

А. С. ГИРШОВИЧ, В. А. ПОЗДНЯКОВ, академик Ю. А. ОВЧИННИКОВ

**О ЛОКАЛИЗАЦИИ ГТФ-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ЦЕНТРА  
ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ГТФ С РИБОСОМОЙ  
И ФАКТОРОМ ЭЛОНГАЦИИ G**

Как известно, удлинение полипептидной цепи в бактериальной системе на стадии транслокации требует взаимодействия рибосомы с ГТФ и специальным белковым фактором G. Способностью связывать ГТФ обладает лишь полная система, в то время как рибосома и фактор G в отдельности не образуют комплекс с ГТФ. При изучении тройного комплекса рибосома — ГТФ — фактор G обычно применяют стероидный антибиотик фузидовую кислоту (ФА), которая специфично стабилизирует комплекс, ингибируя этим циклический процесс наращивания полипептидной цепи. Взаимодействие рибосомы и фактора G с ГТФ также высоко специфично, другие основные нуклеозидтрифосфаты (АТФ, УТФ и ЦТФ) не активны (<sup>1</sup>). Однако, несмотря на высокую специфичность и функциональную значимость участия ГТФ в акте транслокации, практически ничего не известно о природе и локализации ГТФ-связывающего центра.

Методом, потенциально способным решить поставленную задачу, является метод биоспецифичного маркирования (affinity labeling) с использованием аналогов ГТФ, несущих химически активную группировку (которая не влияет на субстратную специфичность ГТФ) и способных в условиях стабильности тройного комплекса образовать ковалентную связь с компонентами ГТФ-связывающего центра. При выборе собственно химического агента необходимо учитывать отсутствие каких-либо данных о наличии тех или иных функциональных групп в изучаемом центре. Поэтому наиболее удобными могут быть, по нашему мнению, максимально неспецифичные реагенты. Такими реагентами являются, например, фотоактивируемые ароматические азиды, генерирующие при облучении светом радикал нитрен, способный атаковать любую стерически близкую связь, вплоть до C—H-связи (<sup>2</sup>). При выборе места присоединения фоточувствительной группировки к молекуле ГТФ мы остановились на синтезе аналога с фотоактивируемой группой, присоединенной к остатку рибозы ГТФ. Аналог получен обработкой периодатокисленной (<sup>14</sup>C)-ГТФ 2-нитро, 4-азидобензоилгидразидом с образованием соответствующего гидразона (2-нитро, 4-азидобензоилгидразон ГТФ — фото-ГТФ) (см. рис. 1). Детали синтеза аналога будут опубликованы позднее. В настоящем сообщении приведены результаты использования фотоаналога ГТФ для локализации ГТФ-связывающего центра в системе рибосома — ГТФ — фактор G.

Рибосомы из *E. coli* MRE 600, четырежды промытые 0,5 M NH<sub>4</sub>Cl, получены, как описано ранее (<sup>4</sup>). (<sup>14</sup>C)-ГТФ — препарат фирмы Амершам, Англия (удельная активность 500 С/моль). Фактор G получен по методу Казиро и др. (<sup>5</sup>), причем очистку белка проводили только до стадии отделения фактора G от смеси факторов T<sub>u</sub> и T<sub>s</sub> хроматографией на ДЭАЭ-се-

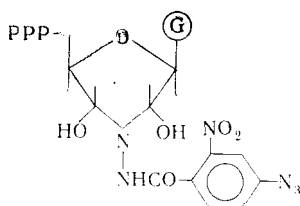


Рис. 1. Фото-ГТФ (структура дана по аналогии с соответствующим гидразоном изоникотиновой кислоты (<sup>3</sup>))

фадексе А-50 с последующим переосаждением сульфатом аммония. Фактор G тестировали по трем критериям: а) по стимулирующему эффекту на бесклеточный синтез полифенилаланина на рибосомах в присутствии полиуридиловой кислоты и смеси факторов  $T_u$  и  $T_s$  (<sup>6</sup>); б) по способности связывать ГТФ только в присутствии рибосом и в) по стабилизирующему эффекту фусидовой кислоты на образование тройного комплекса рибосома — ГТФ — фактор G (<sup>7</sup>). Активность фактора G определяли по Хайленду и др. (<sup>8</sup>); полученный препарат имел активность 300—350 ед. акт./мг белка.

