

3. Lipari G., Szabo A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity // *Ibid.*— 1982.— 104, N 17.— P. 4546—4559.
4. Lipari G., Szabo A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results // *Ibid.*— P. 4559—4770.
5. Федотов В. Д. Ядерный магнитный резонанс и внутримолекулярная подвижность белков // Молекуляр. биология.— 1983.— 17, № 3.— С. 493—504.
6. Федотов В. Д. Импульсный ЯМР в блочных полимерах: Дис. ... докт. физ.-мат. наук: 01.04.15.— Защищена 03.06.81; Утв. 17.04.82.— Казань, 1981.— 273 с. Библиогр.: с. 254—273.
7. ^{13}C NMR studies of the molecular dynamics of selectively ^{13}C -enriched ribonuclease complexes / L. T. Hugher, J. S. Cohen, A. Szabo et al. // *Biochemistry.*— 1984.— 23, N 16.— P. 4390—4394.
8. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование.— М.: Мир, 1975.— 543 с.
9. Fedotov V. D., Feldman Yu. D., Yudin I. D. On the rotational diffusion of globular proteins in aqueous solutions // *Stud. biophys.*— 1985.— 107, N 2.— P. 83—90.
10. Lipari G., Szabo A., Levy R. M. Protein dynamics and NMR relaxation: comparison of simulations with experiment // *Nature.*— 1982.— 300, N 5880.— P. 197—198.
11. Howarth O. W. Effect of internal librational motions on the ^{13}C nuclear magnetic resonance relaxation times of proteins and peptides // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. Part 2.*— 1978.— 74, N 6.— P. 1031—1041.
12. Lehman M. S., Koetzle T. F., Hamilton W. C. Precision neutron diffraction structure determination of protein and nucleic acid components. 1. The crystal and molecular structure of the amino acid L-alanine // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1972.— 94, N 8.— P. 2657—2660.
13. Deisenhofer J., Steigemann W. Crystallographic refinement of the structure of bovine pancreatic trypsin inhibitor at 1,5 Å resolution // *Acta crystallogr. B.*— 1980.— 36, N 1.— P. 238—250.
14. The three-dimensional structure of ribonuclease S / H. W. Wyckoff, D. Tsernoglou, A. W. Hanson et al. // *J. Biol. Chem.*— 1970.— 245, N 2.— P. 305—328.
15. McCammon J. A., Wolynes R. G., Karplus M. Picosecond dynamics of tyrosine side chain in proteins // *Biochemistry.*— 1979.— 18, N 6.— P. 927—942.
16. Wang C. C., Pecora R. Time correlation function for restricted rotational diffusion // *J. Chem. Phys.*— 1980.— 72, N 10.— P. 5333—5340.
17. Karplus M., Gelin B. R., McCammon J. A. Internal dynamics of proteins. Short time and long time motions of aromatic sidechain in PTI // *Biophys. J.*— 1980.— 31, N 1.— P. 603—618.
18. Van Gunsteren W. F., Karplus M. Protein dynamics in solution and in a crystalline environment: a molecular dynamics study // *Biochemistry.*— 1982.— 21, N 10.— P. 2260—2274.
19. McCammon J. A., Gelin B. R., Karplus M. Dynamics of folded proteins // *Nature.*— 1977.— 267, N 5603.— P. 585—590.

Ин-т биологии Казан. фил. АН СССР

Получено 21.04.86

ИДК 577.217.53

**АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ СТАДИИ ЭЛОНГАЦИИ
БЕЛКОВОГО СИНТЕЗА В РАМКАХ ГИПОТЕЗЫ
О СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТАБИЛИЗАЦИИ
КОДОН-АНТИКОДОНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ НА РИБОСОМЕ.
2. СООТНОШЕНИЕ СКОРОСТЕЙ ГИДРОЛИЗА GTP
И ЭЛОНГАЦИИ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЦЕПЕЙ**

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

Для объяснения механизма усиления стабильности и специфичности кодон-антикодонных комплексов на рибосоме при трансляции предложена гипотеза о прямом взаимодействии некоторого участка X декодирующего центра рибосомы с кодон-антикодонным дуплексом [1—4].

Предложена детализированная схема рабочего цикла элонгации [4], теоретический анализ кинетических свойств которой в рамках зависимости скорости элонгации от концентрации аминоктил-тРНК и

белковых факторов с GTP дан в [5]. В настоящей работе исследована зависимость соотношения скоростей гидролиза GTP на рибосоме и элонгации (расход GTP на синтез пептидной связи) от концентрации тех же компонентов системы трансляции.

