

## ВРЕМЕННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ИНДУЦИРУЮЩЕГО СИГНАЛА SOS-СИСТЕМЫ БАКТЕРИИ *E. COLI* ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ

*О. В. Белов*

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

На основе анализа экспериментальных данных для относительной концентрации белка LexA рассчитаны относительные концентрации однонитевой ДНК, активной и неактивной конформации белка RecA. Обсуждены возможности дальнейших теоретических и экспериментальных исследований.

On the basis of the analysis of experimental data for relative concentration of LexA protein, the relative concentrations of single stranded DNA are calculated for active and inactive conformation of the RecA protein. The opportunities for the further theoretical and experimental researches are discussed.

PACS: 87.15.Aa

### ВВЕДЕНИЕ

Как известно, индуцируемый ультрафиолетовым (УФ) облучением мутационный процесс у многих видов бактерий, в том числе у клеток *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, контролируется рядом индуцибельных генов, экспрессия которых осуществляется в ходе SOS-репарации клеточной ДНК. Ключевыми в ходе SOS-зависимого мутационного процесса у бактерий *E. coli* являются гены *recA*, *lexA*, *umuC*, *umuD* и ряд других. В ответ на повреждение ДНК клетка реагирует остановкой репликации ДНК и инициацией процессов эксцизионной и SOS-репарации [1, 2]. Попытки математического моделирования механизмов различных этапов репарационного процесса предпринимались в ряде работ [3–5]. В последнее время были получены новые экспериментальные данные [6], касающиеся активности основных генов SOS-системы клеток *E. coli* [7, 8], свидетельствующие о необычном колебательном отклике SOS-системы при УФ-облучении. Это обстоятельство заставляет пересмотреть ряд положений прежних модельных представлений [4], и прежде всего вопрос о концентрации в клетке однонитевой ДНК, которая является индуцирующим SOS-сигналом. Экспериментальное измерение *in vivo* концентрации однонитевой ДНК представляет собой трудную задачу. В работе [4] эта величина была теоретически рассчитана в рамках оригинальной математической модели. Этот расчет, представляя несомненную ценность, вносит трудно контролируемые неточности в модель SOS-системы.

В настоящей работе исследована модель SOS-системы [4], в которой оставлены наиболее важные, надежно экспериментально и теоретически обоснованные переменные.

Временная зависимость индуцирующего SOS-сигнала получена на основе модели SOS-системы из экспериментальных данных для концентрации белка LexA [9]. Таким образом, функциональный вид индуцирующего SOS-сигнала зависит от используемой математической модели, т. е. чем точнее модель и надежнее экспериментальные данные, тем точнее можно рассчитать индуцирующий SOS-сигнал.

## 1. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Как известно, генетическая сеть SOS-системы контролируется с помощью белка LexA. Этот белок является репрессором более 40 индуцибельных генов всей SOS-системы [7, 8]. Он связывается с промоторами SOS-генов и понижает экспрессию как своего гена, так и других генов SOS-системы. Таким образом, понижение концентрации белка LexA приводит к индукции SOS-системы, а повышение концентрации восстанавливает нормальное состояние клетки. Другим важнейшим белком SOS-системы является белок RecA. При повреждении ДНК, в результате экзонуклеазной деградации, возникают однонитевые пробелы в молекуле ДНК. Белок RecA, связываясь с однонитевой ДНК, формирует так называемые RecA-филаменты. Образование RecA-филамента является сложным процессом, в котором участвуют различные ферменты и белки. RecA-филаменты эволюционируют во времени [10], они обладают разнообразными функциональными свойствами и вовлечены в ряд важных клеточных процессов [1].

В предлагаемой математической модели SOS-системы учтены лишь процессы взаимодействия продуктов генов *lexA* и *recA* во время начального периода работы SOS-системы. Явно описан процесс авторасщепления белка LexA с помощью RecA-филамента. Уровень концентрации белка LexA является величиной SOS-ответа клетки. Этот уровень определяется уровнем концентрации активной конформации белка RecA, который находится в RecA-филаментах (далее активная конформация белка RecA обозначена как RecA\*). В свою очередь, уровень концентрации RecA\* зависит от уровня концентрации однонитевой ДНК, т. е. от индуцирующего сигнала SOS-системы. Любые процессы, связанные с SOS-репарацией, в математической модели явно не описываются. Однако в результате того, что концентрация однонитевой ДНК рассчитана из условия наилучшего описания моделью SOS-системы экспериментальных данных для концентрации белка LexA [9], во временной зависимости концентрации однонитевой ДНК четко видны процессы репарации однонитевых повреждений ДНК (см. далее рис. 3).

