

STUDY ON HYDRATION OF NUCLEIC ACID COMPONENTS
BY IR-SPECTROSCOPY AND SHF-DIELECTROMETRY

M. A. Semenov, V. A. Kashpur, T. V. Bolbukh, V. Ya. Maleev

Institute of Radiophysics and Electronics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Summary

Dielectric permittivity and infrared spectra of nucleic acids components have been measured to elucidate the role of water in the stabilization of DNA double helical structure. The centres and degrees of hydration of adenine, thymine, ribose and phosphate groups are determined.

1. Falk B. M. Hydration of purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides // Can. J. Chem.—1965.—43, N 1.— P. 314—321.
2. Гидратация нуклеотидов, полинуклеотидов и природных ДНК / Э. Л. Андроникашвили, Г. М. Мревлишвили, Г. Ш. Джапаридзе и др. // Конформационные изменения биополимеров в растворах: Тез. докл. V совещания по конформационным изменениям биополимеров в растворах.— Тбилиси: Мецниереба, 1980.— С. 42.
3. Данилов В. И., Шестопалова А. В. Изучение комплексов нуклеотидных оснований и Уотсон-Криковских пар с молекулой воды: плоские и пространственные конфигурации // Молекуляр. генетика и биофизика.— Киев: Вища школа, 1984.— Вып. 9.— С. 47—54.
4. Poltev V. I., Grokhlina T. I., Malenkov G. G. Hydration of nucleic acid bases studied using novel atom-atom potential functions // J. Biomol. Struct. and Dyn.—1984.—2, N 2.— P. 413—429.
5. Большух Т. В., Семенов М. А. Изотермы гидратации полинуклеотидов // Биофизика.—1985.—30, № 3.— С. 409—413.
6. Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголева Т. Ю. Исследование гидратации глобулярных белков дифференциальным диэлектрометрическим методом // Молекуляр. биология.—1976.—10, № 3.— С. 568—575.
7. Osmometric studies on self-association of pyrimidines in aqueous solutions: evidence for involvement of hydrophobic interactions / E. Plesiewicz, E. Stepien, K. Bolewska, K. L. Wierzchowski // Biophys. Chem.—1976.—4, N 2.— P. 131—141.
8. Петров А. И., Сухоруков Б. И. Исследование межмолекулярных взаимодействий и самоорганизация адениновых нуклеотидов методом спиновых меток // Молекуляр. биология.—1980.—14, № 2.— С. 439—447.
9. Семенов М. А., Большух Т. В., Малеев В. Я. Исследование гидратации двухспирального комплекса полнА-полиУ методами ИК-спектроскопии и пьезограмметрии // Биофизика.—1985.—30, № 4.— С. 571—577.

Ин-т радиофизики и электроники АН УССР,
Харьков

Получено 11.11.85

УДК 577.217.53

**АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ
СТАДИИ ЭЛОНГАЦИИ БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В РАМКАХ
ГИПОТЕЗЫ О СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ
КОДОН-АНТИКОДОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА РИБОСОМЕ.
1. СКОРОСТЬ ЭЛОНГАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ**

А. П. Потапов, Б. Н. Гольдштейн, С. Р. Сайфуллин, А. В. Ельская

Матричный синтез белка на рибосомах основан на кодон-антикодонных взаимодействиях, которые определяют отбор соответствующей аминоацил-тРНК и по завершении трансептидации влияют на эффективность транслокации новообразованной пептидил-тРНК с прочтенным кодоном мРНК из А- в Р-центр рибосомы [1]. Характерной особенностью кодон-антикодонных взаимодействий является малое число участвующих в них нуклеотидов, в силу чего эти взаимодействия как таковые являются сравнительно слабыми и малоспецифичными [2—

4]. Это порождает серьезные трудности в объяснении механизмов отбора, транслокации и в конечном счете в объяснении известной точности и скорости трансляции.

