

УДК: 577.213:576.362:579.23

## Согласование темпов роста объема клетки и репликации ДНК: математическая модель

Лихошвай В.А.<sup>\*1,2</sup>, Хлебодарова Т.М.<sup>\*\*1</sup>

<sup>1</sup>*Институт цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия*

<sup>2</sup>*Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090, Россия*

**Аннотация.** Представлены результаты исследования моделей клеточного цикла прокариот, реализующих различные стратегии регуляции инициации репликации ДНК и роста объема клеток в свете проблемы согласования этих процессов. Показано, что решение проблемы зависит от законов роста клетки. Для клеток, рост которых подчиняется экспоненциальному закону, согласование может быть достигнуто за счет механизмов негативной регуляции инициации репликации репрессорного типа. В моделях, реализующих линейный закон роста клетки, наблюдается автоматическая подгонка темпов роста клетки под заданный темп репликации. В этом смысле в клетках, растущих по линейному закону, проблемы согласования процессов роста и репликации не существует.

**Ключевые слова:** моделирование, клеточный цикл прокариот, репликация ДНК, законы роста клеток.

### ВВЕДЕНИЕ

Механизмы, выработанные клетками прокариот для решения проблем согласования роста и репликации, до сих пор остаются предметом интенсивного исследования. Одной из первых моделей клеточного цикла прокариот, в которой был предложен молекулярный механизм, автоматически решающий проблему согласования темпов репликации с темпами роста объема клетки, была модель, основанная на предположении, что инициация репликации ДНК в клетке контролируется репрессором, ген которого расположен вблизи сайта инициации репликации (OriC), и его экспрессия регулируется по механизму авторепрессии [1]. Однако «репрессорная» идея не получила дальнейшего развития, возможно потому, что, несмотря на обилие различных вариантов негативной регуляции репликации, открытых в последующие годы у разных видов бактерий, не было обнаружено репрессора инициации репликации ДНК, который полностью удовлетворяет критериям модели [1]. Более того, практически у всех исследованных видов бактерий [2] был выявлен активатор репликации ДНК – белок DnaA, который, как было показано, контролирует экспрессию собственного гена по механизму авторепрессии и расположен недалеко от ORI [3]. Поэтому не удивительно, что развитие получила «инициаторная» идея.

Первая феноменологическая модель координированного роста, репликации и деления клетки *Escherichia coli* «инициаторного» типа [4] была разработана с учетом

\*likho@bionet.nsc.ru

\*\*tamara@bionet.nsc.ru

экспериментально установленного факта, что отношение массы клетки к количеству ORI в момент инициации репликации является величиной постоянной [5]. Этот параметр был назван «инициаторной массой», и его введение в модель в качестве «феноменологического закона» позволяло имитировать процесс репликации генома при разных скоростях роста и деления клетки. Модель [4] до сих пор успешно используется для симуляции деления клетки *E. coli* [6,7]. Отметим, что параметр «инициаторная масса» строго связывает рост объема клетки и репликацию ДНК, обеспечивая согласованное развитие этих процессов, но не раскрывает молекулярно-генетических механизмов ее решения.

В основу практически всех разработанных впоследствии моделей клеточного цикла прокариот [8–14] также заложен «инициаторный» принцип регуляции репликации, в которых инициация репликации контролируется пороговой концентрацией активатора DnaA. К сожалению, все эти модели решают проблему автоматического согласования двух саморазвивающихся процессов, роста объема клетки и репликации генома, не на структурном уровне, а путем введения в модель дополнительных феноменологических гипотез, не раскрывающих механизмов согласования роста и репликации.

Следует отметить, что до последнего времени в моделях не исследовался вопрос влияния на согласование процессов роста клетки и репликации ДНК законов роста объема клетки. Исторически сложилось так, что опубликованные ранее модели клеточного цикла прокариот были в основном ориентированы на *E. coli*, как наиболее исследованный в этом плане организм. Они основывались на законе экспоненциального роста объема клетки, установленного для клеток *Salmonella typhimurium* и *E. coli*, которые относятся к одной группе  $\gamma$ -Proteobacteria, еще в шестидесятых годах прошлого столетия [15,16]. В моделях этот закон принимался как данность и не обсуждался в свете проблемы согласования роста объема клетки и репликации ДНК.

В теоретических исследованиях законов роста одноклеточных организмов, в настоящее время высказано две точки зрения, противоположные друг другу. Согласно первой, по крайней мере, у низших эукариот не существует универсального закона роста клетки [17], а согласно второй, по крайней мере, у прокариот такой закон есть и им является экспоненциальный, а экспериментальные данные, свидетельствующие об обратном, являются результатом ограниченных возможностей используемых методов [18]. Однако в противоположность последней точке зрения накапливается все больше данных, что рост клетки *E. coli* лучше описывается линейными вариантами моделей роста [19–22]. Более того, в недавних исследованиях скорости роста индивидуальной клетки показано, что существуют межвидовые различия в стратегии роста клетки. Так у *Bacillus subtilis*, в отличие от *E. coli*, действительно, рост клетки хорошо описывается экспоненциальным законом [23]. Для *E. coli* вообще не удалось в этих исследованиях выбрать оптимальной модели.

В теоретических исследованиях последних лет, связанных с моделированием процессов роста клетки и репликации генома, вопрос согласования этих процессов рассматривается, но не со структурной точки зрения [13,14]. В модели [13] авторы демонстрируют зависимость соотношения активных и неактивных форм DnaA от скорости роста, однако, исключив из рассмотрения изменение объема клетки в течение клеточного цикла, они тем самым вывели проблему согласования роста клетки и репликации ДНК за скобки. В модели [14] исследуется поведение модели для клеток, рост которых подчиняется линейному или экспоненциальному закону, однако механизм согласования процессов роста и репликации генома введен через параметр «инициаторный объем», который, по сути, аналогичен параметру «инициаторная масса», используемый в модели [4]. Как указывалось выше, такой параметр автоматически связывает рост и репликацию, поэтому не удивительно, что поведение модели не зависело от закона роста клеток.

В экспериментальных исследованиях, посвященных механизмам регуляции репликации у бактерий, вопрос влияния размера клетки на инициацию репликации ДНК продолжает волновать исследователей [24].

Таким образом, окончательного ответа на вопрос – каким образом клетки прокариот решили проблему согласования процессов роста и репликации – до сих пор не получено. Можно только предполагать, что каждый вид бактерий решил ее по своему, поскольку у исследованных видов прокариот и механизмы инициации репликации [25], и стратегии роста клетки [24] различаются.

Исходя из вышеизложенного, мы исследуем проблему согласования роста клетки и репликации ДНК в зависимости от механизмов регуляции инициации репликации ДНК и законов роста клетки. Для построения базовой модели мы использовали описанные к настоящему времени молекулярно-генетические механизмы регуляции инициации репликации у *E. coli*, как наиболее изученного в этом отношении вида. Мы исследовали поведение модели в зависимости от экспоненциального и линейного законов роста клетки, которые постулируются для этого вида в различных исследованиях.

Мы показываем, что решение этой проблемы зависит от закона роста объема клетки. Если объем клетки растет по экспоненциальному закону, то описанных у *E. coli* негативных механизмов регуляции инициации репликации недостаточно для согласования процессов роста и репликации. Мы показываем, что введение репрессора в систему регуляции инициации репликации ведет к автоматическому согласованию этих процессов. Если рост объема клетки подчинен линейному закону, то в моделях наблюдается явление автоматического подстраивания темпов роста объема клетки под заданный темп репликации, вне зависимости от используемых клеткой механизмов регуляции инициации репликации.

## 1. МЕТОД МОДЕЛИРОВАНИЯ

Для построения модели использован блочный подход. Клеточный цикл разбит на подсистемы, которые описывают процессы репликации ДНК (инициацию, элонгацию и терминацию), рост и деление клетки, а также процессы регуляции экспрессии генов, белки которых участвуют в инициации репликации генома и ее регуляции. Для каждой подсистемы разработаны индивидуальные модели. Для описания подсистем использованы три подхода: непрерывный, дискретный (логический) и стохастический. Из элементарных моделей подсистем мы собрали 4 модели клеточного цикла, реализующие «инициаторный» и «репрессорный» механизмы регуляции инициации репликации в клетках, объем которых растет по экспоненциальному и линейному законам, и изучили их свойства. Каждая из рассмотренных моделей реализует конкретный набор подсистем в соответствии с решаемой задачей.

Расчет моделей проводится методом, который идейно восходит к методу дробных шагов Яненко [26]. Схема расчета следующая. Пусть имеется модель, которая составлена из  $n$  моделей подсистем. Упорядочим подсистемы в определенном порядке, который не будем менять в течение расчета. Фиксируем шаг расчета  $\delta t$ . Пусть динамика рассчитана до момента  $t$ . Открываем цикл по подсистемам. Пусть в цикле фиксирована текущая подсистема. Рассчитываем соответствующую подмодель на шаге  $\delta t$ , беря в качестве начальных данных текущие значения. Новые значения, полученные при расчете данной подмодели, подставляем вместо старых. Для расчета следующей подсистемы используем полученный вектор значений в качестве начальных данных. По окончании цикла получаем вектор значений, который интерпретируется как состояние системы в момент  $t + \delta t$ . Доказано, что для систем дифференциальных уравнений данный вычислительный метод гарантирует первый порядок точности [26].

## 2. ПОДСИСТЕМЫ МОДЕЛИ КЛЕТочНОГО ЦИКЛА ПРОКАРИОТ

### 2.1. Модель текущего состояния геномной ДНК

В текущий момент клеточного цикла геномная ДНК в клетке может присутствовать в виде одной или более автономных единиц. Каждая автономная единица является копией генома, которая содержит ровно один сайт терминации репликации и, возможно, несколько сайтов инициации репликации и несколько репликационных вилок. Каждую копию генома представляем ориентированным графом, вершины и дуги которого помечены дополнительной информацией, необходимой для однозначного описания текущего состояния данной копии.

Описание поясним на примерах.

На рис. 1 представлены два простейших варианта генома, которые могут присутствовать в клетке в процессе ее жизненного цикла, а также ориентированных графов, которые их описывают.

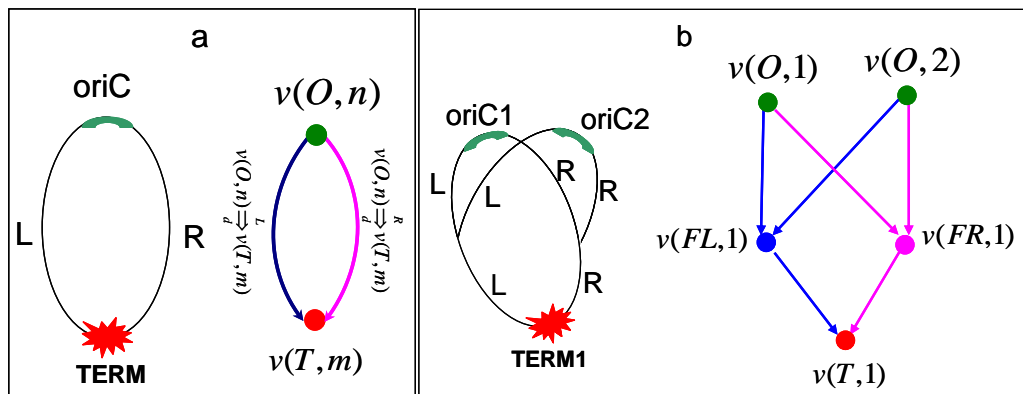


Рис. 1. Примеры геномов, которые могут присутствовать в клетке в процессе ее жизненного цикла.

На рис. 1а, слева, схематически показан минимальный геном – нереплицирующаяся кольцевая ДНК. На нем отмечены два сайта: сайт инициации репликации OriC (☺) и сайт терминации репликации TERM (✶). В моделях рассматриваются только кольцевые геномы, поэтому от OriC к TERM ведут две геномные последовательности  $L$  и  $R$ . Одну последовательность назовем левым плечом, а другую – правым. Длину левого плеча обозначим через  $DistL_{OriC,TERM}$ , правого – через  $DistR_{OriC,TERM}$ . Расстояние на ДНК между фиксированными позициями задаем в условных нуклеотидах.

