

УДК: 517.958:57

Репрессилятор с запаздывающей экспрессией генов. Часть I. Детерминистское описание

Д. А. Брацун^а, Е. С. Лоргов, А. О. Полуянов

Пермский национальный исследовательский политехнический университет,
Россия, 614990, г. Пермь, ул. Профессора Поздеева, д. 11, к. В

E-mail: ^а DABracun@pstu.ru

Получено 19.03.2018, после доработки — 20.03.2018.

Принято к публикации 26.03.2018.

Репрессилятором называют первую в синтетической биологии генную регуляторную сеть, искусственно сконструированную в 2000 году. Он представляет собой замкнутую цепь из трех генетических элементов — *lacI*, *λcI* и *tetR*, — которые имеют естественное происхождение, но в такой комбинации в природе не встречаются. Промотор каждого гена контролирует следующий за ним цистрон по принципу отрицательной обратной связи, подавляя экспрессию соседнего гена. В данной работе впервые рассматривается нелинейная динамика модифицированного репрессилятора, у которого имеются запаздывания по времени во всех звеньях регуляторной цепи. Запаздывание может быть как естественным, т. е. возникать во время транскрипции/трансляции генов в силу многоступенчатого характера этих процессов, так и искусственным, т. е. специально вноситься в работу регуляторной сети с помощью методов синтетической биологии. Предполагается, что регуляция осуществляется протеинами в димерной форме. Рассмотренный репрессилятор имеет еще две важные модификации: расположение на той же плазмиде гена *gfp*, кодирующего флуоресцентный белок, а также наличие в системе накопителя для белка, кодируемого геном *tetR*. В рамках детерминистского описания методом разложения на быстрые и медленные движения получена система нелинейных дифференциальных уравнений с запаздыванием на медленном многообразии. Показано, что при определенных значениях управляющих параметров единственное состояние равновесия теряет устойчивость колебательным образом. Для симметричного репрессилятора, у которого все три гена идентичны, получено аналитическое решение для нейтральной кривой бифуркации Андронова–Хопфа. Для общего случая асимметричного репрессилятора нейтральные кривые построены численно. Показано, что асимметричный репрессилятор является более устойчивым, так как система ориентируется на поведение наиболее стабильного элемента в цепи. Изучены нелинейные динамические режимы, возникающие в репрессиляторе при увеличении надкритических значений управляющих параметров. Кроме предельного цикла, отвечающего поочередным релаксационным пульсациям белковых концентраций элементов, в системе обнаружено существование медленного многообразия, не связанного с этим циклом. Долгоживущий переходный режим, который отвечает многообразию, отражает процесс длительной синхронизации пульсаций в работе отдельных генов. Производится сравнение полученных результатов с известными из литературы экспериментальными данными. Обсуждается место предложенной в работе модели среди других теоретических моделей репрессилятора.

Ключевые слова: репрессилятор, запаздывание, колебания, генная регуляция, синтетическая биология

UDC: 517.958:57

Repressilator with time-delayed gene expression. Part I. Deterministic description

D. A. Bratsun^a, E. S. Lorgov, A. O. Poluyanov

Perm National Research Polytechnic University,
11B Professor Pozdeev st., Perm, 614990, Russia

E-mail: DABracun@pstu.ru

Received 19.03.2018, after completion — 20.03.2018.

Accepted for publication 26.03.2018.

The repressor is the first genetic regulatory network in synthetic biology, which was artificially constructed in 2000. It is a closed network of three genetic elements — *lacI*, *λcl* and *tetR*, — which have a natural origin, but are not found in nature in such a combination. The promoter of each of the three genes controls the next cistron via the negative feedback, suppressing the expression of the neighboring gene. In this paper, the nonlinear dynamics of a modified repressilator, which has time delays in all parts of the regulatory network, has been studied for the first time. Delay can be both natural, i.e. arises during the transcription/translation of genes due to the multistage nature of these processes, and artificial, i.e. specially to be introduced into the work of the regulatory network using synthetic biology technologies. It is assumed that the regulation is carried out by proteins being in a dimeric form. The considered repressilator has two more important modifications: the location on the same plasmid of the gene *gfp*, which codes for the fluorescent protein, and also the presence in the system of a DNA sponge. In the paper, the nonlinear dynamics has been considered within the framework of the deterministic description. By applying the method of decomposition into fast and slow motions, the set of nonlinear differential equations with delay on a slow manifold has been obtained. It is shown that there exists a single equilibrium state which loses its stability in an oscillatory manner at certain values of the control parameters. For a symmetric repressilator, in which all three genes are identical, an analytical solution for the neutral Andronov–Hopf bifurcation curve has been obtained. For the general case of an asymmetric repressilator, neutral curves are found numerically. It is shown that the asymmetric repressor generally is more stable, since the system is oriented to the behavior of the most stable element in the network. Nonlinear dynamic regimes arising in a repressilator with increase of the parameters are studied in detail. It was found that there exists a limit cycle corresponding to relaxation oscillations of protein concentrations. In addition to the limit cycle, we found the slow manifold not associated with above cycle. This is the long-lived transitional regime, which reflects the process of long-term synchronization of pulsations in the work of individual genes. The obtained results are compared with the experimental data known from the literature. The place of the model proposed in the present work among other theoretical models of the repressilator is discussed.

Keywords: repressilator, time delay, oscillations, gene regulation, synthetic biology

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 241–259 (Russian).

1. Введение

После появления в биологии экспериментальных технологий, позволяющих наблюдать и проводить точные измерения величин, участвующих в молекулярно-генетических процессах, появились предпосылки для развития биологии как точной науки, широко использующей математическое описание как для моделирования известных эффектов, так и для предсказания еще неизвестных явлений, возникающих при генной регуляции. Например, важным этапом было выделение в 90-е годы прошлого века зеленого флуоресцентного белка GFP, ген которого в настоящее время широко используется в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков [Prasher et al., 1992]. Таким образом, биология переживает важный этап своего развития и из описательной дисциплины всё более становится точной наукой. Похожий путь проделала физика три сотни лет назад, во времена Исаака Ньютона. Одним из важнейших следствий указанного переворота явилось возникновение синтетической биологии, которая началась с работы [Elowitz, Leibler, 2000]. Авторы теоретически смоделировали, а затем экспериментально сконструировали плазмиду из трех разных генов, которые в естественных условиях в такой комбинации не встречаются. Контур был сконфигурирован таким образом, что белок каждого гена ингибировал экспрессию следующего за ним соседа. Один из генов ингибировал также экспрессию гена, расположенного на отдельной плазмиде и кодирующего флуоресцентный белок GFP. Простые оценки показывали, что здесь могли возникнуть колебания. В недавнем комментарии Эловиц отметил, что изначально казалось почти невероятным, что искусственная схема заработает, как задумано, так как большинство значений биохимических параметров (скорости протекающих реакций) были неизвестны [Gao, Elowitz, 2016]. Однако успех работы показал, что таким путем действительно возможно конструировать искусственные схемы с предписанной динамической генной регуляцией, что и стало предметом синтетической биологии [Hasty et al., 2001]. В последующие годы экспериментально и теоретически были изучены различные динамические эффекты в синтетических генных цепях. В работах [Friedland et al., 2009; Daniel et al., 2013] было показано, что искусственные цепи могут производить простейшие арифметические вычисления и выдавать значения элементарных функций. Логические операции в синтетических цепях исследовались в [Bonnet et al., 2013]. Выделение границ поля изображения, образованного бактериями с синтетическими вставками в геноме, изучалось в [Tabor et al., 2009]. Значительная литература посвящена изучению колебаний. Были предложены и реализованы экспериментально альтернативные, более сложные по сравнению с репрессилиатором, схемы осцилляторов [Fung et al., 2005; Stricker et al., 2008; Tigges et al., 2009]; показано, что точность молекулярных часов репрессилиатора может быть существенно улучшена за счет простых усовершенствований схемы [Potvin-Trottier et al., 2016]; указаны новые эффекты при численном моделировании модели репрессилиатора [Лихошвай и др., 2010]; исходная модель репрессилиатора была усложнена дополнительными связями в контуре и численно изучена [Волков, Журов, 2013], исследованы ансамбли взаимодействующих репрессилиаторов [Ullner et al., 2007; Потапов, Волков, 2010], обнаружены пространственные волны активности в клеточных ансамблях [Danino et al., 2010]. Последняя работа интересна также тем, что колебания были заданы путем искусственного внесения запаздывания в синтетическую цепь, разработанную авторами. Запаздывающие осцилляторы имитировали в каждой бактерии работу её биологических часов, а транспортный белок осуществлял глобальную координацию поведения всей колонии. В результате было обнаружено спонтанное возникновение бегущих концентрических волн свечения GFP в колонии бактерий. Чуть ранее было показано, что и в модель репрессилиатора в эксперименте также может быть внесено запаздывание [Prindle, 2009]. Однако эта работа, оформленная в виде магистерской диссертации, не имела своего продолжения.

