

УДК 573.2:573.22

DOI: <https://doi.org/10.11603/mie.1996-1960.2019.1.10110>

МЕРЕЖЕВА ОСНОВА ФУНКЦІОНУВАННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОСЦИЛЯТОРІВ — ТРИГЕРІВ КОЛИВАЛЬНИХ ЛАНЦЮГІВ У КЛІТИНАХ І БЕЗКЛІТИННИХ СИСТЕМАХ. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

О. П. Мінцер, В. М. Заліський, Л. Ю. Бабінцева

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика

В аналітичному дослідженні розглядаються експериментальні та теоретичні дослідження в області кількісного системного аналізу ролі біологічних осциляторів — тригерів коливальних ланцюгів у клітинах і безклітинних системах. Біологічні осцилятори управляють сплесками активності нейронів, клітинними циклами, патернами сну та пробудження, а також багатьма іншими важливими процесами в живих системах. Передбачається, що кількісні дослідження функціонування біологічних осциляторів допоможуть в попередженні та лікуванні багатьох захворювань людини. За останні десятиліття розвиток методів в області системної і синтетичної біології дозволив намітити шляхи до розшифровки фундаментальних механізмів, що лежать в основі функціонування цих осциляторів. Показано, що істотне значення в подальшому визначенні механізмів функціонування біологічних осциляторів набуває системна та синтетична біологія. Хоча в дослідженнях із функціонування біологічних осциляторів і був досягнутий певний прогрес щодо виявлення особливостей роботи природних і штучних осциляторів, котрі підвищують надійність і якість управління ритмами біологічних реакцій, проте роль багатьох інших другорядних модифікацій залишається маловивченою. Для її розуміння необхідні подальші як теоретичні так і експериментальні дослідження. Вкрай важливою в просуванні системної та синтетичної біології стає роль розвитку інструментів і методів біоінформатики, а вже усталені кількісні підходи системної та синтетичної біології в трансдисциплінарному підході із залученням сучасних методик інших областей знань.

Ключові слова: біологічні осцилятори, складні мережі, системна біологія, синтетична біологія, фундаментальні механізми, тригери.

THE NETWORK BASIS OF THE FUNCTIONING OF BIOLOGICAL OSCILLATORS — OSCILLATOR CIRCUIT TRIGGERS IN CELLS AND CELL-FREE SYSTEMS. ANALYTICAL REVIEW

O. P. Mintser, V. M. Zaliskyi, L. Yu. Babintseva

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Background. An analytical study examines experimental and theoretical studies in the field of quantitative system analysis of the role of biological oscillators — oscillatory circuit triggers in cells and cell-free systems. Biological oscillators control bursts of neuronal activity, cell cycles, sleep and wake patterns, as well as many other important processes in living systems. It is assumed that quantitative studies of the functioning of biological oscillators will help in the prevention and treatment of many human diseases.

Results. Over the past decades, the development of methods in the field of systemic and synthetic biology has made it possible to outline ways to decipher the fundamental mechanisms underlying the functioning of these oscillators. It is shown that systemic and synthetic biology acquires significant importance in further determining the mechanisms of functioning of biological oscillators. Although research on the functioning of biological oscillators has made some progress in identifying features of the functioning of natural and artificial oscillators that increase the reliability and quality of rhythms control of biological reactions, however, the role of many other minor modifications remains poorly understood. To understand it, further theoretical and experimental research is needed.

Conclusions. The role of developing tools and methods of bioinformatics becomes extremely important in promoting systemic and synthetic biology, and the already established quantitative approaches of systemic and synthetic biology in a transdisciplinary approach involving modern techniques of other fields of knowledge.

Key words: biological oscillators complicated network, systemic biology, synthetic biology, fundamental mechanisms, triggers.

