



УДК 547.963.3.04

**О РОЛИ ЭКСПОНИРОВАННОЙ SH-ГРУППЫ ФАКТОРА  
ЭЛОНГАЦИИ G ПРИ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РИБОСОМОЙ***Гиринович А. С., Поздняков В. А., Овчинников Ю. А.**Институт белка Академии наук СССР, г. Пущино, Московская область*

Осуществлена специфичная модификация экспонированной SH-группы фактора элонгации EF-G радиоактивными сульфгидрильными реагентами: N-этилмалеймидом, иодацетамидом и его аналогом иодацетил-*n*-азидобензиламидом. Показано, что способность EF-G специфично связываться с рибосомой обусловлена не требованием сохранения его SH-группы в интактном виде, а природой присоединенного к ней реагента. Прдемонстрирована возможность использования препарата EF-G с фотоактивируемой группировкой, связанной с экспонированной SH-группой, для аффинного мечения EF-G-связывающего района рибосомы.

Как известно, механическая работа рибосомы по транслокации пептидил-тРНК и мРНК в ходе биосинтеза белка прототируется специальным фактором элонгации EF-G (белок с молекулярным весом около  $8 \cdot 10^4$ ) в присутствии GTP. Современное представление о функционировании EF-G и GTP состоит в том (см., например, [1]), что транслокация происходит вследствие присоединения EF-G к рибосоме, а GTP служит аллостерическим эффектором, индуцирующим сродство фактора к рибосоме. Возникающая при взаимодействии EF-G с рибосомой GTP-гидролазная активность реализуется после транслокации и обеспечивает освобождение фактора из рибосомы. Таким образом, для понимания механизма транслокации необходимо выяснение молекулярной природы взаимодействия рибосомы с EF-G, и в первую очередь получение информации о структуре и взаимосвязи компонентов рибосомы и EF-G, контактирующих друг с другом при функционировании фактора.

Информация об участии функциональных групп EF-G во взаимодействии с рибосомой крайне скудна и ограничена данными исследования влияния на активность фактора сульфгидрильных химических реагентов. Показано, что в нативных условиях EF-G содержит одну экспонированную SH-группу [2, 3], расположенную в N-концевой части фактора [4] вблизи его GTP-связывающего центра [5] и атакуемую большинством известных сульфгидрильных реагентов (иодацетатом, иодацетамидом, N-этилмалеймидом, *n*-хлормеркурибензоатом, 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой, динитрофторбензолом) [2-6]. Модификация этой SH-группы приводит к ингибированию биосинтеза белка, что послужило основанием для формулировки представления о наличии в молекуле EF-G функционально необходимой SH-группы [7]. Логическим следствием этого представления является исследование роли SH-группы во взаимодействии фактора с рибосомой.

**Анализ степени связывания с рибосомой EF-G, модифицированного различными [<sup>14</sup>C]сульфгидрильными реагентами \***

Состав инкубационной смеси				Связывание модифицированного EF-G, %		
50S	30S	GDP	FA	IAA	IAA-N <sub>3</sub>	NEM
+	+	+	+	90	35	40
+	+	+	-	11	15	12
-	+	-	-	5	11	7

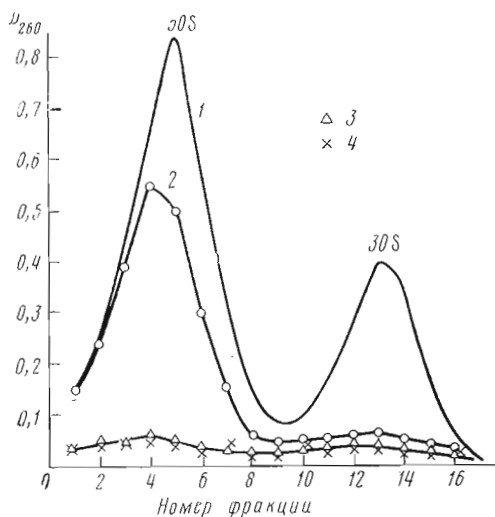
\* Фактор взят в недостатке по отношению к рибосоме; FA — фусидовая кислота, IAA — иодацетамид, IAA-N<sub>3</sub> — иодацетил-*n*-азидобензиламид, NEM — N-этилмаленимид.

