

На правах рукописи

БЕЛОВ  
Олег Валерьевич

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ  
ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАЦИОННОГО ПРОЦЕССА  
В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ  
УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

03.01.01 — радиобиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2010

**Работа выполнена в Лаборатории радиационной биологии  
Объединённого института ядерных исследований.**

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
**Красавин Евгений Александрович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Рубанович Александр Владимирович**

доктор биологических наук, профессор  
**Петин Владислав Георгиевич**

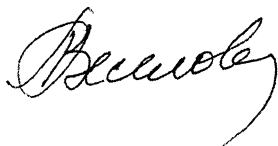
**Ведущая организация:** **ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН**

Защита состоится «**08**» **апреля 2010** года в **15 ч 30** мин на заседании диссертационного совета Д 501.001.65 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики, новая ауд.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Отзывы просим присылать по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, Биологический факультет, Веселовой Т.В. Факс (495) 939-11-15.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2010 года.

**Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук**



**Т.В. Веселова**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фундаментальными свойствами живых систем являются факторы наследственности и изменчивости. Мутационный процесс (скачкообразное изменение наследуемых свойств живых систем) является важнейшим механизмом реализации изменчивости живых организмов. Изучение мутагенеза, индуцированного излучениями с разными физическими характеристиками в клетках различных организмов, является одной из актуальных задач современной радиобиологии.

Среди традиционных биологических объектов, с использованием которых изучаются фундаментальные механизмы индуцированного мутагенеза, важное место занимают бактерии *Escherichia coli* – клетки кишечной палочки. На этом объекте детально изучена структурно-функциональная организация генетического аппарата, биохимические механизмы, контролирующие мутационный процесс. В последние годы выяснен ключевой механизм формирования мутаций из первичных повреждений ДНК, который получил название translesion-синтеза (TLS). Показано, что этот механизм реализуется не только у прокариот, но и в клетках млекопитающих и человека.

Известно, что воздействие разных агентов, задерживающих репликацию ДНК, вызывает в клетке сложную цепь реакций, проявляющихся в виде повышения частоты мутирования, задержке клеточного деления, синтезе различных ферментов, в том числе синтезе RecA-белка, UmuDC-белков, изменения W-реактивации и W-мутагенеза, индукции лямбдоидных профагов. В настоящее время все эти реакции клеток рассматриваются как неспецифический ответ на повреждение ДНК, ингибирующий её репликацию. Ответ клетки на эти воздействия получил название SOS-ответа, а соответствующая система регуляции получила название SOS-системы. Аналоги SOS-системы клеток *E. coli* найдены у многих штаммов прокариот.

Создание математических моделей, описывающих взаимодействие различных звеньев биохимической машинерии, контролирующей мутационный процесс, является важной задачей радиационной генетики. В этой связи создание моделей генетической регуляции репарационного процесса

в бактериальных клетках позволяет выявить взаимодействия различных звеньев генетического контроля индуцированного мутационного процесса и биохимических механизмов, реализующих этот процесс.

Попытки математического моделирования различных этапов репарационного процесса, приводящего к закреплению премутационного повреждения в мутацию, предпринимались в ряде работ [Lindahl, Wood, 1999; С.В. Аксёнов, 1999; Gardner, 2003; Krishna, Maslov, Sneppen, 2007]. Однако известные к настоящему времени модельные представления не достаточно полно описывают основные реакции клетки на повреждающее воздействие, а также не детализируют связь момента возникновения первичного повреждения в молекуле ДНК, которым является изменение химического состава или физического состояния ДНК, с проявлением конечной реакции (генной или точковой мутации).

Целью работы является разработка модели индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *E. coli*, основанной на математическом описании белковых взаимодействий, реализуемых после воздействия ультрафиолетового излучения (УФ-излучения), результатом которых является возникновение генной мутации в цепи ДНК. Достижение поставленной цели предполагает решение следующих основных задач:

1. Построение модели, описывающей динамику взаимодействий белков SOS-системы, являющихся основными регуляторами мутагенной ветви репарации в бактериальных клетках *E. coli*.
2. Определение характера зависимости концентрации димеризованных продуктов гена *umuD* от времени и флюенса энергии УФ-излучения.
3. Количественная оценка динамики концентрации основных регуляторных комплексов SOS-системы.
4. Построение модели translesion-синтеза. Оценка влияния уровня концентрации ДНК-полимеразы V на выход ошибок при реализации translesion-синтеза.
5. Выявление связи между эффективностью реализации translesion-синтеза и выходом генных мутаций. Количественная оценка формирования генных мутаций при УФ-облучении.

Научная новизна. В работе предложен новый подход к математическому описанию мутационного процесса, индуцированного ультрафиолетовым излучением в бактериальных клетках *E. coli*. Впервые построена модель, описывающая индуцированный мутационный процесс посредством детального математического описания ключевых белковых взаимодействий в ходе SOS-ответа бактерий *E. coli*. Впервые в рамках одного модельного подхода прослежен весь путь от возникновения первичного повреждения структуры ДНК до закрепления его в мутацию. Разработанные модельные представления позволили впервые предсказать динамику концентраций димеризованных продуктов гена *umuD*, а также двух регуляторных комплексов SOS-системы: UmuD<sub>2</sub>C и UmuDD'C. Предложенный в диссертационной работе подход позволил впервые детально смоделировать процесс translesion-синтеза во времени и в зависимости от флюенса энергии УФ-излучения.

Научная и практическая значимость работы. Решение многих научно-практических задач современной радиобиологии требует подробного изучения и количественной оценки процесса translesion-синтеза у прокариот. В частности, выяснение механизмов индуцированного мутагенеза в клетках сложных организмов и человека затруднительно без детального анализа мутационного процесса в бактериальных клетках. Математическое моделирование генетической сети SOS-репарации клеток является важным шагом на пути описания накопленных экспериментальных и теоретических знаний, касающихся мутационного процесса.

Положения и результаты, выносимые на защиту.