На рис. 1а, справа, представлен ориентированный граф, описывающий минимальный геном. Он содержит две вершины  $v(O, n), v(T, m)$ , и две ориентированные дуги  $v(O, n) \xrightarrow[d_L]{L} v(T, m)$  и  $v(O, n) \xrightarrow[d_R]{R} v(T, m)$ . Вершина  $v(O, n)$  соответствует сайту инициации репликации OriC, что обозначается меткой  $O$ .  $n$  – уникальный номер сайта, который присваивается ему в момент рождения в процессе инициации репликации. Аналогично, вершина  $v(T, m)$  соответствует сайту терминации репликации TERM, что обозначается меткой  $T$ .  $m$  – уникальный номер данного сайта, который он получает в момент рождения в процессе терминации репликации.

Ориентированные дуги  $v(O, n) \xrightarrow[d_L]{L} v(T, m)$  и  $v(O, n) \xrightarrow[d_R]{R} v(T, m)$  соответствуют левому и правому плечу минимального генома, что отмечается буквами  $L$  и  $R$ ,  $d_L$  и  $d_R$  равны длинам плеч, соответственно. Для левого плеча минимального генома  $d_L = DistL_{OriC,TERM}$ , для правого –  $d_R = DistR_{OriC,TERM}$ .

На рис. 1b, слева, схематически показан реплицирующийся геном, содержащий две репликационные вилки. Одна движется по левому плечу, вторая – по правому. На рис. 1b, справа, представлен ориентированный граф, описывающий данный геном. Он содержит пять вершин:

$$v(O, n_1), v(O, n_2), v(FL, k), v(FR, k), v(T, m),$$

и шесть ориентированных дуг:

$$\begin{aligned} v(O, n_1) &\xrightarrow[d_{O n_1, FLk}]{L} v(FL, k), v(O, n_2) \xrightarrow[d_{O n_2, FLk}]{L} v(FL, k), v(O, n_1) \xrightarrow[d_{O n_1, FRk}]{R} v(FR, k), \\ v(O, n_2) &\xrightarrow[d_{O n_2, FRk}]{R} v(FR, k), v(FL, k) \xrightarrow[d_{FLk, Tm}]{L} v(T, m) \text{ и } v(FR, k) \xrightarrow[d_{FRk, Tm}]{R} v(T, m). \end{aligned}$$

На графе (рис. 1b) для простоты отмечены только вершины.

В данном графе появляются два новых типа вершин  $v(FL, k), v(FR, k)$ , которые отвечают вилкам. Вершины типа  $FL$  ( $FR$ ) соответствуют вилкам, реплицирующим левое (правое) плечо генома. Каждая такая вершина, кроме указания типа, снабжена номером  $k$ , который является уникальным для каждой вершины одного типа, и данный номер присваивается ей в момент инициации репликации в соответствии с алгоритмом, описанным в разделе 2.4.5. Каждая вершина в графе, соответствующая вилке, возникает в момент ее рождения в процессе инициации репликации и существует в графе вплоть до момента терминации репликации. Одинаковые номера разнотипных вершин означают, что они соответствуют левой и правой вилкам, которые появились в результате одного и того же акта инициации репликации. Дуги соответствуют последовательностям ДНК, которые расположены между соответствующими объектами, которыми являются сайты репликации, репликационные вилки и сайты терминации. Дуги обозначаются в виде записи  $v \xrightarrow[d_v]{X} w$ , в котором на первом месте стоит обозначение вершины, из которой идет дуга, в конце размещено обозначение вершины, в которую дуга направлена, между обозначениями вершин размещается двойная стрелка, над которой указан тип плеча ( $X = L$  или  $R$ ), а под ней указана текущая длина плеча  $d_v$ .

Далее будем пользоваться следующими понятиями и обозначениями.

Пусть  $x$  и  $y$  – вершины графа. Будем говорить, что из вершины  $x$  ведет путь в вершину  $y$ , если существует последовательность вершин  $v_1, \dots, v_n$ , таких, что в графе имеются дуги  $x \Rightarrow v_1, v_1 \Rightarrow v_2, \dots, v_{n-1} \Rightarrow v_n, v_n \Rightarrow y$ .

Пусть даны вершины  $v_1, \dots, v_n$ . Граф, состоящий из данных вершин и всех вершин, из которых ведут пути в вершины  $v_1, \dots, v_n$ , будем обозначать через  $G(v_1, \dots, v_n)$ . Будем говорить, что граф  $G(v_1, \dots, v_n)$  порожден вершинами  $v_1, \dots, v_n$ .

Пусть граф  $G_{genom}$  описывает некоторое текущее состояние генома клетки, реализованное в момент времени  $t$ .

Тогда для него выполняются следующие очевидные свойства:

1) Подграф  $G(w)$ , порожденный вершиной  $w$  типа  $T$  (она по определению отвечает некоторому сайту терминации репликации TERM), соответствует точно одному полному геному клетки, на котором, возможно, имеются вилки репликации.

2) Подграфы  $G(w)$ , порожденные разными вершинами типа  $T$ , являются попарно изолированными, и  $G_{genom} = \bigcup_{\substack{\text{впробегает по всем} \\ \text{вершинам типа } T}} G(w)$ .

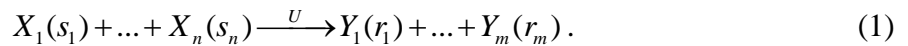
3) Любой путь, ведущий из вершины типа  $O$  в вершину типа  $T$ , либо целиком состоит из левых дуг и внутренних вершин типа  $FL$  (далее, левый путь), либо целиком состоит из правых дуг и внутренних вершин типа  $FR$  (далее, правый путь).

4) Сумма длин дуг левого/правого пути, ведущего из вершины типа  $O$  в вершину типа  $T$ , равна длине левого/правого плеча генома.

## 2.2. Универсальная стохастическая модель процесса исчезновения/порождения, используемая для описания молекулярных процессов

В модели клеточного цикла процессы инициации репликации, регуляции транскрипции, синтеза/деградации РНК, белков, формирования молекулярных комплексов и процессы модификации описаны на основе универсальной пуассоновской модели исчезновения/порождения.

Данная модель представляет алгоритм реализации единичных событий на фиксированном интервале времени. Каждое событие считается случайной величиной, распределенной по закону Пуассона. Опишем алгоритм, реализующий данный процесс. Пусть имеется процесс, в результате которого в клетке происходят акты одновременного исчезновения некоторого количества объектов вида  $X_1, \dots, X_n$  и одновременного появления некоторого количества других объектов вида  $Y_1, \dots, Y_m$ . Договоримся обозначать данный процесс стехиометрической формулой



В скобках, расположенных справа от каждого объекта, размещены стехиометрические коэффициенты, которые задают количества молекул одновременно расходуемых  $X$ -объектов (слева от стрелки) или количества одновременно прибывающих  $Y$ -объектов (справа от стрелки) в результате осуществления процесса. Значения стехиометрических коэффициентов ( $s$ -,  $r$ -коэффициенты) по смыслу являются неотрицательными целыми числами.  $s$ -коэффициенты могут равняться нулю, в этом случае объект данного вида не расходуется. Значения  $r$ -коэффициентов всегда положительны, так как если  $r_i=0$ , то  $Y_i$ -объект не прибывает в результате данного процесса и его можно исключить из правой части формулы (1). Договоримся, что если справа от конкретного объекта отсутствует стехиометрический коэффициент, то он равен единице.

Единичный акт исчезновения из среды объектов вида  $X_1, \dots, X_n$  в модели является случайным пуассоновским процессом с параметром  $U$ , который в общем случае является функцией времени и переменных модели:  $U = U(t) = U(t, V(t), x_1(t), x_2(t), \dots, y_1(t), \dots)$ . Здесь и далее  $t$  – текущее время при моделировании процесса,  $V(t)$  – объем клетки в момент времени  $t$ ,  $x_1, \dots, y_1, \dots$  абсолютные количества объектов вида  $X_1, \dots, Y_1, \dots$ . Функцию  $U$  будем располагать над стрелкой, если она имеет достаточно простой вид (например, является константой), или справа через запятую от  $Y$ -объектов в (1).

Опишем процедуру, по которой вычисляются единичные события в модели (1).

Пусть в момент времени  $t$  в клетке имеется  $x_i$  ( $y_i$ ) объектов вида  $X_i$  ( $Y_i$ ). По смыслу  $x_i$  ( $y_i$ ) – неотрицательные целые числа. Единичный акт события в (1) состоит в исчезновении из клетки  $s_i$  объектов вида  $X_i$ . Данное событие невозможно, если хотя бы для одного номера  $1 \leq i \leq n$   $x_i = 0$  или  $x_i < s_i$ . Пусть единичное событие потенциально возможно. Так как переход осуществляется для всех объектов одновременно, далее будем рассматривать события относительно объекта  $X_1$ , что не ограничивает общности. По условию потенциальной допустимости единичного события  $x_1 \geq 1$ . Зафиксируем интервал времени  $\delta t$  и вычислим для него вероятность  $p$ , что событие «объект  $X_1$  в интервале времени  $[t, t + \delta t]$  не меняет своего состояния» по приближенной формуле  $p = \exp(-U(t)\delta t)$ .

Далее последовательно выполняем следующие действия.

*Шаг 1.* Присваиваем  $w$  значение  $x_1$ :  $w := x_1$ .

*Шаг 2.* Из  $x_1$  объектов выделяем один. Уменьшаем значение  $w$  на единицу:  $w := w - 1$ .

*Шаг 3.* Генерируем случайное число  $\xi$ , равномерно распределенное на интервале  $[0, 1]$ .

Вычисляем значение  $U = U(t) = U(t, V(t), w, x_2, \dots, x_n, y_1, \dots, y_m, \dots)$ , подставляя в  $U(t, V(t), x_1, \dots, x_n, y_1, \dots, y_m, \dots)$  текущее время  $t$ , текущее значение объема  $V(t)$ , текущие количества всех объектов, кроме объекта  $X_1$ , вместо  $x_1$  подставляем  $w$ . Если  $\xi \geq \exp(-U\delta t)$ , то считаем, что в интервале времени  $[t, t + \delta t]$  произошло событие, в результате которого исчез выделенный объект. Пересчитываем количества каждого объекта в соответствии со стехиометрией процесса

$$\begin{cases} x_i := x_i - s_i, & i = 1, \dots, n, \\ y_l := y_l + r_l, & l = 1, \dots, m. \end{cases}$$

Далее считаем полученные значения текущими. Текущее время, объем, значения остальных переменных считаем неизменившимися.

Если же  $\xi < \exp(-U\delta t)$ , то считаем, что в интервале времени  $[t, t + \delta t]$  данное единичное событие не произошло. Текущее время, объем, значения всех переменных считаем неизменившимися.

$$\text{Полагаем } w = \begin{cases} w - \max(1, s_1), & \text{если событие произошло,} \\ w - 1, & \text{если событие не произошло.} \end{cases}$$

*Шаг 4.* Если  $w > 0$  и для всех  $1 \leq i \leq n$ ,  $x_i > 0$  и  $x_i \geq s_i$ , то возвращаемся на шаг 2. В противном случае алгоритм заканчивает работу.

### 2.3. Модели роста клетки

В моделях клеточного цикла объем клетки  $V$  изменяется по закону

$$\frac{dV(t)}{dt} = f(t, V, X).$$

Здесь  $f$  – функция, определяющая закон скорости роста объема клетки. В общем случае функция  $f$  может зависеть от времени, объема и переменных модели.

В работе исследуются два закона роста объема клетки: экспоненциальный и линейный. Экспоненциальный закон роста объема клетки описывается функцией

$$f(t, V, X) = k_v V(t), \quad (2)$$

линейный закон роста объема клетки описывается постоянной функцией

$$f(t, V, X) = \mu. \quad (3)$$

### 2.4. Модели процессов, задействованных в инициации репликации

В живой клетке в каждый текущий момент времени присутствует некоторое количество сайтов OriC. В модели каждый отдельный сайт инициации репликации OriC рассматривается как индивидуальный объект. Т.е. в любой момент в клетке имеется целое ненулевое число сайтов. В текущий момент времени каждый индивидуальный сайт OriC<sub>k</sub> ( $k$  – индивидуальный уникальный номер сайта, присваиваемый ему в момент рождения) находится в одном из нескольких альтернативных состояний. Каждое состояние OriC характеризуется буквенной строкой  $S_{OriC,k} = XYZ_1 \dots Z_s$ .  $X$  принимает значение  $O$  или  $C$ ,  $Y = O, F, H$ ,  $Z = O, A, D$ ,  $s$  – число сайтов связывания DnaA-АТФ в

OriC, обозначаемых далее через  $(OriC:DnaA)$ .  $X=O$  обозначает, что сайт OriC пребывает в состоянии физического эклипса (см. ниже раздел 2.4.1). В этом состоянии никакие молекулярные процессы, описанные в данном разделе, с данным сайтом невозможны. Поэтому равенство  $X=O$  автоматически означает, что  $S_{OriC,k} = OOO_1...O_s$ , которое не меняется на протяжении всего периода физического эклипса.

