

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *DPS* *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ ТОКСИЧЕСКИХ АГЕНТОВ: АНАЛИЗ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

В.А. Лихошвай<sup>1,2</sup>, Т.Ю. Степанова<sup>1</sup>, А.В. Задорожный<sup>1</sup>,  
Н.В. Тикунова<sup>3</sup>, Т.М. Хлебодарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: likho@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

<sup>3</sup> Учреждение Российской академии наук Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Геносенсорная конструкция на основе промотора гена *dps* *Escherichia coli* и репортерного гена *gfp* (*E. coli/pDps-gfp*) была использована для анализа механизмов экспрессии гена *dps* в присутствии фенола, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и солей кадмия методами математического моделирования. Прогнозируется простой механизм активации геносенсора в ответ на фенол и комплексный, с достаточно сложной ингибирующей компонентой, в ответ на перекись водорода. Что касается ответа геносенсора на кадмий, то для него прогнозируется сложный комплексный механизм, который может быть описан разными моделями. Первая модель предполагает наличие одного сайта связывания для РНК-полимеразы в промоторе гена *dps* *E. coli* и сложное взаимодействие между несколькими транскрипционными факторами, вторая – двух альтернативных сайтов связывания для двух различных РНК-полимераз и, возможно, наличие в регуляторной области гена *dps* двух независимых промоторов. Параметры второй модели позволяют считать ее более предпочтительной.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, *dps*, *gfp*, геносенсор, математическое моделирование, регуляция транскрипции.

### Введение

Ген *dps* *Escherichia coli* кодирует структуру ДНК-связывающего белка, который в стационарной фазе роста является одним из основных белков нуклеоида, образуя с ним стабильный комплекс (Almirón *et al.*, 1992; Ali Azam *et al.*, 1999). Показано, что в стационарной фазе роста он защищает клетки от множественных стрессов, включая окислительный стресс, UV и  $\gamma$ -облучение, термальный стресс, кислотный и щелочной шок, а также повышает устойчивость клеток к токсическому воздействию меди и железа (Nair, Finkel, 2004). В экспоненциальной фазе роста этот белок появляется в присутствии окисляющих агентов, защищая в первую очередь ДНК от их повреждающего воздействия (Martinez, Kolter, 1997). Данные microarray также свидетельствуют о чувствительности гена

*dps* *E. coli* к различным внешним воздействиям (Pomposiello *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2001; Khil, Camerini-Otero, 2002; Phadtare *et al.*, 2002).

В настоящее время механизмы регуляции экспрессии гена *dps* *E. coli* изучены недостаточно. Известно, что его экспрессия в условиях окислительного стресса регулируется через транскрипционный фактор (ТФ) ОхуR (Altuvia *et al.*, 1994), а индукция экспрессии в условиях голодания, холода и осмотического стресса зависит от присутствия *groS* полимеразы (Lomovskaya *et al.*, 1994; Phadtare *et al.*, 2002). Недавно показано, что в логарифмической фазе роста наблюдается селективная репрессия экспрессии этого гена через взаимодействие *groD* полимеразы (sigma 70) с ТФ Fis и H-NS (Grainger *et al.*, 2008).

Ранее нами на основе промотора гена *dps* *E. coli* и репортерного гена *gfp* был создан геносенсор,

который, согласно предварительным данным, оказался чувствителен к перекиси водорода, фенолу и митомцину С (Khlebodarova *et al.*, 2007). Что касается перекиси водорода, то, как указано выше, этот факт не является новым, так как известно, что промотор гена *dps* содержит сайт связывания ТФ OxyR (Altuvia *et al.*, 1994), и у мутантов по этому фактору индукция экспрессии гена *dps* в присутствии перекиси водорода резко падает (Zheng *et al.*, 2001). Однако механизмы активации этого гена фенолом и митомцином С неизвестны, как неизвестны механизмы реализации его ответов на большинство из перечисленных выше стрессовых воздействий.

Данная работа посвящена оценке сложности механизмов функционирования геносенсора на основе промотора гена *dps E. coli* в присутствии фенола, кадмия и перекиси водорода методами математического моделирования.

### Алгоритмы и методы

Структура промоторной области гена *dps E. coli* была описана ранее (Altuvia *et al.*, 1994; Lomovskaya *et al.*, 1994). Для ее клонирования в качестве праймеров в реакции ПЦР использовали олигонуклеотиды 5'-CTCTGGGCCCCAATAAGAATTGTTCTTATCAATATATCTAAC и 5'-GAAGGCATGCATAATTTTCATATCCTCTTGATGTTATGTC. Для синтеза ПЦР-фрагмента промотора гена *dps* в качестве матрицы использовали ДНК *E. coli* HB101. Экспериментальное конструирование геносенсорной конструкции на основе промотора гена *dps* с использованием базового вектора pRS-GFP<sub>aaV</sub> описано ранее (Khlebodarova *et al.*, 2007).

