

УДК 575.2:577.171.55

## АНАЛИЗ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕННОЙ СЕТИ *Escherichia coli*

*М.Т. Пу*

### Аннотация

В работе представлены количественные характеристики регуляторной системы *Escherichia coli* в графическом виде. Показаны возможные сценарии отклика генной сети при влиянии различных факторов среды на ключевые регуляторные белки. В качестве примера разработана математическая модель, описывающая генетическую регуляцию биосинтеза пуриновых нуклеотидов. При помощи данной модели найдены два режима функционирования системы: стационарный режим и незатухающие автоколебания. Определены параметры, при которых существуют эти режимы, и установлен их интервал. Показано, что существуют ключевые регуляторные петли, влияющие на поведение системы. На основании модели предсказываются стационарные значения концентраций ключевых метаболитов синтеза пуринов (IMP, AMP, GMP) для мутанта по гену *purR*.

**Ключевые слова:** генная сеть, математическое моделирование, *Escherichia coli*.

### Введение

Развитие методов молекулярной биологии, микробиологии и биоинженерии сделало модельный организм *E. coli* центром исследования большого количества лабораторий. На эту бактерию возложены большие надежды по получению сверхэкспрессируемых штаммов. Однако эту цель возможно достичь только при всестороннем изучении *E. coli*, особенно метаболизма и его регуляции. Первоначальным этапом исследования метаболизма было разбиение его на отдельные пути и реакции. В то же время для восприятия картины в целом предпринимаются попытки по крупномасштабному анализу метаболической сети, содержащейся в базах данных (EcoCyc, KEGG) с применением методов графов. Иллюстрирующим примером может служить ряд статей [1, 2], в которых авторы помещают в вершины графа метаболиты, связи же представляют собой метаболические реакции. Графы строятся на основе информации, содержащейся в базах данных, и в последующем подвергаются анализу. Результаты этих работ показали, что средняя длина метаболического пути длиннее, чем ранее считалось, из чего можно сделать вывод о сложности сети в целом [2]. Несмотря на то что сбор статистики – очень важная задача для лучшего представления всей сложности метаболизма, метаболическая сеть сама по себе не позволяет представить поведение целой системы во времени. Для решения данной задачи применяют подход математического моделирования. Различные методы, развиваемые в этой области, позволяют интегрировать большое количество гетерогенной информации, полученной экспериментально и, что не маловажно,

обладают предсказательной способностью. Задача, которая ставится исследователем, определяет детальность описания системы. В результате модель может описывать отдельную интересующую подсистему с максимально полным привлечением имеющейся информации [3]. В другом случае модель представляет собой описание подсистемы или даже системы с применением подходов, учитывающих лишь общие свойства системы, например потокового метода [4–6]. Безусловно, потоковый метод позволяет более легко описывать довольно большие системы, но метод не учитывает нелинейность, часто присущую метаболическим системам, отражая поведение исследуемого объекта на стационаре. Что касается детальных моделей, то создание базы таких моделей отдельных подсистем (подмоделей) приближает к созданию единой модели выбранной системы, в нашем случае бактерии *E. coli*, что значительно расширяет сферу применения общей модели [7]. Адекватное описание процессов с помощью математического моделирования позволяет ставить *in silico* эксперименты, результатами которых являются проверка гипотез о механизме функционирования отдельных систем и прогнозирование поведения систем, подвергшихся генетическим модификациям.

## 1. Материалы и методы

**1.1. Материалы.** Для реконструкции геной сети регуляторных белков была использована база данных RegulonDB, содержащая информацию об элементах глобальной сети *E. coli* (оперонах, генах, регуляторных белках) и взаимодействиях между ними. Верификация математической модели осуществлялась на основании работ, представленных в табл. 2 (см. ниже).

**1.2. Методы.** Обработка данных представленных в базе данных RegulonDB обрабатывалась с помощью программ, написанных на языке Perl; визуализация геной сети осуществлялась в свободно распространяемой программе Rajek. Разработанные программы и результаты анализа данных доступны по адресу <http://dl.dropbox.com/u/52461630/programs.rar>. При моделировании биосинтеза пуриновых нуклеотидов в работе использовался обобщенный химико-кинетический метод моделирования [8]. Для описания ферментативных реакций и механизмов генетической регуляции использовался метод обобщенных функций Хилла [9]. Модели метаболических систем биосинтеза пуриновых нуклеотидов строились как системы обыкновенных дифференциальных уравнений, описывающие глобальные скорости изменения концентраций низкомолекулярных соединений и белков (ферментов), синтезируемых или расходуемых в моделируемой системе. Глобальные скорости вычислялись на основании закона суммирования локальных скоростей, описывающих отдельную ферментативную реакцию, процесс синтеза или деградации белка. Численные расчеты и анализ моделей проводились средствами программы STEP+ [10].

## 2. Результаты и их обсуждение

**2.1. Реконструкция и анализ геной сети.** В качестве основных участников геной сети выступают регуляторные белки и гены (опероны). Дадим им краткую характеристику на основании базы RegulonDB.

**2.1.1. Гены и опероны.** В базе RegulonDB содержится информация о 4607 генах (без учета Phantom Gene). Большинство генов (2982 шт.) экспрессируется без участия регуляторных белков (TF). Это может быть связано, во-первых, с тем, что регуляция этих генов не до конца изучена, а во-вторых, возможно, эти гены экспрессируются в конститутивном режиме. Первая гипотеза более вероятна, несмотря на то что *E. coli* наиболее – изученный микроорганизм на основании информации из базы International *E. coli* Alliance. Остальные гены (1625 шт.) регулируются от 1 до 13 TF. Большинство генов (678 шт.) регулируется одним TF. Количество положительных связей ген – TF (1184 шт.) и отрицательных (1140 шт.) приблизительно одинаково, что дает возможность системе не только давать отклик на внешнее воздействие, но и поддерживать гомеостаз. Кроме того, для дополнительной регуляции есть 79 связей дуальной природы, зависящих от концентрации TF.

**2.1.2. Регуляторные белки.** Основываясь на данных базы RegulonDB, рассмотрены 184 TF. Каждый TF связывается со специфичным сайтом связывания в регуляторной области оперона и регулирует его экспрессию. Под регуляцией шести TF (CRP, FNR, Fis, IHF, H-NS, ArgA) находится наибольшее количество генов (447, 287, 223, 217, 166, 157 соответственно). Эти TF называют глобальными регуляторами [11], так как они запускают регуляцию большого каскада генов. Именно поэтому очень важно знать, как экспрессируются глобальные регуляторы в зависимости от других TF и внешних факторов.

**2.2. Генная сеть регуляторных белков *E. coli*.** На основании данных из базы RegulonDB была реконструирована генная сеть глобальных регуляторных белков (рис. 1). Из рис. 1 видно, что экспрессия генов, кодирующих TF (H-NS, FNR и IHF), зависит от белков (CspA, GadX для H-NS; Fur для FNR; NsrR для IHF), которые не являются глобальными регуляторами. Однако через два TF – GadX и Fur – осуществляется дополнительная регуляция между глобальными регуляторными белками. В свою очередь, GadX регулируется 7 TF (GadE, GadW, RutR, TorR, AdiY, RcsB, GadE-RcsB), а Fur – двумя TF (OxyR, SoxS). В табл. 1 представлены примеры возможных сценариев отклика генной сети (рис. 1) при различных внешних воздействиях. Безусловно, количество сценариев можно увеличить, поскольку гены TF GadE, GadW и SoxS также активируются другими TF, не представленными на рис. 1.

