

ФУНКЦИОНАЛЬНО ВАЖНЫЕ МЕСТА В ФАКТОРЕ ЭЛОНГАЦИИ EF-Tu ИЗ *Thermus aquaticus*: АНАЛИЗ ТОНКИХ СТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ СВЯЗЫВАНИИ С ГУАНОЗИН-3'-ТРИФОСФАТОМ И ГУАНОЗИН-3'-ДИФОСФАТОМ

© 2001 г. Е.В. Бражников, Ю.Н. Чиргадзе

Институт белка РАН, 142290, Пушино Московской области

Поступила в редакцию 13.07.01 г.

По данным высокого разрешения исследованы конформационные изменения главной цепи в двух функциональных состояниях рибосомного фактора элонгации EF-Tu из *Thermus aquaticus*: неактивного с гуанозин-3'-дифосфатом и активного с гуанозин-3'-трифосфатом. Ранее были определены только большие изменения в области эффекторной петли в домене I. Здесь впервые перестройки в главной цепи определены при смещении C_α-атомов в интервале 1–8 Å для каждого из трех белковых доменов. Установлено, что полный набор изменений наблюдается в многочисленных областях. Обнаружены новые области изменений главной цепи, которые расположены главным образом в петлях белковой молекулы. Некоторые из них находятся в участках междоменных взаимодействий, другие коррелируют с известными функционально важными участками связывания EF-Tu с EF-Ts, аминоацил-тРНК и рибосомой. Большинство изменений, инициируемых передачей конформационного сигнала от мест связывания гуанозин-3'-трифосфата при гидролизе, происходят точно в тех местах, которые важны на дальнейших стадиях функционирования фактора. *Передача сигнала от домена I к доменам II и III происходит через междоменные контакты и предопределяет тонкую подстройку функционально важных мест для участия фактора на следующих этапах элонгационного цикла.* Большая часть наблюдаемых изменений относится к консервативным остаткам всего семейства бактериальных факторов, и только некоторые являются специфическими. Данный подход может быть полезен для предопределения потенциальных функционально важных мест в других белках.

Ключевые слова: предопределение функциональных мест, передача сигнала, фактор элонгации EF-Tu, аллостерические перестройки в белках.

Функционирование белка непосредственно связано с конформационными изменениями в главной и боковых цепях. В качестве примера можно упомянуть последние данные о передаче сигнала в таких системах, как клеточная трансформация, контролирование клеточного цикла, передача сигнала рецепторами, биосинтез белка на рибосоме. Все эти процессы требуют сложных изменений белковых молекул. Однако до сих пор полный набор конформационных изменений и передача сигнала, как правило, не изучались. Рибосомный фактор элонгации Tu

(EF-Tu) является одним из участников процесса элонгации полипептидной цепи в биосинтезе белка. Тройственный комплекс EF-Tu с аминоацил-транспортной рибонуклеиновой кислотой (aa-тРНК) и гуанозин-3'-трифосфатом (ГТФ) реагирует с А-участком рибосомы. При кодон-антикодонном взаимодействии ГТФ гидролизует и фактор в комплексе с гуанозин-3'-дифосфатом (ГДФ) покидает рибосому [1,2]. Кристаллическая структура бактериального EF-Tu из разных организмов определена в нескольких функциональных состояниях: в неактивном в комплексе с ГДФ из *Thermus aquaticus* [3] и из *Escherichia coli* [4,5], в активной форме с негидролизующим аналогом ГТФ (GDPNP) из *Thermus aquaticus* [6] и *Thermus thermophilus* [7], в тройственном комплексе с ГТФ-аналогом и фенилаланиновой транспортной рибонуклеиновой кислотой (Фен-тРНК^{Фен}) [8] и цистеиновой транспортной рибонуклеиновой кислотой (Цис-тРНК^{Цис}) [9], в комплексе

Сокращения: EF-Tu – фактор элонгации Tu, EF-Ts – фактор элонгации Ts, aa-тРНК – аминоацил-транспортная рибонуклеиновая кислота, ГТФ – гуанозин-3'-трифосфат, ГДФ – гуанозин-3'-дифосфат, GDPNP – негидролизующий аналог ГТФ, Фен-тРНК^{Фен} – фенилаланиновая транспортная рибонуклеиновая кислота, Цис-тРНК^{Цис} – цистеиновая транспортная рибонуклеиновая кислота.

EF-Tu с фактором обмена нуклеотида EF-Ts из *Escherichia coli* [10] и из *Thermus thermophilus* [11]. Таким образом, в настоящее время атомная структура EF-Tu из разных источников известна для всех функциональных состояний, кроме его комплекса с рибосомой. Молекулу фактора EF-Tu можно рассматривать как систему передачи сигнала, трехмерная структура которой изучена наиболее полно. Этот фактор состоит из трех доменов, что дает возможность через междоменные контакты проследить путь передачи конформационного сигнала, индуцируемого в первом домене, к другим доменам молекулы. Исчерпывающий анализ белковых структур в разных функциональных состояниях позволяет обнаружить как главные, так и небольшие изменения, которые ответственны за передачу начального сигнала, возникающего в результате гидролиза ГТФ в первом домене.

Мы использовали систематический и весьма эффективный подход для определения конформационных изменений только для главной цепи в двух функциональных состояниях. Мы проверили смещения C_{α} -атомов отдельно в каждом из трех доменов EF-Tu из *Thermus aquaticus* с ГДФ и ГТФ и рассмотрели группы аминокислотных остатков со смещениями C_{α} -атомов больше 1,0 Å. Затем мы проанализировали положение этих областей в молекуле и их участие в междоменных контактах в разных состояниях. Такой подход позволил нам определить путь передачи индуцированного распадом ГТФ конформационного сигнала в первом домене. Функциональное значение обнаруженных областей конформационных изменений хорошо согласуется с известными данными, полученными из исследований факторов в комплексе с разными компонентами, участвующими в элонгационном цикле, что подтверждает достоверность предложенного подхода.

