



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 8 \* № 8 \* 1982

## ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 547.963.04:577.11

### СТРУКТУРА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ G ИЗ *E. COLI*

Алахов Ю. Б.

Институт белка Академии наук СССР, Пущино Московской обл.

В обзоре приведены основные физико-химические характеристики фактора элонгации G (EF-G) из *E. coli*. Обсуждаются результаты исследований по выяснению природы функционально важных особенностей строения молекулы этого белка и происходящих конформационных изменений при взаимодействии фактора G с гуаниловыми нуклеотидами. Приведены данные по выяснению его первичной структуры. Результаты ограниченного протеинолиза фактора G позволили выяснить не только его полную первичную структуру, но и представить общую организацию молекулы. В заключение приведено сравнение аминокислотных последовательностей и вторичных структур GTP-связывающих участков факторов элонгации G и Tи и показано наличие значительной гомологии их аминокислотных последовательностей.

#### 1. Введение

В бактериальной белоксинтезирующей системе известны три растворимых белка, принимающих участие в синтезе полипептидной цепи на рибосоме на этапе элонгации. Эти белки в настоящее время принято называть факторами элонгации Ти (температурно-нестабильный, EF-Tи), Ts (температурно-стабильный, EF-Ts) и G (обладающий рибосомозависимой GTP-азной активностью, EF-G) [1]. Функциональные свойства и роль факторов элонгации в процессе транслокации достаточно хорошо изучены и подробно рассмотрены в ряде обзорных работ [2–15]. Данная работа посвящена исследованиям физико-химических свойств и первичной структуре фактора элонгации G, которые позволили более отчетливо представить механизмы физико-химических основ функционирования этого белка.

#### 2. Физико-химические свойства G-фактора

Основной функцией фактора G на рибосоме является катализирование GTP-зависимой транслокации комплекса пептидил-tРНК·мРНК из A-участка в P-участок на рибосоме с освобождением дезацилированной tРНК из P-участка и выходом ее из рибосомы. Кроме того, фактор элонгации G катализирует рибосомозависимую GTP-азную реакцию в отсутствие мРНК и аминоацил-tРНК. Эта активность фактора названа неспецифической GTP-азной активностью, поскольку она непосредственно не связана с транслокацией.

По данным Ледера с сотр. [16], фактор G имеет молекулярную массу  $72\,000 \pm 5\%$ , установленную равновесным центрифугированием в 6,8 М гуанидинхлориде. Другими авторами [17, 18] низкоскоростным равновесным центрифугированием было показано, что фактор G имеет  $M\ 84\,000$ , и эта величина хорошо согласовывалась с данными по скоростному центрифугированию ( $M\ 80\,000$ ,  $s_{20,w}^{20} = 4,95\text{ S}$ ). Авторы работ [17, 18] в противоположность Ледеру с сотр. показали, что G-фактор является субъединичным белком, поскольку было обнаружено, что в 4 М мочевине белок диссоциирует на две равные субъединицы с  $M\ 42\,500$ , а при хранении белка в течение нескольких суток в 8 М мочевине субъединицы с  $M\ 42\,500$  распадаются на субъединицы с  $M\ 23\,000$ . Субъединицы с  $M\ 42\,500$  способны ренатурировать с образованием активной молекулы, в то время как субъединицы с  $M\ 23\,000$  не ренатурируют.

Однако данные о субъединичной структуре G-фактора не подтвердились. Позже, при определении молекулярной массы равновесным центрифугированием и электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, ее величина была установлена равной 74 000–83 000 [19–22].

Аминокислотный состав, рассчитанный на молекулярную массу 81 000, показал, что полипептидная цепь фактора G состоит приблизительно из 730 аминокислотных остатков и содержит 5 остатков цистеина. Два остатка цистеина, вероятно, образуют S–S-мостик (Kasiro Y., личное сообщение, 1978 г.). Удельное поглощение ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) при 280 нм равно  $8,37 \pm 0,04$  [21], т. е. молярный коэффициент поглощения ( $\epsilon$ ) равен  $6,78 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  и находится в экспериментальных пределах величины, вычисленной по аминокислотному составу, принимая молярные коэффициенты поглощения для тирозина и триптофана  $1197$  и  $5599 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  соответственно [23].

Ультрафиолетовый спектр поглощения фактора G имеет максимум при 279 нм, а соотношение поглощения при 260 и 280 нм равно 1,88, что характерно для белков, не имеющих связанного небелкового хромофора. Количество  $\alpha$ -спиральной структуры, установленное по спектру кругового дихроизма, составляет  $34 \pm 5\%$  [21].

Как было показано рядом исследователей [16, 17, 19, 20, 24, 25], активность фактора G зависит от присутствия тиолсодержащих веществ. Фактор G, находящийся в буфере, содержащем 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, сохраняет полную активность неопределенно долго, в то время как хранение без  $\beta$ -меркаптоэтанола или при его концентрации  $<2$  мМ даже в атмосфере азота приводит к быстрой и необратимой инактивации белка. Очевидно, эта инактивация связана с наличием в факторе G по крайней мере одной свободной SH-группы остатка цистеина, прстерпевающей при недостатке тиолсодержащих веществ быстрое окисление, приводящее к потере активности фактора G [26]. Показано, что процесс инактивации протекает по крайней мере в две стадии. Первая стадия является обратимой и, возможно, включает образование дисульфидной связи, поскольку активность может быть восстановлена добавлением тиола. Следующая, более медленная реакция приводит к необратимому инактивированию. Сущность этой стадии в настоящее время неясна [21]. Таким образом, для сохранения активности фактора G необходимы условия, предохраняющие свободную SH-группу в молекуле белка от модификации.

Известно, что рибосомозависимая несопряженная GTP-азнайшая реакция фактора G сильно ингибируется различными реагентами на SH-группу [19, 27, 28]. Более того, Рорбах и Бодли [26] показали, что химическая модификация одного остатка цистеина в факторе G приводит к его инактивированию, и объяснили этот эффект тем, что при такой модификации белка происходит ингибирование его нуклеотидсвязывающей способности. Однако другими авторами было показано, что G-фактор, модифицированный N-этилмалеимидом или его производными только по одной реактивной SH-группе, способен образовывать бинарный комплекс с GTP и GDP и константы диссоциации этих комплексов близки к константам диссоциации комплексов GTP и GDP с нативным белком [29, 30]. Далее выяснилось [31], что фактор G содержит одну реактивную экспонированную SH-группу и эта группа не важна для связывания нуклеотидов, но существенна для взаимодействия фактора G с рибосомой. Реактивность SH-группы по отношению к N-(1-анилинонафтил-4)малеимиду уменьшается в присутствии гуаниловых нуклеотидов [29].

Известно, что фактор G катализирует рибосомозависимую GTP-азнайную реакцию [32], которая протекает через промежуточную стадию образования тройного комплекса, включающего EF-G, рибосому и гуаниловый нуклеотид [27, 33–37]. При образовании комплекса с GTP происходит быстрый гидролиз GTP до GDP, и образовавшийся новый тройной комплекс, содержащий GDP, может быть выделен только в присутствии фуриловой кислоты [35, 38] гель-фильтрацией [34, 36, 37], ультрацентрифугированием [33–36] или фильтрацией через нитроцеллюлозный фильтр

[35, 37]. С другой стороны, при использовании вместо GDP его негидролизуемых аналогов GuoPP(CH<sub>2</sub>)P или GuoPP(NH)P комплекс устойчив и в отсутствие фусидовой кислоты [34, 35, 39].

Было показано, что тройному комплексу предшествует бинарный комплекс EF-G·GTP [29, 40–42]. Взаимодействие нуклеотидов с фактором G значительно слабее, чем с фактором Ти, и поэтому для определения константы диссоциации комплекса были использованы методы равновесной гель-фильтрации (в соответствии с работой [43]) и равновесного диализа, которые подходят для обнаружения относительно слабых белок-лигандных взаимодействий. Кроме того, был применен метод флуориметрического титрования комплекса EF-G·ANS (1-анилино-8-нафтиалинсульфонат) гуаниловыми нуклеотидами [29]. Все эти методы отчетливо показали взаимодействие EF-G с GDP, GTP, GuoPP(CH<sub>2</sub>)P и GuoPP(NH)P. Константы диссоциации бинарных комплексов, определенные тремя методами, оказались достаточно близкими: равновесным диализом —  $1,0 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-5}$  М, флуориметрическим титрованием —  $1,4 \cdot 10^{-5}$  и  $1,1 \cdot 10^{-5}$  М для GTP и GDP соответственно. Константы диссоциации для негидролизуемых аналогов GuoPP(NH)P и GuoPP(CH<sub>2</sub>)P, вычисленные по результатам флуориметрического титрования, равны  $4,3 \cdot 10^{-5}$  и  $5,7 \cdot 10^{-5}$  М соответственно.

