

УДК: 517.958:57; MSC 2010: 92D20

Моделирование пространственно-временной динамики циркадианных ритмов *Neurospora crassa*

Д. А. Брацун^а, А. П. Захаров

Пермский государственный педагогический университет,
Россия, 614600, г. Пермь, ул. Сибирская, д. 24

E-mail: ^а dmitribratsun@rambler.ru

Получено 25 мая 2011 г.,
после доработки 11 июня 2011 г.

В работе предложена новая модель циркадианных колебаний нейроспоры, которая описывает пространственно-временную динамику белков, ответственных за механизм биоритмов. Модель основывается на нелинейном взаимодействии белков *FRQ* и *WCC*, кодируемых генами *frequency* и *white collar*, и включает в себя как положительную, так и отрицательную петлю обратной связи. Главным элементом механизма колебаний является эффект запаздывания в биохимических реакциях транскрипции генов. Показано, что модель воспроизводит такие свойства циркадианных колебаний нейроспоры как захват частоты под действием внешнего периодического освещения, сброс фазы биоритмов при воздействии импульса света, устойчивость механизма колебаний по отношению к случайным флуктуациям и т. д. Исследованы волновые структуры, возникающие в ходе пространственной эволюции системы. Показано, что волны синхронизации биоритмов среды возникают под воздействием базального транскрипционного фактора.

Ключевые слова: запаздывание, стохастические системы, циркадианные ритмы, генная регуляция

Modelling spatio-temporal dynamics of circadian rythms in *Neurospora crassa*

D. A. Bratsin, A. P. Zakharov

Perm State Pedagogical University, Sibirskaya av. 24, Perm, Russia, 614600

Abstract. – We derive a new model of circadian oscillations in *Neurospora crassa*, which is suitable to analyze both temporal and spatial dynamics of proteins responsible for mechanism of rythms. The model is based on the non-linear interplay between proteins *FRQ* and *WCC* which are products of transcription of *frequency* and *white collar* genes forming a feedback loop comprised both positive and negative elements. The main component of oscillations mechanism is supposed to be time-delay in biochemical reactions of transcription. We show that the model accounts for various features observed in *Neurospora*'s experiments such as entrainment by light cycles, phase shift under light pulse, robustness to action of fluctuations and so on. Wave patterns excited during spatial development of the system are studied. It is shown that the wave of synchronization of biorythms arises under basal transcription factors.

Keywords: time-delay, stochastic systems, circadian rythms, gene regulation

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 191–213 (Russian).

Введение

Циркадианные ритмы – это колебания активности биологических систем, повторяющиеся с периодом, примерно равным продолжительности суток [Sweeney, 1976]. Их отличительная особенность заключается в том, что они имеют эндогенное происхождение: ход колебаний не определяется каким-то внешним периодическим процессом, а генерируется внутренними автономными биологическими часами, находящимися в самом организме. Циркадианные биоритмы управляют большим разнообразием молекулярных, физиологических и поведенческих процессов, позволяющих организму адаптироваться к суточным колебаниям таких параметров как температура, освещение, влажность. В более широком плане внутренние часы помогают организму предвидеть изменения условий окружающей среды и наилучшим образом подготовиться к ним. К существенным чертам циркадианных ритмов нужно отнести их автономность, способность компенсировать температурные изменения среды, возможность изменять фазу колебаний под действием внешнего освещения или температуры [Pittendrigh, 1993].

Циркадианные колебания нейроспоры имеют важную особенность: ее ритмы бесполого спорообразования (конидиирования) производят легко визуально анализируемые полосы в культуре, растущей в твердой агаровой среде. Дело в том, что во время этого процесса на гифках развиваются микроконидии и артроконидии – скопления ярко окрашенных (розовых или оранжевых) конидий. Само название *Neurospora* род получил из-за бросающейся в глаза исчерченности на спорах, напоминающей нервные волокна (рис. 1). У нейроспоры были обнаружены характерные мутации (в коллекции гриба более 3000 мутантов [Galagan et al, 2003]), которые существенно влияют на циркадианные ритмы организма и явным образом проявляют себя во внешнем виде мицелия. Молекулярный анализ, выполненный для этих мутаций, позволил построить ряд моделей циркадных колебаний, которые, вероятно, могут быть использованы при описании биоритмов многих других организмов [Pittendrigh et al, 1959; Lakin-Thomas et al, 1990; Dunlap, 1996; Dunlap, 1999; Loros, Dunlap, 2001; Lakin-Thomas, Brody, 2004].



Рис. 1. Внешний вид *Neurospora crassa* после нескольких дней роста в полной темноте. Эволюция культуры началась в нижней части чашки Петри. Густой ярко-оранжевый мицелий представляет собой конидии. Фотография выполнена одним из авторов в лаборатории проф. С. Броди

Необходимо заметить, что при изучении циркадианных ритмов нейроспоры существует два основных подхода, которые дополняют друг друга. С одной стороны, для понимания происходящих процессов необходимо выяснить молекулярные основы биоритмов, которые включают в себя выявление всех генов и белков, которые участвуют в регуляции. С другой стороны, нейроспора предоставляет исследователям редкую возможность макроскопического изучения биоритмов путем визуального обследования структур конидиирования, возникающих в чашке Петри (эволюция организма протекает в двух измерениях (см. рис. 1)) или в трубке (одномерный рост) [Lakin-Thomas, Brody, 2004].

Молекулярные основы циркадианных ритмов у нейроспоры

С развитием молекулярной биологии понимание того, как функционирует механизм биологических часов у нейроспоры, существенно улучшилось. Экспериментально были определе-

ны основные компоненты часов. Выяснено, что принципиальными элементами в механизме циркадианного осциллятора являются три следующих гена: *frequency (frq)* и *white collar (wc-1* и *wc-2)*. Взаимодействие этих генов включает петли положительной и отрицательной обратной связи [Dunlap, 1999; Loros, Dunlap, 2001; Lakin-Thomas, Brody, 2004; *Neurospora crassa* genome]. Ген *frq* кодирует одноименный белок *FRQ*. Оказалось, что в середине темного времени суток уровень белка *FRQ* низок, но к середине светлого времени суток его уровень достигает максимума [Dunlap, 1999]. Два других гена, *wc-1* и *wc-2*, кодируют белки *WC-1* и *WC-2*, которые найдены в ядре и являются транскрипционными факторами [Loros, Dunlap, 2001; *Neurospora crassa* genome]. Они имеют набор регуляторных доменов, среди которых стоит отметить домен активации транскрипции, и формируют гетеродимер *WCC* [Loros, Dunlap, 2001]. Комплекс *WCC* действует как положительный регулятор для белка *FRQ*: как оказалось, он активирует транскрипцию последнего в темноте или под воздействием голубого света (белок *WC-1* является фоторецептором). В свою очередь протеин *FRQ*, проходя через процесс димеризации (образование молекул, состоящих из двух мономеров), выступает как отрицательный регулятор по отношению к *WCC* [Froehlich et al, 2002; Froehlich et al, 2003]. В ходе суточной эволюции белок *FRQ* деградирует, позволяя процессу возобновиться снова [He et al, 2003]. Регуляция всех этих процессов является достаточно сложной, и полного понимания всех ее элементов у исследователей еще нет. Более полную информацию о функционировании различных механизмов регуляции у нейроспоры можно получить в обзорной статье [Соколовский, Белозерская, 2000]. Упомянем еще один эффект, важный для построения нашей модели. Оказалось, что белок *FRQ* выступает не только как репрессор своей собственной транскрипции, но также активирует *WC-1* и регулирует его уровень посредством неизвестного пока пост-транскрипционного механизма [Lee et al, 2000]. Более того, экспериментально было показано, что производство белков *WC-1* и *FRQ* происходит с задержкой по времени порядка нескольких часов [Lee et al, 2000]. С учетом того, что регуляция любой генной системы осуществляется посредством обратной связи, сам факт такой значительной задержки, возникающей в петле связи, по-видимому, указывает на важную роль запаздывания в процессах транскрипции/трансляции.

Как известно, характерные масштабы времени отдельных компонент при геномном регулировании обычно несопоставимы. Существуют быстрые реакции с характерным временем порядка нескольких секунд или минут (например, димеризация белка) и медленные реакции с характерным временем часы и даже сутки (транскрипция, трансляция, деградация белка и др.). В связи с этим появились работы (например, [Rao, Arkin, 2003]), в которых развивается идея рассматривать динамику только на медленном многообразии. При этом считается, что быстрые процессы переводят систему в квазиравновесие, на фоне которого разворачивается медленная динамика. При этом подходе, как правило, неявно предполагается, что все реакции являются марковскими и подчиняются статистике Пуассона. На наш взгляд, это является неоправданным упрощением свойств системы. В этой связи важно отметить, что процессы транскрипции и трансляции не просто медленные, но еще и состоят из многоэтапных реакций, в ходе которых последовательно образуются ансамбли сложных органических соединений. Таким образом, эти процессы распределены по пространству и растянуты по времени и, строго говоря, уже не могут считаться марковскими. Все это приводит к тому, что процессы идут с некоторым характерным временем запаздывания. Если это время запаздывания мало по сравнению со всеми остальными характерными временами в системе (как быстрыми, так и медленными), этими эффектами можно пренебречь. Однако если времена запаздывания одного порядка величины с другими процессами или обратная связь сильная, то эффекты запаздывания не могут больше игнорироваться. Необходимо отметить, что принципиальную роль в процессах генной регуляции играют флуктуации. Дело в том, что количество молекул, вступающих в реакции во время генных процессов транскрипции/трансляции, весьма невелико – скорость работы РНК-полимеразы, например, всего около 50 нуклеотидов в секунду. Таким образом, даже небольшие флуктуации концентраций рибонуклеиновой кислоты (РНК) и белка могут иметь значительное влияние на общую динамику системы [Nasty, Collins, 2002]. В работах авторов [Bratsun et al, 2005a; Bratsun et al, 2005b] вопросы взаимодействия запаздывания и стохастических флуктуа-

ций впервые были рассмотрены для процессов транскрипции/трансляции генов. Обнаружен эффект возбуждения в подкритической области колебаний за счет взаимодействия шума и запаздывания обратной связи [Bratsun et al, 2005a]. Кроме того, в работе [Bratsun et al, 2005b] впервые была предложена модификация алгоритма Гиллеспи, используемого для прямого численного моделирования стохастических дискретных процессов, на случай систем с запаздыванием.