МЕТОДЫ

Использовали следующие аминокислотные последовательности. Фактор элонгации EF-Tu из *Thermus aquaticus* взяли с аминокислотной последовательностью для гена *tufA* [12]. Консервативные остатки определены для семейства зубактериальных факторов, из которых отобрали 13 независимых представителей из разных ветвей эволюционного древа [13]. За основу нумерации аминокислотных остатков взяли фактор элонгации из *Thermus aquaticus*. Другие последовательности взяли из следующих бактерий: *Anacystys nidulans*, *Spirulina platensis*, *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium leprae*, *Streptomyces aureofaciens*, *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*), *Deinonema sp.*, *Flexistipes sinursarabici* и *Thermatoga maritima*. Данные для последовательности взяли из банка SWISS-PROT. Выравнивание последовательностей получили с помощью программы ALIGNMENT из GENESEE-сервера.

Использовали данные для структуры неактивного состояния EF-Tu-ГДФ из *Thermus aquaticus* при разрешении 2,7 Å [3] и для активного состояния EF-Tu-GDPNP из того же организма при разрешении 2,5 Å [6]. Их PDB-коды (Brookhaven Protein Data Bank, USA) – 1TUI и 1EFT соответственно.

Модули смещений C_{α} -атомов главной полипептидной цепи вычисляли для каждого из трех доменов по отдельности. При вычислениях исключили короткие неупорядоченные участки в начале и конце полипептидной цепи, а также участки, соединяющие домены между собой. Совмещение структур провели с помощью программы FIT (любезно предоставлена д-ром А.В. Финкельштейном). Кристаллы для состояния с GDPNP содержат одну молекулу фактора в асимметричной части элементарной ячейки, но кристаллы для комплекса с ГДФ содержат три молекулы. Мы использовали атомные координаты для молекулы А. Результаты для других молекул В и С аналогичны.

Известно, что структура белка может зависеть от кристаллической упаковки. Чтобы прояснить этот вопрос в нашем случае, мы проверили изменения в EF-Tu, обусловленные контактами внутри кристалла для ГДФ-формы, содержащей три независимые молекулы в асимметричной части кристалла. Для этого мы вычислили смещения C_{α} -атомов для разных частей А и В, А и С, В и С и нашли среднеквадратичные отклонения разностей в диапазоне 0,09–0,12 Å для доменов I, II и III соответственно. Затем мы проанализировали все контакты в кристаллической решетке с помощью программы MODEL (данные любезно предоставил д-р Х. Дриссен). При сравнении результатов корреляцию между двумя наборами данных не обнаружили. Кроме того, отклонения C_{α} -атомов для разных частей каждой пары были на порядок величины ниже, чем соответствующие разности для C_{α} -атомов в ГДФ- и ГТФ-состояниях (3,88, 1,90 и 0,98 Å для доменов I, II и III соответственно). Эти результаты подтверждают корректность предложенного нами подхода, применяемого для изучения функциональных изменений в главной полипептидной цепи с использованием структурных данных. Анализ

взаимодействий между доменами основан на внутриатомных контактах неводородных атомов. Выбранная граница расстояний 4,0 Å включает в себя водородные связи, ионные, полярные и неполярные контакты главным образом боковых цепей аминокислотных остатков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомология последовательностей бактериальных EF-Tu факторов. Белковая цепь EF-Tu (для гена *tufA*) из *Thermus aquaticus* содержит 405 аминокислотных остатков [12], свернутых в три домена, состоящих из 211, 100 и 94 остатков. Последовательность для представительного набора включает 90, 33 и 40 идентичных позиций аминокислотных остатков, что составляет 42,6, 33,0 и 42,5% для доменов I, II и III соответственно. Вся белковая последовательность содержит 163 идентичных остатка или 40,2%, большая часть которых отмечена в верхней части рис. 1. Большинство из них, 79%, относятся к доступным или поверхностным остаткам. Можно отметить только три специфичных по последовательности области с номерами остатков 33–49, 179–201 и 352–359, которые содержат делеции или значительные (от 2 до 10 остатков) вставки. Таким образом, имеется довольно высокая гомология по последовательности в бактериальных факторах для всей молекулы, но с пониженной величиной для домена II.

Конформационные изменения главной цепи EF-Tu из *Thermus aquaticus* в двух состояниях: связанных с ГДФ и ГТФ. Конформационные смещения C_{α} -атомов для EF-Tu из *Thermus aquaticus*, полученные с использованием рентгеновских структурных данных, представлены на рис. 1. Большие внутри- и междоменные изменения были обнаружены сразу же, как только были определены структуры в двух состояниях [3,6]. Однако детального анализа всех конформационных изменений не было сделано. Чтобы восполнить этот пробел, мы проанализировали полный набор внутридоменных перестроек в главной полипептидной цепи. Анализ тонких изменений конформации боковых цепей требует более высокого разрешения, и в данной работе он не проводится. Наиболее важным для передачи конформационных изменений от места первичной активации (нуклеотидсвязывающий участок) к другим частям молекулы является взаимодействие посредством междоменных контактов. Поэтому на эти взаимодей-

ствия мы обратим особое внимание. Рассмотрим сначала смещение модулей разностей C_{α} -атомов для каждого из трех доменов отдельно, которые возникают при переходе из неактивной формы фактора к активной.

