

УДК 517.958:57  
PACS 87.16.A-

## Об устойчивости репрессилатора с запаздывающей экспрессией генов

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

Пермский национальный исследовательский политехнический университет  
614990, Пермь, ул. Комсомольский проспект, 29  
email: lorgovg3@gmail.com, DABracun@pstu.ru

Репрессилатором называют первую в синтетической биологии генную регуляторную сеть, искусственно сконструированную в Гарвардском университете в 2000 г. Он представляет собой замкнутую сеть из трех генетических элементов *lacI*, *λcI* и *tetR*, которые имеют естественное происхождение, но в такой комбинации в природе не встречаются. Промотор каждого из трёх генов контролирует следующий за ним цистрон по принципу отрицательной обратной связи, подавляя экспрессию соседнего гена. В данной работе впервые рассматривается нелинейная динамика репрессилатора, 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. В работе 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 репрессилатора, у которого все три гена идентичны, получено аналитическое решение для нейтральной кривой бифуркации Андронова-Хопфа. Для общего случая асимметричного репрессилатора нейтральные кривые построены численно. Обсуждается место предложенной в работе модели среди других теоретических моделей репрессилатора.

**Ключевые слова:** репрессилатор; запаздывание; колебания; математическая биология

Поступила в редакцию 24.03.2018; принята к опубликованию 18.05.2018

## On the repressilator stability with time-delayed gene expression

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

Perm National Research Polytechnic University, Komsomolsky prospect 29, 614990, Perm, Russia  
email: lorgovg3@gmail.com, DABracun@pstu.ru

The repressor is the first genetic regulatory network in synthetic biology, which was artificially constructed at Harvard University in 2000. It is a closed network of three genetic elements *lacI*, *λcI* 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 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 mul-

tistage 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. In the paper, the nonlinear dynamics has been considered within the framework of the deterministic description. By applying the method of many time scales, 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. The place of the model proposed in the present work among other theoretical models of the repressilator is discussed.

**Keywords:** repressilator; time delay; oscillations; mathematical biology

*Received 24.03.2018; accepted 18.05.2018*

doi: 10.17072/1994-3598-2018-2-75-87

## 1. Введение

После появления 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 гг. 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 [1]. 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 следствий указанного переворота явилось возникновение синтетической биологии, которая началась с работы [2]. В ней описано искусственная плаزمид, сконструированная из трёх разных генов. Стоит отметить, что эти гены 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 были неизвестны [3]. Однако успех работы показал, что таким путем возможно конструировать искусственные схемы с

предписанной динамической генной регуляцией, что и стало предметом синтетической биологии [4]. В последующие годы экспериментально и теоретически были изучены динамические эффекты в синтетических генных цепях. В работах [5, 6] было показано, что искусственные цепи могут производить простейшие арифметические вычисления и выдавать значения элементарных функций. Логические операции в синтетических цепях исследовались в [7]. Выделение границ поля изображения, образованного бактериями с синтетическими вставками в геноме, изучалось в [8]. Значительная литература посвящена изучению колебаний. Были предложены и реализованы экспериментально альтернативные, более сложные по сравнению с репрессилатором, схемы осцилляторов [9–11]; показано, что точность молекулярных часов репрессилатора может быть существенно улучшена за счет простых усовершенствований схемы [12]; указаны новые эффекты при численном моделировании модели репрессилатора [13]; обнаружены нелинейные волны активности в клеточных ансамблях [14]. 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 репрессилатора в эксперименте также может быть внесено запаздывание [15]. Однако эта работа, оформленная в виде магистерской диссертации, не имела своего продолжения.

В последние годы вопросы запаздывания в процессах генной регуляции вызывают всё больший интерес. Стоит отметить, что процессы экспрессии генов, вообще говоря, состоят из

многоэтапных реакций, в ходе которых последовательно образуются ансамбли сложных органических соединений. Таким образом, эти процессы распределены по пространству, растянуты по времени и идут с неким характерным временем запаздывания. Строго говоря, эти процессы не являются Марковскими [16–19]. Если время запаздывания мало по сравнению со всеми остальными характерными временами в системе, этими эффектами можно пренебречь. В этом случае запаздывание не оказывает влияния 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*) [20] и интенсивно изучался в рамках различных математических моделей [21–23]. Эти модели с запаздыванием были использовались, например, для описания возникновения карциномы за счет локальной десинхронизации циркадианных ритмов в клетках [24–26]. Более формальная постановка задачи о запаздывании при генной регуляции рассматривалась в работах [16, 27], в которых было введено понятие гипотетической генной сети (ГГС) и описаны свойства ансамблей таких цепей.

В данной работе 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 [2]. Однако, даже если в исходной схеме Эловица и Лейблера запаздывание не существенно, то экспериментальные технологии, продемонстрированные в более поздних работах [14, 15], однозначно свидетельствуют, что запаздывающий репрессилатор может быть сконструирован в рамках методов и подходов синтетической биологии, а значит его свойства должны быть исследованы *in silico*. В работе предложена математическая модель, которая выводится из исходных биохимических реакций и учитывает новейшие экспериментальные данные [12]. Исследуется линейная устойчивость состояния равновесия, отвечающего стационарному режиму работы репрессилатора.