Для проверки способности полученного рекомбинантного штамма *E. coli/pDps-gfp* функционировать в качестве геносенсора в ответ на присутствие в среде токсических агентов клетки *E. coli* JM109, трансформированные плазмидой pDps-gfp, культивировали в течение ночи, наутро переседали в свежую среду LB с ампициллином и растили до среднелогарифмической стадии. Поскольку среда LB имеет собственную флюоресценцию в диапазоне флюоресценции Gfp-белка, клетки геносенсора *E. coli/pDps-gfp* переносили в минимальную среду M9 следующего состава: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,03 %, NaCl

0,005 %, NH<sub>4</sub>Cl 0,01 %. В качестве токсических агентов были использованы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (агент окислительного стресса), фенол (повреждение мембран и белков) и тяжелые металлы, в частности, Cd<sup>2+</sup>. Чувствительность клеток *E. coli/pDps-gfp* к присутствию токсических агентов оценивали по уровню флюоресценции (возбуждение с максимумом 485 нм, 0,1с; максимум эмиссии – 535 нм) при температуре культивирования 26 °С и 32 °С. Все эксперименты были проведены в 3–4 независимых повторах. Флюоресценцию измеряли с помощью флюориметра Perkin Elmer VICTOR<sup>3</sup> в относительных единицах. Уровень индукции представляет собой отношение максимальной флюоресценции в опыте к базовому уровню флюоресценции. В качестве базового уровня использовали уровень флюоресценции клеток *E. coli/pDps-gfp*, не подвергшихся воздействию токсических агентов.

Для оценки сложности механизмов H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, Cd<sup>2+</sup> и фенол-зависимой регуляции эффективности промотора гена *dps E. coli* в составе геносенсора *E. coli/pDps-gfp* использовали рациональные полиномы вида:

$$V_{n,m}(s) = \frac{w + v \left( \frac{s}{k_1} \right)^n}{1 + \frac{\left( 1 + \left( \frac{s}{k_1} \right)^n \right) \left( 1 + \left( \frac{s}{k_2} \right)^m \right)}{w + v \left( \frac{s_0}{k_1} \right)^n}}, \quad (1)$$

$$1 + \frac{\left( 1 + \left( \frac{s_0}{k_1} \right)^n \right) \left( 1 + \left( \frac{s_0}{k_2} \right)^m \right)}$$

где  $s$  имеет смысл текущей концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cd<sup>2+</sup> или фенола, изменяемой в эксперименте, а  $s_0$  – фиксированная концентрация того же вещества,  $k_1, k_2$  – константы, имеющие размерность концентрации, определяющие эффективность влияния токсического агента на активность промотора,  $w$  – отношение активности промотора в отсутствие агента к величине фонового сигнала флюоресценции,  $v$  – отношение константы эффективности инициации транскрипции активированной формы промотора к величине фонового сигнала флюоресценции. Параметры  $n$  характеризует комплексность влияния агента на активацию промотора,  $m$  характеризует комплексность влияния агента на репрессию промотора. Вели-

чины параметров  $n$  и  $m$  дают нам представление о совокупной сложности механизма регуляции активности промотора токсическим агентом. Чем выше значения  $n$  и  $m$ , тем большая сложность механизма прогнозируется. Физический смысл значений  $n$  и  $m$  является комплексным. Они одновременно отражают и возможную субъединичность транскрипционных факторов, через которые действует агент, и количество сайтов связывания транскрипционных факторов, и возможную каскадность механизма регуляции, и синергические взаимодействия транскрипционных факторов. Данные, которые использованы в настоящей работе, не позволяют разделить эти гипотезы.

Близость функции (1) к экспериментальным точкам оценивали по минимальному значению взвешенного отклонения  $L = \sum_i \left( \frac{V_i}{A_i} + \frac{A_i}{V_i} - 2 \right)$ , где  $i$  пробегает по всем экспериментальным точкам, пронумерованным в порядке возрастания значения концентрации варьируемого агента.  $V_i$  обозначает вычисленную по формуле активность ответа, соответствующего  $i$ -му значению концентрации агента,  $A_i$  обозначает экспериментально измеренную активность ответа при  $i$ -ом значении концентрации агента. Лучшей считается аппроксимация, при которой значение  $L$  является наименьшим. Поиск минимума функционала  $L$  осуществлялся методом покоординатного спуска.

## Результаты и обсуждение

### Разработка численных моделей функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp*

Для оценки сложности механизмов  $H_2O_2$ - и фенол-зависимой регуляции эффективности промотора гена *dps E. coli* при различных температурах использовались экспериментальные данные, полученные ранее (Khlebodarova *et al.*, 2007; Peltek *et al.*, 2008). Для оценки сложности механизма  $Cd^{2+}$ -зависимой регуляции функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* использовались экспериментальные данные, представленные ниже. Интенсивность флюоресценции репортерного белка Gfp при разных

концентрациях токсических агентов интерпретировалась как величина относительной активности промотора. В силу условности шкалы измерения уровня флюоресценции белка Gfp экспериментальные точки, соответствующие исследуемому временному срезу, были нормированы на величину фоновой интенсивности флюоресценции клеток в отсутствие токсического агента, как это описано в разделе «Методы».