СЕТЕВАЯ ОСНОВА ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСЦИЛЛЯТОРОВ — ТРИГГЕРОВ КОЛЕБАТЕЛЬНЫХ ЦЕПЕЙ В КЛЕТКАХ И БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

О. П. Минцер, В. Н. Залесский, Л. Ю. Бабинцева

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика

В аналитическом исследовании рассматриваются экспериментальные и теоретические изыскания в области количественного системного анализа роли биологических осцилляторов — триггеров колебательных цепей в клетках и бесклеточных системах. Биологические осцилляторы управляют всплесками активности нейронов, клеточными циклами, паттернами сна и пробуждения, а также многими другими важными процессами в живых системах. Предполагается, что количественные исследования функционирования биологических осцилляторов помогут в предупреждении и лечении многих заболеваний человека. За последние десятилетия развитие методов в области системной и синтетической биологии позволило наметить пути к расшифровке фундаментальных механизмов, лежащих в основе функционирования этих осцилляторов. Показано, что существенное значение в дальнейшем определении механизмов функционирования биологических осцилляторов приобретает системная и синтетическая биология. Хотя в исследованиях по функционированию биологических осцилляторов и был достигнут определённый прогресс в выявлении особенностей работы естественных и искусственных осцилляторов, повышающих надёжность и качество управления ритмами биологических реакций, однако роль многих других второстепенных модификаций остаётся малоизученной. Для её понимания необходимы дальнейшие как теоретические, так и экспериментальные исследования. Крайне важной в продвижении системной и синтетической биологии становится роль развития инструментов и методов биоинформатики, а уже устоявшиеся количественные подходы системной и синтетической биологии в трансдисциплинарном подходе с привлечением современных методик других областей знаний.

Ключевые слова: биологические осцилляторы, сложные сети, системная биология, синтетическая биология, фундаментальные механизмы, триггеры.

Введение. Одним из основных вопросов понимания молекулярных коммуникационных технологий является обеспечение и поддержание общих знаний о времени. Биологические осцилляторы — потенциальные решения для оценки временных характеристик в молекулярных коммуникационных технологиях, поскольку они генерируют колебания через строго периодические колебания в концентрациях молекул. Крайне важно иметь возможность анализа параметров осцилляторов. Действительно, автоколебания — вездесущие и жизненно важные явления в живых системах. Их периодичность отмечена в широком спектре биологических процессов, таких как активация нейронных ансамблей, сердечные ритмы, клеточные циклы, циркадные ритмы и так далее. Однако они остаются окончательно неисследованными из-за сложности строения и разнообразия, иерархической структуры этих осцилляторных единиц, рассматриваемых в рамках «теории динамического хаоса [3, 5]».

Количественные методы системной и синтетической биологии за последние годы достигли существенного развития в определении генов, белков и метаболитов, участвующих в ритмических колебаниях. Так типичным осциллятором, который можно найти в базах данных, является клеточный цикл, поиск последнего по сайту KEGG позволяет обнаруживать сотни регуляторных молекул с осцилляторными свойствами [26].

Биологические осцилляторы не только сложны, но и представляются чрезвычайно разнообразными по своим динамическим характеристикам и составу [2]. Временные характеристики характеризуются исключительной шириной от субсекундных нервных всплесков до суточных циркадных ритмов и ежегодных ритмов процессов роста. Таким образом, модели осцилляторов охватывают величины нескольких порядков.

Примерами биологических осцилляторов и их сетевых структур являются: кальциевый ток в кардиомиоцитах [53], клеточный цикл у эмбрионов [26, 90], внутренние биологические часы у Zebrafish [55], циркадный ритм у млекопитающих [13], потенциал действия нейрона [46], колебания p38 в клетках Hela [84], осцилляции NF-κB в фибробластах [91], колебания p53 в клеточных линиях человека [12], а также — в наносетях [77]. К молекулам, являющимися центральными звеньями этих реакций, относятся: цитоплазматические осцилляторы (гликолитические ферменты и малые молекулы метаболитов); мембранные осцилляторы (потенциал действия нейронов, клеток проводящей системы сердца) формируются в рамках регуляторных ионных каналов; генетические осцилляторы (наборы специфических генов, участвующих в кооперативной регуляции процессов внутри клетки) [56, 66, 77].