Регуляторные белки, активированные внешними воздействиями, непосредственно регулируют экспрессию генов TF и белков (ферментов, белков-транспортеров и т. д.), которые вовлечены в различные метаболические процессы. Например, TF H-NS регулирует экспрессию 166 генов. Белки, закодированные в данных генах, участвуют в осмотическом контроле [12], метаболизме углерода [13], кислотоустойчивости [14], а также являются компонентами малой субъединицы РНК полимеразы [15], протеаз [16] и др. Таким образом, при внешнем (стрессовом) воздействии запускается координированная регуляция отдельных метаболических систем посредством глобальных регуляторов. Генная сеть глобальных TF (рис. 1) является частью полной генной сети, в которой отражено

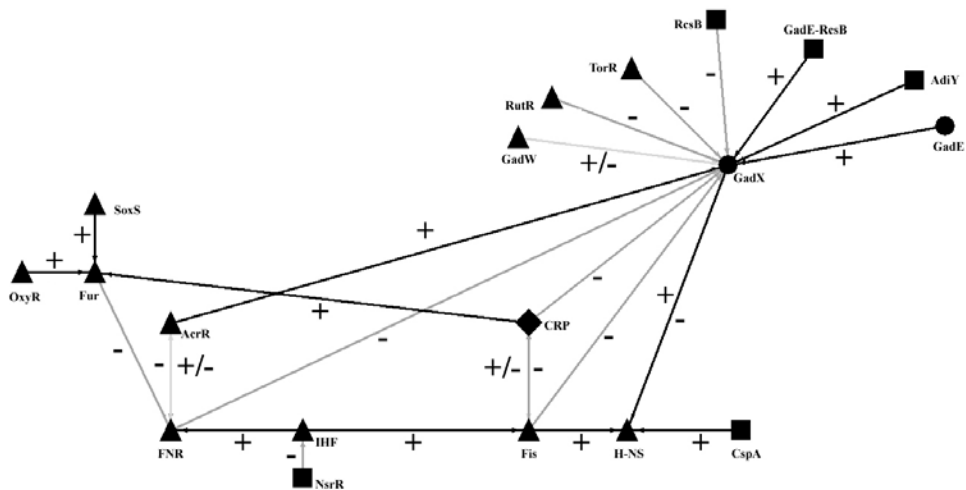


Рис. 1. Генная сеть глобальных регуляторных белков. Вершины – регуляторные белки. Форма вершины показывает тип регуляции собственного гена (круг – активация, треугольник – ингибирование, ромб – активация/ингибирование, квадрат – нет регуляции собственного гена). Стрелки – регуляторные связи. Цвет стрелки показывает тип регуляции (черный (+) – активация, темно-серый (-) – ингибирование, светло-серый (+/-) – активация/ингибирование)

Табл. 1

Сценарии отклика генной сети при внешних воздействиях. => положительная регуляция; → регуляция по дуальному (ингибирование/активация) механизму

Внешнее воздействие (Вв) на экспрессию гена	Сценарий
Экспоненциальная фаза роста	1) Вв => IHF => Fis => H-NS 2) Вв => IHF => FNR → ArcA => GadX => H-NS
Анаэробные условия роста	3) Вв => FNR → ArcA => GadX => H-NS
Микроаэробные условия роста	4) Вв => ArcA => GadX => H-NS
Полигидроксibuтират	5) Вв => H-NS
Логарифмическая фаза роста	6) Вв => Fis => H-NS
Отсутствие глюкозы, стационарная фаза	7) Вв => CRP → Fis => H-NS 8) Вв => CRP => Fur
Холодовой шок 13 °С, Дополнительное питание	9) Вв => CspA => H-NS
Кислотное рН	10) Вв => GadE => GadX => H-NS

взаимодействие всех TF (генная сеть доступна по адресу <http://dl.dropbox.com/u/52461630/programs.rar>). В полной сети 6 TF (CRP, FNR, Fis, IHF, H-NS, ArcA) регулируют соответственно экспрессию 43, 23, 18, 14 и 13 генов, кодирующих регуляторные белки. Регуляторные белки генной сети образуют три группы. Первая группа белков (115 шт.) объединена в общую сеть, вторая группа (15 шт.) представлена сетями с двумя (6 шт.) и тремя вершинами (1 шт.). И третья группа белков – индивидуальные вершины, не связанные между собой (54). Вероятнее всего, что к настоящему моменту недостаточно информации по генетической регуляции каждого гена, чтобы все регуляторные белки образовали единую сеть.

Рассмотрим в качестве примера генетическую регуляцию гена *gadX*. Экспрессия гена *gadX* (TF GadX) контролируется 13 белками (рис. 1), что показывает важность для клетки в большом спектре внешних условий. TF GadX контролирует экспрессию генов, отвечающих на кислотный pH [17]. Вероятнее всего, что разные внешние условия требуют адаптации такого важного фактора для клетки, как pH. Рассмотрим внешние факторы, влияющие на экспрессию *gadX* посредством глобальных регуляторов (рис. 1). Fnr экспрессируется при анаэробных условиях, когда концентрация ионов водорода низкая, следовательно, pH не понижен и фактор GadX не требуется, что обуславливает его ингибирование Fnr. При переходе на микроаэробные условия начинает работать TF ArcA, который положительно влияет на экспрессию GadX. Пониженный pH, стационарная фаза и присутствие ацетата вызывают активацию кислотного стрессового ответа, то есть активируются TF CRP, HN-S, ген *gadX* и ряд других генов [17]. Удивителен тот факт, что, несмотря на то что экспоненциальная фаза характеризуется быстрым размножением клеток и протоны накапливаются очень быстро [18], активации *gadX* не происходит. Видимо, образующиеся протоны идут на образование АТФ. Глобальные регуляторы, которые экспрессируются в экспоненциальную фазу, ингибируют ген *gadX* (ИHF опосредованно через Crp, Fis, H-NS). Это позволяет с большой вероятностью обеспечить «молчание» гена *gadX* в экспоненциальной фазе. При условиях, когда *gadX* экспрессируется (LB-среда и стационарная фаза), сдерживающим фактором является TF CRP. Из этого можно сделать вывод о том, что экспрессия подвергается строгой регуляции, что подтверждает значимость адекватной экспрессии гена *gadX*. Действительно, известно, что способность бактерий выживать в кислой среде жизненно важна для успешной колонизации млекопитающих, и одной из стратегий кишечных бактерий, позволяющих преодолевать кислую среду желудка, является поддержание pH [19].

В заключение отметим, что клетка способна адаптироваться к быстро меняющимся условиям окружающей среды посредством переключения метаболизма на новый режим функционирования. Данное переключение осуществляется за счет работы регуляторных белков, которые либо непосредственно реагируют на внешний сигнал, либо участвуют в системе переноса сигнала внутри клетки. Таким образом, регуляторные белки управляют скоординированной экспрессией генов, имеющих отношение к ответу на данный сигнал.

Далее в качестве примера рассмотрим математическую модель, описывающую генетическую регуляцию метаболизма пуриновых нуклеотидов, играющего важную роль при адаптационных процессах.