В последние годы вопросы запаздывания в процессах генной регуляции вызывают все больший интерес. Стоит отметить, что процессы экспрессии генов, вообще говоря, состоят из многоэтапных реакций, в ходе которых последовательно образуются ансамбли сложных орга-

нических соединений. Таким образом, эти процессы распределены по пространству, растянуты по времени и идут с неким характерным временем запаздывания. Строго говоря, эти процессы уже не могут считаться Марковскими [Лихошвай и др., 2003; Bratsun et al., 2005a; Bratsun et al., 2005b; Брацун, 2011]. Если время запаздывания мало по сравнению со всеми остальными характерными временами в системе, этими эффектами можно пренебречь. В этом случае запаздывание не оказывает влияние на состояние квазиравновесия, сложившееся в системе. Однако если времена запаздывания одного порядка величины с другими процессами (быстрыми или медленными) или обратная связь сильная, то эффекты запаздывания не могут больше игнорироваться. Интересно отметить, что природа успешно использует механизм запаздывания для установления робастных и достаточно точных по периоду и амплитуде колебаний, с помощью которых регулируется жизнедеятельность организма. Факт сильно запаздывающих биохимических реакций во время генной экспрессии был установлен при исследовании естественных циркадианных ритмов у различных микроорганизмов (например, нейроспоры (лат. *Neurospora Crassa*) и дрозофилы (лат. *Drosophila*) [Denault et al., 2001]) и интенсивно изучался в рамках различных математических моделей [Sriram, Gopinathan, 2004; Брацун, Захаров, 2011; Захаров, Брацун, 2013]. Эти модели с запаздыванием были использованы, например, для описания возникновения карциномы за счет локального сбоя синхронизации циркадианных ритмов в клетках [Брацун и др., 2014; Bratsun et al., 2016a; Bratsun et al., 2016b]. Более математически формальная постановка задачи о запаздывании при генной регуляции рассматривалась в работах [Лихошвай и др., 2003; Демиденко и др., 2004], в которых было введено понятие гипотетической генной сети (ГГС) и рассмотрены свойства ансамблей таких цепей.

Данная работа открывает серию из двух статей, в которых свойства классического репрессилатора рассматриваются с учетом запаздывания в его контурах отрицательной обратной связи. До сих пор не очень понятно, есть ли какое-то запаздывание в процессах генной регуляции репрессилатора *in vivo*. Модель колебаний, предложенная авторами репрессилатора, запаздывание не содержала [Elowitz, Leibler, 2000]. Однако даже если в исходной схеме Эловица и Лейблера запаздывание не существенно, то экспериментальные технологии, продемонстрированные в более поздних работах [Prindle, 2009; Danino et al., 2010], однозначно свидетельствуют, что запаздывающий репрессилатор может быть сконструирован в рамках методов и подходов синтетической биологии, а значит, его свойства должны быть исследованы *in silico*. Первая часть работы посвящена детерминистскому описанию процессов генной регуляции в запаздывающем репрессилаторе. Предложена математическая модель, которая выводится из исходных биохимических реакций. Полученная динамическая система исследуется как аналитически, так и численно. Производится сравнение с экспериментальными данными и результатами, полученными в рамках других моделей.

2. Вывод математической модели репрессилатора с запаздыванием

Схема регуляторной цепи репрессилатора [Elowitz, Leibler, 2000] с учетом важных модификаций, предложенных в работе [Potvin-Trottier et al., 2016], представлена на рис. 1. Как следует из рисунка, плазмид репрессилатора включает в себя четыре цистрона. Первый цистрон содержит ген *tetR-lite* (ген и его промоторы отмечены на схеме синим цветом), который находится под управлением промотора *lac* гена *lacI-lite* (оба отмечены на схеме желтым цветом), выступающего в качестве репрессора. При экспрессии *tetR-lite* синтезируется соответствующий белок, который для краткости будем обозначать как X. Белок X димеризуется и в этом виде может выполнять три функции. Во-первых, через промотор он может служить репрессором для гена *lacI-lite* (отмечен на схеме красным цветом). Во-вторых, он также репрессирует экспрессию флуоресцентного белка GFP (выделен зеленым цветом). В исходной версии репрессилатора 2000 года ген *gfp-aav*, кодирующий GFP, был размещен на отдельной плазмиде. Как было продемонстрировано недавно [Potvin-Trottier et al., 2016], это приводит к возникновению сильных флуктуаций в работе репрессилатора из-за удаленной регуляции. Поэтому

в новой версии ген, кодирующий сигнальный белок, был перенесен на ту же самую плазмиду, где располагаются основные игроки репрессилятора (второй цистрон). В-третьих, димеры белка X могут связываться с оператор-сайтами специального РНК накопителя (синее кольцо в центре схемы). Это второе важное усовершенствование репрессилятора, которое приводит к тому, что белок X скорее накапливается в системе, чем деградирует, а цепь с оператор-сайтами выступает как хранилище для белка, кодируемого геном *tetR-lite*. Это было сделано для того, чтобы поддержать концентрацию белка X, который в обычных условиях сильно деградирует при регуляции. Ген *λcl-lite*, находящийся под контролем промотора *tetR*, входит в состав третьего цистрона и кодирует белок, концентрацию которого будем обозначать как Z. Как видно на схеме, четвертый цистрон содержит ген *lacI-lite*, находящийся под контролем промотора λ репрессора. Белок, кодируемый последним геном, будем обозначать как Y. Таким образом, круг замыкается. Основное ядро репрессилятора, определяющее его временную динамику, составлено тремя генами, которые связаны между собой через промоторы отрицательной обратной связи.

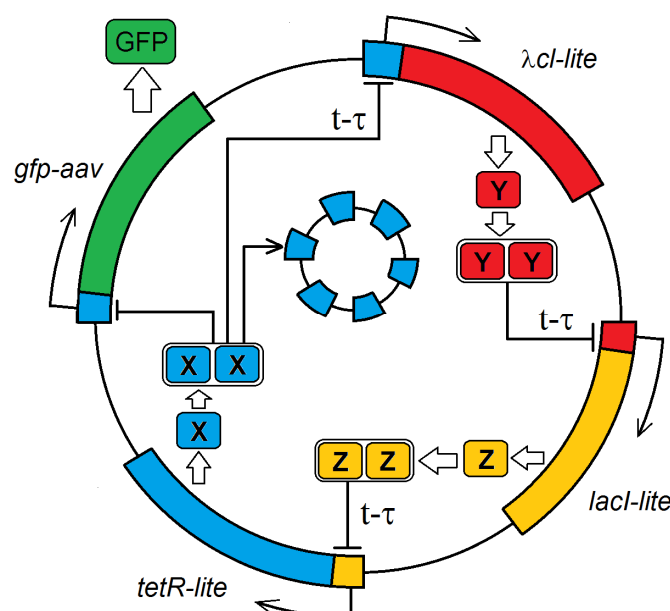


Рис. 1. Схематическое изображение генной сети репрессилятора с запаздыванием. Цветная версия рисунка доступна в электронной версии статьи на сайте журнала

Перечислим основные допущения, которые используются при выводе модели:

- регуляция репрессилятора осуществляется только димерной формой белка;
- промотор каждого гена может регулировать экспрессию одного другого гена (исключением является ген *tetR-lite*, который регулирует экспрессию двух генов, но второй ген кодирует флуоресцентный белок, который не влияет на принципиальную схему функционирования репрессилятора);
- отрицательная обратная связь является запаздывающей для любой пары генов, причем время запаздывания, вообще говоря, предполагается разным (опять же для простоты будем полагать, что регуляция экспрессии флуоресцентного белка не является запаздывающей);
- любое время запаздывания много больше остальных характерных времен, определяющих нелинейную динамику репрессилятора;
- оставшиеся динамические процессы в репрессиляторе можно разбить на быстрые и медленные, ограничившись двумя характерными временными масштабами.

Таблица 1. Список реакций при генной регуляции репрессилатора с запаздыванием (рис. 1)

1	Димеризация белков X, Y, Z
	$X + X \xrightarrow{k_1^X} X_2, \quad Y + Y \xrightarrow{k_1^Y} Y_2, \quad Z + Z \xrightarrow{k_1^Z} Z_2$
2	Дедимеризация белков X, Y, Z
	$X_2 \xrightarrow{k_{-1}^X} X + X, \quad Y_2 \xrightarrow{k_{-1}^Y} Y + Y, \quad Z_2 \xrightarrow{k_{-1}^Z} Z + Z$
3	Связывание димера репрессора с оператор-сайтом
	$D_0^X + Z_2 \xrightarrow{k_2^X} D_1^X, \quad D_0^Y + X_2 \xrightarrow{k_2^Y} D_1^Y, \quad D_0^Z + Y_2 \xrightarrow{k_2^Z} D_1^Z$
4	Освобождение димером репрессора оператор-сайта
	$D_1^X \xrightarrow{k_{-2}^X} D_0^X + Z_2, \quad D_1^Y \xrightarrow{k_{-2}^Y} D_0^Y + X_2, \quad D_1^Z \xrightarrow{k_{-2}^Z} D_0^Z + Y_2$
5	Синтез белков X, Y, Z при открытом оператор-сайте, протекающий с запаздыванием
	$D_0^X(t) \xrightarrow{A_X} D_0^X + X^{t+\tau_X}, \quad D_0^Y(t) \xrightarrow{A_Y} D_0^Y + Y^{t+\tau_Y}, \quad D_0^Z(t) \xrightarrow{A_Z} D_0^Z + Z^{t+\tau_Z}$
6	Деградация белков X, Y, Z
	$X \xrightarrow{B_X} \emptyset, \quad Y \xrightarrow{B_Y} \emptyset, \quad Z \xrightarrow{B_Z} \emptyset$
7	Регуляция экспрессии гена, кодирующего флуоресцентный белок GFP
	$D_0^G + X_2 \xrightarrow{k_2^G} D_1^G, \quad D_1^G \xrightarrow{k_{-2}^G} D_0^G + X_2, \quad D_0^G \xrightarrow{A_G} D_0^G + G, \quad G \xrightarrow{B_G} \emptyset$
8	Динамика оператор-сайтов хранилища димеров белка X
	$D_0^S + X_2 \xrightarrow{k_2^S} D_1^S, \quad D_1^S \xrightarrow{k_{-2}^S} D_0^S + X_2$

Учитывая сделанные выше замечания, полный список биохимических реакций, протекающих при работе репрессилатора, приведен в таблице 1. Соответствующие скорости реакций указаны над стрелками.

