

УДК 577.214

**КИНЕТИКА ДНК-ЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА РНК:
СОПРЯЖЕННЫЙ СИНТЕЗ ДИ- И ТРИНУКЛЕОТИДОВ
В ПРИСУТСТВИИ МИНИМАЛЬНОГО
НАБОРА СУБСТРАТОВ**

С. В. СМЕРНОВ, А. Г. МАЛЫГИН

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

Изучены качественные и количественные характеристики синтеза коротких олигонуклеотидов РНК-полимеразой *Escherichia coli* на промоторе А1 ДНК делеционного мутанта $\Delta D111$ фага Т7 при неполном наборе нуклеозидтрифосфатов в системе синтеза. Получены данные, позволяющие считать, что в соответствии со структурой промотора А1 в присутствии АТР, УТР, СТР синтезируются олигонуклеотиды $pppApU$ и $pppApUpC$, в присутствии АМР, УТР, СТР— $pApU$ и $pApUpC$, в присутствии АМР, УТР, СТР, ГТР — $pApU$, $pApUpC$ и $pApUpCpG$. Получены кривые зависимостей скоростей синтеза ди- и тринуклеотидов от концентраций субстратов. На основании вида этих кривых выведены эмпирические уравнения для скоростей синтеза ди- и тринуклеотидов. Предложена кинетическая схема синтеза, хорошо согласующаяся с полученными результатами, согласно которой стадиям образования фосфодиэфирных связей и отщепления продуктов синтеза предшествуют стадии обратимого присоединения субстратов к фермент-матричному комплексу в произвольном порядке.

В многоступенчатом механизме ДНК-зависимого синтеза РНК стадия инициации играет ключевую роль. Изменения скоростей, составляющих эту стадию реакций, представляются существенным звеном регуляции экспрессии генома клетки. Кинетические параметры инициации транскрипции могут быть использованы для количественной оценки силы промоторов — важной характеристики, применяемой в генной инженерии. Все это определяет большое научное и практическое значение кинетических исследований стадии инициации транскрипции.

Согласно современным представлениям, в стадии инициации транскрипции могут быть выделены два параллельно протекающих и взаимосвязанных процесса: продуктивная инициация [1], переходящая в элонгацию, и abortивная инициация [2—5], приводящая к образованию олигонуклеотидов, насчитывающих от двух до девяти звеньев в цепи [6, 7].

В предыдущей работе [8] на основании изучения скорости abortивного синтеза динуклеотида в присутствии минимального и полного набора субстратов нами была предложена кинетическая модель сопряжения abortивной и продуктивной инициации, учитывающей нестационарное течение процесса. В основу этой модели была положена классическая схема стационарной двухсубстратной реакции, в соответствии с которой, как показано в ряде работ [3, 4, 9], осуществляется синтез динуклеотида в условиях минимального набора субстратов. Однако такую модель нельзя считать полной, поскольку она не учитывает образования олигонуклеотидов с числом звеньев в цепи более двух [6, 7, 10]. В связи с этим возникает вопрос об изменении предложенной ранее модели таким образом, чтобы учесть образование более длинных олигонуклеотидов. Однако построить более детальную модель, учитывающую нестационарный характер синтеза олигонуклеотидов в условиях полного набора нуклеозидтрифосфатов, не разобравшись предварительно в кинетике более простой реакции стационарного синтеза олигонуклеотидов в условиях неполного набора нуклеозидтрифосфатов, представляется затруднительным. Будучи многосубстратными, реакции синтеза олигонуклеотидов даже в случае неполного набора субстратов представля-

ются весьма сложными для кинетического исследования. После выяснения кинетики синтеза динуклеотида в присутствии двух субстратов следующей по сложности задачей является выяснение кинетики синтеза ди- и тринуклеотидов в присутствии трех субстратов. Решению этой задачи на примере синтеза ди- и тринуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* на А1 промоторе ДНК фага Т7 ΔD111 в присутствии трех субстратов и посвящается настоящая работа.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы. Высокоочищенная РНК-полимераза *Escherichia coli*, выделенная по описанному ранее методу [5], была любезно предоставлена нам М. Ф. Шемякиным. ДНК делеционного мутанта ΔD111 фага Т7 выделяли по методу Ричардсона [11]. В опытах использовали АМР и нуклеозидтрифосфаты фирмы «Sigma» (США), предварительно очищенные хроматографией на пластинках с РЕИ-целлюлозой [13], и [α - 32 P]нуклеозидтрифосфаты фирмы «Amersham» (Англия).

Условия синтеза. Стандартная реакционная смесь (20 мкл) содержала 40 мкг/мл ДНК фага Т7 ΔD111, 0,02 М Трис-НСl, рН 7,9, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1 мМ EDTA, 0,1 мМ дитиотреитол. В качестве первого субстрата использовали 300 мкМ АТР либо 1200 мкМ АМР. В случае синтеза с АТР концентрация РНК-полимеразы составляла 0,84 мкг/мл и отношение фермент/ДНК равнялось 1, в случае синтеза с АМР концентрация РНК-полимеразы увеличивалась до 4,2 мкг/мл при отношении фермент/ДНК, равном 5. Реакцию проводили при 37°. Время инкубации составляло 20 мин. Реакцию начинали добавлением раствора фермент-матричного комплекса к раствору субстратов при температуре реакции. Для получения промоторспецифичного фермент-матричного комплекса смесь РНК-полимеразы и ДНК фага Т7 ΔD111 предварительно прогревали при той же температуре не менее 5 мин. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл смеси следующего состава: 0,1 М EDTA, 27 мМ Трис, 27 мМ Н₃ВО₃, 0,1%-ный бромфеноловый синий, 30%-ный глицерин. Концентрации УТР и СТР указаны в подписях к рисункам.