Для решения этой проблемы предложена гипотеза о прямом взаимодействии рибосомы с кодон-антикодоновым комплексом: гипотеза стереоспецифической стабилизации пары кодон — антикодон [5—7]. Согласно ей, некий компонент рибосомы X способен связывать комплементарную кодон-антикодоновую пару в А-центре и транслоцировать ее в Р-центр. Не исключен аналогичный способ перемещения кодон-антикодоновой пары из Р- в Е-центр рибосомы. Принципиально здесь то, что

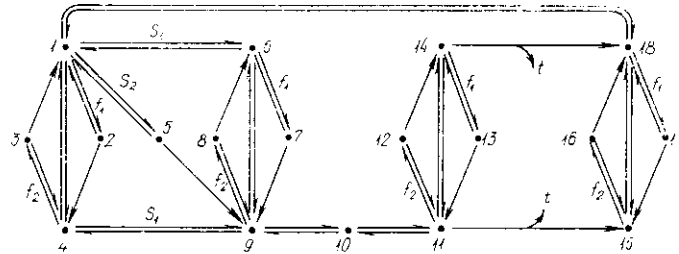


Рис. 1. Граф процесса элонгации белкового синтеза.
Fig. 1. A graph of the protein synthesis elongation.

1) формирование тройного комплекса $X \cdot$ (кодон — антикодон) является обязательным условием отбора субстрата в А-центре рибосомы, 2) темп челночного перемещения X между функциональными центрами рибосомы определяет скорость рабочего цикла элонгации. Отдельные стадии этого перемещения промотируются соответствующими белковыми факторами элонгации с ГТР. $EF-Tu$ промотирует перемещение X из Р- в А-центр, тогда как $EF-G$ — из А- в Р-центр рибосомы [4].

С учетом этих положений предложена детализированная схема рабочего цикла стадии элонгации белкового синтеза [4]. В настоящей работе проанализированы кинетические особенности этой схемы, получены уравнения стационарной кинетики элонгации, качественные выводы из которых допускают экспериментальную проверку справедливости сделанных допущений.

Граф рабочего цикла элонгации полипептидных цепей. Кинетический анализ предложенной схемы [4] проведен методом направленных графов [8] с учетом предположения о стационарности процесса трансляции. В условиях, когда концентрация деацилированной тРНК мала (например, при высокой активности аминоацил-тРНК-синтетаз), и обратным ее присоединением к рибосоме можно пренебречь, данная схема может быть представлена следующим графом (рис. 1). Узлы графа соответствуют различным состояниям рибосомного комплекса: 1) $(p-t)XR$; 2) $((p-t)RX)F_1$; 3) $((p-t)XR)F_2$; 4) $(p-t)RX$; 5) $((p-t)RX(a-t''))F_1$; 6) $(p-t)XR(a-t'')$; 7) $((p-t)RX(a-t''))F_1$; 8) $((p-t)XR(a-t''))F_2$; 9) $(p-t)RX(a-t'')$; 10) $(p-t)RX[a-t'']$; 11) $(t)RX[p-t']$; 12) $((t)[p-t'']XR)F_2$; 13) $((t)RX[p-t''])F_1$; 14) $(t)[p-t'']XR$; 15) $RX[p-t'']$; 16) $(([p-t'']XR)F_2$; 17) $(RX[p-t''])F_1$; 18) $[p-t'']XR$. Используются следующие обозначения: t — деацилированная тРНК; $a-t$ — аминоацил-тРНК; $p-t$ — пептидил-тРНК; R — мРНК-программированная рибосома. Слева от R записаны компоненты, находящиеся в Р-центре рибосомы, справа — компоненты в ее А-центре. Через XR обозначена конформация рибосомы с X , расположенным в Р-центре; через RX — конформация рибосомы с X , расположенным в ее А-центре. Круглыми скобками обозначена ситуация, когда антикодон соответствующей тРНК в А- или Р-центре свободен от X , квадратными — когда он взаимодействует с X и входит в состав тройного комплекса $X \cdot$ (кодон — антикодон). Через F_1 и F_2 обозначены комплексы белковых факторов элонгации $EF-Tu$ и $EF-G$ с ГТР соответственно. Отвечающие им концентрации обозначены малыми буквами

f_1 и f_2 . S_1 — концентрация свободной аминоацил-тРНК, S_2 — концентрация комплекса аминоацил-тРНК с $EF-Tu$ и GTP.

Уравнения удельной скорости элонгации полипептидных цепей. Рассмотрим трансляцию матричного полирибонуклеотида, представленного последовательностью одного и того же кодона, в присутствии аминоацил-тРНК одного вида. Общее выражение для удельной скорости элонгации, оцениваемой по скорости деацилирования тРНК на рибосо-

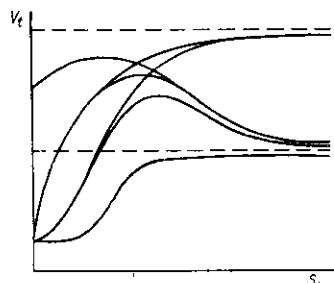


Рис. 2. Зависимость удельной скорости элонгации (v_t) от концентрации свободной аминоацил-тРНК (S_1) согласно уравнению (1).

