



УДК 547.962.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ EF-G
ИЗ *ESCHERICHIA COLI*III. ОГРАНИЧЕННЫЙ ПРОТЕОЛИЗ. ДЕЙСТВИЕ ТЕРМОЛИЗИНА
НА НАТИВНЫЙ EF-G И ТРИПСИНА НА EF-G,
МОДИФИЦИРОВАННЫЙ 1,2-ЦИКЛОГЕКСАНДИОНОМ

*Алахов Ю. Б., Стенгревиц О. А., Будудлис Ю. П.,
Мотуз Л. П., Винокуров Л. М.*

Институт белка Академии наук СССР, Пушкино, Московская обл.

Проведено изучение действия термолитина на EF-G в условиях, когда он сохраняет нативную структуру, а также действие трипсина на EF-G, модифицированный 1,2-циклогександионом. Показано, что при ограниченном термолитическом гидролизе образуются в основном два больших фрагмента с M 45 000 и 25 000. При изучении их структуры локализовано два экспонированных участка в молекуле EF-G, которые доступны для протеолитической атаки. При изучении продуктов триптического гидролиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександионом, показано образование трех фрагментов с M 52 000, 31 000 и 26 000. Фрагменты с M 52 000 и 31 000 охватывают всю молекулу EF-G, однако после удаления защитной группы и ренатурации они не способны образовывать рекомбинантную активную молекулу EF-G.

Ранее было показано, что при ограниченном трипсинолизе нативного фактора элонгации EF-G из *E. coli* образуется несколько фрагментов, относительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина [1]. Мы подробно охарактеризовали фрагменты, образующиеся при ограниченном триптическом гидролизе EF-G в нативном состоянии [2]. Исследование этих фрагментов позволило расположить их в полипептидной цепи EF-G, а также локализовать экспонированную функционально важную SH-группу, модификация которой приводит к ингибированию несопряженной GTP-азной активности [3, 4]. Эта SH-группа входит в состав GTP-связывающего участка EF-G, так как фотохимической модификацией аналогом GTP было показано, что район, включающий экспонированную SH-группу, непосредственно участвует в связывании GTP [5]. Фрагмент, содержащий SH-группу, был выделен и установлено его строение [6, 7].

В данном сообщении мы приводим результаты дальнейших исследований по ограниченному протеолизу EF-G. В качестве протеолитического агента был использован термолитин — фермент, обладающий значительно более широкой специфичностью, чем трипсин, а также были исследованы продукты ограниченного трипсинолиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександионом.

EF-G был выделен в гомогенном состоянии по методу, описанному нами ранее [2].

При ограниченном трипсинолизе EF-G [2] образуется пять сравнительно устойчивых к дальнейшему действию трипсина фрагментов, расположе-

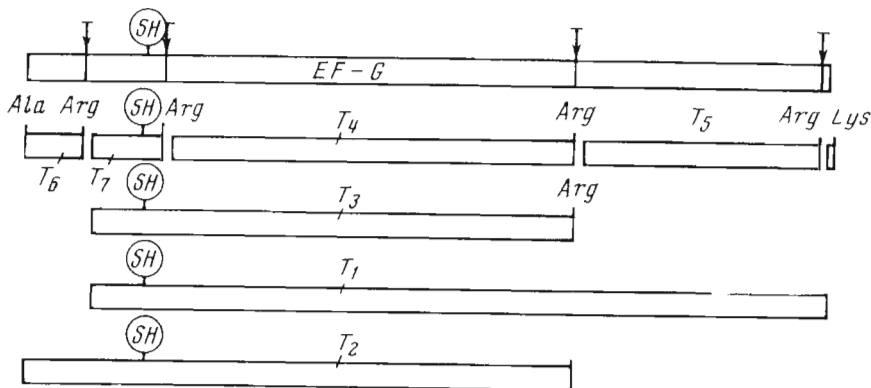


Рис. 1. Расположение фрагментов ограниченного триптического гидролиза по полипептидной цепи EF-G

ние которых в полипептидной цепи EF-G представлено на рис. 1. В результате ограниченного гидролиза EF-G термолитином образуются в основном два больших фрагмента (Th_3 и Th_4) с M 45 000 и 25 000 (табл. 1). На рис. 2 приведен ход термолитического гидролиза EF-G в зависимости от времени. Фрагмент с M 25 000 представляет собой С-концевую часть полипептидной цепи EF-G, 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 и обусловлена несколькими разрывами полипептидной цепи.