В настоящей работе для решения вопроса о роли экспонированной SH-группы EF-G при взаимодействии фактора с рибосомой применен подход, состоящий в анализе влияния модификации этой SH-группы различными сульфгидрильными реагентами на сродство фактора к рибосоме. В качестве таких реагентов выбраны N-этилмаленимид, иодацетамид и его аналог, содержащий объемный ароматический заместитель, а именно иодацетил-*n*-азидобензиламид. Для контролирования специфичности модификации SH-группы и участия модифицированного EF-G в связывании с рибосомой использовали реагенты в радиоактивной форме. Модификацию EF-G проводили при 7–10-кратном избытке реагентов по отношению к фактору в условиях специфичной реакции с SH-группой [2]. Степень модификации SH-группы составила 50, 46 и 62% для N-этилмаленимида, иодацетамида и его аналога соответственно. Специфичность модификации подтверждена анализом распределения радиоактивной метки среди фрагментов EF-G после ограниченного трипсинолиза последнего и разделения гидролизата методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [4, 5]. Оказалось, что для всех реагентов метка локализована только в SH-содержащем пептиде.

Образующийся комплекс рибосомы с модифицированным EF-G выделяли ультрацентрифугированием и анализировали по количеству радиоактивной метки, осаждающейся с рибосомой. Для контролирования возможности неспецифичного осаждения фактора в выбранных условиях ультрацентрифугирования параллельно проводился эксперимент, в котором вместо полной рибосомы была взята только рибосомная 30S субчастица, не обладающая способностью связывать EF-G. Кроме того, в качестве критерия специфичности взаимодействия рибосомы и модифицированного фактора был использован эффект антибиотика — фусидовой кислоты, которая, как известно, стабилизирует образующийся комплекс, повышая тем самым его выход [8, 9].

Полученные результаты (таблица) обнаруживают два важных эффекта влияния сульфгидрильных реагентов на активность EF-G. Прежде всего, модификация экспонированной SH-группы не блокирует способность фактора осаждаться с рибосомой. Удаление фусидовой кислоты приводит к резкому снижению количества модифицированного EF-G в осадке. В соответствии с отмеченным выше механизмом действия антибиотика его эффект служит доказательством того, что осаждение фактора с рибосомой является прямым следствием их специфичного взаимодействия. Таким образом, EF-G сохраняет способность образовывать специфичный комплекс с рибосомой, несмотря на модификацию его экспонированной SH-группы.

Другой эффект состоит в том, что степень связывания EF-G рибосомой зависит от используемого сульфгидрильного реагента. Так, если в случае иодацетамида модифицированный фактор практически количественно связывается с рибосомой, то при использовании реагента, отличающегося от иодацетамида наличием ароматического заместителя, степень связывания



Фотоактивируемое ковалентное связывание с рибосомой EF-G, модифицированного по экспонированной SH-группе [ $^{14}\text{C}$ ]иодацетил-*n*-азидобензиламидам: 1 — поглощение при 260 нм, 2 — полная инкубационная смесь, 3 — то же, но без фусидовой кислоты, 4 — то же, но без облучения

фактора снижается почти в три раза. Снижение активности фактора наблюдается и в случае *N*-этилмалеимида. Отсюда следует, что степень сродства EF-G к рибосоме зависит не от самого факта модификации экспонированной SH-группы, а от природы присоединенного к ней заместителя.

Один из выбранных нами сульфгидрильных реагентов, а именно иодацетил-*n*-азидобензиламид, является бифункциональным. Он содержит кроме иодацетильного остатка, реагирующего с SH-группой, остаток фотоактивируемого ароматического азидо. Последний, как известно [10], при мягком облучении светом с длиной волны более 300 нм освобождает молекулу азота и образует высокоактивный радикал нитрен, способный атаковать практически любую стерически близкую связь, включая связь C—H. Поэтому препарат EF-G, модифицированный этим соединением по экспонированной SH-группе и сохраняющий в значительной степени сродство к рибосоме (см. таблицу), может быть использован в качестве фотоаффинного реагента для мечения компонента EF-G-связывающего района рибосомы, контактирующего с SH-содержащим участком поверхности фактора. Реализация этой возможности продемонстрирована на рисунке. Смесь, содержащую рибосомы, GTP, фусидовую кислоту и EF-G, модифицированный радиоактивным иодацетил-*n*-азидобензиламидам, после облучения разделяли в условиях диссоциации комплекса на рибосомные субчастицы и свободный фактор ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы (5—20%). Анализ распределения радиоактивной метки показывает, что меченым в фотоактивируемой реакции компонентом рибосомы является ее 50S субчастица. Реакция высокоспецифична, поскольку при облучении аналогичной смеси без фусидовой кислоты, т. е. в отсутствие взаимодействия модифицированного фактора с рибосомой (см. таблицу), метка в рибосомной 50S субчастице отсутствует.