Регистрация продуктов синтеза. Разделение продуктов реакции осуществляли при помощи электрофореза в пластинке 25%-ного полиакриламидного геля (метилен-бис-акриламид 1 : 30) в 90 мМ Трис-боратном буфере, рН 8,4, содержащем 1 мМ EDTA [6]. Электрофорез проводили при напряжении 500 В, и останавливали после того, как бромфеноловый синий проходил 6 см (общая длина геля 13 см). Затем пластинку заворачивали в полиэтиленовую пленку и автордиографировали с использованием рентгеновской пленки РТ-1 в течение 12 ч при 4° С с последующим проявлением. Соответствующие почернению рентгеновской пленки участки геля вырезали и просчитывали уровень радиоактивности в них на сцинтилляционном счетчике по черенковскому излучению. Полученные значения радиоактивности в импульсах пересчитывали в микромоли синтезированного продукта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования кинетики сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов в качестве матрицы была выбрана ДНК делеционного мутанта ΔD111 фага Т7. Эта ДНК содержит всего один сильный промотор (А1), что позволяло надеяться на осуществление избирательного синтеза олигонуклеотидов со строго определенной структурой. Однако нельзя было исключить и того, что в условиях неполного набора субстратов более активными окажутся другие промоторы, слабо проявляющие себя в синтезе РНК. Соответствие структуры полученных олигонуклеотидов структуре 5'-конца, синтезируемой на промоторе А1 РНК (pppApUpCpGpApGpA... [12]), подтверждалось следующими опытами.

Было показано, что в присутствии АТР и УТР синтезируется только динуклеотид, а в присутствии АТР, УТР, СТР синтезируются динуклео-

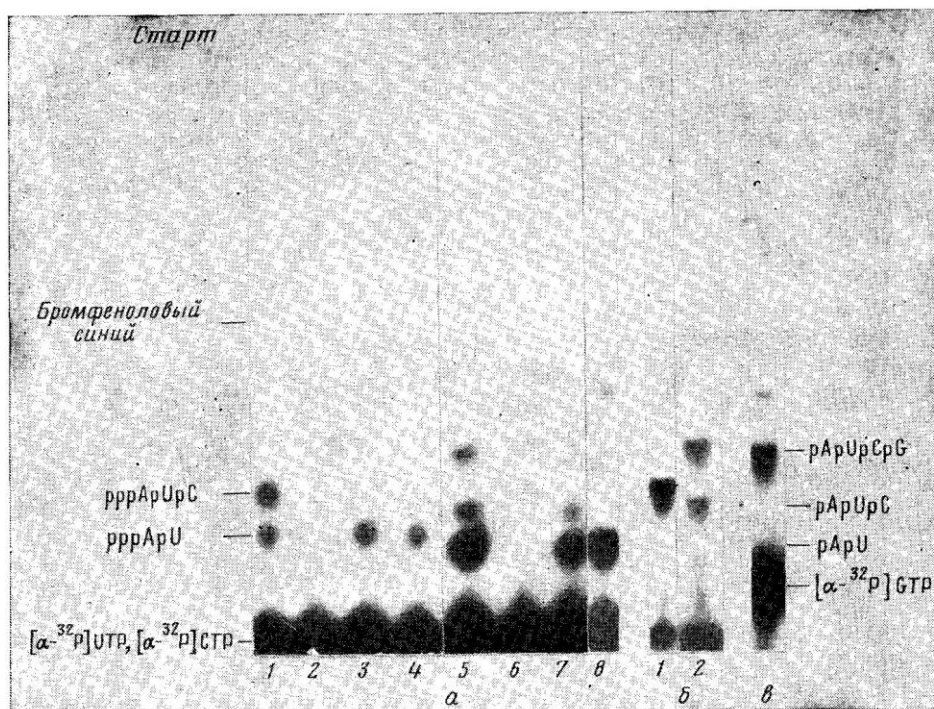


Рис. 1. Включение метки из различных $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ в продукты сопряженного синтеза ди-, три- и тетра-нуклеотидов: а — во всех пробах присутствовал $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ в концентрации 30 мкМ; кроме того, в пробах содержались: 1 — 300 мкМ АТР, 6 мкМ СТР; 2 — 300 мкМ АТР, 6 мкМ СТР (при нулевом времени инкубации); 3 — 300 мкМ АТР; 4 — 300 мкМ АТР, 10 мкМ ГТР; 5 — 1,2 мМ АМР, 10 мкМ СТР, 10 мкМ ГТР; 6 — 1,2 мМ АМР, 6 мкМ СТР (при нулевом времени инкубации); 7 — 1,2 мМ АМР, 6 мкМ СТР; 8 — 1,2 мМ АМР, 100 мкМ ГТР. б — во всех пробах присутствовал $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ в концентрации 2 мкМ; кроме того, в пробах содержались: 1 — 300 мкМ АТР, 30 мкМ УТР; 2 — 1,2 мМ АМР, 30 мкМ УТР, 15 мкМ ГТР. в — в пробе содержались 1,2 мМ АМР, 30 мкМ УТР, 15 мкМ СТР, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ГТР}$ в концентрации 2 мкМ. (Минорный продукт, располагающийся в пробах а, 8 и в над тетра-нуклеотидом, не включает СМР и, следовательно, синтезируется не на промоторе А1)

тид и тринуклеотид. При этом метка из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ включается в оба продукта, а из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ — только в тринуклеотид (рис. 1, а, 1–3; 1, б, 1). В то же время в присутствии УТР, СТР, ГТР синтез олигонуклеотидов не наблюдается, а добавление ГТР в систему, содержащую АТР и УТР, также не приводит к синтезу новых соединений (рис. 1, а, 3, 4).