Комплекс EF-G·GDP в отличие от комплекса EF-G·GTP в отсутствие фусидовой кислоты не взаимодействует с рибосомой. Следовательно, изменение средства фактора к рибосоме вызывается заменой GTP на GDP в бинарном комплексе. Можно было предположить, что состояния фактора в комплексах с GTP и GDP различаются по пространственной структуре. Однако было показано, что в спектрах КД свободного G-фактора и G-фактора в комплексах с GDP и GTP нет сколько-либо заметных различий [44]; различия во вторичной структуре фактора G при его взаимодействии с лигандами не определяются даже методом тритий-водородного обмена [30]. Наличие локальных конформационных изменений в структуре фактора G при образовании бинарных комплексов с гуаниловыми нуклеотидами было показано с помощью гидрофобного [29] и спин-меченого зондов [30], а также при исследовании хода модификации экспонированной SH-группы [31, 45]. Количество связывающих участков для ANS в G-факторе и его комплексах с GDP и GTP равно 5, 5 и 4 соответственно, т. е. связывание GDP с EF-G·ANS происходит без изменения количества связывающих ANS участков, в то время как превращение комплекса EF-G·GDP в EF-G·GTP сопровождается уменьшением их количества на единицу. С другой стороны, экспонированная SH-группа эффективно защищается от модификации гуаниловыми нуклеотидами [41, 45], хотя сама и не входит непосредственно в нуклеотидсвязывающий участок. Приведенные данные позволяют сделать вывод, что конформационные различия между комплексами EF-G·GDP и EF-G·GTP, вероятно, локальны и ограничены участком G-фактора, взаимодействующим с рибосомой.

Дальнейшие исследования физико-химических свойств фактора G позволили более детально представить характер происходящих в его молекуле изменений при взаимодействии с нуклеотидами.

### 3. Ограниченный протеинолиз фактора G

Инкубирование фактора G с трипсином приводит к образованию нескольких фрагментов, относительно устойчивых к дальнейшему расщеплению [22, 46]. Подробное исследование фрагментов G-фактора, модифицированного по экспонированной SH-группе [<sup>14</sup>C]ICH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, позволило расположить их по полипептидной цепи фактора G (см. рис. 1) и локализовать экспонированную SH-группу [22].

Из кинетических данных трипсинолиза следует, что первоначальным актом является отщепление от G-фактора фрагмента T<sub>6</sub> с M 6000 и образование фрагмента T<sub>1</sub> (M 76 000), который далее распадается на фрагменты T<sub>3</sub> (M 49 000) и T<sub>5</sub> (M 26 000). Фрагмент T<sub>3</sub> в свою очередь отщеп-

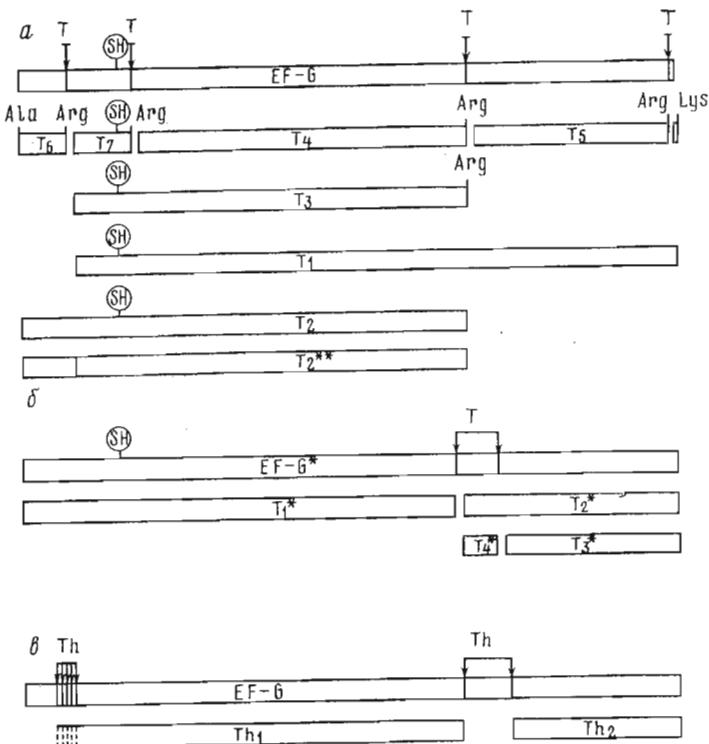


Рис. 1. Расположение фрагментов ограниченного протеинолиза по полипептидной цепи EF-G. Расщепление трипсином EF-G (a) и EF-G, модифицированного 1,2-циклогександионом (b); расщепление термолизином (c).  
**T<sub>2</sub>\*\*** – комплекс фрагментов T<sub>6</sub> и T<sub>3</sub>

ляет фрагмент T<sub>7</sub> ( $M = 8000$ ) и образует фрагмент T<sub>4</sub> ( $M = 41\,000$ ). Кроме основного пути гидролиза прослеживается еще один, менее выраженный, который в итоге приводит к тем же самым фрагментам. Он заключается в следующем: фактор G отщепляет фрагмент T<sub>5</sub> с образованием фрагмента T<sub>2</sub> ( $M = 56\,000$ ), а последний далее расщепляется на фрагменты T<sub>6</sub> и T<sub>3</sub>. В конечном итоге образуется пять фрагментов: T<sub>3</sub>–T<sub>7</sub>. Исследование N-концевых последовательностей фактора G и фрагментов T<sub>1</sub>–T<sub>7</sub> позволило не только установить пути образования фрагментов, но и расположить их по полипептидной цепи. Оказалось, что фрагмент T<sub>6</sub> является N-концевым, непосредственно за ним расположен фрагмент T<sub>7</sub>, являющийся в свою очередь N-концевой частью фрагмента T<sub>3</sub>. Фрагмент T<sub>4</sub> представляет собой продукт отщепления от фрагмента T<sub>3</sub> N-концевого участка, и, наконец, фрагмент T<sub>5</sub> является C-концевой частью фактора G. В рамках фрагмента T<sub>7</sub> расположен экспонированный остаток цистеина, и, как было показано фотохимической модификацией ацилгом GTP [47], участок полипептидной цепи фактора G, включающий этот остаток цистеина, непосредственно участвует в связывании GTP. Исследование первичной структуры фрагментов ограниченного трипсинолиза и продуктов бромцианового расщепления фактора G [48] показало, что все фрагменты расположены непосредственно друг за другом без отщепления каких-либо участков полипептидной цепи, за исключением фрагмента T<sub>5</sub>, C-концевой участок которого отличается от C-концевого участка молекулы белка на два аминокислотных остатка (Gly-Lys). Таким образом, действие трипсина на G-фактор высокоспецифично, и расщепление полипептидной цепи происходит только по остаткам аргинина [49].

При действии на фактор G термолизином [49] – ферментом, обладающим значительно более широкой специфичностью, чем трипсин, – образуются в основном два больших фрагмента (Th<sub>1</sub> и Th<sub>2</sub>) с  $M = 45\,000$  и  $25\,000$

(рис. 1). Фрагмент с  $M$  25 000 представляет собой С-концевую часть молекулы белка, укороченную по сравнению с аналогичным триптическим фрагментом с N-конца. Фрагмент с  $M$  45 000 аналогичен триптическому фрагменту с  $M$  49 000, однако он укорочен с С-конца молекулы на 25–30 аминокислотных остатков. N-Концевая часть этого фрагмента гетерогенна, что обусловлено несколькими разрывами полипептидной цепи. Таким образом, места атаки полипептидной цепи фактора G термолизином находятся в непосредственной близости от мест действия трипсина. При действии термолизина вероятность множественности разрывов полипептидной цепи, естественно, выше, чем при действии трипсина. Тем не менее участки полипептидной цепи, которые атакует термолизин, сравнительно невелики. Один из этих участков находится в N-концевой части молекулы и охватывает 10 аминокислотных остатков, а другой, протяженностью около 30–40 аминокислотных остатков, расположен на расстоянии одной трети длины полипептидной цепи от С-конца молекулы. В нативной молекуле фактора G участки полипептидной цепи, доступные для термолизина, вероятно, значительно меньше, и только после первоначального разрыва происходит дальнейшее расщепление концевых частей вновь образовавшихся молекул в результате произошедших в них конформационных изменений. Сами же фрагменты сохраняют высокую устойчивость к дальнейшему действию протеиназы, очевидно, в результате сохранения в них компактной структуры.

Следует отметить, что устойчивость молекулы G-фактора к действию протеиназ значительно увеличивается в присутствии GTP или GDP [41, 49] и в первую очередь не происходит первоначальный разрыв полипептидной цепи в N-концевой части молекулы. Как оказалось, первичный разрыв под действием трипсина происходит в положении 58–59, а под действием термолизина основной разрыв происходит в положении 59–60 [49]. Исследование первичной структуры триптических фрагментов G-фактора [48] показало, что экспонированный остаток цистеина находится в положении 113 и его модификация также блокируется присутствием гуаниловых нуклеотидов [41, 45]. Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что нуклеотидсвязывающий участок заключен в рамках последовательности 58–113. Какие конкретно аминокислотные остатки формируют нуклеотидсвязывающий участок, пока не ясно. Известно только, что модификация одного остатка аргинина инактивирует фактор G во всех рибосомозависимых реакциях [50], и авторы предполагают, что именно этот остаток аргинина входит в нуклеотидсвязывающий участок.