Домен I (остатки 19–209). В домене I присутствуют семь областей смещений C_{α} -атомов в главной цепи (рис. 1а). Соответствие определенных частей в некоторых областях и контактов боковых цепей между доменами II и III в ГДФ- и ГТФ-формах четко видно на графике. Большие перестройки в областях 2–4 были замечены ранее в работе [6]. Здесь мы рассматриваем для этих областей детали контактов боковых цепей между доменами (табл. 1), которые могут объяснить пути передачи конформационного сигнала. Область 1 (остатки 19–30) со смещениями C_{α} -атомов от 1,2 до 2,4 Å не имеет контактов с другими доменами в ГДФ- и ГТФ-состояниях. Этот участок ответственен за связывание α - и β -фосфатов в нуклеотидах. Область 2 (остатки 43–71) имеет смещения C_{α} -атомов от 1,2 до 22,1 Å. Она не имеет контактов боковых цепей с доменом II в ГДФ-связанном состоянии и имеет несколько сильных контактов остатков 43, 67–69 в ГТФ-связанном состоянии. Имеется несколько контактов Arg59 и Ile61 с доменом III в ГДФ-связанном состоянии, и нет контактов в ГТФ-связанном состоянии. Область 2 содержит эффекторную петлю (остатки 41–62), которая вызывает ГТФ-азную реакцию и остаток Thr62, связывающий γ -фосфат. Мы можем заключить, что конформационный сигнал от этой области в домене I в ГТФ-связанном состоянии передается домену II главным образом через контакты с Glu43, His67 и Gln69. Область 3 (остатки 73–88) имеет смещения C_{α} -атомов в диапазоне 1,1–6,1 Å. Она содержит семь межатомных контактов Arg75 в ГДФ-связанном состоянии с доменом II и контактирует несколькими остатками с доменом II в ГТФ-связанном состоянии. Область 4 (остатки 90–102) имеет смещения C_{α} -атомов от 1,3 до 8,1 Å. Большое число взаимодействий включает 33 межатомных контакта с доменом II в ГТФ-связанном состоянии и 12 контактов с доменом III в ГДФ-связанном состоянии. Было показано, что перестройки спиралей в областях 3 и 4 являются движущей силой в образовании прочного взаимодействия домена I с доменами II и III в ГТФ-связанном состоянии [6].

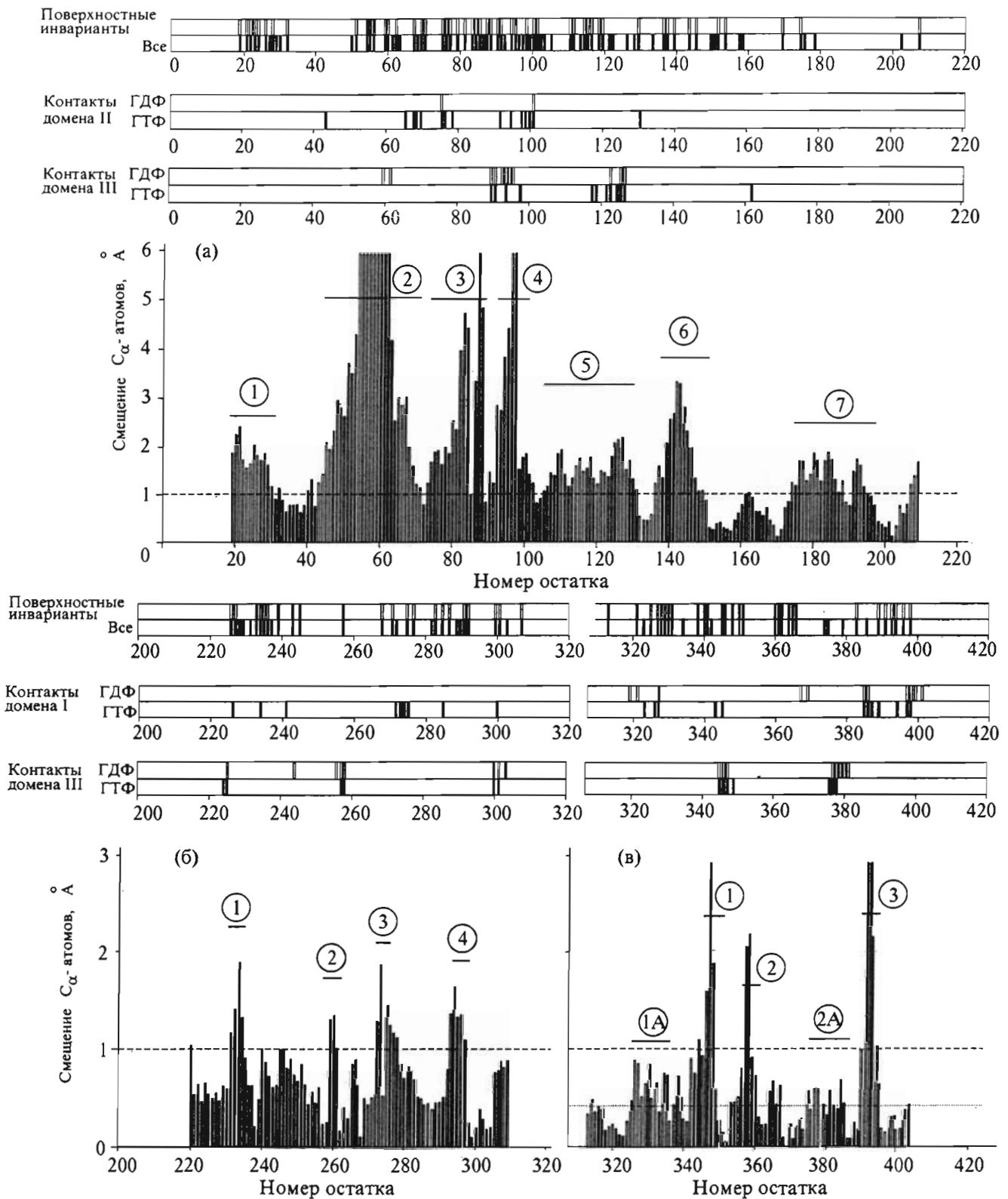


Рис. 1. Модули смещений C_{α} -атомов в домене I (а), домене II (б) и домене III (в) фактора элонгации EF-Tu из *Thermus aquaticus*. На верхней части рисунков показаны консервативные остатки, а также остатки, участвующие в междоменных контактах в ГДФ- и ГТФ-связанном положении. Пунктирная горизонтальная линия указывает границу значимых величин смещений C_{α} -атомов.