Осцилляторы выполняют несколько глобальных функций. Большинство из них функционируют как эндогенные ритмы водители и существуют для приспособления организмов к природной смене день/ночь с периодом, примерно, 24 часа [13, 33]. Осцилляторы водителя ритма сердца также играют определённую роль в пространственной организации развития периодических событий сердечной ткани [14].

Через возбудимые среды местный колебательный сигнал может индуцировать появление триггерных волн, распространяющихся на большие расстояния гораздо быстрее, чем при диффузной передаче [1, 34]. В качестве примеров триггерных волн можно назвать осцилляции с анизотропным магнетосопротивлением (AMP) в ходе процессов клеточной агрегации и дифференцировки [35], а также митотические волны в бесклеточном экстракте из *Xenopus* [20].

В качестве альтернативы, в многомерных системах фазовые различия между периодическими событиями в клетках (как функции их пространственного местоположения) могут приводить к появлению другого типа волны, называемой фазовой волной [64]. Наряду с функцией ритмоводителей циркадные осцилляторы могут генерировать частотно-модулированные сигналы, участвующие в снижении регуляции экспрессии генов и влияющие на судьбу клетки в целом [48]. Подобные изменения происходят при частотно-временном кодировании в нейронных сетях [8], на фоне позитивной колебательной динамики NF-κB – осцилляций [61], р53 [12], р38 [84], кальциевого тока в клетках проводящей системы сердца [15].

Вопрос о том, является ли этот механизм общим для всех этих осцилляторов, вызывает большой интерес. Однако фундаментальные процессы, лежащие в основе периодических колебаний, остаются окончательно нераскрытыми из-за высокой сложности и разнообразия биологических осцилляторов. Поэтому изучение фундаментальных механизмов действия осцилляторов имеет большое значение для диагностики и лечения заболеваний человека. Важно также подчеркнуть, что решению вопроса может помочь синтетическая биология, которая инициировала создание и развитие осцилляторных цепей, позволила осуществлять анализ их участков на молекулярном уровне.

Цель работы: представить аналитический обзор результатов различных исследований в области количественного системного анализа

роли биологических осцилляторов — триггеров колебательных цепей в клетках и бесклеточных системах. Показать значимость биоинформатики в продвижении системной и синтетической биологии, устоявшиеся количественные подходы которых важны для трансдисциплинарного направления с привлечением современных методик других областей знаний.

Результаты и их обсуждение. Представляется важным более подробное рассмотрение современных достижений системной биологии и синтетической биологии, направленных на уточнение механизмов колебательных свойств на сетевом уровне.

Открытие простых и сложных биологических осцилляторов имеет длительную историю. Первым биологическим осциллятором является потенциал действия в аксонах кальмара. Нобелевские лауреаты Алан Ходжкин и Эндрю Хаксли провели серию «Voltage-clamp» – зависимых измерений мембранного ионного тока [45]. Оказалось, что при определенных условиях, нервная система способна к колебательному поведению, а электрические импульсы повторно генерируются в ответ на стимул. Для интеграции полученных данных они предложили комплекс обычных дифференциальных уравнений [46], что позволило осуществить математическое моделирование серии вольтаж – зависимых токов ионных каналов (например, калия, натрия). Модель была названа их именем (Hodgkin – Huxley model) и явилась отправной точкой для теоретической биофизики потенциала действия [27].

В дальнейшем были открыты повторяющиеся колебания концентраций метаболитов — интермедиатов (в частности, дифосфопиридиннуклеотид) гликолитического пути обмена в мембране клеток суспензии [37], в цитозольной бесклеточной системе у дрожжей (*Saccharomyces carlsbergensis*) [19]. Метаболические реакции, происходящие в условиях затухающих синусоидальных осцилляций, были описаны при помощи шести ОДЭ для фосфофруктокиназы и малых молекул метаболитов, что позволило предсказать существование самоподдерживающихся циклов осцилляторных реакций гликолиза [44]. Подобные длительно функционирующие синусоидальные колебания редуцированного пиридиннуклеотида также выявлялись в клеточных экстрактах дрожжей [74].