### Модель функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в условиях окислительного стресса

Для построения модели функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в условиях окислительного стресса были взяты значения интенсивности флюоресценции клеток геносенсора в момент достижения максимального ответа на стресс через 70 мин после начала воздействия перекиси водорода при температуре 26 °C и 32 °C. Их численные значения приведены в табл. 1.

Сложность механизма регуляции экспрессии промотора гена *dps E. coli* перекисью водорода оценивалась вектором  $(n, m)$ , где значение  $n$  характеризует сложность активирующей составляющей механизма, а значение  $m$  – ингибирующей. Основываясь на колоколообразном характере кривой интенсивности флюоресценции (табл. 1), заключаем, что промотор должен активироваться малыми концентрациями перекиси и ингибироваться большими. В работе мы исходим из гипотезы о том, что воздействие  $H_2O_2$  на промотор осуществляется через ТФ, которые имеют один или несколько сайтов связывания в промоторе гена *dps*. Так как нельзя исключить, что физически активирующие и ингибирующие механизмы могут конкурировать или не конкурировать между собой, то сайты, через которые осуществляются оба типа регулирования, могут присутствовать в промоторной области в любой комбинации: не пересекаться, пересекаться или даже быть идентичными. Для оценки значений  $n$  и  $m$  используем модель (1). Результаты минимизации функционала  $L$  при различных экспериментальных условиях представлены в табл. 2.

Таблица 1

Уровни индукции флюоресценции клеток геносенсора *E. coli/pDps-gfp* различными концентрациями перекиси водорода и фенола

Токсический агент	Концентрация, мМ	Значение сигнала, усл. ед.	
		26 °С	32 °С
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,68	4,9	3,9
	1,25	6,4	5,9
	2,5	7,6	7,7
	5	5,1	5,5
Фенол	0,8	1,2	2,1
	1,6	1,7	2,6
	3,2	2,2	3,0

Таблица 2

Результаты адаптации модели (1) регуляции активности промотора гена *dps E. coli* перекисью водорода и фенолом при температуре 26 °С и 32 °С

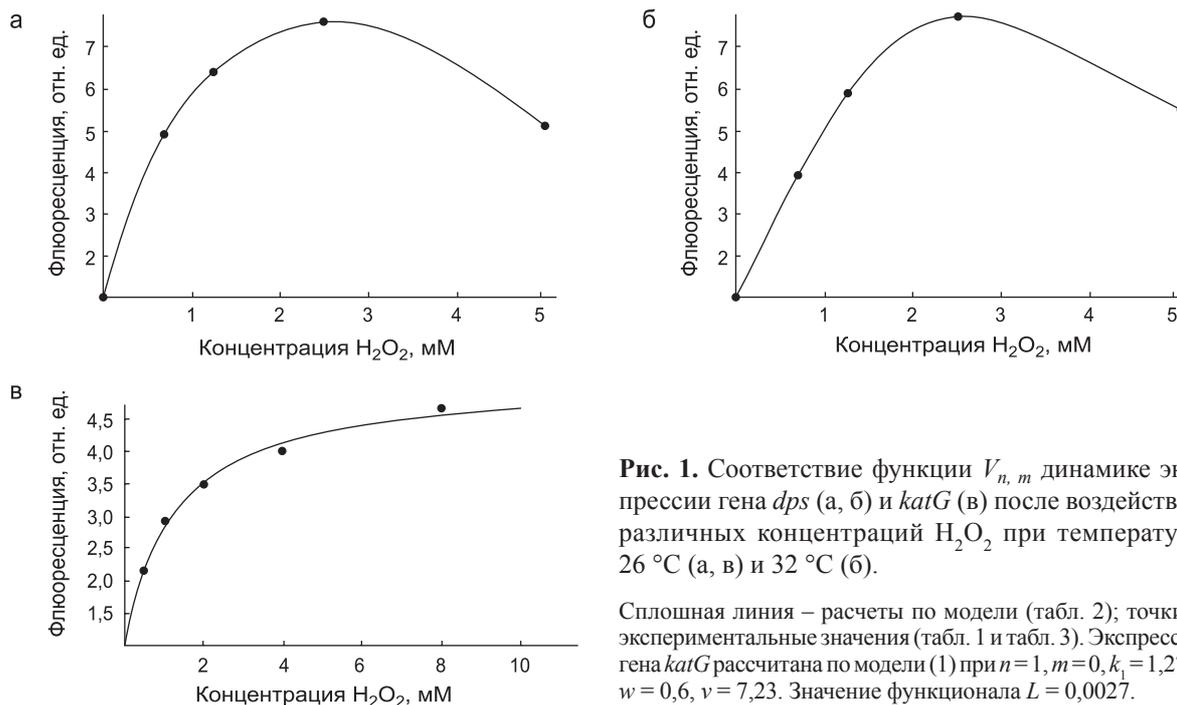
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Фенол	
26 °С	32 °С	26 °С	32 °С
$v = 10,1$	$v = 87,4$	$v = 1,4$	$v = 2,5$
$k_1 = 1,1$	$k_1 = 18,8$	$k_1 = 1,6$	$k_1 = 1$
$k_2 = 5,0$	$k_2 = 3,3$	$k_2 = \infty$	$k_2 = \infty$
$n = 1,0$	$n = 1,01$	$n = 2,575$	$n = 1,175$
$m = 3,9$	$m = 2,6$	$m = 0$	$m = 0$
$L = 1,5 \cdot 10^{-6}$	$L = 1,5 \cdot 10^{-6}$	$L = 3,8 \cdot 10^{-8}$	$L = 2,1 \cdot 10^{-7}$