Функционирование SOS-системы можно описать системами нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений (см., например, [11]). Основные уравнения математической модели были получены в работе [4]. В настоящей работе сохранен их функциональный вид, однако параметры модели изменены и согласованы с новыми экспериментальными данными. Нормированная система дифференциальных уравнений имеет вид

$$\frac{d[\text{LexA}]}{dt} = \tau_l \frac{b_l + 1}{b_l + [\text{LexA}]^4} - \tau_l [\text{LexA}] - k_1 [\text{LexA}] \cdot [\text{RecA}^*], \quad (1)$$

$$\frac{d[\text{RecA}]}{dt} = \tau_r \frac{b_r + 1}{b_r + [\text{LexA}]^2} - \tau_r [\text{RecA}] - k_r [\text{RecA}] \cdot [\text{ssDNA}] + \theta [\text{RecA}^*], \quad (2)$$

$$\frac{d[\text{RecA}^*]}{dt} = k_r [\text{RecA}] \cdot [\text{ssDNA}] - \theta [\text{RecA}^*]. \quad (3)$$

Здесь переменные в квадратных скобках,  $[LexA]$ ,  $[RecA]$  и  $[RecA^*]$ , обозначают соответствующие нормированные концентрации белков LexA, RecA и активированного белка RecA\*.  $[ssDNA]$  является нормированной концентрацией одностранных пробелов ДНК.  $1/\tau_l$  и  $1/\tau_r$  — времена жизни белков LexA и RecA соответственно. За время жизни концентрация белка понижается в 2,718 раза.  $\theta$  — аналог обратного времени жизни белка RecA\*.  $k_l$ ,  $k_r$  и  $\theta$  являются подгоночными параметрами модели. Концентрация белка LexA в клетке с индуцированной SOS-системой может возрастать в несколько раз, а концентрация белка RecA — в десятки раз [1]. Из этих данных можно оценить численные значения параметров:  $b_l = 0,25$ ,  $b_r = 0,015$ . Начальные условия для системы уравнений (1)–(3) определяются состоянием в необлученной клетке:  $[LexA] = 1$ ,  $[RecA] = 1$ ,  $[RecA^*] = 0$ .

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, *a* приведены экспериментальные данные для нормированной концентрации белка  $[LexA]$  в клетках дикого типа *E. coli*, облученных УФ-дозой в  $5 \text{ Дж/м}^2$  [9]. Используя зависимость  $[LexA](t)$ , из уравнения (1) можно определить временную зависимость  $[RecA^*](t)$ . На рис. 1, *б* показаны зависимости  $[RecA^*](t)$ , полученные при различных численных значениях параметра  $\tau_l$ .

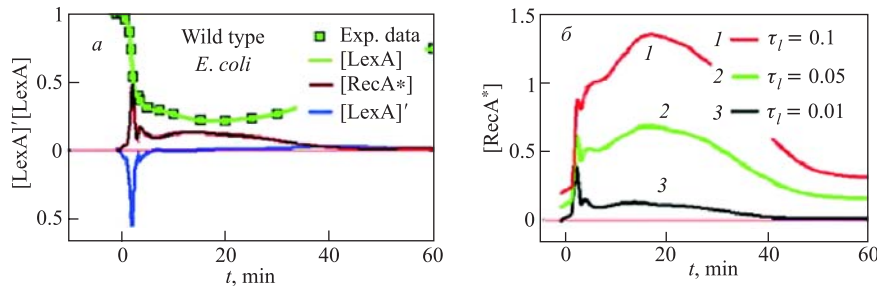


Рис. 1. *a*) Временная зависимость нормированной концентрации белка LexA  $[LexA](t)$  при облучении УФ-дозой  $5 \text{ Дж/м}^2$  клетки дикого типа *E. coli* [9]. В нижней части рисунка показана производная  $[LexA]'$ . Для удобства сравнения с  $[LexA]'$  в середине рисунка показана временная зависимость  $[RecA^*](t)$  в относительных единицах. *б*) Рассчитанные временные зависимости нормированной концентрации активированного белка RecA\*  $[RecA^*](t)$  в относительных единицах, при различных значениях параметра. Для наглядности кривые 1 и 2 смещены вверх на величину 0,2 и 0,1 соответственно

