

УДК 577.214

**КИНЕТИКА ДНК-ЗАВИСИМОГО СИНТЕЗА
РНК: СОПРЯЖЕННЫЙ СИНТЕЗ ДИ-, ТРИ-
И ТЕТРАНУКЛЕОТИДОВ В ПРИСУТСТВИИ
МИНИМАЛЬНОГО НАБОРА СУБСТРАТОВ****С. В. СМИРНОВ, А. Г. МАЛЫГИН***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Изучена кинетика сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов РНК-полимеразой *Escherichia coli* на промоторе А1 фага Т7. Получены эмпирические формулы, описывающие зависимости скорости синтеза три- и тетрануклеотидов от концентрации третьего (СТР) и четвертого (ГТР) субстратов. На основании кинетических данных сделан вывод, что присоединение четвертого субстрата к фермент-матричному комплексу происходит только после присоединения третьего. Предложена кинетическая схема, на основании которой выведены теоретические уравнения сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов, совпадающие с эмпирическими.

В предыдущей работе [1] нами была изучена кинетика сопряженного синтеза ди- и тринуклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* на промоторе А1 ДНК-делеционного мутанта $\Delta D111$ фага Т7 при неполном наборе нуклеозидтрифосфатов в системе синтеза. Более сложной задачей является кинетическое описание сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов. В отличие от предыдущего случая экспериментальные возможности для решения такой задачи более ограничены. В частности, сопряженный синтез ди-, три- и тетрануклеотидов не может быть проведен на промоторе А1, если в качестве первого субстрата использовать АТР, так как применение АТР сделало бы систему полной и привело бы к синтезу длинных цепей РНК. Поэтому в настоящей работе изучение кинетики сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов ограничивается вариантом, когда в качестве первого субстрата используется АМР.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В настоящей работе применяли те же материалы и методы, что и ранее [1]. В качестве первого субстрата во всех случаях использовали АМР (1,2 мМ), в качестве второго — $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (30 мкМ). Концентрации третьего ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$) и четвертого (ГТР) субстратов указаны в подписях к рисункам. Молярное соотношение РНК-полимеразы и ДНК в опытах составляло 1 : 1 при концентрациях компонентов 2,52 и 120 мкг/мл соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как и в предыдущей работе [1], при выяснении кинетического механизма сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов в первую очередь было установлено, что зависимость синтеза каждого из олигонуклеотидов от времени описывается прямыми, исходящими из начала координат (рис. 1). Это свидетельствовало о стационарном характере реакций и об отсутствии в субстратах примеси АТР, которая могла бы нарушить линейную зависимость синтеза олигонуклеотидов от времени вследствие инициации синтеза длинных цепей РНК. Основной задачей работы было изучение зависимостей синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов от концентраций субстратов. Результаты исследования синтеза этих

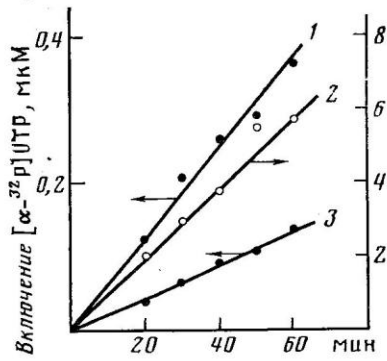


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости синтеза ди- (2), три- (1) и тетра- (3) нуклеотидов от времени. Реакционная смесь содержала 1,2 мМ АМР, 30 мкМ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{УТР}$, 6 мкМ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{СТР}$ и 6 мкМ ГТР

Рис. 2. а — Зависимость обратной величины скорости синтеза динуклеотида от концентрации СТР при концентрациях ГТР 16 (1), 8 (2), 4 (3) и 2 мкМ (4); б — экспериментальные (точки) и вычисленные (линии) зависимости скорости синтеза динуклеотида от концентрации ГТР (d) при концентрациях СТР 2,46 (1), 4,46 (2), 7,46 (3) и 16,45 мкМ (4)