#### 2.4.1. Модель физического эклипса

Согласно данной модели, конкретный сайт  $OriC_k$  пребывает в физическом эклипсе с момента  $t_{ini, OriCk}$  его появления в результате акта инициации репликации до момента времени  $t = t_{ini, OriCk} + t_{eclips, OriC}$ , где  $t_{eclips, OriC}$  – длительность физического эклипса. В момент окончания эклипса сайт переходит из неактивного состояния  $S_{OriC,k} = OOO_1...O_s$ , в активное  $S_{OriC,k} = .$  Данная модель физического эклипса является детерминированной.

#### 2.4.2. Модель инициации репликации из прединициаторного состояния $CYZ_1...Z_s$ , $Y = F, H, Z = O, A, D$

Данная модель реализует гипотезу, что Hda-ADP не является репрессором инициации и гидролиз DnaA-ATP до DnaA-ADP на сайте  $(OriC:DnaA)$ , который находится в прединициаторном состоянии, не выполняет репрессивную функцию.

#### 2.4.3. Модель инициации репликации из состояния $CFZ_1...Z_s$ , $Z = O, A, D$

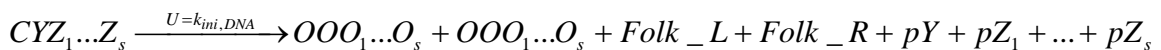
Этот вариант модели отвечает гипотезе, что Hda-ADP является репрессором инициации, но после того как на OriC сформировался beta-clamp окупированность сайтов  $(OriC:DnaA)$  не важна.

#### 2.4.4. Модель инициации репликации из состояния $COO_1...O_s$

В данном варианте модели процесс инициации репликации осуществляется по наиболее простой схеме, в которой по смыслу не рассматриваются функции белков DnaA, DnaN и Hda.

#### 2.4.5. Стохастическая модель формирования репликативных вилок и двух новых копий сайта репликатора инициации в моделях 2.4.2–2.4.4

Процесс формирования репликативных вилок и двух новых копий сайта репликатора инициации описан случайным процессом, согласно уравнению (1), пояснения к которому даны в разделе 2.2:



Здесь  $Y$  и  $Z$  принимают значения в соответствии с выбранным вариантом модели инициации репликации. В момент инициации репликации исчезает старая копия OriC  $CYZ_1...Z_s$ , возникают две вилки репликации,  $Folk\_L$  и  $Folk\_R$ , которые начинают удваивать (реплицировать) левое и правое плечо генома, соответственно, и возникают две новые копии OriC, которые находятся в состоянии эклипса, т.е. в состоянии  $OOO_1...O_s$ . Кроме того, в раствор выделяются белки, которые были связаны с соответствующими сайтами OriC: если  $Y$  и/или  $Z$  равен  $O$ ,  $pY$  и/или  $pZ$  пустое слово, т.е. белок с данного сайта не выделяется, по причине его отсутствия, если  $Y=F (H)$ , то  $pY = multBETA(multBETA+Hda-ADP)$ , если  $pZ=A (D)$ , то  $pZ = multDnaA-ATP (multDnaA-ADP)$ .



Акт инициации репликации меняет структуру графа, описывающего геном в текущий момент времени (см. раздел 2.1), в соответствии с чем, после инициации репликации запускается алгоритм, приводящий структуру графа в соответствие с новой ситуацией.

Алгоритм работает следующим образом: пусть вершина  $v(O, n)$  графа, описывающего геном в момент времени  $t$ , отвечает сайту инициации репликации OriC, на котором произошла инициация репликации. Пусть из нее выходят дуги

$$v(O, n) \xrightarrow[d_{O_n, HL_k}]{L} v(HL, k), HL = FL \vee T \text{ и } v(O, n) \xrightarrow[d_{O_n, HR_k}]{R} v(HR, k), HR = FR \vee T.$$

Удаляем эти дуги из графа и добавляем в него три новые вершины  $v(O, n_{\max} + 1), v(FL, k_{\max} + 1), v(FR, k_{\max} + 1)$  ( $n_{\max}$  – максимальный номер, присвоенный вершинам текущего графа, отвечающим сайтам OriC,  $k_{\max}$  – максимальный номер, присвоенный вершинам текущего графа, отвечающим ранее рожденным репликационным вилкам левого и правого плеча) и шесть новых дуг:

$$\begin{aligned} v(O, n) &\xrightarrow[d_{O_n, FL_{k_{\max}+1}}]{L} v(FL, k_{\max} + 1), d_{O_n, FL_{k_{\max}+1}} = 0; \\ v(O, n_{\max} + 1) &\xrightarrow[d_{O_{n_{\max}+1}, FL_{k_{\max}+1}}]{L} v(FL, k_{\max} + 1), d_{O_{n_{\max}+1}, FL_{k_{\max}+1}} = 0; \\ v(O, n) &\xrightarrow[d_{O_n, FR_{k_{\max}+1}}]{R} v(FR, k_{\max} + 1), d_{O_n, FR_{k_{\max}+1}} = 0; \\ v(O, n_{\max} + 1) &\xrightarrow[d_{O_{n_{\max}+1}, FR_{k_{\max}+1}}]{R} v(FR, k_{\max} + 1), d_{O_{n_{\max}+1}, FR_{k_{\max}+1}} = 0; \\ v(FL, k_{\max} + 1) &\xrightarrow[d_{FL_{k_{\max}+1}, HL_k}]{L} v(HL, k), d_{FL_{k_{\max}+1}, HL_k} = d_{O_n, HL_k}; \\ v(FR, k_{\max} + 1) &\xrightarrow[d_{FR_{k_{\max}+1}, HR_k}]{R} v(HR, k), d_{FR_{k_{\max}+1}, HR_k} = d_{O_n, HR_k}. \end{aligned}$$

Получившийся граф описывает геном, сформировавшийся в результате инициации репликации на сайте OriC, представляемом в графе  $G_{genome}$  в момент инициации репликации вершиной  $v(O, n)$ . Заметим, что в переформированном графе вершина  $v(O, n)$  отвечает вновь рожденному сайту инициации репликации, но за ним сохранен тот же номер. Однако биологический смысл данного сайта отличается от предыдущего, и это его отличие фиксируется в родословной, которая ведется для каждого сайта репликации. Алгоритм формирования родословной описан в разделе 2.9.

## 2.5. Молекулярные процессы на активных сайтах OriC, рассматриваемые в моделях клеточного цикла

Как уже отмечалось выше, сайт инициации репликации рассматривается как сложная молекулярно-генетическая структура, которая содержит  $s$  сайтов ( $OriC:DnaA$ ), с которыми могут связываться различные формы белка DnaA. Предполагается, что с каждым сайтом связывание осуществляется как независимый случайный пуассоновский процесс, описываемый формулой (1). Если все  $s$  сайтов провзаимодействовали с DnaA-АТФ, то возникает новое состояние сайта репликации, которое называется открытым комплексом. С ним может взаимодействовать активная форма белка DnaN, которая обозначена в моделях *multBETA*. Данное взаимодействие формирует на сайте *beta-clamp*. Список моделей процессов, протекающих на OriC, приведен в табл. 1.

**Таблица 1.** Список моделей процессов, протекающих на OriC

№ модели	Модель (процесс)
2.5.1( $\alpha=A$ ), 2.5.2( $\alpha=D$ ).	$COZ_1 \dots Z_{i-1} O_i Z_{i+1} \dots Z_s + multDNAA - AM_{\alpha} P \xrightarrow{U} COZ_1 \dots Z_{i-1} \alpha_i Z_{i+1} \dots Z_s, U = k_{O \rightarrow X} \frac{multDNAA - AM_{\alpha} P}{V(t)}$ ; $Z_1, \dots, Z_{i-1}, Z_{i+1}, \dots, Z_s = O, A, D; \alpha = A, D; M_A = T, M_D = D$ (связывание DnaA-ATP ( $\alpha=A$ ) и DnaA-ADP ( $\alpha=D$ ) с сайтом ( <i>OriC:DnaA</i> ))
2.5.3( $\alpha=A$ ), 2.5.4( $\alpha=D$ ).	$CWZ_1 \dots Z_{i-1} \alpha_i Z_{i+1} \dots Z_s \xrightarrow{U=k_{X \rightarrow O}} CWZ_1 \dots Z_{i-1} O_i Z_{i+1} \dots Z_s + multDNAA - AM_{\alpha} P$ ; $W=O, F, H; Z_1, \dots, Z_{i-1}, Z_{i+1}, \dots, Z_s = O, A, D; \alpha = A, D; M_A = T, M_D = D$ (диссоциация DnaA-ATP ( $\alpha=A$ ) и DnaA-ADP ( $\alpha=D$ ) с сайта ( <i>OriC:DnaA</i> ))
2.5.5.	$COA_1 \dots A_s + multBETA \xrightarrow{U} CFA_1 \dots A_s, U = k_{O \rightarrow F} \frac{multBETA}{V(t)}$ (взаимодействие DnaN с открытым комплексом OriC - формирование beta-clamp)
2.5.6.	$CFZ_1 \dots Z_s \xrightarrow{U=k_{F \rightarrow O}} COZ_1 \dots Z_s + multBETA, Z_1, \dots, Z_s = O, A, D,$ (диссоциация DnaN с OriC - разборка beta-clamp)
2.5.7.	$CFZ_1 \dots Z_s + multHDA - ADP \xrightarrow{U} CHZ_1 \dots Z_s, U = k_{F \rightarrow H, bi} \frac{multHDA - ADP}{V(t)}, Z_1, \dots, Z_s = O, A, D$ (формирование системы RIDA по бимолекулярному механизму)
2.5.8.	$CHZ_1 \dots Z_s \xrightarrow{U=k_{H \rightarrow F}} CFZ_1 \dots Z_s + multHDA - ADP, Z_1, \dots, Z_s = O, A, D$ (диссоциация Hda-ADP с ДНК OriC - декомпозиция системы RIDA)
2.5.9.	$CHZ_1 \dots Z_{i-1} A_i Z_{i+1} \dots Z_s \xrightarrow{U=k_{HA \rightarrow HD}} CHZ_1 \dots Z_{i-1} D_i Z_{i+1} \dots Z_s, Z = O, A, D$ (гидролиз DnaA-ATP на сайте ( <i>OriC:DnaA</i> ))

## 2.6. Модели процессов синтеза, деградации и формирования активных форм белков, участвующих в инициации репликации

Как указывалось выше, процессы регуляции инициации репликации, транскрипции, трансляции, формирования молекулярных комплексов, процессы модификации описаны на основе универсальной пуассоновской модели исчезновения/порождения (см. раздел 2.2.). Список моделей данного раздела приведен в табл.2.

