



УДК 577.112.016

СВОЙСТВА N-КОНЦЕВОГО 60-кДа ФРАГМЕНТА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ 2

© 1998 г. К. В. Коротков, А. Н. Плотников, Л. П. Мотуз,
К. С. Василенко*, Г. В. Семисотнов*, Ю. Б. Алахов#

Филиал Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142292, Пушкино Московской обл.;

*Институт белка РАН, Пушкино Московской обл.

Поступила в редакцию 01.10.97 г. Принята к печати 27.11.97 г.

N-Концевой 60-кДа фрагмент фактора элонгации 2 (EF-2) из печени крысы был получен ограниченным протеолизом нативного EF-2 эластазой. Фрагмент содержит 506 N-концевых а.о. EF-2. Конформационные свойства этого фрагмента и EF-2 в растворе были изучены методами КД и флуоресцентной спектроскопии. Вторичная структура фрагмента и фактора, определенная по данным КД, хорошо согласуется со значениями, предсказанными по первичной структуре. Оба белка устойчивы к денатурации мочевиной до концентрации 3 М и обладают кооперативными денатурационными переходами. Их температурное плавление также имеет кооперативный характер. Обсуждаются структурные свойства N-концевого 60-кДа фрагмента в сочетании с биохимическими характеристиками и третичной структурой прокариотического фактора элонгации – EF-G.

Ключевые слова: фактор элонгации 2, белковые фрагменты, ограниченный протеолиз.

Эукариотический фактор элонгации 2 (EF-2) представляет собой одну полипептидную цепь с $M \sim 95$ кДа [1]. Фактор катализирует транслокацию пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок рибосомы [2]. EF-2 образует стехиометрические бинарные комплексы с гуаниловыми нуклеотидами, и возможность взаимодействия фактора с рибосомой строго зависит от присутствия нуклеотида. Транслокация пептидил-тРНК сопровождается рибосомо- и EF-2-зависимым гидролизом GTP, приводящим к уменьшению сродства фактора к рибосоме. Таким образом, фактор может иметь по крайней мере три функциональных фрагмента, участвующих в связывании с GTP и рибосомой, и каталитический центр, ответственный за гидролиз GTP. EF-2 содержит уникальную посттрансляционную модификацию гистидина-715 – дифтаמיד [3]. Эта модификация обуславливает возможность АДР-рибозилирования белка дифтерийным токсином, в результате чего происходит инактивация фактора [3]. EF-2 также фосфорилируется специфической Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой EF-2-киназой. Участками фосфорилирования являются остатки треонина в положениях 56 и 58 [4].

В относительно больших глобулярных белках полипептидная цепь обычно сворачивается в независимые структурные образования – домены. Предполагается, что процесс сворачивания происходит независимо в каждом домене [5]. В соответствии с этой точкой зрения ожидается, что пептиды, соответствующие фрагментам белковой цепи, формирующим домены, сворачиваются в нативноподобную структуру независимо друг от друга. Ранее нами было показано [6], что N-концевые фрагменты EF-2, содержащие 162 и 244 а. о., не могут сформировать жесткую пространственную структуру. Иными словами, длины полипептидной цепи не хватает для формирования структурного домена. В данной работе мы изучили физико-химические свойства фрагментов EF-2, полученных ограниченным протеолизом.

В предыдущей работе мы показали, что протеолиз EF-2 эластазой приводит к расщеплению в одном месте ($Val^{506} - Ala^{507}$) и накоплению двух фрагментов – E1 (1–506) и E2 (507–858) с молекулярными массами около 60 и 40 кДа соответственно [7]. N-Концевой 60-кДа фрагмент (E1) был устойчив к дальнейшему расщеплению эластазой, а фрагмент E2 расщеплялся, образуя пептид E3 с молекулярной массой 32 кДа. Было показано, что предварительная модификация молекулы фактора (фосфорилирование и/или АДР-рибозилирование) не приводит к изменениям в характере расщепления. N-Концевой 60-кДа фрагмент был выделен и очищен до индивидуаль-

Автор для переписки (тел./факс: 007-0967-730653, e-mail: alakhov@fibkh.serpukhov.su).