**2.3. Математическая модель биосинтеза генетической регуляции пуриновых нуклеотидов.** Биосинтез пуриновых нуклеотидов *de novo* представлен на рис. 2. На первом этапе образуется фосфорибозиламин (PRA) из глутамина и 5-фосфорибозил- $\alpha$ -1-пирофосфата (PRPP). Реакция катализируется ферментом амидофосфорибозилтрансферазой (ATase, EC 2.4.2.14). Активность первого фермента ATase негативно регулируется по механизму обратной связи АМР и GMP [20], а также негативно регулируется со стороны GTP, XMP и IMP. Основным промежуточным продуктом, из которого синтезируются все пуриновые

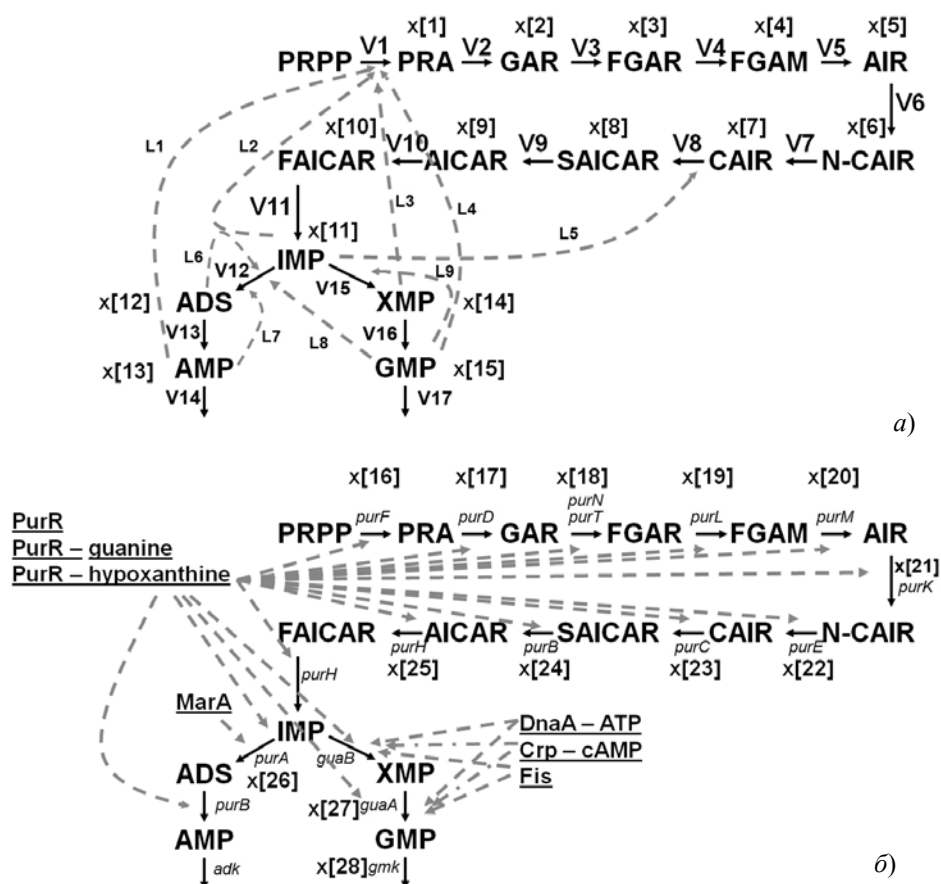


Рис. 2. Общая схема синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* с учетом регуляции активностей ферментов (а) и генетической регуляции экспрессии генов, кодирующих структуру ферментов (б). Черные сплошные стрелки обозначают ферментативные реакции, серые штриховые – ингибирование активности ферментов и экспрессии генов, серые штрих-пунктирные – активация экспрессии генов.  $V_i$  ( $i = 1, \dots, 17$ ) – скорость ферментативных реакций.  $x[j]$  ( $j = 1, \dots, 28$ ) – переменные модели – концентрации низкомолекулярных веществ и мономерных белков, из которых формируются активные формы ферментов. Название белков соответствуют названию гена. Экспрессия гена *purT* не регулируется TF PurR.  $L_k$  ( $k = 1, \dots, 9$ ) показывает номер регуляторного контура (а). Для всех веществ указаны сокращения в соответствии с базой данных EcoСус

нуклеотиды, является инозинмонофосфат (ИМФ), который также участвует в негативной регуляции процесса, ингибируя по механизму обратной связи активность фермента SAICAR синтетазы (EC 6.3.2.6), катализирующей восьмой этап в цепи биосинтеза пуриновых нуклеотидов (до образования AMP и GMP) описано 9 негативных регуляторных петель, которые контролируют активность четырех ферментов (рис. 2, а).

Экспрессия генов, кодирующих структуру всех ферментов биосинтеза подвержена негативной регуляции со стороны регуляторного белка (TF) PurR и его форм связанных с гуанином или гипоксантином [22–24]. Дополнительному контролю со стороны TF DnaA, связанного с ATP [25], CRP с cAMP [26] и Fis [27]

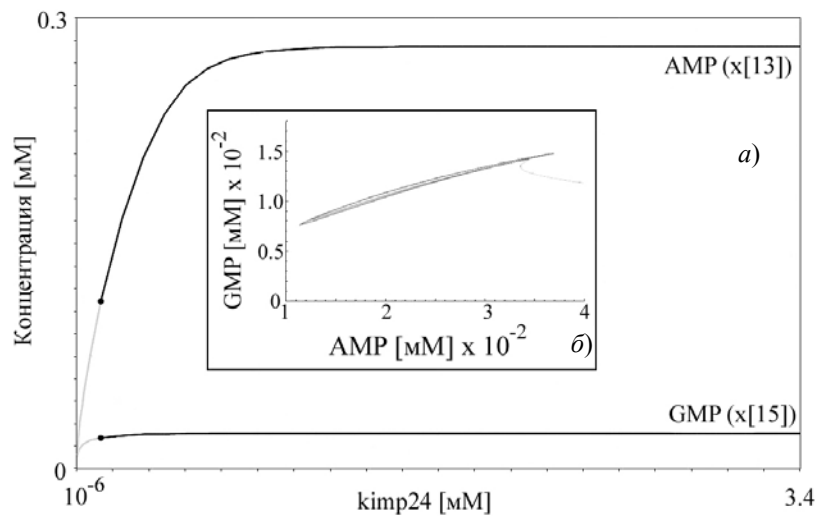


Рис. 3. Анализ устойчивости решения в модели (1) на примере переменных GMP (x[15]) и AMP (x[13]) при изменении параметра  $k_{imp24}$  (a). Черным цветом показаны области значений параметров, при которых система имеет устойчивое стационарное решение. Серым цветом показана область неустойчивого режима функционирования. Черная точка – точка перехода между состояниями. На вставке (б) показан аттрактор при  $k_{imp24} = 0.01$  мМ. Начало фазовой кривой соответствует равновесной точке (AMP = 0.281 мМ, GMP = 0.0237 мМ) при  $k_{imp24} = 3.4$  мМ

подвержены гены *guaB* и *guaA*, входящие в состав одного оперона, а TF MarA регулирует ген *purA* [23, 28] (рис. 3, б).

Математическая модель (1) синтеза пуриновых нуклеотидов собрана на основе моделей, описывающих процессы генетической регуляции и ферментативных реакций, обеспечивающих синтез AMP и GMP. Стоит отметить, что генетическая регуляция представлена только TF PurR, поскольку данный белок координированно регулирует экспрессию всех генов, кодирующих структуру белков (ферментов) и представляет наибольший интерес. Для ферментативных реакций, описывающих скорости  $V_1$ ,  $V_8$ ,  $V_{15}$  и генетических процессов, описывающих процессы ингибирования *reg8* – *reg16* через взаимодействие TF PurR с сайтами, разработаны оригинальные модели их кинетики с учетом известных механизмов регуляции их активности. Кинетика остальных ферментативных реакций описана с использованием уравнения Михаэлиса – Ментен. Для ферментативных реакций, описывающих скорости  $V_{12}$  и  $V_{17}$ , модели и параметры взяты из опубликованной литературы (табл. 2). Модель представлена в формате программы STEP+ для того, чтобы читатель смог быстро воспроизвести результаты, описанные в настоящей работе. Программа STEP+ доступна по следующему адресу: [http://modelsgroup.bionet.nsc.ru/?page\\_id=281&lang=ru](http://modelsgroup.bionet.nsc.ru/?page_id=281&lang=ru).