При эквимолярных концентрациях РНК-полимеразы и ДНК и при использовании АМР в качестве первого субстрата синтез соответствующих олигонуклеотидов был весьма низким. Повышение уровня синтеза в этом случае достигалось увеличением отношения фермент/ДНК до 5. При этом было показано, что в присутствии АМР, УТР и СТР синтезируются ди- и тринуклеотиды, а в присутствии АМР, УТР, СТР и ГТР синтезируются ди-, три- и тетра-нуклеотиды. При этом метка из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ включается во все три продукта, метка из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ — в тринуклеотид, тетра-нуклеотид и в незначительных количествах в динуклеотид, а метка из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ГТР}$ — только в тетра-нуклеотид (рис. 1, а, 5; 1, б, 2; 1, в). Включение метки из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ в динуклеотид могло объясняться синтезом рАрС на каком-либо из слабых промоторов. Указанный синтез, не превышавший 30% от общего синтеза динуклеотидов, учитывался при расчете синтеза рАрУ, если в реакции одновременно участвовали меченые УТР и СТР. Таким образом, полученные данные свидетельствовали о том, что в целом структура образующихся продуктов соответствует структуре 5'-конца синтезируемой на промоторе А1 РНК (динуклеотиды рrrArU, рArU, тринуклеотиды

pppApUpC, pApUpC и тетрануклеотид pApUpCp) и, следовательно, синтез олигонуклеотидов на ДНК фага T7 ΔD111 протекает на промоторе A1.

При выяснении кинетического механизма сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов в первую очередь необходимо было убедиться в стационарном характере изучаемых реакций. С этой целью были сняты зависимости скоростей синтеза ди- и тринуклеотидов от времени, которые имели вид прямых, выходящих из начала координат (рис. 2). Это свидетельствовало о стационарности протекающих реакций.

Следующая задача состояла в том, чтобы установить характер зависимостей скоростей сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов от концентраций УТР и СТР. При этом в качестве первого нуклеотида использовался либо АТР, либо АМР. Анализ формы зависимостей скорости синтеза тринуклеотида от концентраций УТР и СТР показал, что во всех случаях они имеют михаэлисовский вид, и в обратных координатах хорошо описываются семейством прямых, пересекающихся в одной точке на оси абсцисс (рис. 3, в, г; 4, в, г). В случае динуклеотида ситуация была несколько иной. Если зависимости скорости синтеза динуклеотида от концентрации УТР имели михаэлисовский вид и хорошо описывались в обратных координатах прямыми, пересекающимися на оси абсцисс (рис. 3, а; 4, а), то этого нельзя было сказать о зависимостях скорости синтеза динуклеотида от концентрации СТР. По мере возрастания концентрации третьего нуклеотида скорость синтеза динуклеотида уменьшалась в функции, напоминающей гиперболическую. Действительно, после того как были построены графики зависимостей обратных величин скорости синтеза динуклеотида от концентрации СТР, выяснилось, что они хорошо описываются прямыми. Так же как и в предыдущих случаях, эти прямые пересекались на оси абсцисс (рис. 3, б; 4, б).

То, что полученные результаты оказалось возможным представить в форме прямых линий, позволило описать их в виде довольно простых эмпирических уравнений. Для скорости синтеза динуклеотида эти уравнения были получены следующим образом. Сначала записывалось уравнение для семейства прямых, выражающих зависимости обратных величин скорости синтеза динуклеотидов от обратных величин концентрации второго субстрата. Учитывая, что эти прямые пересекались в одной точке на оси абсцисс, соответствующее им уравнение можно было представить в следующем виде:

$$\frac{1}{v_{AB}} = \left(\frac{1}{b} / \frac{1}{b_0} + 1 \right) \cdot \frac{1}{v_{AB\infty}}, \quad (1)$$

где $1/b_0$ — отрезок, отсекаемый на оси абсцисс точкой пересечения прямых на рис. 3, а и 4, а; $1/v_{AB\infty}$ — отрезок, отсекаемый прямыми на оси ординат (см. те же рисунки), величина которого зависит от концентрации третьего субстрата; v_{AB} и b — соответственно скорость синтеза динуклеотида и концентрация второго субстрата. Величина $1/v_{AB\infty}$ выражает зависимость обратной величины скорости синтеза динуклеотида от концентрации третьего субстрата при $1/b=0$ и соответственно $b=\infty$.

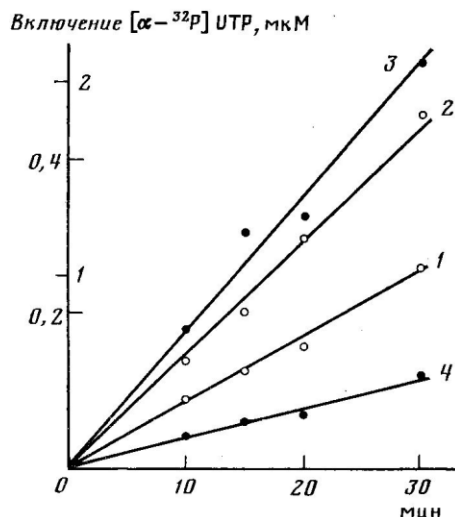


Рис. 2. Зависимость синтеза ди- (1 и 3) и тринуклеотидов (2 и 4) от времени с участием АТР (1 и 2) и АМР (3 и 4). Реакционная смесь содержала также 30 мкМ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ УТР и 6 мкМ СТР