Анализ экспериментальных данных, проведенный в работе [4], показывает, что время жизни белка LexA, связанное со спонтанным расщеплением и деградацией, составляет несколько часов, т. е. для качественной оценки можно взять численное значение  $\tau_l = 0,01$ . В этом случае (см. рис. 1, *б*, кривая 3) временная зависимость  $[RecA^*](t)$  представляет собой четко выраженный узкий пик при малых временах ( $t < 3$  мин), слабо выраженный широкий пик при больших временах ( $t > 7$ ) и небольшой пик при  $t \sim 5$  мин. Из верхней части рис. 1, *a* видно, что при  $0 < t < 3$  происходит быстрое расщепление белка LexA

и понижение его нормированной концентрации от значения 1,0 до  $\sim 0,4$ . Во второй временной отрезок  $3 < t < 7$  происходит дальнейшее, но более медленное понижение концентрации от  $\sim 0,4$  до  $\sim 0,3$ . При  $t > 7$  мин начинается стабильная работа SOS-системы. Сравнивая производную  $[\text{LexA}]'$  с кривой 3, которая также показана в середине рис. 1, а, видим, что форма кривой 3 при  $t < 7$  в основном определяется производной  $[\text{LexA}]'$ , а при  $7 < t < 30$  — величиной  $[\text{LexA}]$ . Таким образом, для более точного определения зависимости  $[\text{RecA}^*](t)$  при  $0 < t < 7$  необходимо как можно точнее экспериментально измерять  $[\text{LexA}](t)$ , чтобы надежнее определить производную  $[\text{LexA}]'$ .

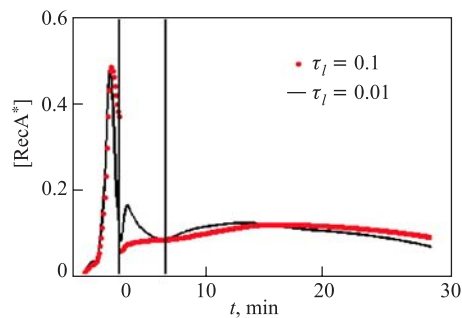


Рис. 2. Приблизительное подобие кривой 3 и измененной кривой 1 (см. рис. 1, б). Сплошной линией показана кривая 3, точками — кривая 1 (при  $t > 3$  точки сливаются в непрерывную линию). Вертикальными линиями выделена промежуточная временная область  $3 < t < 7$  мин

Различие кривых в переходной области  $3 < t < 7$  мин связано с тем, что в эту область вносят вклад как производная  $[\text{LexA}]'$ , так и  $[\text{LexA}]$ , причем их относительный вклад зависит от  $\tau_l$ .

Сравним временные зависимости  $[\text{RecA}^*](t)$ , обсужденные выше, с известными процессами [1, 2], которые протекают сразу после повреждения ДНК. Так называемые «обратимые» повреждения и повреждения, которые репарируются после удаления одного основания, по-видимому, не приводят к увеличению концентрации активированного белка  $\text{RecA}^*$ . Мы предполагаем, что увеличение концентрации начинается с появления пробелов в 12–13 нуклеотидов однонитевой ДНК. Таким образом, узкий пик во временной области  $0 < t < 3$  может быть связан с этим типом однонитевых пробелов ДНК. Репарация таких повреждений приведет к уменьшению их числа, т. е. к понижению концентрации  $[\text{RecA}^*]$ . Дальнейшее появление однонитевых пробелов длиной в сотни нуклеотидов может быть связано с возникновением широкого пика в концентрации  $[\text{RecA}^*]$  при  $t > 7$  мин.