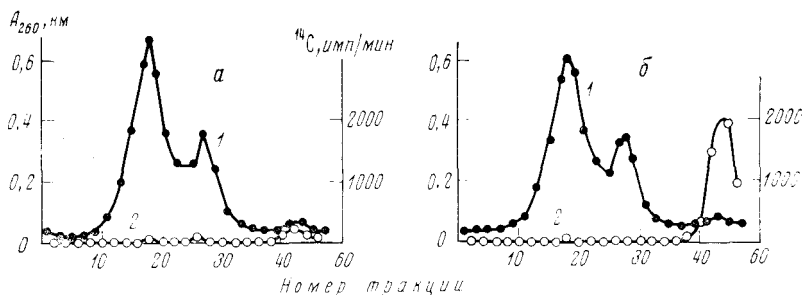


Рис. 2. Распределение радиактивности между компонентами комплекса рибосомы и фактора G после биоспецифического маркирования фото-<sup>14</sup>C-ГТФ в отсутствие (а) и присутствии (б) фусидовой кислоты. 1 — оптическая плотность, 2 — радиоактивность (осаждение холодной 5% ТХУ). Условия образования тройного комплекса и фотореакции приведены в подписи к табл. 1. Условия центрифугирования: ультрацентрифуга К-28 (СССР), бакет-ротор 28030, 5 час., 30 000 (об/мин.), +4°. Буфер: 0,02 М ТЭА, РН 7,5, 1 М MgCl<sub>2</sub>, 0,5 М NH<sub>4</sub>Cl, градиент сахарозы 5—20%. Пробы перед центрифугированием диализовались против этого же буфера (без сахарозы)

Условия образования тройного комплекса, содержащего рибосомы, фактор G и фото-ГТФ, и последующей фотореакции, а также метод идентификации продукта приведены в табл. 1 и в подписях к соответствующим рисункам.

Субстратная специфичность фото-ГТФ анализировалась в системе образования тройного комплекса с рибосомой и фактором G. Критерием специфичности служил стабилизирующий эффект фусидовой кислоты (табл. 1). Для сравнения приведены данные по связыванию нативного ГТФ. Во избежание возможных артефактов, связанных с неспецифической реакцией при последующем облучении, при образовании тройного комплекса фактор G и рибосомы были взяты в большом избытке. Из данных табл. 1 видно, что фото-ГТФ обладает близкой к нативной ГТФ субстратной специфичностью: в присутствии 3 мМ фусидовой кислоты в тройной комплекс связывается до 40% внесленного фото-ГТФ при 60% связывания внесленного нативного ГТФ. Если иметь в виду, что выбранный метод анализа образования тройного комплекса (фильтрование на ультраfiltре по (<sup>7</sup>)) позволяет зарегистрировать примерно половину комплекса, обнаруживаемого при гель-фильтрации или центрифугировании (см. там же (<sup>7</sup>)). то можно заключить, что в выбранных условиях (недостаток ГТФ или фото-ГТФ) имеет место практически количественное связывание обоих субстратов.

Рибосома и фактор G в отдельности практически не связывают фото-ГТФ. Единственным различием фото-ГТФ и нативного ГТФ является значительная лабильность тройного комплекса с фото-ГТФ в отсутствие фусидовой кислоты. Таким образом, фото-ГТФ — хороший субстрат при взаимодействии с рибосомой и фактором G в присутствии фусидовой кислоты и может быть использован для биоспецифического маркирования ГТФ-связывающего центра. Необходимо подчеркнуть, что довольно значительное

нарушение структуры ГТФ при синтезе аналога, связанное с разрывом связи  $C^{2'}$ — $C^{3'}$  в остатке рибозы, как видно, не приводит к существенному снижению его субстратной специфичности.