Как уже упоминалось выше, все триптические фрагменты имеют в качестве С-концевой аминокислоты аргинин, т. е. расщепление полипептидной цепи белка происходит только по остаткам аргинина. Было исследовано действие трипсина на фактор G, модифицированного по остаткам аргинина 1,2-циклогександионом [49], реагентом, предложенным для обратимой модификации гуанидиногруппы остатка аргинина в белках [51]. Оказалось, что модифицированный G-фактор распадается под действием трипсина на четыре фрагмента (см. рис. 1), а фрагменты  $T_1^*$  и  $T_2^*$  полностью охватывают полипептидную цепь белка. Смесь этих фрагментов после удаления защиты и денатурации практически не проявляла какой-либо способности образовывать комплекс с рибосомой и GTP в присутствии фусидовой кислоты, хотя фактор G, модифицированный в аналогичных условиях, после удаления защитной группы и денатурации сохранял свыше 70% исходной активности. Очевидно, эти фрагменты в результате слабого взаимодействия друг с другом не способны образовывать гибридную молекулу, обладающую функциональной активностью. Иными словами, наличие ковалентной связи между С- и N-концевыми фрагментами G-фактора принципиально важно для проявления его функциональной активности.

Высокая специфичность действия протеиназ на молекулу фактора G и высокая устойчивость образующихся фрагментов к дальнейшему действию ферментов, очевидно, обусловлена их компактной структурой, и, ве-

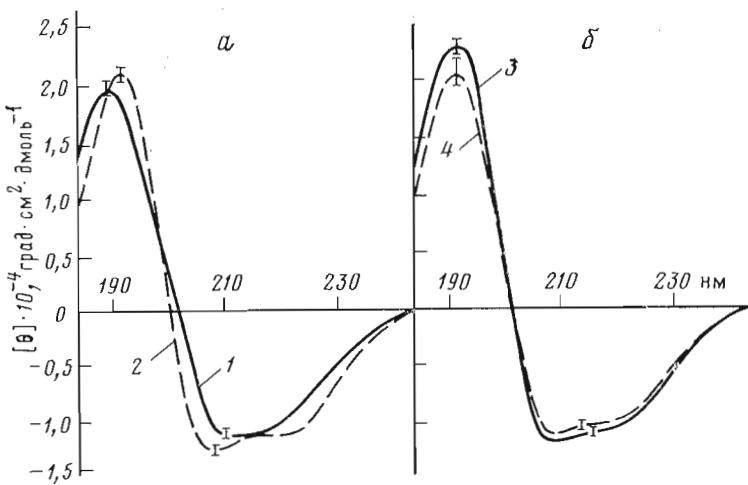


Рис. 2. Спектры КД EF-G (3) и его триптических фрагментов  $T_5$  (1) и  $T_2^*$  (2), а также спектры КД суммы фрагментов  $T_5$  и  $T_2^*$  (4), вычисленный из кривых 1 и 2 в соответствии с уравнением  $0,321 [\theta] \cdot 26 \cdot 10^3 + 0,679 [\theta] \cdot 55 \cdot 10^3$

вероятно, фрагменты в составе целой молекулы белка существуют как независимые структурные единицы — домены. С целью подтверждения этого предположения было проведено исследование G-фактора и его триптических фрагментов методами сканирующей микрокалориметрии и кругового дихроизма [44]. Для этой цели фрагменты выделяли гель-фильтрацией на сепадексе G-150 в неденатурирующих условиях (20 mM трис-HCl, 0,35 M KCl, 5 mM  $\beta$ -меркаптоэтанол, pH 7,5; 35°C). В этих условиях были выделены с большим выходом фрагмент  $T_5$  и смесь фрагментов  $T_3$  и  $T_6$ . Смесь фрагментов  $T_3$  и  $T_6$  образует стабильный комплекс (далее фрагмент  $T_2^{**}$ ), который не разрушается ни длительным диализом на ультрафильтре, ни гель-фильтрацией. Комплекс по свойствам аналогичен фрагменту  $T_2$  и диссоциирует только в присутствии 6 M мочевины. Ни фрагмент  $T_2^{**}$ , ни его эквимольная смесь с фрагментом  $T_5$  не проявляют какой-либо активности в рибосомозависимых реакциях. Очевидно, эти фрагменты (так же как и в обсужденном выше случае) не способны образовывать гибридную функционально активную молекулу из-за отсутствия (или слабого) взаимодействия между ними. При электрофорезе в поликарбамидном геле в неденатурирующих условиях эти фрагменты ведут себя как две независимые молекулы. Однако фрагмент  $T_2^{**}$  способен образовывать бинарные комплексы с гуаниловыми нуклеотидами с константами диссоциации, близкими для целого белка [52].

Из данных кругового дихроизма [44] (рис. 2) следует, что фрагменты  $T_2^{**}$  и  $T_5$  значительно различаются по вторичной структуре. С другой стороны, оптические свойства фрагментов практически полностью аддитивны, т. е. при расщеплении молекулы не происходит достаточно крупных конформационных изменений, которые могли бы отразиться в спектрах КД. Таким образом, в терминах общей упаковки полипептидных цепей фрагменты ведут себя как независимые структурные единицы — домены в молекуле фактора G. Степень их взаимодействия в составе целой молекулы белка, вероятно, невелика, что следует из некооперативности плавления G-фактора [44]. Тем не менее такое взаимодействие существует, поскольку оба фрагмента в составе целого фактора несколько стабилизируют друг друга, в результате чего их плавление становится более кооперативным ( $\Delta H^\text{u,n}$  для фактора G,  $T_2^{**}$  и  $T_5$  равно 598, 420 и 444 кДж·моль<sup>-1</sup> соответственно) (табл. 1 и рис. 3).

Необходимо отметить, что стабильность белка уменьшается с увеличением pH раствора, что выражается значительным изменением формы

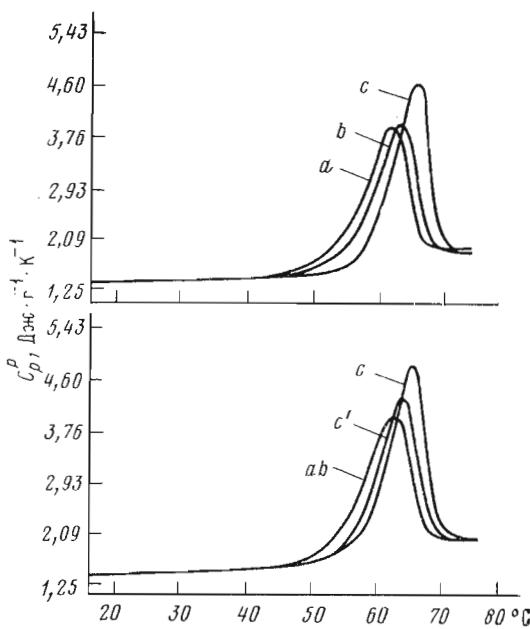


Рис. 3. Температурная зависимость парциальной удельной теплоемкости ( $C_p^p$ ) EF-G и его фрагментов: EF-G (кривые *c*);  $T_5$  (кривая *a*) и  $T_2^{**}$  (кривая *b*) в 20 мМ фосфате калия, pH 7,5; EF-G в 20 мМ фосфате калия в присутствии 350 мМ KCl, pH 7,5 (кривая *c'*) и алгебраическая сумма удельных теплоемкостей фрагментов  $T_5$  и  $T_2^{**}$  в 20 мМ фосфате калия, pH 7,5 (кривая *ab*)

кривой теплопоглощения (рис. 4) [53]. Количественный термодинамический анализ кривых плавления показал, что молекула фактора G проходит по крайней мере через два относительно стабильных состояния. При нейтральных pH переход между этими состояниями может отражать разрушение кооперативных блоков с молекулярными массами 10 000, 30 000 и 40 000, которые различаются по стабильности. Увеличение pH раствора приводит, вероятно, к расщеплению наибольшего блока на два с молекулярными массами около 10 000 и 30 000. Сложность кривых плавления и чувствительность их формы к изменению pH раствора можно объяснить различным действием среды на стабильность структуры блоков и/или на энергию их взаимодействия. Из калориметрических данных трудно количественно определить энергию взаимодействия доменов в составе фактора G. Однако можно отметить следующее: а) энтальпия взаимодействия бесконечно мала, поскольку величины удельной теплоты плавления для G-фактора и фрагментов практически одинаковы; б) свободная энергия взаимодействия также мала, поскольку разрыв ковалентной связи между фрагментами приводит к их диссоциации. Можно предположить, что слабая связь между N- и C-концевыми доменами в факторе G может быть важна в функциональном аспекте.

