

## ДИНАМИКА SOS-ОТВЕТА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОМ ОБЛУЧЕНИИ

О. В. Белов, Е. А. Красавин, А. Ю. Пархоменко

Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

Разработана математическая модель индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении. Описана динамика концентраций индуцибельных белковых комплексов, синтезирующихся в ходе SOS-ответа *E. coli*. Исследован процесс индукции мутаций при реализации translesion-синтеза. Решения модели основаны на экспериментальных данных, касающихся экспрессии основных генов SOS-системы бактерий *E. coli*.

The mathematical model of induced mutational process in bacterial cells *Escherichia coli* under ultraviolet irradiation is developed. Concentration dynamics of the inducible protein complexes synthesizing during SOS-response in *E. coli* is described. The process of mutations induction during the translesion-synthesis is investigated. The solutions of model are based on experimental data which describe the expression of main genes of SOS-system in *E. coli*.

PACS: 87.71.Aa

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы достигнуты значительные успехи в изучении молекулярных механизмов возникновения генных мутаций у бактерий, индуцируемых факторами физической и химической природы. Установлено, что ключевую роль в этом процессе в бактериальных клетках *Escherichia coli* играют гены SOS-системы, контролирующие синтез ДНК по матрице с поврежденными основаниями (translesion synthesis — TLS) [1]. Показано, что этот механизм реализуется не только у прокариот, но и в клетках млекопитающих и человека [2, 3]. Изучение кинетики формирования и деградации генных продуктов системы SOS-ответа позволяет построить математическую модель, описывающую индуцированный мутационный процесс у клеток *E. coli* при воздействии ультрафиолетового излучения.

Как известно, SOS-регулон клеток *E. coli* включает в себя более 40 индуцибельных генов. Ключевыми в ходе SOS-ответа клеток являются гены *recA*, *lexA*, *umuD*, *umuC*. Сигнал к запуску SOS-системы — появление односторонних пробелов ДНК. Белок RecA, являющийся продуктом гена *recA*, связываясь с участками односторонней ДНК, образует спиральные многомерные нуклеопротеиновые филаменты и активируется, приобретая протеазную конформацию (активная форма — RecA\*) и способность расщеплять репрессор LexA и другие белки. Известно, что каждый ген SOS-системы репрессируется транскрипционным фактором LexA. Белок LexA, запирая промоторы индуцибельных оперонов, поддерживает синтез кодируемых ими белков на низком уровне. LexA-протеин

является продуктом гена *lexA*. Сокращение пула инактивных молекул LexA в результате расщепления RecA-протеазой приводит к дерепрессии индуцибельных генов SOS-системы, включая *umuD*-, *umuC*-гены. RecA-протеаза играет важную роль в реализации следующего этапа SOS-ответа, на котором происходит расщепление белка UmuD и переход его в активную форму UmuD'. В свою очередь, UmuD, активная форма UmuD' и UmuC белок способны взаимодействовать между собой с образованием трех комплексов: UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C и UmuD'<sub>2</sub>C. UmuD<sub>2</sub>C-комплекс, включаясь в регуляцию клеточного цикла, останавливает репликативный синтез ДНК при наличии SOS-индуцирующих повреждений и позволяет осуществить процесс TLS. Комплекс UmuDD'C играет ингибирующую роль в SOS-мутагенезе, секвестрируя активность UmuD' [4]. Комплекс UmuD'<sub>2</sub>C (ДНК-полимераза V) имеет способность присоединяться к комплексу ДНК-полимераза III-RecA-SSB, снижая его корректорские функции. Измененный репликационный комплекс продолжает синтез дочерней цепи ДНК на поврежденной матрице, подставляя на месте повреждений нуклеотиды случайным образом. Репликация при этом проходит до конца, но дочерняя цепь ДНК имеет дефекты в местах, находящихся напротив повреждений в материнской цепи.

Важную роль в регуляции TLS играют белки, осуществляющие деградацию субъединиц комплексов UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C и UmuD'<sub>2</sub>C. Так, деградация UmuD осуществляется Lon-протеазой [5]. Взаимодействие RecA-протеазы с белком UmuD приводит к переходу UmuD в более стабильную форму — UmuD', которая не чувствительна к воздействию Lon-протеазы. Высокая стабильность белка является базовым фактором, позволяющим осуществить процесс медленной SOS-репарации. Известно, что в ходе SOS-ответа возникают мутации, следовательно, должен быть механизм, осуществляющий деградацию UmuD'-субъединицы при сокращении количества повреждений. Таким механизмом является расщепление UmuD' посредством ClpXP сериновой протеазы. Деградация мутагенной активности UmuD' субъединицы и снижение активности ДНК-полимеразы V позволяет клетке вернуться в стационарное состояние и репарировать повреждения безошибочными путями репарации. Было показано [6], что в комплексе UmuD'<sub>2</sub>C белок UmuD' может замещаться при определенных условиях на UmuD. Реализуемый обмен субъединицами между UmuD'<sub>2</sub>C и UmuD обеспечивает клетке биологически важный способ выключения ошибочного пути репарации в процессе реализации механизма TLS и, следовательно, снижает вероятность возникновения мутаций в неповрежденной цепи в ходе SOS-ответа.

В настоящее время накапливаются экспериментальные материалы, которые дают конкретную информацию о кинетике образования основных генных продуктов, таких как RecA, LexA, UmuD, UmuC, UmuD', Lon-протеазы, ClpXP-протеазы, влияющих на формирование трех ключевых белковых комплексов SOS-системы, отвечающих за мутационный процесс клеток *E. coli*. Это позволяет формализовать процесс с учетом математических подходов, основанных на результатах экспериментов. В рамках настоящего исследования разработана динамическая модель, описывающая кинетику формирования трех основных комплексов SOS-системы после ультрафиолетового облучения: UmuD'<sub>2</sub>C, UmuDD'C, UmuD<sub>2</sub>C. На основании полученных результатов исследована динамика формирования мутаций в процессе TLS.

Попытки математического моделирования механизмов различных этапов репарационного процесса предпринимались в ряде работ [7–9]. Основные модельные подходы, используемые в настоящем исследовании, изложены в работах [10–12]. Создание много-

численных математических моделей генетической регуляции и репарационного процесса бактериальных клеток обусловлено необходимостью изучения структурно-функциональной организации генетического аппарата и биохимических механизмов, контролирующих мутационный процесс.

## 1. МОДЕЛЬ ДИНАМИКИ *lexA-recA*-СИСТЕМЫ

Уравнения математической модели, описывающей динамику концентрации однострессовой ДНК, имеют следующий вид [10]:

$$\begin{aligned} \text{для } t < t_2 \quad X_0(t, D) &= \frac{50l_1D}{N_A T_0} e^{-v_2 t} \int_0^t \frac{e^{v_2 \xi} d\xi}{\frac{25Dt_1}{T_0} + e^{v_1 \xi}}, \\ \text{для } t \geq t_2 \quad X_0(t, D) &= \frac{50l_1D}{N_A T_0} e^{-v_2 t} \int_0^{t_2} \frac{e^{v_2 \xi} d\xi}{\frac{25Dt_1}{T_0} + e^{v_1 \xi}}, \end{aligned} \quad (1)$$

$$t_2 = \frac{1}{v_1} \ln \left( e^{v_1 T_0} \left( 1 + \frac{25t_1 D}{T_0} \right) - \frac{25t_1 D}{T_0} \right).$$

Здесь  $X_0$  — внутриклеточная концентрация индуцирующего сигнала;  $l_1 = 900$  нуклеотидов — средняя длина однострессового пробела ДНК, образующегося в ходе репликации участков, содержащих тиминовые димеры;  $T_0 = 40$  мин — длительность репликации в нормальных условиях роста;  $v_1 = 0,7$  мин<sup>-1</sup> — константа скорости удаления димеров эксцизионной репарацией;  $N_A$  — постоянная Авогадро,  $t_1 = 0,17$  мин<sup>-1</sup> — время задержки нормального репликативного комплекса на димере;  $t_2$  — время окончания репликации;  $v_2$  — константа скорости репарации пробелов. Параметр  $D$  (доза УФ-облучения) является безразмерным, нормированным на 1 Дж/м<sup>2</sup> и принимает значение, равное численному значению задаваемой дозы.

Уравнения модели динамики *lexA-recA*-системы имеют вид [10]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial X_1}{\partial t \partial D} &= \frac{\alpha_1 X_{10} \left( 1 + (X_{10}/\gamma_1)^{h_1} \right)}{1 + (X_1/\gamma_1)^{h_1}} - \beta_1 X_1 X_3 - \alpha_1 X_1, \\ \frac{\partial X_2}{\partial t \partial D} &= \frac{\alpha_2 X_{20} \left( 1 + (X_{10}/\gamma_2)^{h_2} \right)}{1 + (X_1/\gamma_2)^{h_2}} + \delta_3 X_3 - \beta_2 X_2 X_0 - \alpha_2 X_2, \\ \frac{\partial X_3}{\partial t \partial D} &= \beta_2 X_2 X_0 - \beta_3 X_4 X_3 - \delta_3 X_3. \end{aligned} \quad (2)$$

Начальные условия для уравнений (2) следующие:  $X_1(0, D) = X_{10}$ ,  $X_2(0, D) = X_{20}$ ,  $X_3(0, D) = 0$ .