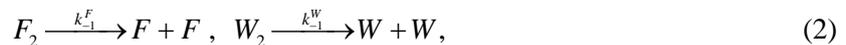
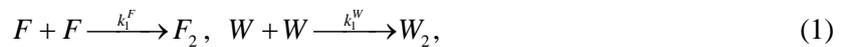
Таким образом, с начала 2000-х все яснее становится то место, которое запаздывание занимает в механизме функционирования биологических часов нейроспоры. Модели циркадианных колебаний, в рамках которых эффект запаздывания во время процессов транскрипции/трансляции считается принципиальным фактором поддержания биоритмов, появились сразу после появления экспериментальной работы [Lee et al, 2000]. Первая генетическая модель с запаздыванием, скорее всего, была предложена в работе Смолена с коллегами [Smolen et al, 2001], в которой была предпринята попытка вывести уравнения сразу для двух биологических систем – нейроспоры и дрозофилы. В части моделирования процессов в нейроспоре их модель учитывала как положительную, так и отрицательную обратную связь, содержала два времени запаздывания, а также описывала эффект нелинейной деградации протеина через образование комплекса *FRQ/WCC*. Авторы попытались учесть все экспериментальные факты, которые были известны на тот момент, однако их математическая модель в целом получилась перегруженной: она включала 23 переменные и 19 параметров. Очевидно, что такая обширная система из-за неопределенности ряда параметров, значения которых сложно установить экспериментально, может описывать слишком много возможных динамических режимов. Сильной стороной работы была попытка проведения стохастического анализа, однако сам метод расчета вызывает вопросы о своей корректности [Bratsun et al, 2005a]. В следующей своей работе [Smolen et al, 2003] те же авторы попытались упростить модель, но уравнения были выведены в полуфеноменологической манере. Как мы покажем ниже, если модельные уравнения выводятся из исходных уравнений биохимической кинетики, их тип нелинейности существенно меняется. Срирам и Гопинатан предложили дальнейшее упрощение модели Смолена, сведя ее к двум переменным для концентраций белков *FRQ* и *WC-1* [Sriram, Gopinathan, 2004]. Однако полученная модель оказалась слишком упрощенной, так как в ней не учитывался процесс возникновения гетеродимерного комплекса *FRQ/WCC*. Кроме того, авторы некорректно использовали метод Гиллеспи, который исторически был сформулирован исключительно для марковских систем [Gillespie, 1977]. Стоит упомянуть еще одну работу, которая учитывает запаздывание [François, 2005]. Так как автор попытался учесть динамику не только белков, но и соответствующих им мРНК, модель также получилась большой – она включает 7 переменных. В работе рассмотрены свойства модели только в рамках детерминистского описания.

Существует еще две работы, посвященные эффектам запаздывания в циркадианных колебаниях [Scherper et al, 1999; Lema, 2000]. Модели, предложенные в них, носят ярко выраженный феноменологический характер, не привязаны к конкретному молекулярному механизму биоритмов и, скорее всего, были призваны продемонстрировать возможность возбуждения колебаний в системе посредством запаздывания.

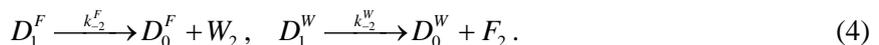
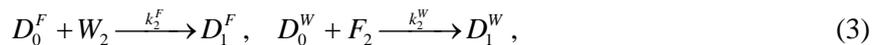
Наша работа является продолжением работ [Smolen et al, 2001; Smolen et al, 2003; Sriram, Gopinathan, 2004]. Математическая модель, которую мы предлагаем, является дальнейшим упрощением рассмотренных в них моделей. Важным отличием является вывод дифференциальных уравнений, определяющих эволюцию системы, напрямую из кинетических уравнений биохимических реакций. Последовательно проведенный вывод приводит к другому типу нелинейности модельных уравнений в сравнении с уравнениями в [Smolen et al, 2001; Smolen et al, 2003; Sriram, Gopinathan, 2004]. В данной работе мы впервые подробно рассматриваем устойчивость генетического механизма колебаний по отношению к внутреннему шуму системы, используя корректное обобщение алгоритма Гиллеспи на случай немарковских систем, выполненное в работе [Bratsun et al, 2005b]. Кроме того, впервые рассмотрена пространственно-временная эволюция, генерируемая циркадианными колебаниями.

Вывод математической модели

Молекулярные процессы, которые будут приняты во внимание в нашей модели, схематически представлены на рисунке 2. Как было отмечено выше, изучение генома нейроспоры выявило несколько генов, которые участвуют в регулировании суточных ритмов этого организма. В связи с этим мы выделяем две основные компоненты механизма колебаний. Одной из них является ген *frq*, который кодирует белок *FRQ* (отмечен на рис. 2 белым цветом). Как известно, в середине темного времени суток уровень *FRQ* низок, зато к середине светлого времени суток он достигает своего максимума [Dunlap, 1999]. Второй компонент формируют два гена *wc-1* и *wc-2*, которые кодируют соответствующие белки *WC-1* и *WC-2*. Изучение поведения этих белков показало, что они формируют гетеродимерный комплекс *WCC* [Loros, Dunlap, 2001], который мы и будем рассматривать в качестве партнера для белка *FRQ* (отмечен на рис. 2 черным цветом). Как известно, белки *FRQ* и *WCC* могут существовать как в форме мономеров, концентрацию которых обозначим F и W , так и в форме димеров F_2 и W_2 . Обе формы активно взаимодействуют друг с другом – в системе одновременно протекают реакции димеризации и распада димеров соответствующих белков:



где $k_1^{F,W}$, $k_{-1}^{F,W}$ – скорости прямых и обратных реакций. Примем во внимание, что во время транскрипции любого гена происходит регуляция этого процесса посредством открытия и закрытия оператор-сайта молекулой димера (отмечен на рисунке 2 черным цветом). Наличие такого оператор-сайта можно учесть введением специальной функции $D \in \{D_0, D_1\}$, которая принимает значение D_0 в случае открытия оператор-сайта и D_1 в случае его закрытия. С формальной точки зрения состояние оператор-сайта можно рассматривать как дополнительный реагент в системе. Своеобразие данной системы состоит в том, что гены *frq* и *wc-1,2* регулируют синтез белков друг друга, формируя положительную связь: оператор-сайт гена считается открытым, если к нему прикрепляется димер белка-партнера. Учитывая эти замечания, запишем еще две пары реакций, описывающих динамику оператор-сайтов генов *frq* и *wc-1* соответственно:



Здесь $k_2^{F,W}$, $k_{-2}^{F,W}$ обозначают скорости прямых и обратных реакций. Процессы синтеза белков зададим следующими реакциями:

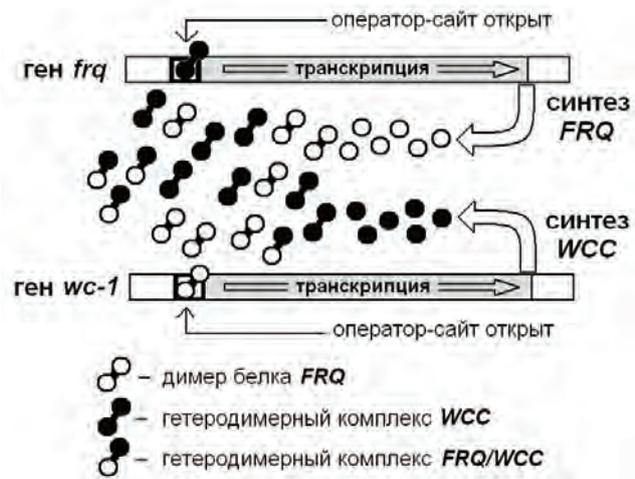
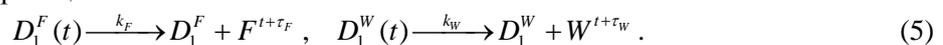
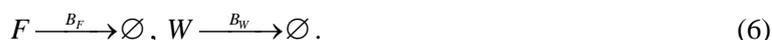


Рис. 2. Схема процессов транскрипции генов *frq* и *wc-1*, завершающихся экспрессией белков *FRQ* и *WCC*. Гены отмечены серым цветом. Оператор-сайты обозначены черным цветом

Уравнения (5) описывают процесс считывания генетической информации: в момент времени t , если оператор-сайт открыт, РНК-полимераза P прикрепляется к началу гена, и процесс транскрипции стартует. Конечным продуктом этой реакции являются мономеры белка, которые синтезируются в момент времени $t + \tau$. Время запаздывания τ необходимо системе, чтобы полностью считать информацию от начала до конца гена, перекодировать ее в мРНК, а затем синтезировать белок. Необходимо отметить, что времена запаздывания τ_F и τ_W для синтеза белков FRQ и WCC , вообще говоря, разные. Даже если исходить из простейшей гипотезы, что запаздывание определяется исключительно скоростью движения полимеразы РНК по гену, то, согласно базе данных генома *N. crassa* [*Neurospora crassa* genome], ген *wc-1* (локус NCU02356.5) примерно в полтора раза длиннее гена *frq* (локус NCU02265). Однако понятно, что ситуация здесь гораздо сложнее, и точно определить соотношения времен запаздывания в настоящий момент не представляется возможным. Поэтому в нашей работе мы будем полагать эти времена равными $\tau_F = \tau_W$. В целом уравнения (3)–(5) формируют в системе петлю положительной обратной связи, так как увеличение концентрации молекул FRQ ведет к стимулированию синтеза WCC , а значит, к еще большему уровню самого белка FRQ .

Белки могут выводиться из системы с помощью двух механизмов. Один из них предполагает обычную деградацию со временем:



Другой механизм учитывает нелинейное взаимодействие FRQ и WCC , в результате которого формируется общий гетеродимерный комплекс FRQ/WCC :



Здесь $B_{F,W}$, k – скорости реакций (6) и (7) соответственно. Мы предполагаем, что комплекс FRQ/WCC сам по себе не участвует в генной регуляции циркадианных ритмов нейроспоры, хотя его образование фактически выводит молекулы белков из системы и этим влияет на общую динамику (см. рис. 2). Уравнение (7) играет важную роль в системе, формируя петлю отрицательной обратной связи и балансируя положительную обратную связь (3)–(5).

Кроме реакций (1)–(7), происходящих локально около рассматриваемых генов *frq* и *wc-1*, необходимо учесть, что в систему могут поступать белки FRQ и WCC , синтезированные где-то в других частях нейроспоры. В большей степени это касается гетеродимерного комплекса WCC , так как ген *wc-2*, кодирующий белок $WC-2$, находится в первой хромосоме нейроспоры. В рамках предложенной модели рассматривается только динамика находящихся в седьмой хромосоме генов *frq* и *wc-1*, для которых молекулы $WC-2$ действительно являются проявлением внешней базальной транскрипции. Таким образом, дополняем систему (1)–(7) еще двумя реакциями:



где $A_{F,W}$ – скорости реакций.

