



СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

95-499

P19-95-499

С.В.Аксенов, Е.А.Красавин, А.А.Литвин

МОДЕЛЬ SOS-ОТВЕТА
БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*
ПРИ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

3. Кинетика процессов регуляции SOS-ответа

1995

ются область применимости модели и возможности её модификации для лучшего соответствия экспериментальным данным.

2. КИНЕТИЧЕСКИЕ УРАВНЕНИЯ МОДЕЛИ

Уравнения модели, полученные нами в работе [2], представляют собой нелинейные обыкновенные дифференциальные уравнения. Анализ их затрудняется наличием сложных нелинейностей, включающих в себя функцию длины брешей $S(t)$, не выражаемую в явном виде, так что получить аналитическое решение системы уравнений не представляется возможным. По этой причине было проведено численное решение системы уравнений модели на ЭВМ.

Прежде всего уравнения модели должны быть переписаны в безразмерной форме. Введём следующие безразмерные переменные:

$$x = \frac{C_L}{C_L(0)}, y = \frac{C_R}{C_R(0)}, z = \frac{C_{R^*}}{C_R(0)}, q = \frac{C_{R^*}}{C_0}, \sigma = \frac{S}{L}, \tau = t e_L,$$

и безразмерные параметры:

$$\begin{aligned} p_1 &= \frac{a_L}{C_L(0)e_L}, p_2 = K_L C_L(0), p_3 = \frac{b_L C_R(0)}{e_L}, p_4 = \frac{a_R}{C_R(0)e_L}, \\ p_5 &= K_R C_L(0), p_6 = \frac{e_R}{e_L}, p_7 = \frac{e_{R^*}}{e_L}, p_8 = \frac{e_{I^*}}{e_L}, p_9 = \frac{2L_G}{L}, \\ p_{10} &= \frac{2v_F}{e_L L}, \varepsilon = \frac{C_0}{C_R(0)}, \tau_s = t_s e_L, A = \frac{b_R L}{e_L}, \\ B &= \frac{b_{R^*}}{e_L}, C = \frac{a_S C_0}{e_L}, D = \frac{b_p C_0}{e_L}. \end{aligned} \quad (1)$$

В безразмерных переменных система уравнений модели принимает вид:

$$\begin{cases} \frac{dx}{d\tau} = \frac{p_1}{1+p_2x} - p_3xz - x \\ \frac{dy}{d\tau} = \frac{p_4}{1+p_5x} + Bz - Ay\sigma - p_6y \\ \frac{dz}{d\tau} = Ay\sigma - Bz - p_7z \\ \varepsilon \frac{dq}{d\tau} = Dz(1-q) - \varepsilon p_8q \\ \begin{cases} N_s(\tau) = 0, & \tau \leq \tau_G \\ \frac{dN_s}{d\tau} = Cq(N_G(\tau) - N_s), & \tau > \tau_G \end{cases} \end{cases} \quad (2)$$

$$\sigma(\tau) = p_9 N_G(\tau) - \sigma_s(\tau), \quad (3)$$

$$\sigma_s(\tau) = \begin{cases} p_{10} \int_0^{\tau} N_s(\xi) d\xi, & \tau \leq \tau_G + \tau_s \\ p_{10} \int_{\tau-\tau_s}^{\tau} N_s(\xi) d\xi, & \tau > \tau_G + \tau_s \end{cases} \quad (4)$$

$$N_G(\tau) = \begin{cases} \frac{\tau}{\tau_G}, & \tau \leq \tau_T \\ \frac{N}{2}, & \tau > \tau_T \end{cases} \quad (5)$$

где τ_G и τ_T вычисляются по формулам $\tau_G = \frac{Le_L}{Nv_F} + t_p e_L$ и $\tau_T = \frac{N}{2} \tau_G$, а на-