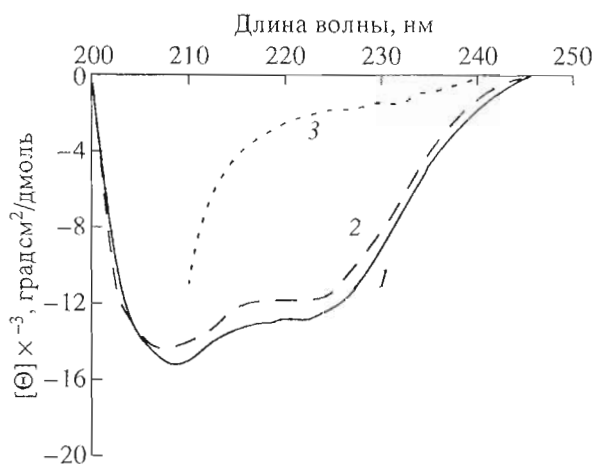


Рис. 1. Спектры КД в дальней УФ-области EF-2 (1) и фрагмента E1 (2) в неденатурирующих условиях и EF-2 в денатурирующих условиях (3).

ного состояния хроматографией на гидроксиапатите в неденатурирующих условиях. Чтобы получить общие структурные характеристики этого фрагмента и EF-2 в растворе, мы использовали несколько физико-химических методов: 1) круговой дихроизм в дальней УФ-области; 2) разворачивание мочевиной с контролем по изменению триптофановой флуоресценции; 3) тепловую денатурацию с анализом изменения КД в дальней УФ-области. Конформационные свойства фрагмента E1 и самого EF-2 обсуждаются с учетом известной кристаллической структуры прокариотического гомолога EF-2 – фактора элонгации EF-G *Thermus thermophilus* [8, 9].

Вторичная структура EF-2 и его фрагмента E1

Спектры КД EF-2 и его N-концевого 60-кДа фрагмента E1 в нативных и денатурирующих условиях (рис. 1) указывают на наличие у них в неденатурирующих условиях выраженной вторичной структуры. В таблице представлены данные по разложению экспериментальных спектров КД на α -спиральные и β -структурные составляющие, полученные по методу [10], а также предсказан-