Таблица 1

Термодинамические параметры плавления фактора G и его триптических фрагментов  $T_2^{**}$  и  $T_5$  в 20 мМ фосфате калия, pH 7,5, в отсутствие (–) или в присутствии (+) 0,35 М KCl<sup>1</sup>

Образец	$Q_{\text{пл}}$ , Дж·г <sup>-1</sup>		$T_{\text{пл}}$ , °C		$\Delta H_{\text{выч}}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>		$\Delta H_{\text{V.H.}}$ , кДж·моль <sup>-1</sup>	
	–	+	–	+	–	+	–	+
EF-G	19,2±1,0	18,4±1,0	65,5±0,2	64±0,2	1560±80	1490±80	598±30	540±30
$T_5$	19,6±1,0	19,6±1,0	61,8±0,2	–	510±80	–	444±40	–
$T_2^{**}$	19,6±1,0	19,6±1,0	62,9±0,2	–	1085±80	–	420±40	–

<sup>1</sup>  $Q_{\text{пл}}$  — удельная теплота плавления,  $\Delta H_{\text{выч}}$  и  $\Delta H_{\text{V.H.}}$  — энтальпия, измеренная экспериментально и вычислена по уравнению Вант-Гоффа.

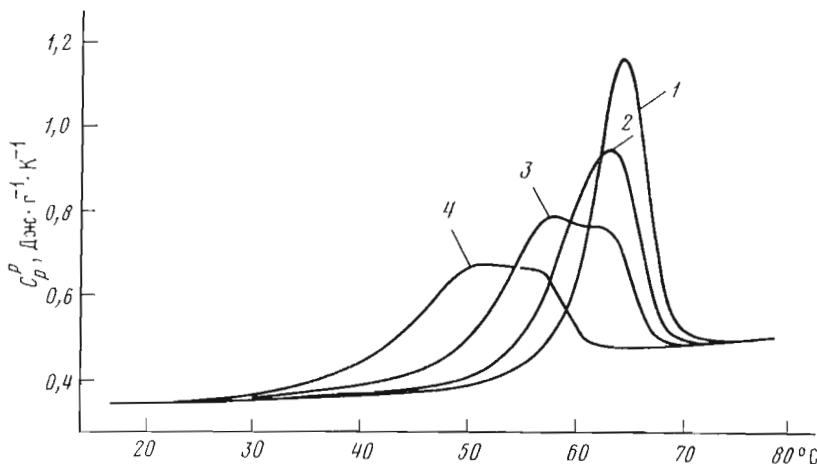


Рис. 4. Зависимость от pH изменения теплопоглощения фактора элонгации G в растворе с низкой ионной силой (раствор содержит 20 мМ фосфат калия или 20 мМ 3-(циклогексиламин)-пропансульфокислоту). Кривые соответствуют pH 7,5 (1), 9,5 (2), 10,15 (3) и 10,85 (4). В этих условиях соответствующие энталпии плавления равны 373, 360, 338 и 313 кДж/моль

#### 4. Исследование конформационных состояний фактора G методами химической модификации и поляризованной флуоресценции

Как уже упоминалось выше, GTP-связывающий участок и, вероятно, участок взаимодействия G-фактора с рибосомой расположены в N-концевом домене. Оставалась неясной роль C-концевого домена. Тот факт, что смесь фрагментов  $T_2^{**}$  и  $T_5$  не активна во всех рибосомозависимых реакциях из-за слабого взаимодействия между ними или полного отсутствия такого, заставляет предположить, что C-концевой домен в составе G-фактора формирует часть или еще один участок взаимодействия с рибосомой. Для подтверждения этого было проведено исследование доступности остатков тирозина для модифицирующих реагентов (иод и тетранитрометан) в свободном факторе G и в его комплексах с гуаниловыми нуклеотидами и 50S субъединицей или 70S рибосомой [54].

Оказалось, что молекула фактора G содержит два экспонированных остатка тирозина, которые и претерпевают модификацию в первую очередь. Эти остатки тирозина расположены в C-концевом домене. Состояние этих остатков принципиально важно для функциональной активности фактора элонгации G, поскольку их модификация как тетранитрометаном, так и иодом приводит к инактивации G-фактора во всех рибосомозависимых реакциях. Однако модификация не действует на способность фактора G образовывать бинарные комплексы с гуаниловыми нуклеотидами. Более того, исследование кинетики модификации белка тетранитрометаном с различными его избытками показало, что скорость модификации значительно выше в присутствии GTP. Присутствие GDP или GMP также увеличивает скорость модификации, но в значительно меньшей степени. С другой стороны, связывание фактора G с 70S рибосомой или 50S субчастицей эффективно защищает остатки тирозина от модификации, т. е. модифицируемые остатки тирозина, вероятно, входят в состав одного из участков полипептидной цепи белка, взаимодействующих с рибосомой. Интересно, что модификация тирозиновых остатков не приводит к каким-либо изменениям во вторичной структуре. Спектры КД пативного и модифицированного фактора G идентичны [54].

Из приведенных данных следует, что GTP-связывающий участок и один участок взаимодействия с рибосомой расположены в N-концевом домене [47], а еще один участок взаимодействия с рибосомой расположен в C-концевом домене. Возможно, что N- и C-концевые части G-фактора при

взаимодействии с GTP образуют общий участок взаимодействия с рибосомой, поскольку, как уже упоминалось выше, гуаниловые нуклеотиды изменяют сродство фактора к рибосоме. Кроме того, посадка нуклеотида в N-концевом домене изменяет реактивность остатков тирозина в C-концевом домене. Эти данные позволяют предположить, что приобретение или потеря фактором сродства к рибосоме, вызванная заменой в тройном комплексе одного гуанилового нуклеотида на другой, происходит в результате конформационных изменений в участках связывания с рибосомой или, возможно, изменения взаимного расположения N- и C-концевых доменов. Во всяком случае, происходящие изменения в молекуле фактора G охватывают как N-, так и C-концевую части молекулы. В пользу этого говорят данные, полученные при исследовании фактора G и его N-концевого триптического фрагмента с  $M_r$  56 000 (фрагмент  $T_2^{**}$ ), а также их производных, несущих на экспонированном остатке цистеина флуоресцирующую группу (аминородамин B) методом поляризованной флуоресценции [52].

Исследование подвижности флуоресцирующей группы при воздействиях на фактор G или фрагмент  $T_2^{**}$ , не приводящих к изменению их вторичной структуры (добавление нуклеотидов, изменение pH раствора от 7,5 до 10,0), показало, что связывание нуклеотидов фактором G при pH 7,5 вызывает определенные изменения в спектре времен релаксации флуоресцирующей метки (см. табл. 2). В том же случае, когда C-концевой фрагмент отсутствует либо пространственная структура G-фактора дестабилизирована (pH 10,0) [53], связывание нуклеотидов практически не оказывается на релаксационных свойствах флуоресцирующей метки. Исходя из полученных данных, можно заключить, что экспонированная SH-группа фактора G не находится непосредственно в участке связывания нуклеотидов, а локализована в области между N- и C-концевыми частями молекулы белка. Включение C-концевого домена в формирование окружения экспонированной SH-группы подтверждается также тем фактом, что различия в релаксационных свойствах флуоресцирующей группы G-фактора и фрагмента  $T_2^{**}$  в нейтральных pH в отсутствие нуклеотидов полностью исчезают при повышении pH до 10,0, т. е. при дестабилизации их пространственной структуры.

Таким образом, можно сделать вывод, что C-концевой домен участвует в изменении окружения экспонированного остатка цистеина, расположенного в N-концевом домене, при взаимодействии фактора G с гуаниловыми нуклеотидами. Такое изменение окружения может быть вызвано, например, весьма незначительным изменением взаимного расположения N- и C-концевых частей молекулы фактора G. В пользу этого предположения свидетельствует зависимость релаксационных свойств флуоресцирующей метки на экспонированном остатке цистеина от субстрата (GTP или GDP) и стабильности пространственной структуры. Этот результат полностью согласуется с обсужденными выше данными, которые показывают, что связывание гуаниловых нуклеотидов фактором G приводит к увеличению доступности остатков тирозина, расположенных в его C-концевом домене, для модифицирующего реагента. При этом действие GDP и GTP направлено в одну сторону, но отличается по величине эффекта.