Кинетические уравнения для динамики мономеров и димеров, записанные на основании реакций (1)–(8), имеют вид:

$$\frac{dF}{dt} = A_F - 2k_1^F F^2 + 2k_{-1}^F F_2 + k_F D_1^F (t - \tau_F) - B_F F - kFW, \quad (9)$$

$$\frac{dW}{dt} = A_W - 2k_1^W W^2 + 2k_{-1}^W W_2 + k_W D_1^W (t - \tau_W) - B_W W - kFW, \quad (10)$$

$$\frac{dF_2}{dt} = k_1^F F^2 - k_{-1}^F F_2 - k_2^W D_0^W F_2 + k_{-2}^W D_1^W, \quad (11)$$

$$\frac{dW_2}{dt} = k_1^W W^2 - k_{-1}^W W_2 - k_2^F D_0^F W_2 + k_{-2}^F D_1^F. \quad (12)$$

К ним нужно добавить две пары уравнений для динамики оператор-сайтов:

$$\frac{dD_0^F}{dt} = -k_2^F D_0^F W_2 + k_{-2}^F D_1^F, \quad \frac{dD_1^F}{dt} = k_2^F D_0^F W_2 - k_{-2}^F D_1^F, \quad (13)$$

$$\frac{dD_0^W}{dt} = -k_2^W D_0^W F_2 + k_{-2}^W D_1^W, \quad \frac{dD_1^W}{dt} = k_2^W D_0^W F_2 - k_{-2}^W D_1^W. \quad (14)$$

Складывая попарно уравнения в (13) и (14), приходим к очевидным соотношениям:

$$D_0^F + D_1^F = 1, \quad D_0^W + D_1^W = 1, \quad (15)$$

которые можно использовать для сокращения числа переменных в задаче. Удобно ввести в рассмотрение полное число молекул белка каждого типа:

$$F_M = F + 2F_2 + 2D_1^W, \quad W_M = W + 2W_2 + 2D_1^F. \quad (16)$$

В выражения (16) вклад вносят мономеры, свободные димеры, а также димеры, прикрепившиеся к оператор-сайту гена-партнера. Учитывая (15), получим:

$$\frac{dF_M}{dt} = A_F + k_F D_1^F (t - \tau_F) - B_F F - kFW, \quad (17)$$

$$\frac{dW_M}{dt} = A_W + k_W D_1^W (t - \tau_W) - B_W W - kFW. \quad (18)$$

Для замыкания уравнений (17)–(18) примем во внимание, что реакции синтеза и деградации белка (5)–(7) являются медленными процессами по сравнению с реакциями димеризации (1)–(2) и переключений оператор-сайтов (3)–(4). Таким образом, на фоне медленно меняющегося общего количества молекул белка каждого сорта реакции (1)–(4) протекают стремительно, а участвующие в них реагенты быстро достигают состояния локального статистического равновесия:

$$F_2 = K_1^F F^2, \quad W_2 = K_1^W W^2, \quad D_1^F = K_1^W K_2^F D_0^F W^2, \quad D_1^W = K_1^F K_2^W D_0^W F^2. \quad (19)$$

Здесь введены обозначения: $K_i^F \equiv k_i^F / k_{-i}^F$, $K_i^W \equiv k_i^W / k_{-i}^W$. Используя соотношения (15) и (19), после преобразований в (17)–(18) приходим к конечным уравнениям:

$$(1 + 4K_1^F F) \frac{dF}{dt} = A_F + k_F \frac{K_1^W K_2^F W^2 (t - \tau_F)}{1 + K_1^W K_2^F W^2 (t - \tau_F)} - B_F F - kFW, \quad (20)$$

$$(1 + 4K_1^W W) \frac{dW}{dt} = A_W + k_W \frac{K_1^F K_2^W F^2 (t - \tau_W)}{1 + K_1^F K_2^W F^2 (t - \tau_W)} - B_W W - kFW. \quad (21)$$

В моделях цикадных колебаний с запаздыванием, ранее предложенных в литературе [Smolen et al, 2001; Smolen et al, 2003; Sriram, Gopinathan, 2004], уравнения были получены путем феноменологической реконструкции элементов взаимосвязей между генами, выявленных экспериментально. В нашем случае модельные уравнения (20)–(21) выведены напрямую из исходных биохимических уравнений (1)–(8) в предположении об иерархии быстрых и медленных процессах в системе. В этом смысле полученная нами модель проще, так как не содержит лишних элементов, которые неизбежно проникают в уравнения при феноменологическом подходе. Кроме того, описывающие положительную обратную связь слагаемые в (20)–(21) имеют отличную от [Smolen et al, 2001; Smolen et al, 2003; Sriram, Gopinathan, 2004] нелинейность. Не-

смотря на свою простоту и компактность, уравнения (20)–(21) воспроизводят большинство фактов, экспериментально наблюдаемых при циркадианных ритмах нейроспоры. Необходимо заметить, что все величины в работе приводятся в размерном виде.

Динамические свойства модели

Уравнения (20)–(21) описывают собственные колебания концентрации белков FRQ и WCC нейроспоры в отсутствие внешнего воздействия на организм. Рассмотрим подробнее динамические свойства модели в рамках детерминистского описания. Выясним сначала основной механизм генерирования колебаний в системе. Предположим для простоты, что между параметрами, описывающими поведения разных белков, имеется полная симметрия:

$$A_F = A_W, \quad k_F = k_W = K, \quad B_F = B_W = B, \\ K_1^W = K_1^F = K_1, \quad K_2^W = K_2^F = K_2, \quad \tau_F = \tau_W = \tau.$$

Тогда, положив в (20)–(21) производные нулю и вычитая правые части, получим:

$$kK_1K_2(W - F)(W + F) + B(1 + K_1K_2F^2)(1 + K_1K_2W^2)(W - F) = 0, \quad (22)$$

из которого видно, что нетривиальные состояния равновесия, принимающие положительные значения, должны удовлетворять условию $F_0 = W_0$. Линеаризуем систему уравнений (20)–(21) около этого положения равновесия:

$$(1 + 4K_1F_0) \frac{d\theta}{dt} = \frac{2KK_1K_2W_0}{(1 + K_1K_2W_0^2)^2} \omega(t - \tau) - (B + kW_0)\theta(t) - kF_0\omega(t), \quad (23)$$

$$(1 + 4K_1W_0) \frac{d\omega}{dt} = \frac{2KK_1K_2F_0}{(1 + K_1K_2F_0^2)^2} \theta(t - \tau) - (B + kF_0)\omega(t) - kW_0\theta(t), \quad (24)$$

где θ , ω обозначают малые возмущения переменных F и W соответственно. Принимая во внимание симметрию уравнений (23) и (24), их можно свести к уравнению для одной переменной $\Phi(t) = \theta(t) - \omega(t)$:

$$(1 + 4K_1F_0) \frac{d\Phi}{dt} = -\frac{2KK_1K_2F_0}{(1 + K_1K_2F_0^2)^2} \Phi(t - \tau) - B\Phi(t). \quad (25)$$

Так как концентрации белков FRQ и WCC в системе колеблются в противофазе, то введение переменной $\Phi(t)$ не приводит к тривиальному результату (для стационарных решений это не так). Слагаемые в правой части (25) не являются равноценными: так как время запаздывания считается большим, то вторым слагаемым можно пренебречь. На практике это означает, что процесс линейной деградации белка (6) не так важен для динамики системы по сравнению с образованием гетеродимерного комплекса FRQ/WCC (7):

$$\frac{d\Phi}{dt} \approx -\zeta \Phi(t - \tau), \quad (26)$$

где $\zeta \equiv 2KK_1K_2F_0 / (1 + 4K_1F_0)(1 + K_1K_2F_0^2)^2$. Линейное дифференциальное уравнение с запаздывающей переменной (26) может быть решено точно в точке бифуркации Хопфа:

$$\Phi_{bif}(t) = A \cos \frac{\pi t}{2\tau}, \quad \zeta|_{bif} = \frac{\pi}{2\tau}.$$

Это решение представляет собой периодические колебания с периодом $T = 4\tau$. Механизм колебаний, возникающих в (26), очень прост. Предположим, эволюция системы начинается в момент времени $t - \tau$ при отрицательных значениях переменной $\Phi(t - \tau)$. Тогда согласно уравнению (26) производная $d\Phi/dt$ в момент времени t положительна, и функция растет. Рост функции $\Phi(t)$ продолжается вплоть до момента времени, когда прошлое значение функции $\Phi(t - \tau)$, определяющее знак производной, пересекает нулевое значение и становится положительным. После этого функция $\Phi(t)$ начинает убывать. В дальнейшем описанный сценарий смены роста функции повторяется. Таким образом, время запаздывания τ определяет ровно четверть периода колебаний. Необходимо отметить, что подобное соотношение между временем запаздывания и периодом реализуется только в линейном приближении (26). В нелинейном же случае, представленным уравнениями (20)–(21), при $\zeta > \zeta_{bif}$ связь между запаздыванием и колебаниями становится более сложной.

Зафиксируем значения параметров системы (20)–(21), частично воспользовавшись данными из работы [Smolen et al, 2003]. Что касается значений, которые отсутствуют в [Smolen et al, 2003], мы дополняем их оценками, которые взяты из предположения о скоростях прохождения различных процессов в системе. Например, в нашей модели предполагается, что процессы образования димеров (1)–(2) и переключения состояния оператор-сайта (3)–(4) проходят со сравнимыми скоростями, поэтому вполне логично просто приравнять их значения. Тогда имеем:

$$\begin{aligned} K_1^F &= 5 \quad (k_1^F = 5nM^{-1}h^{-1}, \quad k_{-1}^F = 1h^{-1}), \\ K_1^W &= 5 \quad (k_1^W = 5nM^{-1}h^{-1}, \quad k_{-1}^W = 1h^{-1}), \\ K_2^F &= 5 \quad (k_2^F = 5nM^{-1}h^{-1}, \quad k_{-2}^F = 1h^{-1}), \\ K_2^W &= 5 \quad (k_2^W = 5nM^{-1}h^{-1}, \quad k_{-2}^W = 1h^{-1}), \\ k_F &= 8nM/h, \quad k_W = 4nM/h, \\ B_F &= 0.3h^{-1}, \quad B_W = 0.4h^{-1}. \end{aligned} \quad (27)$$

Принимая во внимание, что период циркадианных ритмов нейроспоры *in vivo* составляет порядка 22 часов, мы выбираем следующее значение для времени запаздывания: $\tau_F = \tau_W = 6h$. Для простоты будем предполагать, что времена запаздывания при транскрипции/трансляции генов *frq* и *wcc* равны. Таким образом, в системе (20)–(21) остается три свободных параметра: $A_{F,W}$ и k . Параметр k , который характеризует скорость нелинейной деградации белков *FRQ* и *WCC* за счет образования гетеродимерного комплекса *FRQ/WCC*, играет в настройке биоритмов системы принципиальную роль. Численное исследование системы (20)–(21) показало, что существует критическое значение $k_{bif} = 22.45nM^{-1}h^{-1}$, ниже которого колебания отсутствуют. Таким образом, процесс нелинейной деградации белков определяет период колебаний. На рис. 3а представлены развертки по времени для полного числа мономеров F_M и W_M обоого сорта, полученные при численном моделировании системы (20)–(21) при $k = 30nM^{-1}h^{-1}$ и отсутствии базальных транскрипционных факторов $A_{F,W} = 0$. Хорошо видно, что концентрации белков *FRQ* и *WCC* осциллируют в противофазе с периодом примерно 22.65 часа в полном соответствии с экспериментальными данными [Lee et al, 2000]. Зафиксируем указанное значение для скорости нелинейной деградации k . Что касается параметров A_F и A_W , определяющих поступление белков *FRQ* и *WCC* извне, то они остаются свободными. В случае $A_{F,W} = 0$ система осциллирует только за счет внутренних факторов, демонстрируя собственные колебания. Однако, как показывают расчеты, базальный уровень концентрации белков может существенно менять динамику системы. На рисунке 4 на плоскости параметров A_F и A_W представлена область неустойчивости, ограниченная нейтральной кривой для бифуркации Хопфа. Во врезке к рисунку

представлена бифуркационная диаграмма для частного случая, когда белок FRQ в систему извне не поступает: $A_F = 0$. Хорошо видно, что с ростом A_W амплитуда колебаний уменьшается, и выше значения $A_W^{bif} = 3.7$ осцилляции прекращаются. Далее будет показано, что фактор базальной транскрипции существенно модифицирует пространственную динамику системы.