Таблица 1. Межатомные контакты боковых цепей в EF-Tu из *Thermus aquaticus* (расстояние $\leq 4,0 \text{ \AA}$)

Домен I (остатки 19–209)					Домен II (остатки 220–309)					Домен III (остатки 313–403)				
Остатки домена I	Количество контактов				Остатки домена II	Количество контактов				Остатки домена III	Количество контактов			
	Домен II		Домен III			Домен I		Домен III			Домен I		Домен II	
	ГДФ	ГТФ	ГДФ	ГТФ		ГДФ	ГТФ	ГДФ	ГТФ		ГДФ	ГТФ	ГДФ	ГТФ
43 Glu	-	10	-	-	224 Pro	-	-	-	2	319 Ser	7	-	-	-
59 Arg	-	-	10	-	225 Val	-	-	2	4	321 Tyr	1	-	-	-
61 Ile	-	-	2	-	226 Glu	-	11	-	-	323 Leu	-	11	-	-
65 Thr	-	1	-	-	234 Arg	-	1	-	-	326 Glu	-	2	-	-
67 His	-	11	-	-	241 Arg	-	10	-	-	327 Glu	1	11	-	-
68 Val	-	2	-	-	244 Arg	-	-	7	-	343 Tyr	-	2	-	-
69 Glu	-	20	-	-	256 Val	-	-	2	-	345 Arg	-	4	5	2
75 Arg	7	9	-	-	257 Gly	-	-	1	2	346 Thr	-	-	9	11
76 His	-	1	-	-	258 Leu	-	-	6	5	347 Thr	-	-	2	6
78 Ser	-	5	-	-	272 Met	-	2	-	-	349 Val	-	-	-	1
89 Ile	-	-	4	4	273 His	-	21	-	-	367 Asn	4	-	-	-
90 Lys	-	-	1	1	274 Arg	-	10	-	-	369 Thr	3	-	-	-
91 Asn	-	3	-	-	275 Lys	-	4	-	-	376 Lys	-	-	-	1
92 Met	-	-	3	-	285 Asn	-	11	-	-	377 Pro	-	-	6	6
93 Ile	-	-	13	1	300 Arg	-	6	6	2	378 Val	-	-	2	4
94 Thr	-	4	6	-	301 Gly	-	-	3	10	379 Ala	-	-	7	-
95 Gly	-	-	9	-	303 Val	-	-	5	-	380 Leu	-	-	3	-
97 Ala	-	1	-	3						381 Glu	-	-	11	-
98 Gln	-	13	-	-						385 Arg	28	7	-	-
99 Met	-	2	-	-						386 Phe	6	7	-	-
100 Asp	1	10	-	-						387 Arg	-	1	-	-
117 Arg	-	-	-	7						389 Arg	-	7	-	-
118 Glu	-	-	-	8						394 Thr	-	6	-	-
121 Leu	-	-	-	1						397 Ala	4	6	-	-
122 Leu	-	-	1	2						398 Gly	2	2	-	-
124 Arg	-	-	-	1						399 Ile	2	-	-	-
125 Gln	-	-	10	21						401 Gln	2	-	-	-
126 Val	-	-	1	1										
130 Tyr	-	7	-	-										
161 Tyr	-	-	-	6										

До настоящего времени было мало уделено внимания перестройкам в других областях в домене I, так же как и в доменах II и III. Ниже мы описываем новые области перестроек для всех трех доменов. Возможное их функциональное значение будет рассмотрено в сле-

дующем разделе. В домене I мы нашли три дополнительные области: область 5 (остатки 105–131), область 6 (остатки 135–150) и область 7 (остатки 174–196). Область 5 включает в себя участок типа петля-спираль-петля. Она соответствует контактам с доменом III как в ГДФ-,

так и ГТФ-связанном состоянии. Большинство заметных контактов обусловлены Gln125 в ГДФ-связанном состоянии и Arg117, Glu118, Gln125 в ГТФ-связанном состоянии (табл. 1). Области 6 и 7 включают в себя участки петля-спираль и спираль-петля. Они расположены близко друг к другу на внешних частях молекулы. Поэтому они не участвуют в контактах с другими доменами. Следует отметить, что области 1–6 состоят из консервативных поверхностных остатков, а область 7 – только из неконсервативных и специфических.

Домен II (остатки 220–309). Домен II включает четыре области конформационных изменений со смещениями C_{α} -атомов от 1 до 2 Å (рис. 1б). Все они находятся на выступающих петлях (рис. 2). Область 1 (остатки 231–234), область 2 (остатки 259–261) и область 4 (остатки 294–297) содержат четкие пики смещений C_{α} -атомов, но они не проявляют четкой корреляции с контактами с доменами I и III в обоих состояниях. Только область 3 (остатки 272–278) содержит 37 межатомных контактов боковых цепей с доменом I в ГТФ-связанном состоянии посредством остатков His273, Arg274 и Lys275 (табл. 1). Область 3 представляет собой яркий случай непосредственного кинематического влияния, обусловленного передачей сигнала от каталитического домена I. Таким образом, можно предположить, что область 3 ответственна за непосредственную передачу конформационного сигнала от домена I к домену II. Области 1 и 3 являются консервативными, а области 2 и 4 нет.