В свете этих данных можно предложить гипотетическую модель молекулы фактора G (см. рис. 5), в которой N- и C-концевые фрагменты соединены шарниром и в пространстве между ними локализованы нуклеотид-связывающий центр, экспонированный остаток цистеина и часть остатков тирозина. Посадка нуклеотида в N-концевой части фактора G (при нейтральных pH) индуцирует смещение C-концевого домена относительно N-концевой части, в результате которого происходит изменение окружения экспонированного остатка цистеина (и подвижности расположенной на нем флуоресцирующей метки), находящегося в N-концевой части. Одновременно меняется окружение некоторых остатков тирозина C-концевого домена (при этом увеличивается доступность этих остатков для модификации). Зависимость этих эффектов от связываемого субстрата

*Таблица 2*  
 Релаксационные характеристики флуоресцирующей группы (амилородамин В), ковалентно присоединенной к SH-группе фактора G  
 и его N-концевого фрагмента T<sub>2\*\*</sub>

Условия	EE-G ( $\tau_{\text{цел}} 200 \text{ нс}$ )			$T_2^* (\tau_{\text{цел}} 140 \text{ нс})$			
	$\tau_\varphi$		$\tau$	$\tau_{\text{вн}}$		$\tau$	
	$f$	$\text{HC}$	$f$	$\text{HC}$	$\tau_{\text{вн}}$		
20 мМ Фосфат калия, pH 7,5	0,15±0,02	2,1±0,1	48±3	62±6	0,10±0,01	2,0±0,1	32±2
20 мМ Фосфат калия, pH 7,5, GTP	0,19±0,02	1,9±0,1	140±7	460±50	0,09±0,01	2,1±0,1	33±2
20 мМ Фосфат калия, pH 7,5, CDP	0,20±0,02	1,9±0,1	70±4	110±10	0,10±0,01	2,1±0,1	32±2
20 мМ CAPS, pH 10	0,13±0,01	2,2±0,1	24±2	31±3	0,12±0,01	2,0±0,1	26±2
20 мМ CAPS, pH 10, GTP	0,17±0,02	2,1±0,1	25±2	29±3	—	—	—
20 мМ CAPS, pH 10, GDP	0,18±0,02	2,2±0,1	26±2	30±3	—	—	—

*Примечание.* CAPS — 3-циклогексиламинопропансульфоновая кислота;  $\tau$  — среднее время «медленных» релаксационных процессов;  $\tau_{\text{цел}}$  — время вращательной диффузии целой молекулы белка;  $\tau_{\text{вн}}$  — время «медленных» внутримолекулярных движений, вычисленное по формуле  $\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{\text{вн}}} + \frac{1}{\tau_{\text{цел}}}$ ;  $\tau_\varphi$  — время жизни в возбужденном состоянии;  $\varphi$  — поляризация флуоресценции «быстрых» крутильных колебаний.

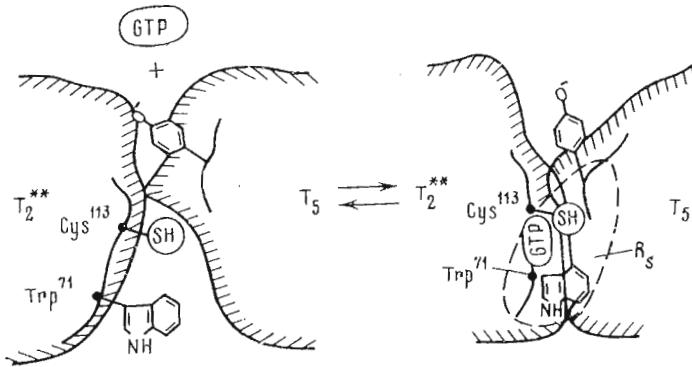


Рис. 5. Гипотетическая модель состояний G-фактора в свободном виде и в комплексе с GTP.  $R_g$  – участок взаимодействия с рибосомой

(GTP или GDP) свидетельствует о наличии субстратзависимых конформационных состояний белка. Состояние фактора G в комплексе с GDP является промежуточным между состояниями в комплексе с GTP и в свободном виде. В пользу этого положения говорят также данные по исследованию конформационных изменений в молекуле фактора G в его комплексах с гуаниловыми нуклеотидами с помощью гидрофобного зонда [29]. Таким образом, можно предположить, что изменение средства G-фактора к рибосоме, вызываемое заменой гуаниловых нуклеотидов, обусловлено изменением взаимного расположения отдельных доменов в молекуле белка при рибосомозависимом гидролизе GTP.

Для подтверждения участия С-концевого домена в конформационных изменениях в районе нуклеотидсвязывающего участка G-фактора было проведено исследование по изучению свойств и роли остатков триптофана в белке методами химической модификации и поляризованной флуоресценции [55]. Оказалось, что два остатка триптофана (из шести в молекуле белка) в положениях 51 и 71 с N-конца молекулы фактора G локализованы на поверхности белковой глобулы. Остаток триптофана в положении 71 эффективно защищается от модификации при связывании фактором G гуаниловых нуклеотидов. Модификация этих остатков триптофана не приводит к потере нуклеотидсвязывающей способности, но полностью ингибирует связывание G-фактора с рибосомой. С другой стороны, методом поляризованной флуоресценции показано, что релаксационные свойства поверхностных остатков триптофана существенным образом зависят как от присутствия С-концевого домена, так и от посадки нуклеотидов в нуклеотидсвязывающий участок, расположенный в N-концевой части G-фактора (см. табл. 3). Анализ этих данных позволил предположить, что часть полипептидной цепи С-концевого домена, нуклеотидсвязывающий участок и участок, ответственный за связывание с рибосомой, сближены в пространственной структуре белка.

Все полученные пока не позволяют представить организацию функциональных участков молекулы фактора элонгации G. Тем не менее проведенные исследования впервые позволили получить представление о взаимном расположении нуклеотидсвязывающего участка и участка взаимодействия с рибосомой в молекуле белка и высказать предположение о возможном механизме приобретения или потери G-фактором средства к рибосоме.

## 5. Исследование первичной структуры фактора элонгации G

Основные данные по первичной структуре фактора G были получены при исследовании фрагментов ограниченного триптического гидролиза [22, 48, 49, 56–59]. Как уже выше обсуждалось, подробная характеристика фрагментов ограниченного трипсинолиза G-фактора позволила рас-

Таблица 3

Релаксационные характеристики остатков триптофана в факторе G  
и фрагменте  $T_2^{**}$

Условия	EF-G, M 81 000 ( $\tau_{\text{дел}} 200 \text{ нс}$ )			
	$\tau_\phi$	$\tau$	$f$	$\tau_{\text{ВН}}$ , нс
	нс	нс		
20 мМ фосфат калия, pH 7,5	$4,9 \pm 0,2$	$47 \pm 3$	$0,09 \pm 0,01$	$61 \pm 6$
20 мМ фосфат калия, pH 7,5; 200-кратный мольный избыток GTP	$4,9 \pm 0,2$	$60 \pm 3$		
20 мМ фосфат калия, pH 7,5; 30-кратный мольный избыток 2-окси-5-нитробензилбромида	$4,7 \pm 0,2$	$52 \pm 3$		
Условия	$T_2^{**}, M 55 000 (\tau_{\text{дел}} 140 \text{ нс})$			
	$\tau_\phi$	$\tau$	$f$	$\tau_{\text{ВН}}$ , нс
	нс	нс		
20 мМ фосфат калия, pH 7,5	$5,0 \pm 0,2$	$51 \pm 3$	$0,25$	$80 \pm 8$
20 мМ фосфат калия, pH 7,5; 200-кратный мольный избыток GTP	$5,0 \pm 0,2$	$69 \pm 4$		
20 мМ фосфат калия, pH 7,5; 30-кратный мольный избыток 2-окси-5-нитробензилбромида	—	—		

положить их по полипептидной цепи белка и локализовать экспонированную SH-группу [22].

При инкубировании фактора G с трипсином в конечном итоге образуется пять фрагментов ( $T_3-T_7$ ), сравнительно устойчивых к дальнейшему действию фермента. Наиболее устойчивым к дальнейшему трипсинолизу является фрагмент  $T_5$ , а фрагмент  $T_3$ , отщепляя N-концевую часть из 69 аминокислотных остатков (фрагмент  $T_7$ ), превращается во фрагмент  $T_4$ . Необходимо отметить, что дополнительным трипсинолизом не удается полностью превратить фрагмент  $T_3$  во фрагменты  $T_4$  и  $T_7$ . Увеличение времени инкубирования с трипсином или увеличение количества трипсина приводит к постепенной деградации как фрагмента  $T_3$ , так и  $T_4$ . Достаточно быстро распадается фрагмент  $T_6$ , представляющий собой N-концевую часть белка. Таким образом, исследование первичной структуры фактора G свелось к определению аминокислотных последовательностей четырех фрагментов ( $T_4-T_7$ ), которые охватывают всю полипептидную цепь белка, и к нахождению пептидов, объединяющих фрагменты ограниченного трипсинолиза в одну полипептидную цепь.

Из данных аминокислотного анализа и определения молекулярной массы пептидных фрагментов — продуктов триптического гидролиза — можно было сделать вывод, что при ограниченном трипсинолизе не происходит отщепления сколько-нибудь значительных участков полипептидной цепи, не вошедших в состав этих фрагментов. Более того, при исследовании продуктов бромцианового расщепления фактора G был выделен ряд пептидов, выяснение структуры которых не только позволило объединить в одну полипептидную цепь все фрагменты ограниченного трипсинолиза, но и показало, что между этими фрагментами действительно нет никаких вставок, т. е. трипсин производит точечные разрывы полипептидной цепи белка.

Фрагмент  $T_6$  является N-концевым, вслед за ним по цепи располагается фрагмент  $T_7$ , который содержит функционально важный остаток цистеина. В районе этого фрагмента расположен GTP-связывающий уча-

сток. За фрагментом  $T_7$  располагается фрагмент  $T_4$ , и, наконец, следует фрагмент  $T_5$ , представляющий собой С-концевую часть молекулы G-фактора.