**Таблица 2.** Список моделей процессов синтеза и деградации мРНК и белков, а также процессов формирования и распада активных форм белков, участвующих в регуляции инициации репликации

№ модели	Модель (процесс)
2.6.1. 2.6.2.	$pDNAA(0) \xrightarrow{U} mDNAA, U = \frac{k_{pDNAA \rightarrow mDNAA}}{Km_{DNAA-ATP} + \frac{multDNAA - ATP}{V(t)}}, mDNAA \xrightarrow{U=k_{mDNAA \rightarrow}}$ (синтез полицистронной mRNA DnaA-DnaN с промотора <i>pDnaA</i> и ее деградация)
2.6.3. 2.6.4.	$pBETA(0) \xrightarrow{U=k_{pBETA \rightarrow mBETA}} mBETA; mBETA \xrightarrow{U=k_{mBETA \rightarrow}}$ (синтез mRNA DnaN с собственного конститутивного промотора <i>pBETA</i> и ее деградация)
2.6.5. 2.6.6.	$mBETA(0) \xrightarrow{U=k_{mBETA \rightarrow protBETA}} protBETA.; mDNAA(0) \xrightarrow{U=k_{mDNAA \rightarrow protBETA}} protBETA.$ (синтез белка DnaN с моно- и полицистронной mRNA)

2.6.7.	$mDNAA(0) \xrightarrow{U=k_{mDNAA \rightarrow protDNAA-ATP}} protDNAA - ATP$ (синтез белка DnaA-ATP)
2.6.8.	$protBETA(2) \xrightarrow{U} multBETA, U = k_{protBETA \rightarrow multBETA} \frac{protBETA}{V(t)}$ (формирование DnaN <sub>2</sub> )
2.6.9.	$multBETA \xrightarrow{U=k_{multBETA \rightarrow protBETA}} protBETA(2)$ (декомпозиция DnaN <sub>2</sub> на мономеры)
2.6.10.	$protBETA \xrightarrow{U=d_{protBETA \rightarrow 0}} 0$ (деградация свободной формы мономера белка DnaN)
2.6.11.	$multBETA \xrightarrow{U=d_{multBETA \rightarrow protBETA}} protBETA$ . (деградация мономера DnaN в составе DnaN <sub>2</sub> )
2.6.12.	$protDNAA - ATP(4) \xrightarrow{U} multDNAA - ATP, U = k_{protDNAA-ATP \rightarrow multDNAA-ATP} \left( \frac{pDNAA - ATP}{V(t)} \right)^3$ (формирование тетрамера DnaA-ATP)
2.6.13.	$multDNAA - ADP \xrightarrow{U=k_{multDNAA-ADP \rightarrow multDNAA-ATP}} multDNAA - ATP$ (восстановление тетрамера DnaA-ATP из тетрамера DnaA-ADP)
2.6.14.	$multDNAA - ATP \xrightarrow{U=k_{multDNAA-ATP \rightarrow protDNAA-ATP}} protDNAA - ATP(4)$ (декомпозиция тетрамера DnaA-ATP на мономеры)
2.6.15.	$protDNAA - ATP \xrightarrow{U=d_{protDNAA-ATP \rightarrow 0}} 0$ (деградация свободной формы мономера белка DnaA-ATP)
2.6.16.	$multDNAA - ATP \xrightarrow{U=d_{multDNAA-ATP \rightarrow protDNAA-ATP}} protDNAA - ATP(3)$ (деградация мономера DnaA-ATP в составе тетрамера)
2.6.17-18	$pHDA(0) \xrightarrow{U=k_{pHDA \rightarrow mHDA}} mHDA$ ; $mHDA \xrightarrow{U=k_{mHDA \rightarrow}} 0$ (синтез и деградация mRNA-Hda)
2.6.19	$mHDA(0) \xrightarrow{U=k_{mHDA \rightarrow protHDA-ADP}} protHDA$ (синтез белка Hda)
2.6.20	$protHDA \xrightarrow{U=d_{protHDA \rightarrow}} 0$ (деградация белка Hda)
2.6.21	$multDnaA - ATP + dat \xrightarrow{U} dat : multDnaA - ATP, U = k_{DnaA-ATP \rightarrow dat:DnaA-ATP} \frac{dat}{V(t)}$ (связывание DnaA-ATP с <i>dat</i> локусом)
2.6.22	$dat : multDnaA - ATP \xrightarrow{U=k_{dat:DnaA-ATP \rightarrow DnaA-ATP}} multDnaA - ATP + dat$ (диссоциация DnaA-ATP с <i>dat</i> локуса)

## 2.7. Модели репликации

### 2.7.1. Модель элонгации репликации

Модель исполнена в виде отдельного программно реализованного алгоритма, рассчитывающего продвижение каждой вилки вдоль ДНК за фиксированный промежуток времени  $\delta t$ . В текущий момент времени  $t$  на вход алгоритму подается граф  $G_{genom}$ . Разбиваем граф на подграфы, которые порождаются вершинами, соответствующие терминаторам репликации. Далее открываем цикл по вершинам-терминаторам и последовательно обрабатываем дуги порожденного графа, двигаясь от текущей вершины типа  $T$  к вершинам типа  $O$ . Алгоритм обработки состоит из следующих шагов.

*Шаг 1.* Рассматриваем дуги нижнего слоя. Их ровно две.

$$v(HL, n) \xrightarrow[d_{HL_n, T_m}]{L} v(T, m), \quad v(HR, n) \xrightarrow[d_{HR_n, T_m}]{R} v(T, m).$$

Текущая вершина  $v(T, m)$  соответствует сайту терминации репликации TERM. Левые вершины могут соответствовать сайтам репликации (тогда одновременно  $HL = O$  и  $HR = O$ ), либо соответствовать вилкам репликации (тогда  $H = F$ ).

Далее различаем два случая.

*Случай 1.1.* Левые вершины дуг имеют тип  $O$ , т.е. соответствуют инициатору репликации ORIC. Тогда по определению  $d_{O_n, T_m} = DISTL_{ORIC, TERM}$  для левой дуги,  $d_{O_n, T_m} = DISTR_{ORIC, TERM}$  для правой дуги. Так как координаты  $ORIC$  и  $TERM$  в модели не меняются, то  $d_{O_n, T_m}(t + \delta t) = d_{O_n, T_m}(t)$  для каждой дуги. На этом анализ текущего порожденного графа завершается. Фиксируется следующая вершина-терминатор и осуществляется переход к шагу 1. Если все вершины-терминаторы рассмотрены, то алгоритм завершает работу.

*Случай 1.2.* Левые вершины имеют тип  $FL$  и  $FR$ , т.е. соответствуют репликационным вилкам. Вилки с течением времени удаляются от  $ORIC$  и приближаются к  $TERM$ . Обозначим дистанцию, которую проходит левая вилка, через  $n_L(\delta t) = VL_{elong} \delta t$ , и через  $n_R(\delta t) = VR_{elong} \delta t$  – для правой вилки (здесь  $VL_{elong}$  и  $VR_{elong}$  – скорости элонгации левого и правого плеча, измеряемые в усл.нукл./мин). Тогда длины дуг

$$v(FL, n) \xRightarrow{d_{FL_n, T_m}^L} v(T, m), \quad v(FR, n) \xRightarrow{d_{FR_n, T_m}^R} v(T, m)$$

в момент времени  $t + \delta t$  будут равняться

$$d_{FL_n, T_k}(t + \delta t) = d_{FL_n, T_k}(t) - n_L(\delta t), \quad d_{FR_n, T_k}(t + \delta t) = d_{FR_n, T_k}(t) - n_R(\delta t).$$

$n_L(\delta t)$  и  $n_R(\delta t)$  подсчитываются по следующим формулам:

$$n_L(\delta t) = \min(d_{FL_n, T_k}(t), VL_{elong\_replic} \cdot \delta t),$$

$$n_R(\delta t) = \min(d_{FR_n, T_k}(t), VR_{elong\_replic} \cdot \delta t).$$

Здесь  $VL_{elong\_replic}$  и  $VR_{elong\_replic}$  – заданные параметры модели, имеющие смысл скорости элонгации левого, правого плеча, соответственно (значения даны в табл.3).

Смысл формул расчета прост. Поясним для левой вилки. Для правой вилки объяснение аналогично. Если  $d_{FL_n, T_k}(t) = 0$ , то это означает, что левая вилка уже достигла сайта терминации и ее дальнейшее движение не возможно. Если же  $d_{FL_n, T_k}(t) > 0$ , то левая вилка продолжает движение, но она не может пройти расстояние больше дистанции, отделяющей ее от сайта терминации репликации. Поэтому, если  $VL_{elong\_replic} \cdot \delta t > d_{FL_n, T_k}(t)$ , то вилка достигает сайта  $TERM$  еще до истечения интервала  $\delta t$  и останавливается, в противном случае вилка пройдет максимальную дистанцию. Переходим к шагу 2.

*Шаг 2.* Рассматриваем дуги следующего по высоте слоя. На данный шаг мы приходим, если на предыдущем слое существовали вершины, отвечающие вилкам, которые всегда присутствуют парами  $v(FL, m)$  и  $v(FR, m)$ . В этом случае существует ровно четыре дуги рассматриваемого слоя и две из них левые, а две – правые:

$$v(HL, n) \xRightarrow{d_{HL_n, FL_m}^L} v(FL, m) \quad \text{и} \quad v(HR, n) \xRightarrow{d_{HR_n, FR_m}^R} v(FR, m), \quad n = n_1, n_2.$$

На предыдущем шаге для вершин  $v(FL, m)$  и  $v(FR, m)$  уже вычислены значения  $n_L(\delta t)$  и  $n_R(\delta t)$ . Далее различаем следующие случаи.

*Случай 2.1.*  $HX = O$  ( $X = L$  или  $R$ , вершина соответствует OriC). Тогда  $d_{HX_n, FX_m}(t + \delta t) = d_{O_n, FX_m}(t + \delta t) = d_{O_n, FX_m}(t) + n_{FX_m}(\delta t)$ ,  $X = L \vee R, n_1, n_2$ .

Случай 2.2.  $HX=FX$  (если  $X=L$ , то вершина соответствует левой вилке, иначе  $X=R$ , и вершина соответствует правой вилке). Тогда длина дуги в момент времени  $t + \delta t$  будет равняться

$$d_{FX_n,FX_m}(t + \delta t) = d_{O_n,FX_m}(t) - n_{FX_n}(\delta t) + n_{FX_m}(\delta t), \quad X = L \vee R,$$

где  $n_{FX_n}(\delta t) = \min(d_{FX_n,FX_m}(t) + n_{FX_m}(\delta t), VL_{elong\_replic}(\delta t))$ .

Повторяем шаг 2 столько раз, сколько имеется слоев в графе. После этого переходим к шагу 1 для следующей вершины-терминатора. В противном случае выполнение алгоритма элонгации заканчивается, и управление передается модели терминации репликации.

### 2.7.2. Модель репликации выделенного участка генома

В моделях клеточного цикла в соответствии с решаемой задачей могут учитываться функции белков. С каждым белком *Prot* в модели связывается участок ДНК, для которого задаются две координаты в геноме: начало  $Dist_{inact\_func}(Prot)$  и конец  $D_{vozvr\_func}(Prot)$ , которые задают относительное расстояние от сайта OriC, измеряемое в условных нуклеотидах. По умолчанию считается, что участки лежат на левом плече генома. Если левая вилка репликации достигла точки  $Dist_{inact\_func}(Prot)$  на конкретной копии генома, то соответствующая копия гена, кодирующего белок *Prot*, инактивируется, и синтез мРНК с нее прекращается. После того как вилка репликации достигает позиции  $D_{vozvr\_func}(Prot)$ , две вновь возникшие копии гена, кодирующего белок *Prot*, становятся активными и включаются в пул генов, с которых может синтезироваться мРНК (*Prot*).

Для *dat* локуса также задается два параметра  $Dist_{inact\_func}(dat)$  и  $D_{vozvr\_func}(dat)$ , которые имеют аналогичный смысл. В момент инактивации *dat* локуса в раствор выделяются молекулы тетрамера *multDNAA-ATP*, связанные с данной копией локуса.

### 2.8. Модель терминации репликации

Терминация репликации является сложным молекулярно-генетическим процессом, который оформляет появление в клетке двух копий генома. В модели данный процесс описан в виде феноменологического логического алгоритма. Алгоритм активируется только в том случае, если конкретной области терминации репликации достигают обе вилки – левая и правая, которые возникли одновременно в результате ранее произошедшего акта инициации репликации. Так как в модели не предполагается равенства длин левого и правого плеча генома и равенства скоростей движения вилок, то вилки, одновременно стартовавшие из области инициации репликации, могут достигать области терминации в разные моменты времени. Для этого случая в модели принята гипотеза, что вилка, достигшая сайта терминации, «ждет отставшую», т.е. терминация репликации откладывается.

Алгоритм разделения реплицировавшегося генома работает следующим образом. В каждый текущий момент времени  $t$ , после завершения работы алгоритма элонгации репликации, для каждой вершины  $v(T,k)$ , отвечающей сайту терминации репликации, берем порождающий граф  $G(v(T,k))$ . По построению он описывает текущее состояние реплицировавшегося генома. Берем в данном графе вершины, дуги из которых входят в вершину  $v(T,k)$ . По смыслу моделируемого процесса репликации таких вершин ровно две ( $v(FL,m)$ ,  $v(FR,m)$ ) и они отвечают вилкам, которые возникли одновременно в момент инициации репликации. Одна из них удваивает ДНК, двигаясь по левому плечу (*FL*), а вторая – по правому (*FR*). В принятых обозначениях дуги имеют следующий вид:

$$v(FL,m) \xrightarrow[d_{FLm,Tk}^L]{} v(T,k) \quad \text{и} \quad v(FR,m) \xrightarrow[d_{FRm,Tk}^R]{} v(T,k).$$

Как описано выше, числа  $d_{FL_m, T_k}$  и  $d_{FR_m, T_k}$  равняются расстоянию соответствующей вилки от сайта терминации репликации. Далее различаем два случая.

