреонин (PT), фосфотирозин (PY). Стрелками указаны направления электрофореза фосфорилированных аминокислот при различных pH. 0 — точка нанесения образца

a



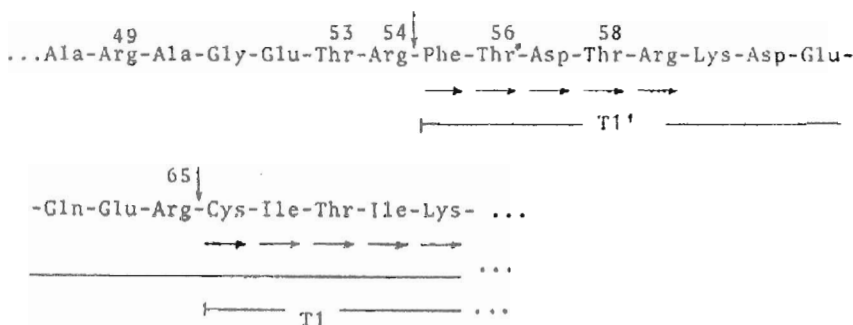
b



ментов T2 и T3), при автордиографии не было обнаружено включение метки ни в один из фрагментов, как и в работе [24] (данные не приведены).

Кроме остатков треонина, мы не обнаружили других фосфорилированных аминокислот ни в целом EF-2, ни во фрагменте T1 (рис. 2).

Анализ N-концевых последовательностей показал, что в наших условиях вместе с фрагментом T1, описанным ранее [23, 24], образуется фрагмент, названный нами T1', который является результатом расщепления полипептидной цепи EF-2 по Arg⁵⁴. Отношение количества фрагментов T1 и T1' в смеси составляет приблизительно 2 : 1. В представленной ниже структуре исследуемого участка полипептидной цепи EF-2 вертикальными стрелками показаны места ее расщепления трипсином и звездочкой отмечен остаток треонина, подвергающийся фосфорилированию:



Стрелками (→) указано определение аминокислотной последовательности по Эдману.

При определении аминокислотной последовательности [³²P]фосфорилированного образца фрагмента T1 радиоактивная метка была обнаружена на втором цикле деградации по Эдману, что соответствует положению Thr⁵⁶. Таким образом, при ограниченном гидролизе EF-2 трипсином первоначальное расщепление его полипептидной цепи происходит по остатку аргинина Arg⁵⁴ с последующим выщеплением 11-членного пептида (гидролиз по Arg⁶⁵). Промежуточный фрагмент T1' отличается от T1 на 11 аминокислотных остатков, в состав которых входят два остатка треонина (Thr⁵⁶ и Thr⁵⁸), подвергающихся фосфорилированию в EF-2 [7] и фосфорилируется подобно целому белку (рис. 2).

При ограниченном гидролизе трипсином [³²P]фосфорилированного EF-2, так же как и в работе [24], было отмечено уменьшение скорости первоначального расщепления полипептидной цепи (ср. рис. 1б, 1, 3; а, 1, 2), а также полное отсутствие радиоактивной метки во фрагменте T1 даже при малом времени гидролиза, что говорит о том, что в отличие от нативного EF-2 при расщеплении фосфорилированного EF-2 не образуется фрагмент T1' (рис. 1б, 4—6).

С другой стороны, мы показали, что протеолиз EF-2 эластазой происходит в одной точке (Val⁵⁰⁶—Ala⁵⁰⁷) с образованием фрагментов E1 и E2 с молекулярной массой около 60 и 40 кДа соответственно (рис. 3, 1, 2), причем на эффективность расщепления фосфорилирование и ADP-рибозилирование EF-2 существенного влияния не оказывают (ср. на рис. 3, 2, 8 и 10). Фрагмент E1 представляет собой N-концевую часть молекулы EF-2. Его N-концевая аминокислотная последовательность совпадает с последовательностью EF-2. Фрагмент E2 — C-концевая часть молекулы. При расщеплении эластазой [¹⁴C]ADP-рибозилированного EF-2 радиоактивная метка обнаруживается во фрагменте E2, а в случае расщепления [³²P]фосфорилированного EF-2 метка находится во фрагменте E1 (рис. 3, 8, 9 и 10, 11 соответственно). Фрагмент E1 устойчив к действию эластазы и трипсина и не гидролизуется ими при соотношении фермент — субстрат 1 : 50 в течение 30 мин при 37° С (рис. 3, 4). По-видимому, расщепление связи между 506-м и 507-м аминокислотными остатками в полипептидной цепи вызывают ее