Граф рабочего цикла элонгации. Кинетический анализ предложенной схемы [4] проведен с помощью метода направленных графов [6] в предположении о стационарности процесса трансляции. В условиях, когда концентрация деацилированной тРНК мала (например, при высокой активности аминоксил-тРНК-синтетаз) и обратным

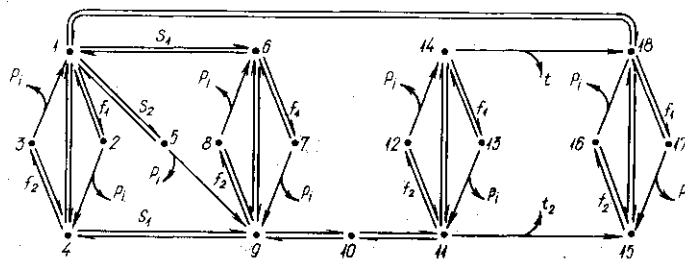


Рис. 1. Граф процесса элонгации белкового синтеза
Fig. 1. A graph of the protein synthesis elongation

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) $[p-t'']XR$. Использованы следующие обозначения: t — деацилированная тРНК; $a-t$ — аминоксил-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 скобками — ситуация, 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 GTP соответственно. Соответствующие им концентрации обозначены малыми буквами f_1 и f_2 ; S_1 — концентрация свободной аминоксил-тРНК; S_2 — концентрация комплекса аминоксил-тРНК с $EF-Tu$ и GTP. P_i — неорганический фосфат, образующийся в результате факторзависимого гидролиза GTP на рибосоме.

Уравнения расхода GTP на синтез пептидной связи. Рассмотрим трансляцию полирибонуклеотида, представленного последовательностью одного и того же кодона, в присутствии аминоксил-тРНК одного сорта. Обозначим через σ соотношение скоростей факторзависимого гидролиза GTP, v_p (оцениваемого по скорости образования неорганического фосфата, P_i , рис. 1), и элонгации, v_t (оцениваемой по скорости образования деацилированной тРНК, t , рис. 1):

$$\sigma = v_p/v_t. \quad (1)$$

σ характеризует расход GTP на синтез пептидной связи, GTP-стоимость рабочего цикла элонгации. Исследуем зависимость σ от концентрации каждого из компонентов системы трансляции (S_1, S_2, f_1, f_2) при постоянных концентрациях остальных компонентов.

Согласно теории направленных графов [6], зависимость σ от концентрации свободной аминоацил-тРНК, S_1 , для нашего графа (рис. 1) должна иметь вид:

$$\begin{aligned}\sigma(S_1) &= \frac{\alpha_0 + \alpha_1 S_1 + \alpha_2 S_1^2}{\beta_0 + \beta_1 S_1 + \beta_2 S_1^2}; \\ \alpha_i &= \alpha_i(S_2, f_1, f_2), \quad i = 0, 1; \\ \alpha_2 &= \alpha_2(f_1, f_2); \\ \beta_i &= \beta_i(S_2, f_1, f_2), \quad i = 1, 2; \\ \beta_0 &= \beta_0(S_2), \quad \beta_0 = 0 \text{ при } S_2 = 0.\end{aligned}\quad (2)$$

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

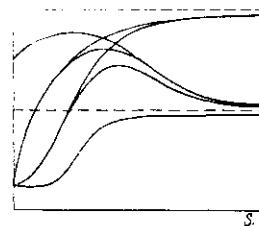


Рис. 2. Зависимость σ от концентрации свободной аминоацил-тРНК, S_1 , согласно уравнению (2)

Fig. 2. Dependence of σ on the free aa-tRNA concentration (S_1) according to eq. 2

обозначенные α , β иные в каждом отдельном случае. Конкретный вид коэффициентов здесь не приведен ввиду громоздкости соответствующих выражений.

Уравнение (2) описывает набор кривых типа изображенных на рис. 2, которые различаются соотношением величин констант, входящих в (2). Зависимость $\sigma(S_1)$ может иметь промежуточный максимум, после которого значение σ асимптотически уменьшается до некоторого отличного от нуля значения либо может стремиться к максимальному значению при увеличении S_1 . В условиях, когда $S_2 = 0$ (отсутствие комплекса аминоацил-тРНК с $EF-Tu$ и GTP), стоимость элонгации при малых значениях S_1 может быть чрезвычайно высокой, быстро уменьшаясь с ростом S_1 и стремясь при больших S_1 к предельной величине α_2/β_2 .