*Случай 1.* Если  $d_{FL_m, T_k}$  или  $d_{FR_m, T_k}$  не равно 0, то заключаем, что репликация генома не завершена, и переходим к анализу состояния следующего терминатора репликации.

*Случай 2.* Если  $d_{FL_m, T_k} = 0$  и  $d_{FR_m, T_k} = 0$  (по смыслу это означает, что процесс репликации генома завершился), то осуществляем разделение реплицировавшегося генома на две независимые геномные единицы. В текущее время состояние реплицировавшегося генома, но еще не разделенного на две независимые геномные единицы, описывается связным графом  $G(v(T, k))$ , где  $v(T, k)$  соответствует сайту терминации репликации, расположенному на данном геноме. Рассматриваем первые два слоя данного графа. Выпишем дуги этих слоев в явном виде: дуги первого слоя

$$v(FL, m_1) \xrightarrow{d_{FLm_1, T_k}=0}^L v(T, k) \quad \text{и} \quad v(FR, m_1) \xrightarrow{d_{FRm_1, T_k}=0}^R v(T, k),$$

дуги второго слоя

$$\begin{aligned} v(HL, m_2) &\xrightarrow{d_{HLm_2, FLm_1}}^L v(FL, m_1), \quad HL = FL \vee O, & v(HL, m_3) &\xrightarrow{d_{HLm_3, FLm_1}}^L v(FL, m_1), \quad HL = FL \vee O, \\ v(HR, m_2) &\xrightarrow{d_{HRm_2, FRm_1}}^R v(FR, m_1), \quad HR = FR \vee O, & v(HR, m_3) &\xrightarrow{d_{HRm_3, FRm_1}}^R v(FR, m_1), \quad HR = FR \vee O. \end{aligned}$$

Удаляем из графа  $G_{cell\_replic}$  вершины  $v(FL, m_1)$ ,  $v(FR, m_1)$  и выписанные выше дуги первого и второго слоев. Вместо них добавляем в граф вершину  $v(T, k_{\max} + 1)$  и дуги:

$$\begin{aligned} v(HL, m_2) &\xrightarrow{d_{HLm_2, T_k}=d_{HLm_2, FLm_1}}^L v(T, k), & v(HR, m_2) &\xrightarrow{d_{HRm_2, T_k}=d_{HRm_2, FRm_1}}^R v(T, k), \\ v(HL, m_3) &\xrightarrow{d_{HLm_3, T_{k_{\max}+1}}=d_{HLm_3, FLm_1}}^L v(T, k_{\max} + 1), & v(HR, m_3) &\xrightarrow{d_{HRm_3, T_{k_{\max}+1}}=d_{HRm_3, FRm_1}}^R v(T, k_{\max} + 1). \end{aligned}$$

Если не все вершины, соответствующие сайтам терминации, рассмотрены, то переходим к анализу следующей вершины типа  $T$ . Если все вершины типа  $T$  рассмотрены, то получаем граф, который описывает промежуточное текущее состояние генома, сформировавшееся в клетке после разделения реплицированных геномов. После этого возвращаемся к анализу полученного графа на предмет поиска других завершенных репликаций. В конечном итоге разделяем все реплицировавшиеся геномы и завершаем работу алгоритма терминации репликации.

## 2.9. Деление клетки

Модель деления клетки представляет алгоритм осуществления акта деления клетки на две дочерние в момент времени  $t$ , при выполнении следующих условий:

- 1) текущий объем клетки  $V(t)$  больше минимального критического  $VD_{min}$ ;
- 2) в клетке присутствует не менее двух полных геномов;
- 3) значение  $T_m$  определено и  $T_m + D \geq t$ , где  $D$  – минимальное время построения перегородки, разделяющей материнскую клетку на две изолированные дочерние клетки.

Алгоритм деления клетки существенно опирается на параметр  $T_m$ . Его значение вычисляется итерационно. Если в клетке в текущий момент времени присутствует один геном, то значение  $T_m$  считается неопределенным, а условия 2) и 3) – невыполненными. По этой причине деление клетки невозможно. Если в клетке в момент  $t$  произошла терминация репликации, то в ней в этот момент появляется два генома и  $T_m$

присваивается значение  $t$ , которое ассоциируется с каждым возникшим сайтом терминации. В данный момент условие 2) становится истинным. Если в этот момент выполняется условие 1), то запускается процесс построения перегородки, на которое требуется время  $D$ . Если в интервале времени  $[T_m, T_m + D]$  происходит одно или несколько дополнительных актов терминации репликации, то информация о последовательности рождения новых сайтов также фиксируется и строго ассоциируется с каждым рожденным сайтом. При этом даты рождения исчезнувших сайтов по-прежнему сохраняются в качестве значения  $T_m$ , так как клетка еще не закончила процесс деления, начавшийся после данного акта. Т. е., каждый сайт терминации репликации в любой текущий момент клеточного цикла несет родословную своего происхождения, в которой фиксированы все предыдущие моменты терминации репликации, которые не завершились делением клетки, среди которых  $T_m$  является самым ранним моментом (алгоритм формирования родословных описан ниже).

В момент времени  $t = T_m + D$  становится истинным условие 3). В этот момент происходит деление материнской клетки на две дочерние. Из них случайным образом с вероятностью 0.5 выбирается одна для последующего расчета клеточного цикла. Если в выбранной дочерней клетке присутствует один геном, то родословная данного сайта считается пустой, а  $T_m$  неопределенным параметром. Если же число геномов равно двум или более, то каждый сайт терминации получает в наследство родословную, в которых сохраняются все моменты терминации репликации, которые произошли позже времени  $T_m$ . Среди них вычисляется самое раннее время, которое и полагается равным  $T_m$  для текущей клетки.

Опишем алгоритм разделения материнской клетки на две дочерние. Он осуществляет распределение между дочерними клетками всех наработанных веществ. РНК, белки и их комплексы, не связанные с геномной ДНК, распределяются между дочерними клетками в равных пропорциях. Что касается геномной ДНК, то она распределяется между дочерними клетками следующим образом. В модели в каждый момент инициации репликации исчезает один сайт инициации репликации, и рождаются два новых сайта и две новые вилки репликации, одна из которых будет реплицировать левое плечо, а другая - правое. В этот момент сайты инициации репликации помечаются разными буквами  $A$  и  $B$ , для них фиксируется время инициации репликации и запоминается порядковый номер произошедшего акта инициации репликации. Метка исчезнувшего сайта, время его рождения и уникальный порядковый номер акта инициации репликации, в котором в свое время был рожден исчезнувший сайт, также сохраняются для каждого нового сайта. Таким образом, в любой момент времени с каждым сайтом инициации репликации, присутствующим в клетке, связаны упорядоченные последовательности троек  $(A, t_{i1}, i_1)$ ,  $(B, t_{i2}, i_2)$ ,  $(B, t_{i3}, i_3)$ ,  $(A, t_{i4}, i_4)$ , ..., которые представляют родословные сайтов инициации репликации. С каждой вновь возникшей вилкой связаны момент ее рождения и номер акта инициации репликации, в котором она родилась. Поэтому у одновременно рожденных вилок эти показатели совпадают. Момент терминации репликации означает, что две одновременно рожденные вилки репликации достигли сайта терминации. Пусть они были рождены в момент  $t_i$  в  $i$ -ом акте инициации репликации. По смыслу это означает, что в клетке существует как минимум два сайта инициации репликации, родословные которых начинаются с троек  $(A, t_i, i)$  и  $(B, t_i, i)$ . В момент терминации в клетке возникают два полных генома и рождаются два новых сайта терминации репликации. Причем обязательно один сайт терминации репликации возникает на новой копии генома, родословные всех сайтов инициации репликации на котором начинаются с тройки  $(A, t_i, i)$ , а другой – на геноме, содержащем сайты инициации с родословными  $(B, t_i, i), \dots$ . Поэтому в момент времени терминации репликации  $T_i$  с первым сайтом терминации репликации соотносится тройка  $(A, T_i, i)$ , а с другим – тройка  $(B, T_i, i)$ . Для каждого вновь

рожденного в интервале времени  $[T_m, T_m+D]$  терминатора репликации эта информация сохраняется в виде упорядоченной последовательности троек  $(A, T_i, i)$ , ... или  $(B, T_i, i)$ , .... Эти последовательности формируются по алгоритму, идентичному алгоритму формирования родословных сайтов инициации репликации, и по смыслу представляют родословные сайты терминации репликации. Совокупность родословных всех сайтов инициации репликации и сайта терминации репликации, лежащих на одном геноме, назовем родословной генома. Родословные всех геномов непосредственно перед делением клетки обладают следующими двумя важными свойствами: (а) если две родословные принадлежат одному геному, то их первые тройки содержат одинаковые буквы, либо  $A$ , либо  $B$ ; (б) если в клетке содержится больше одного генома, то существует хотя бы по одному геному, родословные которых начинаются с троек, содержащих разные буквы. В модели принято, что  $A$ - и  $B$ -геномы расходятся по разным клеткам. Как уже говорилось выше, после формирования дочерних клеток для дальнейшего расчета одиночного цикла отбирается только одна клетка. Выбор производится случайным образом с вероятностью  $1/2$ . В геномах выбранной клетки все родословные укорачиваются на одну первую тройку и обладают теми же двумя свойствами (а) и (б).

В модели принято, что в момент деления объем материнской клетки распределяется между дочерними клетками поровну. После завершения работы алгоритма деления клетки для выбранной дочерней клетки снова запускается расчет жизненного цикла.

### 3. МОДЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, АНАЛИЗИРУЕМЫЕ В РАБОТЕ

В работе рассмотрено 4 варианта модели регуляции инициации репликации. Каждый вариант содержит конкретный набор подмоделей, описанных в разделе 2. Все варианты моделей содержат общее ядро, состоящее из подмоделей 2.1, 2.4.5, 2.5.1–2.5.6, 2.5.8, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9.

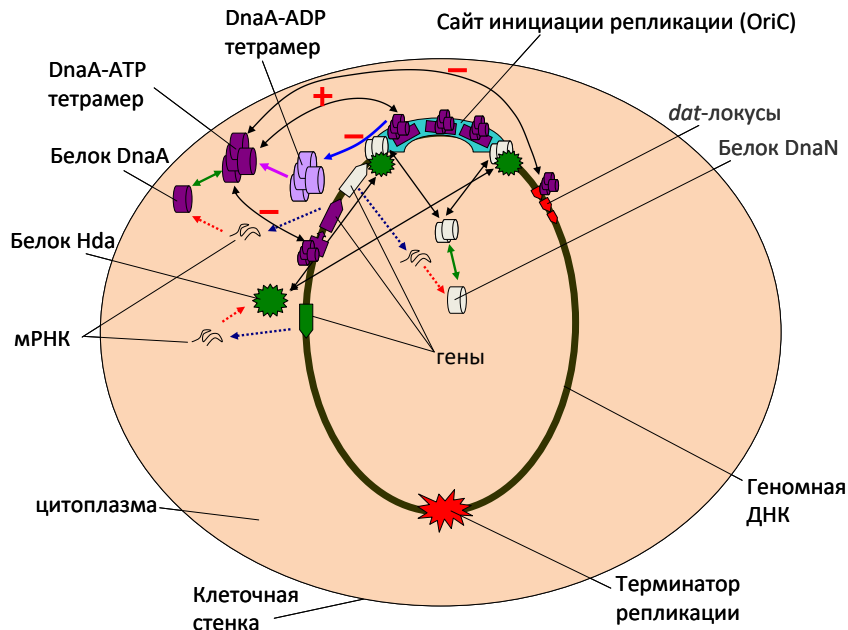
Базовой является модель «инициаторного» типа, в которой клетки растут по экспоненциальному или линейному закону. Она ориентирована на *E. coli* и в неё включены все описанные к настоящему времени механизмы негативной регуляции инициации репликации и концентрации активных форм белка DnaA – инициатора репликации [3,25]. А именно: 1) блокирование инициации репликации на вновь синтезированных OriC белком SeqA (физический эклипс) [26]; 2) распространение негативного действия физического эклипса на экспрессию оперона *dnaA-dnaN*, расположенного вблизи OriC [27–29] 3) негативная регуляция оперона *dnaA-dnaN* белком DnaA; 4) учитывается титрование активной формы DnaA-ATP через связывание с высоко аффинными *dat*-локусами, а также 5) гидролиз DnaA-ATP до DnaA-ADP системой RIDA, которая формируется в результате связывания комплекса Hda-ADP с белком DnaN (*beta-clamp*) [30–32].