Анализ распределения ковалентно связанной радиоактивной метки между основными компонентами 50S субчастицы показал, что в изучаемом районе экспонирована преимущественно 23S РНК (80%).

Таким образом, полученный результат позволяет заключить, что если не сама SH-группа, то по крайней мере ближайший к ней участок фактора (удаленность фотоактивируемого азидо от SH-группы  $\leq 10 \text{ \AA}$ ) контактирует с рибосомной 50S субчастицей (23S РНК). Высокая специфичность наблюдаемой аффинной реакции является дополнительным свидетельством возможности модификации экспонированной SH-группы EF-G без принципиального нарушения его способности взаимодействовать с рибосомой.

Применению метода химической модификации для выяснения роли экспонированной SH-группы EF-G для его взаимодействия с рибосомой

посвящено значительное количество исследований. Из опубликованных данных можно выделить два основных результата. Прежде всего, было показано, что модификация SH-группы никогда не блокирует связывание EF-G с рибосомой на 100%. Обычно наблюдаемая остаточная активность фактора колеблется от 20—30 до 80% [2, 3, 11, 12], что в принципе соответствует данным настоящего исследования. Однако авторы цитируемых работ использовали нерадиоактивные сульфгидрильные реагенты, что не позволило им прямо контролировать связываемость модифицированного фактора с рибосомой. Поэтому был сделан вывод, что частичная инактивация EF-G обусловлена гетерогенностью исходного препарата фактора [11, 12]. В частности, было высказано соображение [12], что EF-G может содержать фракцию с окисленной SH-группой, которая не модифицируется реагентом, но реактивируется (восстанавливается) β-меркаптоэтанолом в условиях последующего анализа активности фактора. Процент этой фракции в препарате EF-G зависит от условий его выделения и хранения. Другими словами, было заключено, что модификация нативной SH-группы полностью блокирует взаимодействие фактора с рибосомой.

Было показано также, что образование комплекса рибосомы с EF-G защищает SH-группу фактора от инактивирующего действия сульфгидрильного реагента [3, 12]. Отсюда был сделан вывод, что эта SH-группа необходима для взаимодействия EF-G либо с рибосомой [3], либо с GTP [12]. Такая трактовка полученного результата является, по нашему мнению, некорректной, поскольку исчезновение эффекта реагента свидетельствует, очевидно, только о том, что при связывании рибосомы с EF-G SH-группа последнего становится недоступной для реагента, но никак не указывает на ее функциональную значимость.

Наконец, следует отметить единственную работу [11], в которой осуществлен прямой анализ связывания с рибосомой EF-G, модифицированного радиоактивным N-этилмалеимидом, но получен отрицательный результат, противоречащий нашим данным. Однако условия эксперимента принципиально различны: в отличие от нас авторы цитируемой работы при анализе связываемости рибосомы с модифицированным EF-G использовали значительный избыток последнего. Ошибочность такой постановки эксперимента обусловлена, как нам представляется, следующими причинами. Как показано в настоящем исследовании и предполагается авторами работы [11], в выбранных условиях обработки EF-G сульфгидрильным реагентом модификация SH-группы не достигает 100%. Поэтому в ходе взаимодействия избытка фактора с рибосомой должна возникнуть конкуренция между оставшимся в нативной форме и модифицированным EF-G за посадку на рибосому. А поскольку сродство последнего снижено по сравнению с нативным фактором (см. таблицу), конкуренция должна привести к вытеснению модифицированного EF-G из рибосомы. Авторы [11] дополнительно «облегчили» эту конкуренцию в пользу нативного фактора использованием неравновесного метода выделения комплекса EF-G с рибосомой (гель-фильтрация без фосфатовой кислоты и GTP в элюирующем буфере). Таким образом, некорректная постановка экспериментов и/или интерпретация полученных результатов привели к ошибочному представлению, вошедшему даже в обзоры (см., например, [13]), о необходимости сохранения в нативном виде экспонированной SH-группы EF-G для его взаимодействия с рибосомой.