чальные условия имеют вид

$$x(0) = 1, y(0) = 1, z(0) = 0, q(0) = 0.$$

В работе [2] нами были оценены значения следующих параметров модели:

$$e_L = 1.2 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}, e_R = e_{R^*} = 4.0 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1},$$

$$K_L = 5.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}, K_R = 5.0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1},$$

$$C_L(0) = 2,2 \cdot 10^{-6} \text{ М}, C_R(0) = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ М}, C_0 = 3,3 \cdot 10^{-8} \text{ М},$$

$$a_L = 2,9 \cdot 10^{-6} \text{ М/мин}, a_R = 5,3 \cdot 10^{-5} \text{ М/мин}, b_L = 5,8 \cdot 10^4 \text{ 1/(М·мин)},$$

$$L_G = 900 \text{ нукл.}, t_p = 0,17 \text{ мин}, t_s = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ мин}, L = 4,0 \cdot 10^6 \text{ пар нукл.},$$

$$v_F = 6,0 \cdot 10^4 \text{ пар нукл./мин.}$$

Воспользовавшись этими значениями и формулами (1), вычислим значения безразмерных параметров:

$$\begin{aligned} p_1 = p_2 = 110, p_3 = 58, p_4 = 368, p_5 = 1100, p_6 = p_7 = 0,33, \\ p_9 = 4,5 \cdot 10^{-4}, p_{10} = 2,5, \varepsilon = 3 \cdot 10^{-3}, \tau_s = 1,8 \cdot 10^{-4}, \\ \tau_G = \frac{0,8}{N} + 2,04 \cdot 10^{-3}, \tau_T = 0,4 + N \cdot 1,02 \cdot 10^{-3}. \end{aligned} \quad (6)$$

Параметры $N, p_8, A, B, C,$ и D являются свободными.

Систему уравнений (2)-(5) можно значительно упростить, если принять во внимание малость параметра $\varepsilon = 3 \cdot 10^{-3} \ll 1$. Перейдя формально к пределу $\varepsilon \rightarrow 0$ в соответствующем уравнении (2), получим $q = 1$ для любого момента времени $t \geq 0$. Хотя мы при этом теряем информацию о поведении системы в интервале времени, близком к нулю, вполне естественно ожидать, что общий характер решения при таком упрощении не изменится. Приближённое равенство $q = 1$ для $t \geq 0$ можно было бы получить также и из следующих соображений. Количество молекул RecA*-белка сразу же после облучения и начала репликации быстро возрастает и в любой момент времени значительно превосходит количество молекул голофермента PolIII. Таким образом, если рассматривать реакцию связывания молекул RecA* и PolIII, то можно сказать, что RecA* находится в избытке по отношению к PolIII, и, следовательно, реакция сильно смещена в сто-

рону образования конечного продукта - модифицированного голофермента PolIII, что и дает $q = 1$.

Подставим теперь $q = 1$ в уравнение (2) для N_S , которое примет вид

$$\frac{dN_S}{d\tau} = C(N_G(\tau) - N_S).$$

После подстановки известной функции $N_G(\tau)$ (5) это дифференциальное уравнение интегрируется, и мы получаем такое решение:

$$N_S(\tau) = \begin{cases} 0, & \tau \leq \tau_G, \\ \alpha_1 + \alpha_2 e^{-C\tau} + \alpha_3, & \tau_G < \tau \leq \tau_T, \\ \beta_1 e^{-C\tau} + \beta_2, & \tau > \tau_T, \end{cases} \quad (7)$$

где параметры $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \beta_1,$ и β_2 вычисляются по формулам

$$\begin{aligned} \alpha_1 = \frac{1}{\tau_G}, \alpha_2 = \frac{1 - C\tau_G}{C\tau_G} e^{C\tau_G}, \alpha_3 = \frac{1}{C\tau_G}, \\ \beta_1 = \left(\tau_T - \frac{1}{C\tau_G} - \frac{N}{2} \right) e^{C\tau_T} + \alpha_2, \beta_2 = \frac{N}{2}. \end{aligned}$$