Однако возможно и другое, в рамках математической модели (1)–(3) более логичное, объяснение. Подобие кривых 1–3, отмеченное выше, позволяет предположить, что реальная зависимость  $[\text{RecA}^*](t)$  похожа на кривую 1 (рис. 1, б), т. е. эта зависимость является возрастающей во временной области  $0 < t < 15$ –20. (Для выяснения значимо-

Анализируя основные особенности временной зависимости  $[\text{RecA}^*](t)$ , можно отметить, что  $[\text{RecA}^*](t)$  представляет собой суперпозицию двух пиков. Амплитуда узкого пика (при  $t < 3$ ) немного увеличивается, а широкого пика (при временах  $t > 7$  мин) быстро растет с увеличением обратного времени жизни (см. рис. 1, б). Заметим, что, умножая на константу, во временной области  $0 < t < 3$  можно добиться приблизительного подобия кривых 1–3 на рис. 1, б. На рис. 2 показаны две кривые 1 и 3. Умножая кривую 1 на коэффициент 6,3 (во временной области  $0 < t < 3$ ), получаем кривую, подобную кривой 1. Далее, уменьшая ординату в 9,5 раза, получаем приблизительное совпадение этих двух кривых (исключая временную область  $3 < t < 7$ ). Подобие кривых является результатом того, что во временной области  $0 < t < 3$  форма кривых 1–3 определяется производной  $[\text{LexA}]'$ , а в области

сти структуры, проявляющейся в переходной временной области  $\sim 5$  мин, необходимы дополнительные точные экспериментальные измерения  $[\text{LexA}](t)$  именно в этой временной области.) Таким образом, амплитуду пика в области  $0 < t < 3$  мин необходимо уменьшить в несколько раз. Это означает, что эффективность расщепления белка LexA активированным белком RecA\* во столько же раз выше на начальной стадии образования RecA-филамента, чем в более позднее время. Этот эффект можно объяснить меньшим радиусом RecA-филамента в начале его образования и/или меньшим количеством дополнительных белков, которые входят в состав RecA-филамента и могут уменьшить взаимодействие белка LexA с RecA-филаментом. Это предположение согласуется с тем экспериментальным наблюдением, что эффективность расщепления белка LexA RecA-филаментом действительно может уменьшиться на порядок при переходе от процессов репарации одонитевых повреждений к процессам репарации двунитевых повреждений ДНК [1]. Так как эффективность расщепления должна быть плавной функцией времени, а не ступенчатой (с перепадом высот 6,3:1, как это использовано в расчетах, представленных на рис. 2), то не будет и разрыва функции при  $t = 3$ .

На рис. 3 приведены рассчитанные временные зависимости концентрации одонитевой ДНК,  $[\text{ssDNA}](t)$ , и нормированной концентрации белка  $[\text{RecA}](t)$ . Расчеты проведены как с использованием кривой 1 (рис. 3, а), так и кривой 3 (рис. 3, б). Мы предполагаем, что эти две предельные кривые охватывают почти все возможные варианты математической модели (1)–(3). Кроме того, на рис. 3 показаны результаты измерений активности гена, кодирующего гибридный белок, RecA- $\beta$ -галактозидазу [12]. Эти экспериментальные данные качественно отражают временную динамику уровней концентрации  $[\text{RecA}]$ .

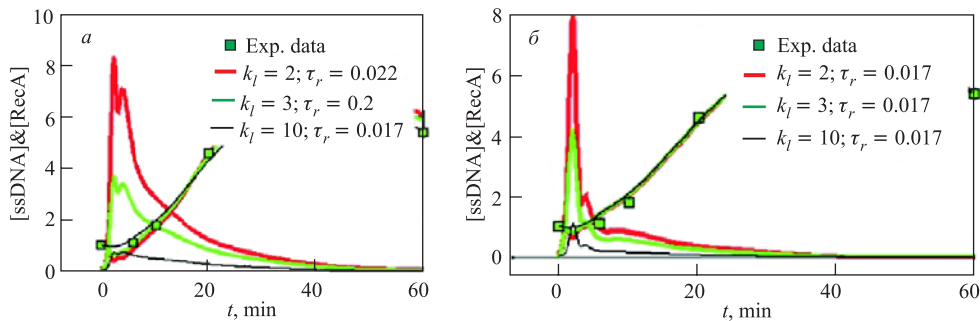


Рис. 3. Временные зависимости концентрации одонитевой ДНК,  $[\text{ssDNA}](t)$ , (а) и нормированной концентрации белка  $[\text{RecA}](t)$  (б). а) Расчеты проведены с использованием кривой 1, при различных численных значениях параметров математической модели. б) То же, что на рис. 3, а, но с использованием кривой 3. Результаты расчетов  $[\text{ssDNA}](t)$  показаны в относительных единицах. Экспериментальные данные из работы [12] показаны квадратами