Наличие оператор-сайтов в таблице 1 учтено с помощью введения специальной дискретной функции $D \in \{D_0, D_1\}$, которая может принимать 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. В случае связывания димера репрессора оператор-сайт закрывается, и транскрипция гена не происходит. Таким образом, в системе реализуется отрицательная обратная связь.

Рассмотрим подробнее для примера общую схему вывода модельных уравнений для динамики белка X. Кинетические уравнения, записанные на основании цепочки реакций из таблицы 1, имеют вид

$$\frac{dx}{dt} = -2k_1^X x^2 + 2k_{-1}^X x_2 + A d_0^X (t - \tau_X) - B_X x, \quad (1)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_1^X x^2 - k_{-1}^X x_2 + k_2^Y d_1^Y - k_2^Y d_0^Y x_2 + k_{-2}^G d_1^G - k_2^G d_0^G x_2 + \sum_{i=1}^m k_{-2}^S d_{1i}^S - \sum_{i=1}^m k_2^S d_{0i}^S x_2, \quad (2)$$

$$\frac{dd_0^Y}{dt} = -k_2^Y d_0^Y x_2 + k_{-2}^Y d_1^Y, \quad (3)$$

$$\frac{dd_1^Y}{dt} = k_2^Y d_0^Y x_2 - k_{-2}^Y d_1^Y, \quad (4)$$

$$\frac{dd_0^G}{dt} = -k_2^G d_0^G x_2 + k_{-2}^G d_1^G, \quad (5)$$

$$\frac{dd_1^G}{dt} = k_2^G d_0^G x_2 - k_{-2}^G d_1^G, \quad (6)$$

$$\frac{dd_{0i}^S}{dt} = -k_2^S d_{0i}^S x_2 + k_{-2}^S d_{1i}^S, \quad i = \overline{1, m}, \quad (7)$$

$$\frac{dd_{1i}^S}{dt} = k_2^S d_{0i}^S x_2 - k_{-2}^S d_{1i}^S, \quad i = \overline{1, m}, \quad (8)$$

где $x(t)$ и $x_2(t)$ — непрерывные функции времени, обозначающие соответственно концентрации белка X в мономерной и димерной форме. Уравнения для динамики мономеров (1) записано с учетом запаздывания синтеза белка X . Уравнение динамики димеров (2) включает в себя три возможных канала активности димеров: связывание с оператор-сайтом гена *λcl-lite* (определяется скоростью реакции k_2^Y), связывание с оператор-сайтом гена *gfp-aav* (скорость реакции k_2^G) и, наконец, связывание с оператор-сайтами ДНК-накопителя (скорости реакции k_2^S). В последнем случае принято во внимание, что мест для связывания на плазмиде хранилища несколько, их число определяется параметром m . Для простоты будем считать, что все оператор-сайты хранилища имеют одинаковые характеристики. Уравнения (3)–(8) записаны для функций времени $d_0(t)$ и $d_1(t)$, которые являются непрерывными аналогами D_0 , D_1 и определяют динамику соответствующих оператор-сайтов (верхний индекс определяет принадлежность оператор-сайта конкретному гену).

Примем во внимание далее, что реакции (1)–(8) протекают с разными скоростями. Реакции синтеза и деградации белков задают в системе медленно меняющуюся динамику, на фоне которой реакции димеризации, дедимеризации и управления оператор-сайтом протекают стремительно, а участвующие в них реагенты быстро достигают состояния статистического равновесия. Это позволяет произвести разделение динамики системы на быструю и медленную составляющие. Целью является получение уравнений движения в фазовом пространстве на медленном многообразии системы. Вообще говоря, последовательная процедура усреднения может быть проведена методом многих временных масштабов, но в системе (1)–(8) можно сделать проще, приравняв к нулю соответствующие производные по времени в левых частях уравнений (2)–(8). Таким образом, приходим к соотношениям

$$x_2 = \frac{k_1^X}{k_{-1}^X} x^2, \quad d_1^Y = \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} d_0^Y x^2, \quad d_1^G = \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} d_0^G x^2, \quad d_{1i}^S = \frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} d_{0i}^S x^2. \quad (9)$$

К уравнениям (9) следует добавить соотношения

$$d_0^Y + d_1^Y = 1, \quad d_0^G + d_1^G = 1, \quad d_{0i}^S + d_{1i}^S = 1, \quad i = \overline{1, m}, \quad (10)$$

в которых предполагается, что числа копирования при экспрессии генов во всех случаях равны 1, т. е. при одном акте транскрипции синтезируется один мономер белка. Решая (9) и (10) совместно для каждого оператор-сайта, получим выражения для средних значений открытости оператор-сайта (т. е. отсутствия связывания с димером X):

$$d_0^Y = \frac{1}{1 + \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2}, \quad d_0^G = \frac{1}{1 + \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2}, \quad d_{0i}^S = \frac{1}{1 + \frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} x^2}, \quad i = \overline{1, m}. \quad (11)$$

Для замыкания системы уравнений необходимо написать уравнения для полного количества молекул белка в мономерной форме для каждого типа. Например, для X это выражение будет иметь самый длинный вид, так как этот белок больше других участвует в генной регуляции репрессилатора:

$$x_{all} = x + 2 \frac{k_1^X}{k_{-1}^X} x^2 + 2 \frac{\frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2}{1 + \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2} + 2 \frac{\frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2}{1 + \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2} + 2m \frac{\frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} x^2}{1 + \frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} x^2}, \quad (12)$$

где первое слагаемое в правой части определяет количество молекул X в мономерной форме, второе — общее количество свободных димеров X (два мономера в одной молекуле димера), третье — количество димеров, связанных с оператор-сайтом гена *lacI-lite*, четвертое — количество димеров, связанных с оператор-сайтом гена *gfp-aav*, пятое — количество димеров, связанных с сайтами РНК-накопителя. В общем случае третье и четвертое слагаемые малы по сравнению с первым и вторым, и ими можно пренебречь. Что касается последнего слагаемого, то оно может быть не малым, это зависит от количества сайтов в хранилище.

Проводя описанную выше процедуру для остальных белков в репрессилаторе, приходим к следующей системе дифференциальных уравнений с запаздыванием:

$$\left(1 + 4\varepsilon_X x + \frac{4m\varepsilon_X \delta_S x}{(1 + \varepsilon_X \delta_S x^2)^2}\right) \frac{dx}{dt} = \frac{A_X}{1 + \varepsilon_Z \delta_Z x^2 (t - \tau_X)} - B_X x, \quad (13)$$

$$(1 + 4\varepsilon_Y y) \frac{dy}{dt} = \frac{A_Y}{1 + \varepsilon_X \delta_X y^2 (t - \tau_Y)} - B_Y y, \quad (14)$$

$$(1 + 4\varepsilon_Z z) \frac{dz}{dt} = \frac{A_Z}{1 + \varepsilon_Y \delta_Y z^2 (t - \tau_Z)} - B_Z z, \quad (15)$$

$$\frac{dg}{dt} = \frac{A_G}{1 + \varepsilon_X \delta_G x^2} - B_G g, \quad (16)$$

где введены следующие обозначения:

$$\varepsilon_X = \frac{k_1^X}{k_{-1}^X}, \quad \varepsilon_Y = \frac{k_1^Y}{k_{-1}^Y}, \quad \varepsilon_Z = \frac{k_1^Z}{k_{-1}^Z},$$

$$\delta_X = \frac{k_2^X}{k_{-2}^X}, \quad \delta_Y = \frac{k_2^Y}{k_{-2}^Y}, \quad \delta_Z = \frac{k_2^Z}{k_{-2}^Z}, \quad \delta_G = \frac{k_2^G}{k_{-2}^G}, \quad \delta_S = \frac{k_2^S}{k_{-2}^S}. \quad (17)$$

Динамическая система (13)–(16) представляет собой три связанных друг с другом дифференциальных уравнения (13)–(15) и уравнение (16), описывающее динамику сигнального белка GFP. Модель, которую предложили сами авторы репрессилатора [Elowitz, Leibler, 2000], состояла из шести уравнений, три из которых отвечают за описание динамики белков, а другие три описывают динамику мРНК (в обозначениях авторов):

$$\frac{dm_i}{dt} = -m_i + \frac{\alpha}{1 + p_j^2} + \alpha_0, \quad (18)$$

$$\frac{dp_i}{dt} = -\beta(p_i - m_i), \quad (19)$$

где $i = \{lacI, tetR, cI\}$, а $j = \{cI, lacI, tetR\}$, α , α_0 и β — константы. Здесь m_i и p_i — концентрации белка и мРНК соответственно. Модель (18)–(19) явно учитывает, что процесс экспрессии гена включает стадию трансляции белка, где мРНК выступает промежуточным продуктом. Введение запаздывания, которое подразумевает протекание многоэтапных реакций, в ходе которых последовательно образуются ансамбли сложных соединений (в том числе мРНК), позволяет понизить порядок системы вдвое (если не принимать во внимание уравнение (16) для флуоресцентного белка, которое в модели [Elowitz, Leibler, 2000] отсутствовало). Кроме новых возможных динамических эффектов за счет запаздывания, в системе (13)–(16) более точно прописан баланс в системе белковых молекул, что находит свое выражение в префакторах в левой части уравнений. Префакторы не влияют на число и расположение состояний равновесия в системе, но, как будет показано далее, имеют принципиальное влияние на их устойчивости и временную динамику системы.