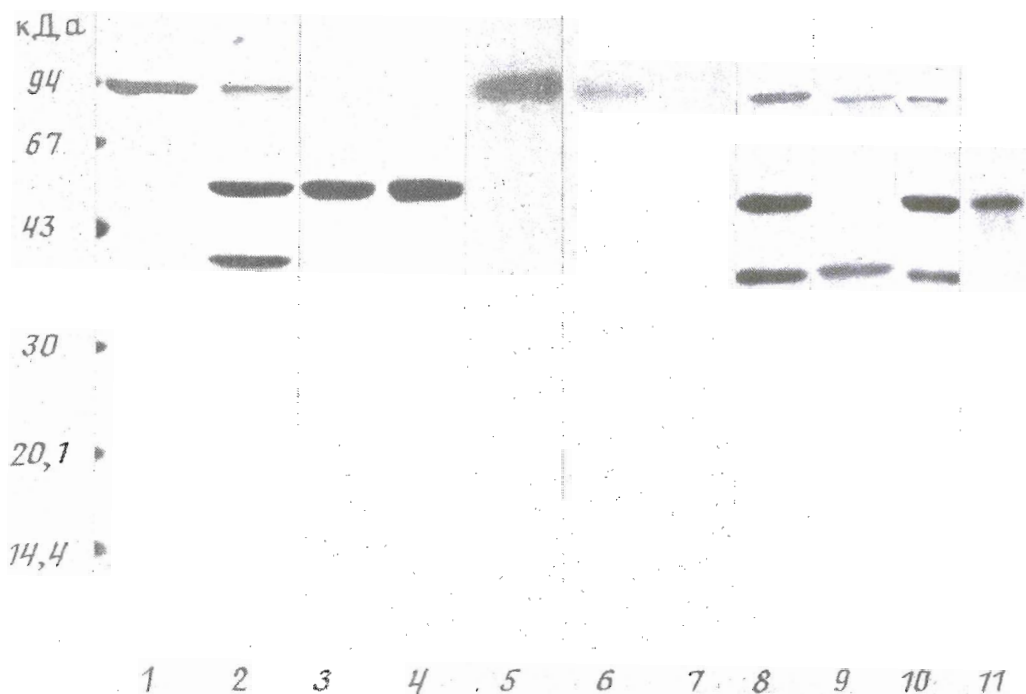


Рис. 3. SDS-электрофорез в ПААГ: фосфорилированных EF-2-киназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ EF-2 (1, 5), фрагментов ограниченного гидролиза EF-2 эластазой в течение 30 мин (2, 6) и E1 эластазного фрагмента (3, 7); E1 после гидролиза трипсином в течение 30 мин при 37°C (4); продуктов гидролиза эластазой ^{14}C ADP-рибозилированного EF-2 (8, 9) и ^{32}P фосфорилированного EF-2 (10, 11); 1—3, 8 и 10 — гели, окрашенные кумасси G; 5—7, 9 и 11 — автордиографы соответствующих гелей

конформационные изменения, приводящие к экранированию участка в N-концевой части молекулы, по которому обычно происходит первое и очень быстрое расщепление полипептидной цепи EF-2 трипсином. Более того, фрагмент E1 в результате этих конформационных изменений теряет способность фосфорилироваться EF-2-киназой (рис. 3, 2, 3 и 6, 7). В отличие от фрагмента E1 фрагмент E2 значительно менее устойчив к дальнейшему действию эластазы и сохраняет свойственную для EF-2 способность к ADP-рибозилированию A-фрагментом дифтерийного токсина в присутствии NAD^+ .