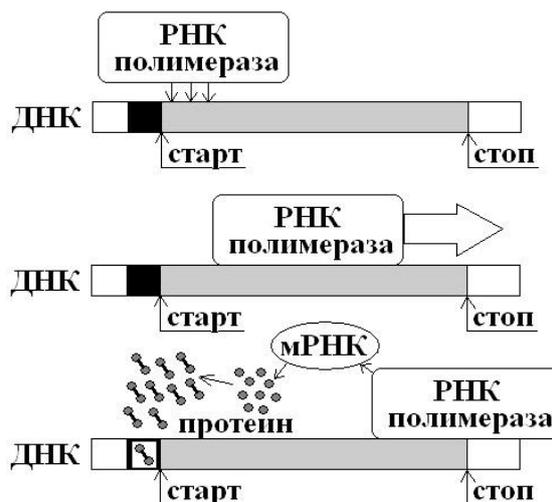


Рис. 1. Схема процессов транскрипции и трансляции. Ген отмечен серым цветом. Небольшой закрашенный участок ДНК перед геном является промотором

## 2. Основные понятия и определения

Простейший вид генной регуляции схематически представлен на рис. 1. Как известно, генетическая программа развития и функционирования живых организмов зашифрована в макромолекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), которая представляет собой длинную двойную спираль. ДНК находится в ядрах клеток. Ген является структурно-функциональной единицей ДНК, которая отвечает за кодирование одного определенного свойства или признака организма, а также определенной команды, которую надо выполнить в организме в данный момент. Процесс считывания информации из гена называется *транскрипцией*, а последующий процесс синтеза белка (протеина) на основе расшифрованной информации – *трансляцией*. Белок и является формой передачи команды по всему организму. Понятно, что транскрипция должна происходить только в момент, когда это нужно организму. Поэтому этот процесс происходит под контролем *генной регуляции* следующим образом. Важную функцию в регуляции выполняет небольшой участок перед самым геном, называемый *промотором* (отмечен черным цветом на рис. 1), а точнее его специальная часть, – *оператор-сайт*. Капелька полимеразы рибонуклеиновой кислоты (РНК), которая содержит неупорядоченный набор нуклеотидов и является строительным материалом для будущей матричной РНК (мРНК), может прикрепляться к началу гена только в том случае, если оператор-сайт промотора открыт. Простейший вид регуляции через отрицательную обратную связь предполагает, что открытие сайта зависит от концентрации уже синтезированного белка. Когда белка уже слишком много, то происходит *связывание* (т.е. прикрепление) одной из

белковых молекул с оператор-сайтом и последний закрывается. В этом случае транскрипция прекращается.

Предположим, что оператор-сайт открыт. Тогда РНК-полимераза начинает двигаться вдоль гена – стартует процесс транскрипции. Сама транскрипция заключается в достаточно простом по смыслу процессе, когда каждому нуклеотиду ДНК по определенному правилу подбирается его двойник из набора молекул в РНК-полимеразе. Таким образом, параллельно макромолекуле ДНК формируется макромолекула мРНК, которая является результатом дешифрования. Когда полимеразы добирается до конца гена, процесс транскрипции ДНК в мРНК заканчивается. Далее стартует процесс трансляции, под которым понимается синтез белка с помощью мРНК в специальном функционале клетки – рибосоме. Там происходит процесс, похожий по смыслу на транскрипцию, в котором каждому основанию мРНК подбирается элемент будущего белка. После синтеза макромолекула белка претерпевает трансформацию в пространстве. Так как это очень длинное и неуклюжее образование, оно по необходимости сворачивается в более компактную форму в виде клубка, который называется *мономером*. Два мономера могут формировать структуры дипольного типа, которые называются *димерами*. Именно в этой форме белок чаще всего и участвует в генной регуляции. На рис. 1 представлен момент, когда один из димеров отделяется от протеинового облака и связывается с оператор-сайтом, что блокирует транскрипцию. Описанный вид регуляции направлен на подавление экспрессии гена через отрицательную обратную связь, поэтому ген с такой регуляцией называют *авторепрессором*. На самом деле существующие виды регуляции весьма разнообразны: белок может репрессировать не только собственную экспрессию, но и экспрессию чужого гена, а также способствовать этому процессу вместо блокирования (положительная обратная связь).

По сложившейся традиции названия генов ниже выделяются наклонным шрифтом, а названия белков – прописными буквами. Некоторые другие термины, используемые в работе: *плазмида* – чаще всего закольцованная молекула ДНК, которая существует независимо от основной последовательности ДНК. *Цистрон* – синоним термина «ген».

С физической точки зрения, мы имеем здесь дело со сложной системой, состоящей из большого числа элементов, – в типичной ДНК имеется десятки тысяч генов. Эти элементы являются активными по отношению к друг другу, так как обмениваются сигналами (командами), которые являются дальнедействующими. Результатом работы этой живой машины являются сложные динамические режимы поведения концентраций белковых полей, которые непосредственно влияют на поведение организма.