- Разработана математическая модель индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *E. coli* при ультрафиолетовом облучении.
- Детально описана кинетика генных продуктов, контролирующих ошибочную ветвь индуцибельной репарации от момента воздействия на клетку повреждающего фактора до возникновения мутации в цепи ДНК. Модель корректно описывает механизм работы

бактериальной системы SOS-ответа, а также воспроизводит наблюдаемые в экспериментах закономерности формирования генных мутаций (на примере *lacI* гена).

Апробация работы. Основные положения диссертационного исследования были представлены и обсуждены на III-м Международном симпозиуме под эгидой ЮНЕСКО, посвященном 100-летию со дня рождения академика Н.М. Сисакяна, Москва-Дубна, 2006 год; Научно-техническом семинаре «Развитие международного научно-технического сотрудничества в сфере современных технологий: проблемы и перспективы», Москва-Дубна, 2007 год; VII-й и VIII-й Конференциях молодых ученых, специалистов и студентов, посвященных дню космонавтики, Москва, 2008, 2009 годы; Вторых чтениях, посвященных В.И. Корогодину и В.А. Шевченко, Дубна-Москва, 2009 год; XIII-й научной конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ, Дубна, 2009 год; 13-й, 14-й, 15-й и 16-й Научных конференциях студентов, аспирантов и молодых специалистов Международного университета «Дубна», Дубна, 2006, 2007, 2008 и 2009 годы; на семинарах Лаборатории радиационной биологии Объединённого института ядерных исследований, Дубна; на Программно-консультативном комитете по физике конденсированных сред Объединённого института ядерных исследований, Дубна, 2009 год.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 работ. Из них 4 – в рецензируемых научных журналах, 4 – в периодических изданиях, 7 – в сборниках материалов конференций.

Структура и объём диссертации. Работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка цитируемой литературы, содержащего 146 наименований. Общий объём диссертации – 134 страницы. Диссертация содержит 19 рисунков.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, основные задачи и аргументирована научная новиз-

на исследования, показана практическая значимость полученных результатов, дано краткое содержание разделов диссертационной работы.

**Первая глава** содержит подробный анализ механизма SOS-ответа, основанный на современных экспериментальных данных. Изложены основные этапы развития представлений о системе SOS-регуляции. Описано современное состояние проблемы и приведены основные факторы, стимулирующие исследование вопросов SOS-мутагенеза. Приведена схема основных путей генетической регуляции SOS-ответа, реализуемого в бактериальных клетках *E. coli*. Объяснена ключевая роль генов *lexA*, *recA*, *umuD* и *umuC* в регуляции SOS-системы. Подробно рассмотрен процесс активации белкового продукта гена *umuD*. В рамках современных представлений описан процесс деградации мутагенной активности белковых комплексов SOS-системы.

**Во второй главе** рассмотрены основные модельные подходы, используемые для описания процессов генетической регуляции. Изложены основные методы и допущения, используемые в данной модели генетической регуляции:

1. акцент на регуляцию транскрипции;
2. пренебрежение механизмами посттранскрипционной регуляции;
3. описание синтеза белка как непрерывного процесса, модулируемого уровнем репрессии или активации операторных последовательностей соответствующего оперона.

Основная модель включает пять подмоделей, соответствующих различным этапам работы системы. Так, выделена модель динамики концентрации индуцирующего сигнала, модель динамики *lexA-recA*-системы, модель динамики концентраций продуктов *umuD*- и *umuC*-генов, модель динамики концентраций димеризованных продуктов гена *umuD*, модель динамики концентраций регуляторных комплексов SOS-системы.

В разделе 2.1 приведены уравнения математической модели индуцирующего сигнала и динамики *lexA-recA*-системы. Функция  $X_0(t, \Psi)$ , характеризующая динамику концентрации индуцирующего сигнала, которым яв-

ляется наличие в клетке однострессовой ДНК, задается отдельно следующим образом [С.В. Аксёнов, 1999]:

$$\text{для } t < t_2 \quad X_0(t, \Psi) = \frac{50l_1\Psi}{N_A T_0} e^{-\nu_2 t} \int_0^t \frac{e^{\nu_2 \xi} d\xi}{25\Psi t_1 + e^{\nu_1 \xi}}, \quad (1)$$

$$\text{для } t \geq t_2 \quad X_0(t, \Psi) = \frac{50l_1\Psi}{N_A T_0} e^{-\nu_2 t} \int_0^{t_2} \frac{e^{\nu_2 \xi} d\xi}{25\Psi t_1 + e^{\nu_1 \xi}}. \quad (2)$$

Здесь  $t$  – время,  $\Psi$  – флюенс энергии УФ-излучения, нормированный на 1 Дж/м<sup>2</sup> и равный численному значению задаваемого флюенса энергии,  $l_1$  – средняя длина образовавшегося пробела, определяемая количеством нуклеотидов,  $T_0$  – длительность репликации в нормальных условиях роста,  $\nu_1$  – скорость удаления димеров эксцизионной репарацией,  $\nu_2$  – скорость репарации пробелов,  $N_A$  – число Авогадро,  $t_1$  – время задержки репликационного комплекса на димере,  $t_2$  – время окончания репликации,  $\xi$  – переменная интегрирования. Для  $t_2$  имеет место следующее выражение:

$$t_2 = \frac{1}{\nu_1} \ln \left( e^{\nu_1 t_0} \left( 1 + \frac{25t_1\Psi}{T_0} \right) - \frac{25t_1\Psi}{T_0} \right). \quad (3)$$

К моменту создания математической модели было известно, что контроль генетической активности компонентов SOS-системы осуществляется на уровне транскрипции. Этот важный элемент регуляции *lexA-recA*-системы описывается слагаемым в функции  $V_{i+}$ , отвечающим за синтез белка вида  $i$ , которое прямо пропорционально уровню репрессии или активации (модулирования) активности промотора соответствующего гена вида  $i$  транскрипторным фактором. В рамках модели предполагается, что транскрипторный фактор находится в динамическом равновесии с операторной ДНК регулируемого гена, так как характерные времена реакций связывания регуляторных белков с ДНК много меньше остальных реакций в системе. Основные уравнения модели регуляции *lexA-recA*-системы имеют вид:



$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{\alpha X_{01} \left( 1 + \left( \frac{X_{01}}{\gamma_1} \right)^{h_1} \right)}{1 + \left( \frac{X_1}{\gamma_1} \right)^{h_1}} - \beta_1 X_1 X_3 - \alpha X_1,$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \frac{\alpha X_{02} \left( 1 + \left( \frac{X_{01}}{\gamma_2} \right)^{h_2} \right)}{1 + \left( \frac{X_1}{\gamma_2} \right)^{h_2}} + \delta_3 X_3 - \beta_2 X_2 X_0 - \alpha X_2, \quad (4)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = \beta_2 X_2 X_0 - \delta_3 X_3.$$

Начальные условия для системы уравнений (4) следующие:

$$\begin{aligned} X_1(0) &= X_{01}, \\ X_2(0) &= X_{02}, \\ X_3(0) &= 0. \end{aligned} \quad (5)$$

В уравнениях (4)-(5)  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  – функции внутриклеточной концентрации белков LexA, RecA и RecA\* соответственно,  $X_{01}$ ,  $X_{02}$  – конstitutивные концентрации продуктов генов *lexA* и *recA* соответственно,  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\delta_3$  – константы скорости химических реакций.  $\gamma_1$  и  $\gamma_2$  – равновесные константы диссоциации мономера продукта гена *lexA* при связывании с операторными областями генов *lexA* и *recA* соответственно.  $h_1$ ,  $h_2$  – коэффициенты Хилла, характеризующие кооперативность связывания продукта гена *lexA* с операторными областями генов *lexA* и *recA* соответственно.

В разделе 2.2 математически описаны процессы, влияющие на скорость прироста и убыли концентрации белков UmuD, UmuC и UmuD'. Приведены уравнения, характеризующие динамику концентраций продуктов *umuDC*-генов:

$$\frac{dX_4}{dt} = \frac{X_{04}(\varepsilon X_{04} + \delta_4) \left( 1 + \left( \frac{X_{01}}{\gamma_4} \right)^{h_4} \right)}{1 + \left( \frac{X_1}{\gamma_4} \right)^{h_4}} + \sigma_1 X_6 X_{10} + \sigma_2 X_6 X_7 + \delta_6 X_6 -$$

$$-\beta_3 X_4 X_3 - \varepsilon X_4^2 - \varphi X_8 X_4 - \mu X_6 X_4 - b_2 X_{11} X_4 - \delta_4 X_4,$$

$$\frac{dX_5}{dt} = \frac{X_{05}(a_1 X_{07} + \delta_5) \left( 1 + \left( \frac{X_{01}}{\gamma_5} \right)^{h_5} \right)}{1 + \left( \frac{X_1}{\gamma_5} \right)^{h_5}} - a_1 X_7 X_5 - a_2 X_8 X_5 - a_3 X_9 X_5 - \delta_5 X_5, \quad (6)$$

$$\frac{dX_6}{dt} = \beta_3 X_4 X_3 + \varphi X_8 X_4 + b_2 X_{11} X_4 - \eta X_6^2 - \mu X_6 X_4 - \sigma_1 X_6 X_{10} -$$

$$-\sigma_2 X_6 X_7 - \delta_6 X_6.$$

Начальные условия для уравнений (6):

$$\begin{aligned} X_4(0) &= X_{04}, \\ X_5(0) &= X_{05}, \\ X_6(0) &= 0. \end{aligned} \quad (7)$$

В уравнениях (6)-(7)  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ ,  $X_8$ ,  $X_9$ ,  $X_{10}$  и  $X_{11}$  есть внутриклеточные концентрации белков UmuD, UmuC, UmuD', UmuD<sub>2</sub>, UmuD'<sub>2</sub>, UmuDD', UmuD<sub>2</sub>C и UmuD'<sub>2</sub>C соответственно.  $X_{04}$ ,  $X_{05}$  и  $X_{07}$  обозначают начальные концентрации белков UmuD, UmuC и UmuD<sub>2</sub> соответственно.  $h_4$ ,  $h_5$  – коэффициенты Хилла, характеризующие кооперативность связывания продукта гена *lexA* с операторными областями генов *umuD* и *umuC*.  $\gamma_4$  и  $\gamma_5$  – равновесные константы диссоциации мономера продукта гена *lexA* при связывании с операторными областями генов *umuD* и *umuC* соответственно.  $\varepsilon$ ,  $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\varphi$ ,  $\mu$ ,  $b_2$ ,  $\delta_4$ ,  $\delta_5$ ,  $\delta_6$ ,  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $\eta$  – параметры модели, характеризующие скорости химических реакций.

В разделе 2.3 изложена модель динамики концентраций димеризованных продуктов гена *umuD*. Основные уравнения модели записываются следующим образом:

$$\begin{aligned}
\frac{dX_7}{dt} &= \varepsilon X_4^2 - a_1 X_5 X_7 - \sigma_2 X_6 X_7 - \delta_7 X_7, \\
\frac{dX_8}{dt} &= \eta X_6^2 - \varphi X_8 X_4 - a_2 X_5 X_8 - \delta_8 X_8, \\
\frac{dX_9}{dt} &= \mu X_6 X_4 + \varphi X_8 X_4 + \sigma_2 X_6 X_7 - a_3 X_5 X_9 - \delta_9 X_9.
\end{aligned} \tag{8}$$

Здесь  $\delta_7$ ,  $\delta_8$  и  $\delta_9$  – параметры модели. Для системы уравнение (8) справедливы следующие начальные условия:

$$\begin{aligned}
X_7(0) &= X_{07}, \\
X_8(0) &= 0, \\
X_9(0) &= 0.
\end{aligned} \tag{9}$$

Таким образом, в начальный момент времени концентрация гомодимера  $\text{UmuD}_2$  есть величина, не равная нулю, поскольку в клетке всегда существует отличный от нуля конститутивный уровень неактивной формы продукта гена *umuD*. Начальная концентрация димеров  $\text{UmuD}'_2$  и  $\text{UmuDD}'$  принята равной нулю, так как в момент времени  $t = 0$  равна нулю концентрация активной формы продукта гена *recA*, при участии которой происходит образование  $\text{UmuD}'$ -субъединицы, необходимой для формирования гомодимера  $\text{UmuD}'_2$  и гетеродимера  $\text{UmuDD}'$ .