В табл. 2 представлены параметры модели (1) в формате пакета STEP+. При данных параметрах решение задачи Коши имеет устойчивое решение. Значения концентраций переменных  $x[11]$  (IMP),  $x[13]$  (AMP),  $x[15]$  (GMP), а также  $x[16]$  –  $x[28]$  соответствуют литературным данным [29, 30]. Стационарные значения остальных переменных рассчитаны теоретически. В литературе значения данных веществ не указаны.

## Система дифференциальных уравнений

(1)

$\pi[1] := V1 - V2;$   
 $\pi[2] := V2 - V3;$   
 $\pi[3] := V3 - V4;$   
 $\pi[4] := V4 - V5;$   
 $\pi[5] := V5 - V6;$   
 $\pi[6] := V6 - V7;$   
 $\pi[7] := V7 - V8;$   
 $\pi[8] := V8 - V9;$   
 $\pi[9] := V9 - V10;$   
 $\pi[10] := V10 - V11;$   
 $\pi[11] := V11 - V12 - V15;$   
 $\pi[12] := V12 - V13;$   
 $\pi[13] := V13 - V14;$   
 $\pi[14] := V15 - V16;$   
 $\pi[15] := V16 - V17;$   
 $\pi[16] := kscvpAp1PurF*reg8-kdPurF*x[16];$   
 $\pi[17] := kspurHpPurD*reg9-kdPurD*x[17];$   
 $\pi[18] := kspurMpPurN*reg10-kdPurN*x[18];$   
 $\pi[19] := kspurLpPurL*reg11-kdPurL*x[19];$   
 $\pi[20] := kspurMpPurM*reg10-kdPurM*x[20];$   
 $\pi[21] := kspurEpPurK*reg12-kdPurK*x[21];$   
 $\pi[22] := kspurEpPurE*reg12-kdPurE*x[22];$   
 $\pi[23] := kspurCpPurC*reg13-kdPurC*x[23];$   
 $\pi[24] := kshflDpPurB*reg14-kdPurB*x[24];$   
 $\pi[25] := kspurHpPurH*reg9-kdPurH*x[25];$   
 $\pi[26] := kspurApPurA*reg15-kdPurA*x[26];$   
 $\pi[27] := ksguaBpGuaB*reg16-kdGuaB*x[27];$   
 $\pi[28] := ksguaBpGuaA*reg16-kdGuaA*x[28];$

$V1 := (k24*E7)/(1+L1*((x[13]/kamp24)^{hamp24}+L4*((x[15]/kgmp24)^{hgmp24}+(GTP/kgtp24)^{hgtp24}+L2*((x[11]/kimp24)^{himp24}+L3*((x[14]/kxmp24)^{hxmp24}+wpur24*L1*L4*((x[13]/kamp24)^{hamp24}*(x[15]/kgmp24)^{hgmp24})));$   
 $V2 := (k25*E8*(x[1]/kmp25)*(ATP/kmatp25))/((1+(x[1]/kmp25))*(1+(ATP/kmatp25)));$   
 $V3 := ((k261*(x[2]/kmgar261)*(ATP/kmatp26))/((1+(x[2]/kmgar261))*(1+(ATP/kmatp26))))+(k262*E10*x[2]/(x[2]+kmgar262));$   
 $V4 := (k27*E12*(x[3]/kmfgar27)*(ATP/kmatp27))/((1+(x[3]/kmfgar27))*(1+(ATP/kmatp27)));$   
 $V5 := (k28*E11*(x[4]/kmfgam28)*(ATP/kmatp28))/((1+(x[4]/kmfgam28))*(1+(ATP/kmatp28)));$   
 $V6 := (k29*E13*(x[5]/kmair29)*(ATP/kmatp29))/((1+(x[5]/kmair29))*(1+(ATP/kmatp29)));$   
 $V7 := k30*E14*x[6]/(kmncair30+x[6]);$   
 $V8 := (k31*E15*(x[7]/kmcair31)*(ATP/kmatp31))/((1+(x[7]/kmcair31)+L5*(x[11]/kimp31))*(1+(ATP/kmatp31)));$   
 $V9 := k32*E16*x[8]/(kmsaicar32+x[8]);$   
 $V10 := k33*E9*x[9]/(kmaicar33+x[9]);$   
 $V11 := k34*E9*x[10]/(kmaicar34+x[10]);$   
 $V12 := (k35*E17*(x[11]/kmimp35)*(GTP/kmgtp35))/((1+(x[11]/kmimp35)+L6*(x[12]/kads35)+L7*(x[13]/kamps35))*(1+(GTP/kmgtp35)+L8*(x[15]/kgmp35)+(GDP/kgdp35)));$   
 $V13 := (k36*(x[12]/kmads36))/(1+(x[12]/kmads36));$   
 $V14 := (k37*(x[13]/kmamp37)*(ATP/kmatp37))/((1+(x[13]/kmamp37))*(1+(ATP/kmatp37)));$   
 $V15 := (k38*E18*(x[11]/(kmimp38*(1+L9*(x[15]/kgmp38))+x[11]));$   
 $V16 := (k39*E19*(x[14]/kxmp39)*(ATP/kmatp39))/((1+(x[14]/kxmp39))*(1+(ATP/kmatp39)));$   
 $V17 := (k40*(x[15]^hgmp40)*ATP)/(((kmgmp40^hgmp40)+(x[15]^hgmp40))*(kmatp40+ATP));$

$reg8 := (1 + w8*(PurR/k83PurR))/(1 + PurR/k83PurR);$   
 $reg9 := (1 + w9*(PurR/k93PurR))/(1 + PurR/k93PurR);$   
 $reg10 := (1 + w10*(PurR/k103PurR))/(1 + PurR/k103PurR);$   
 $reg11 := (1 + w11*(PurR/k113PurR))/(1 + PurR/k113PurR);$   
 $reg12 := (1 + w12*(PurR/k123PurR))/(1 + PurR/k123PurR);$   
 $reg13 := (1 + w13*(PurR/k133PurR))/(1 + PurR/k133PurR);$   
 $reg14 := (1 + w14*(PurR/k143PurR))/(1 + PurR/k143PurR);$   
 $reg15 := (1 + w15*(PurR/k153PurR))/(1 + PurR/k153PurR);$   
 $reg16 := (1 + w16*(PurR/k163PurR))/(1 + PurR/k163PurR);$

$E7 := (x[16]^4)/(((kdisAPRTase)^3)+(4*(x[16]^3)));$   
 $E8 := x[17];$   
 $E9 := x[25];$   
 $E10 := x[18];$   
 $E11 := (x[20]^2)/(kdisPRPGALase+(2*x[20]));$   
 $E12 := x[19];$   
 $E13 := (x[21]^2)/(kdisAIRNSase+(2*x[21]));$   
 $E14 := (x[22]^8)/(((kdisCAIRNMase)^7)+(8*(x[22]^7)));$   
 $E15 := (x[23]^3)/(((kdisPRASASase)^2)+(3*(x[23]^2)));$   
 $E16 := x[24];$   
 $E17 := (x[26]^2)/(kdisASSase+(2*x[26]));$   
 $E18 := (x[27]^4)/(((kdisLMPDase)^3)+(4*(x[27]^3)));$   
 $E19 := (x[28]^2)/(kdisGMPsase+(2*x[28]));$



Табл. 2

Значения параметров модели (1). Параметры представлены в формате пакета STEP+. p[1],...,p[128] – порядковый номер параметра. kmi – константа Михаэлиса; hi – константа, характеризующая степень нелинейности соответствующих соединений; wi – константа, характеризующая удельную активность промотора при действии соответствующих регуляторов; kdisi – константа диссоциации фермента; kdi – константа деградации белка; ksi – константа синтеза белка; ki – константа, характеризующая эффективность ингибирования для соответствующих соединений; k24, k25, k262, k27-k35, k38, k39 – обобщенные константы оборота фермента; k261, k36, k37, k40 – константы максимальной скорости фермента; wriр24 – константа эффективности совместного влияния веществ. L1,...,L9 – коэффициент, определяющий наличие регуляторного конструа (0 – отсутствие связи, 1 – присутствие связи).