3. Анализ линейной устойчивости

Система (13)–(16) допускает стационарное решение $\{x^*, y^*, z^*, g^*\}$, которое определяется приравниванием правых частей уравнений к нулю:

$$\begin{aligned} A_X - B_X x^* (1 + \varepsilon_Z \delta_X z^{*2}) &= 0, & A_Y - B_Y y^* (1 + \varepsilon_X \delta_Y x^{*2}) &= 0, \\ A_Z - B_Z z^* (1 + \varepsilon_Y \delta_Z y^{*2}) &= 0, & A_G - B_G g^* (1 + \varepsilon_X \delta_G x^{*2}) &= 0. \end{aligned} \quad (20)$$

Смысл имеют только решения для положительных значений концентраций. Стоит отметить, что нулевое стационарное решение в (20) априори отсутствует, т. е., даже если приравнять все начальные концентрации белков к нулю, в системе должен развиваться нетривиальный динамический режим.

Линеаризация уравнений (13)–(16) около стационарного решения (20) приводит к системе линейных дифференциальных уравнений с запаздыванием, решение которой будем искать в следующем виде:

$$\begin{pmatrix} x(t) \\ y(t) \\ z(t) \\ g(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \\ \varsigma \\ \gamma \end{pmatrix} e^{\lambda t}, \quad (21)$$

где λ — инкремент неустойчивости.

Тогда получим систему из четырех алгебраических линейных уравнений:

$$\lambda \left(1 + 4\varepsilon_X x^* + \frac{4m\varepsilon_X \delta_S x^*}{(1 + \varepsilon_X \delta_S x^{*2})^2} \right) \alpha + B_X \alpha + \frac{2A_X \varepsilon_Z \delta_X z^*}{(1 + \varepsilon_Z \delta_X z^{*2})^2} \varsigma e^{-\lambda \tau_X} = 0, \quad (22)$$

$$\lambda (1 + 4\varepsilon_Y y^*) \beta + B_Y \beta + \frac{2A_Y \varepsilon_X \delta_Y x^*}{(1 + \varepsilon_X \delta_Y x^{*2})^2} \alpha e^{-\lambda \tau_Y} = 0, \quad (23)$$

$$\lambda (1 + 4\varepsilon_Z z^*) \varsigma + B_Z \varsigma + \frac{2A_Z \varepsilon_Y \delta_Z y^*}{(1 + \varepsilon_Y \delta_Z y^{*2})^2} \beta e^{-\lambda \tau_Z} = 0, \quad (24)$$

$$(\lambda + B_G) \gamma + \frac{2A_G \varepsilon_X \delta_G x^*}{(1 + \varepsilon_X \delta_G x^{*2})^2} \alpha = 0. \quad (25)$$

Уравнение (25) отщепляется от системы и не влияет на порог устойчивости. Условие разрешимости, записанное для (22)–(24), приводит к следующему выражению:

$$\begin{aligned} & \left(\lambda \left(1 + 4\varepsilon_X x^* + \frac{4m\varepsilon_X \delta_S x^*}{(1 + \varepsilon_X \delta_S x^{*2})^2} \right) + B_X \right) \left(\lambda (1 + 4\varepsilon_Y y^*) + B_Y \right) \left(\lambda (1 + 4\varepsilon_Z z^*) + B_Z \right) + \\ & + \frac{8A_X A_Y A_Z \varepsilon_X \varepsilon_Y \varepsilon_Z \delta_X \delta_Y \delta_Z x^* y^* z^*}{(1 + \varepsilon_X \delta_Y x^{*2})^2 (1 + \varepsilon_Y \delta_Z y^{*2})^2 (1 + \varepsilon_Z \delta_X z^{*2})^2} e^{-\lambda(\tau_X + \tau_Y + \tau_Z)} = 0. \end{aligned} \quad (26)$$

Прежде всего, покажем, что стационарное решение $\{x^*, y^*, z^*, g^*\}$ абсолютно устойчиво по отношению к монотонным возмущениям. Положим $\lambda = 0$ в (26), а также, проводя несложные преобразования с использованием соотношений (20), получим

$$\frac{8B_X B_Y B_Z \varepsilon_X \varepsilon_Y \varepsilon_Z \delta_X \delta_Y \delta_Z x^* y^* z^*}{A_X A_Y A_Z} = -1. \quad (27)$$

Если учитывать, что все величины слева в (27) положительные, это выражение в принципе не может быть удовлетворено. Это означает, что бифуркации в простом собственном значении

отсутствуют в спектре состояния равновесия, задаваемого (20). Единственной возможностью для системы раскачать неустойчивость остается бифуркация Андронова–Хопфа, которая фиксируется в спектре при одновременном переходе через мнимую ось комплексно-сопряженной пары значений инкремента неустойчивости.

Решение уравнения (26) в общем случае может быть получено только численно. Однако в частном случае симметричного репрессилатора, который состоит из трех идентичных по параметрам генов, можно получить аналитическое решение для нейтральной кривой устойчивости. Положим

$$\begin{aligned}\varepsilon_X = \varepsilon_Y = \varepsilon_Z \equiv \varepsilon, \quad \delta_X = \delta_Y = \delta_Z \equiv \delta, \quad \tau_X = \tau_Y = \tau_Z \equiv \tau, \\ A_X = A_Y = A_Z \equiv A, \quad B_X = B_Y = B_Z \equiv B, \quad m = 0.\end{aligned}\quad (28)$$

Если выполняется (28), то единственное состояние равновесия (20) должно быть равноудалено от осей фазового пространства, поэтому логично предположить, что

$$x^* = y^* = z^* \equiv X^*. \quad (29)$$

Тогда система (20) сводится к одному уравнению третьей степени:

$$\varepsilon \delta B X^{*3} + B X^* - A = 0, \quad (30)$$

которое определяет единственное действительное решение. Уравнение (26) в симметричном случае (28) может быть преобразовано к следующему виду:

$$(\lambda(1 + 4\varepsilon X^*) + B)^3 e^{3\tau\lambda} + 8 \frac{B^6}{A^3} \varepsilon^3 \delta^3 X^{*9} = 0, \quad (31)$$

при получении которого было использовано уравнение (30). Последнее алгебраическое уравнение, хотя и выглядит сильно нелинейным, может быть решено точно, если использовать функцию Ламберта, которая определяется как $W(x)\exp(W(x)) = x$. Тогда получим аналитическое решение для инкремента неустойчивости в явном виде:

$$\lambda = \frac{1}{\tau} W \left(2\sqrt[3]{-1} \frac{\tau \varepsilon \delta X^{*3} B^2}{A(1 + 4\varepsilon X^*)} e^{\frac{\tau B}{1 + 4\varepsilon X^*}} \right) - \frac{B}{1 + 4\varepsilon X^*} = 0, \quad (32)$$

а нейтральная кривая для бифуркации Андронова–Хопфа определяется условием $\lambda = I\omega$, где ω — частота осцилляций предельного цикла в момент его ответвления.

Если полный баланс белка (12) не учитывать, то в уравнениях (13)–(16) префакторы в левой части не возникают. Прежде всего рассмотрим влияние этого фактора на устойчивость системы. Уравнение для инкремента в этом случае будет иметь вид

$$\lambda = \frac{1}{\tau} W \left(2\sqrt[3]{-1} \frac{\tau \varepsilon \delta X^{*3} B^2}{A} e^{\tau B} \right) - B = 0. \quad (33)$$

Рис. 2 показывает, как могут различаться результаты, полученные по формулам (32) и (33). Положение минимумов нейтральных кривых отличается почти на порядок! Подход, в котором точно учитывается белковый баланс (12), приводит к большей устойчивости системы по отношению к колебательным возмущениям. Причина этого заключается в том, что количество мономеров белка, существующих в разных формах, в системе гораздо больше, чем количество просто свободных мономеров. Именно поэтому при малых значениях коэффициента деградации возникает большая погрешность.

Стоит отметить, что модель (18)–(19), предложенная в [Elowitz, Leibler, 2000], явно не учитывает этот эффект, хотя, очевидно, неявно предполагает регуляцию транскрипции димерами белка (это видно по значению коэффициента Хилла $n = 2$).