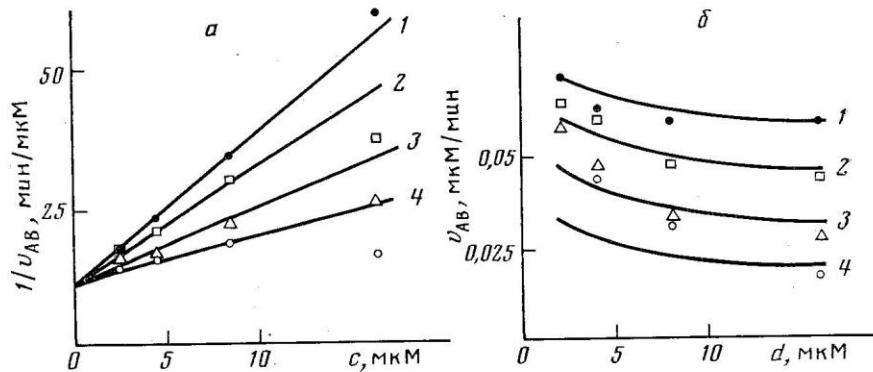


Рис. 2

олигонуклеотидов как функции концентрации третьего (СТР) и четвертого (ГТР) субстратов при фиксированной концентрации первого (АМР) и второго (УТР) субстратов приведены на рис. 2 и 3.

Анализ зависимостей синтеза три- и тетра- нуклеотидов, представленных на рис. 3, и сравнение их с изученными в предыдущей работе [1] зависимостями синтеза ди- и тринуклеотидов от концентрации субстратов показали, что между ними есть определенное соответствие. Это соответствие проявляется в том, что обратные величины скорости синтеза динуклеотида в присутствии трех субстратов и тринуклеотида в присутствии четырех субстратов описываются прямолинейными функциями от концентрации последнего субстрата, в то время как в остальных случаях скорости синтеза ди- и тринуклеотидов в присутствии трех субстратов и три- и тетра- нуклеотидов в присутствии четырех субстратов описываются прямолинейными функциями только в полных обратных координатах. Используя этот факт, несложно вывести эмпирические уравнения скоростей синтеза три- и тетра- нуклеотидов в присутствии четырех субстратов аналогично тому, как это было сделано ранее [1] для скоростей синтеза ди- и тринуклеотидов в присутствии трех субстратов.

Для скорости синтеза тринуклеотидов это может быть сделано следующим образом. В соответствии с рис. 3, а записывали уравнение семейства прямых, выражающих зависимости обратных величин скорости синтеза тринуклеотидов от обратных величин концентрации третьего субстрата:

$$\frac{1}{v_{\text{ABC}}} = \frac{1}{c} \cdot \left(\frac{1}{v_{\text{ABC},\infty}} + \frac{1}{V_1} \right) / \frac{1}{c_1} + \frac{1}{v_{\text{ABC},\infty}} \quad (1)$$

где v_{ABC} — скорость синтеза тринуклеотида, c — концентрация третьего субстрата, $1/v_{\text{ABC},\infty}$ — отрезок, отсекаемый прямыми на оси ординат, $1/c_1$