На рис. 1, а показано соответствие функции  $V_{n,m}$  (1) динамике экспрессии гена *dps E. coli* в условиях окислительного стресса при различных температурах.

Из результатов адаптации модели (1) видно, что активность промотора гена *dps E. coli* регулируется через комплексный механизм, слабо зависящий от температуры. Из равенства  $n = 1$  для активирующей составляющей прогнозируется простой молекулярно-генетический механизм, который хорошо согласуется с известным фактом наличия у данного промотора сайта связывания для ТФ ОхуR, через который и осуществляется активация промотора перекисью водорода (Altuvia *et al.*, 1994). Механизм ингибирования, напротив, может иметь более сложную природу, так как оптимальное значение  $m$  в зависимости от температуры лежит в интервале 2,5–3,4. Для его осуществления можно прогнозировать либо наличие нескольких сайтов, либо мультимерность ТФ, либо каскадный механизм, либо присутствие всех элементов

одновременно. Косвенно обоснованность того, что механизм ингибирования промотора гена *dps* в присутствии перекиси водорода связан с молекулярно-генетическими процессами, а не является следствием гибели клеток в исследуемом интервале концентраций, можно проверить при оценке предложенным методом сложности регуляции экспрессии другого гена с известным механизмом ответа на перекись водорода. Ниже мы приводим подобный анализ для геносенсора на основе промотора гена *katG E. coli*, разработанного нами на той же базовой основе, что и геносенсор *E. coli/pDps-gfp* (Tikunova *et al.*, 2007). Продукт этого гена, фермент каталаза, является одним из ключевых компонентов защитной реакции клетки от окислительного стресса. Его активация в условиях стресса осуществляется через известный ОхуR-зависимый механизм (Tartaglia *et al.*, 1989).

Для оценки параметров были использованы собственные экспериментальные данные по влиянию различных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на



**Рис. 1.** Соответствие функции  $V_{n,m}$  динамике экспрессии гена *dps* (а, б) и *katG* (в) после воздействия различных концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при температуре 26 °С (а, в) и 32 °С (б).

Сплошная линия – расчеты по модели (табл. 2); точки – экспериментальные значения (табл. 1 и табл. 3). Экспрессия гена *katG* рассчитана по модели (1) при  $n=1, m=0, k_1=1,275, w=0,6, v=7,23$ . Значение функционала  $L=0,0027$ .

флюоресценцию клеток геносенсора *E. coli/pKat-gfp* при температуре 26 °С (Тикунова *et al.*, 2007). Значения взяты в момент максимального ответа на стресс через 40 мин после начала воздействия перекиси. Экспериментальные точки, соответствующие временному срезу 40 мин, были нормированы на величину фоновой интенсивности флюоресценции клеток в отсутствие перекиси водорода. Их значения приведены в табл. 3. Результаты аппроксимации модели приведены на рис. 1, в. Видно, что динамика ответа *E. coli/pKat-gfp* на стресс хорошо описывается простейшим видом формулы (1), который получается при  $n=1$  и  $m=0$ . Строение функции

согласуется с наличием у данного промотора сайта для ТФ ОхуR, через который и осуществляется активация промотора перекисью водорода (Tartaglia *et al.*, 1989). Видно также, что концентрации перекиси водорода выше 2,5 мМ не снижают уровень ответа геносенсора *E. coli/pKat-gfp* на присутствие токсического агента. Эти данные косвенно свидетельствуют о специфичности ответа геносенсора *E. coli/pDps-gfp* на воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в интервале концентраций от 2,5 до 5 мМ (рис. 1, а, б), однако для выяснения конкретных механизмов его ингибирования в этом интервале концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> необходимы дополнительные исследования.

**Таблица 3**

Уровни индукции флюоресценции клеток геносенсора *E. coli/pKat-gfp* и *E. coli/pDps-gfp* различными концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и Cd<sup>2+</sup> соответственно

<i>E. coli/pKat-gfp</i>		<i>E. coli/pDps-gfp</i>	
Концентрация H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , мМ	Значение сигнала, усл. ед.	Концентрация Cd <sup>2+</sup> , мМ	Значение сигнала, усл. ед.
0	1	0,031	1,6
0,5	2,17	0,062	4,6
1,0	2,92	0,125	6,2
2,0	3,5	0,25	2,55
4,0	4,0	0,5	1,4
8,0	4,7	1,0	3,5
		2,0	4,1

Следует отметить, что в последнее время появились данные, которые свидетельствуют о селективной репрессии промотора гена *dps* *E. coli* транскрипционными факторами Fis и H-NS через взаимодействие с groD-полимеразой (Grainger *et al.*, 2008), однако участвуют ли они в развитии описанной защитной реакции – неизвестно.