Для разделения и характеристики фрагментов ограниченного термолитического гидролиза EF-G смесь, полученную после 50 мин гидролиза

Таблица 1

Молекулярные веса и подвижность при гель-электрофорезе [2] термолитических фрагментов

Фрагмент	E_f	Молекулярный вес	Фрагмент	E_f	Молекулярный вес
EF-G	0,11	81 000	Th_3	0,25	45 000
Th_1	0,13	76 000	Th_4	0,40	25 000
Th_2	0,19	52 000			

Таблица 2

Аминокислотный состав * и концевые аминокислоты термолитического фрагмента Th_4

Аминокислота	Количество	Аминокислота	Количество
Asp	16	Leu	16
Thr	9	Tyr	10
Ser	10	Phe	8
Glu	29	His	6
Pro	14	Lys	21
Gly	28	Arg	10
Ala	19	Всего	238
Val	23	N-конец	Val
Met	7	С-конец	Lys
Ile	12		

* Рассчитан на M 25 000.

Рис. 3. Гель-фильтрация продуктов ограниченного термолитического гидролиза EF-G, [¹⁴C]карбоксиметилированного по одной SH-группе: 1 — поглощение на 280 нм; 2 — радиоактивность. Колонка (5 × 270 см) с сефадексом G-100 (сверхтонкий), уравновешенная буфером 0,02 М трис-HCl (рН 7,5) — 1 мМ β-меркаптоэтанол. Скорость элюирования 15 мл/ч

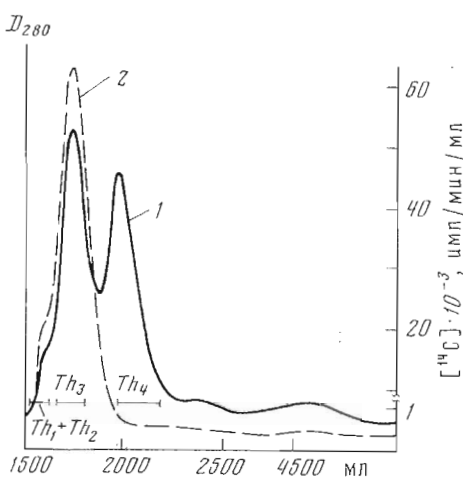


Рис. 4. Расположение фрагментов ограниченного термолитического гидролиза по полипептидной цепи EF-G. Стрелками указаны места атаки термолитизмом (Th)

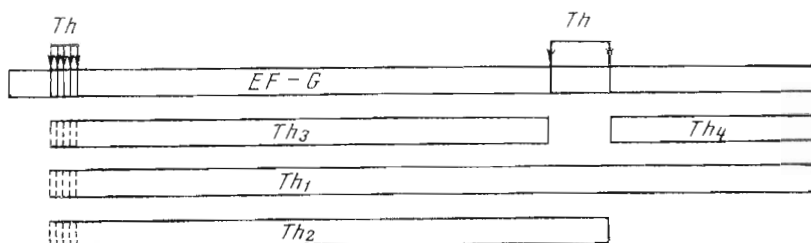
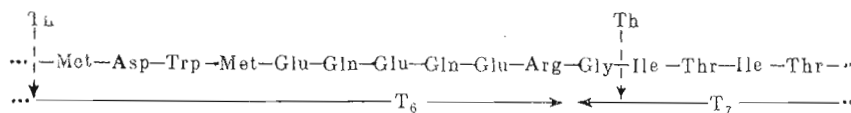