Предполагается, что для инициации репликации необходимо, чтобы все сайты прединициаторного OriC были связаны с активной формой DnaA. Т.е. принято, что гидролиз DnaA-ATP до DnaA-ADP на прединициаторном OriC блокирует инициацию репликации. Процесс инициации репликации описан как процесс заселения активной формой тетрамера DnaA-ATP определенного количества своих сайтов связывания, расположенных в OriC. В результате OriC из активной формы переходит в открытый комплекс. Открытый комплекс связывается с DnaN, что ведет к формированию прединициаторного комплекса, далее прединициаторный комплекс переходит в реплицирующее состояние. Данный процесс реализован в модели как случайный пуассоновский процесс. В момент формирования реплицирующего состояния в клетке исчезает сайт OriC, на котором произошла инициация репликации, появляется два новых сайта OriC в неактивном состоянии физического эклипса и появляются две



репликационные вилки, которые начинают движение в разные стороны от точки инициации репликации.

Схема основных регуляторных процессов, реализованных в модели «инициаторного» типа показана на рис. 2.



**Рис. 2.** Упрощенная схема модели «инициаторного» типа. Показаны: сайт инициации репликации OriC (—), на котором размещены сайты связывания белка DnaA (■); гены, кодирующие Hda, DnaA и DnaN белки (□, ■, □), соответственно; *dat*-локусы (◆); сайт терминации репликации (★); DnaA-ATP репрессируемый промотор оперона *DnaAN* (■); мРНК (⋈); мономеры белков Hda, DnaA и DnaN (●, ■, □); димер DnaN (□□); тетрамеры DnaA-ATP и DnaA-ADP (■, ■); синтез мРНК (⋈); синтез белка (⋈); обратимое формирование белковых комплексов (↔); гидролиз DnaA-ATP до DnaA-ADP системой RIDA (→); рециклизация DnaA-ADP до DnaA-ATP (→); формирование обратимых ДНК-белковых комплексов (↔); ингибирующее действие процесса на инициацию репликации (—); активирующее действие на инициацию репликации (+).

Таким образом, базовый вариант модели содержит дополнительно подмодели 2.3(2) или 2.3(3), 2.4.1, 2.4.2 и 2.5.9, описанные в разделе 2.

Второй вариант модели основан на базовом варианте, в котором клетки растут по экспоненциальному закону (подмодель 2.3(2)), однако в ней белок Hda дополнительно наделен гипотетической функцией репрессии (подмодель 2.4.3).

Третий вариант модели соответствует ситуации, когда из второго варианта модели удалены все компоненты, осуществляющие негативные механизмы регуляции инициации репликации характерные для *E. coli*, за исключением белка Hda, который наделен только гипотетической функцией репрессии, причем по самому простому бимолекулярному механизму (подмодель 2.5.7).

Четвертый вариант модели – удалены все негативные механизмы регуляции инициации репликации (подмодель 2.4.4) и экспоненциальный закон роста объема клеток заменен на линейный (подмодель 2.3(3)). Т.е. в этой модели исключено действие *dat* локусов, отсутствуют функции белков SeqA, DnaA, DnaN, Hda и репрессор инициации репликации. В модели после инициации репликации сразу возникает две активные формы OriC. На OriC репликация ДНК инициируется как случайный пуассоновский процесс с заданным средним временем  $1/k_{ini,DNA}$ . Параметры моделей приведены в таблице 3.

Таблица 3. Список параметров моделей клеточного цикла прокариот

Наименование параметра	Значение/ размерность	Комментарий
$DistL_{OriC,Term}$	$2 \cdot 10^6$ усл.нукл.	Расстояние от сайта OriC до сайта терминации репликации по левому (L) или правому (R) плечу
$DistR_{OriC,Term}$	$2 \cdot 10^6$ усл.нукл.	
$k_v$	$(\ln 2)/25 \text{ мин}^{-1}$ , $(\ln 2)/60 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости экспоненциального роста объема клетки.
$\mu$	5 усл.объем. ед/мин	Скорость линейного прироста объема клетки за одну минуту в модели (3).
$t_{eclips, OriC}$	12 мин	Длительность физического эклипса OriC
$s$	6	Количество сайтов (OriC:DnaA)
$k_{ini, DNA}$	$0.04 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости инициации репликации
$k_{O \rightarrow A}$	$25 \text{ су}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Константа связывания DnaA-ATP с сайтом (OriC:DnaA)
$k_{O \rightarrow D}$	$1 \text{ су}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Константа связывания DnaA-ADP с сайтом (OriC:DnaA)
$k_{A \rightarrow O}$	$3 \text{ мин}^{-1}$	Константа диссоциации DnaA-ATP с сайта (OriC:DnaA)
$k_{D \rightarrow O}$	4, 4.5 $\text{мин}^{-1}$	Константа диссоциации DnaA-ADP с сайта (OriC:DnaA)
$k_{O \rightarrow F}$	$1 \text{ су}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Константа связывания DnaN с открытым комплексом OriC
$k_{F \rightarrow O}$	$0 \text{ мин}^{-1}$	Константа диссоциации DnaN с открытого комплекса OriC
$k_{F \rightarrow H, bi}$	$50 \text{ су}^{-1} \text{ мин}^{-1}$	Константа связывания Hda с <i>beta-clamp</i> по бимолекулярному механизму
$k_{H \rightarrow F}$	$3 \text{ мин}^{-1}$	Константа диссоциации Hda
$k_{HA \rightarrow HD}$	$30 \text{ мин}^{-1}$	Константа гидролиза DnaA-ATP до DnaA-ADP на сайтах (OriC:DnaA) системой RIDA
$k_{pDNAA \rightarrow mDNAA}$	$5 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости инициации синтеза мРНК, кодирующей DnaA и DnaN.
$Km_{DNAA-ATP}$	10 су	Константа ингибирования DnaA-ATP инициации синтеза мРНК, кодирующей DnaA и DnaN.
$k_{pBETA \rightarrow mBETA}$	$1 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости синтеза mRNA DnaN с конститутивного промотора <i>pBETA</i>
$k_{mBETA \rightarrow}$	$0.2 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости деградации mRNA DnaN
$k_{mDNAA \rightarrow}$	$0.2 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости деградации mRNA DnaA-DnaN
$k_{mBETA \rightarrow protBETA}$	$5 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости синтеза белка DnaN с мРНК DnaN
$k_{mDNAA \rightarrow protBETA}$	$5 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости синтеза белка DnaN с мРНК DnaA-DnaN
$k_{mDNAA \rightarrow protDNAA-ATP}$	$5 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости синтеза белка DnaA с мРНК DnaA-DnaN
$k_{protBETA \rightarrow multBETA}$	$1 \text{ су}^{-1} / \text{мин}$	Константа скорости формирования димера DnaN
$k_{multBETA \rightarrow protBETA}$	$1 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости декомпозиции димера белка DnaN на мономеры
$d_{protBETA \rightarrow 0}$	$1 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости деградации свободного мономера белка DnaN
$d_{multBETA \rightarrow protBETA}$	$0.02 \text{ мин}^{-1}$	Константа скорости деградации мономера белка DnaN в составе димера

$k_{protDnaA-ATP \rightarrow multDnaA-ATP}$	0.1 $cu^{-3}/мин$	Константа скорости формирования тетрамера DnaA-ATP.
$k_{multDnaA-ADP \rightarrow multDnaA-ATP}$	0.025 $мин^{-1}$	Константа скорости восстановления DnaA-ATP из DnaA-ADP
$k_{multDnaA-ATP \rightarrow protDnaA-ATP}$	1 $мин^{-1}$	Константа скорости декомпозиции тетрамера DnaA-ATP на мономеры
$d_{protDnaA-ATP \rightarrow 0}$	0.025 $мин^{-1}$	Константа скорости деградации свободного мономера белка DnaA-ATP
$d_{multDnaA-ATP \rightarrow protDnaA-ATP}$	0.025 $мин^{-1}$	Константа скорости деградации мономера белка DnaA-ATP, входящего в состав тетрамера
$k_{pHDA \rightarrow mRNA}$	10 $мин^{-1}$	Константа скорости синтеза mRNA Hda
$k_{mHDA \rightarrow}$	0.5 $мин^{-1}$	Константа скорости деградации mRNA Hda
$k_{mHDA \rightarrow protHDA-ADP}$	5 $мин^{-1}$	Константа скорости синтеза белка Hda
$d_{protHDA \rightarrow}$	0.05 $мин^{-1}$	Константа скорости деградации белка Hda
$VL_{elong}, VR_{elong}$	$2 \cdot 10^6$ усл.нукл. за 46 мин	Скорость элонгации левого и правого плеча генома
$Dist_{inact\_func}(dnaA),$ $Dist_{inact\_func}(dnaN)$	15000 усл.нукл.	Условная точка на геноме, при достижении которой вилкой репликации происходит физическая инактивация гена <i>dnaA</i> , <i>dnaN</i> или <i>hda</i> и <i>dat</i> -локуса, соответственно.
$Dist_{inact\_func}(hda)$	$1.3 \cdot 10^6$ усл.нукл.	
$Dist_{inact\_func}(dat)$	$4 \cdot 10^5$ усл.нукл.	
$Dist_{vozvr\_func}(dnaA),$ $Dist_{vozvr\_func}(dnaN)$	$6 \cdot 10^5$ усл.нукл.	
$Dist_{vozvr\_func}(hda)$	$1.305 \cdot 10^6$ усл.нукл.	Условная точка на геноме, при достижении которой вилкой репликации происходит восстановление физической целостности гена <i>dnaA</i> , <i>dnaN</i> или <i>hda</i> , соответственно.
$Dist_{vozvr\_func}(dat)$	$4.05 \cdot 10^5$ усл.нукл.	
$N_{locus}$	90	Емкость <i>dat</i> -локуса (кол-во тетрамеров DnaA-ATP)
$k_{DnaA-ATP \rightarrow dat:DnaA-ATP}$	10 $cu^{-1}мин^{-1}$	Константа скорости формирования комплекса DnaA-ATP с <i>dat</i> -локусом
$k_{DATAA:DnaA-ATP \rightarrow DnaA-ATP}$	5 $мин^{-1}$	Константа скорости диссоциации DnaA-ATP с <i>dat</i> -локусом
$D$	26 мин	Время разделения материнской клетки на дочерние (от момента терминации репликации)

<sup>a</sup>cu – единица условной концентрации, равной одной молекуле на единицу условного объема клетки

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Анализ согласования темпов роста и репликации в экспоненциально растущих клетках

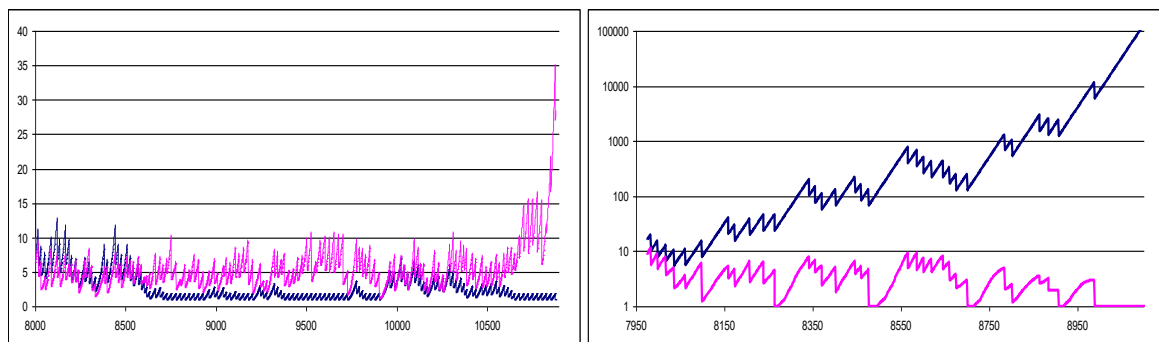
Учитывая точку зрения [18], что у прокариот существует универсальный закон роста объема клетки и им является экспоненциальный закон, мы начинаем анализ динамики клеточного цикла с моделей, в которых клетки растут именно по этому закону. Для клетки *E. coli* эта точка зрения сформировалась достаточно рано [16].

#### 4.1.1. Модель «инициаторного» типа

Как указывалось выше, практически все разработанные к настоящему времени модели клеточного цикла прокариот [8–14] используют «инициаторный» принцип

регуляции инициации репликации, что не удивительно в свете существующих данных [3]. Согласование роста объема клетки и репликации генома в этих моделях достигается введением в модель феноменологического закона в виде одного из дополнительных параметров, например «инициаторная масса» или «инициаторный объем». Поэтому способность инициаторного механизма обеспечивать в отсутствие какого-либо феноменологического закона согласование процессов роста и репликации на параметрическом уровне требует самостоятельного изучения. Исключить такую возможность заранее нельзя, так как данный механизм представляет сложную совокупность молекулярных процессов, осуществляющих позитивные и негативные функции.