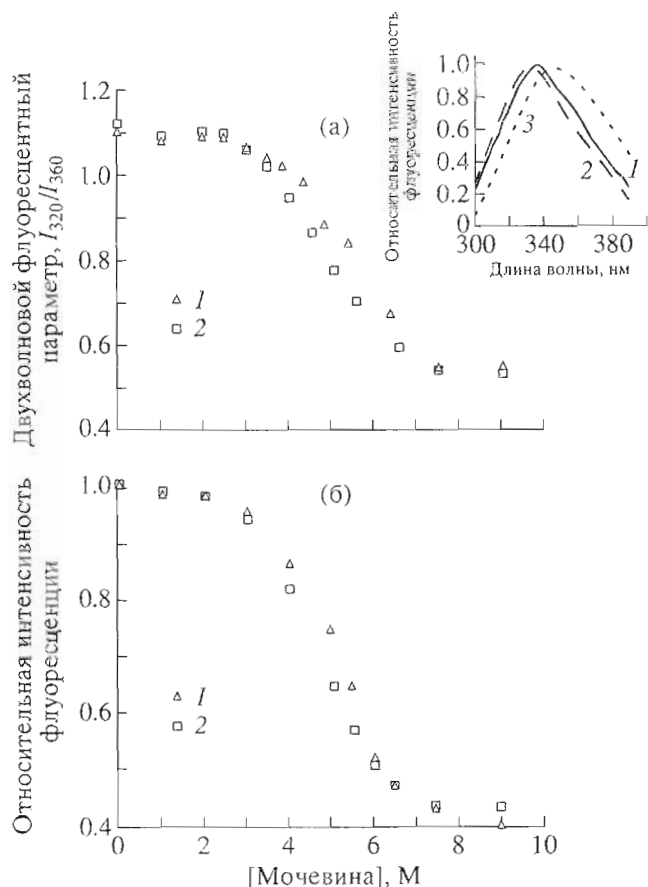


Рис. 2. Разворачивание EF-2 (1) и фрагмента E1 (2) мочевиной с детектированием по изменению двухволнового параметра флуоресценции триптофана (отношение I_{320}/I_{360}) (а) и по интенсивности флуоресценции в максимуме спектра (б). На врезке приведены спектры флуоресценции EF-2 (1) и фрагмента E1 (2) в неденатурирующих условиях и EF-2 в денатурирующих условиях (3).

ные по первичной структуре содержания этих составляющих, полученные по методу [11], основанному на анализе кристаллических структур нативных белков. Результаты разложения экспериментальных спектров как для целого фактора, так и для его фрагмента E1 хорошо согласуются с предсказанными значениями.

Содержание вторичной структуры в EF-2 и его N-концевом 60-кДа фрагменте

Тип вторичной структуры	Содержание типов вторичных структур, %			
	По данным КД		Предсказанное по первичной последовательности	
	Фрагмент	EF-2	Фрагмент	EF-2
α -Спираль	50	41	42	41
β -Структура	20	36	22	21
Неупорядоченная структура	30	23	36	38

Денатурационные переходы

Известно, что присутствие жесткой третичной структуры в глобулярных белках характеризуется кооперативным переходом белковой молекулы в денатурированное состояние при повышении температуры или концентрации различных денатурантов [12]. Кривые равновесного разворачивания EF-2 и его фрагмента E1 мочевиной (рис. 2) показывают, что этот процесс как для фактора, так и для его фрагмента происходит кооперативно. Это типично для глобулярных белков с жесткой третичной структурой и позволяет предположить, что молекулы EF-2 и его фрагмента E1 обладают схожей компактностью упаковки.

Кооперативные денатурационные переходы наблюдались также для обоих белков с повышением температуры (рис. 3). Однако, несмотря на то что точки полуперехода для обоих белков очень близки, плавление фрагмента характеризуется меньшей кооперативностью. Это может объясняться более подвижной структурой полипептидной цепи фрагмента по сравнению со структурой целого белка.

Учитывая приведенные выше данные, мы можем считать, что N-концевой 60-кДа фрагмент EF-2 является компактной глобулой с выраженной вторичной структурой и нативноподобным окружением триптофановых остатков. Однако структура 60-кДа полипептида, соответствующего фрагменту, явно отличается от структуры самого фрагмента в составе целого белка. N-Концевой полипептид не может фосфорилироваться EF-2-киназой [7]. Этот факт согласуется с результатами других авторов [13], которые обнаружили, что более длинный N-концевой фрагмент EF-2 (остатки 1–554) также не может фосфорилироваться. Кроме того, 60-кДа фрагмент нечувствителен к действию трипсина [7], в то время как сам EF-2 легко расщепляется трипсином по остатку Arg⁶⁵ [14]. Это позволяет предполагать наличие влияния C-концевой части молекулы EF-2 на структуру N-концевой части.