Рис. 3

Рис. 4

составляет около 40 аминокислотных остатков. В нативной молекуле EF-G участок полипептидной цепи, который доступен действию протеазы, вероятно, значительно меньше, и только после первоначального разрыва происходит дальнейшее расщепление концевых частей вновь образовавшихся молекул в результате происшедших в них конформационных изменений. Необходимо отметить, что термолитизин является ферментом со значительно более широкой специфичностью, чем трипсин, и поэтому вероятность множественности разрывов полипептидной цепи белка естественно выше. Тем не менее участок полипептидной цепи EF-G, который атакует термолитизин, сравнительно невелик. Это, очевидно, обусловлено сохранением компактной структуры образующихся фрагментов. С другой стороны, N-концевая часть фрагмента с $M 45\ 000$ гетерогенна и обусловлена несколькими разрывами полипептидной цепи EF-G в районе, охватывающем С-концевую часть триптического фрагмента T_6 и N-концевую часть триптического фрагмента T_7 :



Основная часть разрыва (около 60%) происходит по остатку изолейцина, находящемуся рядом с N-концевым глицином во фрагменте T_7 , а остальные разрывы происходят в С-концевом участке полипептидной цепи, входящем в N-концевой фрагмент EF-G T_6 . Таким образом, исследование термолитических фрагментов позволило локализовать в полипептидной цепи EF-G два экспонированных участка, один из которых, протяженностью около 10 аминокислотных остатков, расположен в N-концевой части моле-

кулы, а другой, протяженностью около 40 аминокислотных остатков, расположен на расстоянии одной трети длины полипептидной цепи от С-конца молекулы.

Мы показали, что термолитический разрыв по остатку изолейцина в N-концевой части цепи эффективно защищается гуаниловыми нуклеотидами. Так, при проведении термолитического гидролиза в присутствии GDP степень гидролиза связи -Gly-Ile- уменьшается в 2 раза. Поскольку известно, что триптический фрагмент T₇ включает GTP-связывающий центр EF-G, то такое экранирование действия термолитина вполне понятно, так как расщепляемая связь находится в непосредственной близости или включена в участок полипептидной цепи, формирующей GTP-связывающий центр.

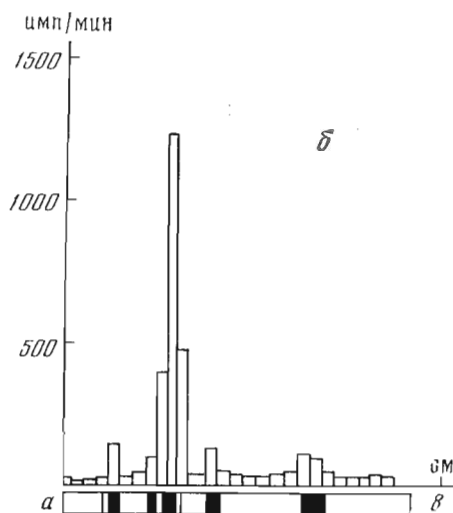


Рис. 5. Распределение радиоактивности в продуктах ограниченного термолитического гидролиза (40 мин) EF-G, модифицированного $[^{14}\text{C}]\text{ICH}_2\text{CONH}_2$: а — расположение фрагментов в полиакриламидном геле; б — распределение радиоактивной метки ^{14}C

Необходимо отметить также, что термолитин совершенно не расщепляет полипептидную цепь EF-G в районе, соответствующем стыку триптических фрагментов T₇ и T₄, хотя рядом с аргинином, по которому происходит расщепление трипсином, расположены специфические для действия термолитина аминокислоты триптофан и валин (см. [7]). Это видно по распределению радиоактивной метки в продуктах термолитического гидролиза EF-G, модифицированного по SH-группе $[^{14}\text{C}]\text{иодацетамидом}$ (см. рис. 3 и 5). Вся радиоактивная метка находится в большом фрагменте T₃ с M 45 000. Очевидно, этот участок в целой молекуле EF-G недоступен действию протеаз и становится доступным для трипсина только в составе фрагмента T₃, в котором происходят конформационные изменения, приводящие к экспонированию участка цепи, содержащей остаток аргинина.