Домен III (остатки 313–403). Домен III имеет три области сильных конформационных изменений от 1 до 4 Å (рис. 1в). Все они найдены в выступающих петлях (рис. 2). Область 1 (остатки 344–348) не имеет контактов с доменом I в ГДФ-связанном состоянии, но образует 6 контактов боковых цепей остатков 343 и 345 в ГТФ-связанном состоянии. Эта область очень четко контактирует с доменом II: 16 контактов (ГДФ) и 19 контактов (ГТФ). Область 2 (остатки 357–359) не образует контактов, поскольку она расположена на внешней части молекулы. Область 3 (остатки 390–394) содержит контакты боковой цепи только одного остатка Thr394 с доменом I в ГДФ-связанном состоянии. Однако вблизи остатков 385–389 и 397–401 видно много контактов с доменом I как в ГТФ-, так и в ГДФ-связанном состоянии,

которые могут вызвать сильные смещения C_{α} -атомов в диапазоне 2–4,2 Å.

Кроме этого, мы наблюдали очень низкий фон смещений C_{α} -атомов для домена III по сравнению с другими доменами. Это позволяет нам выделить две дополнительные области с небольшими изменениями порядка 0,5–1,0 Å. Область 1А (остатки 325–332) состоит главным образом из консервативных остатков и образует один контакт (ГДФ) и 13 контактов (ГТФ) с доменом I. Область 2А (остатки 377–385) домена III имеет очень четкие контакты с доменом I: 28 контактов (ГДФ) и 7 контактов (ГТФ), и с доменом II: 29 контактов (ГДФ) и 10 контактов (ГТФ). Таким образом, область 2А имеет важные взаимодействия домена III с доменами I и II, и они сохраняются как в ГДФ-, так и в ГТФ-связанном состоянии. Все области домена образуются консервативными остатками, за исключением области 2А, которая содержит небольшое количество спрятанных внутри молекулы консервативных остатков.

Функциональное значение наблюдаемых конформационных изменений главной белковой цепи EF-Tu из *Thermus aquaticus* при переходе из ГТФ- в ГДФ-связанное состояние. Общие свойства всех наблюдаемых областей со значительными смещениями C_{α} -атомов суммированы в табл. 2 и на рис. 3. Они также сравниваются со структурными данными для тройственного комплекса EF-Tu·GDPNP·aa-tРНК [8], комплекса EF-Tu·EF-Ts [10] и электронно-микроскопическими данными 70S рибосомной субчастицы с EF-Tu фактором [14].

Рассмотрим полученные результаты с функциональной точки зрения. Домен I содержит семь протяженных областей конформационных смещений. Области 1–3 принимают участие в связывании ГДФ, ГТФ, иона магния и молекулы структурной воды в районе γ -фосфатной группы в ГТФ. Области 3–5 ответственны за взаимодействие домена I с другими доменами, и сигнал перестройки молекулы передается точно через эти области. Существенная часть области 6 участвует в образовании контакта EF-Tu с фактором гуанин-нуклеотидного обмена EF-Ts (табл. 2). Ранее было показано, что EF-Tu из *E. coli* контактирует с белком L7/L12 в составе 50S рибосомной субчастицы в комплексе с ГТФ, aa-tРНК^{Фен} и другими важными компонентами [14], и полная контактная область EF-Tu из