Колебательная кинетика синтеза цАМФ [36] и пероксидаза – оксидазных реакций метаболизма

[65] регистрировались в системе, открытой для специфических субстратов, а полученные экспериментально волновые формы подвергались моделированию благодаря использованию модели ветвящейся цепной реакции.

Первый генетический осциллятор был теоретически предсказан в 1963 году [40] вскоре после создания модели генной регуляции, открытой F. Jakob и J. Monod. Этот классический осциллятор содержал только единичный генный метаболит, что позволило предсказать способность данной генетической биоконструкции генерировать циклические колебания еще до обнаружения реально функционирующих генетических осцилляторов. Необходимо отметить существенное отставание экспериментальных исследований по генетическим осцилляторам до момента интенсивного развития методов генной инженерии, а также — оптимизации люминесцентных и флуоресцентных методик микроскопии.

Одними из наиболее характерных генетических осцилляторов являются циркадные часы (circadian clock) обнаруженные фактически во всех клетках эукариот и некоторых прокариот, таких как цианобактерии. Циркадные часы эндогенно управляют автоколебаниями в живых системах: у нейроспоры [21], у цианобактерий [52], дрозофил [43], мышей [10], *arabinopsis* [57].

В этих исследованиях успешно использовался принцип конвергенции экспериментальных измерений и математического моделирования *in silico* анализа, для лучшего понимания того как каждый из этих биологических осцилляторов функционирует в русле происходящих многочисленных событий в отдельных клетках и иерархии сетевых структур [4, 6]. В дальнейшем, количественные подходы были использованы для обнаружения и детальной характеристики многих других биологических осцилляторов [39].

Несмотря на существующий прогресс, достигнутый в понимании роли соответствующих компонентов в функционировании биологических осцилляторов, решение проблем количественного анализа этих колебательных биоструктур в живых системах остается крайне актуальным [2]. Однако главным препятствием является то, что базовая архитектура осциллятора часто встроена в значительно более сложные биологические регуляторные сети. Осциллятор также имеет тенденцию вмешиваться в функционирование сигнальных путей в клетке, либо ограничивать активность других

осцилляторов [25]. Это порождает проблемы изоляции сетевых структур центрального осциллятора для последующих углубленных исследований.

Другим препятствием являются трудности разграничения петель положительной и отрицательной обратной связи с последующим ограничением манипулирования колебательным поведением в живых системах. Для решения этих проблем синтетическая биология сегодня позволяет создать определённую колебательную схему *de novo* (в рамках сетевой структуры), которая может быть подвержена последующему детальному анализу и более точному управлению.

Роль синтетической биологии в понимании природы применения искусственных осцилляторов в живых клетках и бесклеточных системах.

Синтетическая биология находится на стыке многих областей биологических исследований, таких как функциональная геномика, белковая инженерия, химическая биология, метаболическая инженерия, системная биология и биоинформатика [51]. Последние достижения в области современных методов синтеза, анализа и моделирования обеспечили создание инструментальной базы, необходимой для осмысленного управления живыми системами.

В русле высказываний Р. Фейнмана (1988 г.) — «то, что я не могу создать, я не понимаю», синтетическая биология стремится улучшить понимание функций от многочисленных биологических осцилляторов (имеющих различные молекулярные формы) до сетевых осцилляторных структур (характеризующихся обилием общих биологических характеристик). Важно отметить, что деятельность многих из этих структур, по-видимому, сводится к работе основной функциональной архитектуры, содержащей циклы положительной и отрицательной обратной связи.