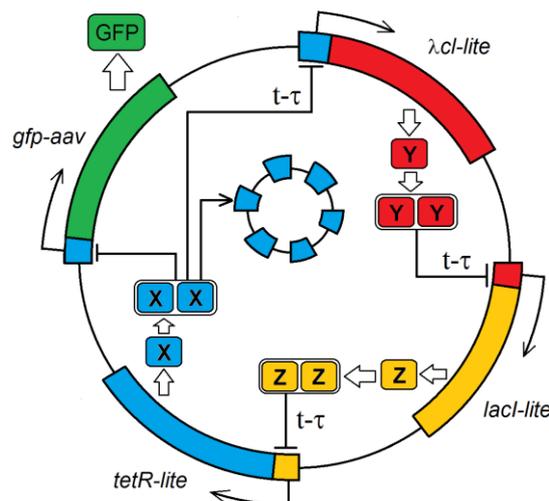


Рис. 2. Схематическое изображение генной сети репрессилатора с запаздыванием (цветной в электронной версии)

### 3. Вывод математической модели репрессилатора с запаздыванием

Схема регуляторной цепи репрессилатора [2] с учетом важных модификаций, предложенных в работе [12], представлена на рис. 2. Как следует из рисунка, плазмида 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 будем обозначать X. Белок X димеризуется и в этом виде может выполнять три функции. Во-первых, он через промотор *tetR* может служить репрессором для  $\lambda$  фага (соответствующий ген *λcl-lite* отмечен на схеме красным цветом). Во-вторых, он также репрессирует экспрессию флуоресцентного белка GFP (выделен зеленым цветом). В исходной версии репрессилатора 2000 г. ген *gfp-aav*, кодирующий GFP, был размещен на отдельной плазмиде. Как было продемонстрировано недавно [12], 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 репрессилатора (второй цистрон). В-третьих, димеры белка X могут связываться с оператор-сайтом специальной ДНК плазмиды (синее кольцо в центре схемы). Это второе важное усовершенствование репрессилатора, 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 *lacI-lite*, находящийся под контролем промотора *tetR*, входит в состав третьего цистрона и кодирует белок, концентрацию которого будем обозначать Z. Как видно на схеме, промотор  $\lambda$  фага выступает как репрессор экспрессии гена *lacI-lite* (четвертый цистрон). Белок, кодируемый последним геном, будем обозначать Y. Таким образом, круг замыкается. Основное ядро репрессилатора, определяющее его временную динамику, составлено тремя генами, которые связаны между собой через промоторы отрицательной обратной связи.

Перечислим основные допущения, которые используются при выводе модели:

- регуляция репрессилатора 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 репрессилатора);
- 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 значительно больше остальных характерных времен, определяющих нелинейную динамику репрессилатора;
- оставшиеся динамические процессы в репрессилаторе можно разбить на быстрые и медленные, ограничившись двумя характерными временными масштабами.

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

Список реакций при генной регуляции репрессилатора с запаздыванием (рис. 2). Соответствующие скорости реакций указаны над стрелками

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

Рассмотрим подробнее общую схему вывода модельных уравнений, например, для концентрации белка X. Кинетические уравнения, записанные на основании реакций из таблицы, имеют вид:

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

$$\frac{dx_2}{dt} = k_1^X x^2 - k_{-1}^X x_2 + k_2^Y d_1^Y - k_2^Y d_0^Y x_2 + k_{-2}^G d_1^G - k_2^G d_0^G x_2 + \sum_{i=1}^m k_{-2}^S d_{i1}^S - \sum_{i=1}^m k_2^S d_{i0}^S x_2, \quad (2)$$

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

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

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

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

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

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

где  $x$  и  $x_2$  – непрерывные функции времени, обозначающие соответственно концентрацию белка X в мономерной и димерной формах. 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  $\lambda cI-lite$  (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 сайтов (верхний индекс определяет принадлежность оператор-сайта конкретному гену).

Далее примем во внимание, 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 должна быть проведена методом многих временных масштабов, но в системе (1)–(8) можно сделать проще, положив нулю соответствующие производные по времени в левых частях

уравнений (2)–(8). Таким образом, приходим к соотношениям:

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

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

К уравнениям (9) следует добавить соотношения:

$$d_0^Y + d_1^Y = 1, \quad d_0^G + d_1^G = 1, \quad (10)$$

$$d_{0i}^S + d_{1i}^S = 1, \quad i = \overline{1, m},$$

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):

$$d_0^Y = \frac{1}{1 + \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2}, \quad d_0^G = \frac{1}{1 + \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2}, \quad (11)$$

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

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:

$$x_{all} = x + 2 \frac{k_1^X}{k_{-1}^X} x^2 + 2 \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2 + \frac{k_2^Y k_1^X}{k_{-2}^Y k_{-1}^X} x^2 +$$

$$+ 2 \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2 + 2m \frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} x^2 + \frac{k_2^G k_1^X}{k_{-2}^G k_{-1}^X} x^2 + \frac{k_2^S k_1^X}{k_{-2}^S k_{-1}^X} x^2,$$

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  $\lambda cI-lite$ ; четвертое – количество димеров, связанных с оператор-сайтом гена  $gfp-aav$ ; пятое – количество димеров, связанных с сайтами плазмиды ДНК-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, вообще говоря, не малым – это зависит от

количества сайтов для связывания в ДНК-накопителе.