Здесь  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$  — внутриклеточные концентрации регуляторных белков LexA, RecA, RecA\*, UmuD.

Первые члены в первых двух уравнениях (2) описывают процессы синтеза продуктов генов *lexA* и *recA* соответственно. Скорость убывания концентрации белка LexA определяется протеолитическим расщеплением белка LexA продуктом гена *recA* в активированной форме (член  $\beta_1 X_1 X_3$ ) и разбавлением в экспоненциально растущей культуре (член  $\alpha_1 X_1$ ). Прирост концентрации продукта гена *recA* определяется не только процессом синтеза белка, но и переходом активированной формы продукта гена *recA* в нормальную форму (член  $\delta_3 X_3$ ). Убывание концентрации белка RecA обусловлено переходом продукта гена *recA* из нормальной формы в активированную при взаимодействии с индуцирующим сигналом (член  $\beta_2 X_2 X_0$ ), а также разбавлением в экспоненциально растущей культуре (член  $\alpha_2 X_2$ ). Члены  $\beta_2 X_2 X_0$  и  $\delta_3 X_3$ , входящие в уравнения (2) с противоположными знаками, описывают, соответственно, прирост и убыль концентрации активированной формы продукта гена *recA* (белка RecA\*).

В настоящей работе в уравнение, описывающее динамику активированного продукта гена *recA*, введен дополнительный член  $\beta_3 X_4 X_3$ , который существенно влияет на скорость убыли белка RecA\*. Член  $\beta_3 X_4 X_3$  описывает процесс взаимодействия белков RecA\* и UmuD, приводящий к переходу продукта гена *umuD* из нормальной формы в активированную форму UmuD'.

Определим параметры системы уравнений (2).  $X_{10}$ ,  $X_{20}$ ,  $X_{40}$  — конститутивные концентрации белков LexA, RecA, UmuD соответственно. Значения параметров  $X_{10}$ ,  $X_{20}$ ,  $X_{40}$  могут быть определены следующим образом. Из экспериментальной литературы известен начальный уровень белков LexA (1300 молекул на клетку [13]) и RecA (1000 молекул на клетку [14]). Отсюда:  $X_{10} = \frac{1300}{N_A} = 2,2 \cdot 10^{-21}$  моль,  $X_{20} = \frac{1000}{N_A} = 1,66 \cdot 10^{-21}$  моль, где  $N_A = 6,02 \cdot 10^{23}$  моль<sup>-1</sup>. Конститутивная концентрация продукта гена *umuD* ( $X_{40}$ ) клеток бактерий *E. coli* была измерена в работе [15]. Для клеток дикого типа значение начальной концентрации оказалось равным  $X_{40} = 2,99 \cdot 10^{-22}$  моль.

Параметры  $\alpha_1 = \alpha_2 = 0,011$  мин<sup>-1</sup> — константы скорости в процессах неспецифических потерь продуктов генов *lexA* и *recA* соответственно.

Параметры  $\gamma_1 = 2,0 \cdot 10^{-23}$  моль и  $\gamma_2 = 2,0 \cdot 10^{-24}$  моль являются равновесными константами диссоциации продукта гена *lexA* при связывании с операторной ДНК генов *lexA*, *recA* соответственно.

Параметры  $h_1$ ,  $h_2$  есть коэффициенты Хилла, характеризующие меру кооперативности в реакциях связывания продукта гена *lexA* с операторами генов *lexA* и *recA* соответственно. Значение параметра  $h_2 = 2$  определено в [10]. Численное значение коэффициента  $h_1 = 1$  найдено на основе результатов исследований, свидетельствующих об отсутствии кооперативности связывания продукта гена *lexA* с оператором гена *lexA* [16].

Численное значение параметра  $\beta_1$ , представляющего собой константу скорости в реакции расщепления репрессора LexA белком RecA\*, в экспериментальной литературе отсутствует.  $\beta_1$  является свободным параметром модели. Его значение  $\beta_1 = 1,44 \times 10^{20}$  моль<sup>-1</sup> · мин<sup>-1</sup> получено из наилучшего соответствия решений модели экспериментальным данным. Константа скорости реакции связывания продукта гена *recA* с однонитевой ДНК  $\beta_2 = 3,7 \cdot 10^{20}$  моль<sup>-1</sup> · мин<sup>-1</sup> была определена в [10]. Константа скорости реакции  $\beta_3$ , характеризующая процесс перехода продукта гена *umuD* из неактивной (UmuD) в активированную форму (UmuD'), может быть рассчитана следующим образом. Поскольку процесс перехода имеет первый порядок по концентрациям, он описывается

следующим дифференциальным уравнением:

$$\frac{\partial X_4}{\partial t} = -\beta_3 X_4 X_3. \quad (3)$$

Полагая концентрацию активированного продукта гена *recA* ( $X_3$ ) постоянной, получим решение этого уравнения в виде

$$X_4(t) = X_4(0) e^{-\beta_3 X_3 t}.$$

Из экспериментальных данных известно значение времени полураспада  $t_{1/2(\text{UmuD})}$  продукта гена *umuD*. За это время концентрация UmuD-белка уменьшается ровно в два раза, поэтому, выражая  $\beta_3$  через  $t_{1/2(\text{UmuD})}$ , получим

$$\beta_3 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD})} X_3}.$$

Время полураспада продукта гена *umuD* в реакции *in vivo* расщепления активированной формой продукта гена *recA* (RecA-протеазой) было измерено в [17]:  $t_{1/2(\text{UmuD})} = 30$  мин. Воспользуемся предположением, изложенным в [18], о том, что почти сразу же после индуцирующего воздействия почти весь продукт гена *recA* находится в активированной форме. Получим следующую оценку:

$$\beta_3 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD})} X_{20}} = 1,93 \cdot 10^{18} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

Константа  $\delta_3$ , характеризующая процесс неспецифической деградации белка RecA\*, может быть определена следующим образом. Поскольку процесс деградации имеет первый порядок по концентрациям, он описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{\partial X_3}{\partial t} = -\delta_3 X_3.$$

Решением этого уравнения является экспоненциальная функция:

$$X_3(t) = X_3(0) e^{-\delta_3 t}.$$

Экспериментально установлено значение времени полураспада белка RecA\*  $t_{1/2(\text{RecA}^*)} = 2,95$  мин [19]. Выражая  $\delta_3$  через  $t_{1/2(\text{RecA}^*)}$ , получим

$$\delta_3 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{RecA}^*)}} = 0,235 \text{ мин}^{-1}.$$

Из [10] следует, что скорость репарации однонитевых пробелов ДНК по рекомбинационному механизму  $v_2$  может быть принята равной скорости уменьшения концентрации продукта гена *recA*, связанного с однонитевой ДНК (т.е. скорости уменьшения концентрации белка RecA\*). Получим  $v_2 = \delta_3 = 0,235 \text{ мин}^{-1}$ .

## 2. ДИНАМИКА ПРОДУКТОВ ГЕНОВ *umuD*, *umuC*

Динамика взаимодействия продуктов генов *umuD* и *umuC* между собой, с операторами этих генов и с индуцирующим сигналом в рамках развиваемого модельного подхода описывается следующими дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{\partial X_4}{\partial t \partial D} &= \frac{X_{40} (\varepsilon X_{40} + \delta_4) (1 + (X_{10}/\gamma_4)^{h_4})}{1 + (X_1/\gamma_4)^{h_4}} - \beta_3 X_4 X_3 - \varepsilon X_4^2 - \delta_4 X_4, \\ \frac{\partial X_5}{\partial t \partial D} &= \frac{X_{50} (a_1 X_{70} + \delta_5) (1 + (X_{10}/\gamma_5)^{h_5})}{1 + (X_1/\gamma_5)^{h_5}} - a_1 X_7 X_5 - a_2 X_8 X_5 - a_3 X_9 X_5 - \delta_5 X_5, \\ \frac{\partial X_6}{\partial t \partial D} &= \beta_3 X_4 X_3 + \phi X_8 X_4 - \eta X_6^2 - \delta_6 X_6.\end{aligned}\tag{4}$$

Для уравнений (4) справедливы следующие начальные условия:  $X_4(0, D) = X_{40}$ ,  $X_5(0, D) = X_{50}$ ,  $X_6(0, D) = 0$ .