\*Значение параметра оценено

Параметры	Значение		Источник	Параметры	Значение		Источник
k24 := p[1];	1.42487E+03	[1/c]	*	ATP := p[65];	9.63000E+00	[mM]	[29]
k25 := p[2];	6.93512E+02	[1/c]	*	GDP := p[66];	6.76000E-01	[mM]	[29]
k261 := p[3];	1.80000E-01	[mM/c]	*	PurR := p[67];	9.70000E-04	[mM]	[30]
k262 := p[4];	1.24324E+02	[1/c]	*	w8 := p[68];	4.00000E-02		[22]
k27 := p[5];	4.38333E+02	[1/c]	*	k83PurR := p[69];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k28 := p[6];	1.53477E+02	[1/c]	*	w9 := p[70];	2.00000E-02		[22]
k29 := p[7];	5.64991E+02	[1/c]	*	k93PurR := p[71];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k30 := p[8];	1.08023E+03	[1/c]	*	w10 := p[72];	2.55000E-01		[22]
k31 := p[9];	1.38263E+02	[1/c]	*	k103PurR := p[73];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k32 := p[10];	1.61432E+02	[1/c]	*	w11 := p[74];	4.00000E-01		[22]
k33 := p[11];	1.40890E+02	[1/c]	*	k113PurR := p[75];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k34 := p[12];	1.23279E+02	[1/c]	*	w12 := p[76];	4.50000E-01		[22]
k35 := p[13];	1.68080E+02	[1/c]	*	k123PurR := p[77];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k36 := p[14];	2.89207E-01	[mM/c]	*	w13 := p[78];	2.10000E-01		[22]
k37 := p[15];	2.60470E-01	[mM/c]	*	k133PurR := p[79];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k38 := p[16];	1.93601E+02	[1/c]	*	w14 := p[80];	9.80000E-01		[22]
k39 := p[17];	2.28347E+02	[1/c]	*	k143PurR := p[81];	4.00000E-04	[mM]	[22]
k40 := p[18];	3.42932E-01	[mM/c]	*	w15 := p[82];	1.00000E+00		[22]
kamp24 := p[19];	3.50000E+00	[mM]	[31]	k153PurR := p[83];	4.00000E-04	[mM]	[22]
hamp24 := p[20];	2.00000E+00		[31]	w16 := p[84];	1.00000E+00		[22]
kgmp24 := p[21];	1.10000E+00	[mM]	[31]	k163PurR := p[85];	4.00000E-04	[mM]	[22]
hgmp24 := p[22];	4.60000E+00		[31]	kdisAPRase := p[86];	1.00000E-03	[mM]	*
kgtp24 := p[23];	3.70000E+00	[mM]	[31]	kdisPRPGALase := p[87];	1.00000E-03	[mM]	*
hgtp24 := p[24];	4.60000E+00		[31]	kdisAIRNSase := p[88];	1.00000E-03	[mM]	*
kimp24 := p[25];	3.40000E+00	[mM]	[31]	kdisCAIRNase := p[89];	1.00000E-03	[mM]	*
himp24 := p[26];	4.60000E+00		[31]	kdisPRASCASase := p[90];	1.00000E-03	[mM]	*
kxmp24 := p[27];	4.90000E+00	[mM]	[31]	kdisASSase := p[91];	1.00000E-03	[mM]	*
hxmp24 := p[28];	4.60000E+00		[31]	kdisIMPase := p[92];	1.00000E-03	[mM]	*
wpur24 := p[29];	3.00000E+01		[31]	kdisGMPase := p[93];	1.00000E-03	[mM]	*
kmpra25 := p[30];	7.00000E-02	[mM]	[32]	kscvpAp1PurF := p[94];	3.77593E-05	[mM/c]	*
kmrat25 := p[31];	1.70000E-01	[mM]	[32]	kdPurF := p[95];	2.00000E-03	[mM]	*
kmgar261 := p[32];	1.01000E-02	[mM]	[33]	kspurHpPurD := p[96];	8.34936E-06	[mM/c]	*
kmrat26 := p[33];	4.50000E-02	[mM]	[33]	kdPurD := p[97];	2.00000E-03	[mM]	*
kmgar262 := p[34];	1.22000E-02	[mM]	[34]	kspurMpPurN := p[98];	2.13325E-05	[mM/c]	*
kmfgar27 := p[35];	4.70000E-02	[mM]	[35]	kdPurN := p[99];	2.00000E-03	[mM]	*
kmrat27 := p[36];	5.10000E-02	[mM]	[34]	kspurLpPurL := p[100];	7.32289E-06	[mM/c]	*
kmfgar28 := p[37];	2.70000E-02	[mM]	[36]	kdPurL := p[101];	2.00000E-03	[mM]	*
kmrat28 := p[38];	6.50000E-02	[mM]	[36]	kspurMpPurM := p[102];	4.96032E-05	[mM/c]	*
kmair29 := p[39];	2.60000E-02	[mM]	[37]	kdPurM := p[103];	2.00000E-03	[mM]	*
kmrat29 := p[40];	9.00000E-02	[mM]	[37]	kspurEpPurK := p[104];	1.12908E-05	[mM/c]	*
kmncair30 := p[41];	1.40000E-01	[mM]	[37]	kdPurK := p[105];	2.00000E-03	[mM]	*
kmncair31 := p[42];	1.20000E-01	[mM]	[21]	kspurEpPurE := p[106];	2.11273E-05	[mM/c]	*
kmrat31 := p[43];	1.90000E-02	[mM]	[21]	kdPurE := p[107];	2.00000E-03	[mM]	*
kimp31 := p[44];	8.70000E+00	[mM]	[21]	kspurCpPurC := p[108];	8.14693E-05	[mM/c]	*
kmsaicar32 := p[45];	2.90000E-03	[mM]	[38]	kdPurC := p[109];	2.00000E-03	[mM]	*
kmaicar33 := p[46];	1.90000E-03	[mM]	[39]	kshfDpPurB := p[110];	1.11235E-05	[mM/c]	*
kmfaicar34 := p[47];	9.00000E-04	[mM]	[40]	kdPurB := p[111];	2.00000E-03	[mM]	*
kmimp35 := p[48];	2.00000E-02	[mM]	[3]	kspurHpPurH := p[112];	3.86296E-05	[mM/c]	*
kmgtp35 := p[49];	2.30000E-02	[mM]	[3]	kdPurH := p[113];	2.00000E-03	[mM]	*
kads35 := p[50];	7.50000E-03	[mM]	[3]	kspurApPurA := p[114];	2.71672E-05	[mM/c]	*
kamp35 := p[51];	1.00000E-02	[mM]	[3]	kdPurA := p[115];	2.00000E-03	[mM]	*
kgmp35 := p[52];	2.40000E-02	[mM]	[3]	ksguaBpGuaB := p[116];	1.03342E-05	[mM/c]	*
kgdp35 := p[53];	8.00000E-03	[mM]	[3]	kdGuaB := p[117];	2.00000E-03	[mM]	*
kmads36 := p[54];	3.70000E-03	[mM]	[41]	ksguaBpGuaA := p[118];	9.08000E-06	[mM/c]	*
kmamp37 := p[55];	2.60000E-02	[mM]	[42]	kdGuaA := p[119];	2.00000E-03	[mM]	*
kmrat37 := p[56];	7.10000E-02	[mM]	[42]	L1 := p[120];	0 или 1		
kmimp38 := p[57];	1.15000E-02	[mM]	[43]	L2 := p[121];	0 или 1		
kgmp38 := p[58];	8.00000E-02	[mM]	[43]	L3 := p[122];	0 или 1		
kmxmp39 := p[59];	2.90000E-02	[mM]	[44]	L4 := p[123];	0 или 1		
kmrat39 := p[60];	5.30000E-01	[mM]	[44]	L5 := p[124];	0 или 1		
hgmp40 := p[61];	2.00000E+00		[45]	L6 := p[125];	0 или 1		
kgmp40 := p[62];	1.50000E-02	[mM]	[45]	L7 := p[126];	0 или 1		
kmrat40 := p[63];	3.33000E-01	[mM]	[46]	L8 := p[127];	0 или 1		
GTP := p[64];	4.87000E+00	[mM]	[29]	L9 := p[128];	0 или 1		