Исследование структуры фрагментов  $T_5-T_7$  [56–59] оказалось достаточно простым ввиду их сравнительно небольшой молекулярной массы ( $M$  6500 – для  $T_6$ , 7500 – для  $T_7$  и 25 000 – для  $T_5$ ). С помощью традиционных химических и энзиматических методов расщепления полипептидной цепи были установлены полностью первичные структуры фрагментов  $T_6$ ,  $T_7$  и  $T_5$ , в сумме охватывающие свыше 350 аминокислотных остатков.

При характеристике фрагментов ограниченного трипсинолиза G-фактора было показано, что все фрагменты в качестве С-концевого аминокислотного остатка имеют аргинин, в то время как С-концевым аминокислотным остатком G-фактора является лизин. При изучении продуктов расщепления бромцианом целой молекулы белка был выделен пептид, имеющий последовательность, полностью аналогичную С-концевому бромциановому пептиду фрагмента  $T_5$ , но отличающейся от последнего на два аминокислотных остатка с С-конца: Gly-Lys. На этом основании был сделан вывод, что при ограниченном трипсинолизе G-фактора происходит отщепление С-концевого дипептида [59].

Для получения перекрытий между фрагментами ограниченного трипсинолиза и выяснения структуры фрагмента  $T_4$ , представляющего собой среднюю часть полипептидной цепи белка с  $M$  41 000, исследовались продукты бромцианового расщепления целой молекулы фактора G [60, 61]. В результате были выделены все 23 бромциановых пептида, в том числе 12 пептидов, составляющих структуру фрагмента  $T_4$ . Таким образом, исследование структуры фрагмента  $T_4$  свелось к выяснению аминокислотной последовательности 12 пептидов бромцианового расщепления и нахождению перекрытий между ними. Для получения перекрывающих пептидов был использован гидролиз фрагмента  $T_4$  трипсином, стафилококковой глутаминовой протеиназой и расщепление молекулы белка по связям Asp-Pro. Для выделения SH- и S–S-содержащих пептидов, входящих в состав фрагмента  $T_4$ , использовалась ковалентная хроматография на тиолактивированной сефарозе.

Приведенные данные по исследованию аминокислотных последовательностей фрагментов ограниченного трипсинолиза фактора G, а также пептидов бромцианового расщепления позволили представить полную первичную структуру фактора элонгации G [61]. Его полипептидная цепь состоит из 701 аминокислотного остатка и имеет молекулярную массу 77 321,46. Полная первичная структура приведена на схеме.

Отдельные участки аминокислотной последовательности недавно были подтверждены изучением нуклеотидной последовательности гена, кодирующего G-фактор. В частности, при изучении оперона *E. coli* [62] была установлена нуклеотидная последовательность, соответствующая 92 аминокислотным остаткам с N-конца белковой молекулы, а при выяснении нуклеотидной последовательности гена *lufA*, кодирующего фактор элонгации Ti, была установлена структура участка гена, кодирующего С-концевую часть фактора G из 20 аминокислотных остатков [63]. В обоих случаях наблюдается полное совпадение аминокислотных последовательностей, установленных химическим методом и выведенных на основании исследования структуры ДНК.

## 6. Особенности первичной структуры G-фактора

Аминокислотный состав G-фактора, вычисленный из аминокислотной последовательности, находится в хорошем соответствии с установленным экспериментально с учетом поправки на точный молекулярный вес. Белок содержит пять остатков цистеина, два из которых образуют S–S-связь (положения 296 и 392 в полипептидной цепи). SH-группа остатка цистеина в положении 113 обладает повышенной реакционной способностью, и ее модификация приводит к резкому уменьшению сродства комплекса G-фактора с GTP к рибосоме.

Полная первичная структура фактора элонгации G

Ala-Arg-Thr-Thr-Pro-Ile-Ala-Arg-Tyr-Arg-Asn-Ile-Gly-Ile-Ser-Ala-His-Ile-Asp-Ala-	20
30	40
Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Glu-Arg-Ile-Leu-Phe-Tyr-Thr-Gly-Val-Asn-His-Lys-Ile-Gly-	50
50	60
Glu-Val-His-Asp-Gly-Ala-Ala-Thr-Met-Asp-Trp-Met-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Arg-Gly-Ile-	70
70	80
Thr-Ile-Thr-Ser-Ala-Ala-Thr-Thr-Ala-Phe-Trp-Ser-Gly-Met-Ala-Lys-Gln-Tyr-Glu-Pro-	90
90	100
His-Arg-Ile-Asn-Ile-Ile-Asp-Thr-Pro-Gly-His-Val-Asp-Phe-Thr-Ile-Glu-Val-Glu-Arg-	110
110	120
Ser-Met-Arg-Val-Ileu-Asp-Gly-Ala-Val-Met-Val-Tyr-Cys-Ala-Val-Gly-Gly-Val-Gln-Pro-	130
130	140
Gln-Ser-Glu-Thr-Val-Trp-Arg-Gln-Ala-Asn-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Arg-Ile-Ala-Phe-Val-	150
150	160
Asn-Lys-Met-Asp-Arg-Met-Gly-Ala-Asn-Phe-Leu-Lys-Val-Val-Asn-Gln-Ile-Lys-Thr-Arg-	170
170	180
Leu-Gly-Ala-Asn-Pro-Val-Pro-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Gly-Ala-Glu-Glu-His-Phe-Thr-Gly-	190
190	200
Val-Val-Asp-Leu-Val-Lys-Met-Lys-Ala-Ile-Asn-Trp-Asn-Asp-Ala-Asp-Gln-Gly-Val-Thr-	210
210	220
Phe-Glu-Tyr-Glu-Asp-Ile-Pro-Ala-Asp-Met-Val-Glu-Leu-Ala-Asn-Glu-Trp-His-Gln-Asn-	230
230	240
Leu-Ile-Glu-Ser-Ala-Ala-Glu-Ala-Ser-Glu-Glu-Leu-Met-Glu-Lys-Tyr-Leu-Gly-Gly-Glu-	250
250	260
Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-Ile-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Arg-Val-Leu-Asn-Asn-Glu-Ile-	270
270	280
Ile-Leu-Val-Thr-Cys-Gly-Ser-Ala-Phe-Lys-Asn-Lys-Gly-Val-Gln-Ala-Met-Leu-Asp-Ala-	290
290	300
Val-Ile-Asp-Tyr-Ile-Pro-Ser-Pro-Val-Asp-Val-Pro-Ala-Ile-Asp-Cys*-Ile-Leu-Lys-Asp	310
310	320
Thr-Pro-Ala-Glu-Arg-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Glu-Pro-Phe-Ser-Ala-Leu-Ala-Phe-Lys-Ile-	330
330	340
Ala-Thr-Asp-Pro-Phe-Val-Gly-Asn-Leu-Thr-Phe-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Gly-Val-Val-Asn-	350
350	360
Ser-Gly-Asp-Thr-Val-Leu-Asn-Ser-Val-Lys-Ala-Ala-Arg-Glu-Arg-Phe-Gly-Arg-Ile-Val-	370
370	380
Gln-Met-His-Ala-Asn-Lys-Arg-Glu-Glu-Ile-Lys-Glu-Val-Arg-Ala-Gly-Asp-Ile-Ala-Ala-	390
390	400
Ala-Ile-Gly-Leu-Lys-Asp-Val-Thr-Thr-Gly-Asp-Cys*-Leu-Cys-Asp-Pro-Asp-Ala-Pro-Ile	410
410	420
Ile-Leu-Glu-Arg-Met-Glu-Phe-Pro-Glu-Pro-Val-Ile-Ser-Ile-Ala-Val-Glu-Pro-Lys-Thr-	430
430	440
Lys-Ala-Asp-Gln-Glu-Lys-Met-Gly-Leu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Ala-Lys-Glu-Asp-Pro-Ser-	450
450	460
Phe-Arg-Val-Trp-Thr-Asp-Glu-Glu-Ser-Asn-Gln-Thr-Ile-Ile-Ala-Gly-Met-Gly-Glu-Leu-	470
470	480
His-Leu-Asp-Ile-Ile-Val-Asp-Arg-Met-Lys-Arg-Glu-Phe-Asn-Val-Glu-Ala-Asn-Val-Gly-	490
490	500
Lys-Pro-Gln-Val-Ala-Tyr-Arg-Glu-Thr-Ile-Arg-Gln-Lys-Val-Thr-Asp-Val-Glu-Gly-Lys-	510
510	520
His-Ala-Lys-Gln-Ser-Gly-Gly-Arg-Gly-Glu-Tyr-Gly-His-Vai-Val-Ile-Asp-Met-Tyr-Pro-	530
530	540
Leu-Glu-Pro-Gly-Ser-Asn-Pro-Lys-Gly-Tyr-Glu-Phe-Ile-Asn-Asp-Ile-Lys-Gly-Gly-Val-	550
550	560
Ile-Pro-Gly-Glu-Tyr-Ile-Pro-Ala-Val-Asp-Lys-Gly-Ile-Gln-Glu-Gln-Leu-Lys-Ala-Gly-	570
570	580
Pro-Leu-Ala-Gly-Tyr-Pro-Val-Val-Asp-Met-Gly-Val-Arg-Leu-His-Phe-Gly-Ser-Tyr-Lys-	590
590	600
Asp-Val-Asp-Ser-Ser-Glu-Leu-Ala-Phe-His-Leu-Ala-Ala-Ser-Ile-Ala-Phe-Lys-Glu-Gly-	610
610	620
Phe-Lys-Lys-Ala-Lys-Pro-Val-Leu-Leu-Glu-Pro-Ile-Met-Lys-Val-Glu-Val-Glu-Thr-Pro-	630
630	640
Glu-Gln-Asn-Thr-Gly-Asp-Val-Ile-Gly-Asp-Leu-Ser-Arg-Arg-Gly-Met-Leu-Lys-Gly-	650
650	660
Gln-Gln-Ser-Glu-Val-Thr-Gly-Val-Lys-Ile-His-Ala-Gln-Val-Pro-Leu-Ser-Glu-Gln-Met-	670
670	680
Phe-Gly-Tyr-Ala-Thr-Gln-Leu-Arg-Ser-Leu-Thr-Lys-Gly-Arg-Ala-Ser-Tyr-Thr-Met-Glu-	690
690	700
Phe-Leu-Lys-Tyr-Asp-Glu-Ala-Pro-Ser-Asn-Val-Ala-Gln-Ala-Val-Ile-Glu-Ala-Arg-Gly-	
Lys	