Начиная с первых шагов в открытии биологических колебаний на основе теоретических разработок, многие исследователи пробовали ответить на вопрос: каковы основные (минимальные) требования к созданию генераторов устойчивых колебаний. При этом они создавали простейшие модели, охватывающие анализ фундаментальных механизмов функционирования различных колебательных систем. Моделирование на основе обычных дифференциальных уравнений оказалось наиболее широко используемым подходом для описания колебательного поведения.

В тоже время, принцип построения логических моделей также применялся в работе со сложными

сетями [75]. К тому же, построение моделей на основе стохастических дифференциальных уравнений часто применяется для анализа работы биологических часов [38, 50].

После обнаружения метаболических колебательных процессов И. Пригожин высказался в отношении нарушений симметрии в неравновесной пространственно-временной самоорганизации диссипативных структур в химических и биологических системах [68]. Данная точка зрения обеспечила концептуальную основу для поддержки последующих исследований многих функциональных свойств биологических осцилляторов на системном уровне [39].

На протяжении нескольких лет для построения точных моделей биологических осцилляторов исследователям требовалось все меньшее и меньшее количество параметров в экспериментальной валидации. Так, изучение осциллятора потенциала действия на модели Ходжкина – Хаксли потребовало более 20-ти исходных параметров [46]. Для построения FHN (Fitz Hugh – Nagumo) модели релаксационного осциллятора мембраны нервной клетки, а позднее ML (Moris – Lecar) модели достаточным оказалось использование уже только двух дифференциальных уравнений, описывающих систему как совокупность петель положительной и отрицательной обратной связи. Несмотря на осуществлённое упрощение базовой архитектуры осциллятора, точная модель позволила определить основной динамический ответ с генерацией пространственных триггерных волн вдоль аксона нейрона [34].

Оказалось, что более упрощенные (менее точные) модели также помогают постулировать фундаментальные требования для проектирования осциллятора. Установлено, что к элементам, необходимым для генерации колебаний лежащих в основе механизма осцилляции, относятся: 1) ингибиторы петли отрицательной обратной связи и 2) источник «запаздывания» в данной петле обратной связи, способствующий устойчивости осциллирующих изменений перед полным ее ингибированием [30].

Создание моделей, основанных на общих чертах биохимических сетей в пределах одной клетки, показывает, что циркадная сеть может надежно колебаться в присутствии стохастического биохимического шума [11]. Однако «запаздывающая» отрицательная обратная связь не позволяет полностью объяснить феномен помехоустойчивости

циркадных ритмов. Кроме того, двухкомпонентный контур осциллятора содержит как активатор, так и репрессор. Поэтому, в дополнение к петле отрицательной обратной связи (сформированной активатором) спонтанно активируется собственный репрессор, приводящий к автоматической активации петли положительной обратной связи. Подобный «принцип проектирования», т. е. связывание петель положительной и отрицательной обратной связи, сегодня широко встречается в биологических осцилляторах [50, 63].

Простой цикл отрицательной обратной связи взаимодействующих генов или белков имеет существенный потенциал для проектирования устойчивых колебаний. Математическое моделирование позволило выявить выраженную работоспособность биологического осциллятора благодаря усилению и задержке сигнала отрицательной обратной связи [86] (на фоне добавочного влияния положительной обратной связи, повышающего надежность и частотный диапазон осцилляторной системы). Эти и другие данные математического моделирования послужили основой для создания искусственных осцилляторов.

Простые синтетические осцилляторы. С развитием генной инженерии стало возможным создание искусственных осцилляторов в реально существующих биологических системах.

В 2000 году Flowitz и Leibler [28] создали первый генетический осциллятор кишечной палочки (на основе синтетической колебательной сети транскрипционных регуляторов), названный репрессилатором (repressilator). В этом осцилляторе три отрицательных транскрипционных регулятора (TetR, lcl1 и Lac1) участвуют в подавлении друг друга, с целью формирования петли отсроченной отрицательной обратной связи. Зеленый флуоресцентный белок (GFP) под контролем промотера TetR использовался для визуализации колебательного поведения системы, подтверждая, что для генерации колебаний достаточно одной отрицательной обратной связи. Тем не менее, они не были устойчивы и только в 40 % клеток выявились осцилляторные движения.