Фрагменты E1 и E2 были разделены в нативных условиях при хроматографии на HA-ультрагеле в градиенте K-фосфата. Это говорит о том, что степень их взаимодействия в растворе не очень высока, но в составе целой молекулы взаимодействие между этими ее частями, вероятно, играет весьма существенную роль при функционировании белка и, в частности, при формировании в EF-2 участка взаимодействия с рибосомой, которое модулируется гуаниловыми нуклеотидами [15].

Анализ с помощью двумерного электрофореза по О'Фарреллу нативного и фосфорилированного EF-2, а также его триптических фрагментов T1' и T1 и эластазных фрагментов E1 и E2 показал, что все образцы гетерогенны, за исключением фрагмента E2 (рис. 4а, б). Выделенный исходный EF-2 из печени крысы содержит две основные изоформы (рис. 4а, 1, пятна а, б) и в значительно меньшем количестве изоформы, соответствующие фосфорилированному *in vivo* EF-2 (рис. 4а, 1, пятна с, д). После частичного ^{32}P фосфорилирования *in vitro* количество изоформ с и д увеличивается (рис. 4а, 2), что и фиксируется автордиографией геля (рис. 4а, 3). Аналогичные результаты наблюдаются и

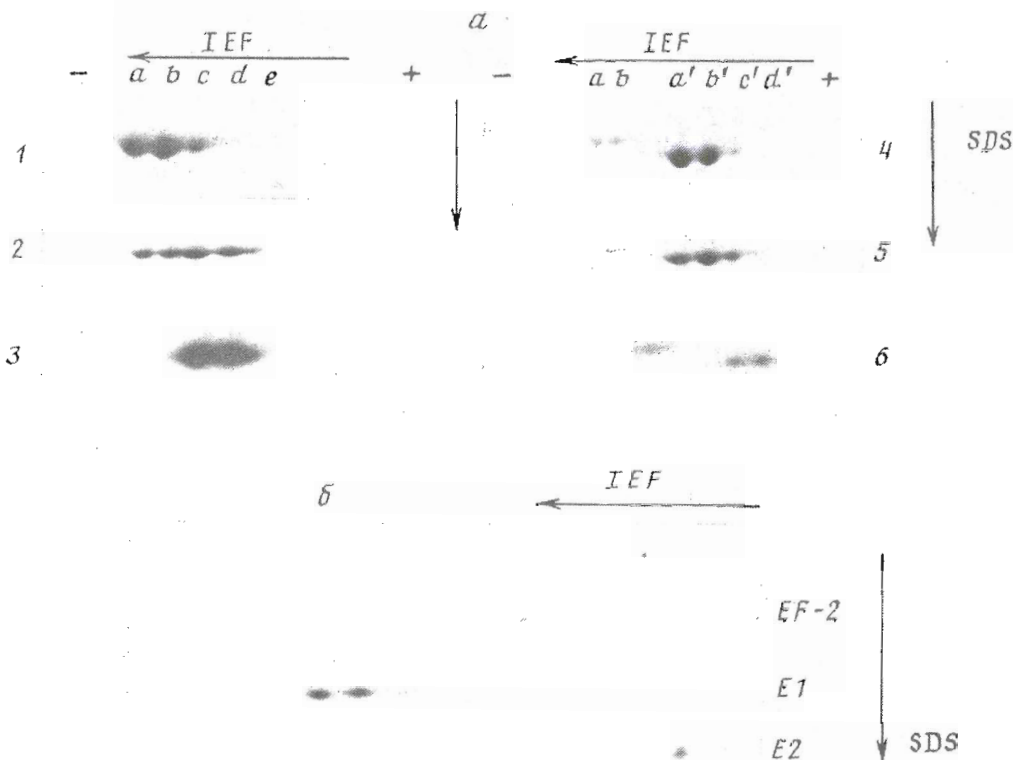


Рис. 4. Двумерный электрофорез (1) по О'Фарреллу: *a* — немодифицированного (1) и фосфорилированного EF-2-киназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ EF-2 (2, 3), подвергнутого ограниченному трипсинолизу немодифицированного EF-2 (4) и подвергнутого ограниченному трипсинолизу немодифицированного EF-2 с последующим фосфорилированием EF-2-киназой в присутствии $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ EF-2 (5, 6); *б* — продуктов гидролиза EF-2 эластазой, E1 и E2 — N- и C-концевые 60 и 40 кДа фрагменты соответственно. 1, 2, 4, 5 — гели, окрашенные кумасси; 3, 6 — автордиограммы гелей 2 и 5 соответственно. Пятна *a* и *b* в гелях 4 и 5 соответствуют негидролизованному EF-2, *a'* и *b'* — нефосфорилированным изоформам фрагментов T1, *c'* и *d'* — фосфорилированным изоформам T1. Пятна *a*, *b*, *c*, *d* — см. текст. Стрелками указаны направления изоэлектрофокусирования (IEF) и SDS-электрофореза EF-2 и его пептидных фрагментов в ПААГ

для фрагмента T1' (рис. 4*a*, 4—6). Фрагмент T1 дает картину, аналогичную для T1', но не содержит фосфорилированных изоформ (данные не приведены). Эластазный фрагмент E1 (рис. 4*б*) также содержит несколько изоформ, сходных с изоформами исходного фактора и фрагмента T1'. Фрагмент E2 до и после $[\text{C}^{14}]\text{ADP}$ -рибозилирования имеет только один компонент.