Ранее нами было показано [2], что все триптические фрагменты EF-G (T₃—T₇) имеют в качестве С-концевой аминокислоты аргинин, т. е. расщепление полипептидной цепи белка происходит только по остаткам аргинина. Поэтому мы предприняли исследование действия трипсина на EF-G, модифицированный по остаткам аргинина 1,2-циклогександионом, реагентом, предложенным для обратимой модификации гуанидиногруппы остатка аргинина в белках [8]. Реакция протекает в мягких условиях (рН 8—9, 25—40°) в натрий-боратном буфере, который образует стабильный комплекс с N⁷, N⁸-(1,2-дигидроциклогекс-1,2-илен)-аргинином, являющимся продуктом реакции аргинина с 1,2-циклогександионом. Остаток аргинина из полученного комплекса может быть количественно регенерирован инкубированием белка при 37° в гидроксилламинном буфере при рН 7,0 в течение 7—8 ч.

Оказалось, что модифицированный EF-G распадается под действием трипсина на четыре фрагмента T₁* — T₄*. На рис. 6 приведен ход триптичес-

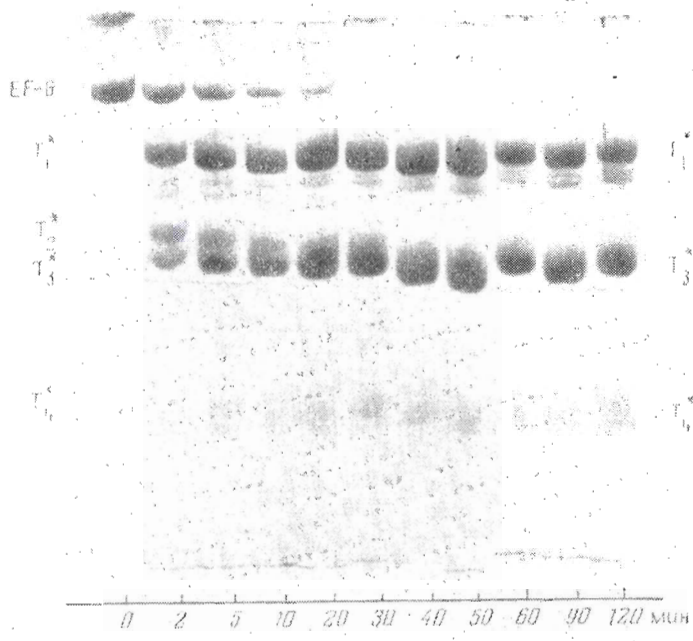


Рис. 6. Ход триптического гидролиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександиолом. Анализ методом геля-электрофореза [2]

ского гидролиза модифицированного EF-G в зависимости от времени, а на табл. 3 — основные характеристики образующихся фрагментов. Фрагмент T_2^* быстро претерпевает дальнейший распад с образованием фрагментов T_3^* и T_4^* .

Для разделения и характеристики полученных фрагментов смесь была подвергнута разделению на колонке с сефадексом G-150 (рис. 7). При этом был выделен в чистом виде фрагмент T_1^* . Фракцию, содержащую смесь фрагментов T_2^* и T_3^* , рехроматографировали на QAE-сефадексе А-50 (рис. 8). В результате были выделены фрагменты T_2^* и T_3^* . Фрагмент T_1^* представляет собой N-концевую часть EF-G, поскольку его N-концевая аминокислотная последовательность такая же, как и у EF-G. Фрагмент T_2^* , следовательно, является C-концевым. Фрагмент T_3^* имеет C-концевую

Таблица 3

Аминокислотный состав, концевые аминокислоты и молекулярные веса фрагментов триптического гидролиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександиолом

Аминокислоты	Количество			Аминокислоты	Количество		
	T_3^*	T_2^*	T_1^*		T_3^*	T_2^*	T_1^*
Cys	—	—	3	Tyr	5	9	10
Asp	19	22	43	Phe	9	9	17
Thr	11	12	35	His	5	5	10
Ser	14	15	19	Lys	19	19	22
Glu	35	38	56	Trp	—	—	5
Pro	14	14	21	Arg	12	15	26
Gly	30	32	37	Всего	257	288	488
Ala	21	23	53	N-конец	—	Met	Ala
Val	27	30	49	C-конец	Lys	Lys	Lys
Met	7	10	18	Молекулярный вес	26 000	31 000	52 000
Ile	13	16	34				
Leu	16	19	30				