Специфичность ковалентной фиксации фото-ГТФ анализировали осаждением облученных проб холодной 5% трихлоруксусной кислотой (ТХУ) (табл. 1). Легко видеть, что в составе тройного комплекса (+FA) до 16% внесенного фото-ГТФ остается ковалентно связанным с компонентом, осаждаемым холодной 5% ТХУ. Реакция является фотохимической, так как при инкубации комплекса в аналогичных условиях в темноте ковалентная фиксация аналога практически отсутствует. Крайне незначительная реакция наблюдается и при облучении смеси в отсутствие фусидовой кислоты. Таким образом, биоспецифичное маркирование комплекса аналогом ГТФ высоко специфично. Специфичная ковалентная фиксация фото-ГТФ в составе тройного комплекса на компоненте, осаждаемом холодной 5% ТХУ, позволяет сформулировать два альтернативных объяснения природы этого компонента: это либо фактор G, либо рибосома. Не исключено, хотя и менее вероятно, что оба эти компонента в составе комплекса могут принимать участие в связывании фото-ГТФ.

Идентификацию компонента, связывающего фото-ГТФ, проводили центрифугированием облученного тройного комплекса в градиенте сахарозы 5—20% после длительного диализа для удаления стабилизатора комплекса (FA) и свободного фото-ГТФ. Буфер для диализа и центрифугирования содержал 0,5M  $NH_4Cl$ , в присутствии которого, как известно, фактор G отделяется от рибосомы. Фракции градиента осаждались холодной 5% ТХУ и анализировались на радиоактивность. Результат приведен на рис. 2б; радиоактивность отсутствует во фракциях, содержащих рибосомальные субчастицы, и концентрируется в районе более низкомолекулярного компонента. В соответствии с вышеизложенными фактами, этим компонентом может быть только фактор G. Специфичность ковалентного связывания фото-ГТФ с фактором G сохраняется и при облучении лабильного комплекса (в отсутствии FA), но с гораздо меньшей эффективностью реакции (рис. 2а). Дополнительным подтверждением идентичности фактора G и меченого ТХУ-осаждаемого компонента может служить также анализ последнего методом гель-фильтрации на сефадексе G-200. На хроматографическом профиле (рис. 3) этот компонент представлен в виде симметричного пика, локализованного левее взятого в качестве внутреннего стандарта овальбумина (м.в. 45000), что коррелируется с данными по гель-фильтрации фактора G (м.в.  $\approx 80000$  (4)). Кроме того, фракции этого пика пропорционально стимулируют связывание ГТФ в присутствии рибосом и фусидовой кислоты, т. е. проявляют активность фактора G.

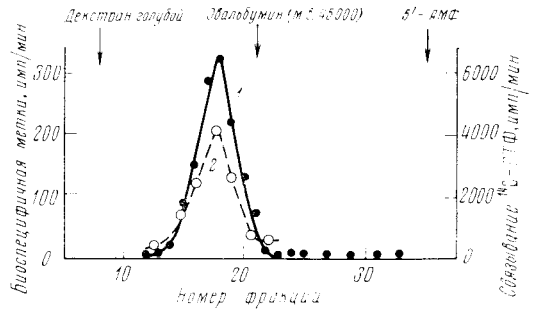


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-200 ( $^{14}C$ )-меченого компонента, выделенного из облученного тройного комплекса рибосома — фактор G — фото-( $^{14}C$ )-ГТФ (+FA) центрифугированием в градиенте сахарозы. 1 — ( $^{14}C$ )-биоспецифичная метка, 2 — ( $^{14}C$ )-ГТФ-связывающая активность в присутствии рибосом и FA.