В разделе 2.4 изложена модель, описывающая динамику концентраций белковых комплексов системы SOS-ответа клеток *E. coli*, отвечающих за реализацию мутационного процесса и обеспечивающих клетке условия для осуществления длительной пострепликативной PolV-зависимой репарации. Уравнения, полученные для белковых комплексов  $\text{UmuD}_2\text{C}$ ,  $\text{UmuD}'_2\text{C}$  и  $\text{UmuDD}'\text{C}$  имеют вид:

$$\begin{aligned}
\frac{dX_{10}}{dt} &= a_1 X_7 X_5 - \sigma_1 X_6 X_{10} - \delta_{10} X_{10}, \\
\frac{dX_{11}}{dt} &= a_2 X_8 X_5 - b_2 X_{11} X_4 - \delta_{11} X_{11}, \\
\frac{dX_{12}}{dt} &= a_3 X_9 X_5 + b_2 X_{11} X_4 + \sigma_1 X_6 X_{10} - \delta_{12} X_{12},
\end{aligned} \tag{10}$$

где  $\delta_{10}$ ,  $\delta_{11}$  и  $\delta_{12}$  – параметры модели. Начальные условия для уравнений (10) записываются в виде:

$$\begin{aligned} X_{10}(0) &= X_{010}, \\ X_{11}(0) &= 0, \\ X_{12}(0) &= 0. \end{aligned} \tag{11}$$

Начальные концентрации белков  $UmuD'$ ,  $UmuDD'$ ,  $UmuD'_2$ ,  $UmuD'_2C$  и  $UmuDD'C$  приняты равными нулю по причине отсутствия в клетке  $UmuD'$ -субъединицы в неиндуцированной SOS-системе.

В разделе 2.5 определены параметры математической модели.

В разделе 2.6 введены безразмерные переменные и параметры модели. Представлены нормированные уравнения модели.

В третьей главе представлены результаты численного исследования уравнений модели. Получены зависимости концентраций белков  $LexA$ ,  $RecA$ ,  $RecA^*$ ,  $UmuD$ ,  $UmuC$ ,  $UmuD'$  от времени и флюенса энергии УФ-излучения (см. рис. 1, 2, 3). Впервые предсказана динамика концентраций двух регуляторных комплексов SOS-системы:  $UmuD_2C$  и  $UmuDD'C$  (см. рис. 3г, 3д) и димеризованных продуктов гена *umuD* и (см. рис. 4). Рассчитана динамика концентрации комплекса  $UmuD'_2C$  (ДНК-полимеразы V), играющего основную роль в реализации индуцированного мутационного процесса клеток *E. coli* (см. рис. 3е). Проведено исследование полученных решений. Определены положения максимумов и минимумов концентрации, а также времена, на которых они наблюдаются. Проанализировано смещение положения максимумов и минимумов во времени в зависимости от флюенса энергии УФ-излучения. Указаны возможные механизмы, определяющие характер полученных кривых и трёхмерных графиков. Выявлено совпадение теоретических результатов с экспериментальными данными.

В четвертой главе проведен анализ индукции генных мутаций в клетках *E. coli* при реализации translesion-синтеза. На основе экспериментальных данных проанализирована роль ДНК-полимеразы V в процессе translesion-синтеза. Описана математическая модель translesion-синтеза.

Выполнена количественная оценка частоты мутирования в *lacI*-локусе бактериальных клеток *E. coli*.

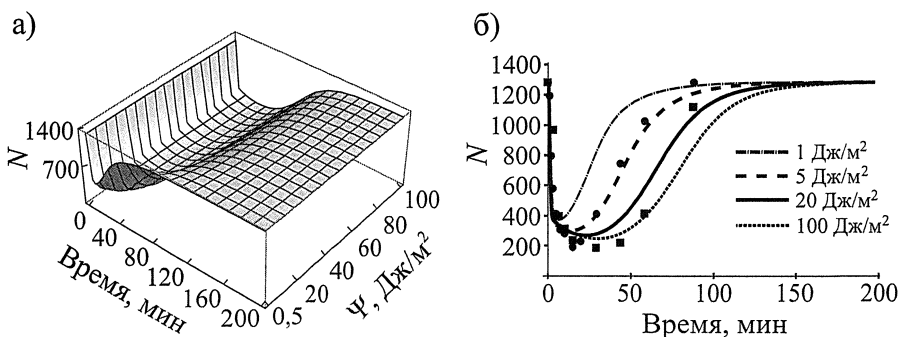


Рис. 1. Динамика концентрации белка LexA. а) Поверхность, характеризующая изменение концентрации белка LexA во времени и в зависимости от флюенса энергии  $\Psi$  УФ-излучения. б) Набор кривых, характеризующих динамику концентрации белка LexA при различных значениях флюенса энергии УФ-излучения. ● – экспериментальные данные для 5  $\text{Дж/м}^2$ , ■ – экспериментальные данные для 20  $\text{Дж/м}^2$  [Sassanfar, Roberts, 1990].  $N$  – внутриклеточная концентрация белка, выраженная в количестве молекул на клетку.