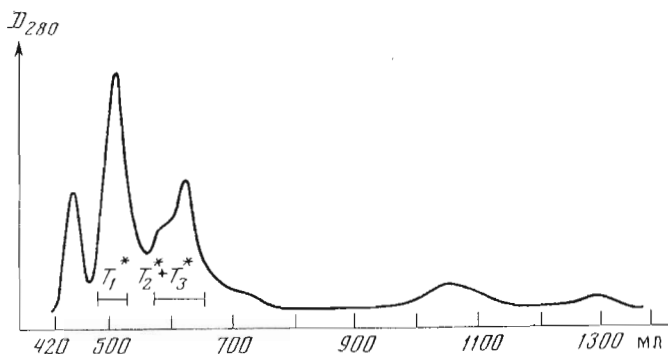


Рис. 7. Гель-фильтрация продуктов ограниченного триптического гидролиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександионом (см. «Экспериментальную часть»)

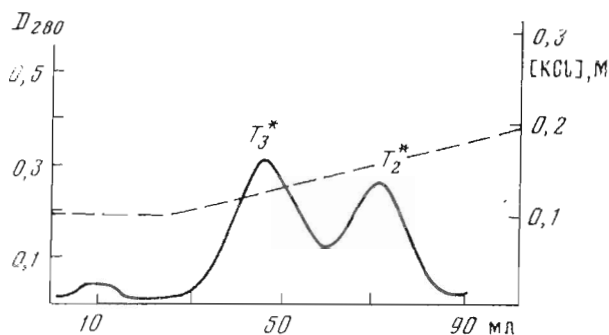


Рис. 8. Разделение смеси фрагментов T_2^* и T_3^* на колонке (1×5 см) с QAE-сефадексом А-50, уравновешенной буфером 20 мМ трис-НСl (рН 7,5) — 8 М мочевины в градиенте концентрации КСl. Скорость элюирования 10 мл/ч

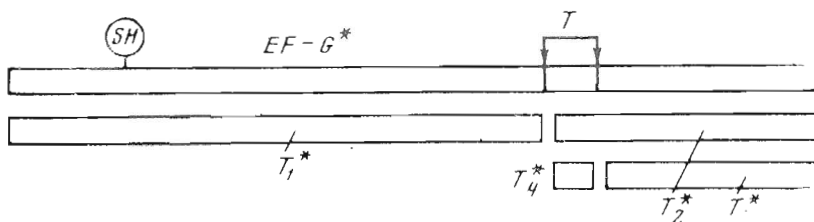


Рис. 9. Расположение фрагментов ограниченного триптического гидролиза EF-G, модифицированного 1,2-циклогександионом по полипептидной цепи

последовательность -Arg-Gly-Lys, т. е. такую же, как G-фактор и фрагмент T_2^* , и отличается от последнего тем, что лишен с N-конца 25—35 аминокислотных остатков. Различие определено по разности в молекулярных весах, поскольку T_3^* имеет закрытый N-конец, вероятно, в результате превращения остатка N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту.

Таким образом, фрагменты T_1^* и T_2^* полностью охватывают полипептидную цепь EF-G (рис. 9). Ввиду этого было интересно проверить, обладают ли N-концевой фрагмент и его смесь с C-концевым фрагментом функциональной активностью. В качестве функционального теста была использована способность G-фактора образовывать комплекс с рибосомой и $[^{14}\text{C}]\text{-GDP}$ в присутствии фусидовой кислоты [9, 10]. Для контроля способности восстанавливать активность после модификации EF-G был модифи-

дирован с помощью циклогександиона с последующим удалением защитных групп и ренатурацией. Оказалось, что обработанный таким образом EF-G сохраняет 70% активности исходного белка, в то время как ни фрагмент T_1^* , ни смесь фрагментов $T_1^* + T_2^*$ практически не проявляли какой-либо способности образовывать комплекс с рибосомой и GDP. Вероятно, эти фрагменты в результате слабого взаимодействия друг с другом не способны образовывать гибридную молекулу, обладающую функциональной активностью.