Как видно из рис. 3, меняя значение параметра  $k_l$ , можно моделировать эффекты, связанные с величиной дозы облучения (для конкретного значения  $k_l$  параметр  $\tau_r$  выбирался из условия наилучшей подгонки  $[\text{RecA}](t)$  к экспериментальным данным). Уменьшение  $k_l$  приводит к увеличению концентрации  $[\text{ssDNA}]$  и понижению уровня относительной концентрации  $[\text{RecA}]$  ниже конститутивного единичного значения (во временной области  $0 < t < 5-7$ ). Последний эффект объясняется тем, что число молекул белка RecA

(несколько тысяч на клетку [1, 6]) уменьшается из-за связывания с одонитевой ДНК. В дальнейшем, в результате работы SOS-системы, этот уровень не только восстанавливается, но и значительно возрастает. Отметим здесь, что в настоящей работе проанализированы экспериментальные данные для дозы  $5 \text{ Дж/м}^2$  [9], которую для бактерии *E. coli* можно считать малой. Для получения более надежных результатов при высоких дозах облучения необходимо анализировать экспериментальные данные для доз  $30\text{--}50 \text{ Дж/м}^2$ . В этом случае математическую модель (1)–(3) необходимо модифицировать.

Структура при  $t \sim 5$  мин появляется в результате особенностей временной зависимости  $[\text{LexA}](t)$ . Для исследования значимости этой структуры необходимы более точные экспериментальные измерения  $[\text{LexA}](t)$  в этой временной области. Во временном интервале  $4 < t < 7$  происходит репарация определенного типа одонитевых повреждений, по-видимому, это репарация пробелов в 12–13 нуклеотидов ДНК. В последующие 10–13 мин происходит дальнейшая репарация, но репарация другого типа одонитевых повреждений. Это могут быть повреждения длиной в сотни нуклеотидов. Далее из части оставшихся не репарированными одонитевых повреждений ДНК индуцируются двунитевые повреждения ДНК, которые репарируются во время второго периода работы SOS-системы, т. е. при  $t > 30$  мин. Отметим, что концентрация двунитевых повреждений ДНК в  $\sim 20$  раз ниже концентрации одонитевых повреждений ДНК при прямых повреждениях ДНК рентгеновским облучением [1].

На рис. 4 показаны решения математической модели (1)–(3). Математическая модель (1)–(3) удовлетворительно описывает экспериментальные данные во временной области

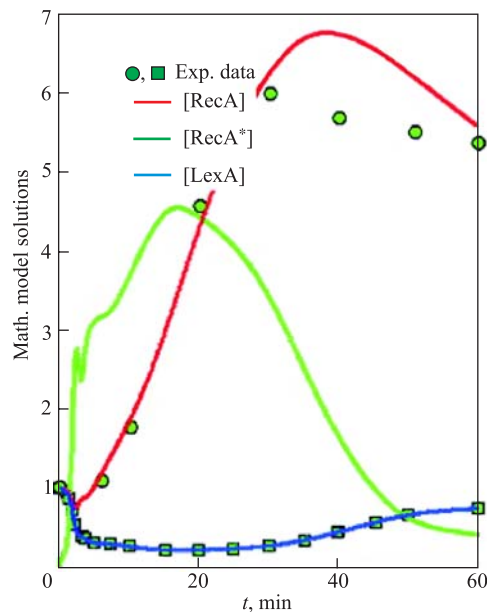


Рис. 4. Решения математической модели (1)–(3). Экспериментальные данные для  $[\text{LexA}]$  взяты из работы [9], а для  $[\text{RecA}]$  из [12]. Значения  $[\text{RecA}^*]$  увеличены в 10 раз для наглядности. Расчет проведен для следующих численных значений параметров модели:  $\tau_l = 0,1 \text{ мин}^{-1}$ ;  $b_l = 0,25$ ;  $k_l = 5 \text{ мин}^{-1}$ ;  $\tau_r = 0,018 \text{ мин}^{-1}$ ;  $b_r = 0,0105$ ;  $k_r = 1 \text{ мин}^{-1}$ ;  $\theta = 5 \text{ мин}^{-1}$