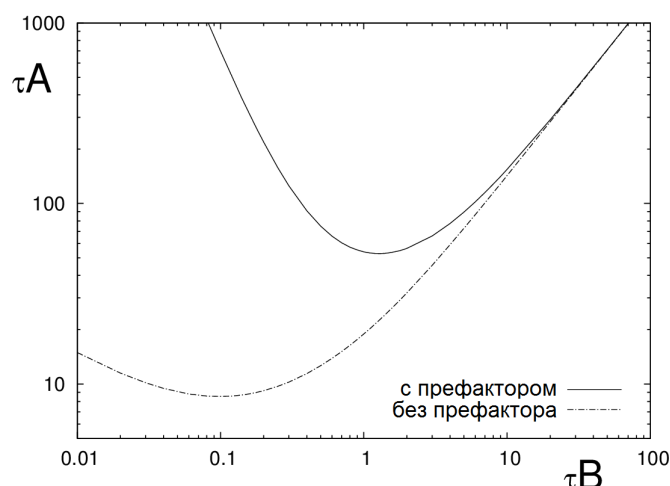


Рис. 2. Нейтральная кривая для бифуркации Андронова–Хопфа для симметричного репрессилатора при учете полного баланса молекул белка (сплошная линия) и без такого учета (штриховая линия). Результаты представлены на плоскости параметров τA и τB . Кривые получены при $\varepsilon = 0.1$, $\delta = 0.2$. Колебательная неустойчивость развивается выше кривой

Интересно также сравнить результаты для линейной устойчивости репрессилатора (рис. 2) и авторепрессора [Браун, 2011]. Минимум нейтральной кривой Андронова–Хопфа в тех же координатах, что и на рис. 2, лежал гораздо выше: $\tau B = 17$, $\tau A = 381$ у авторепрессора против $\tau B = 1.3$, $\tau A = 52.8$ у симметричного репрессилатора из трех генов. Можно сделать вывод, что удлинение цепочки репрессоров делает систему менее устойчивой к колебательным возмущениям. В принципе, формулы (31) и (32) допускают обобщение на случай последовательной цепи бесконечного числа репрессоров, но это не является темой данной работы.

Рассмотрим теперь свойства устойчивости несимметричного репрессилатора, т. е. такой цепочки из генов, каждый из которых имеет собственные значения основных параметров, определяющих их функционирование. На рис. 3 приведены нейтральные кривые для случая, когда ген, кодирующий белок X, подстраивается под два других элемента цепи, демонстрируя свою способность раскачать неустойчивость в одиночку на фоне их фиксированных значений для параметра производства белка. Для сравнения на этом же рисунке приведена нейтральная кривая для симметричного репрессилатора. Из представленных данных можно сделать вывод, что несимметричность репрессилатора существенно снижает способность последнего к развитию неустойчивости. С уменьшением значения τA_Y и τA_Z область развития колебаний существенно сужается по сравнению с симметричным случаем. Например, при $\tau B_Y = \tau B_Z = 5$ и $\tau A_Y = \tau A_Z = 80$ область неустойчивости превращается в узкую полосу, уходящую асимптотически вверх (рис. 3). При этом минимум этого языка находится в точке $\tau B = 9.7$, $\tau A = 230$. В целом способность одного элемента раскачать неустойчивость в системе при двух других «спящих» элементах весьма ограничена. Наибольшую же способность к переходу к колебательному режиму при прочих равных следует признать у симметричного репрессилатора. В этой связи следует отметить, что беспокойство авторов репрессилатора [Elowitz, Leibler, 2000] о том, заработает ли их соединение трех совершенно разных генов со своими индивидуальными наборами значений параметров, выглядит вполне обоснованным. Можно даже сказать, что в том, что репрессилатор сразу же запустился и начал демонстрировать колебания, есть большая доля везения.

Обсудим теперь влияние накопителя для белка X, которое определяется количеством сайтов m для связывания димеров (рис. 4). Ненулевое значение этого параметра априори делает тройку генов в репрессилаторе несимметричной, даже если все остальные параметры их работы идентичны (см. формулу (26)). Как видно из рисунка, работа накопителя приводит к сущест-

венной стабилизации системы, а минимум нейтральной кривой смещается в область меньших значений коэффициента деградации. Этот результат вполне ожидаем, так как при связывании молекул белка X с сайтами накопителя они перестают участвовать в регуляции. Поэтому этот процесс в чем-то аналогичен процессу деградации белка. Однако молекулы при этом не выводятся из системы и через некоторое время, когда концентрация белка X уменьшается, освобождают сайты и вновь участвуют в регуляции. Таким образом, концентрация белка X не может в системе уменьшиться ниже некоторого критического значения.

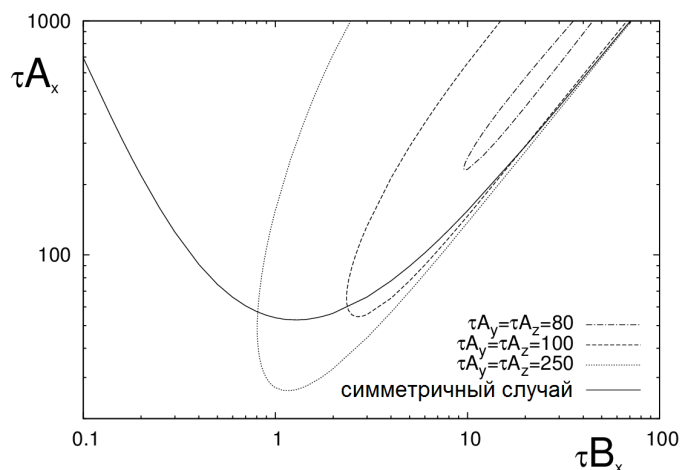


Рис. 3. Нейтральные кривые для бифуркации Андронова-Хопфа для несимметричного (штриховые линии) и симметричного (сплошная линия) репрессилатора. Результаты представлены на плоскости параметров производства τA_x и деградации τB_x белка первого гена и разных фиксированных значений этих же параметров для других генов. Остальные параметры фиксированы: $\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = 0.1$, $\delta_x = \delta_y = \delta_z = 0.2$, $\tau B_y = \tau B_z = 5$. Параметры для симметричного репрессилатора такие же, как на рис. 2. Колебательная неустойчивость развивается выше кривых

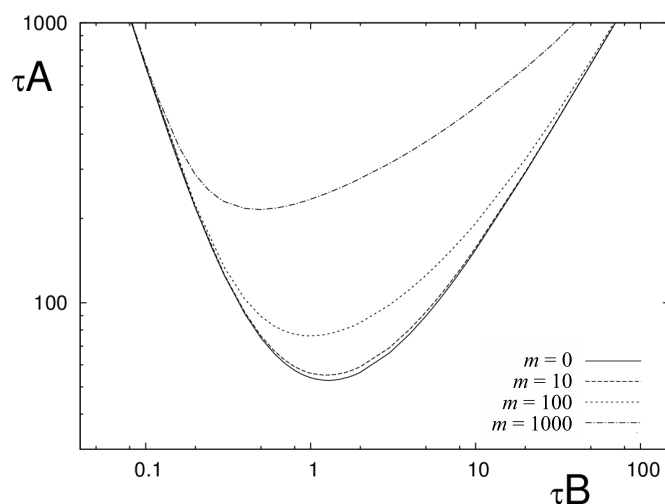


Рис. 4. Нейтральные кривые для бифуркации Андронова-Хопфа для несимметричного (штриховые линии) и симметричного (сплошная линия) репрессилатора. Несимметричность репрессилатора формируется специальным накопителем для белка X, который имеет m сайтов для связывания. Результаты представлены на плоскости параметров производства τA и деградации τB белков. Остальные параметры фиксированы: $\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = 0.1$, $\delta_x = \delta_y = \delta_z = 0.2$. Параметры для симметричного репрессилатора такие же, как на рис. 2. Колебательная неустойчивость развивается выше кривых