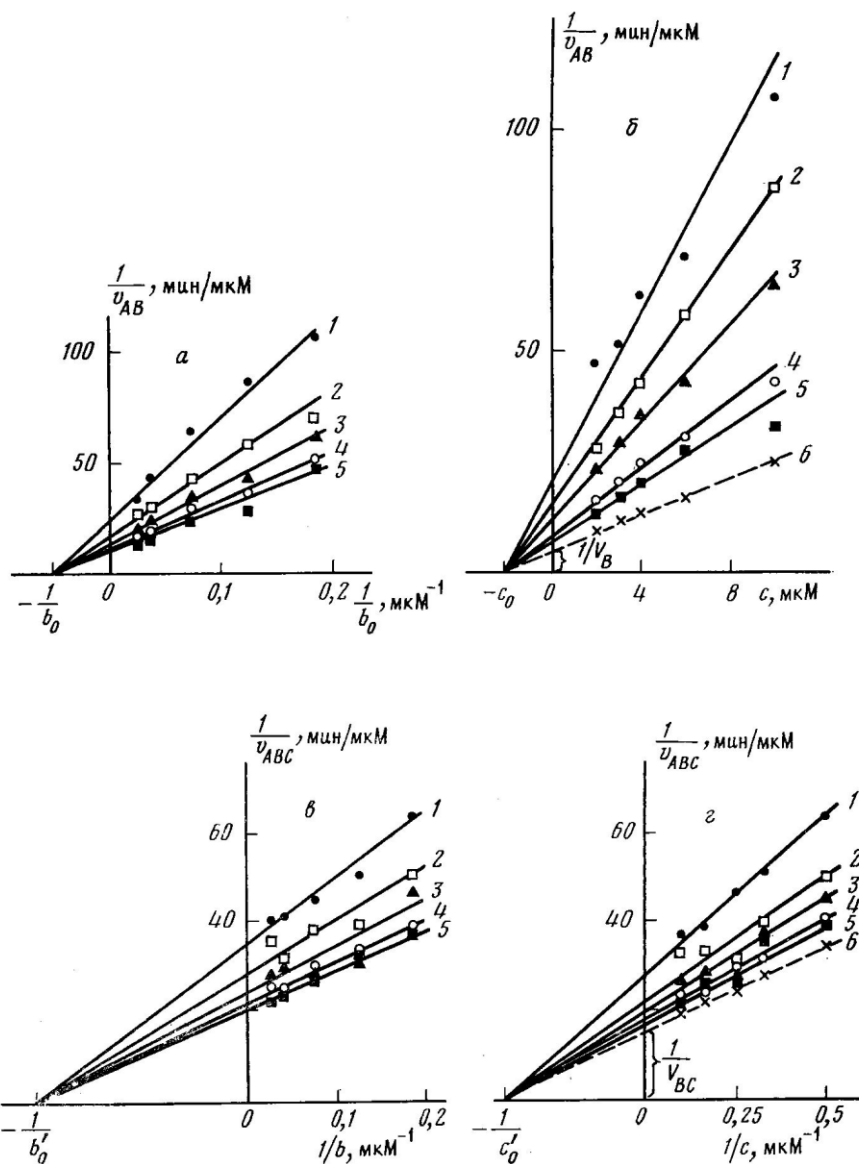


Рис. 3. Кинетика реакции сопряженного синтеза динуклеотида рррАрУ и тринуклеотида рррАрУрС. Первый субстрат — АТР. а — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза динуклеотида ($1/v_{AB}$) от обратной величины концентрации УТР ($1/b$) при концентрациях СТР 10 мкМ (1), 6 (2), 4 (3), 3 (4), 2 мкМ (5); б — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза динуклеотида от концентрации СТР (c) при концентрациях УТР 5 мкМ (1), 8 (2), 13 (3), 26 (4), 40 мкМ (5), зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике а, от концентрации СТР (6); в — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида ($1/v_{ABC}$) от обратной величины концентрации УТР при концентрациях СТР 2 мкМ (1), 3 (2), 4 (3), 6 (4), 10 мкМ (5); г — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида от обратной величины концентрации СТР ($1/c$) при концентрациях УТР 5 мкМ (1), 8 (2), 13 (3), 26 (4), 40 мкМ (5), зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике в, от обратной величины концентрации СТР (6)

Нетрудно видеть, что эта зависимость выражается прямой, относящейся к семейству прямых, описывающих зависимость обратной величины скорости синтеза динуклеотида от концентрации третьего субстрата при разных значениях концентрации второго субстрата (рис. 3, б; 4, б). Соответствующая зависимости прямая может быть записана в виде сле-