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

$$\begin{aligned} \left(1 + 4\varepsilon_x x + \frac{4m\varepsilon_x \delta_s x}{(1 + \varepsilon_x \delta_s x^2)^2}\right) \frac{dx}{dt} &= \\ &= \frac{A_x}{1 + \varepsilon_x \delta_x z^2 (t - \tau_x)} - B_x x, \end{aligned} \quad (13)$$

$$(1 + 4\varepsilon_y y) \frac{dy}{dt} = \frac{A_y}{1 + \varepsilon_x \delta_y x^2 (t - \tau_y)} - B_y y, \quad (14)$$

$$(1 + 4\varepsilon_z z) \frac{dz}{dt} = \frac{A_z}{1 + \varepsilon_y \delta_z y^2 (t - \tau_z)} - B_z z, \quad (15)$$

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

где введены следующие обозначения:

$$\begin{aligned} \varepsilon_x &= \frac{k_1^X}{k_{-1}^X}, \quad \varepsilon_y = \frac{k_1^Y}{k_{-1}^Y}, \quad \varepsilon_z = \frac{k_1^Z}{k_{-1}^Z}, \\ \delta_x &= \frac{k_2^X}{k_{-2}^X}, \quad \delta_y = \frac{k_2^Y}{k_{-2}^Y}, \quad \delta_z = \frac{k_2^Z}{k_{-2}^Z}, \\ \delta_G &= \frac{k_2^G}{k_{-2}^G}, \quad \delta_s = \frac{k_2^S}{k_{-2}^S}. \end{aligned} \quad (17)$$

Динамическая система (13)–(16) представляет три связанных друг с другом дифференциальных уравнения (13)–(15) и уравнение (16), описывающее динамику сигнального белка GFP. Модель, которую предложили сами авторы репрессилатора [2], 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  $j = \{cI, lacI, tetR\}$ . Здесь  $m_i$  и  $p_i$  – соответственно концентрации белка и мРНК. 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 [2] отсутствовало). Кроме новых возможных динамических эф-

фектов за счет запаздывания в системе (13)–(16) более точно прописан баланс белковых мономеров, что находит своё выражение в префакторах в левой части уравнений. Префакторы не влияют на число и расположение состояний равновесия в системе, но имеют принципиальное влияние на их устойчивость и временную динамику системы.

### 3. Анализ линейной устойчивости

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

$$\begin{aligned} A_x - B_x x^* (1 + \varepsilon_x \delta_x (z^*)^2) &= 0, \\ A_y - B_y y^* (1 + \varepsilon_x \delta_y (x^*)^2) &= 0, \\ A_z - B_z z^* (1 + \varepsilon_y \delta_z (y^*)^2) &= 0, \\ A_G - B_G g^* (1 + \varepsilon_x \delta_G (x^*)^2) &= 0. \end{aligned} \quad (20)$$

Смысл имеют только решения для положительных значений концентраций. Стоит отметить, что нулевое стационарное решение в (20) априори отсутствует, т.е. даже при задании всех начальных концентраций белков 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 которого будем искать в следующем виде:

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

где  $\lambda$  – инкремент неустойчивости.

Тогда получим систему из четырех алгебраических линейных уравнений:

$$\begin{aligned} \lambda \left(1 + 4\varepsilon_x x^* + \frac{4m\varepsilon_x \delta_s x^*}{(1 + \varepsilon_x \delta_s (x^*)^2)^2}\right) \alpha + B_x \alpha + \\ + \frac{2A_x \varepsilon_x \delta_x z^*}{1 + \varepsilon_x \delta_x (z^*)^2} \zeta e^{-\lambda \tau_x} = 0, \end{aligned} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \lambda (1 + 4\varepsilon_y y^*) \beta + B_y \beta + \\ + \frac{2A_y \varepsilon_x \delta_y x^*}{1 + \varepsilon_x \delta_y (x^*)^2} \alpha e^{-\lambda \tau_y} = 0, \end{aligned} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \lambda (1 + 4\varepsilon_z z^*) \zeta + B_z \zeta + \\ + \frac{2A_z \varepsilon_y \delta_z y^*}{1 + \varepsilon_y \delta_z (y^*)^2} \beta e^{-\lambda \tau_z} = 0, \end{aligned} \quad (24)$$

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

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

$$e^{\lambda(\tau_x + \tau_y + \tau_z)} \left( \lambda \left( 1 + 4\varepsilon_x x^* + \frac{4m\varepsilon_x \delta_y x^*}{(1 + \varepsilon_x \delta_y (x^*)^2)} \right) + B_x \right) \times \\ \times (\lambda(1 + 4\varepsilon_y y^*) + B_y) (\lambda(1 + 4\varepsilon_z z^*) + B_z) + \\ + \frac{8A_x A_y A_z \varepsilon_x \varepsilon_y \varepsilon_z \delta_x \delta_y \delta_z x^* y^* z^*}{(1 + \varepsilon_x \delta_y (x^*)^2)(1 + \varepsilon_y \delta_z (y^*)^2)(1 + \varepsilon_z \delta_x (z^*)^2)} = 0. \quad (26)$$