На рис. 3 приведены численные расчеты базовой модели, в которой, как указывалось выше (см. раздел 3), реализованы все позитивные и негативные механизмы регуляции инициации репликации, описанные для клетки *E. coli*.



**Рис. 3.** Динамика роста объема клетки (синие кривые) и накопления массы генома (малиновые кривые), рассчитанные в ряду поколений по модели «инициаторного типа» для клеток, объем которых растет по экспоненциальному закону (каждый ниспадающий излом соответствует отдельному акту деления клетки) и удваивается каждые 25 мин ( $k_v = 1/25 \text{ мин}^{-1}$ ). Для левого графика параметр  $k_{D \rightarrow O} = 4.5 \text{ мин}^{-1}$ , для правого –  $k_{D \rightarrow O} = 4.0 \text{ мин}^{-1}$ . Значения остальных параметров клеточного цикла приведены в табл. 3. По оси абсцисс отложено время в минутах, по оси ординат в логарифмической шкале отложены объем (усл. ед. объема) и масса генома (в геномных эквивалентах).

Для базовой модели, реализующей клеточный цикл без феноменологического закона, нам не удалось подобрать набора значений параметров, при котором наблюдалась устойчивая динамика роста и деления, сменяющих друг друга в ряду поколений клеток. Закономерно воспроизводились два сценария развития. На рис. 3 приведены два расчета, которые отличаются друг от друга значением только по одному параметру – константе скорости диссоциации DnaA-ADP с сайта на *oriC* ( $k_{D \rightarrow O}$ ), который находится в прединициаторном состоянии. Для левого графика  $k_{D \rightarrow O} = 4.5$ , для правого –  $k_{D \rightarrow O} = 4.0$ . В первом случае (график слева) происходит неконтролируемое накопление геномной массы, а во втором (справа) наблюдается прекращение репликации и неограниченный рост объема клетки.

На основании полученных результатов мы делаем вывод, что «инициаторный» механизм регуляции инициации репликации самостоятельно не способен обеспечить устойчивое решение проблемы согласования темпов репликации с темпами экспоненциального роста объема клетки. Если и есть область параметров, в которой проблема устойчиво решается, то нам не удалось ее обнаружить.

#### 4.1.2. Модель «репрессорного» типа

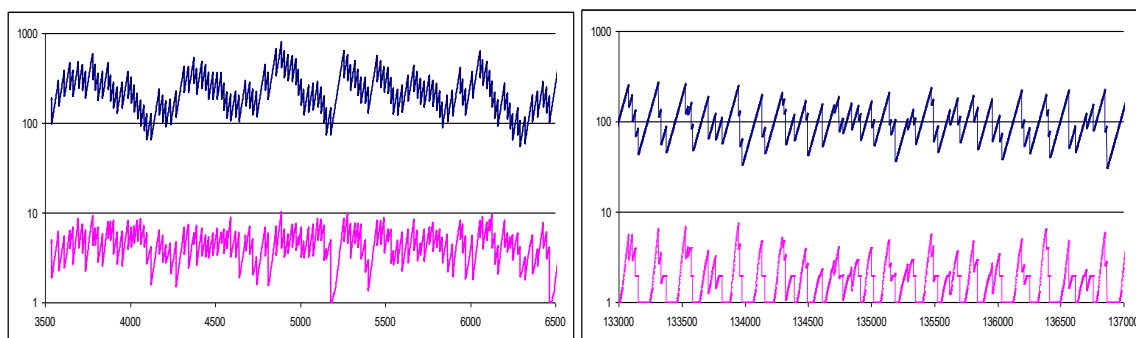
Выше отмечалось, что еще в 1969 году [1] была предложена модель, автоматически решающая проблему согласования темпов репликации с темпами роста объема клетки.

В ее основе лежал молекулярный механизм регуляции инициации репликации ДНК репрессором. Однако модель не получила дальнейшего развития по ряду причин. В том числе и потому, что у прокариот не было обнаружено репрессора инициации репликации ДНК, который бы полностью удовлетворял критериям модели.

Мы вернулись к этой идее, учитывая тот факт, что жесткие ограничения, которые были наложены на функционирование репрессора в модели [1], могли быть связаны не только с решением проблемы согласования роста и репликации, но также с реализацией высокого уровня синхронности инициации репликации, которую экспериментально наблюдали в те годы в быстро растущих клетках *E. coli* [5,33].

Исходя из этого, в реализованную выше базисную модель мы дополнительно ввели «репрессорный» механизм, гипотетически наделив данной функцией белок Hda (вариант модели 2). Расчеты показали (рис. 4, слева) согласованную динамику роста объема клетки и накопления ДНК в ряду растущих и длительно делящихся клеток, независимо от скорости роста клеток.

Более того, оказалось, что если из этой модели удалить все негативные механизмы регуляции инициации репликации, кроме «репрессорного», причем функционирующего по самому простому бимолекулярному механизму (вариант модели 3), то, как следует из рис. 4 (справа), этого вполне достаточно для согласованного развития процессов роста клетки и репликации генома.



**Рис. 4.** Динамика роста объема клетки (синие кривые) и накопления массы генома (малиновые кривые), рассчитанные в ряду поколений по варианту модели 2 (слева) и варианту модели 3 (справа). Объем клеток растет по экспоненциальному закону (каждый ниспадающий излом соответствует отдельному акту деления клетки). Параметры клеточного цикла приведены в табл. 3. Левый график: время удвоения объема клетки,  $V = 25$  мин; правый график:  $V = 60$  мин. Обозначения осей - как на рис. 2.

Таким образом, вышеизложенные результаты численных экспериментов позволяют предположить, что для клеток, объем которых изменяется в процессе роста по экспоненциальному закону, согласование роста и репликации возможно только при наличии в клетке негативного механизма регуляции инициации репликации «репрессорного» типа.

#### 4.2. Анализ согласования темпов роста и репликации в клетках, растущих по линейному закону

Выше отмечалось, что существует целый ряд данных, в которых рост индивидуальной клетки *E. coli* описан различными вариантами линейных моделей роста [19–22].

Учитывая это, и тот факт, что в базисной модели, реализующей молекулярные механизмы регуляции репликации, описанные для *E. coli*, нам не удалось найти параметрическую область, в которой согласовываются экспоненциальный рост объема клетки и репликация геномной ДНК, мы исследовали поведение моделей

«инициаторного» типа для клеток, рост объема которых подчиняется линейному закону.

На рис. 5 (слева) приведены расчеты для базового варианта модели клеточного цикла, в которой рост объема клетки подчинен линейному закону. Видно согласованное изменение массы генома и объема клетки в ряду растущих и делящихся клеток.

Более того, если из этой модели убрать все негативные механизмы регуляции репликации (вариант модели 4), то, как видно из рис. 5 (справа), согласованная динамика роста массы генома и объема клетки не нарушается. Расчеты модели при разных значениях интенсивности инициации репликации (данные не представлены) существенно не различаются, и свидетельствуют об устойчивом росте/делении клеток в ряду поколений.

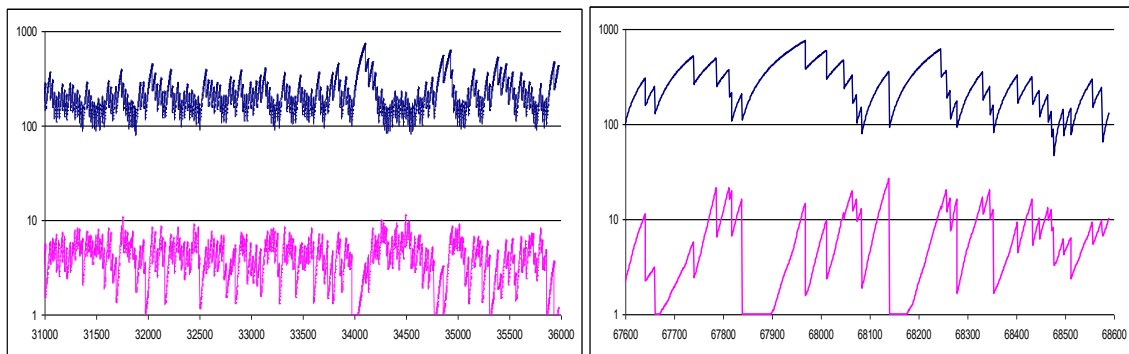


Рис. 5. Динамика роста объема клетки (синие кривые) и накопления массы генома (малиновые кривые), рассчитанная в ряду поколений по варианту модели 1 (слева) и 4 (справа). Для графика справа –  $k_{ini,DNA} = 0.04 \text{ мин}^{-1}$ , т. е. среднее время пуассоновского процесса инициации репликации равно 25 мин. Параметры клеточного цикла и обозначения осей как на рис. 2.

Таким образом, численные эксперименты показывают, что при линейном законе роста клеток происходит автоматическое подстраивание темпов репликации генома и роста объема клетки друг к другу независимо от механизмов регуляции репликации.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ

Выше представленные результаты численного моделирования показывают, что если объем клеток увеличивается по экспоненциальному закону и согласование его темпа роста с темпами репликации не обеспечивается феноменологическим законом типа «инициаторная масса», то эту роль успешно решает механизм негативной регуляции инициации репликации по «репрессорному» типу. В моделях, реализующих линейный закон роста клетки, проблемы согласования процессов роста и репликации не существует: наблюдается автоматическое подстраивание объема клетки под заданный темп репликации.

Чем можно объяснить «лояльность» линейного закона роста и «требовательность» экспоненциального? Приведем простые рассуждения, которые позволяют ответить на этот вопрос.

Пусть объем клетки растет по линейному закону. Тогда объем клетки растет в соответствии с формулой  $V(t_0 + t_1) = V(t_0) + \mu t_1$ . Предположим, что клетка в среднем удваивает геном за время  $T$ . Тогда для стабильного существования клетки в ряду поколений необходимо, чтобы длительность клеточного цикла также в среднем равнялась  $T$ , и за это время объем клетки также должен в среднем удваиваться. Получаем уравнение  $V(t_0 + T) = V(t_0) + \mu T = 2V(t_0)$ , из которого следует, что начальный

объем, при котором клетка будет стабильно воспроизводиться с заданным темпом удвоения генома, равняется  $V(t_0) = \mu T$ . Нетрудно увидеть, что если в начальный момент объем клетки равнялся  $V_0$ , то после  $n$ -го деления средний объем клетки равняется

$$V_n = V_0 \frac{1}{2^n} + \mu T \sum_{i=1}^n \frac{1}{2^i}.$$

Т. е. при неограниченном росте  $n$  имеем  $V_n \xrightarrow{n \rightarrow \infty} \mu T$ , откуда видим, что линейный закон роста объема клетки автоматически подгоняет объем клетки под заданный темп репликации, таким образом, что за время  $T$  происходит его удвоение в среднем. Иными словами, линейный закон роста объема клетки не накладывает каких либо ограничений на механизмы регуляции репликации в жизненном цикле клетки в связи с необходимостью решать проблему согласования, так как полностью решает ее «собственными силами».

Для клеток, рост которых подчинен экспоненциальному закону все выглядит прямо противоположным образом. Действительно, экспоненциальный закон роста описывается формулой  $V(t_0 + t_1) = V(t_0)\exp(k_v t_1)$ . Время удвоения объема равно  $T_{2V} = \ln 2/k_v$  и зависит только от значения параметра  $k_v$ . Следовательно, чтобы клетка могла устойчиво воспроизводиться в ряду поколений, необходимо, чтобы в ней существовал механизм автоматического подстраивания темпов репликации геномной ДНК под заданный экспоненциальным законом темп роста объема клетки. Это означает, что если темп репликации оказывается выше скорости роста объема, то должен существовать механизм, который будет снижать его и наоборот. А это качество как раз и является признаком того, что механизм является негативным. Но этого может оказаться недостаточно, так как живые системы являются стохастическими. Поэтому негативный механизм должен быть еще и устойчивым к стохастическим флуктуациям. По нашим расчетам, такими являются негативные механизмы регуляции инициации репликации репрессорного типа.