Из полученных данных следует, что EF-2 не содержит дополнительных мест фосфорилирования, кроме уже идентифицированных ранее. При ограниченном трипсинолизе EF-2 в N-концевой части белка происходит расщепление по двум остаткам аргинина: Arg^{54} (образование T1') и Arg^{65} (T1). Фрагмент T1' фосфорилируется EF-2-киназой. Расщепление по Arg^{54} происходит с большей скоростью, чем по Arg^{65} . При трипсинолизе фосфорилированного EF-2 не происходит последовательного гидролиза по Arg^{54} , затем по Arg^{65} (T1' не образуется), расщепление идет только по Arg^{65} . Возможно, это и является основной причиной более медленного гидролиза фосфорилированного EF-2 по сравнению с нативным.

Кроме того, данные по анализу количества изоформ фактора EF-2 и его протеолитических фрагментов, полученные электрофорезом по О'Фарреллу, показали, что модификация, обуславливающая наличие двух исходных изоформ EF-2, находится в участке полипептидной цепи между 66-м и 506-м аминокислотными остатками. Природу этой модификации выяснить пока не удалось. Наиболее вероятным кажется наличие в разных формах белка как минимум одной аминокислотной замены нейтрального аминокислотного остатка на заряженной, или наоборот.

Таким образом, приведенная характеристика фрагментов ограниченного протеолиза EF-2 показала, что для решения основной цели, поставленной авторами, — исследования формирования парциальных активностей в молекуле EF-2, являющегося мультифункциональным белком, — необходимо учитывать ряд обстоятельств.

1. Принимать во внимание, что отдельные структурно-функциональные домены в результате выщепления из целого белка могут претерпевать конформационные изменения, в результате которых исчезает та функциональная активность, которую необходимо исследовать. Пример тому — фрагмент E1, который теряет способность фосфорилироваться.

2. Конформация отдельного домена зависит от соседних доменов в составе целого белка и может изменяться в зависимости от функционального состояния белка, т. е. наличия связанного лиганда, модификации и т. д. В случае EF-2, например, связывание GTP/GDP зависит от ADP-рибозилирования [25], а доступность для триптической атаки участка расщепления в свою очередь зависит от наличия фосфорилирования.

3. Необходимо детальная физико-химическая характеристика отдельных фрагментов и соотношение их пространственной структуры со структурой, существующей в целом белке.

4. Кроме того, необходимо учитывать возможное существование гетерогенности полипептидной цепи, обусловленной генетически, а не посттрансляционными модификациями. Такая гетерогенность может также вносить свой вклад в тонкие различия структурной организации отдельных пулов молекул.

Тем не менее подход, связанный с исследованием структуры отдельных фрагментов целого белка, начиная с набора N-концевых фрагментов постепенно увеличивающейся длины и до завершения отдельного структурно-функционального домена (фрагмент E1 в случае EF-2), представляется весьма перспективным.