Стохастические свойства модели

Как известно, количество молекул, вступающих в реакции во время генных процессов транскрипции/трансляции, весьма невелико. Например, скорость работы РНК-полимеразы всего около 50 нуклеотидов в секунду. Таким образом, даже небольшие флуктуации концентраций мРНК и белка могут иметь значительное влияние на общую динамику системы. Между тем, механизм циркадианных ритмов любого живого организма является одним из самых устойчивых и неизменно воспроизводимых процессов в природе. Предполагая генное происхождение этого механизма, основным элементом которого является запаздывание в процессах транскрипции и трансляции, необходимо убедиться в его устойчивости по отношению к внутриклеточным флуктуациям. Отметим, что в генетике принято различать два вида шума, которые могут возникать в системе. Первый вид шума связан со случайной природой самих химических реакций между небольшим количеством молекул внутри одной клетки (в англоязычной литературе используют термин *intrinsic noise* – «внутренний шум»). Все, что в этих условиях работает на усиление стохастичности, может быть отнесено к этому типу шума [Bratsun et al, 2005a; Swain et al, 2002]. Например, флуктуации, возникающие при нагреве системы, определенно служат усилению внутренне присущего системе шума. Другой тип шума, получивший название «внешний шум» (*extrinsic noise*), генерируется за пределами клетки и связан с межклеточными различиями [Swain et al, 2002]. Наличие внешнего шума на межклеточном уровне поднимает вопрос о его влиянии на механизм синхронизации циркадианных ритмов отдельных клеток на уровне всего организма. Этот вопрос остается за рамками данной работы. Что касается внутреннего шума, то удобным инструментом численного исследования дискретных стохастических систем является алгоритм Гиллеспи [Gillespie, 1977], который представляет собой разновидность методов Монте-Карло. Особенно интенсивно этот метод используется в вычислительной системной биологии при изучении внутриклеточной динамики, в которой участвует сравнительно небольшое количество молекул. Как известно, численное решение, полученное методом Гиллеспи, статистически воспроизводит точное решение основного кинетического уравнения. Однако классическая версия алгоритма была сформулирована только для марковских систем. В связи с этим в работе [Bratsun et al, 2005a] нами была предложена модификация алгоритма Гиллеспи на случай запаздывающих химических реакций. Там же на примерах показано, что новый алгоритм корректно воспроизводит их решения численно, а также приведены примеры расчета.

Опишем кратко главную идею модификации алгоритма Гиллеспи. Предположим, имеется N химических соединений X_i , вступающих в многоэтапную реакцию между собой. Каждый тип реактивного контакта, случающийся между молекулами, будем называть «химическим каналом» R_μ . Пусть таких каналов имеется M штук. Будем считать, что многосоставная реакция распадается на элементарные акты. При совершении каждого акта нужно вычислить время, через которое произойдет следующая элементарная реакция, а также определить канал этой реакции, то есть выяснить, какие именно компоненты из вектора X_i должны вступить в контакт. Для марковских процессов, для которых и сформулирован метод Гиллеспи, распределение промежутков времени Δt , проходящих между реакциями, подчиняется распределению Пуассона:

$$P(\Delta t) = \sum_{\mu} a_{\mu} \exp\left(-\Delta t \sum_{\mu} a_{\mu}\right), \quad (28)$$

где $a_\mu \equiv c_\mu h_\mu$ – вероятность того, что в данный момент реализуется μ -й химический канал. Значение a_μ формируется благодаря двум факторам. Не углубляясь в тонкости кинетики реакций, можно сказать, что c_μ – это скорость реакции [Gillespie, 1977]. Величина h_μ определяется для каждого химического канала и равняется количеству различных молекулярных соединений из набора X_i . Это число легко определяется кинетикой реакции. Отбор следующей по времени реакции зависит от дискретного распределения

$$P(\mu = \mu^*) = \frac{a_{\mu^*}}{\sum_{\mu} a_{\mu}}. \quad (29)$$

Алгоритм Гиллеспи включает в себя следующие действия. По заранее известным кинетическим уравнениям химических каналов вычисляются значения a_μ . Стартуя с некоторых начальных условий, генерируются два случайных числа из отрезка $[0,1]$. Первое число согласно распределению (28) определяет время наступления ближайшей реакции Δt , а второе – по распределению (29) определяет химический канал μ^* , который реализуется через время Δt . Система делает прыжок $t = t + \Delta t$, и реакция совершается. Обновляется вектор состояния системы X_i , и вся процедура повторяется.

Главная идея обновления алгоритма заключается в следующем [Bratsun, 2005a]. Предположим, один из химических каналов R_μ является немарковским. Если при определении следующего канала выпадает реакция μ^* с запаздыванием, то она не выполняется, а помещается в стек памяти с тем, чтобы быть выполненной в момент времени $\Delta t^* + \tau$, где τ – время запаздывания. Если же выпавший химический канал является марковским, то прыжок во времени Δt^* , который должна совершить система, сравнивается со временами наступления отложенных в стек памяти реакций. Если в диапазоне между t и $t + \Delta t^*$ никаких реакций не запланировано, то система совершает прыжок на Δt^* . Если же в этот диапазон времени как раз попадает одна из запаздывающих реакций, то последняя процедура отбора игнорируется, а система прыгает к моменту времени $t + \Delta t_d$, которое ранее было уже запланировано, но отложено из-за запаздывания.

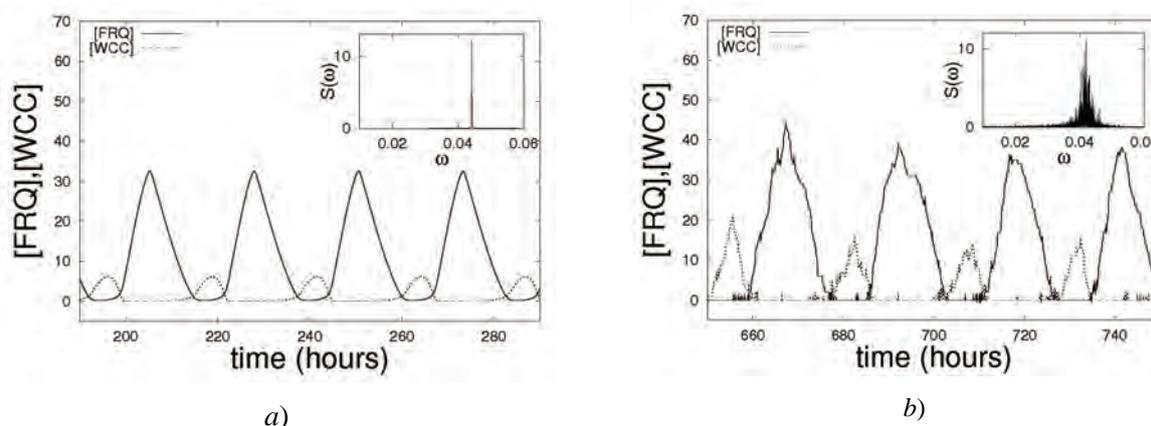


Рис. 3. (а) Временная зависимость полного числа мономеров белка FRQ (сплошная линия) и WCC (штриховая линия), полученная при численном интегрировании системы (20)–(21). (б) Временная эволюция соответствующей стохастической системы (1)–(8), полученная методом Гиллеспи. Во врезках приведены фурье-спектры сигналов. Значения параметров в обоих случаях одинаковы (27)

Применим этот метод для численного анализа химических реакций с запаздыванием (1)–(8). На рисунке 3*b* приведены результаты расчетов для тех же значений параметров, что и в детерминистском случае, представленном на рис. 3*a*. Хорошо видно, что, несмотря на небольшое количество вовлеченных в динамику молекул (в любой момент времени полное число мономеров не превышает 50 штук) и значительные флуктуации, базисный механизм колебаний уверенно работает. Во врезке к рис. 3*b* приведен фурье-спектр стохастического сигнала, который имеет максимум, примерно соответствующий периоду колебаний 23 часа.

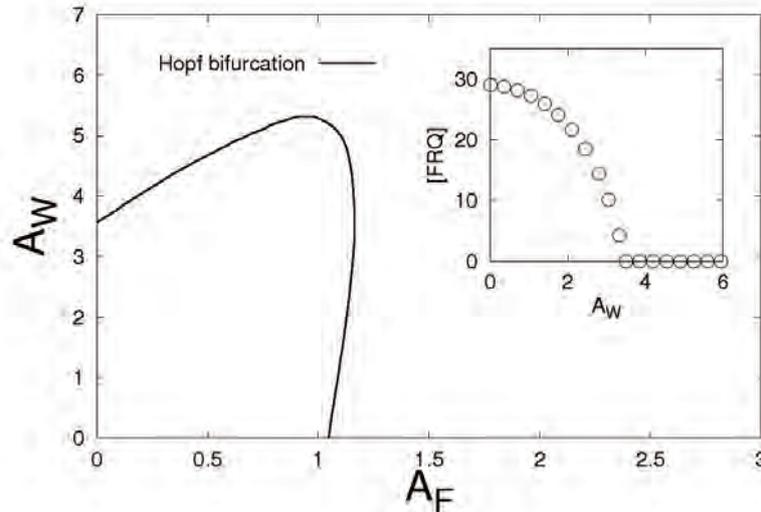


Рис. 4. Нейтральная кривая бифуркации Хопфа для системы (20)–(21) на плоскости параметров базальных транскрипционных факторов A_F и A_W . Колебания наблюдаются внутри области неустойчивости. Во врезке представлена бифуркационная диаграмма для амплитуды колебаний при $A_F = 0$

В рамках стохастического описания было рассмотрено влияние фактора базальной транскрипции на динамику системы. На первый взгляд, поступление в систему как FRQ , так и WCC вызывает одинаковый эффект: колебания прекращаются, и базовый механизм биоритмов перестает работать (рис. 4). Однако расчет уровня флуктуаций в обоих случаях и оценка их возможного влияния на эволюцию системы выявили существенную разницу между этими двумя случаями. Для характеристики системы удобен коэффициент вариации $C.V.$, который представляет собой отношение среднеквадратичного отклонения к среднему значению случайной величины. Фактически $C.V.$ определяет уровень шума по отношению к интенсивности сигнала. На рис. 5*a* приведена зависимость коэффициента вариации от параметра A_F , определяющего интенсивность поступления белка FRQ в систему. При этом считается, что белок WCC кодируется только внутри системы: $A_W = 0$. Несмотря на рост средней концентрации FRQ (эта зависимость приведена во врезке к рисунку 5*a*), относительный уровень флуктуаций к величине сигнала быстро уменьшается с ростом A_F . Это означает, что возможности для развития неустойчивости уменьшаются. Как будет показано ниже, этот эффект существенно влияет на пространственную эволюцию системы, вызывая упрощение возникающих структур. Причина уменьшения флуктуаций концентраций белка FRQ понятна: поступающий в систему базальный FRQ связывается с имеющимся здесь WCC и образует гетеродимер FRQ/WCC , не принимающий напрямую участие в функционировании механизма биочасов организма. Это ведет к падению концентрации WCC и ослаблению петли положительной обратной связи: система перестает кодировать FRQ и относительный уровень флуктуаций в системе падает. Система реагирует в обычной для биологических систем манере: если что-то нужно для ее функционирования поступает извне даром, то самостоятельно синтезировать это нет необходимости.