Формула (7) позволяет вычислить интегралы в (4) и определить таким образом функцию $\sigma(\tau)$ в явном виде. Примем количество димеров на бактериальную хромосому равным $N = 250$. Это число соответствует дозе УФ-излучения 5 Дж/м^2 . Используя значения параметров (6), окончательно получим следующую систему уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dx}{d\tau} = \frac{k_1}{1+k_1x} - k_2xz - x \\ \frac{dy}{d\tau} = \frac{k_3}{1+k_4x} + Bz - Ay\sigma(\tau) - k_5y \\ \frac{dz}{d\tau} = Ay\sigma(\tau) - Bz - k_3z; \end{cases} \quad (8)$$

$$\sigma(\tau) = \begin{cases} k_{10}\tau, & \tau \leq k_6 \\ k_{11}\tau^2 + k_{12}(C)\tau + k_{13}(C)(e^{-C\tau} - 1), & k_6 < \tau \leq k_7 \\ k_{14}(C)e^{-C\tau} + k_{15}(C), & k_7 < \tau \leq k_8 \\ -k_{11}\tau^2 - k_{12}(C)\tau + k_{16}(C)e^{-C\tau} + k_{17}(C), & k_8 < \tau \leq k_9 \\ k_{18}(C)e^{-C\tau}, & \tau > k_9 \end{cases} \quad (9)$$

где параметры k_1-k_{18} принимают значения

$$\begin{aligned} k_1 &= 1,1000 \cdot 10^2, & k_2 &= 5,8000 \cdot 10^1, & k_3 &= 3,6800 \cdot 10^2, & k_4 &= 1,1000 \cdot 10^3, \\ k_5 &= 3,3000 \cdot 10^{-1}, & k_6 &= 5,2400 \cdot 10^{-3}, & k_7 &= 5,4200 \cdot 10^{-3}, & k_8 &= 6,5500 \cdot 10^{-1}, \\ k_9 &= 6,5518 \cdot 10^{-1}, & k_{10} &= 8,5878 \cdot 10^{-2}, & k_{11} &= -2,3855 \cdot 10^2, \\ k_{12}(C) &= k_{10} - \frac{2k_{11}}{C}, & k_{13}(C) &= 2k_{11}(Ck_6 - 1) \frac{e^{Ck_6}}{C^2}, \\ k_{14}(C) &= k_{13}(C)(1 - e^{C \cdot 1,8 \cdot 10^{-4}}), & k_{15}(C) &= 7,7290 \cdot 10^{-6} + \frac{k_{10}}{C}, \\ k_{16}(C) &= \left(\frac{2k_{11}}{C} - 2k_{11}k_8 - 3,1250 \cdot 10^2 \right) \frac{e^{Ck_8}}{C} + k_{14}(C), \\ k_{17}(C) &= \frac{k_{12} + 3,1250 \cdot 10^2}{C} - 1,0229 \cdot 10^2, \\ k_{18}(C) &= \frac{1 - e^{C \cdot 1,8 \cdot 10^{-4}}}{C} \left[k_{13}(C) + e^{Ck_8} \left(\frac{2k_{11}}{C} - 2k_{11}k_8 - 3,1250 \cdot 10^2 \right) \right]. \end{aligned} \quad (10)$$

Параметры A , B и C являются свободными.

Решение системы уравнений (8) было проведено на ЭВМ методом Рунге - Кутты 4-го порядка точности. На рис. 1 изображена функция $x(\tau)$ в случае, когда параметры A , B и C принимают значения $2,6 \cdot 10^4$, 140 и 20 соответственно. На этом же рисунке показана экспериментальная зависимость относительного содержания LexA-белка в клетке от времени для дозы УФ-излучения 5 Дж/м^2 . Данные взяты из работы [3]. Такое же значение дозы мы выбрали для расчёта параметров (10). На рис. 2 изображена зависимость относительной длины брешей в облучённой хромосоме от

времени, рассчитанная по формуле (9), а на рис. 3 - функции $y(\tau)$ и $z(\tau)$, представляющие относительные количества белков ResA и ResA*, соответственно.