Зависимость σ от концентрации тройного комплекса аминоацил-тРНК с $EF-Tu$ и GTP, S_2 , выглядит относительно просто:

$$\begin{aligned}\sigma(S_2) &= \frac{\alpha_0 + \alpha_1 S_2}{\beta_0 + \beta_1 S_2}; \\ \alpha_i &= \alpha_i(S_1, f_1, f_2), \quad i = 0, 1; \\ \beta_i &= \beta_i(S_1, f_1, f_2), \quad i = 0, 1.\end{aligned}\quad (3)$$

Ей соответствуют два вида кривых (рис. 3). Они не имеют экстремумов и с увеличением S_2 стремятся к некоторому пределу α_1/β_1 , зависящему от S_1 , f_1 и f_2 .

Совсем иным должен быть характер связи σ с концентрациями комплексов $EF-Tu \cdot GTP$, f_1 , и $EF-G \cdot GTP$, f_2 :

$$\begin{aligned}\sigma(f_1) &= \frac{\alpha_0 + \alpha_1 f_1 + \alpha_2 f_1^2 + \alpha_3 f_1^3 + \alpha_4 f_1^4}{\beta_0 + \beta_1 f_1 + \beta_2 f_1^2 + \beta_3 f_1^3}; \\ \alpha_i &= \alpha_i(S_1, S_2, f_2), \quad i = 0, 1, 2, 3, 4; \\ \alpha_0 &= 0 \text{ при } S_2 = 0, \quad f_2 = 0; \\ \beta_i &= \beta_i(S_1, S_2, f_2), \quad i = 0, 1, 2, 3.\end{aligned}\quad (4)$$

$$\sigma(f_2) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 f_2 + \alpha_2 f_2^2 + \alpha_3 f_2^3 + \alpha_4 f_2^4}{\beta_0 + \beta_1 f_2 + \beta_2 f_2^2 + \beta_3 f_2^3};$$

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

$$\alpha_0 = 0 \text{ при } S_2 = 0, \quad f_1 = 0;$$

$$\beta_i = \beta_i(S_1, S_2, f_1), \quad i = 0, 1, 2, 3.$$
(5)

Соответствующие уравнениям (4) и (5) кривые могут быть довольно сложными (рис. 4). При определенных соотношениях величин констант

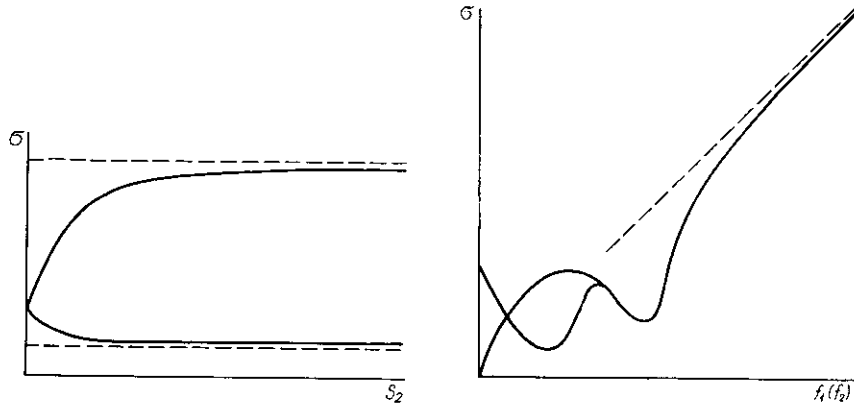


Рис. 3. Зависимость σ от концентрации комплекса аминоксил-тРНК с белковым фактором $EF\cdot Tu$ и GTP, S_2 , согласно уравнению (3)

Fig. 3. Dependence of σ on the aa-tRNA- $EF\cdot Tu$ -GTP complex concentration (S_2) according to eq. 3

Рис. 4. Зависимость σ от концентрации комплекса $EF\cdot Tu\cdot GTP$, f_1 , или $EF\cdot G\cdot GTP$, f_2 , согласно уравнениям (4) и (5)

Fig. 4. Dependence of σ on either $EF\cdot Tu\cdot GTP$ concentration (f_1) or $EF\cdot G\cdot GTP$ concentration (f_2) according to eq. 4 and eq. 5

скоростей отдельных стадий они могут иметь экстремумы. Важным общим свойством кривых является то, что, начиная с некоторых значений, увеличение f_1 или f_2 сопровождается неограниченным ростом σ .

Обсуждение. Итак, для предложенной схемы элонгации характерна сложная зависимость расхода GTP на синтез пептидной связи от концентраций аминоксил-тРНК и белковых факторов с GTP.