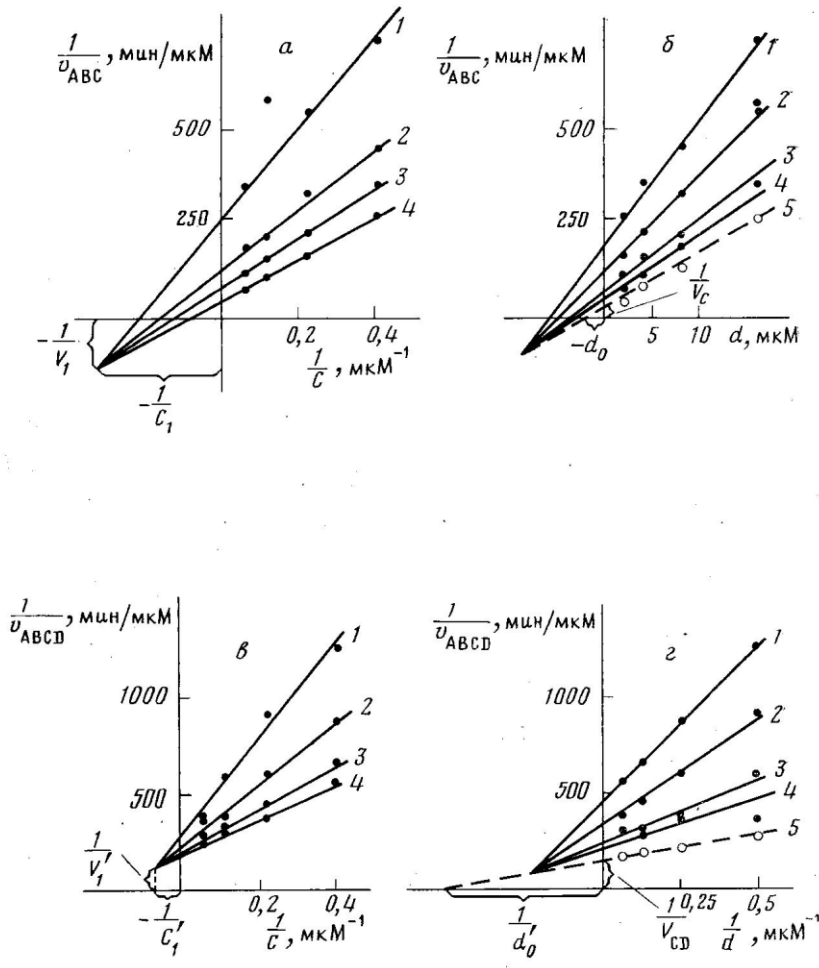


Рис. 3. Кинетика синтеза три- и тетрануклеотидов. а — Зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида от обратной величины концентрации СТР при концентрациях ГТР 16 (1), 8 (2), 4 (3), 2 мкМ (4). б — Зависимости обратной величины начальной скорости синтеза тринуклеотида от концентрации ГТР при концентрациях СТР 1,46 (1), 4,46 (2), 8,46 (3), 16,47 мкМ (4); ∞ (5); зависимость величины отрезков, отсекаемых на оси ординат прямыми на графике (а), от концентрации ГТР. в — Зависимости обратной величины скорости синтеза тетрануклеотида от обратной величины концентрации СТР при концентрациях ГТР 2 (1), 4 (2), 8 (3), 16 мкМ (4); зависимость величины отрезков, отсекаемых от оси ординат прямыми на графике (б) от обратной величины концентрации СТР. г — Зависимость обратной величины скорости синтеза тетрануклеотида от обратной величины концентрации ГТР (1/d)⁻¹ при концентрациях СТР 2,46 (1), 4,46 (2), 8,46 (3), 16,46 мкМ (4), ∞ (5)

и $1/V_1$ — соответственно значения абсциссы и ординаты точки пересечения прямых, взятые с знаком. Член $1/v_{ABC, \infty}$ выражает зависимость скорости синтеза тринуклеотида от концентрации четвертого субстрата при $1/c=0$ и соответственно $c=\infty$. Из рис. 3, б видно, что эта зависимость относится к семейству прямых, выражающих зависимость обратной величины скорости синтеза тринуклеотида от концентрации четвертого субстрата при разных значениях концентраций третьего субстрата, и может быть выражена в виде уравнения

$$\frac{1}{v_{ABC, \infty}} = (d/d_0 + 1) \frac{1}{V_C}, \quad (2)$$

где d_0 и $1/V_C$ — отрезки, отсекаемые соответственно на оси абсцисс и оси ординат обсуждаемой прямой, обозначенной на рис. 3, б пунктирной линией (V_C — максимальная скорость синтеза тринуклеотида при фиксированной концентрации ГТР).