Здесь  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$  — внутриклеточные концентрации регуляторных белков UmuC, UmuD', UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub>, UmuDD' соответственно. Прирост концентрации белка UmuD определяется лишь процессом его синтеза, который характеризуется первым членом уравнения. Убыль концентрации продукта гена *umuD* определяется тремя процессами: переходом белка UmuD в активную форму UmuD' посредством расщепления RecA-протеазой (член  $\beta_3 X_4 X_3$ ), образованием димера UmuD<sub>2</sub> при соединении двух молекул UmuD протеина (член  $\varepsilon X_4^2$ ) и естественной деградацией продукта гена *umuD* при участии Lon-протеазы (член  $\delta_4 X_4$ ). Прирост концентрации белка UmuC характеризуется одним процессом — синтезом белка UmuC. Убыль концентрации UmuC определяется четырьмя процессами: образованием комплексов UmuD<sub>2</sub>C, UmuD'<sub>2</sub>C и UmuDD'C при взаимодействии белка UmuC с димерами UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub> и UmuDD' соответственно (члены  $a_1 X_7 X_5$ ,  $a_2 X_8 X_5$ ,  $a_3 X_9 X_5$ ), а также естественной деградацией продукта гена *umuC* посредством взаимодействия с молекулами Lon-протеазы (член  $\delta_5 X_5$ ). Прирост концентрации активной формы UmuD' происходит при взаимодействии нормального продукта гена *umuD* с RecA-протеазой (член  $\beta_3 X_4 X_3$ ). Образование гетеродимера UmuDD' также вносит существенный вклад в скорость увеличения концентрации UmuD', поскольку при этом происходит отщепление одной субъединицы UmuD' от гомодимера UmuD'<sub>2</sub> (член  $\phi X_8 X_4$ ). Убыль концентрации UmuD' связана, во-первых, с образованием димера UmuD'<sub>2</sub>, во-вторых, с естественной деградацией UmuD' при взаимодействии с молекулами ClpXP-протеазы (члены  $\eta X_6^2$  и  $\delta_6 X_6$  соответственно).

Найдем параметры уравнений (4). По различным оценкам, приведенным в литературе, величина конститутивного уровня белка UmuC ( $X_{50}$ ) низка и составляет в среднем  $2,49 \cdot 10^{-23}$  моль [20]. Равновесные константы диссоциации  $\gamma_4 = 5,5 \cdot 10^{-22}$  моль и  $\gamma_5 = 2,0 \cdot 10^{-25}$  моль продукта гена *lexA* при связывании с операторной ДНК генов *umuD*, *umuC* были вычислены с использованием модели репрессии транскрипции белком LexA, описанной в [10]. Коэффициенты Хилла  $h_4$ ,  $h_5$ , характеризующие меру кооперативности в реакциях связывания продукта гена *lexA* с операторами генов *umuD* и *umuC*, соответственно, определены на основании следующего подхода. Анализ экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что связывание продукта гена *lexA* с

операторными последовательностями некоторых репрессируемых генов обладает чертами кооперативности [21, 22]. Известно также, что продукт гена *lexA* существует в растворе в виде мономера [23], но связывается с ДНК как димер [10]. Кроме того, известно, что операторные последовательности, связывающие продукт гена *lexA*, имеют осевую симметрию, и каждая из симметричных половин оператора связывает один мономер белка [24]. Поскольку существует одно место связывания продукта гена *lexA* с операторами генов *umuD* [24] и *umuC* [25], а связывание двух молекул продукта гена *lexA* с двумя половинками места связывания в операторе каждого гена является абсолютно кооперативным, то кооперативность возникает в результате взаимодействия молекул продукта гена *lexA*, связывающихся с двумя соседними местами связывания оператора. Согласно модели репрессии транскрипции белком LexA в случае абсолютной кооперативности связывания коэффициенты Хилла равны максимальному числу молекул продукта гена *lexA*, способных связаться с оператором гена [10]. В нашем случае максимальное число молекул белка LexA, способных связаться с оператором каждого из генов, равно двум (две молекулы белка LexA на единственное место связывания). Следовательно,  $h_4 = 2$  и  $h_5 = 2$ .

Константы  $\delta_4$ ,  $\delta_5$ ,  $\delta_6$ , характеризующие процессы неспецифической деградации белков UmuD, UmuC, UmuD', могут быть определены аналогично  $\delta_3$  с использованием выражения (3). Используя значения времен полураспада  $t_{1/2(\text{UmuD})} = 30$  мин,  $t_{1/2(\text{UmuC})} = 20$  мин,  $t_{1/2(\text{UmuD}')} = 40$  мин, найденные в [17, 26, 27], получим  $\delta_4 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD})}} = 0,023 \text{ мин}^{-1}$ ,  $\delta_5 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuC})}} = 0,035 \text{ мин}^{-1}$ ,  $\delta_6 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD}')}} = 0,017 \text{ мин}^{-1}$ .

Константы скорости  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$  в процессах взаимодействия продукта гена *umuC* с димерами UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub> и UmuDD' соответственно определяются по аналогии с (3) следующим способом:

$$X_7(t) = X_7(0) e^{-a_1 X_5 t}, \quad X_8(t) = X_8(0) e^{-a_2 X_5 t}, \quad X_9(t) = X_9(0) e^{-a_3 X_5 t}.$$

На основании анализа экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что период полураспада продуктов гена *umuD* (в активированной и неактивированной формах) возрастает в среднем в 1,5 раза при димеризации белков [26, 17]. С учетом времен полураспада белков UmuD и UmuD', составляющих 30 мин [17] и 40 мин [26] соответственно, значения времен полураспада гомодимеров UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub> будут 45 и 60 мин. Димер UmuDD' *in vivo* более стабилен, чем UmuD'<sub>2</sub>. Время полураспада UmuDD' составляет 65 мин [26, 17]. Повышенная стабильность гетеродимера проявляется в процессах последовательной деградации мутагенной активности ДНК-полимеразы V (UmuD'<sub>2</sub>C) на этапе обмена субъединиц, когда происходит переход гомодимера UmuD'<sub>2</sub> в гетеродимер UmuDD'. На основе изложенных фактов получим следующие выражения для констант скорости  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ :

$$a_1 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD}_2)} X_{50}} = 6,18 \cdot 10^{20} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1},$$

$$a_2 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD}'_2)} X_{50}} = 4,64 \cdot 10^{20} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1},$$

$$a_3 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuDD}')} X_{50}} = 4,28 \cdot 10^{20} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

Аналогичным образом можно получить выражение для константы реакции димеризации продукта гена *umuD*:

$$\varepsilon = \frac{\ln 2}{t_{1/2(\text{UmuD})} X_{40}} = 7,73 \cdot 10^{19} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

Для константы скорости  $\varphi$  реакции взаимодействия белка  $\text{UmuD}'_2$  с неактивным продуктом гена *umuD* можно получить аналогичные выражения. Используя данные экспериментов о времени полураспада  $t_{1/2(\text{UmuD}'_2)}$  гомодимера  $\text{UmuD}'_2$  и конститутивной концентрации  $\text{UmuD}$  белка  $X_{40}$ , указанные выше, определяем численное значение константы скорости:  $\varphi = 3,86 \cdot 10^{19} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ .

Определить численное значение константы  $\eta$  реакции димеризации активной формы продукта гена *umuD* ( $\text{UmuD}'$  белка) из экспериментальных данных не представляется возможным. Таким образом,  $\eta$  является свободным параметром модели. Численное значение параметра  $\eta = 6,0 \cdot 10^{22} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$  определено из наилучшего соответствия полученных результатов экспериментальным данным.

### 3. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИЙ $\text{UmuD}_2$ , $\text{UmuD}'_2$ И $\text{UmuDD}'$

Процесс образования димеризованных продуктов гена *umuD* является промежуточным этапом синтеза основных регуляторных комплексов SOS-системы. Динамические процессы, связанные с белками  $\text{UmuD}_2$ ,  $\text{UmuD}'_2$ ,  $\text{UmuDD}'$ , описываются дифференциальными уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{\partial X_7}{\partial t \partial D} &= \varepsilon X_4^2 - \delta_7 X_7, \\ \frac{\partial X_8}{\partial t \partial D} &= \eta X_6^2 - \varphi X_8 X_4 - \delta_8 X_8, \\ \frac{\partial X_9}{\partial t \partial D} &= \mu X_6 X_4 + \varphi X_8 X_4 - \delta_9 X_9 \end{aligned} \quad (5)$$

с начальными условиями  $X_7(0, D) = X_{70}$ ,  $X_8(0, D) = 0$ ,  $X_9(0, D) = 0$ .

Увеличение концентрации димеров  $\text{UmuD}_2$  и  $\text{UmuD}'_2$  обусловлено взаимодействием молекул белков  $\text{UmuD}$  и  $\text{UmuD}'$  между собой (члены  $\varepsilon X_4^2$  и  $\eta X_6^2$  соответственно). Прирост концентрации димера  $\text{UmuDD}'$  характеризуется следующими процессами: во-первых, непосредственным взаимодействием молекул неактивного и активированного продуктов гена *umuD* (член  $\mu X_6 X_4$ ), во-вторых — процессом замены  $\text{UmuD}$ -субъединицы в димере  $\text{UmuD}'_2$  на молекулу активной формы продукта гена *umuD* (член  $\varphi X_8 X_4$ ). Убывание концентрации димеров  $\text{UmuD}_2$  и  $\text{UmuDD}'$  обуславливается неспецифической деградацией белков при участии молекул Lon-протеазы (член  $\delta_7 X_7$ ) и ClpXP-протеазы (член  $\delta_9 X_9$ ) соответственно. Уменьшение концентрации димера  $\text{UmuD}'_2$  вызвано двумя процессами. Первый процесс есть частичный переход гомодимера  $\text{UmuD}'_2$  в гетеродимер  $\text{UmuDD}'$  в результате замещения одной субъединицы белка  $\text{UmuD}'_2$  молекулами неактивного продукта гена *umuD* (член  $\varphi X_8 X_4$ ). Второй процесс представляет собой естественную убыль гомодимера при участии молекул ClpXP-протеазы (член  $\delta_8 X_8$ ).