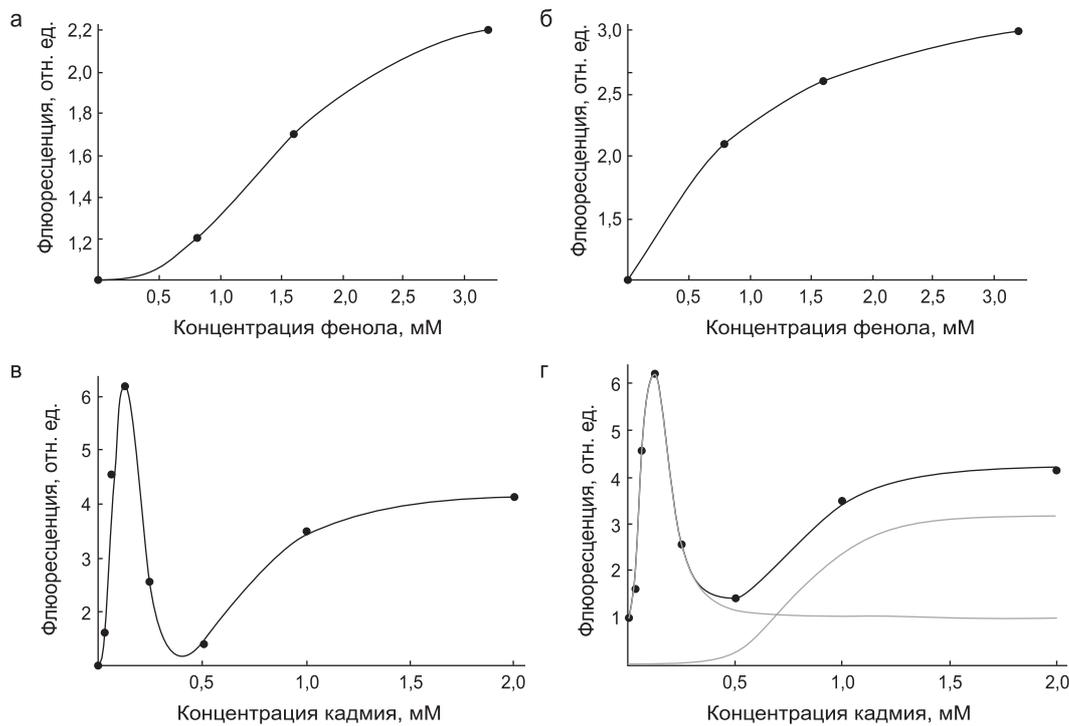
### Модель функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в присутствии фенола

Анализ полученных ранее данных показал, что в присутствии фенола уровень флюоресценции клеток геносенсора с повышением температуры увеличивается, а время достижения максимального ответа уменьшается (Khlebodarova *et al.*, 2007; Peltek *et al.*, 2008). Для построения модели функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* под воздействием фенола были взяты значения интенсивности флюоресценции клеток геносенсора в момент

достижения максимального ответа на стресс через 40 и 20 минут после начала воздействия токсического агента при температурах 26 °С и 32 °С соответственно. Численные значения этих параметров приведены в табл. 1. Основываясь на монотонном характере кривой интенсивности флюоресценции, заключаем, что промотор должен активироваться фенолом. Ингибирование фенолом, если имеет место, то в эксперименте не проявляется. Данное предположение подтвердилось результатами минимизации функционала L при различных экспериментальных условиях, представленными в табл. 2.

На рис. 2 (а, б) показано соответствие функции  $V_{n,m}$  (1) динамике экспрессии геносенсора *E. coli/pDps-gfp* под воздействием фенола при различных температурах.

Из результатов адаптации видно, что активность промотора гена *dps* *E. coli* регулируется через активирующий механизм ( $m = 0$ ). Значение  $n$  в зависимости от температуры заключено в границах от 1 до 3, поэтому для фенола при



**Рис. 2.** Соответствие теоретических расчетов динамике экспрессии геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в ответ на фенол (а, б) и кадмий (в, г).

Точки – экспериментальные значения экспрессии геносенсора после воздействия различных концентраций токсических агентов в момент максимального ответа на стресс при температуре 26 °С (а, в, г) и 32 °С (б) (табл. 1 и 3); сплошная линия – расчеты по модели 1 (а, б), 2 (в) и 3 (г) (табл. 2 и 4).

температуре, более близкой к оптимальной (32 °С), прогнозируется достаточно простой молекулярно-генетический механизм ( $n = 1,175$ ). При более низкой температуре (26 °С) механизм активации может иметь более сложную природу ( $n = 2,575$ ).