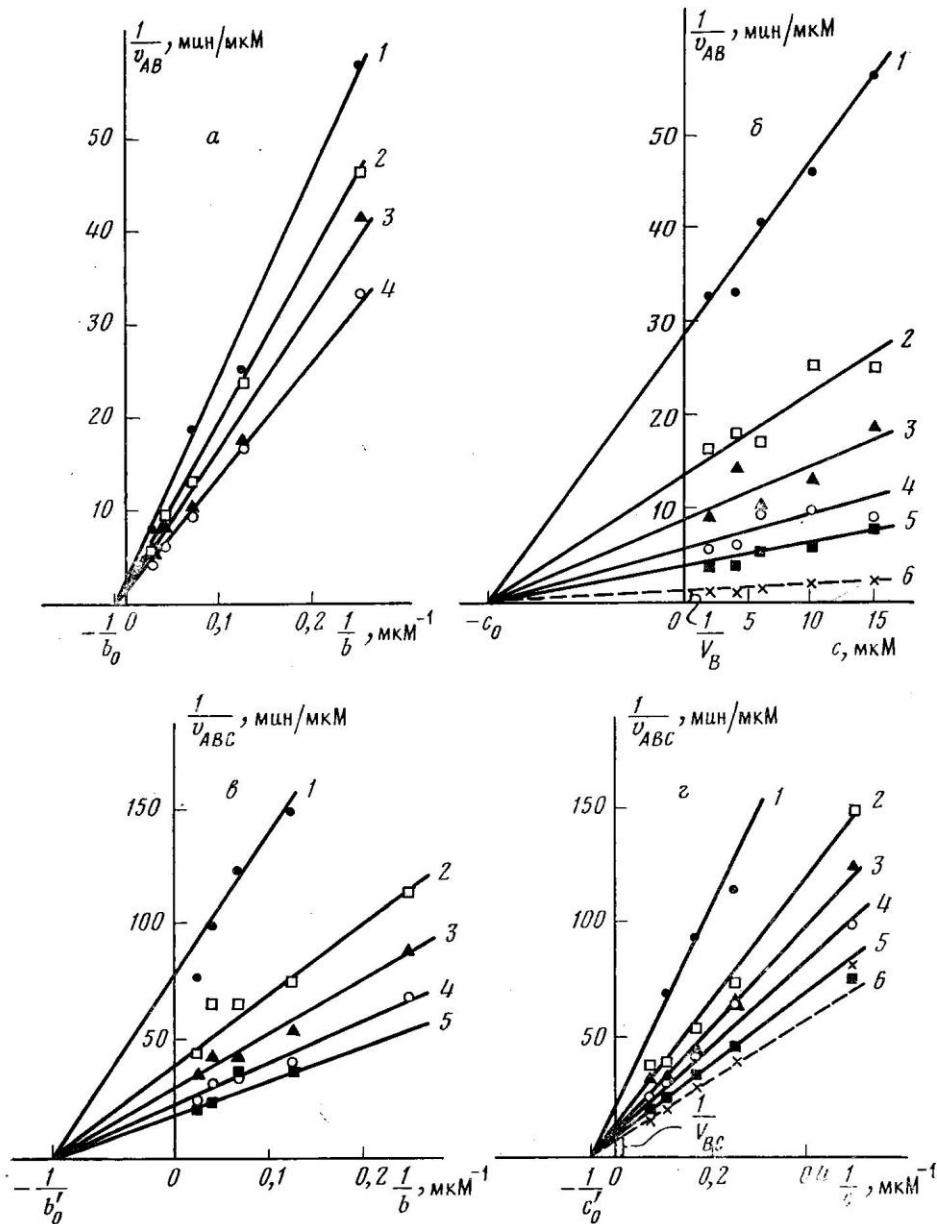


Рис. 4. Кинетика реакции сопряженного синтеза динуклеотида рАрУ и тринуклеотида рАрУрС. Первый субстрат — АМР. а — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза динуклеотида ($1/v_{AB}$) от обратной величины концентрации УТР ($1/b$) при концентрациях СТР 15 мкМ (1), 10 (2), 6 (3), 4 (4), 2 мкМ (4) (последние две прямые на графике совпадают); б — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза динуклеотида от концентрации СТР (c) при концентрациях УТР 4 мкМ (1), 8 (2), 15 (3), 25 (4), 40 мкМ (5), зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике а, от концентрации СТР (6); в — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида ($1/v_{ABC}$) от обратной величины концентрации УТР при концентрациях СТР 2 мкМ (1), 4 (2), 6 (3), 10 (4), 15 мкМ (5); г — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида от обратной величины концентрации СТР ($1/c$) при концентрациях УТР 4 мкМ (1), 8 (2), 15 (3), 25 (4), 40 мкМ (5), зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике в, от обратной величины концентрации СТР (6)

дующего уравнения:

$$\frac{1}{v_{AB\infty}} = (c/c_0 + 1) \cdot \frac{1}{V_B}, \quad (2)$$

где c_0 — отрезок, отсекаемый на оси абсцисс точкой пересечения прямых на рис. 3, б и 4, б; $1/V_B$ — отрезок, отсекаемый на оси ординат прямой,

соответствующей $1/b=0$ (V_B — максимальная скорость синтеза динуклеотида при фиксированном значении концентрации первого субстрата); c — концентрация третьего субстрата.

В результате подстановки значения $1/v_{AB\infty}$ из уравнения (2) в уравнение (1) и последующего преобразования для скорости синтеза динуклеотида получали следующее выражение:

$$v_{AB} = \frac{V_B \cdot c_0 \cdot b}{(b + b_0)(c + c_0)} \quad (3)$$

Аналогичным образом, но с использованием линейной зависимости обратной величины скорости реакции от обратной величины концентрации третьего субстрата при $1/b=0$ (рис. 3, в, г; 4, в, г); находили уравнение для скорости синтеза тринуклеотида:

$$v_{ABC} = \frac{V_{BC} \cdot b \cdot c}{(b + b'_0)(c + c'_0)} \quad (4)$$

где v_{ABC} — скорость синтеза тринуклеотида; b'_0 — величина, обратная отрезку, отсекаемому на оси абсцисс точкой пересечения прямых на рис. 3, в и 4, в; c'_0 — величина, обратная отрезку, отсекаемому на оси абсцисс точкой пересечения прямых на рис. 3, г и 4, г; V_{BC} — величина, обратная отрезку, отсекаемому на оси ординат прямой, соответствующей $1/b=0$, и выражающая максимальную скорость синтеза тринуклеотида при фиксированном значении концентрации первого субстрата (рис. 3, г; 4, г).

Численные значения констант для случаев, когда в качестве первых субстратов использовали АТР и АМР, приведены в таблице. Сравнивая между собой соответствующие константы, можно заметить, что значения констант c_0 и c'_0 в уравнениях для скоростей синтеза ди- и тринуклеотидов близки между собой и в пределах ошибки опыта могут рассматриваться как равные. Отмеченная особенность сохраняется независимо от того, какой из двух нуклеотидов, АТР или АМР, участвует в синтезе в качестве первого субстрата.