Условия гель-фильтрации: колонка 1,5×35 см, объем наносимой пробы 1 мл, скорость элюции 5 мл/час, объем фракции 1,7 мл, элюент — буфер для связывания (без FA, см. подпись к табл. 1). Фракции разделяли на две части: одну часть осаждали холодной 5% ТХУ и после фильтрования на ультрафильтре ЛУФС (ЧССР) анализировали на радиоактивность; вторую часть приливали к смеси, содержащей рибосомы, ( $^{14}C$ )-ГТФ и фусидовую кислоту, для анализа G-факторной активности (условия и детали анализа см. в подписи к табл. 1)

Специфичность связывания фото-(<sup>14</sup>C)-ГТФ и биоспецифичного  
маркирования комплекса рибосомы и фактора G

Субстрат	Рибо- сома	Фак- тор G	Фузидо- вая кислота	Связы- вание, %	Эффективность марки- рования, в % от общего количества фото-ГТФ в инкубационной смеси
Фото-( <sup>14</sup> C)-ГТФ	+	+	+	37,0	15,7 (1,1 в темноте) 1,7
	+	+	-	1,0	
	+	-	+	0,5	
(14C)-ГТФ	-	+	+	0,7	
	+	+	+	37,0	
	+	+	-	28,0	
	-	+	-	3,0	

Условия связывания — 25°, 20 мин. Состав инкубационной смеси (0,05 мл): 125 пмол. рибосом, 0,03 мг фактора G (10 ед. акт. по Бодли<sup>(8)</sup>), 0,15 мкмол. фузидовой кислоты, 10 пмол. ГТФ или фото-ГТФ. Буфер для связывания 10 мМ ТЭА, рН 8,5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ. Связывание измерялось методом фильтрования на миллиметровых ультрафильтрах<sup>(7)</sup>. Последующая фотореакция проводилась в термостатированной камере при 0° в течение 2 час. (источник света — ЛЭТИ, СССР, лампа накаливания 400 в) и анализировалась осаждением проб холодной 5% ТХУ на ультрафильтрах АУФС (ЧССР) со счетом последних на радиоактивность в толуольном сцинтиляторе (счетчик ТриКарб, модель 3320, фирма Паккард).

Таким образом, можно сделать вывод, что в изучаемой нами системе рибосома — фактор G — ГТФ ГТФ-связывающий центр локализован на факторе G, а не на рибосоме. Не исключено, что и ГТФазная активность также является внутренним свойством фактора G и индуцируется при его взаимодействии с рибосомой. Для подтверждения сделанного вывода мы в настоящее время изучаем другой аналог ГТФ с фотоактивируемой группировкой, присоединенной к трифосфатному остатку.

Авторы благодарны академику А. С. Спиринову за участие в обсуждении полученных результатов и П. П. Дахнову за помощь при синтезе фото-ГТФ.

Институт белка  
Академии наук СССР  
Пушино Московской обл.

Поступило  
8 VIII 1974

## ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> J. Lucas-Lenard, F. Lipmann, Ann. Rev. Biochem., v. 40, 409 (1971). <sup>2</sup> J. R. Knowles, Acc. Chem. Res., v. 5, 155 (1972). <sup>3</sup> J. A. Hunt, Biochem. J., v. 95, 541 (1965). <sup>4</sup> M. Nirenberg, J. H. Matthaei, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 47, 1588 (1961). <sup>5</sup> J. Kaziro, N. Inoue-Yokosawa, M. Kawakita, J. Biochem., v. 72, 853 (1972). <sup>6</sup> P. Leder, In: Methods in Enzymology, v. 20C, 302 (1971). <sup>7</sup> J. W. Bodley, F. J. Zieve et al., J. Biol. Chem., v. 245, 5656 (1970). <sup>8</sup> J. H. Highland, L. Lin, J. W. Bodley, Biochemistry, v. 10, 4404 (1971).