**2.3.1. Параметрический анализ устойчивости поведения модели.** Численный анализ поведения модели биосинтеза пуриновых нуклеотидов (1) выявил область значений трех параметров ( $kgmp_{24}$ ,  $kimp_{24}$ ,  $kxmp_{24}$ ), при которых реализуется неустойчивое стационарное решение (рис. 3, б). Данные параметры характеризуют эффективность ингибирования GMP-, IMP-, XMP-активности ключевого фермента биосинтеза амидофосфорибозилтрансферазы (ATase, EC 2.4.2.14). На рис. 3, а приведен анализ устойчивости решения модели (1) при изменении параметра  $kimp_{24}$  на примере динамики концентраций конечных продуктов биосинтеза пуриновых нуклеотидов AMP и GMP. Значение параметра  $kimp_{24}$  в модели (1), представленное в табл. 2, характерно для параметрической области устойчивого стационарного решения. Значения параметров  $kgmp_{24}$ ,  $kimp_{24}$  и  $kxmp_{24}$ , представленные в табл. 2, характерны для экспериментов *in vitro*. Однако модель (1) описывает биосинтез *in vivo*. Поэтому варьирование значений параметров на два-три порядка в сторону уменьшения имеет место быть. Таким образом, численный расчет показывает возможность существования двух режимов функционирования системы. Незатухающие автоколебания являются внутренним свойством системы и никак не связаны с генетической регуляцией системы.

**2.3.2. Влияние негативных регуляторных петель на поведение модели биосинтеза пуриновых нуклеотидов.** В настоящее время в цепи биосинтеза пуриновых нуклеотидов описано 9 негативных регуляторных петель, из которых четыре (L1–L4 на рис. 2, а) контролируют по механизму обратной связи продуктами биосинтеза активность первого фермента и пять негативных петли (L5–L9) участвуют в регуляции трех ферментов: SAICAR-синтетазы (этап 8), AS-синтетазы (этап 12), IMP-дегидрогеназы (этап 15) (рис. 2, а). Поскольку существующий набор параметров (табл. 2) обеспечивает устойчивое решение системы, то любая комбинаторика связей (512 шт.) также будет давать устойчивое состояние. Для анализа влияния негативных регуляторных петель на динамику поведения модели были проанализированы три варианта модели (1), в которых система имела неустойчивое решение (при значениях параметров  $kgmp_{24} = 0.001$  мМ,  $kimp_{24} = 0.01$  мМ,  $kxmp_{24} = 0.01$  мМ). Таким образом, было проанализировано поведение 1536 моделей (512 вариантов связей в 3 моделях). Анализ динамики поведения этих моделей показал, что колебания концентраций метаболитов возникают в моделях, в которых учитывается влияние регуляторной петли L2, и/или L3, и/или L4 (рис. 2, а). На рис. 4, а показан фазовый портрет поведения модели, демонстрирующий присутствие циклического колебательного аттрактора в системе, контролируемой девятью связями, а на рис. 4, б – тремя (L2–L4) отрицательными регуляторными контурами. Фазовый портрет представлен в координатах концентраций метаболитов AMP ( $x[13]$ ) и GMP ( $x[15]$ ). В обоих случаях значения параметров следующие:  $kgmp_{24} = 0.001$  мМ,  $kimp_{24} = 0.01$  мМ,  $kxmp_{24} = 0.01$  мМ. Стоит отметить, что структуры аттракторов отличаются. Амплитуда AMP ( $x[13]$ ) и GMP ( $x[15]$ ) больше при наличии всех регуляторных связей, чем при трех связях. Таким образом, разница между структурой аттракторов есть вклад регуляторных контуров L1, L5–L9 в динамику системы.

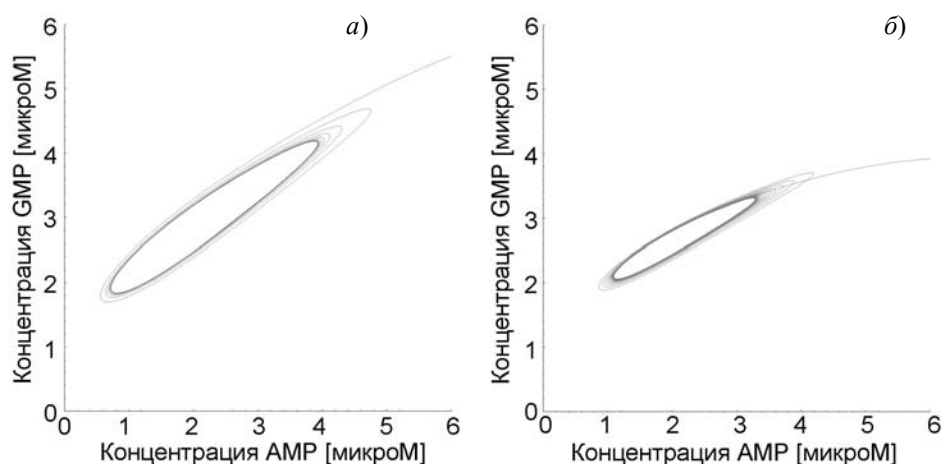


Рис. 4. Фазовые портреты поведения модели биосинтеза пуриновых нуклеотидов от двух переменных  $x[13]$  (AMP) и  $x[15]$  (GMP) при наличии 9 (а) и 3 (б) отрицательных регуляторных контуров

**2.3.3. Влияние делеции *purR* гена на поведение модели.** В математической модели (1) ключевым регуляторным белком является PurR. Структура белка PurR координированно регулирует экспрессию всех генов, кодирующих структуру ферментов биосинтеза пуриновых нуклеотидов (рис. 2, б). Численный анализ модели показывает, что если концентрацию PurR приравнять к нулю, а в модели (1) ее значение равно 0.00097 мМ (табл. 1), то получим новые стационарные решения для переменных модели. Биологическая интерпретация приравнивания к нулю значения концентрации белка PurR заключается в том, что рассмотрен мутант с делецией гена *purR*. Из генной сети (генная сеть доступна по адресу <http://dl.dropbox.com/u/52461630/programs.rar>) видно, что мутант по гену *purR* не затрагивает экспрессию генов, кодирующих остальные регуляторные белки. Поскольку равновесные концентрации ключевых метаболитов (IMP = 0.272 мМ, AMP = 0.281 мМ, GMP = 0.0237 мМ) соответствуют литературным данным [29], наличие новых стационарных значений концентраций (IMP = 5.12 мМ, AMP = 5.17 мМ, GMP = 0.026 мМ) является теоретическим предсказанием для мутанта по гену *purR*. В настоящий момент на базе Института фармакологии и молекулярной биотехнологии Гейдельбергского университета (г. Гейдельберг, Германия) вводится измерение квазиравновесных концентраций данных веществ для разных мутантов, в том числе и по гену *purR*.