Определим неизвестные параметры уравнений (5). Константы  $\delta_7$ ,  $\delta_8$ ,  $\delta_9$  в реакциях неспецифической деградации белков  $UmuD_2$ ,  $UmuD'_2$ ,  $UmuDD'$  соответственно определяются аналогично  $\delta_3$ . Используя найденные выше времена полураспада этих белков, получим

$$\delta_7 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}(UmuD_2)} = 0,015 \text{ мин}^{-1}, \quad \delta_8 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}(UmuD'_2)} = 0,012 \text{ мин}^{-1},$$

$$\delta_9 = \frac{\ln 2}{t_{1/2}(UmuDD')} = 0,011 \text{ мин}^{-1}.$$

Константа скорости  $\mu$  реакции взаимодействия димера  $UmuDD'$  с неактивной формой продукта гена *umuD* может быть рассчитана по аналогии с (3):

$$X_6(t) = X_6(0) e^{-\mu X_4 t}.$$

Из экспериментальных данных известно значение времени полураспада  $t_{1/2}(UmuD')$  активной формы продукта гена *umuD*. За это время концентрация белка  $UmuD'$  уменьшается ровно в два раза. Полагая концентрацию белка  $UmuD$  равной своему конститутивному уровню, т. е.  $X_4 = X_{40}$  и выражая  $\mu$  через  $t_{1/2}(UmuD')$ , получим

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_{1/2}(UmuD') X_{40}} = 5,8 \cdot 10^{-19} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

#### 4. ДИНАМИКА БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ $UmuD_2C$ , $UmuD'_2C$ И $UmuDD'C$

Динамика концентраций трех основных регуляторных комплексов SOS-системы, отвечающих за реализацию мутационного процесса и обеспечивающих клетке условия для осуществления длительной пострепликативной PolV-зависимой репарации, описывается следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{\partial X_{11}}{\partial t \partial D} &= a_1 X_7 X_5 - \delta_{11} X_{11}, \\ \frac{\partial X_{12}}{\partial t \partial D} &= a_2 X_8 X_5 - b_2 X_{12} X_4 - \delta_{12} X_{12}, \\ \frac{\partial X_{13}}{\partial t \partial D} &= a_3 X_9 X_5 + b_2 X_{12} X_4 - \delta_{13} X_{13}. \end{aligned} \quad (6)$$

Начальные условия для уравнений (6):  $X_{11}(0, D) = 0$ ,  $X_{12}(0, D) = 0$ ,  $X_{13}(0, D) = 0$ .

Прирост концентрации комплексов  $UmuD_2C$  и  $UmuD'_2C$  определяется процессами взаимодействия молекул гомодимеров  $UmuD_2$  и  $UmuD'_2$  с продуктом гена *umuC* (члены  $a_1 X_7 X_5$  и  $a_2 X_8 X_5$  соответственно). Увеличение концентрации белка  $UmuDD'C$  связано с двумя процессами: соединением гетеродимера  $UmuDD'$  с продуктом гена *umuC* (член  $a_3 X_9 X_5$ ) и обменом субъединиц ДНК-полимеразы V. Процессом обмена в этом случае является взаимодействие комплекса  $UmuD'_2C$  с неактивированным продуктом гена *umuD* (член  $b_2 X_{12} X_4$ ). Убыль концентрации всех трех комплексов осуществляется за счет их неспецифической деградации при участии молекул Lon-протеазы и ClpXP-протеазы

(члены  $\delta_{11}X_{11}$ ,  $\delta_{12}X_{12}$ ,  $\delta_{13}X_{13}$ ). В процесс убывания концентрации  $UmuD'_{2C}$  вносит существенный вклад обмен субъединиц ДНК-полимеразы V (член  $b_2X_{12}X_4$ ).

Параметры  $\delta_{11} = 0,022 \text{ мин}^{-1}$ ,  $\delta_{12} = 0,012 \text{ мин}^{-1}$ ,  $\delta_{13} = 0,015 \text{ мин}^{-1}$  определены по аналогии с  $\delta_3$  на основе данных о времени полураспада комплексов  $t_{1/2(UmuD_{2C})} = 31 \text{ мин}$ ,  $t_{1/2(UmuD'_{2C})} = 60 \text{ мин}$ ,  $t_{1/2(UmuDD'_{2C})} = 45 \text{ мин}$  [15, 27, 28].

Параметр  $b_2$  — константа скорости реакции взаимодействия белкового комплекса  $UmuD'_{2C}$  (PoIV) с неактивированной формой продукта гена *umuD*:

$$b_2 = \frac{\ln 2}{t_{1/2(UmuD'_{2C})} X_{40}} = 3,86 \cdot 10^{19} \text{ моль}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}.$$

Уравнения (1)–(6) справедливы в диапазоне доз  $0,5 < D < 100 \text{ Дж/м}^2$  [10].

## 5. МОДЕЛЬ ВОЗНИКНОВЕНИЯ МУТАЦИЙ

Рассмотрим уравнения модели, описывающие процесс возникновения мутаций. В работе [10] была предложена формула для расчета числа образовавшихся к моменту окончания репликации одонитевых пробелов:

$$N_1(t_2, D) = \frac{1}{v_1 t_1} \left[ v_1 t_2 + \ln \left( \frac{t_1 N_0(D) + T_0}{t_1 N_0(D) + T_0 e^{v_1 t_2}} \right) \right],$$

где  $N_0(D) = 25D$  — число димеров, образовавшихся в половине хромосомы.

Известно, что в состав каждой молекулы модифицированного репликационного комплекса входит по одной молекуле ДНК-полимеразы V (белка  $UmuD'_{2C}$ ) и что в заполнении каждого одонитевого участка участвует только одна молекула репликационного комплекса [29]. Анализ экспериментальной литературы показывает, что комплекс PoIV Mut способен осуществлять синтез дочерней цепи ДНК и по матрице, не содержащей повреждения [30]. Поскольку число молекул PoIV, синтезируемых при определенной дозе УФ-излучения, больше, чем число одонитевых пробелов, возникающих при той же дозе, предполагается, что во время работы SOS-системы комплекс PoIV Mut способен включаться в процесс синтеза неповрежденной цепи ДНК, замещая при этом нормальный репликационный комплекс.

При анализе вероятности возникновения мутаций при реализации TLS возникает необходимость моделирования случайной величины, представляющей собой число ошибок в цепи ДНК, возникших за фиксированное время при условии, что данные события происходят с некоторой фиксированной средней интенсивностью и независимо друг от друга. Поскольку число нуклеотидов  $n$ , пройденных модифицированным репликационным комплексом, велико (порядка нескольких тысяч), а вероятность возникновения мутации в каждом отдельном случае мала ( $p = 10^{-4} - 10^{-3}$  [30]), полагаем, что число возникших в цепи ДНК ошибок  $m$  распределено по закону Пуассона:

$$P_n(m) = \frac{a^m}{m!} e^{-a}.$$

Для расчета параметра  $a = np$  распределения Пуассона в среде C++ была разработана программа, определяющая параметр  $a$  на основе следующих входных данных: доза

УФ-облучения, время, в пределах которого необходимо провести расчеты, и файл, содержащий зависимость числа молекул ДНК-полимеразы V от времени для конкретной дозы УФ-облучения. При вычислении параметра  $a$  необходимой величиной является количество нуклеотидов, пройденных на данный момент времени комплексом PolV Mut. Известно, что процесс translesion-синтеза обладает различными характеристиками в зависимости от времени и последовательности ДНК, на которой он происходит. Рассмотрим отдельно процессы, реализуемые на тиминовых димерах, на одонитевых пробелах ДНК, исключая тиминовые димеры, и при синтезе на неповрежденной ДНК. Разработанная программа моделирует возникновение мутаций при движении модифицированного репликационного комплекса с учетом особенностей и характеристик всех трех процессов.

Реализация TLS на тиминовых димерах в алгоритме программы описывается циклом пошагового вычисления количества пройденных нуклеотидов по следующей формуле:

$$L_{td}(t, D) = X_{12}(t, D)v_{td} \left( t - t_{in} + \frac{l_1}{2v_{ss}(D)} \right), \quad (7)$$

где число молекул репликационного комплекса будет равно количеству синтезированных на данный момент молекул ДНК-полимеразы V  $X_{12}(t, D)$ . В формуле (7)  $v_{td}$  — скорость движения комплекса PolV Mut в момент прохождения тиминовых димеров;  $t_{in}$  — момент времени, когда была синтезирована последняя из  $X_{12}(t, D)$  молекул ДНК-полимеразы V.  $v_{ss}(D)$  — скорость движения модифицированного репликационного комплекса по ДНК в пределах одонитевого пробела, исключая тиминовые димеры. Было выявлено, что скорость комплекса PolV Mut в данном случае зависит от дозы УФ-облучения. Расчет переменной  $v_{ss}(D)$  проводится на основе данных о средней длине пробела  $l_1$  и времени окончания всего процесса TLS для конкретной дозы УФ-облучения. Время начала процесса на конкретном тиминовом димере полагается равным времени прохождения половины одонитевого пробела ДНК.