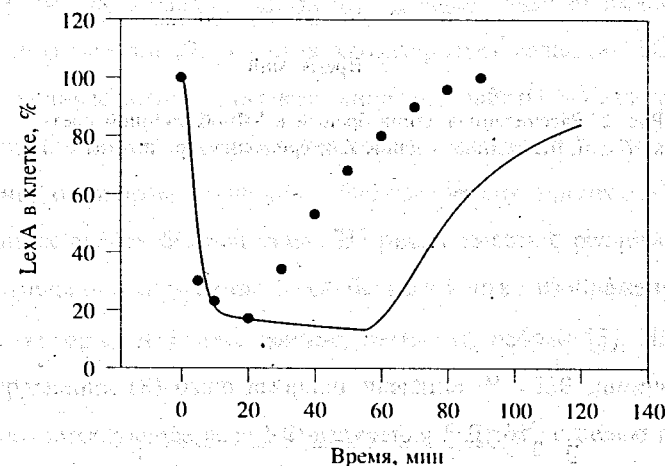


Рис. 1. Относительное содержание LexA-белка в УФ-облучённой клетке *E.coli*. Сплошная линия представляет численный расчёт, символы \bullet - экспериментальные точки [3]

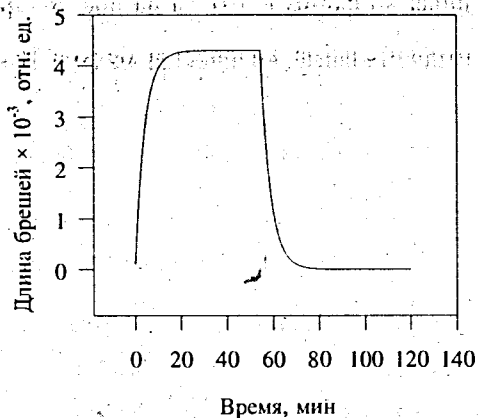


Рис. 2. Рассчитанная длина брешей в УФ-облучённой клетке *E.coli*, отнесённая к длине бактериальной хромосомы

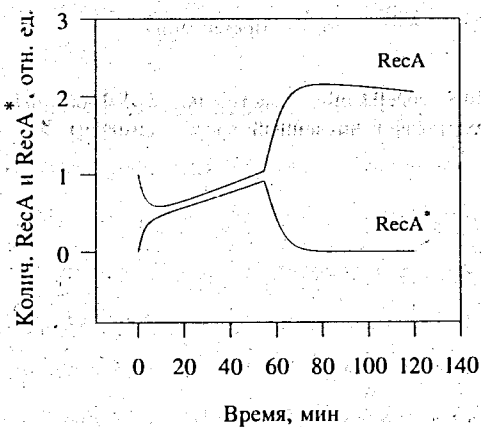


Рис. 3. Рассчитанная зависимость относительного количества белков RecA и RecA* в УФ-облучённой клетке *E.coli* от времени

3. КИНЕТИКА ПРОЦЕССОВ SOS-РЕГУЛЯЦИИ

Количественное описание модели регуляции работы SOS-системы, сформулированной нами ранее [1], заключено в дифференциальных уравнениях (2)-(5). В приближении $\epsilon \rightarrow 0$ мы получили уравнения модели в достаточно элегантном виде как систему дифференциальных уравнений (8) для относительных количеств белков LexA, RecA и RecA* в клетке (т.е. для основных регуляторных величин, определяющих развитие SOS-ответа). Кроме того, удалось вычислить в явном виде функцию относительной длины брешей (9), которая характеризует величину SOS-сигнала и поэтому количественно описывает кинетику работы SOS-системы. Численное решение системы дифференциальных уравнений (8) предоставляет информацию о кинетике основных биохимических процессов в клетке, регулирующих работу SOS-системы. На рис. 1 вместе с расчётной кривой $x(t)$ относительного количества LexA-белка в клетке, изображены соответствующие экспериментальные данные, взятые из работы [3]. При расчёте системы уравнений (8) было выбрано значение $N = 250$ димеров на хромосому, соответствующее дозе УФ-излучения 5 Дж/м^2 , с целью произвести сравнение с опытами [3], в которых использовалась именно такая доза.

При анализе результатов, представленных на рис. 1, прежде всего обращает на себя внимание тот факт, что расчётная кривая качественно совпадает с экспериментальной кривой. Это свидетельствует об адекватности модели, описывающей процессы, влияющие на количество LexA-белка в облучённой клетке и постулированные в модели, а именно:

- авторегуляция синтеза LexA-белка по механизму обратной связи молекул LexA-белка с ДНК-матрицей;
- расщепление LexA-белка в реакции с RecA*-белком.