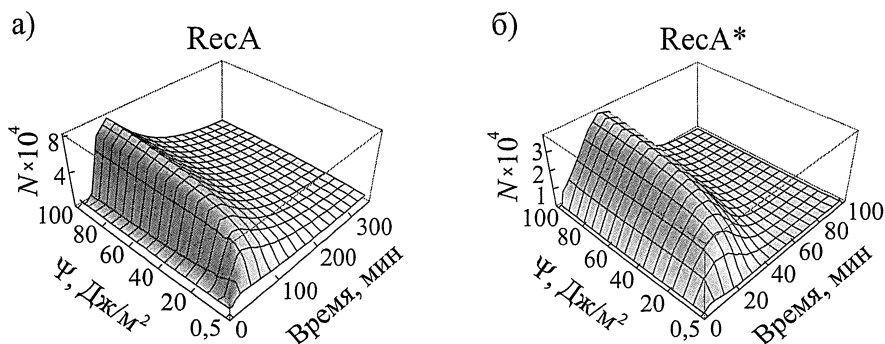


Рис. 2. Динамика концентрации белков RecA и RecA\* в зависимости от времени и флюенса энергии  $\Psi$  УФ-излучения.  $N$  – внутриклеточная концентрация белка, выраженная в количестве молекул на клетку.

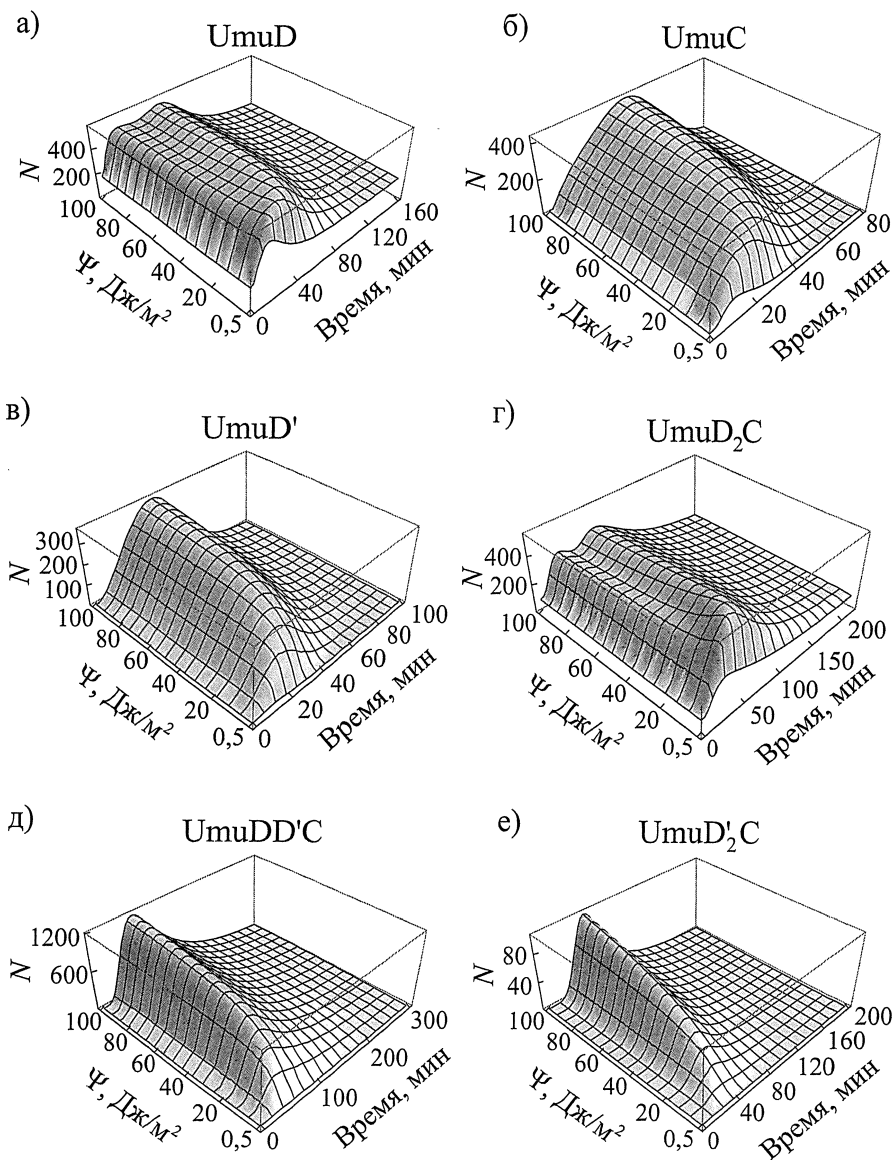


Рис. 3. Динамика концентрации белков UmuD, UmuC, UmuD', UmuD<sub>2</sub>C, UmuDD'C и UmuD'<sub>2</sub>C (ДНК-полимеразы V) в зависимости от времени и флюенса энергии  $\Psi$  УФ-излучения.  $N$  – внутриклеточная концентрация белка, выраженная в количестве молекул на клетку.