Cys\* - остатки цистеина, образующие S-S связи.

Аминокислотный состав G-фактора несколько отличается от среднего состава глобулярных белков. G-фактор содержит повышенное количество заряженных и алифатических гидрофобных аминокислотных остатков, а содержание незаряженных гидрофильных остатков несколько понижено. Количество кислых аминокислотных остатков немногого превышает количество основных (15,5 и 14,5% соответственно). В этом отношении аминокислотный состав G-фактора подобен составу фактора элонгации Tu. Однако фактор элонгации Tu содержит повышенное количество остатков треоинса. Соотношение треоин/серин для Tu-фактора - 2,7, для G-фактора - 1,28, среднее для глобулярных белков - 0,85. Фрагменты ограни-

ченного трипсинолиза отличаются друг от друга по соотношению кислых и основных остатков. Во фрагменте  $T_6$  соотношение равно 0,8, во фрагменте  $T_7 - 1$ , во фрагменте  $T_4 - 1,27$  и во фрагменте  $T_5 - 0,74$ . Наибольшее количество кислых аминокислотных остатков во фрагменте  $T_4$ , где они во многих местах группируются в кластеры, например -Glu-Tyr-Glu-Asp-(положения 202–205), -Glu-Ala-Ser-Glu-Glu-Leu-Met-Glu-(положения 227–234), -Glu-Glu-Leu-Thr-Glu-Ala-Glu-(положения 240–246), -Asp-Asp-Glu-(положения 309–311), -Glu-Glu-Ile-Lys-Glu-(положения 368–372), -Asp-Glu-Glu-(положения 446–448). Интересный кластер кислых остатков содержится на С-концевой части фрагмента  $T_6$ . Из восьми кислых остатков во фрагменте четыре расположены непосредственно друг возле друга: -Asp-Trp-Met-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-(положения 50–57). Кроме того, основные аминокислотные остатки также образуют несколько кластеров, например -Arg-Met-Lys-Arg-(положения 468–471), -Lys-Lys-Ala-Lys-(положения 602–605), -Arg-Arg-Arg-(положения 633–635).

Из шести остатков триптофана пять остатков расположены в N-концевой части молекулы. Два остатка в положениях 51 и 71 обладают повышенной реакционной способностью и легко претерпевают модификацию под действием модифицирующих агентов. Всего в молекуле белка 19 остатков тирозина, и 10 из них расположены в С-концевом домене. Два остатка тирозина в С-концевом домене обладают пониженной величиной р $K$  фенольного гидроксила и легко претерпевают модификацию. Эффективность модификации как остатков триптофана, так и остатков тирозина зависит от присутствия гуаниловых нуклеотидов. Однако если присутствие GTP или GDP блокирует модификацию остатка триптофана в положении 71, то наличие нуклеотида значительно увеличивает скорость модификации остатков тирозина. С другой стороны, если G-фактор находится в составе комплекса с рибосомой и GDP, то степень модификации остатков тирозина резко уменьшается. Неравномерно распределены по полипептидной цепи остатки гистидина. В 91 остаток с N-конца полипептидной цепи белка входят пять остатков гистидина, а фрагменты  $T_4$  и  $T_5$  содержат также по пять остатков. Концентрирование ароматических аминокислотных остатков, в частности остатков гистидина и триптофана в N-концевой части, а остатков гистидина и тирозина в С-концевой части полипептидной цепи белка, очевидно, связано с формированием этими частями молекулы участка взаимодействия белка с рибосомой.

## 7. Сравнение аминокислотных последовательностей факторов элонгации G и Tu

Поскольку факторы G и Tu выполняют на рибосоме сходные функции, а именно обладают рибосомозависимой GTP-азной активностью, представляет интерес сравнить их аминокислотные последовательности, формирующие GTP-связывающие участки. Хотя молекула фактора G почти в 2 раза больше молекулы фактора Tu, оказалось, что у обоих белков эти участки расположены в N-концевой части молекулы. Остаток цистеина, находящийся непосредственно около GTP-связывающего участка, в обоих белках занимает сходное положение.

При сравнении аминокислотных последовательностей GTP-связывающих участков обоих белков на первый взгляд трудно обнаружить в них гомологию. Однако при учете нескольких вставок или делеций аминокислотные последовательности имеют 30% гомологии, а если принять во внимание консервативные замены, гомология составляет 45%. Эти вычисления сделаны с учетом делеции в 10 аминокислотных остатков в Tu-факторе (положение 23–32 на рис. 6). Ларсеном и Даффи [64] были вычислены конформационные параметры  $P_\alpha$ ,  $P_\beta$  и  $P_t$  для аминокислотных остатков в  $\alpha$ -спиралях,  $\beta$ -слоях и  $\beta$ -поворотах для сравниваемых участков обоих белков. Общая  $\beta$ -структура предсказана для остатков 15–20 и 67–73 и  $\beta$ -поворот — у остатков 46–49. Основное различие заключается в отсутствии  $\alpha$ -спирали в факторе Tu (остатки 21–23). Есть еще одна интересная структурная особенность сравниваемых структур: в обоих белках имеется

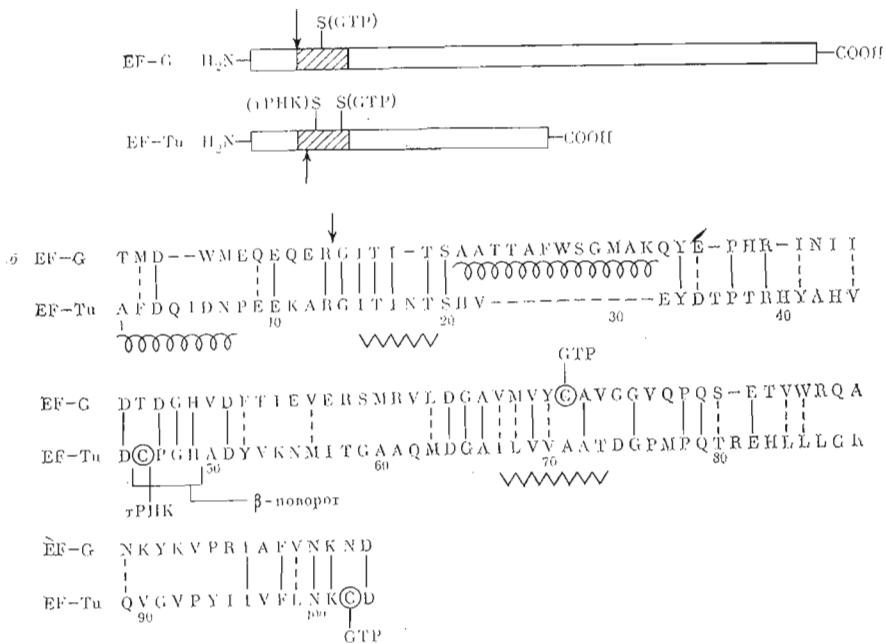


Рис. 6. а – относительные размеры молекул EF-G и EF-Tu и расположение сульфогидрильных групп, находящихся в непосредственной близости от тРНК- и GTP-связывающих участков [64]. Заштрихованы сравниваемые участки полипептидной цепи; б – сравнение аминокислотных последовательностей EF-G и EF-Tu. Сплошными вертикальными линиями указаны идентичные аминокислотные остатки, пунктирными – консервативные замены, зигзагообразными – общие  $\beta$ -структурные участки, спиральными –  $\alpha$ -спиральные участки. Стрелками указаны места атаки молекул EF-G и EF-Tu трипсином. В кружках – функционально важные остатки Cys, имеющие отношение к связыванию GTP и тРНК