Данные, приведенные в настоящем сообщении, однозначно демонстрируют возможность модификации SH-группы фактора без блокирования его способности специфично связываться с рибосомой и показывают, что эта способность фактора количественно зависит не от нативности его SH-группы, а от структуры присоединенного к ней реагента. Эффект заместителя может проявляться, например, в разного рода конформационных нарушениях соседних к SH-группе участков EF-G, в частности расположенного вблизи GTP-связывающего центра [5]. Это в свою очередь может

привести к ослаблению сродства ГТР к EF-G и, как следствие, к наблюдаемому снижению связываемости модифицированного фактора с рибосомой. В пользу такой возможности говорят некоторые экспериментальные данные, показывающие, что модификация SH-группы сульфгидрильными реагентами увеличивает константу диссоциации бинарного комплекса EF-G с GDP [3] и повышает константу Михаэлиса для ГТР в ГТР-гидролазной реакции [2], возникающей, как отмечалось ранее, вследствие взаимодействия EF-G с рибосомой. К сожалению, авторы этих экспериментов не провели сравнительного анализа влияния природы сульфгидрильного реагента на изучаемую функцию EF-G. Кроме приведенной возможности локального эффекта заместителя при SH-группе на конформацию EF-G нельзя исключить, что в зависимости от своей структуры этот заместитель может являться в той или иной степени определенным стерическим препятствием для полноценной посадки фактора на рибосому.

### Экспериментальная часть

Рибосомы получены из *E. coli* MRE-600, как описано в работе [14]. Рибосомные субчастицы разделяли зональным центрифугированием в сахарозном градиенте в присутствии 0,5 М  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  [15]. Фактор элонгации G получен из *E. coli* MRE-600 согласно [16]; [ $^{14}\text{C}$ ]иодуксусная кислота, [ $^{14}\text{C}$ ]иодацетамид и [ $^{14}\text{C}$ ]N-этилмалеимид (уд. акт. 51, 52 и 4,7 мКи/ммоль соответственно) — препараты фирмы Amersham (Англия).

*Синтез [ $^{14}\text{C}$ ]иодацетил-*n*-азидобензиламида.* Реакционную смесь, содержащую по 4 мкмоль [ $^{14}\text{C}$ ]иодуксусной кислоты, дициклогексилкарбодимида и N-оксисукцинимид в 50 мкл сухого диоксана, инкубировали 1 ч при 20°С. Затем к смеси добавляли 10 мкмоль *n*-азидобензиламина в 100 мкл диоксана и инкубацию продолжали еще 1 ч. По окончании реакции смесь упаривали и продукт очищали хроматографией на окиси алюминия в хлороформе. По данным хроматографии на пластинках с  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (тип Т, пейтр., Merck, ФРГ), в хлороформе продукт ( $R_f$  0,7) гомогенен и не содержит примеси исходных соединений ( $R_f$  0).

Модификацию EF-G радиоактивными сульфгидрильными реагентами проводили в условиях специфичной реакции с экспонированной SH-группой фактора, описанных в работе [2], и очищали от непрореагировавшего реагента гель-фильтрацией на сефадексе G-25, уравновешенном буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl (рН 8), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ KCl и 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Степень модификации SH-группы EF-G составила 50, 46 и 62% для N-этилмалеимида, иодацетамида и его аналога соответственно.

Способность модифицированных препаратов EF-G связываться с рибосомой анализировали в инкубационной смеси следующего состава (0,3 мл): по 0,63 нмоль каждой из рибосомных субчастиц (в опыте с изолированной 30S субчастицей последняя взята в количестве 1,3 нмоль), 0,3 нмоль  $^{14}\text{C}$ -модифицированного EF-G в буфере, содержащем 0,1 мМ GDP, 2 мМ фусидовую кислоту, 10 мМ трис-HCl (рН 8), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ KCl и 5 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Смесь инкубировали 20 мин при 20°С и комплекс выделяли нанесением смеси на 1 мл 5% сахарозы в буфере связывания и ультрацентрифугировали на центрифуге Spinco L5-50 (ротор Ti-50) в течение 4 ч при 49 000 об/мин и 4°С. Осадок, содержащий рибосомы и связанный с ними радиоактивный фактор, растворяли в 1 мл 10 мМ трис-HCl (рН 8), 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ KCl и анализировали количество рибосом и EF-G по поглощению при 260 нм и радиоактивности соответственно.