В третичной структуре фактора элонгации EF-G из *Th. thermophilus* были локализованы пять доменов [8, 9]. Опубликованы результаты сравнительного анализа последовательностей эукариотических и прокариотических факторов элонгации [15, 16]. Расположение фрагментов EF-2, полученных ограниченным протеолизом трипсином, эндопротеиназой Glu-C и эластазой относительно предполагаемых доменов EF-2, представлено на рис. 4. Видно, что протеиназы с различной специфичностью расщепляют EF-2 в двух областях: в области 3-го домена и в G-доме в близости от N-конца. Также видно, что расположение N-концевого 60-кДа фрагмента E1 хорошо

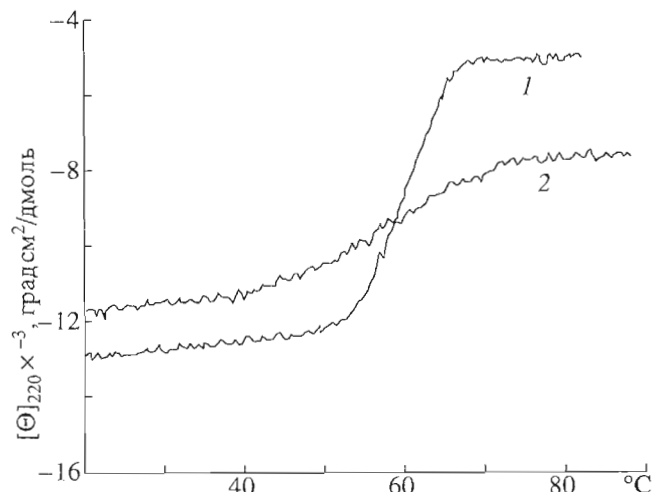


Рис. 3. Тепловая денатурация EF-2 (1) и фрагмента E1 (2) с детектированием по эллиптичности при 220 нм.

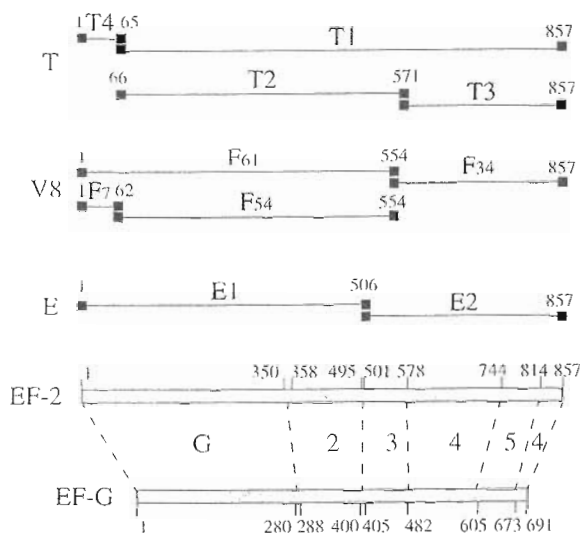


Рис. 4. Сравнение расположения протеолитических фрагментов и предполагаемых доменов EF-2 по цепи белка. Показаны фрагменты, образующиеся при гидролизе EF-2 трипсином (Т [14]), протеиназой Glu-C (V8 [13]), эластазой (Е [7]). Расположение предполагаемых доменов EF-2 получено по аналогии с доменами EF-G [8, 9] в соответствии с ранее опубликованными сравнительными анализами последовательностей EF-2 и EF-G [15, 16].

согласуется с границами предсказанных G-домена и 2-го домена EF-2.

Таким образом, N-концевой 60-кДа фрагмент, возможно, является большим структурным модулем, состоящим из двух доменов молекулы EF-2. Планируемые эксперименты по сканирующей микрокалориметрии EF-2 и его N-концевого фрагмента позволят подтвердить это предположение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка белков. EF-2 из печени крысы и N-концевой 60-кДа E1-фрагмент были получены как описано ранее [7].

Структурные методы. Во всех экспериментах растворы белков были приготовлены в 20 мМ трис-HCl-буфере, pH 7.8, и доведены до требуемой концентрации на ультрафильтрационной ячейке Centrifrep 10 (Amicon). Молярный коэффициент поглощения N-концевого фрагмента E1 был определен по методу [17]. Его значение составило $2.17 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (λ 280 нм). Величина ϵ_{280} EF-2 равнялась $9.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [6]. Спектры КД были записаны при 22°C на спектрополяриметре J-600 (Jasco); кривые температурного плавления в дальней УФ-области были получены на спектрополяриметре J-41 (Jasco). Концентрация белка составляла 0.5 мг/мл. Содержание вторичной структуры вычисляли из спектров КД и аминокислотной последовательности по известным методикам [10, 11]. Измерения флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Aminco SPF-1000cs (Aminco) как описано в [6].