Fig. 2. Dependence of the specific elongation (v_t) rate on the free aa-tRNA concentration (s_1) according to equation (1).

ме (высвобождение t , рис. 1), отнесенной к молярной концентрации рибосом, типа $v_t = v_t(S_1, S_2, f_1, f_2)$ имеет громоздкий вид и неудобно в рассмотрении. Поэтому целесообразен последовательный анализ зависимости v_t от концентрации каждого из компонентов системы при постоянных концентрациях остальных компонентов.

Согласно теории направленных графов [8], зависимость удельной скорости элонгации, v_t , от концентрации свободных аминоацил-тРНК, S_1 , для нашего графа (рис. 1) должна иметь вид:

$$v_t(S_1) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 S_1 + \alpha_2 S_1^2}{\beta_0 + \beta_1 S_1 + \beta_2 S_1^2}; \quad \alpha_i = \alpha_i(S_2, f_1, f_2), \quad i = 0, 1, 2; \quad (1)$$

$$\alpha_0 = 0 \text{ при } S_2 = 0; \quad \beta_i = \beta_i(S_2, f_1, f_2), \quad i = 0, 1, 2.$$

Коэффициенты α_i и β_i являются полиномами указанных параметров, где коэффициенты полинома представляют собой произведения констант скоростей отдельных стадий. Это справедливо и для всех ниже рассмотренных случаев. Однако следует иметь в виду, что одинаково обозначенные α , β иные в каждом отдельном случае. Конкретный вид коэффициентов здесь не приведен ввиду громоздкости соответствующих выражений.

Уравнение (1) может описывать набор кривых типа изображенных на рис. 2. Эти кривые соответствуют различным соотношениям констант, входящих в (1). Их можно подразделить на кривые с насыщением по субстрату S_1 и кривые с частичным ингибированием. Кроме того, кривые могут иметь перегиб на восходящем участке. Возможна также кривая с насыщением и лаг-областью. Асимптотическое значение $v_t(S_1)$ при $S_1 \rightarrow \infty$ может быть больше ($\alpha_2/\beta_2 > \alpha_0/\beta_0$) или меньше ($\alpha_2/\beta_2 < \alpha_0/\beta_0$) ее начального значения при $S_1 = 0$. В отсутствие субстрата S_2 кривая идет из 0.

Зависимость удельной начальной скорости элонгации от концентрации комплекса аминоацил-тРНК с $EF-Tu$ и GTP, S_2 , задается уравнением более простого вида:

$$v_t(S_2) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 S_2}{\beta_0 + \beta_1 S_2}; \quad \alpha_i = \alpha_i(S_1, f_1, f_2), \quad i = 0, 1; \quad (2)$$

$$\alpha_0 = 0 \text{ при } S_1 = 0; \quad \beta_i = \beta_i(S_1, f_1, f_2), \quad i = 0, 1.$$

Оно может описывать два вида кривых (рис. 3). При выполнении неравенства $\alpha_1/\beta_1 > \alpha_0/\beta_0$ уравнению (2) соответствует гипербола Михаэлиса — Ментен, смещенная по оси ординат от нуля на величину α_0/β_0 .

Если справедливо неравенство $\alpha_1/\beta_1 < \alpha_0/\beta_0$, ему соответствует кривая, асимптотически падающая до значения α_1/β_1 .

Зависимость v_i от концентрации комплекса белкового фактора *EF-Tu* с GTP, f_1 , описывается уравнением:

$$v_i(f_1) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 f_1 + \alpha_2 f_1^2 + \alpha_3 f_1^3}{\beta_0 + \beta_1 f_1 + \beta_2 f_1^2 + \beta_3 f_1^3 + \beta_4 f_1^4};$$

$$\alpha_i = \alpha_i(S_1, S_2, f_2), \quad i = 0, 1, 2, 3;$$

$$\beta_i = \beta_i(S_1, S_2, f_2), \quad i = 0, 1, 2, 3;$$

$$\beta_4 = \beta_4(S_1).$$
(3)

Возможные кривые, соответствующие уравнению (3) при различных соотношениях входящих в него констант, представлены на рис. 4. Соот-