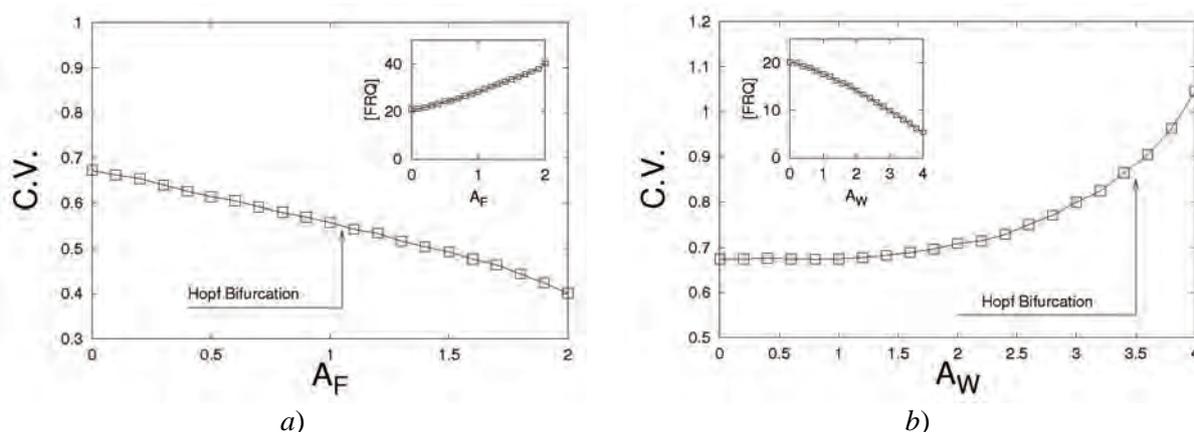


Рис. 5. График зависимости коэффициента вариации от интенсивности внешнего потока белка: (а) FRQ ; (б) WCC . Во врезке приведены зависимости средней величины полного числа мономеров FRQ от базальных транскрипционных факторов A_F и A_W

Совсем другая картина разворачивается при изменении параметра A_W (рис. 5b). Когда в систему извне поступает белок WCC , это запускает интенсивное кодирование белка FRQ , но одновременно связывает последний в рамках гетеродимера FRQ/WCC . Так как подпитка системы протеином FRQ извне отсутствует, это понижает его среднюю концентрацию в системе (см. врезку в рис. 5b), но резко усиливает относительные флуктуации. Последние, как будет показано далее, запускают в системе различные типы волновых процессов.

Влияние внешнего освещения на динамику циркадианных ритмов

Как известно, свет влияет на динамику циркадианных колебаний нейроспоры через белок $WC-1$. Являясь хорошим фоторецептором, $WC-1$ получает прямой световой сигнал и образует гетеродимер с белком $WC-2$. Вместе они запускают процесс транскрипции гена frq . Таким образом, свет напрямую влияет на механизм генетических часов, который лежит в основе циркадианных осцилляций нейроспоры. Как выражение этого факта, экспериментально наблюдаются такие явления как синхронизация биоритмов нейроспоры под действием внешнего периодического освещения или сброс текущей фазы колебаний при импульсном освещении [Соколовский, Белозерская, 2000; Neurospora crassa genome]. В рамках нашей модели описанный механизм влияния света может быть учтен в первом уравнении в (3). Будем считать, что свет напрямую стимулирует процесс прикрепления гетеродимера WCC к оператор-сайту гена frq . Введем в рассмотрение функцию $\phi(t)$, которая описывает изменение интенсивности внешнего освещения во времени. В этом случае уравнение (20) принимает следующий вид:

$$(1 + 4K_1^F F) \frac{dF}{dt} = A_F + k_F \frac{K_1^W K_2^F \phi(t) W^2 (t - \tau_F)}{1 + K_1^W K_2^F \phi(t) W^2 (t - \tau_F)} - B_F F - kFW, \quad (30)$$

а уравнение (21) остается без изменений. Рассмотрим случай периодического освещения:

$$\phi(t) = 1 + R(1 + \cos(\Omega t)), \quad (31)$$

где R , Ω – амплитуда и частота колебаний. Значение $R = 0$ соответствует условию полной темноты, при котором кодирование белка FRQ проходит с естественной скоростью k_2^F . С другой стороны, выражение (31) гарантирует, что $\phi(t) \geq 1$, то есть свет может только ускорять синтез FRQ .

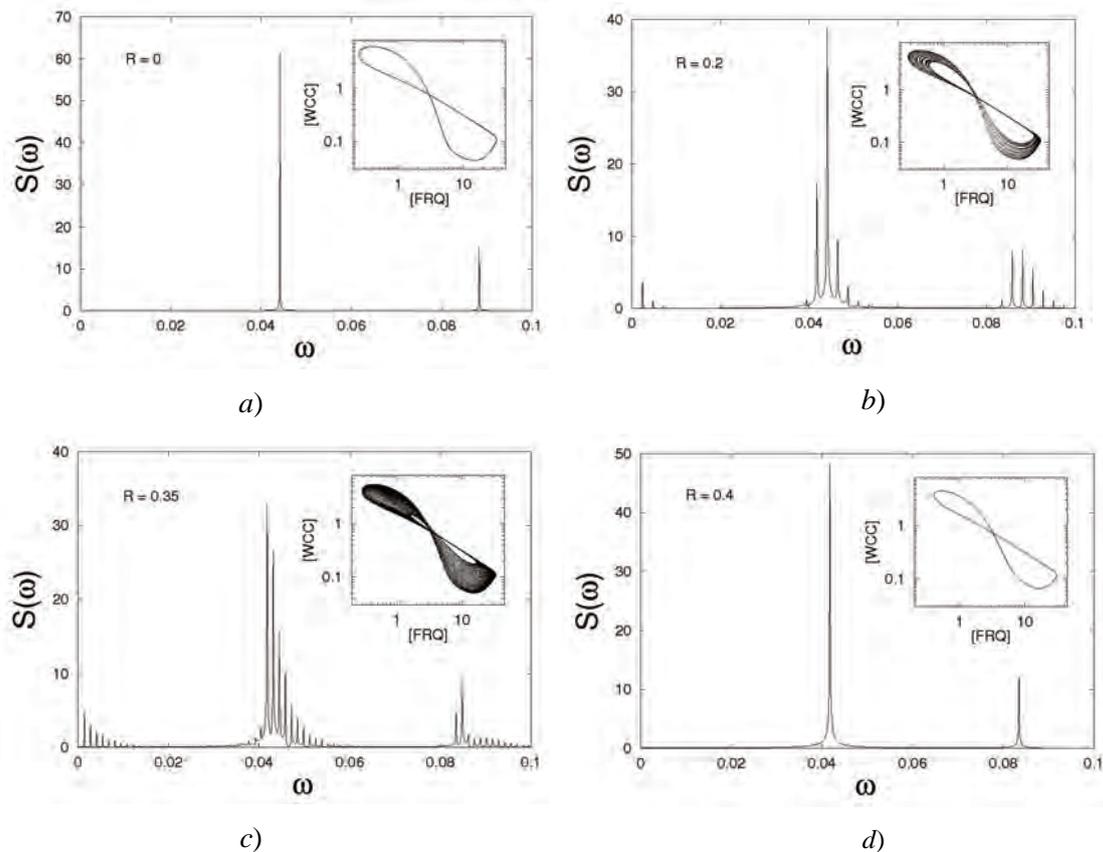


Рис. 6. Спектры Фурье и фазовые портреты системы (во врезке), полученные при численном интегрировании уравнений (21), (30)–(31) для четырех значений амплитуды модуляции внешнего освещения R : (a) – 0, (b) – 0.2, (c) – 0.35, (d) – 0.4

Система уравнений (21), (30)–(31) исследовалась численно для разных значений амплитуды R и фиксированной частоты колебаний с периодом 24 часа (земные сутки). Результаты расчетов в виде фурье-спектров представлены на рисунке 6. Во врезках показаны фазовые портреты системы, на которых по осям отложены значения для полного числа молекул FRQ и WCC . В условиях полной темноты $R=0$ в системе работает только собственный механизм колебаний, связанный с запаздыванием (рис. 6a). При этом система осциллирует с периодом 22.65 часа. При появлении внешнего освещения $R>0$, интенсивность которого меняется с периодом 24 часа, в системе происходит перестройка. При небольших значениях амплитуды R сигнал ведет себя квазипериодически: как видно из рис. 6b, ведущий пик фурье-спектра соответствует собственным колебаниям нейроспоры, а рядом находится пик, отвечающий вынужденным колебаниями, инспирированным извне. При дальнейшем увеличении амплитуды колебаний ведущий пик спектра смещается в сторону значения частоты вынужденных колебаний (рис. 6c, $R=0.35$), а затем происходит синхронизация, которая проявляется в появлении предельного цикла на торе (рис. 6d, $R=0.4$). Период колебаний в системе становится равным 24 часам. Таким образом, внешнее освещение, периодически меняющееся во времени по закону (31), подправляет внутренние биоритмы нейроспоры.

Рассмотрим теперь другой случай внешнего воздействия. Экспериментально установлено, что неожиданный импульс света в темноте производит сброс текущей фазы колебаний у нейроспоры и устанавливает стрелки биочасов на момент, соответствующий максимальному уровню белка FRQ в системе [Liu et al, 2000]. Предложенная нами модель легко описывает данный эффект. На рисунке 7 представлен график изменения полного числа мономеров FRQ во времени, где сплошная линия соответствует осцилляциям в полной темноте. В момент времени

$t = 310$ производится импульсное включение внешнего освещения нейроспоры, которое продолжается до момента $t = 320$. После этого эволюция организма снова продолжается в полной темноте. Как видно из рисунка, импульс света действительно изменяет фазу колебаний, переключая ее к моменту времени, когда концентрация молекул FRQ высока. Лучше всего понять, что происходит в системе, рассматривая ее фазовый портрет (рис. 7, врезка). В условиях полной темноты в фазовом пространстве системы сосуществуют как минимум два объекта: неустойчивое состояние равновесия (отмечено точкой на рис. 7) и устойчивый предельный цикл (сплошная линия на том же рисунке). Резкое увеличение скорости кодирования гена frq , которое производит импульс света, приводит к ускорению синтеза белка FRQ и прекращению осцилляций: система мгновенно попадает в ситуацию, когда предельный цикл исчезает из фазового пространства, а состояние равновесия становится устойчивым. Таким образом, фазовая траектория (штриховая линия) притягивается к фиксированной точке, и поведение системы становится стационарным. После окончания действия импульса света в фазовом пространстве системы снова возникает предельный цикл и колебания возобновляются. Однако в этом случае траектория стартует из окрестности состояния равновесия, которое соответствует высокому уровню белка FRQ , что соответствует фазе «день».