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

$$\frac{8B_x B_y B_z \varepsilon_x \varepsilon_y \varepsilon_z \delta_x \delta_y \delta_z (x^* y^* z^*)^3}{A_x A_y A_z} = -1. \quad (27)$$

Учитывая, 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 раскатать 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

$$\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z \equiv \varepsilon, \quad \delta_x = \delta_y = \delta_z \equiv \delta, \\ \tau_x = \tau_y = \tau_z \equiv \tau, \quad A_x = A_y = A_z \equiv A, \quad (28) \\ B_x = B_y = B_z \equiv B, \quad m = 0.$$

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

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

Система (20) сводится к одному уравнению третьей степени:

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

которое определяет единственное действительное и положительное решение. Уравнение (26) в

симметричном случае (27) может быть преобразовано в следующий вид:

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

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 решение для инкремента неустойчивости в явном виде:

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

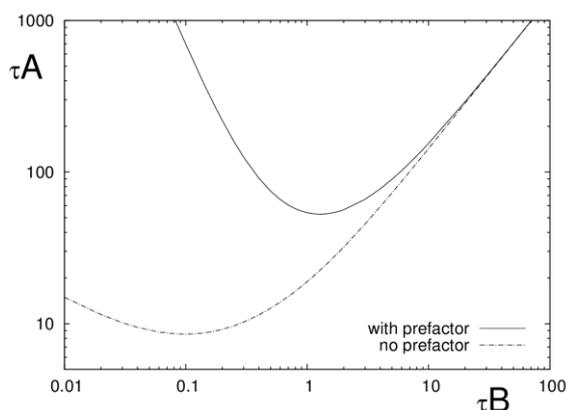
а нейтральная кривая для бифуркации Андронова–Хопфа определяется условием  $\lambda = i\omega$ , где  $\omega$  – частота осцилляций предельного цикла в момент его ответвления.

Обсудим процедуру нахождения нейтральной кривой устойчивости для равновесия (30). Специфика динамических систем с запаздыванием заключается в том, что уравнения для нахождения спектра в рамках линейного анализа устойчивости не сводятся к полиномиальному уравнению, а представляют собой комбинацию степенных и экспоненциальных функций. Это несколько усложняет анализ, так как требуется найти все корни в общем случае системы нелинейных алгебраических уравнений. В отличие от полиномиального уравнения, корни которого выстраиваются в хорошо понятную иерархию, задаваемую теоремой Виета, в данном случае требуется обратить внимание на то, чтобы не пропустить какой-то корень (такая опасность, особенно для многомерных нелинейных уравнений, всегда остаётся). Уравнение (32) задает спектр значений инкремента неустойчивости для рассматриваемой задачи. Классическая схема линейного анализа требует нахождения всех значений инкремента возмущений для фиксированного набора значений параметров. Поэтому в выражении (32) требуется предварительно извлечь все корни из  $\sqrt[3]{-1}$  и отдельно рассмотреть каждый соответствующий инкремент на предмет его опасности для устойчивости равновесия. Например, нейтральная кривая для симметричного репрессилатора, приведенная на рис. 3 была получена для пары комплексно сопряженных корней, которые оказались наиболее опасными в данном случае. Для несимметричного репрессилатора введение функции Ламберта не представляется возможным, поэтому нахождение спектра возмущений требует решать численно нелинейное алгебраическое уравнение (26), в котором также надо отыскивать все корни и выделять среди них наиболее опасные.

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:

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

Рис. 3 показывает, как могут различаться результаты, полученные по формулам (32) и (33). Положение минимумов нейтральных кривых отличаются 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.



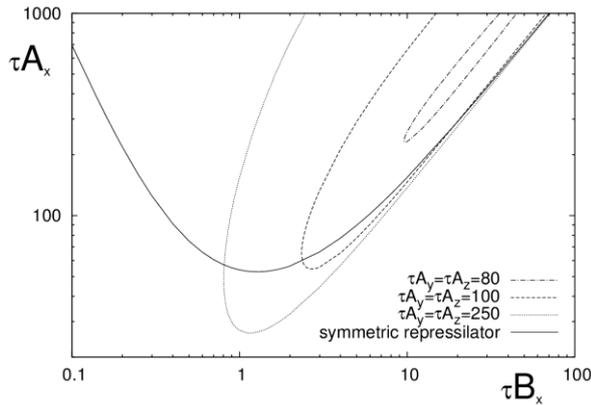
**Рис. 3.** Нейтральная кривая для бифуркации Андронова–Хопфа для сим-метричного репрессилатора при учете полного баланса молекул белка (сплошная линия) и без такого учета (штриховая линия). Результаты представлены на плоскости параметров  $\tau A$  и  $\tau B$ . Кривые получены при  $\varepsilon = 0.1$ ,  $\delta = 0.2$ . Колебательная неустойчивость развивается выше кривой