Translesion-синтез в пределах одонитевых пробелов, исключая тиминовые димеры, имеет отличные от предыдущего процесса характеристики и может быть описан путем реализации пошагового вычисления количества пройденных нуклеотидов на основе следующих формул:

$$\left[ \begin{cases} \left\{ \begin{array}{l} L_{ss}(t, D) = X_{12}(t, D)v_{ss}(D)(t - t_{in}), \\ X_{12}(t, D) \leq N_1(D), \end{array} \right. \\ \left\{ \begin{array}{l} L_{ss}(t, D) = N_1(D)v_{ss}(D)(t - t_{in}), \\ X_{12}(t, D) > N_1(D). \end{array} \right. \end{cases}$$

Здесь  $L_{ss}(t, D)$  есть число нуклеотидов, пройденных на данный момент времени молекулами комплекса PolV Mut в пределах одонитевых пробелов, исключая тиминовые димеры.

Синтез на неповрежденной ДНК с участием модифицированного репликационного комплекса может быть описан на основе следующего подхода. Поскольку комплекс PolV Mut обладает большим сродством к одонитевой ДНК, связанной с белком RecA, то можно сделать вывод о том, что TLS начинается и заканчивается на одонитевых пробелах. Следовательно, включение молекул ДНК-полимеразы V в процесс на неповрежденной ДНК происходит в тот момент, когда их число начинает превосходить количество

однонитевых пробелов. Соответственно, выключение синтеза на неповрежденной ДНК осуществляется в тот момент, когда количество молекул PolV становится равным количеству однонитевых пробелов. Пошаговый подсчет количества пройденных нуклеотидов в этом случае описывается формулой

$$\left[ \begin{cases} L_{\text{und}}(t, D) = 0, \\ X_{12}(t, D) \leq N_1(D), \\ L_{\text{und}}(t, D) = v_{\text{und}}(X_{12}(t, D) - N_1(D)), \\ X_{12}(t, D) > N_1(D). \end{cases} \right.$$

Здесь  $v_{\text{und}} = 16,8$  нуклеотидов/мин — скорость движения модифицированного репликационного комплекса при синтезе неповрежденных участков ДНК [31].

Обозначим  $P(X)$  вероятность подстановки комплексом PolV Mut некомплементарного нуклеотида на участках цепи ДНК, не содержащих тиминных димеров. Пусть  $P(Y)$  — вероятность подстановки некомплементарного нуклеотида при прохождении тиминных димеров. Тогда параметр  $a$  распределения Пуассона в зависимости от времени и дозы УФ-облучения будет принимать значения в соответствии с формулой

$$a(t, D) = P(X)(L_{\text{und}}(t, D) + L_{\text{ss}}(t, D)) + P(Y)L_{\text{td}}(t, D),$$

где  $1,3 \cdot 10^{-4} \leq P(X) \leq 3,0 \cdot 10^{-3}$  [30, 32].

Вероятность подстановки некомплементарного нуклеотида  $P(Y)$  при прохождении димеров определяется по формуле

$$P(Y) = P_1P_A + P_2P_B + P_3P_C + P_4P_D,$$

где  $P_1 = P_2 = 0,1$ ,  $P_3 = P_4 = 0,4$ . Эти значения следуют из экспериментальных данных [33, 34], согласно которым основную часть повреждений, вызванных воздействием ультрафиолетового излучения, составляют *cys-sin* пиримидиновые димеры циклобутанового типа (порядка 80%). Следовательно, тиминовые (6–4) фотопродукты составляют долю порядка 20% от общего числа вызванных УФ-излучением повреждений. Полагаем также, что в рамках одного из двух основных УФ-обусловленных повреждений ДНК (ТТ (6–4) фотопродукта или ТТ *cys-sin* фотодимера) события возникновения повреждения с 3'-концом и 5'-концом являются равновероятными.  $P_A$  — вероятность возникновения мутации при прохождении тиминового (6–4) фотопродукта с 3'-концом,  $P_B$  — вероятность возникновения мутации при прохождении тиминового (6–4) фотопродукта с 5'-концом,  $P_C$  — вероятность возникновения мутации при прохождении *cys-sin*-пиримидинового димера циклобутанового типа с 3'-концом и  $P_D$  — вероятность возникновения мутации при прохождении *cys-sin* пиримидинового димера циклобутанового типа с 5'-концом. Согласно результатам работы [30], эти вероятности имеют следующие значения:  $P_A = 0,875$ ,  $P_B = 0,078$ ,  $P_C = 0,02$ ,  $P_D = 0,048$ . Подставляя известные значения, получим, что полная вероятность возникновения мутации при осуществлении translesion-синтеза на участках ДНК, содержащих тиминовые димеры, имеет значение  $P(Y) = 0,12$ .

## 6. РЕЗУЛЬТАТЫ

В рамках динамической модели SOS-системы клеток *E. coli* было проведено численное исследование уравнений (1)–(6). Построены графические решения, описывающие динамику белков LexA, RecA, RecA\*, UmuD, UmuC, UmuD', UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C, UmuD'<sub>2</sub>C при различных дозах ультрафиолетового облучения. Решения математической модели, полученные для различных белков, представлены на рис. 1. В таблице даны основные характеристики построенных кривых.

Анализ динамики регуляторных белков SOS-системы показывает, что положение мак-

**Значения минимальных  $X_{i_{\min}}$  и максимальных  $X_{i_{\max}}$  концентраций белков и времена, на которых они наблюдаются**

Белки	$D$ , Дж/м <sup>2</sup>	$t_{\min}$ , мин	$X_{i_{\min}}$ , молекул на клетку	$t_{\max}$ , мин	$X_{i_{\max}}$ , молекул на клетку
LexA	1	15	504	—	—
	5	16	242	—	—
	50	22	122	—	—
	100	24	101	—	—
RecA	1	4,5	480	42	2490
	5	3	105	40	6008
	50	3	32	43	21438
	100	3	26	44	30423
RecA*	1	—	—	6	558
	5	—	—	14	1293
	50	—	—	22	5040
	100	—	—	24	7168
UmuD	1	—	—	24	440
	5	—	—	23	688
	50	—	—	30	808
	100	—	—	34	810
UmuD'	1	—	—	16	3
	5	—	—	20	6
	50	—	—	26	15
	100	—	—	27	18
UmuC	1	—	—	14	37
	5	—	—	13	91
	50	—	—	16	167
	100	—	—	18	192
UmuD <sub>2</sub> C	1	—	—	38	121
	5	—	—	34	363
	50	—	—	37	1416
	100	—	—	38	2000
UmuD' <sub>2</sub> C	5	—	—	27	9
	50	—	—	32	103
	100	—	—	34	192
UmuDD'C	1	—	—	62	2
	5	—	—	52	13
	50	—	—	52	160
	100	—	—	53	303

симума (минимума) концентрации варьирует в зависимости от дозы УФ-излучения. Результаты, полученные для белка LexA (рис. 1), согласуются с экспериментальными данными [35]. Расчеты, выполненные для продукта гена *recA* в нормальной форме, подтверждаются экспериментальными данными, свидетельствующими о значительном возрастании концентрации белка RecA при индукции SoS-ответа [36]. На ранних временах (порядка 2–4 мин) при дозах выше 5 Дж/м<sup>2</sup> проявляется резкий перегиб кривой концентрации белка RecA\*. Ход кривой объясняется, по-видимому, переходными процессами, связанными с окончанием репликации. Значения максимальной концентрации белков UmuD и UmuC, а также распределение пиков максимальной концентрации по времени хорошо согласуются с экспериментальными наблюдениями [15, 37]. Численное исследование было выполнено и для димеризованных продуктов гена *umuD*. Результаты для белков UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub> и UmuDD' отдельно не показаны. Наибольший интерес представляют решения, характеризующие изменение концентрации ДНК-полимеразы V (белкового комплекса UmuD'<sub>2</sub>C), так как именно этот белковый комплекс является ответственным за возникновение мутаций во время синтеза ДНК по матрице, содержащей повреждения. Анализ динамики ДНК-полимеразы V (рис. 2) показывает, что увеличение дозы УФ-излучения ведет к сужению пика концентрации и незначительному смещению области максимальной концентрации в сторону более поздних времен. В экспериментальной литературе указывается, что SOS-ответ достигает максимума на промежутке времен 20–40 мин [38]. Все полученные при расчетах времена максимумов концентрации ДНК-полимеразы V лежат в пределах указанного промежутка времени.

Решение модели формирования мутаций с использованием результатов, характеризующих динамику ДНК-полимеразы V, дает возможность построить функции распределения случайной величины, представляющей собой число мутаций в цепи ДНК. В качестве примера приведены расчеты для следующих доз: 5 и 50 Дж/м<sup>2</sup>.