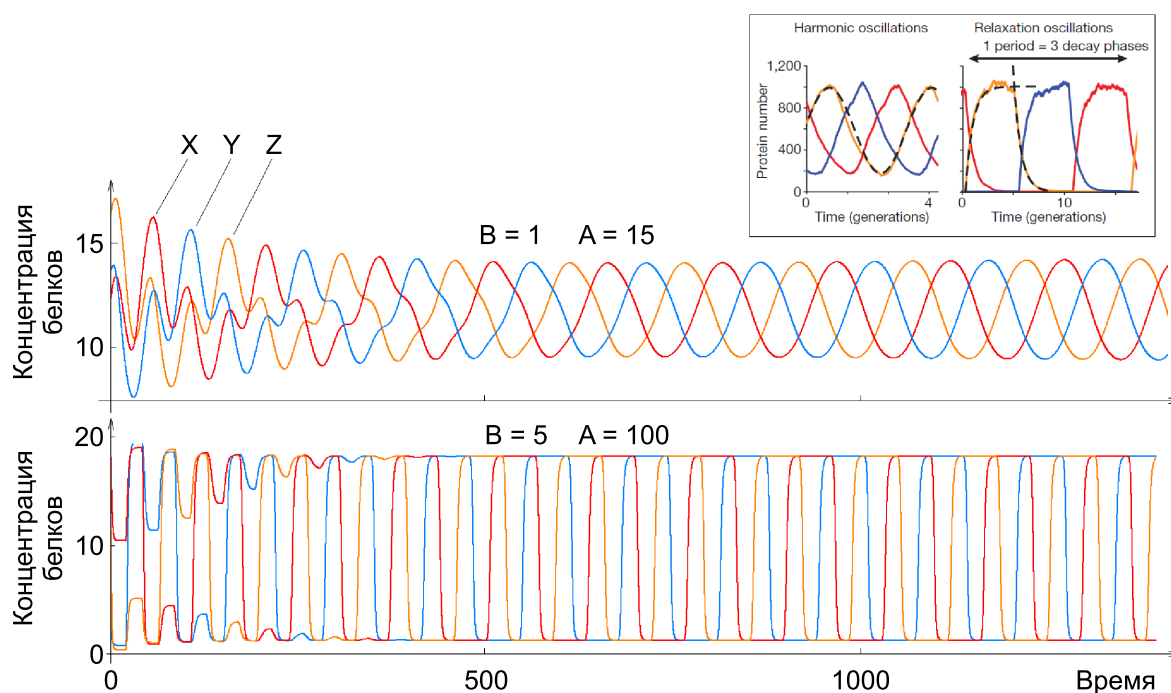


Рис. 5. Основные два вида периодических колебаний белковых концентраций в симметричном репрессилляторе, описываемых уравнениями (13)–(16): квазигармонические колебания при $B = 1$, $A = 15$ (вверху), релаксационные колебания при $B = 5$, $A = 100$ (внизу). Остальные параметры фиксированы: $\tau = 20$, $\varepsilon = 0.1$, $\delta = 0.2$. Для сравнения вверху справа приведены экспериментальные данные из недавней работы [Potvin-Trottier et al., 2016]. Цветная версия рисунка доступна в электронной версии статьи на сайте журнала

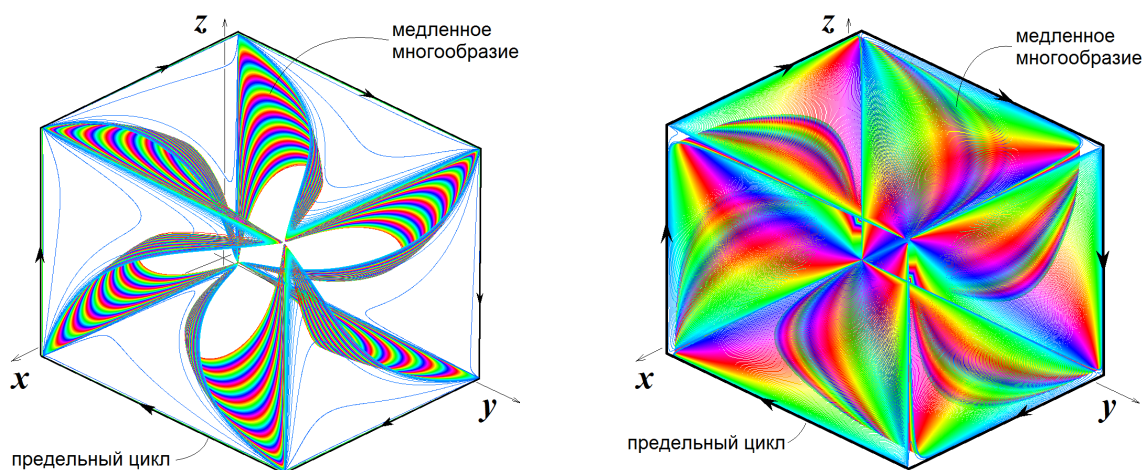
4. Нелинейная динамика репрессиллятора

Рассмотрим динамические свойства репрессиллятора в области неустойчивости. В работе [Potvin-Trottier et al., 2016] отмечается, что в зависимости от условий проведения эксперимента и значений параметров в эксперименте *in vitro* могут наблюдаться два вида колебаний концентрационных полей: гармонические и релаксационные колебания (рис. 5). Первые возникают при сравнительно небольших значениях параметра деградации, поэтому на периоде колебаний концентрации белков не уменьшаются до нуля, а осциллируют около среднего значения. Релаксационные колебания отличаются тем, что переключения между состояниями происходят очень быстро, и концентрация каждого белка на периоде падает почти до нуля. Как видно из рис. 5, наши расчеты подтверждают этот вывод, а вид полученных численно колебаний качественно согласуется с данными экспериментов. Как и в эксперименте, период работы репрессиллятора состоит из трех последовательных участков, на каждом из которых доминирует белок определенного вида. Это связано с тем, что концентрация белка, ген которого ингибируется доминирующим в данный момент белком, не может восстановиться, а третий белок только начинает восстанавливать свою концентрацию.

Рассмотрим подробнее релаксационные колебания, которые возникают при больших значениях коэффициента деградации B . На рис. 6 для примера представлен характерный расчет нелинейной динамики симметричного репрессиллятора для $B = 5$, $A = 120$, $\tau = 20$. Для данного значения параметра деградации и времени запаздывания кризис равновесия насапает при $A^* = 70.8$, то есть представленный на рис. 6 можно считать развитым. Базовые колебания релаксационного типа в фазовом пространстве представлены предельным циклом, который замыкается через шесть ребер куба. Исследование нелинейной динамики показало, что цикл в ко-

в конечном итоге притягивает к себе все траектории в фазовом пространстве. Период колебаний цикла равняется 125 единиц времени, то есть почти в 6 раз больше, чем время запаздывания экспрессии каждого гена. В принципе это согласуется с хорошо известным фактом из динамики запаздывающих систем, в которых период колебаний принимает значение от 2 до 4 периодов запаздывания (с учетом трех запаздывающих элементов в данном случае). Движение вдоль цикла осуществляется неравномерно: происходит задержка в вершинах куба, за которыми следует быстрое перемещение вдоль ребра к следующей вершине. Таким образом, формируется характерная для релаксационных колебаний развертка по времени со ступенчатым профилем колебаний (рис. 5).

Интересной особенностью фазового пространства симметричного репрессиллятора является наличие притягивающего медленного многообразия, которое не связано с предельным циклом. Фазовая траектория быстро притягивается к этому образованию, а затем медленно эволюционирует по нему, в конце концов покидая и притягиваясь к циклу. На рис. 6 представлены расчеты многообразия для двух разных начальных условий. Для визуализации поверхности многообразия был использован следующий прием: фазовая траектория периодически меняла свой цвет каждые 20 000 единиц времени, пробегая за это время основные цвета спектра. Таким образом, по рис. 6 можно оценить общее время интегрирования. Например, количество полос на фазовом портрете на рис. 6, а показывает, что траектория провела в общей сложности около 150 000 единиц времени (порядка 1200 периодов колебаний предельного цикла!) на многообразии, пока не притянулась к циклу, идущему по ребрам куба. Несомненно, что в условиях эксперимента (если не вдаваться в обсуждение вопроса о реалистичности конструирования симметричного репрессиллятора *in vitro*) такой режим воспринимался бы как устойчивый периодический процесс. Природа притягивающего многообразия связана с симметрией системы. Можно заметить, что наиболее долгая эволюция к предельному циклу происходит при более симметричных начальных условиях. Когда начальные концентрации для белков близки друг другу, то система долгое время не может решить, какой белок и в каком порядке будет синтезироваться и деградировать. В самый начальный момент эволюции факторы транскрипции действуют одновременно, и все три репрессора ингибируют экспрессию друг друга, борясь за лидерство. Релаксационные колебания развиваются постепенно в результате длительного переходного режима.



(а) Начальные условия интегрирования: (5, 6, 6)

(б) Начальные условия интегрирования: (2, 8, 8)

Рис. 6. Фазовый портрет симметричного репрессиллятора для двух разных начальных условий и фиксированных значений параметров: $B = 5$, $A = 120$, $\tau = 20$, $\varepsilon = 0.1$, $\delta = 0.2$. При любых начальных условиях фазовая траектория притягивается к предельному циклу, который идет по шести ребрам куба. Для визуализации медленного многообразия цвет фазовой траектории менялся периодически, пробегая спектр за 20 000 единиц времени. Цветная версия рисунка доступна в электронной версии статьи на сайте журнала

Интересно посмотреть, какого рода долгоживущие осцилляции формирует многообразие. На рис. 6, а видно, что фазовая траектория периодически посещает вершину куба, которая наиболее удалена от начала координат, и вершину, которая ближе всего расположена к началу координат. Таким образом, на одном полном периоде укладываются еще два дополнительных события: почти полная деградация всех белков (близкая к нулю вершина куба) и одновременное сосуществование белков при высоких концентрациях (наиболее удаленная от нуля вершина куба). Характерный период осцилляций в этом режиме составляет 40 единиц времени, т. е. ровно в три раза меньше периода колебаний предельного цикла. Примерно с таким же периодом осциллировал бы авторепрессор, под которым понимается один ген, регулирующий свою экспрессию посредством отрицательной обратной связи [Bratsun et al., 2005a; Брацун, 2011]. Это означает, что во время фазового движения по многообразию гены работают больше в индивидуальном режиме, их коллективное поведение еще не установилось.