$0 < t < 30$ , т.е. во время первого периода работы SOS-системы. Различие между экспериментальными данными и расчетом при  $t > 30$  мин связано с тем, что, во-первых, в работе [12] измерена не относительная концентрация [RecA], а активность гена, кодирующего гибридный белок RecA- $\beta$ -галактозидазу. Во-вторых, математическая модель (1)–(3) не учитывает процессы, происходящие во время второго периода работы SOS-системы ( $t > 30$  мин). Более того, модель (1)–(3) явно не учитывает процессы репарации даже во время первого периода работы SOS-системы. Эти процессы учтены неявно, во временной зависимости индуцирующего SOS-сигнала. В целом, математическая модель (1)–(3) является наиболее простой моделью, которая описывает основные процессы, происходящие в первый период работы SOS-системы.

Проведенный выше анализ экспериментальных данных указывает на важность введения нового параметра в математическую модель — эффективности расщепления белка LexA RecA-филаментом. Временную зависимость этого параметра можно рассчитать на основе анализа дополнительных экспериментальных данных, например, данных для концентрации белка RecA (или суммарной концентрации белков RecA и RecA\*), но уже в рамках модифицированной математической модели. Концентрацию белка RecA можно, по-видимому, экспериментально определить методом [13]. Кроме того, представляет интерес анализ дозовых зависимостей всех переменных математической модели (1)–(3).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе предложен метод решения, который позволяет модельно-обусловленным образом рассчитать одну из важных переменных в математической модели — концентрацию однонитевой ДНК (рис. 3), которая не поддается прямому экспериментальному измерению.

Автор выражает благодарность проф. Е. А. Красавину за помощь и обсуждение результатов работы. Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проект № 07- 04-00390).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kuzminov A. Recombinational Repair of DNA Damage in Escherichia coli and Bacteriophage  $\lambda$*  // *Micr. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63, No. 4. P. 751–813.
2. *Красавин Е. А. Проблема ОБЭ и репарация ДНК. М.: Энергоатомиздат, 1989.*
3. *Lindahl T., Wood R. D. Quality Control by DNA Repair* // *Science.* 1999. V. 28, No. 286. P. 1897–1905.
4. *Аксенов С. В. Математическое моделирование генетической регуляторной системы SOS-ответа у бактерий Escherichia coli. Дис. . . канд. физ.-мат. наук. Дубна: ОИЯИ, 1999;*  
*Aksenov S. V. Dynamics of the Inducing Signal for the SOS Regulatory System in Escherichia coli after Ultraviolet Irradiation* // *Math. Biosci.* 1999. V. 157, No. 15.
5. *Gardner T. S. et al. Inferring Genetic Networks and Identifying Compound Mode of Action via Expression Profiling* // *Science.* 2003. V. 301, No. 1. P. 269–286.

6. Friedman N. et al. Precise Temporal Modulation in the Response of the SOS DNA Repair Network in Individual Bacteria // PLoS. Biol. 2005. V. 3, No. 7. P. 1261–1268.
7. Michel B. After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us // Ibid. P. 1174–1176.
8. Courcelle J. et al. Comparative Gene Expression Profiles Following UV Exposure in Wild-Type and SOS-Deficient *Escherichia coli* // Genetics. 2001. V. 158. P. 41–64.
9. Sassanfar M., Roberts J. Constitutive and UV-Mediated Activation of RecA Protein: Combined Effects of recA441 and recF143 Mutations and of Addition of Nucleosides and Adenine // J. Bact. 1991. V. 173. P. 5869–5875.
10. Kidane D., Graumann P. L. Dynamic Formation of RecA Filaments at DNA Double Strand Break Repair Centers in Live Cells // J. Cell Biol. 2005. V. 170, No. 3. P. 357–366.
11. Рубин А. Б. Лекции по биофизике. М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 1998. 167 с.
12. Weisemann J. M., Funk C., Weinstock G. M. Measurement of *in vivo* Expression of the *recA* Gene of *Escherichia coli* by Using *lacZ* Gene Fusions // J. Bacteriol. 1984. V. 160. P. 112–121.
13. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Application // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Получено 24 ноября 2006 г.