Основные кинетические характеристики синтеза ди- и тринуклеотидов РНК-полимеразой *Escherichia coli* на ДНК фага Т7 ΔD111

Тип реакции	Первый субстрат	Метод определения	A_K , мкМ	A'_K , мкМ	A''_K , мкМ	V_{AB} , мкМ/мин	V_B , мкМ/мин	V_{BC} , мкМ/мин	b_0 , мкМ	b'_0 , мкМ	c_0 , мкМ	c'_0 , мкМ
С участием трех субстратов	АТР	Найденное в прямом эксперименте					0,20	0,065	19,6	4,2	2,4	2,5
	АМР	То же					0,81	0,112	83	7,6	16,2	15,1
С участием двух субстратов	АТР	Вычисленные	484	10,5	132,5	0,465						
	АМР	Найденные в прямом эксперименте Вычисленные	2220	43	192	0,416	0,13		19,1			
							0,45		100			

Логично было предположить, что найденные эмпирические уравнения могут быть выведены из кинетической схемы, полученной путем добавления к использованной ранее [8] схеме двухсубстратной ферментативной реакции стадии присоединения третьего субстрата к ферментатричному комплексу, содержащему синтезированный динуклеотид. Действительно, такая схема (рис. 5, а) позволила вывести уравнение синтеза тринуклеотида, соответствующее эмпирическому уравнению, полученному из экспериментальных данных. Однако попытки использовать эту схему или различные ее модификации для вывода уравнения синтеза динуклеотида, отвечающего экспериментальным данным, не привели к желаемому результату. Такая схема, удовлетворяющая одно-

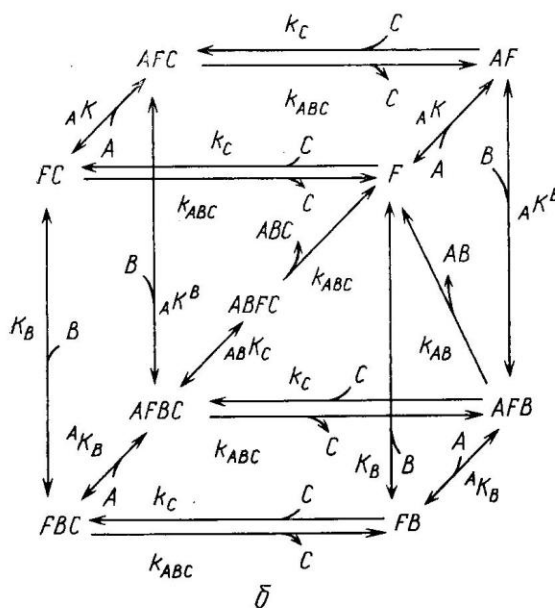
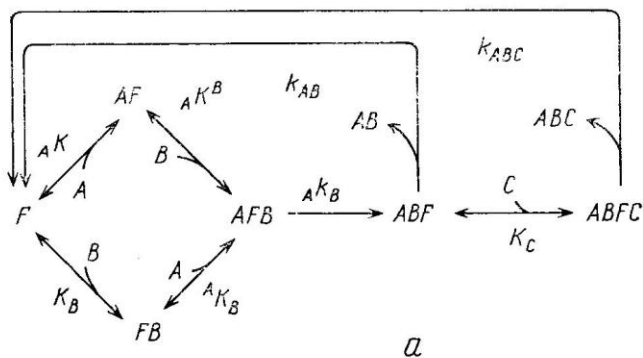


Рис. 5. Первоначально предполагавшаяся (а) и окончательная (б) кинетические схемы сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов, где F — открытый промоторный комплекс РНК-полимеразы с ДНК; A — первый субстрат; B, C — субстраты, включающиеся в олигонуклеотид соответственно вторым и третьим; $AF, FB, AFB, ABF, FC, AFC, FBC, AFBC, ABFC$ — соответствующие фермент-субстратные комплексы; $k_A, K_A, k_{AB}, K_{AB}, k_{AC}, K_C$ — равновесные константы диссоциации субстратов из соответствующих комплексов (расположение буквенных индексов обозначает место и порядок присоединения субстратов при образовании комплекса); k_{ABC} — константа равновесной реакции после присоединения к фермент-матричному комплексу трех субстратов; k_C — константа скорости присоединения к фермент-матричному комплексу третьего субстрата; k_{AB} — константа скорости образования первой фосфодиэфирной связи; k_{AB} — константа скорости диссоциации из фермент-матричного комплекса динуклеотида; k_{ABC} — константа скорости диссоциации из фермент-матричного комплекса тринуклеотида и третьего субстрата

временно обоим эмпирическим уравнениям, может быть построена исходя из предположения об обратимом присоединении третьего субстрата к начальному и ко всем промежуточным состояниям фермент-матричного комплекса вне зависимости от того, включают ли они в себя первые два субстрата. При этом константы скорости, характеризующие обратимое присоединение третьего субстрата, должны оставаться неизменными во всех случаях.

Простейшая схема, удовлетворяющая этим требованиям, а также условию сохранения классического двухсубстратного характера образования динуклеотида в отсутствие третьего субстрата, представлена на рис. 5, б. Согласно этой схеме, стадии образования фосфодиэфирных связей предшествуют стадии обратимого присоединения субстратов к

фермент-матричному комплексу в произвольном порядке. При этом, если присоединение первых двух субстратов происходит быстро и характеризуется константами равновесия, то присоединение третьего субстрата замедлено и в силу стационарности реакции характеризуется константами скоростей прямой и обратной реакций. Кроме того, значения констант присоединения к фермент-матричному комплексу первых двух субстратов сохраняются неизменными вне зависимости от нахождения или отсутствия в комплексе третьего субстрата, а константы присоединения третьего субстрата принимаются во всех случаях одинаковыми. Наконец, предполагается, что после включения в фермент-матричный комплекс трех субстратов осуществляется некоторая равновесная реакция, а скорость отщепления образовавшегося тринуклеотида и скорость отщепления третьего субстрата от фермент-матричного комплекса не зависят от состава последнего и характеризуются одинаковыми константами. Равенство этих констант может быть объяснено исходя из представления о независимом от состава обратимом конформационном превращении фермент-матричного комплекса, одинаково лимитирующем скорость отщепления тринуклеотида и третьего субстрата.