Работа была поддержана ГНТП "Новейшие методы биоинженерии" (грант 3.1-195).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oleinikov A.V., Jokhadze G.G., Alakhov Yu.B. // FEBS Lett. 1989. V. 248. P. 131–136.
2. Nygard O., Nilsson L. // Eur. J. Biochem. 1990. V. 191. P. 1–17.
3. Van Ness B.G., Howard J.B., Bodley J.W. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255, P. 10 710–10 720.
4. Ovchinnikov L.P., Motuz L.P., Natapov P.G., Averbuch L.J., Wettenhall R.E., Szyszka R., Kramer G., Hardesty B. // FEBS Lett. 1990. V. 275. P. 202–212.
5. Jaenicke R. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 3147–3161.
6. Плотников А.Н., Василенко К.С., Киркитадзе М.Д., Котова Н.В., Мотуз Л.П., Коротков К.В., Семисотнов Г.В., Алахов Ю.Б. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 489–502.
7. Мотуз Л.П., Плотников А.Н., Коротков К.В., Алахов Ю.Б. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 872–882.
8. Czworkowski J., Wang J., Steitz T.A., Moore P.B. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 3661–3668.
9. Aevarsson A., Brazhnikov E., Garber M., Zheltonosova J., Chirgadze Y., Al-Karadaghi S., Svensson L.A., Liljas A. // EMBO J. 1994. V. 13. P. 3669–3677.
10. Provencher S.W., Glockner J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33–37.
11. Соловьев В.В., Саламов А.А. // Молекуляр. биология. 1991. Т. 25. С. 810–823.
12. Ptitsyn O.B., Semisotnov G.V. // Conformations and Forces in Protein Folding / Eds B.T. Nall, K.A. Dill. Washington D. C.: AAAS Publisher, 1991. P. 155–168.
13. Dumont-Miscopein A., Lavergne J.-P., Reboud J.-P. // Biochem. Biophys. Acta. 1995. V. 1263. P. 221–227.
14. Nilsson L., Nygard O. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 171. P. 293–299.
15. Cammarano P., Palm P., Creti R., Ceccarelli E., Sanangelantoni A.M., Tiboni O. // J. Mol. Evol. 1992. V. 34. P. 396–405.
16. Aevarsson A. // J. Mol. Evol. 1995. V. 41. P. 1096–1104.
17. Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.

Properties of the N-Terminal 60-kDa-Fragment of Elongation Factor 2

K. V. Korotkov*, A. N. Plotnikov*, L. P. Motuz*, K. S. Vasilenko**,
G. V. Semisotnov**, and Yu. B. Alakhov*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Branch, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

**Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia

The N-terminal 60-kDa-fragment of elongation factor 2 from rat liver (EF-2) was obtained by the limited proteolysis of native EF-2 with elastase. This fragment consists of 506 N-terminal amino acid residues of EF-2. The conformational properties of both this fragment and EF-2 in solution were studied by circular dichroism and fluorescent spectroscopy. The contents of secondary structure components in the fragment and in the factor that were deduced from CD measurements agreed well with values predicted from their primary structures. Both proteins were resistant to denaturation with ≤ 3 M urea and exhibited cooperative denaturation transitions. Temperature melting also proceeded cooperatively for the fragment and EF-2. Structural properties of the N-terminal 60-kDa-fragment are discussed in comparison with the biochemical characteristics and 3D structure of prokaryotic elongation factor EF-G.

Key words: elongation factor 2, protein fragments, limited proteolysis