рованном значении концентраций первого и второго субстратов), d — концентрация четвертого субстрата.

В результате подстановки значений $1/v_{ABC,\infty}$ из уравнения (2) в уравнение (1) и последующего преобразования для скорости синтеза тринуклеотида получается выражение

$$v_{ABC} = \frac{V_C c d_0}{(c + c_1)(d + d_0) + \frac{V_C}{V_1} d_0 c_1} \quad (3)$$

Аналогичным образом, но с использованием линейной зависимости обратной величины скорости реакции от обратной величины концентрации четвертого субстрата (рис. 3, в, г) находили эмпирическое уравнение для скорости синтеза тетрануклеотида:

$$v_{ABCD} = \frac{V_{CD} c d}{(c + c_1')(d + d_0') - \frac{V_{CD}}{V_1'} c_1' d} \quad (4)$$

где v_{ABCD} — скорость синтеза тетрануклеотида, $-c_1'$ и V_1' — обратные значения соответственно абсциссы и ординаты точки пересечения прямой на рис. 3, в, $-d_0'$ и V_{CD} — обратные значения величин отрезков, отсекаемых соответственно на оси абсцисс и оси ординат прямой, выражающей зависимость максимальной скорости синтеза тетрануклеотида ($c = \infty$) от концентрации четвертого субстрата и обозначенной на рис. 3, г пунктирной линией.

Вторая часть работы состояла в отыскании по возможности простейшей кинетической схемы, описывающей данные по синтезу динуклеотидов на рис. 2 и объясняющей эмпирические уравнения скоростей синтеза три- и тетрануклеотидов. Очевидно, что такая схема должна включать в качестве составной части кинетическую схему, разработанную в предыдущей статье [1] для синтеза ди- и тринуклеотидов и в этом смысле может рассматриваться как ее развитие. Это развитие может быть представлено как усложнение схемы синтеза олигонуклеотидов в

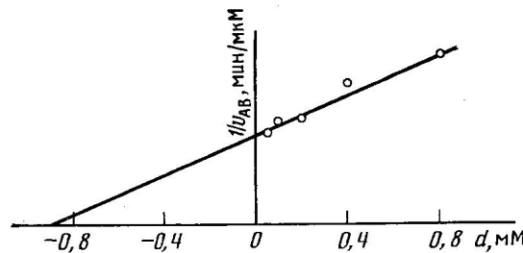


Рис. 4. Зависимость обратной величины скорости синтеза динуклеотида от концентрации GTP в отсутствие СТР

присутствии трех субстратов за счет введения в нее реакций с участием четвертого субстрата (GTP). Чтобы исключить из рассмотрения на схеме взаимодействие GTP со свободным комплексом ДНК·фермент или комплексами, включающими первые два субстрата, было изучено влияние различных концентраций GTP на синтез динуклеотида в отсутствие СТР. Как видно из рис. 4, GTP при высоких концентрациях подавляет синтез динуклеотида, возможно, по механизму описанного в литературе [2] конкурентного ингибирования синтеза РНК избытком одного из субстратов. Однако в используемом в данной работе интервале концентраций это ингибирование составляло не более 1,5%. Поэтому взаимодействием GTP с фермент-матричными комплексами, не включающими СТР, в кинетической схеме можно пренебречь. Что касается взаимодействия GTP с комплексами, включающими СТР, то можно предложить несколько вариантов схем, отвечающих экспериментальным данным. В этой работе используется наиболее простая из них, представленная на рис. 5. Эта схема может быть описана приведенной ниже системой уравнений:

$$\begin{cases}
 f_0 = f + Af + f_B + Af_B + f_C + Af_C + f_{BC} + Af_{BC} + ABf_C + ABf_{CD} \\
 k_C \cdot c(f + Af + f_B + Af_B) = k_{ABC} \cdot (f_C + Af_C + f_{BC} + Af_{BC} + ABf_C) + k_{ABCD} \cdot ABf_{CD} \\
 f \cdot a = Af \cdot AK \\
 f_B \cdot a = Af_B \cdot AK^B \\
 Af \cdot b = Af_B \cdot AK^B \\
 f_C \cdot a = Af_C \cdot AK \\
 f_{BC} \cdot a = Af_{BC} \cdot AK^B \\
 Af_C \cdot b = Af_{BC} \cdot AK^B \\
 Af_{BC} = ABf_C \cdot ABK_C \\
 ABf_C \cdot d = ABf_{CD} \cdot K_D \\
 v_{AB} = Af_B \cdot k_{AB} \\
 v_{ABC} = ABf_C \cdot k_{ABC} \\
 v_{ABCD} = ABf_{CD} \cdot k_{ABCD},
 \end{cases} \quad (5)$$

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

В результате решения этой системы для скоростей сопряженного синтеза ди-, три- и тетрануклеотидов получаются следующие уравнения:

$$v_{AB} = \frac{f_0 k_{AB} L \left(\frac{k_{ABC} K_D}{k_C L'} + \frac{k_{ABCD} d}{k_C} \right)}{\left(\frac{k_{ABCD}}{k_C} + c \right) \left(\frac{K_D}{L'} + d \right) + \frac{K_D}{k_C L'} (k_{ABC} - k_{ABCD})}, \quad (6)$$

$$v_{ABC} = \frac{f_0 c k_{ABC} K_D}{\left(\frac{k_{ABCD}}{k_C} + c \right) \left(\frac{K_D}{L'} + d \right) + \frac{K_D}{k_C L'} (k_{ABC} - k_{ABCD})}, \quad (7)$$

$$v_{ABCD} = \frac{f_0 c d k_{ABCD}}{\left(\frac{k_{ABCD}}{k_C} + c \right) \left(\frac{K_D}{L'} + d \right) - \frac{d}{k_C} (k_{ABC} - k_{ABCD})}, \quad (8)$$

где

$$L = \frac{ab}{AK_A K^B + AK^B a + AK^B b + ab}, \quad (9)$$

$$L' = \frac{L}{ABK_C + L}. \quad (10)$$

Нетрудно видеть, что если принять

$$\begin{aligned}
 V_C &= f_0 L' k_{ABC}, & V_{CD} &= f_0 k_{ABCD}, \\
 V_1 &= \frac{f_0 L' k_{ABC} k_{ABCD}}{(k_{ABC} - k_{ABCD})}, & V_1' &= \frac{f_0 k_{ABC} k_{ABCD}}{(k_{ABC} - k_{ABCD})},
 \end{aligned} \quad (11)$$