В настоящее время в промоторе гена *dps* *E. coli* не описано сайтов связывания ТФ, через которые можно было бы объяснить возможность этой активации. Однако следует отметить, что в области  $-32/-5$  от известного старта транскрипции в промоторе гена *dps* *E. coli* (Altuvia *et al.*, 1994) присутствует хорошо выраженный консенсус сайта связывания стрессовой полимеразы RpoE (Rezuchova *et al.*, 2003), экспрессия которой индуцируется в ответ на повреждение структуры мембранных белков (Raivio, Silhavy, 2001). Мы полагаем, что через эту полимеразу может реализоваться ответ на фенол.

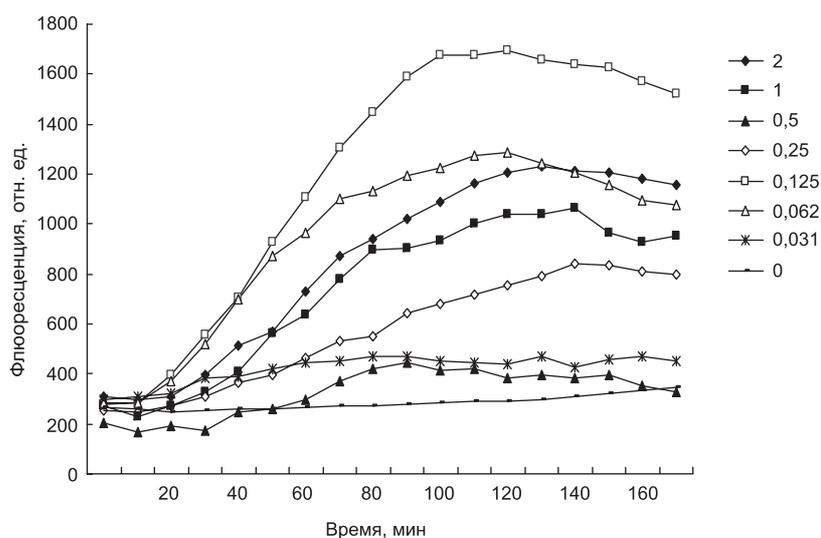
### Модели функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в присутствии $Cd^{2+}$

Ранее не было данных об активации экспрессии гена *dps* *E. coli* в присутствии тяжелых металлов. Однако, основываясь на способности ионов кадмия образовывать формы активного кислорода, мы предположили участие гена *dps* в защите клеток *E. coli* от действия ионов данного металла. И действительно, как видно из рис. 3,

клетки геносенсора *E. coli/pDps-gfp* реагировали изменением флюоресценции на присутствие  $Cd^{2+}$  в среде, причем максимальный уровень флюоресценции клеток при температуре 26 °С наблюдали через 100–120 мин. Как следует из этих данных, динамика изменения уровня индукции геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в исследуемом диапазоне концентраций (0,031–2,0 мМ) носит нелинейный характер и при концентрации кадмия, равной 0,5 мМ, падает практически до фоновых значений. Максимальный уровень индукции флюоресценции клеток геносенсора наблюдали при концентрации  $Cd^{2+}$ , равной 0,125 мМ, и его значение было 6,2.

Полученные данные были использованы для оценки сложности механизмов  $Cd^{2+}$ -зависимой регуляции эффективности промотора гена *dps* *E. coli*. Для построения модели функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* под воздействием ионов кадмия были взяты значения интенсивности флюоресценции клеток геносенсора в момент достижения максимального ответа на стресс через 110 мин после начала воздействия токсического агента. Экспериментальные точки, соответствующие временному срезу 110 мин, были нормированы как описано выше. Их численные значения приведены в табл. 3.

Что мы можем сказать о деталях возможного механизма, еще не приступая к вычислениям? Основываясь только на наличии двух пиков



**Рис. 3.** Влияние различных концентраций  $Cd^{2+}$  (0,031–2,0 мМ) на флюоресценцию клеток линии *E. coli/pDps-gfp* в сравнении с контрольными клетками при температуре 26 °С.

у кривой интенсивности флюоресценции, можно предположить наличие трех областей концентрации кадмия. В пределах области минимальных и максимальных концентраций наблюдается высокая активность экспрессии промотора (кадмий действует как интегральный активатор). В границах промежуточных концентраций преобладающим является механизм ингибирования (кадмий действует как ингибитор). Данные закономерности позволяют предложить две различные модели. Первая модель предполагает наличие одного сайта связывания для РНК-полимеразы в промоторе гена *dps E. coli*. Для описания функционирования такого промотора мы использовали рациональный полином вида

$$W_1(s) = \frac{V_1(s)}{V_1(0)};$$

$$V_1(s) = \frac{1 + v_{11} \left(\frac{s}{k_{11}}\right)^{n_{11}} + v_{12} \left(\frac{s}{k_{13}}\right)^{n_{13}}}{1 + \left(\frac{s}{k_{11}}\right)^{n_{11}} + \left(\frac{s}{k_{12}}\right)^{n_{12}} + \left(\frac{s}{k_{13}}\right)^{n_{13}}}. \quad (2)$$