Это обстоятельство заслуживает особого внимания в связи с неудачными попытками измерения универсальной стехиометрической константы гидролиза GTP при элонгации [7, 8]. Согласно положенной в основу настоящей работы концепции, подобной универсальной константы не должно быть [4]. В пользу этой точки зрения свидетельствует ряд данных. С одной стороны, создание систем бесфакторной трансляции [9] продемонстрировало возможность элонгации в отсутствие гидролиза GTP. С другой стороны, высказанная Хопфилдом [10] идея о необходимости «избыточного» расхода GTP для обеспечения высокой точности отбора аминоксил-тРНК получила определенное экспериментальное подтверждение [11–13]. Наконец, показано, что расход GTP выше при включении в пептид неправильной аминокислоты по сравнению с правильной [14–16], из чего следует возможность варьирования стехиометрии распада GTP при элонгации.

Согласуясь с результатами этих работ [11–16], анализируемая схема элонгации (рис. 1) указывает конкретный молекулярный механизм «избыточного» расхода GTP. Согласно [4, 17], он определяется узостью предполагаемой роли белковых факторов как индукторов конформационных изменений рибосомы и относительной (или полной) несцепленностью конформационного движения рибосомы с ее функциональной активностью, в результате чего белковые факторы элонгации

с GTP промотируют изменения рибосомной системы ($XR \rightleftharpoons RX$) как в направлении процесса биосинтеза белка, так и в противоположном направлении (рис. 1). При этом, как можно убедиться [4] (рис. 1), предложенный Хопфилдом принцип селекции аминоксил-тРНК является составной частью данного механизма.

Разнообразие кривых (рис. 2—4), иллюстрирующих свойства обсуждаемой схемы элонгации, отчасти определяется неизвестностью величин констант скоростей отдельных стадий процесса. С другой стороны, оно обусловлено тем, что некоторые из констант являются функциями состава среды, температуры и, в частности, кодоновой специфичности используемой аминоксил-тРНК, антикодон которой может быть **комплементарен** кодону полностью или частично. Рассматриваемая при этом ситуация качественно отражает самые разнообразные варианты осуществления процесса элонгации, включая далеко не оптимальные условия его проведения.

Как следует из уравнений (2)—(5), конкретный характер зависимости стоимости элонгации σ от концентраций каждого из компонентов системы (аминоксил-тРНК, белковые факторы элонгации с GTP) определяется концентрациями остальных компонентов. С увеличением концентрации аминоксил-тРНК или комплекса аминоксил-тРНК с *EF-Tu* и GTP расход GTP изменяется в определенных пределах, тогда как с увеличением концентрации комплекса одного из белковых факторов элонгации с GTP этот параметр проявляет тенденцию к неограниченному росту. Последняя особенность схемы элонгации может быть положена в основу ее экспериментальной проверки.

С учетом характерного для данной схемы глубокого ингибирования процесса элонгации избытком одного из белковых факторов с GTP [5] можно прийти к выводу о чрезвычайной невыгодности подобного избытка для систем трансляции, работа которых при этом предположительно становится и малопродуктивной, и высокоэнергоёмкой. Результаты анализа свидетельствуют о необходимости оптимизации, согласования концентраций субстратов и белковых факторов элонгации с GTP для обеспечения режима продуктивного и рентабельного функционирования рибосом.

ANALYSIS OF THE KINETIC SCHEME FOR THE PROTEIN SYNTHESIS ELONGATION STAGE ACCORDING TO THE HYPOTHESIS OF THE STEREOSPECIFIC STABILIZATION OF THE CODON-ANTICODON COMPLEXES AT RIBOSOME. 2. THE RATIO OF THE RATES OF GTP SPLITTING AND POLYPEPTIDE CHAIN ELONGATION

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

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

Summary

Steady-state kinetics of the polypeptide chain elongation is theoretically analyzed based on hypothesis of the stereospecific stabilization of the codon-anticodon complexes at ribosome during the aa-tRNA selection and translocation stages. The ratio of GTP splitting rate and polypeptide chain elongation rate is studied. Equations have been obtained describing dependence of this ratio on the concentrations of the aa-tRNA, aa-tRNA·*EF-Tu*·GTP complex, *EF-Tu*·GTP and *EF-G*·GTP complexes.

1. Потанов А. П. Стереоспецифический механизм отбора аминоксил-тРНК рибосомой // Докл. АН УССР.— Сер. Б.— 1982.— № 5.— С. 100—102.
2. Потанов А. П. Механизм транслокации пептидил-тРНК и мРНК в рибосоме // Там же.— № 6.— С. 73—75.
3. Potapov A. P. A stereospecific mechanism for the aminoacyl-tRNA selection at the ribosome // FEBS Lett.— 1982.— 146, N 1.— P. 5—8.