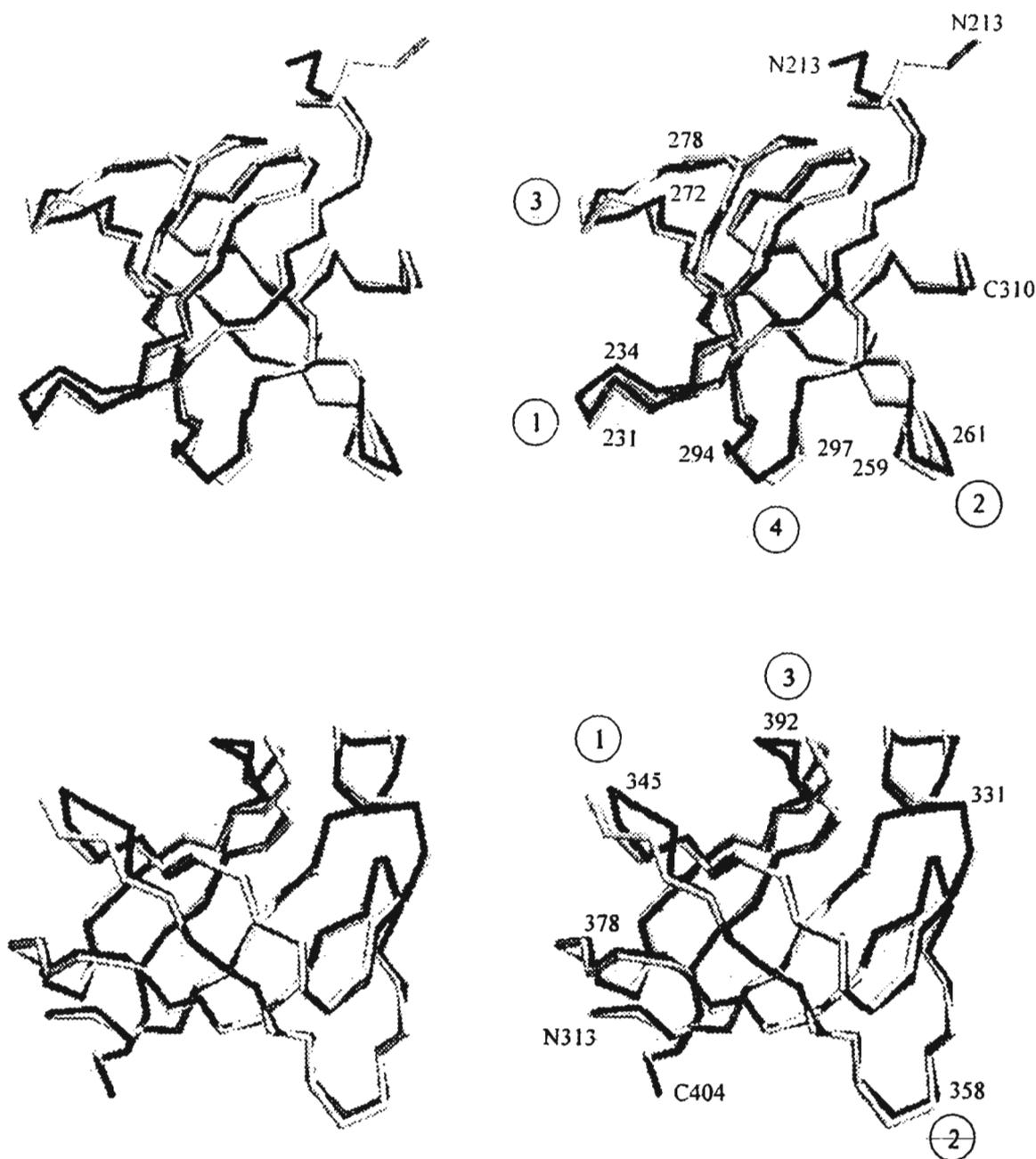


Рис. 2. Наложение хода полипептидной цепи в виде C_{α} -атомов в доменах II и III фактора EF-Tu из *Thermus aquaticus* в ГДФ- и ГТФ-связанном состояниях. Выступающие петли со значительными смещениями перенумерованы согласно рис. 1 и табл. 2. Верхняя часть – домен II, нижняя часть – домен III.

Thermus thermophilus считается по аналогии как область 7. Области 1–6 являются наиболее консервативными, тогда как область 7 полностью специфична.

В домене II области 1 и 3 участвуют в связывании EF-Tu с aa-tРНК около 3'- и 5'-

концов (табл. 2). Области 1 и 3 являются консервативными, тогда как области 2 и 4 – специфичны.

В домене III области 1 и 3 ответственны за связывание с aa-tРНК на следующем функциональном шаге (табл. 2). Область 2А домена

Таблица 2. Наблюдаемые перестройки главной полипептидной цепи фактора элонгации EF-Tu из *Thermus aquaticus*, связанного с ГТФ и ГДФ

Номер области	Номера остатков	ΔC_{α} , Å, rms	Инварианты от всех остатков	Структура и контакты доменов	Функциональный смысл
Домен I*					
5	105–131	1,2–2,3	9 из 27	<i>Структура:</i> петля-спираль-петля <i>Контакты с доменом II:</i> нет контактов в ГДФ-связанном состоянии. Только один остаток Tyr130 образует контакты в ГТФ-состоянии <i>Контакты с доменом III:</i> многие остатки образуют контакты как в ГДФ-, так и в ГТФ-состояниях	Сильные контакты между доменами I и III в ГДФ- и ГТФ-состояниях. Наиболее значительными являются остатки Arg117, Glu118 и Gln125 (показано в данной работе). Остатки Thr109, Asp110 и Gln115 образуют контакты с фактором EF-Ts по аналогии с Tu-Ts комплексом из <i>E.coli</i> [10]
6	136–150	1,0–3,4	6 из 15	<i>Структура:</i> петля-спираль <i>Контакты с доменами II и III:</i> нет	Остатки 142–150 образуют участок связывания с EF-Ts по аналогии с Tu-Ts комплексом из <i>E.coli</i> [10].
7	174–196	1,0–2,0	0 из 23	<i>Структура:</i> спираль-петля на внешней части домена I <i>Контакты с доменами II и III:</i> нет	Эта область взаимодействует с L7/L12 выступом на 50S субчастице рибосомы, как показано для EF-Tu из <i>E.coli</i> с ГДФ и aa-тРНК [14]
Домен II					
1	231–234	1,2–1,9	4 из 4	Выступающая петля на внешней части домена <i>Контакты с доменом I:</i> нет контактов в ГДФ-состоянии. Только один контакт Arg234 в ГТФ-состоянии <i>Контакты с доменом III:</i> нет	Две петли 229–236 и 272–277 образуют карман для 3'-концевого аденина, как это было показано для EF-Tu из <i>Thermus aquaticus</i> с дрожжевой Фен-тРНК и аналогом ГТФ [8]
2	259–261	1,0–1,3	0 из 3	Выступающая петля на внешней части домена <i>Контакты с доменами I и III:</i> нет	Еще не известен
3	272–278	1,2–1,9	3 из 6	Выступающая петля на внешней части домена <i>Контакты с доменом I:</i> нет контактов в ГДФ-, но много в ГТФ-состояниях <i>Контакты с доменом III:</i> нет	Петля 272–278 ответственна за непосредственную передачу конформационного сигнала от домена I к домену II. Эта петля образует также участок связывания aa-тРНК [8]
4	294–297	1,4–1,7	0 из 4	Выступающая петля на внешней части домена <i>Контакты с доменами I и III:</i> нет	Еще не известен
Домен III					
1	344–348	1,0–1,3	4 из 5	Выступающая петля на внутренней части домена <i>Контакты с доменом I:</i> нет контактов в ГДФ-состоянии. Несколько контактов в ГТФ-состоянии <i>Контакты с доменом II:</i> много контактов как в ГТФ-, так и в ГДФ-состояниях	Петля из остатков 346–348 образует стенку кармана для связывания aa-тРНК 5'-конца, как это было показано для <i>Thermus aquaticus</i> EF-Tu в комплексе с дрожжевой Фен-тРНК и аналогом ГТФ [8]
2	357–359	1,0–2,2	0 из 3	Выступающая петля на внешней части домена <i>Контакты с доменами I и III:</i> нет	Еще не известен
3	390–394	1,1–4,2	5 из 5	Выступающая петля, расположенная в интерфейсе между доменами I и III <i>Контакты с доменом I:</i> только один Thr394 образует контакты в ГТФ-состоянии <i>Контакты с доменом II:</i> нет	Остаток Gly391 должен взаимодействовать с T-черешком aa-тРНК по аналогии с комплексом EF-Tu из <i>Thermus aquaticus</i> , дрожжевой Фен-тРНК и аналогом ГТФ [8]