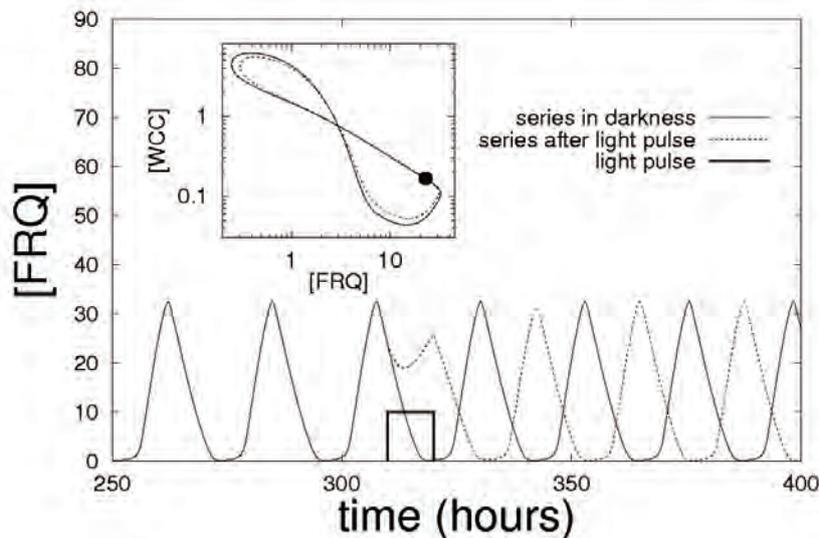


Рис. 7. Эффект сброса фазы колебаний под действием внезапного импульса света в промежутке времени $310 < t < 320$. Во врезке представлен фазовый портрет системы, демонстрирующий, что происходит с системой в этот момент

Пространственно-распределенная модель

Для рассмотрения пространственно-временной эволюции системы, обобщим уравнения (20)–(21) следующим образом:

$$\frac{\partial F}{\partial t} = \frac{1}{(1 + 4K_1^F F)} \left(A_F + k_F \frac{K_1^W K_2^F W^2 (t - \tau_F)}{1 + K_1^W K_2^F W^2 (t - \tau_F)} - B_F F - kFW \right) + D\Delta_{xy} F, \quad (32)$$

$$\frac{\partial W}{\partial t} = \frac{1}{(1 + 4K_1^W W)} \left(A_W + k_W \frac{K_1^F K_2^W F^2 (t - \tau_W)}{1 + K_1^F K_2^W F^2 (t - \tau_W)} - B_W W - kFW \right) + D\Delta_{xy} W, \quad (33)$$

где D – коэффициент диффузии, Δ_{xy} – оператор Лапласа, заданный на плоскости координат x и y . Будем предполагать, что коэффициенты диффузии мономеров FRQ и WCC равны. Урав-

нения (32)–(33) сформулированы для переменных $F(t, x, y)$ и $W(t, x, y)$, которые теперь являются функциями времени и двух пространственных координат x, y .

Расчетная область $\Sigma(x, y)$ может интерпретироваться как область плоского физического пространства, занятая мицелием нейроспоры (см. фотографию на рис. 1). Нейроспора является многоклеточным организмом. Однако транскрипция и кодирование белков происходят внутри отдельных клеток. Как в этом случае следует рассматривать мицелий всего гриба в целом? Здесь наш анализ упрощает важная особенность *N. crassa*: мицелий организма состоит из многоядерных разветвленных гиф, обладающих апикальным полярным ростом. Септальная перегородка с центральной порой до 0.5 мкм в диаметре разделяет гифы на клетки или компартменты (100×20 мкм). Пора проницаема для цитоплазмы, ядер и митохондрий. Таким образом, белки, вырабатываемые в отдельных клетках нейроспоры, по-видимому, могут легко преодолевать межклеточные стенки. По крайней мере, в ряде работ было показано наличие функционально связанных групп клеток в гифах мицелия. Оказалось, что такие сообщества клеток на верхушке растущей грибной гифы эффективно функционируют, успешно решая задачу энергетической кооперации и продвижения организма в пространстве. Верхушка растущей грибной гифы – не просто высокоорганизованное образование клеток: в ходе роста все структуры находятся в непрерывной динамике, меняя место, интенсивность работы, связь с соседями. На кончике гифа непрерывно выделяется клеточная стенка и ферменты, переваривающие окружающий субстрат. В нашем случае это означает, что можно говорить об общем белковом облаке внутри организма. Динамика этого облака и определяет биоритмы всего мицелия нейроспоры в целом.

Опишем кратко численный метод. Система уравнений (32)–(33) интегрировалась в квадратной области $\Sigma: (0 < x < 200, 0 < y < 200)$, на границе которой задавались следующие условия:

$$\left. \frac{\partial F}{\partial x} \right|_{x=0,200} = 0, \quad \left. \frac{\partial F}{\partial y} \right|_{y=0,200} = 0, \quad \left. \frac{\partial W}{\partial x} \right|_{x=0,200} = 0, \quad \left. \frac{\partial W}{\partial y} \right|_{y=0,200} = 0. \quad (34)$$

Решение краевой задачи (32)–(34) осуществлялось с помощью метода конечных разностей. Уравнения и граничные условия аппроксимировались на равномерной сетке 400 на 400 узлов с помощью аппроксимаций второго порядка по пространственным координатам. Использовалась явная схема, и, чтобы обеспечить ее устойчивость, шаг по времени вычислялся по формуле

$$\Delta t = \frac{\Delta x^2}{2(2 + \max(|F|, |W|))}, \quad (35)$$

где Δx – шаг сетки по пространству.

Главная трудность моделирования системы (32)–(34) заключается в вычислении запаздывающих значений. Прямолинейный подход к данной проблеме подразумевает хранение в машинной памяти данных для всех временных слоев в пределах диапазона запаздывания. В нашем случае из-за большой величины запаздывания, протяженной области интегрирования и малого шага по времени общее количество хранимых данных может превысить возможности компьютера. Чтобы преодолеть эту трудность, хранение данных осуществлялось не на каждом временном шаге, а только в определенные моменты времени, которые мы называем «опорными». Значения переменных F и W для промежуточных слоев времени аппроксимировались по хранимым в памяти опорным слоям. В процессе расчета с целью повышения точности вычислений число таких слоев в пределах диапазона запаздывания могло меняться. Тестовые расчеты показали, что при времени запаздывания $\tau = 6$ для получения корректных результатов достаточно введения 6–10 опорных слоев.

Были рассмотрены два принципиально разных случая начальных условий. В первом случае в качестве начального состояния эволюции системы рассматривалось случайное распределение концентрации белков FRQ и WCC по всей области интегрирования Σ . Данная постановка начальных условий моделирует ситуацию, когда в каждой точке мицелия задана своя начальная

фаза циркадианных колебаний. В начальный момент времени все эти биоритмы никак не связаны друг с другом, но в процессе эволюции вступают в нелинейное взаимодействие, результатом которого являются разные виды пространственно-временных структур. С точки зрения функционирования реального организма такая постановка задачи является несколько искусственной, так как внутренняя синхронизация биоритмов в клетках осуществляется на стадии эмбрионального развития организма и структурно поддерживается в ходе его физического роста. Таким образом, ситуация, при которой во взрослом организме неожиданно обнуляются все фазы локальных биоритмов в клетках и эволюция стартует с самого начала, представляется противоестественной. Тем не менее, исследование системы с такими начальными условиями позволяет глубже понять потенциал системы по отношению к пространственно-временной самоорганизации и оценить ее вероятные формы структурообразования.

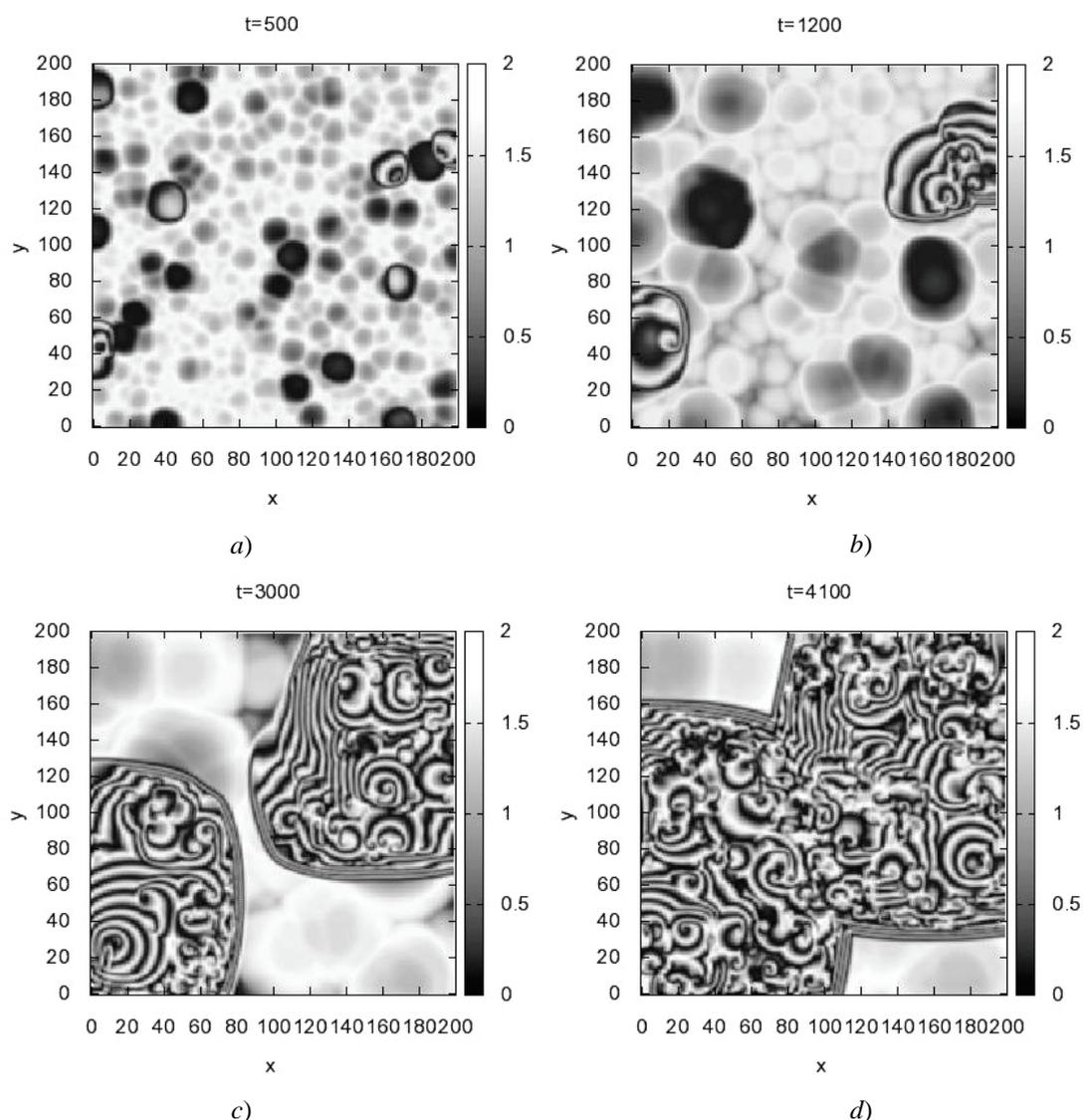


Рис. 8. Поля концентрации белка *FRQ* для четырех последовательных моментов времени t : (a) – 500, (b) – 1200, (c) – 3000, (d) – 4100. Внешние потоки белков в систему отсутствуют: $A_F = 0$, $A_W = 0$. Значение коэффициента диффузии фиксировано: $D=0.01$

Второй случай начальных условий, представляющий собой малое симметричное возмущение концентрации протеинов *FRQ* или *WCC* на фоне нулевых значений полей в остальных точках области Σ , является более естественным. Экспериментально установлено, что при выра-

щивании нейроспоры из небольшого зародыша в однородной питательной среде на плоскости (в чашке Петри), организм развивается равномерно в обоих пространственных направлениях [Lakin-Thomas, Brody, 2004]. В этом случае фронт продвижения границы мицелия математически представляет собой концентрическую ударную волну, распространяющуюся с постоянной скоростью по плоскости. Такое распространение мицелия феноменологически может быть описано соответствующим уравнением, однако мы не вводим его, ограничиваясь только уравнениями (32)–(33), которые напрямую вытекают из генетико-транскрипционного анализа. Стоит подчеркнуть, что локальная фаза колебаний, вызываемых распространяющейся волной, определяется фазой начального возмущения в зародыше, а вся пространственно-временная структура в целом формируется в ходе морфогенеза организма.