Из проведенных рассуждений видно, что экспоненциальный и линейный законы задают противоположные стратегии коэволюции процессов репликации и роста объема клетки. Нам представляется, что в случае «экспоненциального» закона единственной успешной стратегией выживания клетки является приобретение механизма автосогласования темпов репликации геномной ДНК с темпами роста объема клетки. Этой стратегии вполне отвечают «репрессорные» механизмы. Если же клетка растет по «линейному» закону, то объем клетки обладает внутренне присущей способностью автоматически подстраиваться под заданные темпы репликации. В этом случае разнообразие механизмов контроля репликации, которые могут использоваться клеткой в жизненном цикле, не ограничено проблемой согласования, что дает клетке дополнительные степени свободы при эволюционном отборе механизмов репликации, обеспечивающих ей наиболее эффективную стратегию выживания.

Приведенные рассуждения показывают, что среди возможных законов роста объема (массы, площади, линейных размеров) клетки можно выделить две условные группы. Первую группу составляют законы «экспоненциального» типа. Их характерной чертой является неспособность (или слабая способность) подстраиваться под темпы репликации геномной ДНК. Рассмотренный в работе экспоненциальный закон является крайним представителем данной группы, так как обладает нулевой способностью подстраиваться под темпы репликации.

Вторую группу представляют законы роста, обладающие полной или высокой способностью подстраиваться под темпы репликации геномной ДНК. Их назовем «линейными». Крайним представителем данной группы является линейный закон роста объема клетки, рассмотренный в работе, который обладает стопроцентной способностью подстраиваться под темпы репликации. Мы не исключаем возможности

существования законов промежуточного типа, которые в одних условиях будут проявлять экспоненциальные свойства, а в других – линейные.

Рассмотрим, в свете этих представлений, известные к настоящему времени механизмы регуляции инициации репликации у прокариот. Наиболее изученными в этом плане являются два вида – *E. coli* и *B. subtilis*, которые эволюционно достаточно далеки друг от друга и относятся к разным группам [34]. *E. coli* принадлежит к небольшой ветви  $\gamma$ -Proteobacteria, а *B. subtilis* – к обширной группе бактерий с низким содержанием GC пар. Для обоих видов описан целый ряд механизмов, контролирующих инициацию репликации, которые, однако, у этих видов совершенно различны [25].

Как показано нами выше, механизмы регуляции инициации репликации, описанные у *E. coli* и реализованные нами в базовой модели, не способны согласовать процессы роста и репликации в клетках, рост которых подчинен экспоненциальному закону. Все известные механизмы, за исключением функции белка SeqA, связаны с регуляцией концентрации активной формы белка – инициатора репликации [3,25,28–32], и не обладают функциональной активностью, необходимой для согласования процессов роста и репликации в экспоненциально растущих клетках. Это касается и функции белка SeqA, который, связываясь с вновь синтезированным OriC, физически не позволяет DnaA белку осуществить свою функцию в течение короткого периода (10–12 минут), называемого эклипсом.

С этой точки зрения ясно, что, если у *E. coli* со временем не будет найдено регулятора репликации, обладающего необходимой «репрессорной» функцией, то доминирующим законом роста объема ее клеток необходимо признать закон роста неэкспоненциального типа. Подтверждением этому могут быть данные [19–22], которые свидетельствуют в пользу модели линейного роста клеток *E. coli*. Однако, учитывая наличие противоположных данных [16] и точки зрения, что у прокариот экспоненциальный закон роста является универсальной моделью [18], мы не исключаем возможности наличия у *E. coli* «репрессорного» механизма, который пока не открыт.

Также возможно, что клетка *E. coli* в различные периоды своего жизненного цикла использует разные стратегии роста, что не позволяет выбрать для неё оптимальной модели [23].

Что касается *B. subtilis*, то рост ее клеток, как показано [23], хорошо описывается законом экспоненциального типа. Если это так, то, согласно результатам моделирования, для устойчивого воспроизведения клеток *B. subtilis* необходимо наличие у них механизмов регуляции инициации репликации «репрессорного» типа.

В этой связи интересно отметить описанный для этого вида механизм контроля инициации репликации белком YabA через взаимодействие с  $\beta$ -clamp, который позиционируется как аналогичный Hda *E. coli* [35,36]. Однако, в отличие от *E. coli*, у которой через взаимодействие с  $\beta$ -clamp формируется механизм RIDA, контролирующей концентрацию активных форм DnaA, у *B. subtilis* нарушается взаимодействие DnaA с белком DnaD примасомы, что ведет к блокированию инициации репликации [37]. Т.е. механизм действия белка YabA *B. subtilis* является репрессорным. Более того, у *B. subtilis* обнаружен еще один регулятор репликации – белок Soj, который в мономерной форме репрессирует инициацию репликации [38].

Таким образом, у *B. subtilis* обнаружено как минимум два механизма регуляции инициации репликации, белками YabA и Soj, которые являются механизмами «репрессорного» типа и способны обеспечить, согласно результатам моделирования, согласование процессов роста и репликации генома в клетках, объем которых растет по экспоненциальному закону.



К сожалению, отсутствие данных о стратегии роста клеток у других видов прокариот не позволяет провести аналогичное сопоставление механизмов регуляции инициации репликации с законами их роста.

В заключение хотелось бы еще раз подчеркнуть, что наши результаты свидетельствуют о наличии двух универсальных механизмов, которые позволяют различным видам бактерий в ходе эволюции реализовать самые разные стратегии согласования темпов роста и репликации. Это «репрессорный» механизм регуляции инициации ДНК и линейный закон роста объема клеток. Первый универсален тем, что позволяет клетке использовать любые законы роста, а универсальность второго проявляется в том, что клетка может использовать любые механизмы регуляции инициации ДНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программ Президиума СО РАН (интеграционный проект №80) и РАН «Молекулярная и клеточная биология», и гранта НШ-5278.2012.4.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pritchard R.H., Barth P.T., Collins J. Control of DNA synthesis in bacteria. In: *Microbial Growth, Symposium of Society of General Microbiology*. 1969. V. 19. P. 263–297.
2. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwinska J., Zawilak A., Dudek M.R., Cebrat S. Where does bacterial replication start? Rules for predicting the oriC region. *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. 3781–3791.
3. Kaguni J.M. DnaA: controlling the initiation of bacterial DNA replication and more. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006. V. 60. P. 351–375.
4. Cooper S., Helmstetter C.E. Chromosome Replication and the Division Cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 1968. V. 31. P. 619–644.
5. Donachie W.D. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature*. 1968. V. 219. P. 1077–1079.
6. Zaritsky A., Vischer N., Rabinovitch A. Changes of initiation mass and cell dimensions by the 'eclipse'. *Mol Microbiol.* 2007. V. 63. P. 15–21
7. Zaritsky A., Wang P., Vischer N.O. Instructive simulation of the bacterial cell division cycle. *Microbiology*. 2011. V. 157. P. 1876–1885.
8. Sompayrac L., Maaloe O. Autorepressor model for control of DNA replication. *Nat. New Biol.* 1973. V. 241. № 109. P. 133–135.
9. Margalit H., Grover N.B. Initiation of chromosome replication in bacteria: analysis of an inhibitor control model. *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 5231–5240.
10. Mahaffy J.M., Zyskind J.W. A model for the initiation of replication in *Escherichia coli*. *J. Theor. Biol.* 1989. V. 140. № 4. P. 453–477.
11. Hansen F.G., Christensen B.B., Atlung T. The initiator titration model: computer simulation of chromosome and minichromosome control. *Res. Microbiol.* 1991. V. 142. P. 161–677.
12. Donachie W.D., Blakely G.W. Coupling the initiation of chromosome replication to cell size in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. V. 6. № 2. P. 146–150.
13. Grant M.A., Saggiaro C., Ferrari U., Bassetti B., Sclavi B., Cosentino Lagomarsino M. DnaA and the timing of chromosome replication in *Escherichia coli* as a function of growth rate. *BMC Syst. Biol.* 2011. V. 5. P. 201.
14. Zhang Q., Shi H. Coupling chromosomal replication to cell growth by the initiator protein DnaA in *Escherichia coli*. *J. Theor. Biol.* 2012. V. 314. P. 164–172.
15. Schaechter M., Maaloe O., Kjeldgaard N.O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced grown of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 1958. V. 19. P. 592–606.

16. Schaechter M., Williamson J.P., Hood J.R. Jr., Koch A.L. Growth, cell and nuclear divisions in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1962. V. 29. P. 421–434.
17. Mitchison J.M. Single cell studies of the cell cycle and some models. *Theor. Biol. Med. Model.* 2005. V. 2. P. 4.
18. Cooper S. Distinguishing between linear and exponential cell growth during the division cycle: Single-cell studies, cell-culture studies, and the object of cell-cycle research. *Theor. Biol. Med. Model.* 2006. V. 3. P. 10
19. Cullum J., Vicente M. Cell growth and length distribution in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1978. V. 134. P. 330–337.
20. Kubitschek H.E. Increase in cell mass during the division cycle of *Escherichia coli* B/rA. *J. Bacteriol.* 1986. V. 168. № 2. P. 613–618.
21. Grover N.B., Woldringh C.L. Dimensional regulation of cell-cycle events in *Escherichia coli* during steady-state growth. *Microbiology.* 2001. V. 147. P. 171–181.
22. Reshes G., Vanounou S., Fishov I., Feingold M. Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* 2008. V. 94. P. 251–264.
23. Godin M., Delgado F.F., Son S., Grover W.H., Bryan A.K., Tzur A., Jorgensen P., Payer K., Grossman A.D., Kirschner M.W., Manalis S.R. Using buoyant mass to measure the growth of single cells. *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 5. P. 387–390.
24. Hill N.S., Kadoya R., Chatteraj D.K., Levin P.A. Cell size and the initiation of DNA replication in bacteria. *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 3. P. e1002549.
25. Katayama T., Ozaki S., Keyamura K., Fujimitsu K. Regulation of the replication cycle: conserved and diverse regulatory systems for DnaA and ORI. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. V. 8. № 3. P. 163–170.
26. Yanenko N.N. *The method of fractional steps. The solution of problems of mathematical physics in several variables.* Ed. by M.Holt. New York: Springer-Verlag, 1971. 156 p.
27. Kang S., Lee H., Han J.S., Hwang D.S. Interaction of SeqA and Dam methylase on the hemimethylated origin of *Escherichia coli* chromosomal DNA replication. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 11463–11458.
28. Campbell J.L., Kleckner N. *E. coli* oriC and the *dnaA* gene promoter are sequestered from dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell.* 1990. V. 62. № 5. P. 967–979.
29. Bogan J.A., Helmstetter C.E. DNA sequestration and transcription in the OriC region of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 1997. V. 26. № 5. P. 889–896.
30. Katayama T., Kubota T., Kurokawa K., Croke E., Sekimizu K. The initiator function of DnaA protein is negatively regulated by the sliding clamp of the *E. coli* chromosomal replicase. *Cell.* 1998. V. 94. P. 61–71.
31. Kawakami H., Su'etsugu M., Katayama T. An isolated Hda-clamp complex is functional in the regulatory inactivation of DnaA and DNA replication. *J. Struct. Biol.* 2006. V. 156. P. 220–229.
32. Su'etsugu M., Nakamura K., Keyamura K., Kudo Y., Katayama T. Hda monomerization by ADP binding promotes replicase clamp-mediated DnaA-ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 52. P. 36118–36131.
33. Helmstetter C.E. Cooper S. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 1968. V. 31. № 3. P. 507–518.
34. Olsen G.J., Woese C.R., Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 1994. V. 176. P. 1–6.
35. Hayashi M., Ogura Y., Harry E.J., Ogasawara N., Moriya S. *Bacillus subtilis* YabA is involved in determining the timing and synchrony of replication initiation. *FEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 247. № 1. P. 73–79.
36. Noirot-Gros M.F., Velten M., Yoshimura M., McGovern S., Morimoto T., Ehrlich S.D., Ogasawara N., Polard P., Noirot P. Functional dissection of YabA, a negative regulator

- of DNA replication initiation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 2368–2373.
37. Cho E., Ogasawara N., Ishikawa S. The functional analysis of YabA, which interacts with DnaA and regulates initiation of chromosome replication in *Bacillus subtilis*. *Genes Genet. Syst.* 2008. V. 83. P. 111–125.
  38. Scholefield G., Whiting R., Errington J., Murray H. Spo0J regulates the oligomeric state of Soj to trigger its switch from an activator to an inhibitor of DNA replication initiation. *Mol Microbiol.* 2011. V. 79. P. 1089–1100.

Материал поступил в редакцию 14.12.2012, опубликован 12.03.2013.