Представленная схема может быть описана приведенной ниже системой уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l} f_0 = f + Af + f_B + Af_B + f_C + Af_C + f_{BC} + Af_{BC} + Abf_C \\ k_C \cdot c (f + Af + f_B + Af_B) = k_{ABC} (f_C + Af_C + f_{BC} + Af_{BC} + Abf_C) \\ f \cdot a = Af \cdot AK \\ Af \cdot b = Af_B \cdot AK^B \\ f_B \cdot a = Af_B \cdot AK_B \\ Af_C \cdot b = Af_{BC} \cdot AK^B \\ f_C \cdot a = Af_C \cdot AK \\ f_{BC} \cdot a = Af_{BC} \cdot AK_B \\ Af_{BC} = Abf_C \cdot AB K_C \\ v_{AB} = Af_B \cdot k_{AB} \\ v_{ABC} = Abf_C \cdot k_{ABC}, \end{array} \right. \quad (5)$$

где f_0 — общая концентрация фермент-матричного комплекса; f с буквенными индексами — концентрации соответствующих фермент-субстратных комплексов; строчные буквы — концентрации субстратов, обозначенных соответствующими прописными буквами.

В результате решения этой системы для скоростей синтеза динуклеотида и тринуклеотида получаются соответственно следующие уравнения:

$$v_{AB} = \frac{f_0 \cdot a \cdot b \cdot k_{AB} \cdot k_{ABC} / k_C (AK_B + a)}{\left(\frac{AK + a}{AK_B + a} \cdot AK^B + b \right) \left(\frac{k_{ABC}}{k_C} + c \right)}, \quad (6)$$

$$v_{ABC} = \frac{f_0 \cdot a \cdot b \cdot c \cdot k_{ABC} / [(AK_B + a) \cdot ABK_C + a]}{\left(\frac{(AK + a) \cdot AK^B \cdot ABK_C}{(AK_B + a) \cdot ABK_C + a} + b \right) \left(\frac{k_{ABC}}{k_C} + c \right)}. \quad (7)$$

Нетрудно видеть, что если принять

$$\begin{aligned} V_B &= \frac{f_0 \cdot a \cdot k_{AB}}{AK_B + a}; \quad V_{BC} = \frac{f_0 \cdot a \cdot k_{ABC}}{(AK_B + a) \cdot ABK_C + a}; \\ b_0 &= \frac{AK + a}{AK_B + a} \cdot AK^B; \quad b'_0 = \frac{(AK + a) \cdot AK^B \cdot ABK_C}{(AK_B + a) \cdot ABK_C + a}; \\ c_0 &= c'_0 = \frac{k_{ABC}}{k_C}, \end{aligned}$$