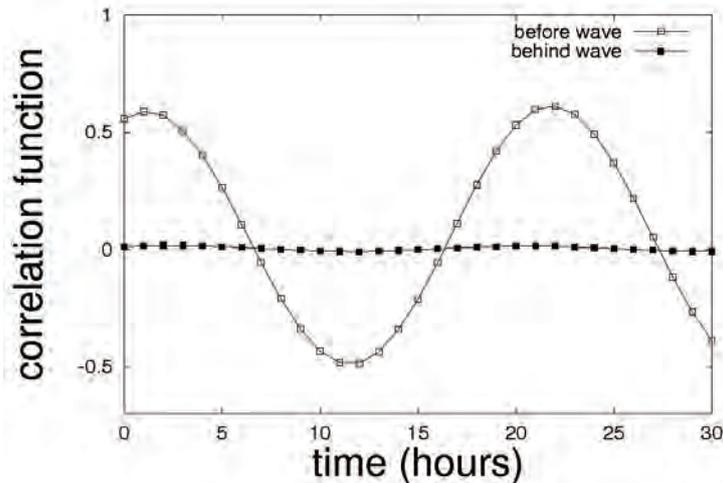


Рис. 9. Взаимокорреляционные функции двух точек пространства до и после прохождения волны рассинхронизации, показанной на рисунке 8

Рассмотрим сначала первый случай начальных условий. На рисунке 8 представлены пространственные структуры, образованные полем концентрации мономеров FRQ , для четырех последовательных моментов времени. Расчеты выполнены для случая, когда факторы базальной транскрипции отсутствуют: $A_f = 0$, $A_w = 0$. Как видно из рисунка, пространственная динамика системы складывается из двух колебательных режимов. Один из них представляет собой осцилляции концентрации FRQ в квазистационарных ячейках, чей характерный размер медленно растет со временем (рис. 8a, b, c). Одновременно на фоне ячеек распространяются волны (рис. 8b, c, d), возникающие из отдельных центров возмущения (рис. 8a). Эти волны продвигаются во всех направлениях пространства, пока не захватывают всю область интегрирования. Отметим, что если сам фронт волны выглядит более-менее упорядоченным, то внутри области неустойчивости возникают многочисленные центры возбуждения вторичных спиральных волн, нелинейное взаимодействие которых приводит к хаотическому поведению среды за гребнем первичной волны. Расчет взаимокорреляционной функции между парами точек среды, принадлежащих областям до и после прохождения волны, показывает, что корреляции между точками в волновой зоне практически отсутствуют (рис. 9). Таким образом, с точки зрения динамики биоритмов эволюция системы проходит три стадии. Сначала из случайных начальных условий возникает медленно меняющаяся во времени ячеистая структура, которая устанавливает определенную синхронизацию между колебаниями различных точек среды. Затем очень быстро в системе возбуждаются волны рассинхронизации, которые сбрасывают все локальные установки фаз часов в среде. Тем не менее, поведение системы нельзя назвать пассивным – скорее, она находится в «ждущем» режиме: поле концентрации белка FRQ хаотически осциллирует как по пространству, так и по времени, но при любой команде извне система готова упорядочить фазу своих колебаний нужным образом. Внешнее управление этой активной средой может осуществляться, например, с помощью фактора базальной транскрипции. Как было показано выше, внешний поток бел-

ков FRQ и WCC действует на систему по-разному. Особенно чувствительной к возмущениям система становится в случае действия фактора базальной транскрипции WCC (рис. 5b). Рассмотрение пространственной эволюции системы подтверждает рассмотренный выше стохастический анализ. На рисунке 10 представлены поля концентрации мономеров FRQ , которые являются результатом 5000-часовой эволюции системы, для четырех значений параметра A_w . Как видно из рисунка, с увеличением внешнего потока белка WCC количество организующих центров волновой неустойчивости резко возрастает, а сама пространственно-временная структура становится более упорядоченной. Если в изолированной системе структура имела ярко выраженный нестационарный характер (рис. 10a), то в случае $A_w \neq 0$ образования являются квазистационарными: пространственной динамики здесь уже нет – структуры просто «вморожены» в пространство, а каждая точка среды осциллирует периодически в соответствии со своей фазой колебаний, которую ей навязывает паттерн (рис. 10b, c, d). При этом период колебаний несколько увеличивается с ростом A_w . Таким образом, фактор базальной транскрипции играет здесь синхронизирующую роль.

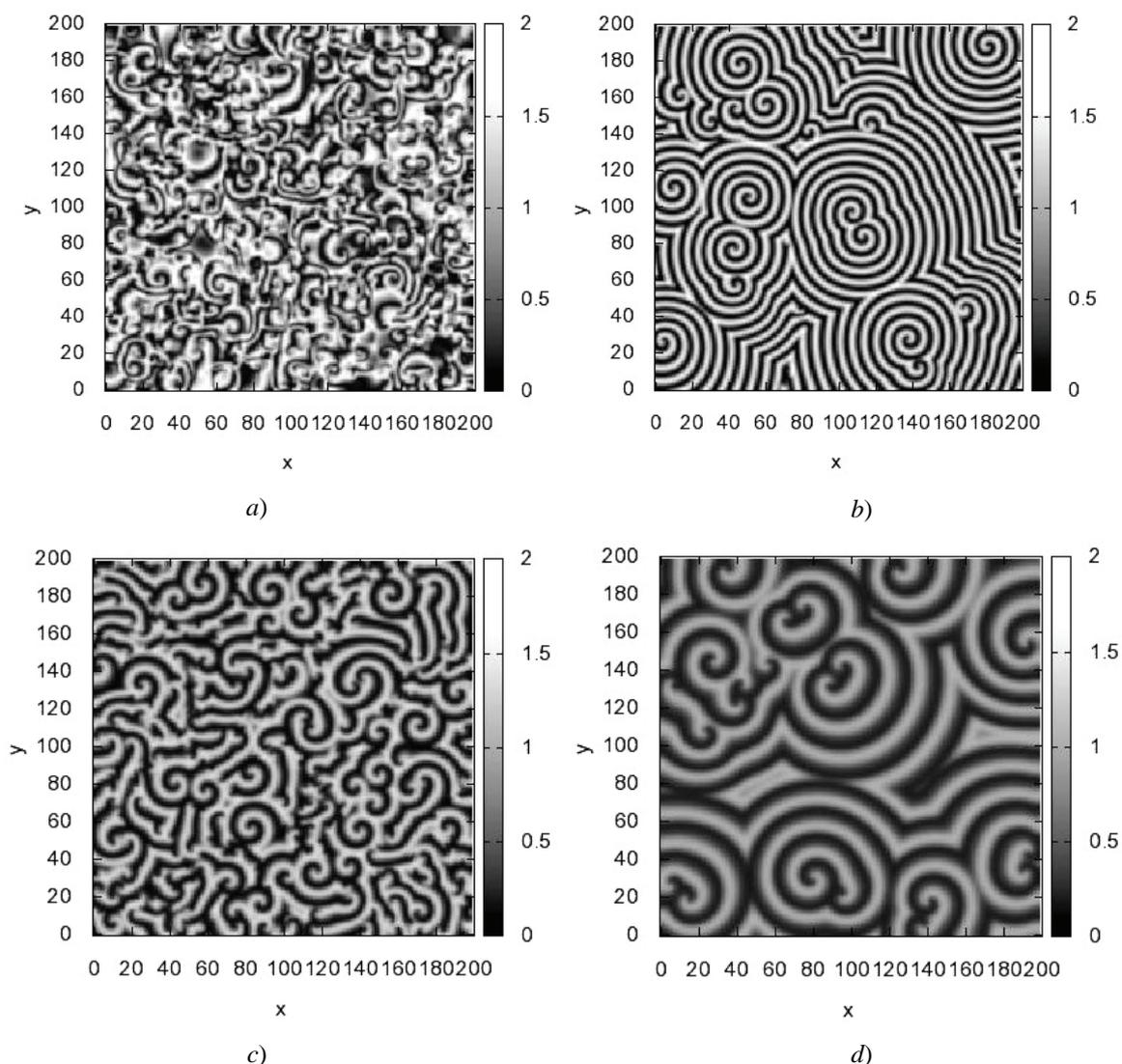


Рис. 10. Структуры, образуемые белком FRQ в зависимости от разных значений параметра A_w : (a) – 0, (b) – 1, (c) – 2, (d) – 2.8. Каждая структура является результатом 5000-часовой эволюции системы (32)–(34) в полной темноте из случайных начальных условий

Численные эксперименты для случая внешнего потока белка FRQ в систему показали, что волновые структуры здесь не возникают. Динамика системы представляет собой медленно эволюционирующие ячеистые возмущения, которые походят на фоновые структуры на рис. 8а. Это поведение можно связать с резким уменьшением относительной величины флуктуаций поля концентрации FRQ , которое было продемонстрировано на рисунке 5а. В каком-то смысле влияние этого фактора аналогично действию внешнего освещения нейроспоры, которое также вызывает резкий рост синтеза FRQ и прекращение колебаний (см. рис. 6).