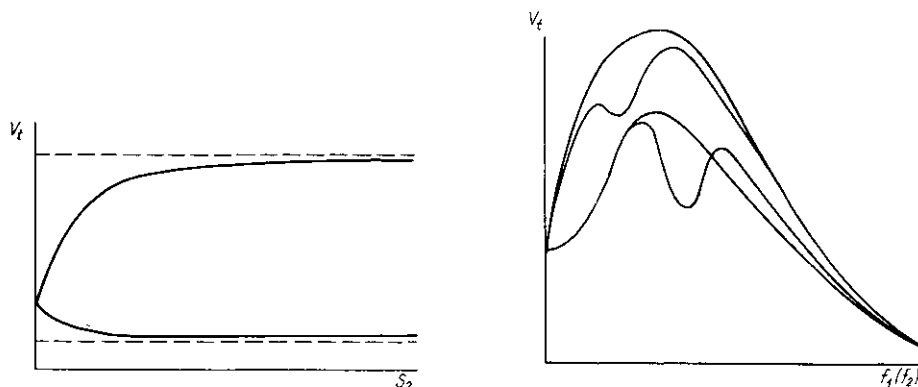


Рис. 3. Зависимость удельной скорости элонгации (v_i) от концентрации комплекса аминоксил-тРНК с белковым фактором *EF-Tu* и GTP (S_2) согласно уравнению (2).

Fig. 3. Dependence of the specific elongation (v_i) rate on the aa-tRNA·*EF-Tu*·GTP complex concentration (s_2) according to equation (2).

Рис. 4. Зависимость удельной скорости элонгации (v_i) от концентрации комплекса белкового фактора *EF-Tu* с GTP (f_1) или *EF-G* с GTP (f_2) согласно уравнениям (3) и (4).

Fig. 4. Dependence of the specific elongation (v_i) rate on either *EF-Tu*·GTP concentration (f_1) or *EF-G*·GTP concentration (f_2) according to equations (3) and (4).

ношения величин максимумов и минимумов $v_i(f_1)$ могут быть различными. Общим свойством всех кривых является то, что они описывают полное ингибирование процесса элонгации при больших концентрациях комплекса *EF-Tu* с GTP.

Зависимость v_i от концентрации комплекса белкового фактора элонгации *EF-G* с GTP, f_2 , описывается сходным уравнением:

$$v_i(f_2) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 f_2 + \alpha_2 f_2^2 + \alpha_3 f_2^3}{\beta_0 + \beta_1 f_2 + \beta_2 f_2^2 + \beta_3 f_2^3 + \beta_4 f_2^4};$$

$$\alpha_i = \alpha_i(S_1, S_2, f_1), \quad i = 0, 1, 2, 3;$$

$$\beta_i = \beta_i(S_1, S_2, f_1), \quad i = 0, 1, 2, 3.$$
(4)

Избыток f_2 ингибирует процесс элонгации полипептидных цепей (рис. 4). При уменьшении S_1 либо S_2 до нуля ни один из коэффициентов уравнений (3) и (4) не исчезает, и следовательно, вид уравнения не меняется.

Обсуждение. Приведенный анализ показывает, что данная модель стадии элонгации белкового синтеза (рис. 1) характеризуется большим разнообразием кинетических особенностей и, исходя из этого, возможностью для регуляции этого процесса.

Разнообразие приведенных кривых, иллюстрирующих зависимость удельной скорости элонгации от концентрации каждого из компонен-

тов системы (S_1 , S_2 , f_1 и f_2), обусловлено в первую очередь незнанием конкретных величин констант скоростей отдельных стадий процесса. С другой стороны, оно определяется тем, что некоторые из этих констант являются сложными функциями ионного состава среды, температуры, наконец, кодоновой специфичности используемой аминоацил-тРНК, когда например кодон-антикодоновая пара комплементарна полностью либо частично. Иными словами, рассматриваемая ситуация качественно отражает самые разнообразные варианты осуществления процесса элонгации, включая далеко не оптимальные условия его протекания.

Как следует из уравнений (1)—(4), зависимость удельной скорости элонгации от концентраций субстратов и белковых факторов с GTP в целом должна быть нелинейной. Соответствующие кривые могут иметь перегибы, промежуточные и основные максимумы, минимумы, могут описывать частичное или полное ингибирование. Анализ таких уравнений можно найти в [9]. Подобные зависимости предполагают существование концентрационных областей с повышенной (пониженной) чувствительностью скорости процесса к изменениям концентрации соответствующего компонента.