Графики, представленные на рис. 2, 3, позволяют сделать вывод о распределении вероятности возникновения  $m$  ошибок во времени при заданной дозе УФ-облучения. Резкий пик, проявляющийся на рис. 2, 3, *a, б*, обусловлен прохождением репликационного комплекса PolV Mut через тиминовые димеры, где вероятность возникновения ошибки при подстановке нуклеотида выше. При дозе 5 Дж/м<sup>2</sup> вероятность того, что мутация не возникнет (т. е.  $m = 0$ ), представляет собой величину, близкую к единице для всего временного промежутка, исключая времена, на которых осуществляется translesion-синтез участков ДНК, содержащих тиминовые димеры. На этом временном промежутке (71–74 мин) значение вероятности для параметра  $m = 0$  составляет  $P(0) = 0,781–0,783$ . Максимальное значение вероятности возникновения одной ошибки ( $m = 1$ ) при репликации неповрежденной ДНК и односторонней ДНК пробелов для дозы 5 Дж/м<sup>2</sup> составляет  $P = 1,17 \cdot 10^{-2}$ , в то время как при репликации участков ДНК с димерами максимальное значение вероятности становится равным  $P = 0,193$  (рис. 2, *a*). Доза 50 Дж/м<sup>2</sup> дает следующее распределение вероятностей при различных значениях параметра  $m$ . Минимальное значение вероятности того, что ошибка не возникнет ( $m = 0$ ), составляет  $P = 0,818$  для ДНК, не содержащей тиминовых димеров, и  $P = 0,372$  для участков ДНК с димерами. Указанные значения вероятности принимает на временах 34 и 94 мин соответственно. Событие возникновения одной ошибки при дозе 50 Дж/м<sup>2</sup> ( $m = 1$ ) имеет максимальную вероятность  $P = 0,165$  для ДНК без димеров и  $P = 0,368$  на участках, содержащих димеры. Времена, соответствующие значениям вероятности

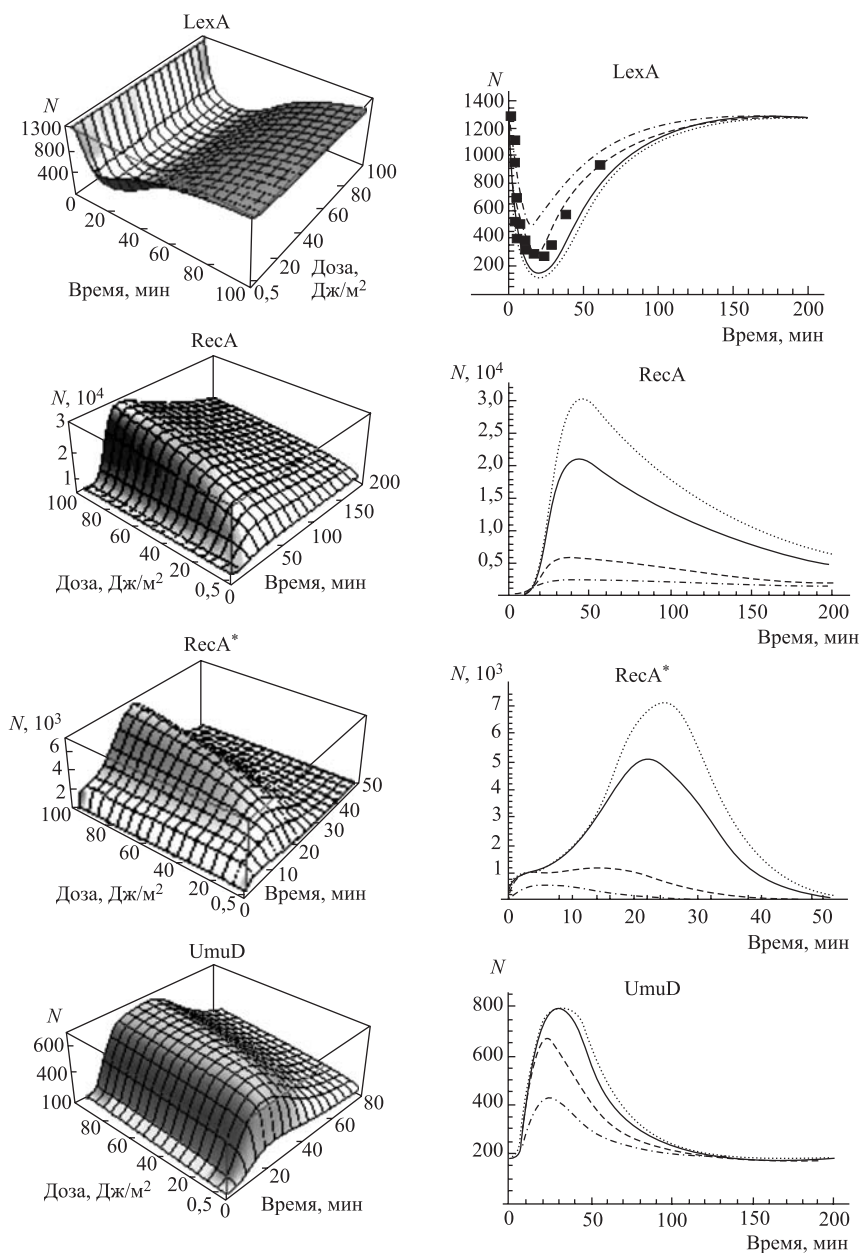
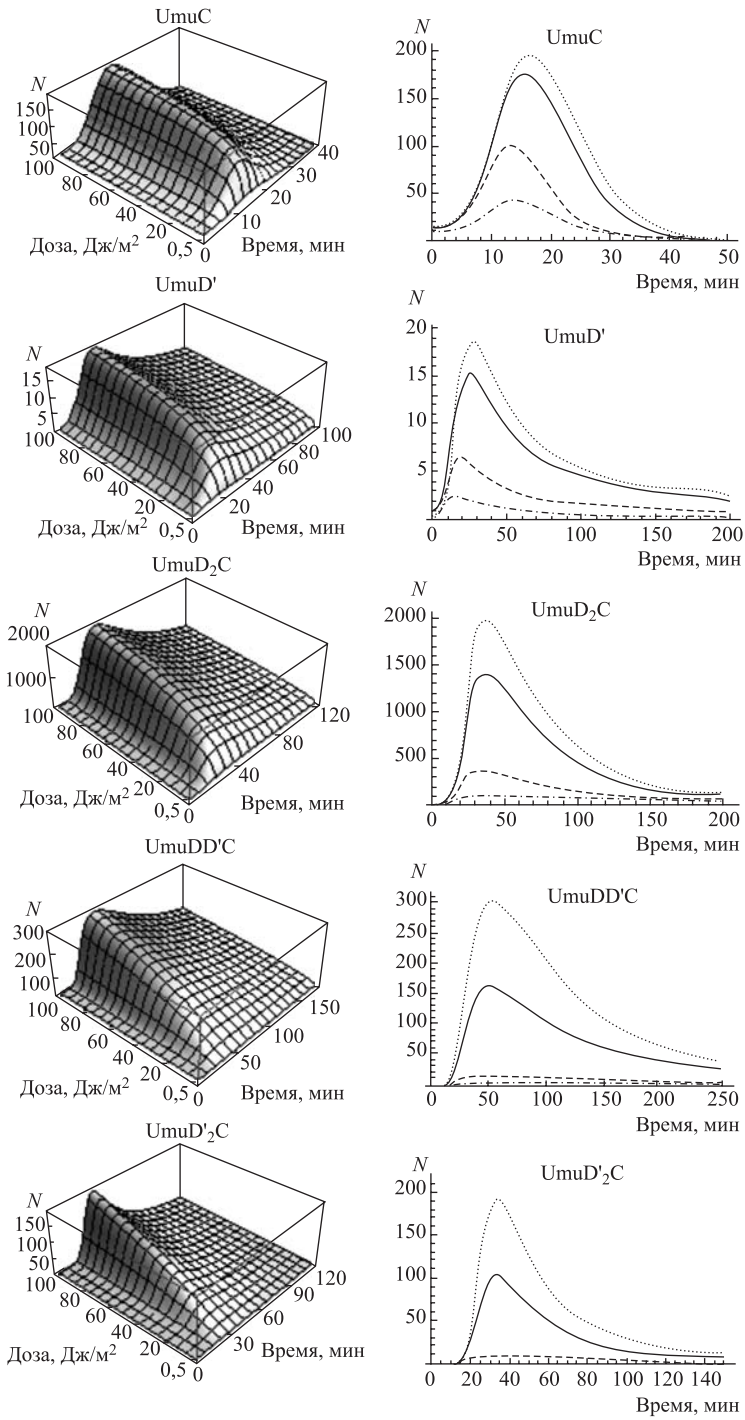


Рис. 1. Поверхности и наборы кривых, характеризующие изменение концентрации белков LexA, RecA, RecA\*, UmuD, UmuC, UmuD', UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C, UmuD'<sub>2</sub>C во времени и в зависимости от дозы УФ-излучения.  $N$  — число молекул белка, содержащееся в одной клетке. Кривые построены для следующих доз УФ-излучения: штрихпунктирная линия — 1 Дж/м<sup>2</sup>; штриховая — 5 Дж/м<sup>2</sup>; сплошная — 50 Дж/м<sup>2</sup>; точечная — 100 Дж/м<sup>2</sup>; ■ — экспериментальные данные для белка LexA при дозе 5 Дж/м<sup>2</sup> [35]