**2.3.4. Возможный сценарий влияния  $\text{NO}^{\bullet}$  и PQ на поведение модели.** Во время нормального метаболизма клеток в аэробных условиях образуются высоко реактивные молекулы, такие как  $\text{O}_2^-$ , которые являются следствием неполного восстановления молекул кислорода, который не проходит через электронную цепь или в редких случаях действием таких внешних агентов, как пероксид водорода (PQ) или окись азота ( $\text{NO}^{\bullet}$ ). Образовавшиеся в результате окислительного стресса радикалы способны непосредственно повреждать ДНК. На восстановление клетки требуется дополнительное количество нуклеотидов. Уровень нуклеотидов напрямую не зависит от концентрации PQ и  $\text{NO}^{\bullet}$ . Регуляция процес-

ходит через сложную сеть взаимодействий TF (генная сеть доступна по адресу <http://dl.dropbox.com/u/52461630/programs.rar>). Большая часть информации по регуляции экспрессии генов регуляторных белков отсутствует. Несмотря на это, известно, что оперон *soxRS* в условиях окислительного стресса регулируется  $\text{NO}^{\cdot}$  [47] или PQ [48] при их присутствии в окружающей среде. В результате воздействия этих внешних факторов повышается уровень экспрессии оперона *soxRS*, происходит наработка TF SoxS, который запускает каскад стрессового ответа, регулируя в том числе и экспрессию гена *fur*. В свою очередь, TF Fur (структура, которого кодируется геном *fur*) негативно влияет на наработку ингибирующего регуляторного белка PurR. Таким образом, снимается ингибирующий эффект и происходит повышение концентрации нуклеотидов (см. п. 2.3.3). Математическая модель, описывающая уровень транскриптов оперона *soxRS* в зависимости от концентраций  $\text{NO}^{\cdot}$  и PQ, представлена в работе Ри и соавторов [49]. Экспериментальная проверка позволит проверить адекватность теоретического предсказания данного сценария.

### Заключение

Генная сеть регуляторных белков демонстрирует возможные сценарии отклика генной сети, которые могут реализоваться при разных внешних условиях. Реконструкция генной сети метаболизма нуклеотидов показывает, что гены, кодирующие структуру ферментов, участвующих в последовательных ферментативных реакциях, и не образующие одного оперона, координированно регулируются одним регуляторным белком. Математическая модель, описывающая менее одного процента метаболизма клетки, демонстрирует, что важно учитывать физиологический диапазон параметров, которые обеспечивают несколько режимов функционирования, и что существуют регуляторные петли, не оказывающие влияние на динамику системы. Для дальнейшего развития и понимания функционирования клетки необходимо проверять предсказания модели в экспериментах.

Автор выражает признательность Наталье Александровне Ри за непосредственное участие в разработке программ и обсуждение научных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке стипендиальной программы для молодых ученых Forschungsstipendien für Doktoranden und Nachwuchswissenschaftler (DAAD).

### Summary

*M.T. Ri. Mathematical Modeling and Analysis of Escherichia coli Gene Network.*

This paper presents in a graphical form the quantitative characteristics of *Escherichia coli* regulatory network. Possible network responses to the key regulatory proteins under the influence of various environmental factors are listed. As an example, a mathematical model describing the genetic regulation of purine biosynthesis has been developed. Using this model, two modes of functioning of the system have been revealed, i.e. stationary mode and undamped oscillations. The parameters at which these two modes occur have been found; the range of their values has been determined. The existence of the key regulatory loops influencing the

system behavior is shown. Based on the model, stationary values of concentrations of the key metabolites of purine biosynthesis (IMP, AMP, GMP) for *purR* mutants are predicted.

**Key words:** gene network, mathematical modeling, *Escherichia coli*.

### Литература

1. Dobrin R., Beg Q.K., Barabási A.L., Oltvai Z.N. Aggregation of topological motifs in the *Escherichia coli* transcriptional regulatory network // BMC Bioinformatics. – 2004. – V. 5, No 10. – URL: <http://link.springer.com/article/10.1186/1471-2105-5-10>, свободный.
2. Arita M. The metabolic world of *Escherichia coli* is not small // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – V. 101, No 6. – P. 1543–1547.
3. Oshchepkova-Nedosekina E.A., Likhoshvai V.A. A mathematical model for the adenylo-succinate synthetase reaction involved in purine biosynthesis // Theor. Biol. Med. Model. – 2007. – V. 4, No 11. – URL: <http://www.tbiomed.com/content/pdf/1742-4682-4-11.pdf>, свободный.
4. Papoutsakis E.T. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria // Biotechnol. Bioeng. – 1984. – V. 26, No 2. – P. 174–187.
5. Varma A., Palsson B.O. Stoichiometric flux balance models quantitatively predict growth and metabolic by-product secretion in wild-type *Escherichia coli* W3110 // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60, No 10. – P. 3724–3731.
6. Durot M., Bourguignon P.Y., Schachter V. Genome-scale models of bacterial metabolism: reconstruction and applications // FEMS Microbiol. Rev. – 2009. – V. 33, No 1. – P. 164–190.
7. Le Novère N., Bornstein B., Broicher A., Courtot M., Donizelli M., Dharuri H., Li L., Sauro H., Schilstra M., Shapiro B., Snoep J.L., Hucka M. BioModels Database: a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems // Nucleic Acids Res. – 2006. – V. 34. – P. D689–D691.
8. Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Vatolin Yu.N., Bazhan S.I. A generalized chemical kinetic method for simulating complex biological systems. A computer model of  $\lambda$  phage ontogenesis // Comput. Technologies. – 2000. – V. 5, No 2. – P. 87–99.
9. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized hill function method for modeling molecular processes // J. Bioinform. Comput. Biol. – 2007. – V. 5, No 2B. – P. 521–531.
10. Fadeev S.I., Pokrovskaya S.A., Berezin A.Yu., Gainova I.A. The Package STEP for Numerical Study of Systems of Nonlinear Equations and Autonomous System of General Form // Description of work of the package STEP by examples of problems from the course “Engineering chemistry of catalytic processes”. – Novosibirsk: Izdatel'stvo Novosibirskogo Universiteta, 1998. – P. 178.
11. Ma H.W., Kumar B., Ditges U., Gunzer F., Buer J., Zeng A.P. An extended transcriptional regulatory network of *Escherichia coli* and analysis of its hierarchical structure and network motifs // Nucleic Acids Res. – 2004. – V. 32, No 22. – P. 6643–6649.
12. Rajkumari K., Gowrishankar J. *In vivo* expression from the RpoS-dependent P1 promoter of the osmotically regulated *proU* operon in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: activation by *rho* and *hns* mutations and by cold stress // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183, No 22. – P. 6543–6550.
13. Rimsky S., Spassky A. Sequence determinants for H1 binding on *Escherichia coli lac* and *gal* promoters // Biochemistry. – 1990. – V. 29, No 15. – P. 3765–3771.
14. Shin M., Song M., Rhee J.H., Hong Y., Kim Y.J., Seok Y.J., Ha K.S., Jung S.H., Choy H.E. DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of  $E\sigma^{70}$  as a cofactor for looping // Genes Dev. – 2005. – V. 19, No 19. – P. 2388–2398.