последовательность ...-Arg-Gly-Ile-Thr- $\text{Ile}$ -... (участок, находящийся между фрагментами  $T_6$  и  $T_7$  в факторе G). При ограниченном триптическом гидролизе обоих белков происходит разрыв полипептидных цепей по связи Arg-Gly (положение 58–59 в EF-G и EF-Tu). Интересно, что последовательность Arg-Gly-Ile содержится также в актине (положение 62–64 [65]) и под действием ограниченного трипсинолиза проходит разрыв связи Arg-Gly в этом положении [66].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Caskey T., Leder P., Moldave K., Schlessinger D. Science, 1972, v. 176, № 4031, p. 195–197.
2. Lengyel P., Söll D. Bacteriol. Revs, 1969, v. 33, № 2, p. 264–301.
3. Lucas-Lenard J., Lipmann F. Ann. Rev. Biochem., 1971, v. 40, p. 409–448.
4. Nomura M. Science, 1973, v. 179, p. 864–873.
5. Pestka S. Ann. Rev. Microbiol., 1971, v. 25, p. 487–562.
6. Borst P., Grivell L. H. FEBS Lett., 1971, v. 43, p. 73–88.
7. Kurland C. G. Ann. Rev. Biochem., 1972, v. 41, p. 377–408.
8. Kozak M., Nathans D. Bacteriol. Revs, 1972, v. 36, № 4, p. 109–134.
9. Brot N. In: Molecular mechanisms of protein biosynthesis/Eds Weissbach H., Pestka S. New York – San Francisco – London: Acad. Press, 1977, p. 375–411.
10. Revel M., Groner Y., Pollack Y., Scheps R., Berissi H. Ciba Foundation Symp. on Polymerization in Biological Systems. Protein synthesis machinery and the regulation of messenger RNA translation, 1972, p. 69–85.
11. Haselkorn R., Rothman-Denes L. B. Ann. Rev. Biochem., 1972, v. 42, p. 397–438.
12. Haenni A. L. In: The mechanism of protein synthesis and its regulation/Ed. Bosch L. Amsterdam – London: North-Holland Publ. Co., 1972, p. 33–54.
13. Modolell I., Vazquez D. In: MTP International Rev. Science. Biochemistry, ser. 1. London: Butterworths, 1975, v. 7, p. 137–178.
14. Cox R. A., Godwin E. In: MTP International Rev. Science. Biochemistry, ser. 1. London: Butterworths, 1975, v. 7, p. 179–253.
15. Kaziro Y. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 505, № 1, p. 95–127.
16. Leder P., Skogerson L. E., Nau M. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 62, № 2, p. 454–460.

17. Parmeggiani A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1968, v. 30, p. 613–619.
18. Gottschalk E. M., Parmeggiani A. Fed. Eur. Biochem. Soc. 6th Meeting, 1969, Abstracts, p. 142.
19. Kaziro Y., Imoue-Yokosawa N., Kawakita M. J. Biochem. (Tokyo), 1972, v. 72, № 4, p. 853–863.
20. Rohrbach M. S., Dempsey M. E., Bodley J. W. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 12, p. 509–511.
21. Rohrbach M. S., Bodley J. W., Mann K. G. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 7, p. 6831–6836.
22. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1333–1334.
23. Mihalyi E. In: Handbook of biochemistry/Ed. Sober H. A. 2nd Ed. Cleveland: Chemical Rubber Co., 1970, p. 13–77.
24. Leder P. In: Advances in Protein Chemistry, 1973, v. 27, p. 213–241.
25. Gordon J. J. Biol. Chem., 1969, v. 244, № 20, p. 5680–5686.
26. Rohrbach M. S., Bodley J. W. J. Biol. Chem., 1976, v. 251, № 4, p. 930–933.
27. Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumoto K., Tanaka M., Kawakita M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1969, v. 34, p. 385–393.
28. Nishizuka Y., Lipmann F. Arch. Biochem. and Biophys., 1966, v. 116, p. 344–351.
29. Arai N., Arai K., Kaziro Y. J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 78, p. 243–246.
30. Arai N., Arai K., Maeda T., Ohnishi S., Kaziro Y. J. Biochem. (Tokyo), 1976, v. 80, № 5, p. 1057–1065.
31. Arai N., Arai K., Nakamura S., Kaziro Y. J. Biochem. (Tokyo), 1977, v. 82, № 3, p. 695–702.
32. Nishizuka Y., Lipmann F. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1966, v. 55, № 1, p. 212–219.
33. Parmeggiani A., Gottschalk E. M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 35, p. 861–867.
34. Brod N., Spears C., Weissbach H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 34, p. 843–848.
35. Kuriki Y., Inoue N., Kaziro Y. Biochim. et biophys. acta, 1970, v. 224, p. 487–497.
36. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1969, v. 37, № 3, p. 437–443.
37. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 21, p. 5656–5661.
38. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L. J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 21, p. 5662–5667.
39. Okura A., Kinoshita T., Tanaka M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1970, v. 41, № 6, p. 1545–1550.
40. Rohrbach M. S., Bodley J. W. Biochemistry, 1976, v. 15, № 21, p. 4565–4569.
41. Baca O. G., Rohrbach M. S., Bodley J. W. Biochemistry, 1976, v. 15, № 21, p. 4570–4574.
42. Girshovich A. S., Kurtschalia T. V., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1977, v. 80, p. 161–163.
43. Hammel J. P., Dreyer W. J. Biochim. et biophys. acta, 1962, v. 63, p. 530–632.
44. Alakhov Yu. B., Stengrevics O. A., Filimonov V. V., Venyaminov S. Yu. Eur. J. Biochem., 1979, v. 99, p. 585–591.
45. Marsh R. C., Chinali G., Parmeggiani A. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, p. 8344–8352.
46. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. Biochemistry, 1975, v. 14, p. 3922–3926.
47. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1978, v. 85, p. 283–286.
48. Motuz L. P., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 6, с. 814–827.
49. Алахов Ю. Б., Стенгревиц О. А., Бундулис Ю. П., Мотуз Л. П., Винокуров Л. М. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 3, с. 330–339.
50. Rohrbach M. S., Bodley J. W. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 1360–1363.
51. Pathy L., Smith E. L. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, № 2, p. 557–564.
52. Kashparov I. A., Semisotnov G. V., Alakhov Yu. B. Eur. J. Biochem., 1981, v. 118, № 2, p. 417–421.
53. Filimonov V. V., Alakhov Yu. B., Privalov P. L. Studia biophys., 1980, v. 79, p. 127–218.
54. Alakhov Yu. B., Zalite I. K., Kashparov I. A. Eur. J. Biochem., 1980, v. 105, № 3, p. 531–538.
55. Каширнов Н. А., Семисотнов Г. В., Алахов Ю. Б. Биохимия, 1981, т. 46, вып. 8, с. 1488–1498.
56. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. Биоорганическая химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1301–1313.
57. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1978, v. 85, № 2, p. 287–290.
58. Мотуз Л. П., Бундулис Ю. П., Алахов Ю. Б. Биоорганическая химия, 1979, т. 5, № 6, с. 814–827.
59. Alakhov Yu. B., Dovgas N. V., Motuz L. P., Vinokurov L. M., Ovchinnikov Yu. A. FEBS Lett., 1981, v. 126, № 2, p. 183–186.
60. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Довгас Н. В., Винокуров Л. М., Бундулис Ю. П., Бундуле М. А., Козлов В. П., Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия, 1981, т. 7, № 6, с. 937–940.
61. Ovchinnikov Yu. A., Alakhov Yu. B., Bundulis Yu. P., Bundule M. A., Dovgas N. V., Kozlov V. P., Motuz L. P., Vinokurov L. M. FEBS Lett., 1982, v. 139, № 2, p. 130–135.

62. Post L. E., Nomura M. J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 10, p. 4660–4666.
63. Yokota T., Sugisaki H., Takanami N., Kaziro Y. Gene, 1980, v. 12, p. 25–31.
64. Laursen R. A., Daffy L. FEBS Lett., 1978, v. 92, p. 200–202.
65. Rosenbuch J. P., Jacobson G. R., Jaton J.-C. J. Supramol. Struct., 1976, v. 5, № 3, p. 391–396.
66. Jacobson G. R., Rosenbuch J. P. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, № 8, p. 2742–2746.

Поступила в редакцию  
15.II.1982

## STRUCTURE AND STRUCTURE-FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE ELONGATION FACTOR G FROM *E. COLI*

ALAKHOV Yu. B.

*Institute of Protein Research, Academy of Sciences  
of the USSR, Pushchino*

The review reports the main physico-chemical characteristics of the elongation factor G (EF-G) from *E. coli*. Studies on elucidation of the nature of functionally important features of this protein molecule and conformational changes proceeding at interaction of EF-G with guanyl nucleotides are discussed. Data on the determination of the EF-G primary structure are reported. The studies on EF-G limited proteolysis which permitted not only to elucidate its complete primary structure but also to get insight into the overall organization of the molecule are discussed. In conclusion, the primary and secondary structures of the GTP-binding sites of EF-G and elongation factor EF-Tu are compared and it is shown that their amino acid sequences possess a considerable homology.