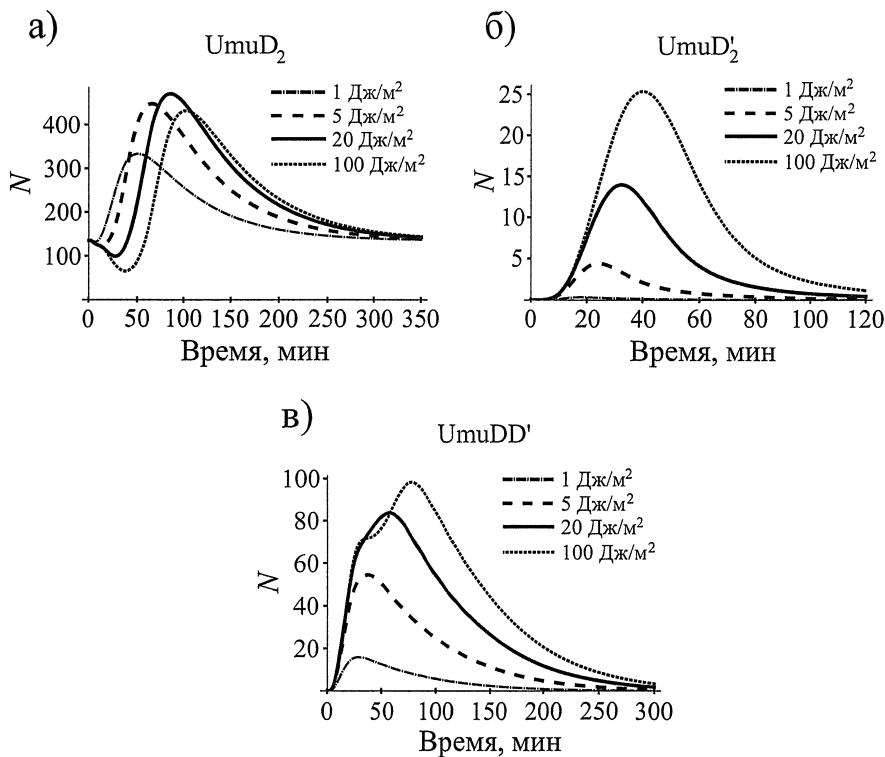


Рис. 4. Динамика концентрации димеризованных белковых продуктов гена *umuD*:  $UmuD_2$ ,  $UmuD'_2$ ,  $UmuDD'$ .  $N$  – внутриклеточная концентрация белка, выраженная в количестве молекул на клетку.

В разделе 4.1 показано, что ключевую роль в реализации процесса TLS играет ДНК-полимераза V, входящая в состав модифицированного репликационного комплекса PolV Mut. Индукция ДНК-полимеразы V в клетках *E. coli* сопровождается существенным увеличением числа мутаций, вызванных ошибками при прохождении модифицированного репликационного комплекса (мутасомы PolV Mut) через одонитевые участки цепи ДНК. Три другие ДНК-полимеразы (PolII, PolIII и PolIV) не оказывают существенного влияния на уровень генных мутаций при репликации ДНК.

В разделе 4.2 формализован динамический процесс возникновения ошибок при репликации ДНК с участием специфического репликационного

комплекса, образующегося в ходе SOS-ответа клеток *E. coli*. При анализе описанного механизма мутагенеза возникает необходимость моделирования случайной величины, представляющей собой число ошибок в цепи ДНК, возникающих в течение некоторого времени. При этом полагается, что данные события происходят с некоторой фиксированной средней интенсивностью и независимо друг от друга. Для оценки вероятности возникновения определённого количества ошибок в цепи ДНК было использовано распределение Пуассона.

В параграфе 4.2.1 описан алгоритм программы, определяющей параметр распределения Пуассона на основе рассчитанной ранее зависимости числа молекул ДНК-полимеразы  $V$  от времени и флюенса энергии УФ-излучения. Известно, что процесс translesion-синтеза обладает различными характеристиками в зависимости от времени и последовательности ДНК, на которой он происходит. В работе отдельно проанализированы процессы, реализуемые на тиминовых димерах, на одонитевых пробелах ДНК, исключая тиминовые димеры, и при синтезе на неповрежденной ДНК. Разработанная программа моделирует возникновение ошибок при движении модифицированного репликационного комплекса с учетом особенностей и характеристик всех трех процессов. Конечная формула для расчёта параметра распределения Пуассона  $a$  в зависимости от времени и флюенса энергии УФ-излучения имеет следующий вид:

$$a(t, \Psi) = P(X)(L_{und}(t, \Psi) + L_{ss}(t, \Psi)) + P(Y)L_{td}(t, \Psi), \quad (12)$$

где  $P(X)$  – вероятность подстановки комплексом PolV Mut некомплементарного нуклеотида на одонитевых участках цепи ДНК, не содержащих тиминовых димеров,  $P(Y)$  – вероятность подстановки некомплементарного нуклеотида при прохождении тиминовых димеров,  $L_{td}(t, \Psi)$  – количество нуклеотидов, пройденных на данный момент времени комплексом PolV Mut на тиминовых димерах,  $L_{ss}(t, \Psi)$  – число нуклеотидов, пройденных в пределах одонитевых пробелов, исключая тиминовые димеры,  $L_{und}(t, \Psi)$  – количество нуклеотидов, пройденных на неповрежденной ДНК. Величины  $L_{td}(t, \Psi)$ ,  $L_{ss}(t, \Psi)$ ,  $L_{und}(t, \Psi)$  рассчитываются в алгоритме программы с по-



мощью цикла пошагового вычисления количества пройденных нуклеотидов на соответствующих последовательностях ДНК.

В параграфе 4.2.2 приведены численные значения основных параметров математической модели translesion-синтеза.

В параграфе 4.2.3 представлены решения математической модели, которые представляют собой распределения вероятностей, характеризующие процесс возникновения ошибок в цепи ДНК при реализации TLS. Полученные функции исследованы во времени и в зависимости от флюенса энергии УФ-излучения. Найдены максимумы и минимумы функций, определено их временное положение при различных значениях флюенса энергии. Получены зависимости среднего числа ошибок от времени и флюенса энергии УФ-излучения (см. рис. 5). Решения модели translesion-синтеза проанализированы при двух граничных значениях параметра  $P(X)$ , характеризующего процесс синтеза ДНК на неповрежденной матрице с участием мутагенного репликационного комплекса.

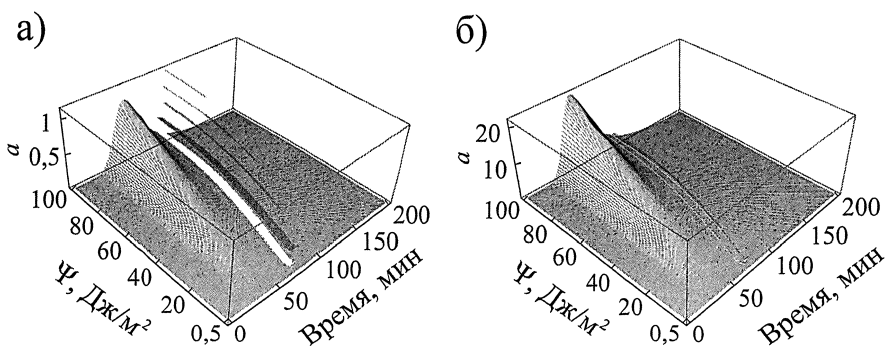


Рис. 5. Среднее число возникающих ошибок  $a$  в зависимости от времени и флюенса энергии УФ-излучения а) при  $P(X) = 1,3 \times 10^{-4}$ , б) при  $P(X) = 3,0 \times 10^{-3}$ .