Для фотоактивируемой реакции рибосомы с EF-G, модифицированным [ $^{14}\text{C}$ ]иодацетил-*n*-азидобензиламидом, использовали смесь, аналогичную вышеприведенной, только рибосомы и EF-G были взяты в 2 раза большей

концентрации и буфер не содержал β-меркаптоэтанола. Облучение проводили как описано ранее [5]. После облучения смесь разделяли ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы (5–20%), содержащем 10 мМ трис-HCl (рН 8), 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ NH<sub>4</sub>Cl; объем градиента 33 мл, ротор SW-27, условия центрифугирования 16 ч, 20 000 об/мин, 4° С. В этих условиях происходит полная диссоциация комплекса и рибосом, и свободный EF-G остается в верхней части градиента, хорошо отделяясь от рибосомных субчастиц (см. рисунок). По окончании ультрацентрифугирования анализировали содержание радиоактивной метки (<sup>14</sup>C-модифицированной EF-G) во фракциях рибосомных субчастиц.

Распределение радиоактивной метки между белковым и РНК-овым компонентами рибосомной 50S субчастицы анализировали как описано ранее [17], используя метод «2М LiCl+4М мочевины» [18] для осаждения 23S РНК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Спири А. С. (1977) Молекулярн. биология, **11**, 1335–1343.
2. Marsh R. C., Chinali G., Parmeggiani A. (1975) J. Biol. Chem., **250**, 8344–8352.
3. Arai N., Arai K., Nakamura S., Kaziro Y. (1977) J. Biochem., **82**, 695–702.
4. Alakhov Yu. B., Motuz L. P., Stengrevics O. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., **85**, 287–290.
5. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Pozdnyakov V. A., Ovchinnikov Yu. A. (1978) FEBS Lett., **85**, 283–286.
6. Baca O. G., Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1976) Biochemistry, **15**, 4570–4574.
7. Nishizuka Y., Lipmann F. (1966) Arch. Biochem. and Biophys., **116**, 344–351.
8. Bodley J. W. (1969) Biochemistry, **8**, 465–475.
9. Kuriki Y., Inoue N., Kaziro Y. (1970) Biochim. et biophys. acta, **224**, 487–497.
10. Knowles J. R. (1972) Accounts Chem. Res., **5**, 155–160.
11. Gibres T., Vazquez D., Modolell J. (1976) Mol. Biol. Rep., **2**, 401–406.
12. Rohrbach M. S., Bodley J. W. (1976) J. Biol. Chem., **251**, 930–933.
13. Kaziro Y. (1978) Biochim. et biophys. acta, **505**, 95–127.
14. Гаврилова Л. П., Смолянинов В. В. (1971) Молекулярн. биология, **5**, 883–891.
15. Gavrilova L. P., Ivanov D. A., Spirin A. S. (1966) J. Mol. Biol., **16**, 473–489.
16. Алахов Ю. Б., Мотуз Л. П., Стенгревич О. А., Винокуров Л. М., Овчинников Ю. А. (1977) Биоорг. химия, **3**, 1333–1345.
17. Girshovich A. S., Bochkareva E. S., Kramarov V. M., Ovchinnikov Yu. A. (1974) FEBS Lett., **45**, 213–217.
18. Kaltschmidt E., Wittmann H. G. (1972) Biochemie, **54**, 167.

Поступила в редакцию  
3.IX.1979

#### ON THE ROLE OF EXPOSED SH-GROUP OF ELONGATION FACTOR G IN ITS INTERACTION WITH RIBOSOME

GIRSHOVICH A. S., POZDNYAKOV V. A., OVCHINNIKOV Yu. A.

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

The exposed SH-group of the elongation factor EF-G has been specifically modified by radioactive sulfhydryl reagents: N-ethylmaleimide, iodoacetamide and its analog — iodoacetyl-*p*-azidobenzylamide. It has been shown that the EF-G ability to specifically bind with the ribosome is determined not by the intactness of its SH-group, but by the nature of modifying reagent. It has been demonstrated that EF-G having a photoactivable group bound to the exposed SH-group can be used for affinity labeling of the EF-G binding site of the ribosome.