Вторая модель предполагает наличие двух альтернативных сайтов связывания для двух различных РНК-полимераз и соответственно наличие в регуляторной области гена *dps* двух независимых промоторов. Для описания их функционирования мы использовали рациональный полином вида:

$$W_2(s) = \frac{V_2(s)}{V_2(0)};$$

$$V_2(s) = 1 + \frac{v_{21} \left(\frac{s}{k_{21}}\right)^{n_{21}}}{1 + \left(\frac{s}{k_{21}}\right)^{n_{21}} + \left(\frac{s}{k_{22}}\right)^{n_{22}}} + \frac{v_{22} \left(\frac{s}{k_{23}}\right)^{n_{23}}}{1 + \left(\frac{s}{k_{23}}\right)^{n_{23}}}. \quad (3)$$

Здесь  $n_{11}$ ,  $n_{12}$ ,  $n_{13}$  в (2) и  $n_{21}$ ,  $n_{22}$ ,  $n_{23}$  в (3) характеризуют комплексность влияния кадмия на активность промотора,  $k_{11}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{13}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{22}$ ,  $k_{23}$  – константы, имеющие размерность концентраций, в которых проводится измерение,  $v_{11}$ ,  $v_{12}$ ,  $v_{21}$ ,  $v_{22}$  – отношение активности соответствующего состояния промотора к активности, которая складывается из конститутивной активности промотора в отсутствие кадмия плюс естественный фоновый сигнал флюоресценции.

Предполагается, что кадмий действует на активность промотора через соответствующие факторы. Структура моделей (2) и (3) отражает принятые предположения о структуре промотора. Например в знаменателе выражения для  $V_1(s)$  присутствуют 4 слагаемых. Первое слагаемое, число 1, соответствует исходной форме промотора, которая реализуется в отсутствие действия активных форм транскрипционных факторов, второе слагаемое,  $\left(\frac{s}{k_{11}}\right)^{n_{11}}$ , отвечает состоянию промотора, в котором происходит его активация низкими концентрациями кадмия. Третье слагаемое,  $\left(\frac{s}{k_{12}}\right)^{n_{12}}$ , в формуле (2) отвечает состоянию промотора, в котором происходит его подавление промежуточными концентрациями кадмия. И наконец, четвертое слагаемое,  $\left(\frac{s}{k_{13}}\right)^{n_{13}}$ , отвечает состоянию промотора, которое активируется высокими концентрациями кадмия. Модель (2) реализована при дополнительном предположении, что все выделенные состояния являются взаимоисключающими (действие осуществляется через некоторые механизмы, которые не раскрываются, но в формуле они отражаются в виде соответствующих слагаемых, зависящих от концентрации кадмия).

Выражение  $V_2(s)$  состоит из трех слагаемых. Первое слагаемое, число 1, отражает возможную конститутивную активность промотора плюс фон, второе слагаемое отвечает состоянию первого промотора, в котором происходит его активация низкими концентрациями кадмия и подавление промежуточными концентрациями кадмия. И наконец, третье слагаемое отвечает состоянию второго промотора, который активен при высоких концентрациях кадмия. Модель (3) реализована при дополнительном предположении, что все выделенные состояния первого промотора являются взаимоисключающими. Величины параметров  $n$  характеризуют сложность механизма регуляции активности промотора кадмием. Чем выше значения  $n$ , тем большая сложность механизма прогнозируется. Биохимический смысл значений  $n$  на данном этапе анализа не может быть однозначно распознан. Они могут отражать и возможную

Таблица 4

Результаты адаптации модели (2) и (3) регуляции активности промотора гена *dps E. coli* кадмием

Модель	Значения констант							
	$v_1$	$v_2$	$k_1$	$k_2$	$k_3$	$n_1$	$n_2$	$n_3$
(2)	11,8	4,25	0,1	0,14	0,2475	2,0	5,5	8,75
(3)	11,25	3,2	0,1	0,13	0,8	2,0	5,5	5,0

субъединичность транскрипционных факторов, через которые действует кадмий, и количество сайтов связывания транскрипционных факторов, и возможную каскадность механизма регуляции, и синергические взаимодействия транскрипционных факторов. Данные, которые использованы в настоящей работе, не позволяют разделить эти гипотезы.

На рис. 2 (в, г) показаны графики поведения функций (2) и (3) в сравнении с данными экспериментов. Параметры моделей приведены в табл. 4.

Из результатов адаптации можно заключить, что активность промотора гена *dps E. coli* удовлетворительно описывается обеими функциями. Для разделения гипотез, положенных в основу моделей (2) и (3), необходимо проведение дополнительного анализа структурной организации промоторной зоны гена *dps*. Следует только отметить, что в логарифмическую фазу роста культуры *E. coli* регуляция экспрессии гена *dps* осуществляется через взаимодействие транскрипционных факторов с *groD*-полимеразой (Altuvia *et al.*, 1994; Grainger *et al.*, 2008). Однако в настоящее время в промоторе гена *dps* не описано сайтов связывания для ТФ, через которые мог бы реализоваться такой сложный ответ на кадмий. В то же время, как указано выше, в его промоторе присутствует хорошо выраженный консенсус для сайта связывания RpoE стрессовой полимеразы, которая активируется также и металлами (Egler *et al.*, 2005). Учитывая это и тот факт, что значение параметра  $n_3$  модели (3) почти в 2 раза меньше значения параметра  $n_3$  модели (2), для объяснения механизмов ответа промотора гена *dps* на кадмий мы считаем более вероятной гипотезу 2: сложная динамика ответа на кадмий может быть отражением взаимоотношений между двумя полимеразой, *groD* и *groE*.