Исследование фрагментов, образующихся в результате триптического гидролиза EF-G, модифицированного циклогександионом, позволило также подтвердить наличие экспонированного участка полипептидной цепи протяженностью 25—35 остатков на расстоянии одной трети от C-конца молекулы.

Экспериментальная часть

В работе использованы [^{14}C]GDP, [^{14}C]ICH₂CONH₂ (Amersham, Англия), сефадексы G-100, G-150, QAE A-50 (Pharmacia, Швеция), реактивы для диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (Serva, ФРГ), трипсин, карбоксипептидазы А и В (Worthington, США), термоллизин (Serva, ФРГ), 1,2-циклогександион (Pierce, США), реактивы для автоматического метода Эдмана и фенилтиогидантоины аминокислот (Beckman, США), реактивы для аминокислотного анализатора (Pierce, США). Все остальные реактивы имели квалификацию ос. ч.

Определение активности EF-G и его фрагментов проводили по способности EF-G образовывать комплекс с рибосомами и [^{14}C]GTP в присутствии фусидовой кислоты, используя метод фильтрации через нитроцеллюлозный фильтр, как описано [9, 10].

Концентрацию белка находили спектрофотометрическим определением поглощения при 280 нм, принимая величину удельного поглощения для EF-G $E_{1\text{см}}^{0,1}$ 0,84, а для фрагментов T_1^* , T_{h3} и T_2^* , T_{h4} — 0,97 и 0,57 соответственно. Коэффициенты экстинкции были вычислены по результатам аминокислотного анализа.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. За ходом протеолиза EF-G следили методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле по Веберу и Осборн [11], а также по модифицированному нами методу [2]. Молекулярные веса фрагментов определяли методом гель-электрофореза, как описано в работе [2]. Для анализа распределения радиоактивной метки ^{14}C во фрагментах гель разрезали на кусочки длиной 3 мм, дезинтегрировали в 0,2 мл 0,1% додецилсульфата натрия и инкубировали при 40° 12 ч, после чего радиоактивность считали на жидкостном сцинтилляционном счетчике LS-100 (Beckman, США) в толуольном сцинтилляторе с тритоном X-100 (2 : 1 по объему). Распределение радиоактивной метки представлено на рис. 5.

Автоматический метод Эдмана. Автоматическое определение аминокислотной последовательности проводили на секвенсоре модели 890 С (Beckman, США) с использованием диметилаллиламинной программы (102 974 по фирменному руководству). Идентификацию фенилтиогидантоинов аминокислот осуществляли на газовом хроматографе модели 5710 (Hewlett-Packard, США) с колонкой, наполненной фазой SP-400 (Beckman, США), и тонкослойной хроматографией на пластинках Kieselgel 60F₂₅₄ (Fluka, Швейцария), а также на аминокислотном анализаторе D-500 после гидролиза Pth-производных аминокислот 5,6 н. HCl.

Селективное карбоксиметилирование EF-G [^{14}C]ICH₂CONH₂ по экспонированной SH-группе, аминокислотный анализ и определение N- и C-концевых аминокислот осуществляли как описано ранее [2].

Модификация EF-G 1,2-циклогександионом. К раствору EF-G (3 мг/мл) в 0,2 М натрий-боратном буфере с 5 мМ β-меркаптоэтанолом, pH 8,8, доба-

вили 1,2-циклогександион в том же буфере (75-кратный молярный избыток). Смесь инкубировали в течение 2 ч при 35° и затем обессоливали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 0,1 М натрий-боратным буфером с 5 мМ β-меркаптоэтанолом, рН 8,8.

Термолитический гидролиз EF-G, модифицированного [¹⁴C]ICH₂CONH₂ проводили в условиях, аналогичных проведению триптического гидролиза EF-G (см. [2]), используя соотношение фермент — субстрат 1 : 50. Для препаративного выделения фрагментов 0,5 г EF-G гидролизovali 50 мин и полученную смесь разделяли на колонке с сефадексом G-100 (рис. 3) в условиях, аналогичных разделению триптических фрагментов.