15. Gralla J.D. *Escherichia coli* ribosomal RNA transcription: regulatory roles for ppGpp, NTPs, architectural proteins and a polymerase-binding protein // Mol. Microbiol. – 2005. – V. 55, No 4. – P. 973–977.
16. Fornis N., Juárez A., Madrid C. Osmoregulation of the HtrA (DegP) protease of *Escherichia coli*: an Hha-H-NS complex represses HtrA expression at low osmolarity // FEMS Microbiol. Lett. – 2005. – V. 251, No 1. – P. 75–80.
17. Tucker D.L., Tucker N., Ma Z., Foster J.W., Miranda R.L., Cohen P.S., Conway T. Genes of the GadX-GadW regulon in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185, No 10. – P. 3190–3201.
18. Jordan K.N., Oxford L., O'Byrne C.P. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – V. 65, No 7. – P. 3048–3055.
19. Tramonti A., Visca P., De Canio M., Falconi M., De Biase D. Functional characterization and regulation of gadX, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system // J. Bacteriol. – 2002. – V. 184, No 10. – P. 2603–2613.
20. Zhou G., Smith J.L., Zalkin H. Binding of purine nucleotides to two regulatory sites results in synergistic feedback inhibition of glutamine 5-phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269, No 9. – P. 6784–6789.
21. Nelson S.W., Binkowski D.J., Honzatko R.B., Fromm H.J. Mechanism of action of *Escherichia coli* phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide synthetase // Biochemistry. – 2005. – V. 44, No 2. – P. 766–774.
22. Meng L.M., Kilstrup M., Nygaard P. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of *purR* in the regulation of *purB*, *purC*, *purL*, *purMN* and *guaBA* expression in *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem. – 1990. – V. 187, No 2. – P. 373–379.
23. He B., Zalkin H. Regulation of *Escherichia coli purA* by purine repressor, one component of a dual control mechanism // J. Bacteriol. – 1994. – V. 176, No 4. – P. 1009–1013.
24. Husnain S.I., Busby S.J., Thomas M.S. Downregulation of the *Escherichia coli guaB* promoter by upstream-bound cyclic AMP receptor protein // J. Bacteriol. – 2009. – V. 191, No 19. – P. 6094–6104.
25. Tesfa-Selase F., Drabble W.T. Regulation of the *gua* operon of *Escherichia coli* by the DnaA protein // Mol. Gen. Genet. – 1992. – V. 231, No 2. – P. 256–264.
26. Hutchings M.I., Drabble W.T. Regulation of the divergent *guaBA* and *xseA* promoters of *Escherichia coli* by the cyclic AMP receptor protein // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – V. 187, No 2. – P. 115–122.
27. Husnain S.I., Thomas M.S. Downregulation of the *Escherichia coli guaB* promoter by FIS // Microbiology. – 2008. – V. 154, Pt. 6. – P. 1729–1738.
28. Schneiders T., Barbosa T.M., McMurry L.M., Levy S.B. The *Escherichia coli* transcriptional regulator MarA directly represses transcription of *purA* and *hdeA* // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279, No 10. – P. 9037–9042.
29. Bennett B.D., Kimball E.H., Gao M., Osterhout R., Van Dien S.J., Rabinowitz J.D. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli* // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5, No 8. – P. 593–599.
30. Lu P., Vogel C., Wang R., Yao X., Marcotte E.M. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation // Nat. Biotechnol. – 2007. – V. 25, No 1. – P. 117–124.
31. Messenger L.J., Zalkin H. Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. Purification and properties // J. Biol. Chem. – 1979. – V. 254, No 9. – P. 3382–3392.

32. Cheng Y.S., Shen Y., Rudolph J., Stern M., Stubbe J., Flannigan K.A., Smith J.M. Glycinamide ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli*: cloning, overproduction, sequencing, isolation, and characterization // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29, No 1. – P. 218–227.
33. Marolewski A., Smith J.M., Benkovic S.J. Cloning and characterization of a new purine biosynthetic enzyme: a non-folate glycinamide ribonucleotide transformylase from *E. coli* // *Biochemistry*. – 1994. – V. 33, No 9. – P. 2531–2537.
34. Inglese J., Johnson D.L., Shiau A., Smith J.M., Benkovic S.J. Subcloning, characterization, and affinity labeling of *Escherichia coli* glycinamide ribonucleotide transformylase // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29, No 6. – P. 1436–1443.
35. Schendel F.J., Mueller E., Stubbe J., Shiau A., Smith J.M. Formylglycinamide Ribonucleotide Synthetase from *Escherichia coli*: Cloning, Sequencing, Overproduction, Isolation, and Characterization // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28, No 6. – P. 2459–2471.
36. Schrimsher J.L., Schendel F.J., Stubbe J., Smith J.M. Purification and characterization of aminoimidazole ribonucleotide synthetase from *Escherichia coli* // *Biochemistry*. – 1986. – V. 25, No 15. – P. 4366–4371.
37. Mueller E.J., Meyer E., Rudolph J., Davisson V.J., Stubbe J. N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide: evidence for a new intermediate and two new enzymatic activities in the de novo purine biosynthetic pathway of *Escherichia coli* // *Biochemistry*. – 1994. – V. 33, No 8. – P. 2269–2278.
38. Sivendran S., Patterson D., Spiegel E., McGown I., Cowley D., Colman R.F. Two novel mutant human adenylosuccinate lyases (ASLs) associated with autism and characterization of the equivalent mutant *Bacillus subtilis* ASL // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, No 51. – P. 53789–53797.
39. Shim J.H., Wall M., Benkovic S.J., Díaz N., Suárez D., Merz K.M. Jr. Evaluation of the catalytic mechanism of AICAR transformylase by pH-dependent kinetics, mutagenesis, and quantum chemical calculations // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123, No 20. – P. 4687–4696.
40. Vergis J.M., Bullock K.G., Fleming K.G., Beardsley G.P. Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5'-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, No 11. – P. 7727–7733.
41. Green S.M., Malik T., Giles I.G., Drabble W.T. The *purB* gene of *Escherichia coli* K-12 is located in an operon // *Microbiology*. – 1996. – V. 142, Pt. 11. – P. 3219–3230.
42. Reinstein J., Vetter I.R., Schlichting I., Rösch P., Wittinghofer A., Goody R.S. Fluorescence and NMR investigations on the ligand binding properties of adenylate kinases // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29, No 32. – P. 7440–7450.
43. Gilbert H.J., Lowe C.R., Drabble W.T. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Purification by affinity chromatography, subunit structure and inhibition by guanosine 5'-monophosphate // *Biochem. J.* – 1979. – V. 183, No 3. – P. 481–494.
44. Sakamoto N. GMP synthetase (*Escherichia coli*) // *Methods Enzymol.* – 1978. – V. 51. – P. 213–218.
45. Gentry D., Bengra C., Ikehara K., Cashel M. Guanylate kinase of *Escherichia coli* K-12 // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268, No 19. – P. 14316–14321.
46. Oeschger M.P., Bessman M.J. Purification and properties of guanylate kinase from *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1966. – V. 241, No 22. – P. 5452–5460.
47. Nunoshiba T., Hidalgo E., Amabile Cuevas C.F., Demple B. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene // *J. Bacteriol.* – 1992. – V. 174, No 19. – P. 6054–6060.

48. Nunoshiba T., Derojas-Walker T., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Demple B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90, No 21. – P. 9993–9997.
49. Ri M.T., Khlebodarova V.A., Likhoshvai V.A. Mathematical modeling of genetic regulation of pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli* // Sixth Int. Conf. on bioinformatics of genome regulation and structure (BGRS'2008) – Novosibirsk, 2008. – P. 207.

Поступила в редакцию  
13.01.12

---

*Ри Максим Тексенович* – студент Института фармакологии и молекулярной биотехнологии Гейдельбергского университета, г. Гейдельберг, Германия (Германская служба академических обменов DAAD).  
E-mail: *maxim.ree@googlemail.com*