Существенно, что конкретный характер зависимости скорости элонгации от каждого компонента системы определяется концентрациями остальных компонентов. Отсюда с неизбежностью вытекает проблема оптимизации, согласования концентраций субстратов и белковых факторов элонгации с GTP для обеспечения высокой скорости белкового синтеза.

Наиболее яркой качественной особенностью рассматриваемой схемы рабочего цикла элонгации является возможность частичного ингибирования процесса увеличением концентрации свободных аминоацил-тРНК, а также глубокого ингибирования элонгации избытком одного из белковых факторов с GTP. Эти в общем неожиданные положения могут стать основой экспериментальной проверки предложенной модели стадии элонгации белкового синтеза.

ANALYSIS OF THE KINETIC SCHEME FOR THE PROTEIN
SYNTHESIS ELONGATION STAGE WITHIN HYPOTHESIS
ON THE STEREOSPECIFIC STABILIZATION
OF THE CODON-ANTICODON COMPLEXES BY RIBOSOME.
1. THE RATE OF POLYPEPTIDE CHAIN ELONGATION

A. P. Potapov, B. N. Goldstein, S. R. Saijullin, A. V. Elskaya

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Biological Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Pushchino, Moscow Region

Summary

A kinetic analysis of a steady-state polypeptide chain elongation is presented based on the hypothesis of stereospecific stabilization of the codon-anticodon complexes by ribosome during aa-tRNA selection and translocation stages. Equations have been obtained describing the dependence of the elongation rate on concentrations of aa-tRNA, aa-tRNA·EF-Tu·GTP complex, EF-Tu·GTP and EF-G·GTP complexes.

1. Nierhaus K. H. Structure, assembly and function of ribosomes // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.*— 1982.—97.— P. 81—155.
2. Kurland C. G. Aspects of ribosome structure and function // *Molecular mechanisms of protein biosynthesis.*— New York: Acad. press, 1977.— P. 81—116.
3. Эльская А. В., Солдаткин А. П. Основы высокой точности трансляции // *Молекуляр. биология.*— 1984.—18, № 5.— С. 1163—1180.
4. Потанов А. П. Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодоновых комплексов на рибосомах в ходе трансляции // *Журн. общ. биологии.*— 1985.—46, № 1.— С. 63—77.

(Окончание см. на с. 40).

7. Кейтс М. Техника липидологии.— М.: Мир, 1975.— 258 с.
8. Deamer D., Bangham A. D. Binding of large liposomes to plant protoplasts and delivery of encapsulated DNA // *Biochim. et biophys. acta.*— 1976.— 443, N 3.— P. 629—634.
9. Трансфекция бактериальных клеток заключенной в фосфолипидные везикулы ДНК фага M13 / Н. О. Беляев, В. Г. Будкер, Т. Г. Максимова и др. // *Молекуляр. биология.*— 1982.— 16, № 3.— С. 612—618.
10. Горлов Ю. И., Кириллова В. С. Методы получения протопластов дрожжей // *Молекуляр. биология.*— 1978.— Вып. 20.— С. 85—94.
11. Ahn J. S., Pack M. Y. Use of liposomes in transforming yeast cells // *Biotechnol. Lett.*— 1985.— 7, N 8.— P. 553—556.
12. Rodicio M. R., Chater K. F. Small DNA-free liposomes stimulate transfection of streptomyces protoplasts // *J. Bacteriol.*— 1982.— 151, N 3.— P. 1078—1085.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 17.01.86

Окончание. Начало см. на с. 22—26.

5. Потапов А. П. Стереоспецифический механизм отбора аминоацил-тРНК рибосомой // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1982.— № 5.— С. 100—102.
6. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // *FEBS Lett.*— 1982.— 146, N 1.— P. 5—8.
7. Потапов А. П. Механизм транслокации пептидил-тРНК и мРНК в рибосоме // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1982.— № 6.— С. 73—75.
8. Volkenstein M. V., Goldstein B. N. A new method for solving the problems of the stationary kinetics of enzymological reactions // *Biochim. et biophys. acta.*— 1966.— 115, N 2.— P. 471—477.
9. Bardsley W. G., Childs R. E. Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plots and allosterism // *Biochem. J.*— 1975.— 149, N 2.— P. 313—328.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биофизики АН СССР, Пушкино

Получено 26.07.85