Рассмотрим теперь, что происходит в случае несимметричного репрессилиатора. В целом описанный выше сценарий не изменяется. На рис. 7 изображен фазовый портрет (а) и приведенная развертка по времени (б) для типичного несимметричного репрессилиатора, у которого сильно различаются параметры производства белка. Как видно из рисунка, в соответствии с асимметрией параметров куб в симметричном случае превращается в параллельный параллелепипед, удлиненные стороны которого отвечают более высоким значениям производства белка (для X и Y). При этом движение траектории по многообразию происходит быстрее: раскраска

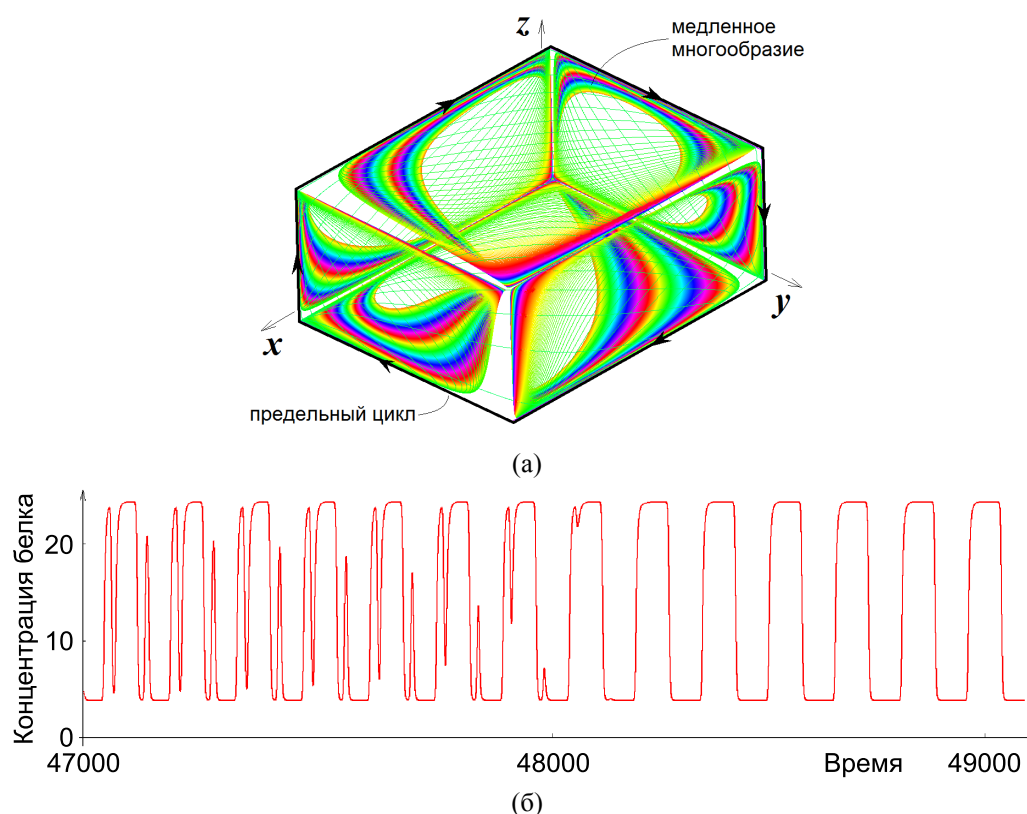


Рис. 7. Фазовый портрет (а) и развертка по времени (б) несимметричного репрессилиатора для начальных условий интегрирования: (6, 6, 6) и фиксированных значений параметров: $B_X = B_Y = B_Z = 5$, $A_X = 170$, $A_Y = 200$, $A_Z = 80$, $\delta = 0.2$, $\varepsilon_X = \varepsilon_Y = \varepsilon_Z = 0.1$, $\delta_X = \delta_Y = \delta_Z = 0.2$, $\tau_X = \tau_Y = \tau_Z = 20$. При любых начальных условиях фазовая траектория притягивается к предельному циклу, который идет по шести ребрам параллелепипеда. Для визуализации медленного многообразия цвет фазовой траектории менялся периодически, пробегая последовательно спектр за 20 000 единиц времени. Развертка по времени для колебаний белка Y дана в диапазоне времени, когда происходит сползание динамики с медленного многообразия на предельный цикл. Цветная версия рисунка доступна в электронной версии статьи на сайте журнала

показывает, что переход совершается примерно за 50 000 единиц времени. На рис. 7, б приводится фрагмент развертки по времени, когда фазовая траектория соскакивает с многообразия и притягивается к предельному циклу релаксационных колебаний. Как было отмечено выше, суть перехода заключается в конечной синхронизации работы трех генов, которые вырабатывают последовательность работы отрицательной обратной связи.

Численное моделирование нелинейной динамики показывает, что наиболее чувствителен репрессиллятор к асимметрии времени запаздывания в экспрессии генов. При задании разных значений τ медленное многообразие практически сразу разрушается, и фазовая траектория очень быстро притягивается к предельному циклу коллективных релаксационных осцилляций. При этом цикл выглядит совершенно так же, как это показано на рис. 6 или 7.

5. Дискуссия и заключение

Геном любого, даже простейшего организма содержит тысячи генов, у высших организмов их десятки тысяч. Они образуют сложную сеть взаимодействий, конфигурация которых в ходе регуляции постоянно видоизменяется как по времени, так и по пространству. Соответствующее белковое поле также испытывает сложные пульсации по времени и пространству. Перефразируя известное высказывание, можно сказать, что «за этим лесом совершенно не было видно отдельных деревьев». Вываться из этого порочного круга — главный побудительный мотив возникновения синтетической биологии. Вместо изучения уже существующих генных сетей, возникших в результате длительной естественной эволюции, гораздо продуктивнее создать модельную малоразмерную систему и в деталях изучить ее работу. Когда экспериментальные технологии развились достаточно, чтобы работа генной системы стала наблюдаемой со стороны средствами объективного контроля, эта идея была реализована. На первом этапе своего развития синтетическая биология занималась разработкой простейших динамических объектов, среди которых можно отметить репрессиллятор, авторепрессор, переключатель уровней, переключатель осцилляций и др. Репрессиллятор был первым и, несмотря на свою кажущуюся простоту, продолжает привлекать внимание исследователей.

В данной работе была предложена модель репрессиллятора, которая отличается от математической модели первооткрывателей [Elowitz, Leibler, 2000] тем, что в ней с самого начала предполагается запаздывание экспрессии генов. Сама по себе идея не является оригинальной, однако по отношению к репрессиллятору она долгое время не рассматривалась как удачная, так как считалось, что модель (18)–(19) и так работает неплохо, а запаздывание рассматривалось как излишнее усложнение модели. Кроме того, роль запаздывания в процессах транскрипции/трансляции стала проявляться только в нулевые годы. Например, экспериментально продемонстрировано, что циркадианные ритмы таких организмов, как нейроспора (лат. *Neurospora Crassa*) и дрозофилы (лат. *Drosophila*), основаны на механизме запаздывания, как самом робастном и надежном [Denault, Loros, Dunlap, 2001]. Типичное время запаздывания для нейроспоры оценивается в 5–6 часов, период самого циркадианного ритма составляет около 22 часов. Такое время запаздывания гораздо больше остальных характерных времен в системе, что позволяет считать их немарковскими. Пренебрегать эффектами запаздывания в этом случае принципиально нельзя. Возвращаясь к репрессиллятору, можно отметить, что его период колебаний составляет порядка 3 часов, что меньше осцилляций в нейроспоре, но все равно является довольно медленным процессом. В недавней экспериментальной работе, в которой удалось существенно стабилизировать «плавание» частоты и амплитуды осцилляций в репрессилляторе за счет некоторых модификаций, период колебаний стал еще больше: вплоть до 15 часов [Potvin-Trottier et al., 2016]. Таким образом, предположение о временной задержке, как существенной черте поведения репрессиллятора, кажется теперь вполне естественным.

Работа посвящена детерминистскому описанию поведения репрессиллятора с запаздыванием. Необходимо отметить, что динамика настоящего репрессиллятора *in vivo* стохастическая и испытывает сильные флуктуации в силу малого числа белковых молекул, участвующих в регуляции. Все результаты, полученные в рамках детерминистского подхода, которые излагаются как в этой статье, так и в работах других авторов, должны оцениваться с учетом этого фактора.

Перечислим основные результаты работы. Последовательно исследована линейная устойчивость по отношению колебательным возмущениям. Показано, что важную роль в модели играет точный баланс количества белковых молекул в системе. Игнорирование этого фактора приводит к смещению нейтральной кривой для бифуркации Андронова–Хопфа более чем в 10 раз. Рассмотрена нелинейная динамика системы. Кроме квазигармонических и релаксационных колебаний, наблюдаемых в эксперименте, обнаружен колебательный режим, во время которого система совершает переходный режим по медленному многообразию. Этот режим связан с длительной синхронизацией в работе трех генов (до нескольких тысяч периодов базового колебания), определяющих, в какой последовательности им включаться и выключаться. Обнаружено, что в несимметричном репрессилляторе с разными временами запаздывания многообразие быстро разрушается. Сложные динамические режимы обнаружены не были, что объясняется, по-видимому, отсутствием в модели положительных обратных связей.