Экспериментальная часть

В работе использованы [^{14}C]NAD⁺ (уд. акт. 298 мКи/ммоль; Amersham, Англия); [γ - ^{32}P]ATP (уд. акт. 1000 мКи/ммоль; «Изотоп», Россия); дифтерийный токсин (Calbiochem, Англия); трипсин, апротинин, эластаза, эластатинал (Boehringer Mannheim, ФРГ).

Выделение EF-2 и EF-2-киназы. Печень крысы была разрушена в тканевом гомогенизаторе в буфере А (20 мМ трис-НСl (рН 7,6), 50 мМ КСl, 2 мМ дитиотреит, 1 мМ EDTA и 10% глицерин). В гомогенат был добавлен соевый трипсиновый ингибитор до концентрации 40 мкг/мл.

Осветленный гомогенат смешивали с DEAE-целлюлозой, уравновешенной в буфере А. Целлюлозу промывали на стеклянном фильтре буфером А и заполняли колонку, EF-2 и EF-2-киназу элюировали линейным градиентом концентрации КСl (50—400 мМ). EF-2 тестировали по его способности ADP-рибозилироваться дифтерийным токсином в присутствии [^{14}C]NAD⁺ [26]. Фракции, содержащие EF-2, непосредственно наносили на колонку с гидроксиапатитом, уравновешенным буфером Б (10 мМ К-фосфат (рН 7,1), содержащий 2 мМ дитиотреит и 10% глицерин). EF-2 элюировали линейным градиентом К-фосфата (10—200 мМ). Активную фракцию разбавляли равным объемом раствора 2 мМ дитиотреита, 10% глицерина и наносили на колонку с фосфоцеллюлозой, уравновешенной

50 мМ К-фосфатом (рН 7,1), содержащим 2 мМ дитиотреит, 0,1 мМ EDTA, 10% глицерин. Элюирование проводили линейным градиентом концентрации К-фосфата (50—200 мМ). Фракции, содержащие EF-2, диализовали против буфера А и хроматографировали на колонке с DEAE-сефадексом А-50, уравновешенным буфером А. EF-2 элюировали линейным градиентом концентрации КСl (50—200 мМ). Чистоту полученного белка проверяли SDS-электрофорезом в полиакриламидном геле.

Фракцию, проявляющую EF-2-киназную активность, полученную после хроматографии на DEAE-целлюлозе, рехроматографировали на колонке с DEAE-Toyorearl 650M, уравновешенным буфером А, содержащим 100 мМ КСl. Элюирование проводили линейным градиентом концентрации КСl (100—400 мМ). Активную фракцию непосредственно наносили на колонку с гидроксипатитом, уравновешенным буфером Б. EF-2-киназу элюировали линейным градиентом К-фосфата (10—300 мМ). EF-2-киназу расфасовывали и хранили при -70°C . Тестирование киназы по фосфорилированию EF-2 проводили как в работе [27].

Частичное расщепление EF-2 и $[^{32}\text{P}]\text{EF-2}$ трипсином и эластазой. Белок инкубировали в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,8), содержащем 100 мМ КСl, 0,1 мМ EDTA, 2 мМ дитиотреит и 10% глицерин, с трипсином или эластазой (соотношение фермент — субстрат 1 : 100) при 30°C .

Образцы отбирали через 5, 15 и 30 мин и реакцию останавливали добавлением равного объема SDS-гель-электрофорезного буфера для образцов. Кипятили 2 мин и анализировали SDS-гель-электрофорезом, используя линейный градиент концентрации полиакриламидного геля (10—25%) [28].

Фосфорилирование EF-2. EF-2 (20 мкг) инкубировали 10 мин при 30°C с EF-2-киназой, как в работе [7], в 20 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,6), содержащем 10 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ CaCl_2 , 5 мМ дитиотреит, 10 мкг/мл кальмодулина, 200 мкМ $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в конечном объеме 60 мкл. Реакционную смесь (5 мкл) анализировали SDS-электрофорезом в ПААГ с последующей автордиографией.

Фосфорилирование триптического фрагмента EF-2. EF-2 (20 мкг) инкубировали с трипсином 30 мин, как описано выше. Реакцию останавливали добавлением апротинина в соотношении ингибитор — фермент 2 : 1 (по весу). Полученные пептиды фосфорилировали как описано для EF-2.