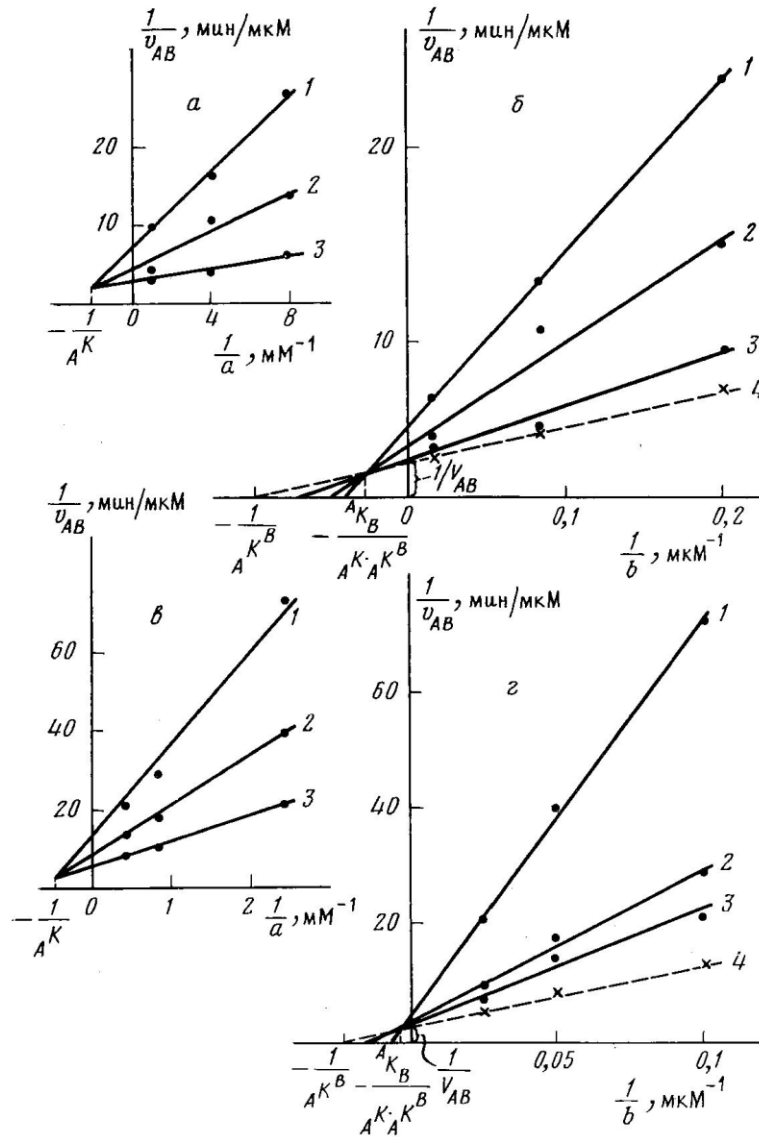


Рис. 6. Кинетика реакций синтеза динуклеотидов rrrArU и rArU в условиях минимального набора субстратов (концентрация ДНК фага T7 ΔD111 в случае синтеза rrrArU составляла 100 мкг/мл, в случае синтеза rArU — 32 мкг/мл при сохранении отношений фермент/ДНК, указанных в условиях эксперимента): а — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза rrrArU ($1/v_{AB}$) от обратной величины концентрации АТР ($1/a$) при концентрациях УТР 5 мкМ (1), 12 мкМ (2), 60 мкМ (3); б — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза rrrArU от обратной величины концентрации УТР ($1/b$) при концентрациях АТР 125 мкМ (1), 250 мкМ (2), 1000 мкМ (3), зависимость величины отрезков, отсекаемых от оси ординат прямыми на графике а, от обратной величины концентрации УТР (4); в — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза rArU ($1/v_{AB}$) от обратной величины концентрации АМР ($1/a$) при концентрациях УТР 10 мкМ (1), 20 мкМ (2), 40 мкМ (3); г — зависимости обратной величины начальной скорости синтеза rArU от обратной величины концентрации УТР при концентрациях АМР 0,415 мМ (1), 1,25 мМ (2), 2,5 мМ (3), зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике в, от обратной величины концентрации УТР (4). V_{AB} — максимальная скорость двухсубстратной реакции

то уравнения (6) и (7) полностью соответствуют эмпирическим уравнениям (3) и (4), описывающим экспериментальные результаты. При $s=0$ правая часть уравнения скорости синтеза тринуклеотида (7) обращается в 0, а уравнение скорости синтеза динуклеотида (6) приобретает вид, типичный для уравнения скорости двухсубстратной ферментативной реакции:

$$v_{AB} = \frac{f_0 \cdot a \cdot b \cdot k_{AB}}{A^K \cdot A^K B + A^K B \cdot a + A^K B \cdot b + a \cdot b} \quad (8)$$

В подтверждение этой кинетической схемы была проведена следующая работа. Из независимых опытов по синтезу pppApU и pApU (рис. 6) были получены константы уравнения двухсубстратной реакции (таблица). Эти константы были использованы для вычисления констант b_0 и V_v в формулах для скоростей синтеза динуклеотидов pppApU и pApU в присутствии третьего субстрата (см. уравнение (6)). Сравнение вычисленных значений констант b_0 с экспериментально найденными показывает, что эти значения находятся в хорошем соответствии друг с другом (таблица). Несколько большие расхождения наблюдаются при сравнении вычисленных и экспериментально найденных констант V_v . Они могут быть следствием различий в концентрации ферментматричного комплекса в различных сериях опытов.

Таким образом, полное соответствие формы уравнений для скоростей сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов, выведенных на основании анализа кинетических кривых и полученных при решении системы уравнений, описывающей предполагаемую схему синтеза, а также близость значений констант, экспериментальных и вычисленных, свидетельствуют в пользу предлагаемой интерпретации полученных результатов.

Авторы выражают глубокую благодарность С. К. Завриеву за консультацию и помощь при выделении ДНК фага T7 Δ D111.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nierman W. C., Chamberlin M. J. J. Biol. Chem., 1979, 254, 7921—7926.
2. Johnston D. E., McClure W. R. In: RNA, Polymerase/Losick R., Chamberlin M., eds., N. Y.: Cold Spring Harbor Labor, 1976, 413—428.
3. McClure W. R., Cech C. L., Johnston D. E. J. Biol. Chem., 1978, 253, 8941—8948.
4. Smagowicz W. J., Scheit K. H. Nucl. Acids Res., 1978, 5, 1919—1932.
5. Shemyakin M. F., Malygin A. G., Patrushev L. I. FEBS Letters, 197, 91, 253—256.
6. Carposis A. J., Gralla J. D. Biochemistry, 1980, 19, 3245—3253.
7. McClure W. R., Cech C. L. J. Biol. Chem., 1978, 253, 8949—8956.
8. Малегин А. Г., Шемякин М. Ф. Мол. биол., 1981, 15, 875—882.
9. Smagowicz W. J., Scheit K. H. Nucl. Acids Res., 1981, 9, 5845—5854.
10. Munson L. M., Reznikoff W. S. Biochemistry, 1981, 20, 2081—2085.
11. Richardson C. C. J. Mol. Biol., 1966, 15, 49—61.
12. Siebenlist U. Nucl. Acids Res., 1979, 6, 1895—1903.
13. Рандерат К., Рандерат Е. В. В кн.: Методы исследования нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1970, 31—49.

Поступила в редакцию
16.XII.1982

KINETICS OF DNA-DEPENDENT SYNTHESIS OF RNA: COUPLED SYNTHESIS OF DI- AND TRINUCLEOTIDES IN THE PRESENCE OF THE MINIMAL SET OF SUBSTRATES

S. V. SMIRNOV, A. G. MALYGIN

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The qualitative and quantitative characteristics of the synthesis of the short oligonucleotides by *Escherichia coli* RNA polymerase on A1 promoter of the bacteriophage T7 deletion mutant Δ D111 DNA in the presence of the incomplete set of nucleosidetriphosphates were studied. It was shown, that in conformity with the structure of A1 promoter the oligonucleotides pppApU, pppApUpC were synthesized in the presence of ATP, UTP, CTP; the oligonucleotides pApU, pApUpC — in the presence of AMP, UTP, CTP and oligonucleotides pApU, pApUpC, pApUpCpG — in the presence of AMP, UTP, CTP, GTP. The curves of di- and trinucleotide syntheses as the functions of the substrate concentrations were obtained. The analytical formulas for the rates of the coupled synthesis were derived from these curves. A kinetic scheme that is in conformity with the experimental data was proposed. This scheme includes the stage of the reversible, random and release of di- and trinucleotides from the enzyme-template complex.