Стоит отметить, что модель (18,19), предложенная в [2], явно не учитывает этот эффект, хотя, очевидно, неявно предполагает регуляцию транскрипции димерами белка – это видно по квадратичному слагаемому в знаменателе функции Хилла (второе слагаемое справа в уравнении (18) представляет собой частный случай функции Хилла, которая активно используется в математической биологии [28] для построения моделей живых систем, так как она хорошо описывает отрицательную обратную связь при сохранении положительного значения слагаемого, что важно, когда мы имеем дело с

концентрациями веществ). Коэффициент Хилла, который задаёт значение степени, соответствует структуре белка, участвующего в регуляции: например, для мономеров это значение равно 1, для димеров – 2, для тетрамеров – 4 и т.д. Интересно сравнить результаты для линейной устойчивости репрессилатора (рис. 3) и авторепрессора [19]. Минимум нейтральной кривой Андронова-Хопфа в тех же координатах, что и на рис. 3, лежал гораздо выше: если у авторепрессора это  $\tau B = 17$ ,  $\tau A = 381$ , то у симметричного репрессилатора из трёх генов:  $\tau B = 1.3$ ,  $\tau A = 52.8$ . 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. 4 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  $\tau A_Y$  и  $\tau A_Z$  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. 4). 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 условиях следует признать у симметричного репрессилатора. В этой связи следует отметить, что беспокойство авторов репрессилатора [2] на тему о том, заработает ли их соединение трёх 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 ДНК-накопителя для белка X, которое определяется количеством сайтов  $m$  для связывания димеров (рис. 5). Ненулевое зна-



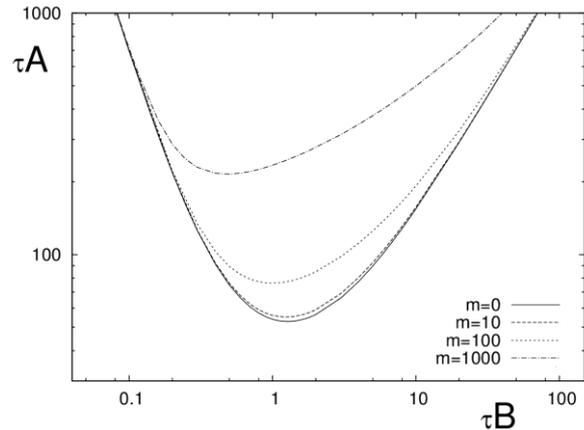
**Рис. 4.** Нейтральные кривые для бифуркации Андронова–Хопфа для симметричного (сплошная линия) и несимметричного (штриховые линии) репрессилатора. Результаты представлены на плоскости параметров производства  $\tau A_x$  и деградации  $\tau B_x$  белка первого гена и разных фиксированных значениях этих же параметров для других генов, указанных на рисунке. Остальные параметры фиксированы и принимают значения:  $\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = 0.1$ ,  $\delta_x = \delta_y = \delta_z = 0.2$ ,  $\tau B_y = \tau B_z = 5$

*Примечание:* Использованы параметры симметричного репрессилатора такие же, как на рис. 3. Колебательная неустойчивость развивается выше нейтральных кривых

чение 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 существенной 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 ДНК-накопителя они перестают участвовать в регуляции. Поэтому этот процесс в чём-то аналогичен процессу деградации белка. Однако молекулы при этом не выводятся из системы, и через некоторое время, когда концентрация белка X уменьшается, они освобождают сайты и вновь участвуют в регуляции. Таким образом, концентрация белка X не может в системе уменьшиться ниже некоторого критического значения.

#### 4. Заключение

Перечислим основные результаты работы. Выведена математическая модель репрессилатора, которая учитывает в общем белковом балансе как свободные мономеры, так и мономеры, заключенные в димерных структурах. Кроме того, в модели учтены новые элементы, которые были использованы в недавних экспериментальных работах. Показано, что единственное состояние



**Рис. 5.** Нейтральные кривые для бифуркации Андронова–Хопфа для несимметричного (штриховые линии) и симметричного (сплошная линия) репрессилатора. Специальный ДНК-накопитель для белка X, который имеет  $m$  сайтов для связывания, создаёт несимметричность ре-репрессилатора. Результаты представлены на плоскости параметров производства  $\tau A$  и деградации  $\tau B$  белков. Остальные параметры фиксированы и принимают значения:  $\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = 0.1$ ,  $\delta_x = \delta_y = \delta_z = 0.2$

равновесия системы может терять устойчивость только колебательным образом. Последовательно изучена линейная устойчивость системы по отношению к колебательным возмущениям. Показано, что важную роль в модели играет точный баланс количества белковых молекул в системе. Это выражается в появлении в модельных уравнениях префакторов, которые оказывают существенное влияние на устойчивость репрессилатора. Игнорирование этого фактора приводит к смещению нейтральной кривой для бифуркации Андронова–Хопфа более чем на порядок величины. Показано, что несимметричный репрессилатор при прочих равных обстоятельствах является более устойчивым, так как система ориентируется на самый стабильный элемент генной сети. Выявлено влияние ДНК-накопителя, который стабилизирует работу репрессилатора.