Таким образом, с использованием данных по динамике функционирования геносенсора *E. coli/pDps-gfp* в присутствии токсических агентов была проведена оценка сложности механизмов  $H_2O_2$ -,  $Cd^{2+}$ - и фенол-зависимой регуляции эффективности промотора гена *dps E. coli* методами математического моделирования. Построенные модели удовлетворительно описывают выявленные закономерности функционирования геносенсора в присутствии вышеописанных токсических агентов и позволяют сделать прогноз относительно сложности механизмов регуляции промотора гена *dps E. coli* в присутствии фенола, ионов кадмия и перекиси водорода.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-01008), программ РАН (проекты № 22.8 и 21.26) и Президиума СО РАН (проекты № 107, 119), и гранта научной школы НШ-2447.2008.4.

### Литература

- Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A. *et al.* Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. P. 6361–6370.
- Almirón M., Link A.J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 2646–2654.
- Altuvia S., Almirón M., Huisman G. *et al.* The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 13. P. 265–272.
- Egler M., Grosse C., Grass G., Nies D.H. Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 2297–2307.

- Grainger D.C., Goldberg M.D., Lee D.J., Busby S.J. Selective repression by Fis and H-NS at the *Escherichia coli* *dps* promoter // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 68. P. 1366–1377.
- Khil P.P., Camerini-Otero R.D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 44. P. 89–105.
- Khlebodarova T.M., Tikunova N.V., Kachko A.V. *et al.* Application of bioinformatics resources for genosensor design // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. P. 507–520.
- Lomovskaya O.L., Kidwell J.P., Matin A. Characterization of the sigma 38-dependent expression of a core *Escherichia coli* starvation gene, *pexB* // *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 3928–3935.
- Martinez A., Kolter R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 5188–5194.
- Nair S., Finkel S.E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. P. 4192–4198.
- Peltek S.E., Goryachkovskaya T.N., Popik V.M. *et al.* Microfluidics in biology and genosensor construction // *Nanotechnologies in Russia.* 2008. V. 3. P. 622–632.
- Phadtare S., Kato I., Inouye M. DNA microarray analysis of the expression profile of *Escherichia coli* in response to treatment with 4,5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 6725–6729.
- Pomposiello P.J., Bennik M.H., Demple B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate // *J. Bacteriol.* 2001. V. 183. P. 3890–3902.
- Raivio T.L., Silhavy T.J. Periplasmic stress and ECF sigma factors // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. V. 55. P. 591–624.
- Rezuchova B., Miticka H., Homerova D. *et al.* New members of the *Escherichia coli* sigma E regulon identified by a two-plasmid system // *FEMS Microbiol. Lett.* 2003. V. 225. P. 1–7.
- Tartaglia L.A., Storz G., Ames B.N. Identification and molecular analysis of oxyR-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 210. P. 709–719.
- Tikunova N.V., Khlebodarova T.M., Kachko A.V. *et al.* A computational-experimental approach to designing a polyfunctional genosensor derived from the *Escherichia coli* gene *yfiA* promoter // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 417. P. 357–361.
- Zheng M., Wang X., Templeton L.J. *et al.* DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide // *J. Bacteriol.* 2001. V. 83. P. 4562–4570.

## ESCHERICHIA COLI DPS GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO TOXIC AGENTS: ANALYSIS AND MATHEMATICAL MODELING

V.A. Likhoshvai<sup>1,2</sup>, T.Yu. Stepanova<sup>1</sup>, A.V. Zadorozhnyi<sup>1</sup>, N.V. Tikunova<sup>3</sup>, T.M. Khlebodarova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: likho@bionet.nsc.ru;

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

### Summary

A genosensor on the base of the *Escherichia coli* *dps* gene and the reporter *gfp* gene (*E. coli/pDps-gfp*) is used in mathematical modeling of *dps* expression with the presence of phenol, hydrogen peroxides, and cadmium salts. Different responses are predicted: a simple response to phenol and an intricate response, with a complex inhibiting pathway, to hydrogen peroxide. Several models can be proposed for the complex response to cadmium. The first model assumes the presence of one binding site for RNA polymerase in the *E. coli* *dps* promoter and complex interaction between several transcription factors. The second model assumes two alternative binding sites for two different RNA polymerases and, probably, two independent promoters in the *dps* regulatory region. The parameters of the second model appear to fit better.

**Key words:** *Escherichia coli*, *dps*, *gfp*, genosensor, mathematical modeling, transcription regulation.