*Области 1–4 домена I описаны в тексте.

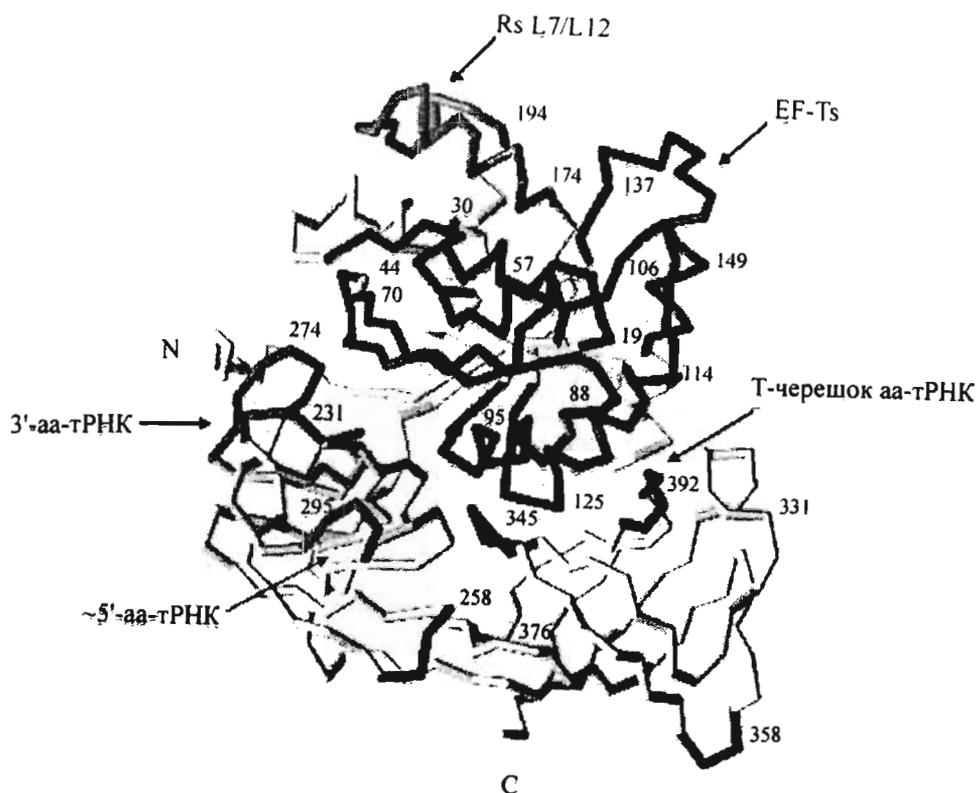


Рис. 3. Функциональные значения наблюдаемых областей конформационных изменений главной белковой цепи EF-Tu из *Thermus aquaticus* в ГТФ-связанном состоянии. Отнесение областей, указанных стрелками, сделано на основе известных данных (см. текст). Выделенные участки соответствуют областям со значительными перестройками главной цепи белка.

III образует многочисленные контакты с доменами I и II, которые имеются в молекуле фактора как в ГДФ-, так и в ГТФ-связанном состоянии.

Функциональная роль областей 2 и 4 (домен II) и области 2 (домен III) еще не известна. Мы только предполагаем, что они могут принимать участие во взаимодействии фактора с поверхностью рибосомы.

Мы получили и проанализировали полный набор смещений C_{α} -атомов при переходе из ГТФ- в ГДФ-связанное состояние. Области значительных изменений охватывают существенную часть молекулы, и большинство из них, как показано *a posteriori*, имеют ясный функциональный смысл. Их структурное значение заключается в передаче конформационного сигнала от места первоначальной перестройки молекулы в ГТФ-связывающем центре к другим частям молекулы. Эта передача происходит через междоменные контакты и представляет со-