#### Список литературы

1. 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. N. 2. P. 229–33. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90691-H
2. Elowitz M. B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators // *Nature*. 2000. Vol. 403. P. 335–338.

- DOI: 10.1038/35002125
3. Gao X. J., Elowitz M. B. Synthetic biology: Precision timing in a cell // *Nature*. 2016. Vol. 538. P. 462–463.
  4. Hasty J., Dolnik M., McMillen, D., Collins J. J. Designer gene networks: Towards fundamental cellular control // *Chaos*. 2001. Vol. 11. P. 207–220. DOI: 10.1063/1.1345702
  5. 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. DOI: 10.1126/science.1172005
  6. Daniel R., Rubens J. R., Sarpeshkar R., Lu T. K. Synthetic analog computation in living cells // *Nature*. 2013. Vol. 497. P. 619–623. DOI: 10.1038/nature12148
  7. Bonnet J., Yin P., Ortiz M. E., Subsoontorn P., Endy, D. Amplifying genetic logic gates // *Science*. 2013. Vol. 340. P. 599–603. DOI: 10.1126/science.1232758
  8. 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. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.048
  9. 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. DOI: 10.1038/nature0350
  10. 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. DOI: 10.1038/nature07389
  11. Tiggens M., Marquez-Lago T. T., Stelling J., Fussenegger M. A tunable synthetic mammalian oscillator // *Nature*. 2009. Vol. 457. P. 309–312. DOI: 10.1038/nature07616
  12. 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. DOI: 10.1038/nature19841
  13. Лихошвай В. А., Хлебодарова Т. М., Колчанов Н. А. Компьютерный ресурс «Генетический конструктор» для моделирования молекулярно-генетических процессов в бактериальной клетке: анализ циклической геновой цепи // Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2010. С. 392–404.
  14. Danino T., Mondragón-Palomino O., Tsimring L., Hasty J. A synchronized quorum of genetic clocks // *Nature*. 2010. N.463. P. 326–330. DOI: 10.1038/nature08753
  15. Prindle A. Optimization of a gene oscillator using transcriptional time delay // Senior thesis. Sup. R. Murrey. California Institute of Technology, Pasadena, 2009.
  16. Лихошвай В. А., Матушкин Ю. Г., Фадеев С. И. Задачи теории функционирования геновых сетей // Сибирский журнал индустриальной математики. 2003. Т. 6. № 2. С. 64–80.
  17. Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L. Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation // *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005. Vol. 102. N. 41. P. 14593–14598. DOI: 10.1073/pnas.0503858102
  18. Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L. Non-Markovian processes in gene regulation // *Proceeding of SPIE*. 2005. Vol. 5845. P. 210–219. DOI: 10.1117/12.609707
  19. Брауун 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.
  20. 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. DOI: 10.1093/emboj/20.1.109
  21. Sriram K., Gopinathan M. S. A two variable delay model for the circadian rhythm of *Neurospora crassa* // *Journal of Theoretical Biology*. 2004. Vol. 231. P. 23–38. DOI: 10.1016/j.jtbi.2004.04.006
  22. Брауун Д. А., Захаров А. П. Моделирование пространственно-временной динамики циркадианных ритмов *Neurospora crassa* // Компьютерные исследования и моделирование. 2011. Т. 3, № 2. С. 191–213.
  23. Захаров А. П., Брауун Д. А. Синхронизация циркадианных ритмов в масштабах гена, клетки и всего организма // Компьютерные исследования и моделирование. 2013. Т. 5. № 2. С. 255–270.
  24. Брауун 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.
  25. Bratsun D. A., Zakharov A. P., Pismen L. M. Chemo-mechanical elastic modeling of carcinoma development // *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine*. 2016. Vol. 3. No. 1. P. 19–29.
  26. 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 // *Journal of Biological Physics*. 2016. V. 42. No. 1. P. 107–132. DOI: 10.1007/s10867-015-9395-y
  27. Демиденко Г. В., Колчанов Н. А., Лихошвай В. А., Матушкин Ю. Г., Фадеев С. И. Математическое моделирование регулярных контуров геновых сетей // Журнал вычислительной математики и математической физики. 2004. Т. 44. № 12. С. 2276–2295.
  28. Мюррей Дж. Математическая биология. Т. 1. Введение. Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2009. 774 с.