Выделение фрагментов EF-2 и их секвенирование. Полипептиды, полученные при инкубировании в течение 30 мин 8 мкг EF-2 с эластазой, а также триптические полипептиды (8 мкг) после инкубирования с EF-2-киназой разделяли SDS-электрофорезом в ПААГ и перенесли на PVDF-мембрану Immobilon согласно [29, 30]. Перенос проводили 16 ч при 4°C и напряжении 4 В/см в 50 мМ Na-боратном буфере (рН 8,3), содержащем 20% этанол. N-Концевую аминокислотную последовательность определяли на секвенаторе 477A (Applied Biosystems). Положение фосфорилированного аминокислотного остатка определяли по появлению радиоактивной метки в экстракте мембраны (90% водный метанол, содержащей 2 мМ Na-фосфат, рН 7,0) после первых пяти шагов деградации [7].

Анализ фосфоаминокислот. Участок мембраны Immobilon, содержащий фосфорилированный полипептид, гидролизовали 3 ч 6 н. НСl при 110°C [31]. Фосфоаминокислоты разделяли методом двумерного электрофореза в тонком слое целлюлозы [32]. Гидролизат и смесь фосфоаминокислот (по 1 мкг фосфосерина, фосфотреонина и фосфотирозина) наносили в угол пластинки (8,5×9,5 см) на расстоянии 1 см от края. В первом направлении — электрофорез при рН 1,9 (уксусная кислота — 80% муравьиная кислота — вода, 78 : 25 : 897; 800 В, 1 ч), во втором — при рН 3,5 (уксусная кислота — пиридин — вода, 50 : 5 : 945; 500 В, 1 ч). Пластину окрашивали 0,1% раствором нингидрина в ацетоне и автордиографировали.

Выделение эластазных фрагментов. EF-2 (3 мкг) инкубировали 40 мин с эластазой, как описано выше. Реакцию останавливали добавлением эластатиналя до концентрации 40 мкг/мл, выдерживали 30 мин при 0°C . Образец наносили

на колонку (1×15 см) с НА-ультрагелем, уравновешенным 10 мМ К-фосфатом (рН 7,1), содержащим 10% глицерин и 2 мМ дитиотреит. Элюирование проводили линейным градиентом концентрации К-фосфата (10—200 мМ) по 100 мл каждого.

Двумерный электрофорез осуществляли по O'Farrell [33].