Обращает на себя внимание ещё одно обстоятельство: начальный участок расчётной кривой, соответствующий уменьшению количества LexA-белка, точно ложится на экспериментальные точки (см. рис. 1). Несоответствие же остальной части расчётной кривой с экспериментальными данными, по-видимому, обусловлено тем, что при моделировании процессов развития SOS-ответа во времени не учитывается некоторый важный фактор. Действительно, участок расчётной кривой, соответствующий увеличению количества LexA-белка, будучи перенесён параллельно самому себе, точно ложится на экспериментальные точки (не показано). Это говорит о том, что подходы, на основе которых были написаны дифференциальные уравнения (8), верны. Однако имеется некоторый систематический сдвиг в кинетике величины SOS-сигнала (т.е. длины брешей), приводящий к сдвигу расчётной кривой вправо от экспериментальной кривой.

Как видно из рис. 2, расчётная зависимость длины брешей от времени имеет протяжённое плато, когда длина брешей, или иначе величина SOS-сигнала, остается постоянным в течение достаточно долгого времени. Такой высокий уровень SOS-сигнала приводит к нарастанию количества RecA*-белка и непрерывному расщеплению LexA-белка. Поэтому количество LexA-белка долго остается на низком уровне и таким образом отклоняется от экспериментальной зависимости, что проявляется в отмеченном "сдвиге". Таким образом, то, что мы не учитываем некоторый фактор, влияющий на кинетику величины SOS-сигнала, отражается в слишком протяжённом плато зависимости $\sigma(\tau)$. С другой стороны, это плато обусловлено тем, что скорость застройки брешей в процессе SOS-репарации равна скорости их образования при встрече репликативной вилки с димерами в ходе "прерывистой" репликации. С учётом этих обстоятельств можно предположить наличие в клетке системы, определённым

образом влияющей на величину SOS-сигнала в клетке. Представляется возможным учесть влияние аппарата эксцизионной *uvrABC*-зависимой репарации на кинетику образования брешей. Как известно, UvrABC-эндонуклеаза делает "надрезы" в нити ДНК, содержащей повреждение, с обеих сторон от димера, так что удаляется фрагмент ДНК длиной около 12 нуклеотидов. Образующаяся малая брешь застраивается ДНК-полимеразой I, использующей в качестве комплементарной матрицы для синтеза вторую, неповреждённую нить ДНК. Таким образом, в процессе эксцизионной репарации, возможно, удаляется часть димеров, распложенных в ещё не реплицированной части хромосомы. Тогда скорость образования брешей будет меньше и можно ожидать менее протяжённого плато в зависимости $\sigma(\tau)$, чем мы имеем на рис. 2. Следовательно, с учётом этого обстоятельства можно ожидать лучшего совпадения расчётной и экспериментальной кривых. Тот факт, что отсутствие учёта работы аппарата эксцизионной *uvrABC*-зависимой репарации проявляется только спустя некоторое время (около 20 мин. как это следует из рис.1) после начала работы SOS-системы, говорит об относительно медленном развитии процессов *uvrABC*-зависимой репарации, на что также существуют указания в литературе [3]. Таким образом, сформулированную нами в работе [1] модель и её количественное описание с помощью уравнений (8)-(9) можно рассматривать как приближение, не учитывающее некоторые важные процессы регуляции SOS-системы.

В рамках модели мы можем использовать определённые в ходе численного решения значения параметров A , B и C для оценки размерных макроскопических констант соответствующих реакций (см. уравнения, написанные нами в работе [2] и формулы (1)). Безразмерный параметр A соответствует размерной константе реакции связи молекул RecA-белка с

однонитевой ДНК b_R . Поскольку $A = 26000$, то $b_R \propto 10^{-4}$ 1/(нукл.мин).