## References

1. 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, pp. 229–33. DOI: 10.1016/0378-1119(92)90691-H
2. Elowitz M.B., Leibler S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. *Nature*, 2000, vol. 403, pp. 335–338. DOI: 10.1038/35002125
3. Gao X. J., Elowitz M. B. Synthetic biology: Precision timing in a cell. *Nature*, 2016, vol. 538, pp. 462–463.
4. Hasty J., Dolnik M., McMillen D., Collins J. J. Designer gene networks: Towards fundamental cellular control. *Chaos*, 2001, vol. 11, pp. 207–220. DOI: 10.1063/1.1345702
5. Friedland A. E., Lu T. K., Wang X., Shi D., Church G., Collins J. J. Synthetic gene networks that count. *Science*, 2009, vol. 324, pp. 1199–1202. DOI: 10.1126/science.1172005
6. Daniel R., Rubens J. R., Sarpeshkar R., Lu T. K. Synthetic analog computation in living cells. *Nature*, 2013, vol. 497, pp. 619–623. DOI: 10.1038/nature12148
7. Bonnet J., Yin P., Ortiz M. E., Subsoontorn P., Endy, D. Amplifying genetic logic gates. *Science*, 2013, vol. 340, pp. 599–603. DOI: 10.1126/science.1232758
8. 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, pp. 1272–1281. DOI: 10.1016/j.cell.2009.04.048
9. Fung E., Wong W. W., Suen J. K., Bulter T., Lee S., Liao J. C. A synthetic gene-metabolic oscillator. *Nature*, 2005, vol. 435, pp. 118–122. DOI: 10.1038/nature0350
10. 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, pp. 516–519. DOI: 10.1038/nature07389
11. Tigges M., Marquez-Lago T. T., Stelling J., Fussenegger M. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature*, 2009, vol. 457, pp. 309–312. DOI: 10.1038/nature07616
12. Potvin-Trottier L., Lord N. D., Vinnicombe G., Paulsson J. Synchronous long-term oscillations in a synthetic gene circuit. *Nature*, 2016, vol. 538, pp. 514–517. DOI: 10.1038/nature19841
13. Likhoshvai V. A., Kolchanov N. A., Khlebodarova T. M. *Komp'yuternyj resurs "Geneticheskij konstruktor" dlya modelirovaniya molekulyarnogeneticheskix protsessov v bakterial'noj kletke: analiz tsiklicheskoj gennoj tsepi. Rol' mikroorganizmov v funkcionirovanii zhivyx sistem: fundamental'nye problemy i bioinzhenernyye prilozhenija* (Computer resource "Genetic constructor" for modeling molecular genetic processes in bacterial cells: analysis of cyclic genetic chain. Role of microorganisms in the functioning of living systems: fundamental problems and bioengineering applications). Novosibirsk: SB RAS, 2010. P. 392–404 (in Russian).
14. Danino T., Mondragón-Palomino O., Tsimring L., Hasty J. A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 2010, no. 463, pp. 326–330. DOI: 10.1038/nature08753
15. Prindle A. *Optimization of a gene oscillator using transcriptional time delay*. Senior thesis, Sup. R. Murrey, California Institute of Technology, Pasadena, 2009.
16. Likhoshvai V. A., Matushkin Yu.G., Fadeev S. I. Problems in the theory of the functioning of genetic networks. *Journal of Applied and Industrial Mathematics*, 2003, vol. 6, no. 2, pp. 64–80.
17. Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L. Delay-induced stochastic oscillations in gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, vol. 102, no. 41, pp. 14593–14598. DOI: 10.1073/pnas.0503858102
18. Bratsun D., Volfson D., Hasty J., Tsimring L. Non-Markovian processes in gene regulation. *Proceeding of SPIE*, 2005, vol. 5845, pp. 210–219. DOI: 10.1117/12.609707
19. Bratsun D.A. 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, pp. 421–438 (in Russian).
20. 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, pp. 109–117. DOI: 10.1093/emboj/20.1.109
21. Sriram K., Gopinathan M. S. A two variable delay model for the circadian rhythm of *Neurospora crassa*. *J. Theor. Biol.*, 2004, vol. 231, pp. 23–38. DOI: 10.1016/j.jtbi.2004.04.006
22. Bratsun D. A. Modelling spatio-temporal dynamics of circadian rhythms in *Neurospora crassa*. *Computer Research and Modeling*, 2011, vol. 3, no. 2, pp. 191–213 (in Russian).
23. Zakharov A. P., Bratsun D. A. 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, pp. 255–270 (in Russian).
24. Bratsun D.A., Zakharov A. P., Pismen L. M. Multiscale mathematical modeling occurrence and growth of a tumour in an epithelial tissue. *Computer Research and Modeling*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 585–604 (in Russian).
25. Bratsun D. A., Zakharov A. P., Pismen L. M. Chemo-mechanical elastic modeling of carcinoma development. *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine*, 2016, vol. 3, no. 1, pp. 19–29.
26. 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. *Journal of Biological Physics*, 2016, vol. 42, no. 1, pp. 107–132.  
DOI: 10.1007/s10867-015-9395-y
27. 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, no. 12, pp. 2166–2183.
28. Murray J. D. *Mathematical biology: I. An introduction*. Springer-Verlag, 1979. 767 p.

**Просьба ссылаться на эту статью в русскоязычных источниках следующим образом:**

Брацун Д. А., Лоргов Е. С., Полюянов А. О. Об устойчивости репрессилатора с запаздывающей экспрессией генов // Вестник Пермского университета. Физика. 2018. № 2 (40). С. 75–87. doi: 10.17072/1994-3598-2018-2-75-87

**Please cite this article in English as:**

Bratsun D. A., Lorgov E. S., Poluyanov A. O. On the repressilator stability with time-delayed gene expression. *Bulletin of Perm University. Physics*, 2018, no. 2 (40), pp. 75–87. doi: 10.17072/1994-3598-2018-2-75-87