Триптический гидролиз модифицированного EF-G. 2 мг/мл модифицированного EF-G в 0,1 М натрий-боратном буфере с 1,5 мМ β-меркаптоэтанолом, рН 8,8, инкубировали с трипсином при 37° (соотношение фермент — субстрат 1 : 60). Через определенные промежутки времени отбирали аликваты по 50 мкл и проводили анализ гель-электрофорезом, как описано в [2] (см. рис. 6).

Для препаративного получения фрагментов к раствору 500 мг модифицированного EF-G в боратном буфере (2 мг/мл) добавляли раствор трипсина в воде (1 мг/мл) при соотношении фермент — субстрат 1 : 60 и инкубировали в описанных условиях 5 мин. Для прекращения действия трипсина к реакционной смеси добавили соевый ингибитор трипсина (Reanal, Венгрия) в соотношении ингибитор — фермент 2 : 1. Полученная смесь была разделена на колонке (2,5 × 270 мм) с сефадексом G-150 (тонкий, фракционированный), уравновешенной буфером 0,02 М трис-НСl (рН 7,5) — 1 мМ дитиотреит — 7 М мочевины. Скорость элюирования 4 мл/ч (рис. 7). Фракцию, содержащую смесь фрагментов T₂* и T₃*, рехроматографировали на колонке (1 × 5 см) с QAE-сефадексом А-50, уравновешенной буфером 20 мМ трис-НСl (рН 7,5) — 8 М мочевины в градиенте концентрации КСl. Скорость элюирования 10 мл/ч (рис. 8).

Удаление защитной группы с EF-G и его триптических фрагментов и их ренатурация. Модифицированный EF-G или его фрагменты диализовали 7—8 ч против буфера, содержащего 0,2 М NH₂OH · НСl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 8 М мочевины (рН 7,0). После диализа раствор инкубировали при 37° 5 ч и затем диализовали против буфера 20 мМ трис-НСl (рН 7,5) — 5 мМ β-меркаптоэтанол. В каждой смене буфера концентрация мочевины ступенчато понижалась (6, 4, 2, 0 М). Окончательно диализ был проведен против буфера, не содержащего мочевины (трехкратная смена).

ЛИТЕРАТУРА

1. Skar D. C., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1975) *Biochemistry*, 14, 3922—3926.
2. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. (1977) *Биоорганическая химия*, 3, 1333—1345.
3. Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumoto K., Tanaka M., Kawakita M. (1969) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 34, 385—393.
4. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, 116, 344—351.
5. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *FEBS Letters*, 85, 283—286.
6. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) *FEBS Letters*, 85, 287—290.
7. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревиц О. А., Винокуров Л. М. (1978) *Биоорганическая химия*, 4, 1301—1313.
8. Patty L., Smith E. L. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 557—564.
9. Highland J. H., Lin L., Bodley J. W. (1971) *Biochemistry*, 10, 4404—4409.
10. Bodley J. W., Zieve F. J., Lin L., Zieve S. T. (1970) *J. Biol. Chem.*, 245, 5656—5661.
11. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, 244, 4406—4412.

Поступила в редакцию
24.VIII.1978

THE PRIMARY STRUCTURE OF THE ELONGATION FACTOR EF-G FROM
ESCHERICHIA COLI. III. LIMITED PROTEOLYSIS. EFFECT OF
THERMOLYSIN ON NATIVE EF-G AND OF TRYPSIN ON EF-G MODIFIED
WITH 1,2-CYCLOHEXANEDIONE

ALAKHOV Yu. B., STENGREVICIS O. A., BUNDULIS Yu. P., MOTUZ L. P.,
VINOKUROV L. M.

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

The effects of thermolysin on EF-G under conditions when it preserves its native structure and of trypsin on EF-G modified with 1,2-cyclohexanedione have been studied. It has been shown that limited thermolytic hydrolysis results in the formation of mainly two large fragments with M of 45 000 and 25 000. A study of their structure showed the localization of two exposed regions in the EF-G molecule which are accessible to proteolytic attack. A study of the products of tryptic hydrolysis of EF-G modified with 1,2-cyclohexanedione revealed the formation of three fragments with M of 52 000, 31 000 and 26 000. The fragments with M of 52 000 and 31 000 make up the whole EF-G molecule, however, after the removal of the masking group and renaturation they are incapable to form a recombined active EF-G molecule.