Полученные результаты свидетельствуют о сложной и неоднозначной зависимости выхода ошибок при реализации translesion-синтеза от численного значения параметра  $P(X)$ . В настоящее время не существует экс-

периментально подтверждённых гипотез, способных объяснить причину изменения этой величины в столь широком диапазоне. Учитывая большое влияние этого параметра на решения математической модели, предполагается наличие специфического механизма, определяющего эффективность синтеза ДНК посредством комплекса PolV Mut на матрице, не содержащей тиминных димеров. Выявление такого механизма является важной задачей дальнейших экспериментальных исследований SOS-ответа. Успешное решение этой задачи позволит усовершенствовать предложенную математическую модель и подойти к более точной количественной оценке индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках.

В разделе 4.3 показана возможность применения изложенных расчетов для описания частоты мутирования в любом интересующем гене. На примере регуляторного *lacI*-локуса лактозного оперона клеток *E. coli* продемонстрирован метод нахождения кривых УФ-мутагенеза с помощью построенной модели.

В параграфе 4.3.1 изложены ключевые представления о гене *lacI*, основанные на современных экспериментальных данных.

В параграфе 4.3.2 проанализированы типы зависимости частоты мутирования от флюенса энергии УФ-излучения. Рассмотрены основные гипотезы, объясняющие характер зависимостей.

В параграфе 4.3.3 выполнен расчёт зависимости частоты мутирования от флюенса энергии УФ-излучения. Расчёт проведен на основании следующего выражения: [Е.А. Красавин, С. Козубек, 1991]

$$N_m / N(\Psi) = \theta_1 \Psi + \theta_2 \Psi (1 - e^{-\theta_3 \Psi}), \quad (13)$$

где  $N_m$  – количество мутантов,  $N$  – количество выживающих клеток,  $\theta_1 \Psi$  – линейный компонент зависимости. Величина  $\theta_2 \Psi$  пропорциональна выходу премутационных повреждений в гене *lacI*,  $1 - e^{-\theta_3 \Psi}$  – доля клеток, в которых индуцировалась мутагенная репарация. Коэффициенты  $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $\theta_3$  определены с использованием разработанной модели регуляции SOS-ответа, а также на основе экспериментальных данных.

В ходе исследования установлено, что коэффициент  $\theta_3$  в значительной степени зависит от численного значения параметра  $P(X)$ , характеризующего вероятность подстановки модифицированным репликационным комплексом некомплементарного нуклеотида на участках ДНК, не содержащих тиминового димера. Сравнение зависимостей  $N_m / N(\Psi)$ , полученных при различных значениях  $P(X)$ , позволило выявить сходство рассчитанных результатов с экспериментальными данными [Oller, et al., 1992] при значениях параметра  $P(X)$ , близких к  $2,1 \times 10^{-4}$  (см. рис. 6).

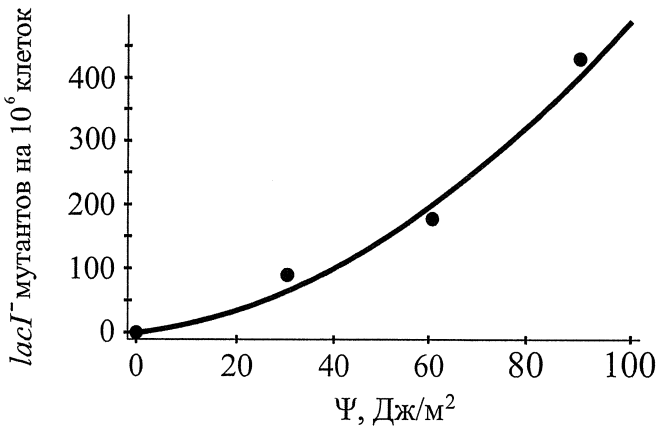


Рис. 6. Зависимость частоты мутаций в гене *lacI* *E. coli* от флюенса энергии УФ-излучения. Сплошная линия – результаты расчетов, точки – экспериментальны данные [Oller, et al., 1992].

В параграфе 4.3.4 получены решения модели при других значениях параметра  $P(X)$ . Для серии численных экспериментов было выбрано пять различных значений из отрезка  $1,3 \times 10^{-4} \leq P(X) \leq 3,0 \times 10^{-3}$ , включая граничные значения отрезка. Построены зависимости частоты мутаций от флюенса энергии УФ-излучения, соответствующие выбранным значениям  $P(X)$ . Анализ проведенных численных экспериментов позволил определить характер изменения зависимости  $N_m / N(\Psi)$  для гена *lacI* вследствие

вариации параметра  $P(X)$ . Сравнение полученных результатов с экспериментальными данными позволяет заключить, что модель корректно воспроизводит основные закономерности возрастания уровня мутагенеза с увеличением флюенса энергии УФ-излучения с точностью до эксперимента. При этом предполагается, что зависимости  $N_m / N(\Psi)$ , полученные при других значениях  $P(X)$  из отрезка  $1,3 \times 10^{-4} \leq P(X) \leq 3,0 \times 10^{-3}$ , также могут наблюдаться в экспериментах.