$$c_1 = \frac{k_{ABCD}}{k_C}, \quad c_1' = \frac{k_{ABC}}{k_C},$$

$$d_0 = \frac{K_D}{L'}, \quad d_0' = \frac{K_D}{L'},$$

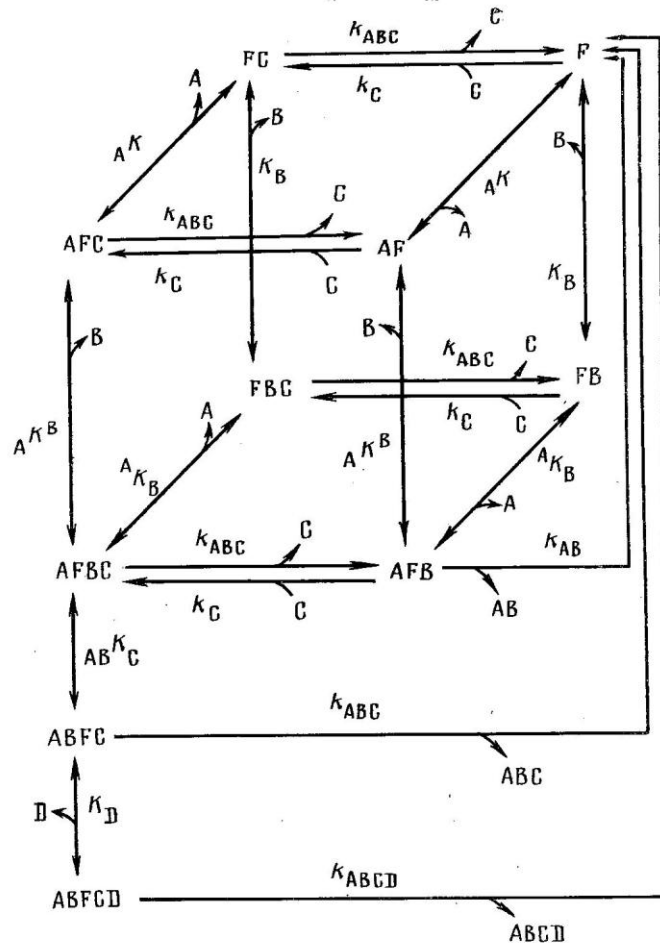


Рис. 5. Кинетическая схема сопряженного синтеза ди-, три- и тетра-нуклеотидов, где F — открытый промоторный комплекс РНК-полимеразы с ДНК; А — первый субстрат; В, С, D — субстраты, включающиеся в олигонуклеотид соответственно вторым, третьим и четвертым: AF, FB, AFB, FC, AFC, FBC, AFBC, ABFC, ABFGD — соответствующие фермент-субстратные комплексы; $A^{\wedge}K$, K_B , $A^{\wedge}K^B$, $A^{\wedge}K^B$, K_D — равновесные константы диссоциации для высвобождения субстратов из соответствующих комплексов (расположение буквенных индексов обозначает место и порядок присоединения субстратов при образовании комплекса); $AB^{\wedge}K_C$ — 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 высвобождения из фермент-матричного комплекса динуклеотида; k_{ABC} — константа скорости высвобождения из фермент-матричного комплекса тринуклеотида и третьего субстрата; k_{ABCD} — константа скорости высвобождения из фермент-матричного комплекса тетра-нуклеотида

то уравнения (7) и (8) полностью соответствуют эмпирическим уравнениям (3) и (4), описывающим экспериментальные результаты.

Для проверки предложенной кинетической схемы была проделана следующая работа. На основании равенств (11) с использованием значений эмпирических констант были вычислены несколькими независимыми способами значения L' , K_D , а также k_{ABC}/k_{ABCD} и k_{ABC}/k_C (таблица). Для сравнения приведено также значение L' , рассчитанное на основании опубликованных ранее данных [1] и значения k_{ABC}/k_C [1] (L' вычисляли по формулам (9) и (10) с учетом того, что $AB^{\wedge}K_C = -L$ при $b = -b_0'$). Из таблицы видно, что значения одних и тех же величин, найденные различными способами, хорошо согласуются как между собой, так и со значениями соответствующих величин, взятыми из предыдущей работы [1].

Сравнение кинетических констант, вычисленных различными способами на основании равенств (11)

L'	K_D	$\frac{k_{ABC}}{k_{ABCD}}$	$\frac{k_{ABC}}{k_C}$
$\frac{V_1}{V_1'} = 0,81$	$\frac{V_1}{V_1'} d_0 = 1,62$	$\frac{V_C}{V_1} + 1 = 5,4$	$c_1' = 15,0$
$\frac{V_C c_1}{V_{CD} c_1'} = 0,99$	$\frac{V_C c_1}{V_{CD} c_1'} d_0 = 1,98$	$\frac{V_1'}{V_1 - V_{CD}} = 4,0$	$\frac{c_1 \cdot V_1'}{V_1 - V_{CD}} = 12,5$
$\frac{L}{AB K_C + L} = 0,76^*$	$\frac{V_1}{V_1'} d_0' = 1,59$	$\frac{c_1'}{c_1} = 4,8$	$c_1 \left(\frac{V_C}{V_1} + 1 \right) = 16,7$
	$\frac{V_C c_1}{V_{CD} c_1'} d_0' = 1,94$		$c_0 = 16,2^*$
			$c_0' = 15,1^*$

* См. предыдущую работу [1].