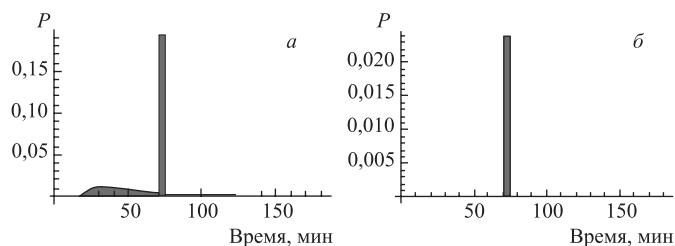


Рис. 2. Распределение вероятности для дозы УФ-облучения 5 Дж/м<sup>2</sup> и  $P(X) = 1,3 \cdot 10^{-4}$  при  $m = 1$  (а), при  $m = 2$  (б). На всех графиках  $P$  — вероятность возникновения  $m$  ошибок

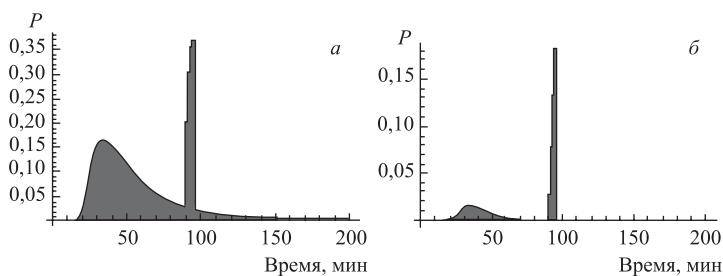


Рис. 3. Распределение вероятности для дозы УФ-облучения 50 Дж/м<sup>2</sup> и  $P(X) = 1,3 \cdot 10^{-4}$  при  $m = 1$  (а), при  $m = 2$  (б). На всех графиках  $P$  — вероятность возникновения  $m$  ошибок

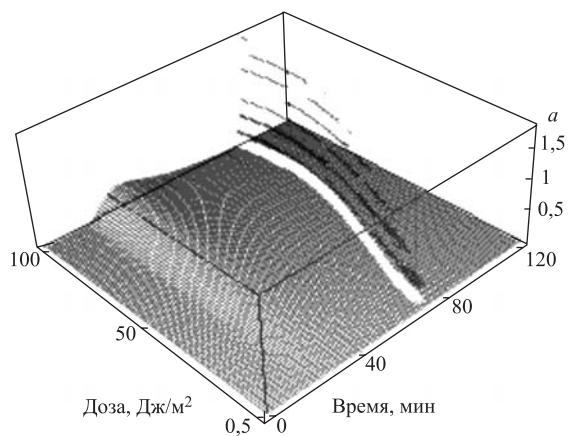


Рис. 4. Наивероятнейшее число возникновения мутаций в зависимости от времени и дозы УФ-облучения при  $P(X) = 1,3 \cdot 10^{-4}$

$P$ , совпадающим с аналогичным для дозы 5 Дж/м<sup>2</sup>, составляют 34 и 94 мин соответственно (рис. 3, а).

Важным вопросом при анализе SOS-мутагенеза является анализ зависимости наивероятнейшего числа ошибок  $a$  от времени и дозы УФ-облучения (рис. 4).

Анализ рис. 4 показывает, что при выбранной нижней границе  $P(X) = 1,3 \cdot 10^{-4}$ ,

число возникших мутаций вероятнее всего будет определяться только процессами на тиминовых димерах. Избыток молекул ДНК-полимеразы V в данном случае не оказывает существенного влияния на мутагенез при реализации TLS.

Совершенно иная ситуация возникает при использовании в качестве входного параметра модели верхней границы интервала  $P(X) = 3,0 \cdot 10^{-3}$ . Графики распределения вероятности для доз 5 и 50 Дж/м<sup>2</sup> теперь удобнее представлены на рис. 5 и 6 соответственно.

Рис. 5, а, 6, а показывают, что возникновение большого количества ошибок — вероятнее всего на временах 31–34 мин, т.е. в тот момент, когда концентрация молекул ДНК-полимеразы V (а следовательно, и молекул модифицированного репликационного комплекса) максимальна. На малых временах и на временах больше 100 мин высока вероятность возникновения небольшого числа ошибок. Этот факт объясняется малым числом молекул PoIV в клетке на указанных временах. Рассмотрим подробнее распределение вероятности возникновения одной ошибки при дозе 5 Дж/м<sup>2</sup>. Параметр  $m$  в этом случае имеет значение 1 (рис. 5, б). Вероятность  $P$  при этом имеет максимальное значение 0,368 и наблюдается в следующем диапазоне времен:  $16 \leq t \leq 17$  мин,  $123 \leq t \leq 182$  мин. При дозе 50 Дж/м<sup>2</sup> вероятность возникновения 30 ошибок ( $m = 30$ ) также имеет два пика, первый из которых характеризуется максимальным значением вероятности  $P = 0,068$  и наблюдается в момент 21 мин, второй — значением вероятности  $P = 0,054$  и наблюдается в диапазоне времен  $83 \leq t \leq 84$  мин (рис. 6, б).

В ходе исследования был проведен анализ зависимости наивероятнейшего числа воз-

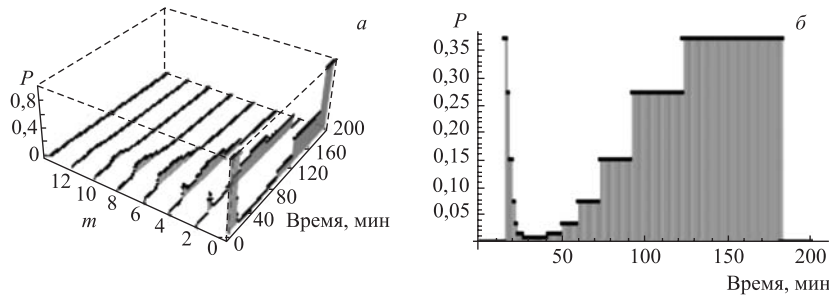


Рис. 5. Распределение вероятности для дозы УФ-облучения 5 Дж/м<sup>2</sup> и  $P(X) = 3,0 \cdot 10^{-3}$  при различных значениях параметра  $m$  (а), при  $m = 1$  (б).  $P$  — вероятность возникновения  $m$  ошибок

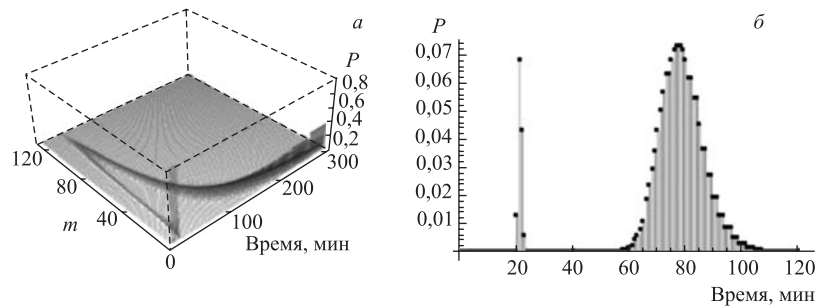


Рис. 6. Распределение вероятности для дозы УФ-облучения 50 Дж/м<sup>2</sup> и  $P(X) = 3,0 \cdot 10^{-3}$  при различных значениях параметра  $m$  (а), при  $m = 30$  (б).  $P$  — вероятность возникновения  $m$  ошибок

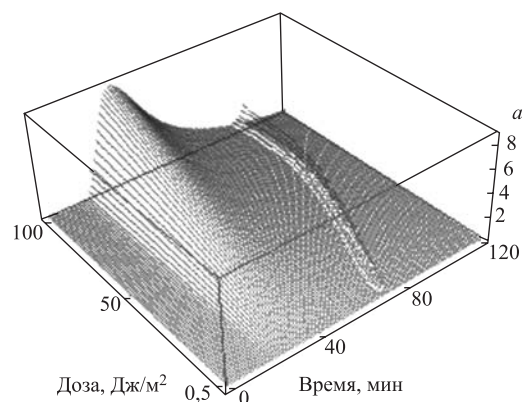


Рис. 7. Наивероятнейшее число возникновения мутаций в зависимости от времени и дозы УФ-облучения при  $P(X) = 3,0 \cdot 10^{-3}$

никающих мутаций от времени и дозы УФ-облучения при выбранной верхней границе интервала  $P(X)$ . Различия между результатами, представленными на рис. 4 и 7, обусловлены процессами возникновения мутаций при репликации неповрежденной ДНК и однострочной ДНК пробелов, за исключением тиминных димеров. Исходя из этого, можно заключить, что при выбранном значении  $P(X)$  количество возникших мутаций, вероятнее всего, будет определяться всеми тремя процессами, обозначенными выше. Кроме того, справедлив вывод о том, что подстановка ошибочных нуклеотидов на тиминных димерах при больших дозах вносит сравнительно небольшой вклад в общее число мутаций. Основными в этом случае являются процессы, происходящие на неповрежденной ДНК и однострочной ДНК пробелов, за исключением тиминных димеров.