бой подстройку структуры фактора для выполнения его функциональной роли на следующих этапах белкового синтеза. Действительно, многие предопределенные места, связанные с конформационными изменениями, участвуют непосредственно на следующих этапах функционирования фактора элонгации EF-Tu. Например, определенные области относятся к связывающим участкам EF-Ts, aa-тРНК и L7/L12 на 50S рибосомной субчастице. Это поддерживает идею, что фактор EF-Tu должен обеспечить свою структуру в активной форме таким образом, чтобы быть готовым для следующих стадий его функционирования. Большинство областей содержат эволюционно консервативные остатки. Однако связывающий участок домена I (в области 7) EF-Tu к рибосоме является абсолютно специфичным. Наконец, мы можем отметить, что полученные результаты применимы ко всему семейству бактериальных факторов EF-Tu.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы применили систематический подход для эффективного определения и дальнейшего анализа полного набора перестроек внутри белковых доменов, которые происходят в факторе EF-Tu в разных конформационных состояниях. Это было сделано только для изменений главной цепи, а именно для отклонений C α -атомов. На этой основе может быть сделан дальнейший детальный анализ соответствующих боковых групп аминокислотных остатков. Данный подход был применен для наиболее хорошо изученного фактора элонгации EF-Tu, связанного с ГТФ и ГДФ. Мы подтвердили все уже известные изменения, и это доказывает надежность предложенного подхода. В дополнение к этому, были найдены многочисленные перестройки в главной цепи, происходящие в EF-Tu при переходе из неактивной формы в активное состояние. Рассмотрение *a posteriori* рентгеноструктурных данных разных комплексов EF-Tu позволяет признать функциональный смысл групп остатков со значительными смещениями C α -атомов. Более того, некоторые новые, возможно функционально важные, места были определены более детально и точно. Полученные данные могут быть полезны для любого семейства факторов элонгации EF-Tu из эубактерий. В настоящее время многие из выявленных в данной работе функционально важных мест фактора элонгации EF-Tu могут быть эффективно использованы в белковой инженерии для контроля белкового синтеза в клетке.

Можно предположить, что наблюдаемый эффект является общей особенностью функционирующих белков и данный подход представляет общий интерес. Например, он может быть особенно ценным для определения аллостерических перестроек в молекуле белка при аминокислотных заменах. Другое важное значение полученных данных состоит в определении пути передачи конформационного сигнала. Хорошим примером предложенного подхода может служить случай определения пути передачи сиг-

нала внутри сложной структуры карбомил-фосфатсинтетазы [15].

Мы благодарим проф. А.В. Финкельштейна (Институт белка РАН) за предоставление программы FIT и полезное обсуждение и Dr Н.Р.С. Driessen (Birkbeck College, University of London) за определение данных о контактах атомов в кристаллической ячейке, полученных с использованием программы MODEL.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller D.I., Weissbach H. // *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* / Eds. H. Weissbach, S. Pestca. N. Y.: Acad. Press, 1977. P. 323–373.
2. Spirin A.S. // *Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 1985. V. 32. P. 75–113.
3. Polekhina G., Thirup S., Kjeldgaard M., Nissen P., Lippmann C., Nyborg J. // *Structure*. 1996. V. 4. P. 1141–1151.
4. Abel K., Yoder M.D., Hilgenfeld R., Jurnak F. // *Structure*. 1996. V. 4. P. 1153–1159.
5. Song H., Parsons M.R., Rowsell S., Leonard G., Phillips S.E.V. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 285 P. 1245–1256.
6. Kjeldgaard M., Nissen P., Thirup S., Nyborg J. // *Structure*. 1993. V. 1. P. 35–50.
7. Berchtold H., Reshetnikova L., Reiser C.O.A., Schirmer N.K., Sprinzl M., Hilgenfeld R. // *Nature*. 1993. V. 365. P. 126–132.
8. Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S., Polekhina G., Reshetnikova L., Clark F.C., Nyborg J. // *Science*. 1995. V. 270. P. 1464–1472.
9. Nissen P., Thirup S., Kjeldgaard M., Nyborg J. // *Structure*. 1999. V. 7. P. 143–156.
10. Kawashima T., Berthet-Colominas C., Wulff M., Cusack S., Leberman R. // *Nature*. 1996. V. 379. P. 511–518.
11. Wang Y., Jiang Y., Meyering-Voss M., Sprinzl M., Sigler P.B. // *Nature Struct. Biol.* 1997. V. 4. P. 650–656.
12. Voss R.H., Hartmann R.K., Lippman C., Alexander C., Jahn O., Erdmann V.A. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 207. P. 839–846.
13. Baldauf S.L., Palmer J.D., Doolittle W.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 7749–7754.
14. Stark H., Rodnina M.V., Rinke-Appel J., Brimacombe R., Wintermeyer W., van Heel M. // *Nature*. 1997. V. 389. P. 403–406.
15. Thoden J.B., Holden H.M., Wesenberg G., Raushel F.M., Rayment F. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 6305–6316.

Functionally Important Sites in the Elongation Factor EF-Tu from *Thermus aquaticus*: Analysis of Fine Structural Changes upon Binding of Guanosine-3'-triphosphate and Guanosine-3'-diphosphate

E.V. Brazhnikov and Yu.N. Chirgadze

Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

High-resolution data were used to analyze conformational changes of the main chain in two functional states of the ribosome elongation factor EF-Tu from *Thermus aquaticus*: the inactive state with guanosine-3'-diphosphate and the active state with guanosine-3'-triphosphate. Earlier only major changes in the effector loop of the domain I were determined. In this paper, all rearrangements in the main chain were observed upon shifting of C_α-atoms from 1 to 8 Å for each of the three protein domains. It was shown that these changes occur in numerous regions. New regions of changes were found, and they were located mostly in the loops of protein domains. Some of them are in the regions of interdomain interactions, others correlate with the known functionally important regions of EF-Tu binding with EF-Ts, aminoacyl-tRNA and the ribosome. Most changes induced by the conformational signal transfer from the guanosine-3'-triphosphate binding site occur just in the regions that are important for further stages of the factor functioning. *The signal is transferred from domain I to domains II and III via interdomain contacts, predetermining fine fitting of functionally important regions to be involved in the following stages of the elongation cycle.* The greatest part of the detected changes occurs in conservative residues of the whole family of bacterial factors, and only some of them are specific. This approach may prove useful for predetermining potential functionally important sites in other proteins.

Key words: predetermining functional sites; signal transfer; elongation factor EF-Tu; allosteric rearrangements in proteins