В 2003 году синтезирован первый активатор-репрессор, содержащий генный осциллятор в клетках *E. coli* [9], позволяющий осуществлять синхронизацию колебаний. Однако индицированные колебания со временем затухали, возможно, из-за потери синхронизации между клетками. Последующий генно-инженерный анализ способствовал созданию

образцов модифицированного генного осциллятора с устойчивыми и быстро самонастраиваемыми колебательными (13 мин.) периодами [78]. Этот осциллятор был синтезирован с применением ранее смоделированной сетевой архитектуры, состоящий из связанных циклов положительной и отрицательной обратной связи. Математическое моделирование способствовало выявлению ключевого конструктивного принципа построения такого осциллятора, каким явилась временная задержка в цикле отрицательной обратной связи, возникающая в каскаде клеточных процессов с участием функционального фактора транскрипции.

Первый ген-метаболический осциллятор [31] получил название метаболатор (*metabolator*) в 2005 году. Как и все генетические осцилляторы, созданный синтетический метаболический генератор находился в живых бактериальных клетках. Наряду с этим, первый синтетический осциллятор в клетках млекопитающих появился в 2009 году [81]. Применяв авторегулируемое (*sens-antisense*) управление транскрипцией авторы построили молекулярную сеть, которая была похожа на типичную схему репрессора-активатора, где тетрациклин-зависимый транс активатор (*tTA*) функционирует в качестве активатора, а пристицинамицин – зависимый транс активатор (*PT*) — как репрессор. Последующее развитие этой биосистемы привело к появлению биологического осциллятора с частотой, сопоставимой с циркадной периодичностью [82].

Эти первые исследования сравнительно простых синтетических осцилляторов в реально существующих биологических системах сыграли важную роль в тестировании первоначальных принципов их проектирования и построения на основе теоретических исследований. В последнее годы целый ряд *in silico* проектов был реализован в области создания синтетических осцилляторов генов и регуляторных белков [70, 76, 88].

Сложные синтетические осцилляторы и области их применения. В настоящее время, на фоне расширения линейки синтетических осцилляторов, фокус исследований смещается от создания новых колебательных систем к улучшению существующих осцилляторов с приданием им новых функциональных возможностей и сфер применения.

После объединения данных синтетической биологии, микрофлюидной технологии и компьютерного моделирования для исследования

фундаментальных механизмов, лежащих в основе функционирования биологических осцилляторов, оказалось, что слабая петля положительной обратной связи делает осциллятор более надежным [58].

Построение осциллятора с температурной компенсацией (т. е. генератора с двойной обратной связью и с температурозависимым периодом) [47] позволило создать синтетический образец с самонастраиваемым и длительно устойчивым колебательным (48 мин) периодом для температур в диапазоне от 30°C до 41°C. Данная работа продемонстрировала возможность проектирования надежных синтетических колебательных цепей генов, представляя современные подходы для реинжиниринга и перепрограммирования регулярных систем клеток.

Современные микро флюидные устройства позволяют выявлять разнообразие пространственно-временных волн и создавать синхронизованные осциллирующие сети на уровне клеточных микроколоний [22]. Путем объединения и анализа 12000 таких синхронизованных (*quorum-sensory*) колоний, называемых биопикселями, удалось уточнить механизмы газ фазовой (*gas-phase*) редокс сигнализации в клетке.

Синхронизация микроколоний позволила инициировать создание недорогих биосенсоров (жидкокристаллических дисплеев) для обнаружения тяжелых металлов (таких как мышьяк) путем модуляции частоты колебательного периода, что стало возможным благодаря построению устойчивых осцилляторных цепей в «шумовой» метаболической среде [69].