4. *Потапов А. П.* Механизм стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосомах в ходе трансляции // Журн. общ. биологии.— 1985.— 46, № 1.— С. 63—77.
5. *Анализ кинетической схемы стадии элонгации белкового синтеза в рамках гипотезы о стереоспецифической стабилизации кодон-антикодонных комплексов на рибосоме. 1. Скорость элонгации полипептидных цепей / А. П. Потапов, Б. Н. Гольдштейн, С. Р. Сайфуллин, А. В. Ельская // Биополимеры и клетка.— 1987.— 3, № 1.— С. 22—26.*
6. *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.
7. *Nishizuka Y., Lipmann F.* Comparison of guanosine triphosphate split and polypeptide synthesis with a purified *E. coli* system // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1966.— 55, N 1.— P. 212—219.
8. *Stachometry of polypeptide chain elongation / B. Cabrer, M. J. San-Millan, D. Vazquez, J. Modoleil // J. Biol. Chem.*— 1976.— 251, N 6.— P. 1718—1722.
9. *Gavrilova L. P., Spirin A. S.* «Nonenzymatic» translation // *Meth. Enzymol.*— 1974.— 30.— P. 452—462.
10. *Hopfield J. J.* Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes required high specificity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1974.— 71, N 10.— P. 4135—4139.
11. *Thompson R., Stone P.* Proofreading of the codon-anticodon interaction on ribosomes // *Ibid.*— 1977.— 74, N 1.— P. 198—202.
12. *A GTPase reaction accompanying the rejection of Leu-tRNA₂ by UUU-programmed ribosomes. Proofreading of the codon-anticodon by ribosomes / R. C. Thompson, D. B. Dix, R. B. Gerson, A. M. Karim // J. Biol. Chem.*— 1981.— 256, N 1.— P. 81—86.
13. *Yates J. L.* Role of ribosomal protein S12 in discrimination of aminoacyl-tRNA // *Ibid.*— 1979.— 254, N 22.— P. 11550—11554.
14. *Ruusala T., Ehrenberg M., Kurland C. C.* Is there proofreading during polypeptide synthesis? // *The EMBO J.*— 1982.— 1.— P. 741—745.
15. *Изучение стехиометрии распада GTP при синтезе пептида на рибосоме. Стехиометрия гидролиза GTP в процессе элонгации полифенилаланина на полиуридилевой кислоте / Д. Г. Кахнашвили, С. К. Смаилов, И. Н. Гогия, Л. П. Гаврилова // Биохимия.— 1983.— 48, № 6.— С. 959—969.*
16. *Смаилов С. К., Кахнашвили Д. Г., Гаврилова Л. П.* Изучение стехиометрии распада GTP при синтезе пептида на рибосоме. Стехиометрия гидролиза GTP при ложном считывании матрицы на рибосоме (синтез полилейцина на полиуридилевой кислоте) // Там же.— 1984.— 49, № 11.— С. 1868—1873.
17. *Потапов А. П.* О природе скоростьлимитирующих моментов рабочего цикла элонгации и механизме действия белковых факторов элонгации с GTP // *Молекуляр. биология.*— 1982.— 16, № 1.— С. 28—33.

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

Получено 26.07.85

УДК 576.315.42

СТРУКТУРА ОКТАМЕРА ГИСТОНОВ В СОСТАВЕ РЕКОНСТРУИРОВАННЫХ ПОЛИНУКЛЕОСОМ В ПРИСУТСТВИИ ГИСТОНА Н1 И ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

А. В. Сиволоб, С. Н. Храпунов

Введение. На первых двух этапах укладки ДНК в хроматине эукариот происходит формирование нуклеосом (комплексов октамера гистонов (Н2А—Н2В—Н3—Н4)₂ и участка ДНК длиной 146 пар оснований) и дальнейшая компактизация нуклеосомной нити с образованием фибриллы хроматина толщиной 30 нм [1].

В стабилизации второго уровня упаковки хроматина принимают участие гистон Н1 [2], концевые участки коровых гистонов [3, 4] и двухвалентные катионы [5]. Методом межмолекулярных сшивок в компактном хроматине выявляются не только октамер, но и комплексы из 16 и 24 молекул гистонов [6]. Кроме того, глобулярные области гистона Н1 контактируют как между собой [7, 8], так и с нуклеосо-