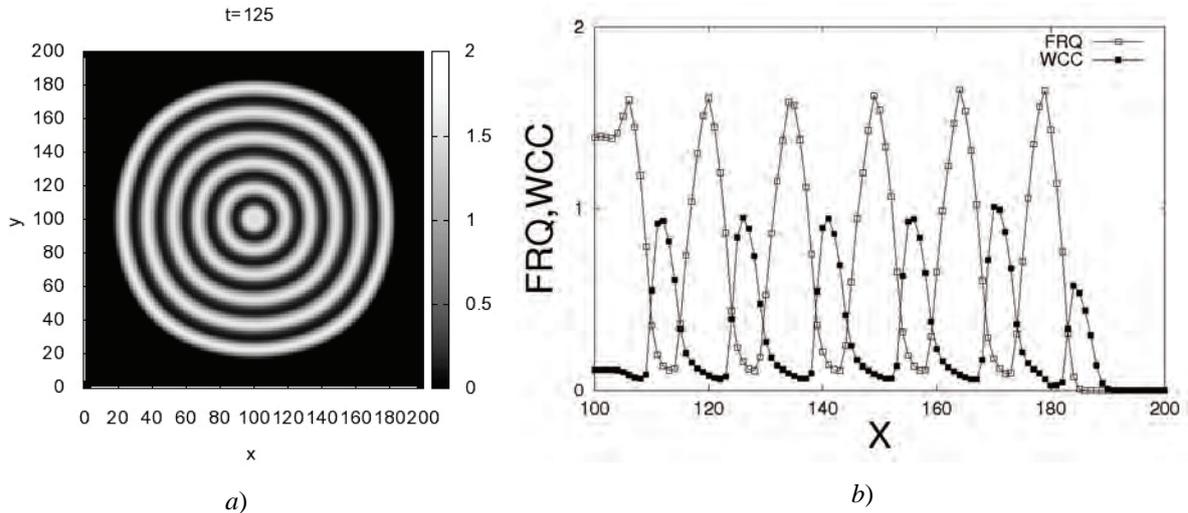


Рис. 11. (а) Структура, образованная белком FRQ после 125-часовой эволюции в полной темноте из одиночного возмущения в центре расчетной области в точке $x^* = 100$, $y^* = 100$; (б) распространение концентрационных волн белков FRQ и WCC вдоль координаты x (из-за симметрии показана только половина волны)

Рассмотрим теперь второй случай начальных условий: пусть эволюция системы начинается из локального возмущения x^*, y^* в центре области интегрирования. Расчеты показали, что первоначальное возмущение $F(t, x^*, y^*) - W(t, x^*, y^*)$ определяет фазу начальных колебаний в системе. Так как весь организм вырастает из этой точки, колебания в x^*, y^* можно определить как «глобальные часы» нейроспоры. Именно эти часы управляют процессом роста организма. На рисунке 11 приведены: поле концентрации FRQ после 125 часов эволюции (а) и одномерный срез поля $y = 100$ (б). Хорошо видно, что возникающая белковая структура представляет собой систему концентрических окружностей с центром в точке первоначального возмущения $x^* = 100$, $y^* = 100$. Предложенная модель отражает все основные особенности пространственной эволюции *N. crassa* в чашке Петри (см. фотографию на рис. 1): во-первых, фронт организма расширяется радиально во всех направлениях с постоянной скоростью, начиная с места, куда зародыш был помещен изначально (рис. 11а). Во-вторых, в течение «дня», то есть когда уровень белка FRQ доминирует над WCC , начинается процесс конидиирования. Условие того, будет происходить рост конидий или нет, определяется сразу же за фронтом распространения мицелия (рис. 11б). Положительное решение принимается, если уровень FRQ высокий («день»), в противном случае конидиирование не происходит («ночь»). После того, как дифференцирование клеток произошло (определились полосы конидиирования), изменения во внешнем облике организма уже не происходят, несмотря на продолжающиеся локальные периодические колебания протеина FRQ . На рисунке 10 видно, что по истечении 125 часов эволюции у нейроспоры сформировалось шесть полос конидий. В-третьих, в пространственной модели максимумы (минимумы) значений концентрации белка FRQ соответствуют минимумам (максимумам) уровня WCC – в полном соответствии с моделью (20)–(21), в которой исследовалась

только временная эволюция (рис. 11b). Период колебаний уровня белков в темноте составляет приблизительно 22.5 часа.

Обсуждение и заключение

В работе предложена математическая модель пространственно-временных циркадианных колебаний оранжевой хлебной плесени (лат. *N. crassa*). В модели предполагается, что механизм суточных ритмов нейроспоры имеет генетическое происхождение и основывается на динамическом взаимодействии белков *FRQ* и *WCC*, порождаемых одноименными генами. Основным компонентом механизма биоритмов, формирующим колебания, является эффект запаздывания синтеза белка в процессе транскрипции генов *frq* и *wc-1*. Стабильность генетических процессов, которые включают в себя транскрипцию и трансляцию, – один из важнейших факторов существования живой материи, так как именно посредством этого механизма осуществляется кодирование белков и передача генетической информации от клетки к клетке. Запаздывание в процессах транскрипции/трансляции является простейшим источником колебаний в генетической системе. По своей природе этот процесс обладает устойчивостью по отношению к флуктуациям, поэтому совершенно неудивительно, что механизм запаздывания может служить основной частью механизма циркадианных колебаний.

Предложенная в работе модель биоритмов нейроспоры на основе запаздывания является дальнейшим развитием существующих в литературе моделей. Есть несколько важных моментов, отличающих наш подход. Во-первых, наша модель построена не феноменологически, а напрямую выведена из цепочки биохимических реакций, происходящих при транскрипции генов. Именно поэтому тип нелинейности в петле положительной обратной связи отличается от моделей других авторов [Smolen et al, 2001; Smolen et al, 2003; Sriram, Gopinathan, 2004; Gillespie, 1977]. Кроме того, в нашей работе впервые было последовательно проведено стохастическое исследование свойств системы исходных биохимических реакций. Численные расчеты были произведены с помощью метода Гиллеспи, специально обобщенного нами на случай запаздывающих реакций [Bratsun et al, 2005a]. Выявлена зависимость относительной величины флуктуаций от факторов базальной транскрипции. Впервые было проведено исследование пространственно-временной динамики системы запаздывающих циркадных колебаний, которое продемонстрировало разнообразие и сложность возникающих колебательных режимов. Стоит отметить, что выявление в нашей работе волновых решений переключается с недавней работой [Danino et al, 2010], в которой была обнаружена пространственно-временная синхронизация биоритмов в колонии микроорганизмов, состоящей из кишечных палочек. В этой работе экспериментально показано, что волна синхронизации биочасов начинается из какой-то одной бактерии, а затем распространяется концентрически по всей колонии. Если такой уровень координации демонстрирует сообщество организмов, то внутри каждого организма тем более происходит синхронизация биоритмов отдельных клеток. Наша работа на примере *N. crassa* демонстрирует, как происходит эта синхронизация с помощью механизма обмена белками *FRQ* и *WCC*.

Кроме всего прочего, в работе предложен метод расчета пространственно-распределенных систем с запаздыванием по времени, который основан на хранении данных не всей предшествующей эволюции системы, а только нескольких опорных слоев. Значения полей для промежуточных моментов времени восстанавливаются путем интерполяции данных опорных слоев. Описываемая схема может быть адаптирована для решения широкого круга задач с запаздыванием.

Авторы благодарны Л. Цимрингу, Д. Н. Вольфсону, Д. Хасту и С. Броди за многочисленные и плодотворные обсуждения темы данной работы.

Список литературы

- Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L.* Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation // PNAS, 2005a. – V. 102, N. 41. – P. 14593–14598.
- Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L.* Non-Markovian processes in Gene Regulation // Noise in Complex Systems and Stochastic Dynamics III / edited by Laszlo B.Kish, Katja Lindenberg, Zoltan Gingl, Proceeding of SPIE, 2005b. – V. 5845. – P. 210–219.
- Danino T., Mondragon-Palomino O., Tsimring L., Hasty J.* A synchronized quorum of genetic clocks // Nature, 2010. – V. 423. – P. 326–330.
- Dunlap J. C.* Genetics and molecular analysis of circadian rhythms // Annu. Rev. Genet., 1996. – V. 30. – P. 579–601.
- Dunlap J. C.* Molecular bases for circadian clocks // Cell, 1999. – V. 96. – N. 2. – P. 271–290.
- François P.* A Model for the Neurospora Circadian Clock // Biophys. J., 2005. – V. 88. – N. 4, P. 2369–2383.
- Froehlich A. C., Liu Y., Loros J. J., Dunlap J. C.* White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter // Science, 2002. – V. 297. – P. 815–819.
- Froehlich A. C., Loros J. J., Dunlap J. C.* Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY // PNAS, 2003. – V. 100. – N. 10, P. 5914–5919.
- Galagan J. E., Calvo S. E., Borkovich K. A., et al.* The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa* // Nature, 2003. – V. 422. – P. 859–868.
- Gillespie D. T.* Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions // J. Phys. Chem., 1977. – Vol. 81. – P. 2340–2361.
- Hasty J., Collins J. J.* Translating the noise // Nature Genetics, 2002. – V.31. – P. 13–14.
- He Q., Cheng P., Yang Y., He Q., Yu H., Liu Y.* FWD1-mediated degradation of FRQ in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation // Embo. J., 2003. – V. 22. – N.17. – P. 4421–4430.
- Lakin-Thomas P. L., Brody S.* Circadian rhythms in microorganisms: New complexities // Annu. Rev. Microbiol., 2004. – V. 58. – P. 489–519.
- Lakin-Thomas P. L., Cote G. G., Brody S.* Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: biochemistry and genetics // Crit. Rev. Microbiol., 1990. – V. 17. – N. 5. – P. 365–416.
- Lee K., Loros J. J., Dunlap J. C.* Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system // Science, 2000. – V. 289. – N. 5476. – P. 107–110.
- Lema M. A., Golombek D. A., Echave J.* Delay model of the circadian pace maker // J. Theor. Biol., 2000. – V. 204. – P. 565–573.
- Liu Y., Loros J., Dunlap J. C.* Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock // PNAS, 2000. – V. 97. – N. 1. – P. 234–239.
- Loros J. J., Dunlap J. C.* Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora* // Annu. Rev. Physiol., 2001. – V. 63. – P. 757–794.
- Neurospora crassa* genome – Broad Institute –
<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/GenomesIndex.html>
- Pittendrigh C. S., Bruce V. G., Rosensweig N. S., Rubin M. L.* A biological clock in *Neurospora* // Nature, 1959. – V. 184. – P. 169–170.
- Pittendrigh, C. S.* Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher // Annu. Rev. Physiol., 1993. – V.55. – P. 16–54.

- Rao C. V., Arkin A. P. Stochastic chemical kinetics and the quasi-steady-state assumption: Application to the Gillespie algorithm // J. Chem. Phys., 2003. – Vol. 118. – P. 4999–5010.
- Schepper T., Klinkerberg D., Pennartz C., Van Pelt J. A mathematical model for the intracellular circadian rhythm generator // J. Neurosci., 1999. – V. 19. – P. 40–47.
- Smolen P., Baxter D. A., Byrne J. H. Modeling circadian oscillations with interlocking positive and negative feedback loops // J. Neurosci., 2001. – V. 21. – N. 17. – P. 6644–6656.
- Smolen P., Baxter D. A., Byrne J. H. Reduced models of the circadian oscillators in *Neurospora crassa* and *Drosophila melanogaster* illustrate mechanistic similarities // OMICS, 2003. – V. 7. – N. 4. – P. 337–354.
- Sriram K., Gopinathan M. S. A two variable delay model for the circadian rhythm of *Neurospora crassa* // J. Theor. Biol., 2004. – Vol. 231. – P. 23–38.
- Swain P., Elowitz M., Siggia E. Intrinsic and Extrinsic contributions to stochasticity in gene expression // PNAS, 2002. – Vol. 99. – P. 12795–12800.
- Sweeney, B. M. Circadian rhythms, definition and general characterization. // The Molecular Basis of Circadian Rhythms. / edited J. W. Hastings and H.-G. Schweiger. Berlin, Dahlem Konferenzen, 1976. – P. 77–83.
- Соколовский В. Ю., Белозерская Т. А. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* // Успехи биологической химии, 2000. – Т.40. – С. 85–152.