Реакция эта описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dC_R}{dt} = -b_R S C_R.$$

Подставив в это уравнение $S = L_G$, получим, что с однонитевой ДНК брешей средней длины 900 нуклеотидов в 1 сек вступает в реакцию по порядку величины 10 молекул RecA-белка.

Параметр B (его размерный эквивалент b_{R^*}) представляет собой константу реакции спонтанной потери RecA*-белком своей SOS-индуцирующей активности. Эта реакция описывается дифференциальным уравнением

$$\frac{dC_{R^*}}{dt} = -b_{R^*} C_{R^*}.$$

Решение этого уравнения и расчёт времени полураспада (в течение этого времени половина всего количества RecA*-белка превращается обратно в RecA-белок) при $B = 140$ даёт значение, равное по порядку величины 0,5 мин. Как видно, RecA*-белок достаточно быстро теряет свою активную конформацию.

Наконец, параметр C характеризует реакцию инициации застройки брешей модифицированной ДНК-полимеразой III. Расчёт при $C = 20$ даёт, что в 1 мин иницируется синтез на 10 брешах.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведён количественный анализ сформулированной нами ранее модели регуляции работы SOS-системы бактерий *E.coli* при УФ-

облучении [1]. На основании положений модели и с использованием закономерностей биохимической кинетики в работе [2] были предложены дифференциальные уравнения для концентраций белков LexA, RecA и RecA* - основных количественных характеристик кинетики SOS-ответа. После написания этих уравнений в безразмерной форме оказалось, что довольно сложная система уравнений модели (2)-(5) допускает приведение к более простому виду (8)-(9) в приближении $\epsilon \rightarrow 0$. В частности, удалось получить в явном виде зависимость длины брешей от времени (9) - количественную характеристику развития SOS-сигнала во времени после УФ-облучения. Эта зависимость для случая УФ-облучения дозой 5 Дж/м², приведённая на рис. 1, является важным следствием модели, позволяющим составить определённое представление о кинетике SOS-ответа в целом.

Численное решение методом Рунге - Кутты дифференциальных уравнений (8) с длиной брешей $\sigma(\tau)$, задаваемой формулой (9), показало, что в главных своих чертах предлагаемая модель адекватно описывает результаты экспериментов. Это следует из сравнения расчётной зависимости $x(\tau)$ с экспериментальными данными, взятыми из работы [3] (см. рис. 1). Модель объясняет зависимость SOS-ответа от наличия в клетке функционального RecA-белка. RecA-белок требуется для dereпрессии SOS-генов путём расщепления LexA-белка, и для протекания SOS-репарации в качестве модификатора голофермента PolIII. Кроме того, полученные результаты позволяют оценить некоторые макроскопические константы реакций взаимодействия между собой белков LexA, RecA* и ДНК.

Тот факт, что расчётная кривая $x(\tau)$ не на всех участках совпадает с экспериментальными данными, говорит о том, что при моделировании развития SOS-сигнала во времени мы не учли действие некоторой клеточной системы. Анализ этой ситуации позволил нам сделать вывод о том,

что необходимо принять во внимание работу *uvrABC*-зависимой эксцизионной репарации, приводящей к исчезновению некоторого количества пиримидиновых димеров из ещё не реплицировавшейся части хромосомы. В течение примерно 20 мин после начала работы SOS-системы расчётная кривая точно ложится на экспериментальные точки, а в следующие моменты времени качественно описывает экспериментальную кривую. Поэтому предлагаемую модель регуляции SOS-системы [1] и её математическое описание можно рассматривать в качестве приближения, не учитывающего некоторые важные процессы, влияющие на работу SOS-системы (в частности, работу *uvrABC*-зависимой эксцизионной репарации).

Авторы выражают благодарность В.Л.Аксёнову за полезные обсуждения, способствовавшие улучшению работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксёнов С.В., Красавин Е.А. - Сообщение ОИЯИ, P19-95-485, Дубна, 1995.
2. Аксёнов С.В., Красавин Е.А., Литвин А.А. - Сообщение ОИЯИ, P19-95-486, Дубна, 1995.
3. Sassanfar M., Roberts J. - J. Mol. Biol., 1990, vol.212, p.79.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 декабря 1995 года.