**В заключении** изложены основные результаты, полученные в диссертационной работе.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые модельные подходы, описывающие динамику взаимодействия основных белков SOS-системы, регулирующих мутагенную ветвь репарации в бактериальных клетках *E. coli*. Показано, что величина и временное положение максимумов и минимумов концентрации белков зависят от флюенса энергии УФ-излучения.
2. Установлено, что динамика концентрации димеров  $UmuD_2$ ,  $UmuD'_2$  и  $UmuDD'$  описывается кривой с локальным максимумом, смещающимся в область более поздних времён при увеличении флюенса энергии УФ-излучения. Для димера характерно падение концентрации белка на начальных временах работы SOS-системы.
3. Установлено, что при величине флюенса энергии свыше  $30 \text{ Дж/м}^2$  для белка  $UmuD$  и свыше  $49 \text{ Дж/м}^2$  для белка  $UmuD_2C$  наблюдается два пика концентрации этих белков, временное положение которых зависит от значения флюенса энергии УФ-излучения.
4. На основании расчётов, выполненных для ключевых регуляторных белков SOS-системы, построена математическая модель translesion-синтеза. Показано, что возрастание концентрации ДНК полимеразы  $V$  ведёт к увеличению количества ошибок, возникающих в ходе реализации translesion-синтеза.

5. Установлена связь между эффективностью реализации translesion-синтеза и выходом генных мутаций. На примере регуляторного *lacI*-гена *E. coli* произведен расчёт зависимости частоты образования *lacI*<sup>-</sup> мутаций в зависимости от флюенса энергии УФ-излучения. Показано совпадение результатов моделирования с экспериментальными данными при определённых значениях входных параметров.

#### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- [1] Белов О.В., Красавин Е.А., Пархоменко А.Ю. Математическая модель индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении // **Радиационная биология. Радиоэкология.** – 2009. Т. 49. № 5. – С. 617-628.
- [2] Belov O.V., Krasavin E.A., Parkhomenko A.Yu. Model of SOS-induced mutagenesis in bacteria *Escherichia coli* under ultraviolet irradiation // **J. Theor. Biol.** – 2009. – Vol. 261. – P. 388-395.
- [3] Белов О.В. Временная зависимость индуцирующего сигнала SOS-системы бактерии *E. coli* при ультрафиолетовом облучении // Письма в журнал «**Физика элементарных частиц и атомного ядра**». – 2007. – Т. 4. № 6(142). – С. 867-874.
- [4] Белов О.В., Красавин Е.А., Пархоменко А.Ю. Динамика SOS-ответа в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении // Письма в журнал «**Физика элементарных частиц и атомного ядра**». – 2009. Т. 6. № 3(152). – С. 418-439.
- [5] Белов О.В., Борейко А.В. Подходы к созданию математической модели индуцированного мутационного процесса у клеток *Escherichia coli* // Вестник Международного университета природы, общества и человека «Дубна». – 2006. № 2(15). - С. 39-46.
- [6] Белов О.В. Подходы к математическому моделированию экспрессии *recA*-, *umuD*-генов бактерий *Escherichia coli* при УФ-облучении: Сообщение ОИЯИ, Р19-2006-127, 2006. – 6 с.
- [7] Белов О.В., Шахматов В.С. Подходы к математическому моделированию индуцированного мутационного процесса у бактерий *Escherichia*

- coli*: Тез. докл. III Межд. симп. под эгидой ЮНЕСКО. – Дубна: ОИЯИ, 2006. – 166 с.
- [8] Белов О.В. Современные представления об организации SOS-системы в клетках *Escherichia coli*: Анн. докл. 13-я науч. конф. студ., аспирантов и молодых специалистов. – Дубна: МУПОЧ «Дубна», 2007. Ч.1. – 160 с.
- [9] Белов О.В. Моделирование кинетики индуцибельных белковых комплексов SOS-системы бактерий *E. coli*, осуществляющих процесс TLS: Сообщения ОИЯИ, P19-2007-47, 2007. – 11 с.
- [10] Белов О.В. Моделирование кинетики индуцибельных белковых комплексов SOS-системы бактерий *E. coli*, осуществляющих процесс TLS: Анн. докл. 14-я науч. конф. студ., аспирантов и молодых специалистов. – Дубна: МУПОЧ «Дубна», 2008. – 220 с.
- [11] Белов О.В., Красавин Е.А., Пархоменко А.Ю. Математическая модель индуцированного мутационного процесса бактерии *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении: Препринт – P19-2008-105. Дубна: ОИЯИ, 2008. – 20 с.
- [12] Белов О.В., Пархоменко А.Ю. Математическая модель индуцированного мутационного процесса у бактерий *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении: Анн. докл. 15-я науч. конф. студ., аспирантов и молодых специалистов. – Дубна: МУПОЧ «Дубна», 2008. Ч.1. – 169 с.
- [13] Белов О.В., Красавин Е.А., Пархоменко А.Ю. Model of SOS-induced mutagenesis in bacteria *Escherichia coli* under ultraviolet irradiation: Тез. докл. Вторые чтения, посвящённые памяти В.И. Корогодина и В.А. Шевченко. – Дубна: ОИЯИ, 2009. – 107с.
- [14] Белов О.В., Красавин Е.А., Пархоменко А.Ю. Моделирование индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках: Анн. докл. XIII науч. конф. мол. учёных и специалистов ОИЯИ. – Дубна: ОИЯИ, 2009. – 234 с.
- [15] Белов О.В., Пархоменко А.Ю. Математическая модель индуцированного мутационного процесса в бактериальных клетках *Escherichia coli* при ультрафиолетовом облучении: Тез. докл. VIII Конф. мол. ученых, специалистов и студ. – М.: ГНЦ РФ-ИМБП РАН, 2009. – 66 с.

Отпечатано методом прямого репродуцирования  
с оригинала, предоставленного автором.

Подписано в печать 26.02.2010.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 1,44. Уч.-изд. л. 1,27. Тираж 100 экз. Заказ № 56903.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований  
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.

E-mail: [publish@jinr.ru](mailto:publish@jinr.ru)

[www.jinr.ru/publish/](http://www.jinr.ru/publish/)