Список литературы (References)

- Брацун Д. А.* Эффект возбуждения подкритических колебаний в стохастических системах с запаздыванием. Часть I. Регуляция экспрессии генов // Компьютерные исследования и моделирование. — 2011. — Т. 3, № 4. — С. 421–438.
Bratsun D. A. Effekt возбужdeniya podkriticheskikh kolebaniy v stohasticheskix sistemax s zapazdyvaniem. Chast' I. Reguljatsija ekspressii genov [Effect of subcritical excitation of oscillations in stochastic systems with time delay. Part I. Regulation of gene expression] // Computer Research and Modeling. — 2011. — Vol. 3, No. 4. — P. 421–438 (in Russian).
- Брацун Д. А., Захаров А. П.* Моделирование пространственно-временной динамики циркадианных ритмов *Neurospora crassa* // Компьютерные исследования и моделирование. — 2011. — Т. 3, № 2. — С. 191–213.
Bratsun D. A. Modelirovanie prostranstvenno-vremennoj dinamiki tsirkadiannyh ritmov *Neurospora crassa* [Modelling spatio-temporal dynamics of circadian rhythms in *Neurospora crassa*] // Computer Research and Modeling. — 2011. — Vol. 3, No. 2. — P. 191–213 (in Russian).
- Брацун Д. А., Захаров А. П., Письмен Л. М.* Многоуровневое математическое моделирование возникновения и роста опухоли в ткани эпителия // Компьютерные исследования и моделирование. — 2014. — Т. 6, № 4. — С. 585–604.
Bratsun D. A., Zakharov A. P., Pismen L. M. Mnogourovnevoe matematicheskoe modelirovanie vzniknovenija i rosta opuxoli v tkani epiteliya [Multiscale mathematical modeling occurrence and growth of a tumour in an epithelial tissue] // Computer Research and Modeling. — 2014. — Vol. 6, No. 4. — P. 585–604 (in Russian).
- Волков Е. И., Журов Б. А.* Динамическое поведение изолированного репрессиллятора с обратной связью // Известия вузов. Радиофизика. — 2013. — Т. 56, № 10. — С. 774–786.
Volkov E. I., Zhurov B. A. Dynamic Behavior of an Isolated Repressilator with Feedback // Radiophysics and Quantum Electronics. — 2014. — Vol. 56, Is. 10. — P. 697–707. (Original Russian paper: *Volkov E. I., Zhurov B. A.* Dinamicheskoe povedenie izolirovannogo repressiljatora s obratnoj svyaz'ju // Izvestija vuzov. Radiofizika. — 2013. — Vol. 56, No. 10. — P. 774–786.)
- Демиденко Г. В., Колчанов Н. А., Лихошвай В. А., Матушкин Ю. Г., Фадеев С. И.* Математическое моделирование регулярных контуров геновых сетей // Ж. вычисл. матем. и матем. физ. — 2004. — Т. 44, № 12. — С. 2276–2295.
Demidenko G. V., Kolchanov N. A., Likhoshvai V. A., Matushkin Yu. G., Fadeev S. I. Mathematical modeling of regular circuits of gene networks // Computational Mathematics and Mathematical Physics. — 2004. — Vol. 44, Is. 12. — P. 2166–2183. (Original Russian paper: *Demidenko G. V., Kolchanov N. A., Likhoshvai V. A., Matushkin Yu. G., Fadeev S. I.* Matematicheskoe modelirovanie reguljarnyx konturov gennyh setej // Zhurnal vychislitel'noj matematiki i matematicheskoy fiziki. — 2004. — Vol. 44, No. 12. — P. 2276–2295.)
- Захаров А. П., Брацун Д. А.* Синхронизация циркадианных ритмов в масштабах гена, клетки и всего организма // Компьютерные исследования и моделирование. — 2013. — Т. 5, № 2. — С. 255–270.
Zakharov A. P., Bratsun D. A. Sinkhronizatsija tsirkadiannyh ritmov v masshtabax gena, kletki i vsego organizma [Synchronization of circadian rhythms in the scale of a gene, a cell and a whole organism] // Computer Research and Modeling. — 2013. — Vol. 5, No. 2. — P. 255–270 (in Russian).

- Лихошвай В. А., Хлебодарова Т. М., Колчанов Н. А.* Компьютерный ресурс «Генетический конструктор» для моделирования молекулярно-генетических процессов в бактериальной клетке: анализ циклической геной цепи // Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения. — Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. — С. 392–404.
- Likhoshvai V. A., Khlebodarova T. M., Kolchanov N. A.* Komp'yuternyj resurs «Geneticheskij konstruktor» dlya modelirovaniya molekulyarno-geneticheskix protsessov v bakterial'noj kletke: analiz tsiklicheskoj gennoj tsepi // Rol' mikroorganizmov v funktsionirovanii zhivyx sistem: fundamental'nye problemy i bioinzhenernye prilozhenija. — Novosibirsk: SO RAN, 2010. — P. 392–404 (in Russian).
- Лихошвай В. А., Матушкин Ю. Г., Фадеев С. И.* Задачи теории функционирования геновых сетей // Сиб. журн. индустр. матем. — 2003. — Т. 6, № 2. — С. 64–80.
- Likhoshvai V. A., Matushkin Yu. G., Fadeev S. I.* Zadachi teorii funktsionirovaniya gennyx setej [Problems of theory of gene networks functioning] // Siberian Journal of Industrial Mathematics. — 2003. — Vol. 6, No. 2. — P. 64–80 (in Russian).
- Потапов И. С., Волков Е. И.* Анализ динамических режимов взаимодействующих синтетических генетических репрессилаторов // Компьютерные исследования и моделирование. — 2010. — Т. 2, № 4. — С. 403–418.
- Potapov I. S., Volkov E. I.* Analiz dinamicheskix rezhimov vzaimodejstvujushchix sinteticheskix geneticheskix oscilljatorov [Dynamics analysis of coupled synthetic genetic repressilators] // Computer Research and Modeling. — 2010. — Vol. 2, No. 4. — P. 403–418 (in Russian).
- Bonnet J., Yin P., Ortiz M. E., Subsoontorn P., Endy D.* Amplifying genetic logic gates // Science. — 2013. — Vol. 340. — P. 599–603.
- Bratsun D. A., Merkuriev D. V., Zakharov A. P., Pismen L. M.* Multiscale modeling of tumor growth induced by circadian rhythm disruption in epithelial tissue // J. Biol. Phys. — 2016a. — Vol. 42, No. 1. — P. 107–132.
- Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L.* Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2005a. — Vol. 102, No. 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. — Vol. 5845. — P. 210–219.
- Bratsun D. A., Zakharov A. P., Pismen L. M.* Chemo-Mechanical Elastic Modeling of Carcinoma Development // Advanced Biomaterials and Devices in Medicine. — 2016b. — Vol. 3, No. 1. — P. 19–29.
- Daniel R., Rubens J. R., Sarpeshkar R., Lu T. K.* Synthetic analog computation in living cells // Nature. — 2013. — Vol. 497. — P. 619–623.
- Danino T., Mondragón-Palomino O., Tsimring L., Hasty J.* A synchronized quorum of genetic clocks // Nature. 2010. — No. 463. — P. 326–330.
- Denault D., Loros J., Dunlap J.* WC-2 mediates WC-1–FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of Neurospora // EMBO J. — 2001. — Vol. 20. — P. 109–117.
- Elowitz M. B., Leibler S.* A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators // Nature. — 2000. — Vol. 403. — P. 335–338.
- Friedland A. E., Lu T. K., Wang X., Shi D., Church G., Collins J. J.* Synthetic gene networks that count // Science. — 2009. — Vol. 324. — P. 1199–1202.
- Fung E., Wong W. W., Suen J. K., Bulter T., Lee S., Liao J. C.* A synthetic gene-metabolic oscillator // Nature. — 2005. — Vol. 435. — P. 118–122.
- Gao X. J., Elowitz M. B.* Synthetic biology: Precision timing in a cell // Nature. — 2016. — Vol. 538. — P. 462–463.
- Hasty J., Dolnik M., McMillen, D., Collins J. J.* Designer gene networks: Towards fundamental cellular control // Chaos. — 2001. — Vol. 11. — P. 207–220.

- Potvin-Trottier L., Lord N. D., Vinnicombe G., Paulsson J.* Synchronous long-term oscillations in a synthetic gene circuit // *Nature*. — 2016. — Vol. 538. — P. 514–517.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J.* Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein // *Gene*. — 1992. — Vol. 111, No. 2. — P. 229–33.
- Prindle A.* Optimization of a Gene Oscillator using Transcriptional Time Delay // Senior thesis, Sup. R. Murrey, California Institute of Technology, Pasadena, 2009.
- 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.
- Stricker J., Cookson S., Bennett M. R., Mather W. H., Tsimring L. S., Hasty J.* A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator // *Nature*. — 2008. — Vol. 456. — P. 516–519.
- Tabor J. J., Salis H. M., Simpson Z. B., Chevalier A. A., Levskaya A., Marcotte E. M., Voigt C. A., Ellington A. D.* A synthetic genetic edge detection program // *Cell*. — 2009. — Vol. 137. — P. 1272–1281.
- Tigges M., Marquez-Lago T. T., Stelling J., Fussenegger M.* A tunable synthetic mammalian oscillator // *Nature*. — 2009. — Vol. 457. — P. 309–312.
- Ullner E., Zaikin A., Volkov E. I., Garcia-Ojalvo J.* Multistability and clustering in a population of synthetic genetic oscillators via phase-repulsive cell-to-cell communication // *Phys. Rev. Lett.* — 2007. — Vol. 99. — 148103.