Авторы признательны Т. А. Мурановой за определение аминокислотной последовательности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moldave K.//Ann. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 1109—1149.
2. Nygard O., Nilsson L.//Eur. J. Biochem. 1990. V. 191. № 1. P. 1—17.
3. Palfrey H. C.//FEBS Lett. 1983. V. 157. № 1. P. 183—190.
4. Nairn A., Bhagat B., Palfrey H. C.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 23. P. 7939—7943.
5. Ryazanov A. G., Shestakova E. A., Natapov P. G.//Nature. 1988. V. 334. № 6178. P. 170—173.
6. Koizumi S., Ryazanov A. G., Hamat T., Chen H.-C., Guroff G.//FEBS Lett. 1989. V. 253. № 1, 2. P. 55—58.
7. Ovchinnikov L. P., Motuz L. P., Natapov P. G., Averbuch L. J., Wettenthal R. E. H., Szyszka R., Kramer G., Hardesty B.//FEBS Lett. 1990. V. 275. № 1, 2. P. 209—212.
8. Collier R. J.//Bacteriol. Rev. 1975. V. 39. № 1. P. 54—85.
9. Van Ness B. G., Howard J. B., Bodley J. W.//J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 22. P. 10710—10716.
10. Moehring J. M., Moehring T. J., Danley D. E.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 2. P. 1010—1014.
11. Fendrick J. L., Yglewski W. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 2. P. 554—557.
12. Nygard O., Nilsson L.//J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 11. P. 6030—6034.
13. Marzouki A., Lavergne J.-P., Rebound J.-P., Rebound A.-M.//FEBS Lett. 1989. V. 255. № 1. P. 72—76.
14. Redpath N. T.//Anal. Biochem. 1992. V. 202. № 2. P. 340—343.
15. Kohno K., Uchida T., Ohkulo H., Nakanishi S., Nakanishi T., Fukui T., Ohtsuka E., Ikehara M., Okada I.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 14. P. 4978—4982.
16. Nakanishi T., Kohno K., Ishiura M., Ohashi H., Uchida T.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 13. P. 6384—6391.
17. Nygard O., Nilsson L.//Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 824. № 2. P. 152—162.
18. Amons R., Pluijms W., Roobol K., Moller W.//FEBS Lett. 1983. V. 153. № 1. P. 37—42.
19. Wittinghofer A., Frank R., Leterman R.//Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. № 2. P. 423—431.
20. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W.//Biochemistry. 1975. V. 14. № 17. P. 3922—3926.
21. Alakhov Yu. B., Stengrevits O. A., Filimonov V. V., Venyaminov S. Yu.//Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 3. P. 585—591.
22. Kashparov J. A., Semisotnov G. V., Alakhov Yu. B.//Eur. J. Biochem. 1981. V. 118. № 2. P. 417—421.
23. Nilsson L., Nygard O.//Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. № 1/2. P. 293—299.
24. Nilsson L., Nygard O.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 16. P. 10578—10582.
25. Burns G., Abraham A. K., Vedeler A.//FEBS Lett. 1986. V. 208. № 2. P. 217—220.
26. Van Ness B. G., Howard J. B., Bodley J. W.//J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 24. P. 8687—8690.
27. Ryazanov A. G.//FEBS Lett. 1987. V. 214. № 2. P. 331—334.
28. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
29. Cohen I. D., Tanü Y., Tian H., Boone E., Sameison L. E., Lane C. L.//Science. 1992. V. 256. № 18. P. 542—545.
30. Eckerskorn C., Yungblut P., Mewes W., Klose J., Lottspeich F.//Electrophoresis. 1988. V. 9. № 10. P. 830—838.
31. Hildebrandt E., Fried V. A.//Anal. Biochem. 1989. V. 177. № 2. P. 407—412.
32. Hunter T., Sefton B. M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. № 3. V. 77. P. 1311—1315.
33. O'Farrell P. H.//J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 10. P. 4007—4021.

Поступила в редакцию
8.III.1994

L. P. Motuz, A. N. Plotnikov, K. V. Korotkov, Yu. B. Alakhov

**STRUCTURE-FUNCTIONAL DOMAINS OF ELONGATION FACTOR EF-2.
ANALYSIS OF FRAGMENTS OF THE EF-2 LIMITED HYDROLYSIS
WITH TRYPSIN AND ELASTASE**

*Branch of M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142292*

Key words: elongation factor EF-2, limited proteolysis, structure-functional domains.

Limited hydrolysis of EF-2 with trypsin in mild conditions leads to cleavage at the N-terminal part of the protein, at the region of phosphorylation, at the Arg⁵⁴ and Arg⁶⁵ residues. The trypsinolysis product, fragment T1', containing Thr⁵⁶ and Thr⁵⁸, which are phosphorylated in EF-2, is also phosphorylated by EF-2-kinase at the same residues. In the phosphorylated EF-2, digestion by trypsin takes place only at Arg⁶⁵, resulting in a reduction of the rate of hydrolysis in comparison with the native EF-2.

Digestion of EF-2 with elastase results in the formation of two fragments E1 and E2 (60 and 40 kDa, respectively). Fragment E1 represents the N-terminal part of EF-2. It is resistant to the further action of elastase, is not cleaved by trypsin, and loses its capability for phosphorylation. Fragment E2, the C-end part of the molecule, is not resistant to the further action of elastase and retains its capability for ADP-ribosylation with the A fragment of diphtheria toxin and NAD⁺. Electrophoretic analysis of EF-2 and its proteolytic fragments according to O'Farrell showed that the modification, resulting in the presence of two initial forms of EF-2, is located between the amino acid residues 66 and 506 of the polypeptide chain.

In conclusion a possibility of studying the formation of partial functional activities within the framework of individual structure-functional domains using a set of N-terminal fragments of various length is discussed.