Примечание. Используются эмпирические константы сопряженного синтеза ди-, три- и тетрауклеотидов РНК-полимеразой *E. coli* на ДНК фага T7 ΔD111: $c_1 = 3,1$ мкМ, $c_1' = 15,0$ мкМ, $d_0 = 2,0$ мкМ, $d_0' = 1,96$ мкМ, $V_1 = 0,0077$ мкМ·мин⁻¹, $V_C = 0,034$ мкМ·мин⁻¹, $V_1' = 0,0095$ мкМ·мин⁻¹, $V_{CD} = 0,0071$ мкМ·мин⁻¹, $f_0^{-1} L^{-1} \cdot k_{AB} = 11$ мкМ·мин⁻¹.

Нетрудно также показать, что при $d=0$ уравнения (6) и (7) преобразуются в уравнения сопряженного синтеза соответственно ди- и триуклеотидов в присутствии трех субстратов, выведенные ранее [1]. Кроме того, преобразовав уравнение (6) в линейную форму относительно концентрации третьего субстрата

$$\frac{1}{v_{AB}} = \frac{c \cdot k_C (K_D + L'd)}{f_0 \cdot k_{AB} L (k_{ABC} + L'k_{ABC}d)} + \frac{1}{f_0 L k_{AB}}, \quad (12)$$

можно увидеть, что свободный член в этом уравнении не зависит от концентрации четвертого субстрата. Поэтому прямые, выражающие зависимость обратной величины скорости синтеза динуклеотида от концентрации третьего субстрата при различных концентрациях четвертого, должны пересекаться в точке, лежащей на оси ординат. Этот вывод хорошо согласуется с данными, представленными на рис. 2, а. Значение ординаты этой точки определяет величину свободного члена $1/f_0 L k_{AB}$. Подставив значение свободного члена и значения остальных констант (см. таблицу) в уравнение (6), можно вычислить кривые зависимости скорости синтеза динуклеотида от концентрации четвертого субстрата и сравнить их с экспериментальными результатами. Необходимость вычисления этих кривых связана с тем, что они, учитывая структуру уравнения (12), не могут быть сведены к прямым подбором подходящей системы координат, как это делалось в остальных случаях. Как можно видеть из рис. 2, б, между вычисленными кривыми и экспериментальными точками имеется достаточно хорошее соответствие.

Таким образом, хорошее совпадение найденных различными способами значений кинетических констант в случае синтеза три- и тетрауклеотидов и соответствие между вычисленными с привлечением этих констант теоретическими кривыми синтеза динуклеотидов и экспериментальными данными может служить достаточно убедительным доказательством правильности предлагаемой кинетической схемы сопряженного синтеза ди-, три- и тетрауклеотидов на промоторе A1 ДНК фага T7.

Авторы выражают благодарность В. И. Брускову и В. Г. Курявому за предоставленную возможность провести ряд экспериментов в Институте биофизики АН СССР (Пушино).

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов С. В., Малыгин А. Г. Молекуляр. биология, 1984, 18, 436—446.
2. Остерман Л. А., Адлер В. В. Молекуляр. биология, 1969, 3, 349—360.

Поступила в редакцию
23.XI.1984

KINETICS OF DNA-DEPENDENT SYNTHESIS OF RNA: COUPLED SYNTHESIS OF DI-, TRI- AND TETRANUCLEOTIDES 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 short oligonucleotides synthesis by *Escherichia coli* RNA polymerase on A1 promoter of the bacteriophage T7 in the presence of incomplete set of nucleoside triphosphates were studied. The binding of the fourth substrate with enzyme-template complex was shown to occur after binding of the third substrate only. The curves of di-, tri- and tetranucleotide synthesis as the function of CTP and GTP concentration were constructed. The empirical formulas for the rates of the coupled synthesis of tri- and tetranucleotides were derived from these curves. A kinetic scheme describing the experimental data was proposed.