Из анализа рис. 7 следует, что при выбранной верхней границе  $P(X) = 3,0 \cdot 10^{-3}$  число возникших мутаций, вероятнее всего, будет определяться в основном процессами на неповрежденной ДНК и на однострочной ДНК пробелов, за исключением участков, содержащих тиминные димеры. Избыток молекул ДНК-полимеразы V в этом случае оказывает существенное влияние на эффективность TLS у бактерий *E. coli*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе построена математическая модель регуляции SOS-ответа у бактериальных клеток *E. coli*, индуцированного ультрафиолетовым излучением. Новый перспективный подход основан на математическом описании белковых взаимодействий, происходящих после воздействия УФ-излучения, результатом которых является возникновение мутации в цепи ДНК. Впервые в рамках одного модельного подхода прослежен путь от возникновения первичного повреждения структуры ДНК до закрепления его в мутацию. Разработанные модельные представления позволили впервые предсказать динамику димеризованных продуктов гена *umuD*, а также двух регуляторных комплексов SOS-системы: UmuD<sub>2</sub>C и UmuDD'C. Результаты, полученные в ходе исследования, позволяют детально рассмотреть процесс translesion-синтеза во времени и в зависимости от дозы УФ-облучения. С использованием нового подхода представляется возможным

прогнозирование поведения системы SOS-ответа клеток *E. coli* при интересующей дозе УФ-облучения на заданном временном отрезке. Решение многих научно-практических задач современной биофизики требует подробного изучения и количественной оценки процесса translesion-синтеза у прокариот. В частности, выяснение механизмов индуцированного мутагенеза в клетках сложных организмов и человека весьма затруднительно без детального анализа мутационного процесса у бактериальных клеток. Математическое моделирование генетической сети SOS-репарации клеток является важным шагом на пути описания накопленных экспериментальных и теоретических знаний, касающихся мутационного процесса.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Z. Translesion Synthesis by the UmuC Family of DNA Polymerase // *Mutat. Res.* 2001. V. 486. P. 59–70.
2. Yang I., et al. Mammalian Translesion DNA Synthesis Across an Acrolein-derived Deoxyguanosine Adduct // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278, No. 16. P. 13989–13994.
3. Chiapperino D. et al. Error-prone Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase  $\eta$  on DNA-containing Deoxyadenosine Adducts of 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280, No. 48. P. 39684–39692.
4. Smith B. T., Walker G. C. Mutagenesis and More: *umuDC* and the *Escherichia coli* SOS Response // *Genetics.* 1998. V. 148. P. 1599–1610.
5. Gonzalez M. et al. Lon-mediated Proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD Mutagenesis Protein: In Vitro Degradation and Identification of Residues Required for Proteolysis // *Gen. & Dev.* 1998. No. 12. P. 3889–3899.
6. Shen X., Woodgate R., Goodman M. F. *Escherichia coli* DNA Polymerase V Subunit Exchange: a Post-SOS Mechanism to Curtail Error-Prone DNA Synthesis // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 52546–52550.
7. Lindahl T., Wood R. D. Quality Control by DNA Repair // *Science.* 1999. V. 286. P. 1897–1905.
8. Gardner T. S. et al. Inferring Genetic Networks and Identifying Compound Mode of Action via Expression Profiling // *Science.* 2003. V. 301. P. 102–105.
9. Krishna S., Maslov S., Sneppen K. UV-Induced Mutagenesis in *Escherichia coli* SOS Response: A Quantitative Model // *PLoS Comp. Biology.* 2007. V. 3. P. 0451–0462.
10. Аксенов С. В. Математическое моделирование генетической регуляторной системы SOS-ответа у бактерий *Escherichia coli*. Дис. . . . канд. физ.-мат. наук. Дубна, 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.
11. Белов О. В., Борейко А. В. Подходы к созданию математической модели индуцированного мутационного процесса у клеток *Escherichia coli* // *Вестн. Междунар. ун-та природы, общества и человека «Дубна».* 2006. № 2(15). С. 39–46.
12. Белов О. В. Временная зависимость индуцирующего сигнала SOS-системы бактерии *E. coli* при ультрафиолетовом облучении // *Письма в ЭЧАЯ.* 2007. Т. 4, № 6. С. 867–874.

13. Hegde S. et al. *recO* and *recR* Mutations Delay Induction of the SOS Response in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 246. P. 254–258.
14. Woodgate R., Ennis D. G. Levels of Chromosomally Encoded Umu Proteins and Requirements for in Vivo UmuD Cleavage // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 229. P. 10–16.
15. Bianco P. R., Kowalczykowski S. C. RecA Protein // Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publ. Group. London. <http://www.els.net>
16. Ronen M. et al. Assigning Numbers to the Arrows: Parameterizing a Gene Regulation Network by Using Accurate Expression Kinetics // Proc. Nat. Acad. Sci. 2002. V. 99, No. 16. P. 10555–10560.
17. Gonzalez M. et al. Lon-mediated Proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD Mutagenesis Protein: In Vitro Degradation and Identification of Residues Required for Proteolysis // Genes & Dev. 1998. No. 12. P. 3889–3899.
18. Sassanfar M., Roberts J. W. Nature of the SOS-inducing Signal in *E. coli*. The Involvement of DNA Replication // J. Mol. Biol. 1990. V. 212. P. 79–96.
19. Bryant F. R., Taylor A. R., Lehman I. R. Interaction of the RecA Protein of *Escherichia coli* with Singlestranded DNA // J. Biol. Chem. 1985. V. 260, No. 2. P. 1196–1202.
20. Goodman M. F., Woodgate R. The Biochemical Basis and in Vivo Regulation of SOS-induced Mutagenesis Promoted by *Escherichia coli* DNA Polymerase V (UmuD'2C) // Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. 2000. V. 65. P. 31–40.
21. Brent R. Regulation and Autoregulation by LexA Protein // Biochimie. 1982. V. 64. P. 565–569.
22. Perry K. L. et al. *umuDC* and *mucAB* Operons whose Products are Required for UV Light and Chemical-Induced Mutagenesis: UmuD, MucA, and LexA Products Share Homology // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4331–4335.
23. Schnarr M. et al. Large-scale Purification, Oligomerization Equilibria, and Specific Interaction of the LexA Repressor of *Escherichia coli* // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 2812–2818.
24. Schnarr M. et al. DNA Binding Properties of the LexA Repressor // Biochimie. 1991. V. 73. P. 423–431.
25. Woodgate R. et al. Isolation and Characterization of Novel Plasmid-Encoded *umuC* Mutants // J. Bacter. 1994. V. 176, No. 16. P. 5011–5021.
26. Frank E. G. et al. Regulation of SOS Mutagenesis by Proteolysis // Proc. Nat. Acad. Sci. 1996. V. 93. P. 10291–10296.
27. Donnelly C. E., Walker G. C. *groE* Mutants of *Escherichia coli* are Defective in *umuDC*-dependent UV Mutagenesis // J. Bacteriol. 1989. V. 171(11). P. 6117–6125.
28. Frank E. G. et al. In Vivo Stability of the Umu Mutagenesis Proteins: A Major Role for RecA // J. Bacter. 1996. V. 178. P. 3550–3556.
29. Pham P. et al. Roles of DNA Polymerases V and II in SOS-induced Error-prone and Error-free Repair in *Escherichia coli* // Proc. Nat. Acad. Sci. 2001. V. 98, No. 15. P. 8350–8354.
30. Tang M. et al. Roles of *E. coli* DNA Polymerases IV and V in Lesion-targeted and Untargeted Mutagenesis // Letters to Nature. 2000. V. 404. P. 1014–1018.

31. Fujii S., Fuchs R.P. Defining the Position of the Switches between Replicative and Bypass DNA Polymerases // EMBO J. 2004. V. 23. P. 4342–4352.
32. Livneh Z. DNA Damage Control by Novel DNA Polymerases: Translesion Replication and Mutagenesis // J. Biol. Chem. 2000. V. 276, No. 28. P. 25639–25642.
33. Wang S.Y. // Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids. N. Y., 1976. V. 1. P. 296–359.
34. Cadet J., Vigny P. // Bioorganic Photochemistry. N. Y., 1990. V. 1. P. 1–272.
35. 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. Bacter. 1991. V. 173, No. 18. P. 5869–5875.
36. Stohl E.A. et al. *Escherichia coli* RecX Inhibits RecA Recombinase and Coprotease Activities in Vitro and in Vivo // J. Biol. Chem. 2003. V. 278, No. 4. P. 2278–2285.
37. Delmas S., Matic I. Interplay between Replication and Recombination in *Escherichia coli*: Impact of the Alternative DNA Polymerases // Proc. Nat. Acad. Sci. 2006. V. 103. P. 4564–4569.
38. Voloshin O.N. et al. A Model for the Abrogation of the SOS Response by an SOS Protein: A Negatively Charged Helix in DinI Mimics DNA in Its Interaction with RecA // Genes & Dev. 2001. V. 15, No. 4. P. 415–427.

Получено 11 июля 2008 г.