Регистрация генетических осцилляторов в синтетическом микробном консорциуме (состоящем из двух различных типов клеток-штамма «активатора» и штамма «репрессора», производителей сигнальных белковых молекул, совместно регулирующих экспрессию генов в синтетических осцилляторных цепях обоих штаммов) обеспечила возможность программировать динамику компиляционного взаимодействия клеточных узлов многих штаммов и открыла путь к созданию сложных синтетических тканей и органов в будущем [50].

Сравнительно недавно возникшее новое направление разработки коммуникационных систем для микробных консорциумов, в рамках проектирования микробных экосистем, позволило создать коммуникационные модули (на основе мультиплексного кворума сенсорных цепей) в целях оптимизации способности искусственного органа или ткани к генетической модификации [73].

Важно отметить, что интеграция синтетических компонентов в естественные биологические осцилляторы позволяет модулировать поведение эндогенных ритмических колебаний. Так, в работе [83] авторы создали математическую модель колебательной системы, перестраиваемой по частоте путем добавления металл-регуляторного транскрипционного фактора 1 (MTF1, metal-regulatory transcriptional factor 1) в р53 сигнальный путь клеток млекопитающих, на фоне пополнения расчетной модели синтетическими петлями положительной и отрицательной обратной связи.

В другом исследовании [24] математическое моделирование процесса взаимодействия между циклом клеточного деления и устойчивым синтетическим осциллятором в *E. coli* позволило установить, что смена фаз клеточного цикла негативно влияла на устойчивость частоты колебаний синтетического осциллятора.

Известно, что циркадные осцилляторы являются посттрансляционно регулируемые и влияют на экспрессию генов в аутотрофных цианобактериях. Прошли успешные испытания по трансплантации Kai ABC белковых осцилляторов циркадных часов (с 24-часовым периодом) цианобактерий в не циркадные бактерии кишечной палочки (без своего собственного циркадного ритма) [18]. Данная ортогональная система позволила выявить циркадные колебания Kai C белкового фосфорилирования в синтетическом транскрипционном репортере. Авторы считают трансплантацию циркадного осциллятора возможной для решения широкого спектра задач, включая реинжиниринг.

Роль бесклеточных систем в создании синтетических осцилляторов. Наряду с бактериями и клеточными линиями, биологические осцилляторы активно разрабатываются в бесклеточных системах *in vitro*. По сравнению с живыми клетками бесклеточная система имеет несколько уникальных преимуществ. Во-первых, она обычно содержит только самые важные компоненты, что уменьшает потенциальные помехи от внутриклеточного и внеклеточного средового окружения. Во-вторых, в такую систему удобно вводить белки, мРНК, рекомбинантные плазмиды, малые молекулы и препараты, а также точно настраивать ее колебательные реакции, осуществляя надежный контроль цитотоксичности, эффективности доставки, перекрестных взаимодействий и т. д. Гибкость и специфичность введения биологических молекул позволяет легко проектировать и тестировать

функциональные схемы в бесконечных системах, по сравнению с живыми клетками. При этом учет стационарной функции каждой реакции в отдельности имеет решающее значение для построения математических моделей [29].

Бесклеточные системы внесли существенный вклад в открытие и характеристики биохимических осцилляторов и их роль в качестве центральных митотических регуляторов. Таким регулятором у шпорцевой лягушки оказался белок MPF (Maturation Promoting Factor), впоследствии известный как протеиновый комплекс B1-Cdc1 [54]. В экстракте моллюска удалось обнаружить еще один биохимический осциллятор APC/C (Anaphase-promoting complex or cyclostome) [79], участвующий в конечных этапах митотических событий.

Известно, что в раннем эмбриональном периоде, белок Cdc2-циклин В клеточного цикла функционирует как автономный осциллятор, чей надежный биохимический ритм продолжается даже в период репликации ДНК, или при блокировании митоза [67]. В основе функциональной активности осциллятора лежит контур отрицательной обратной связи: накапливается и активируется митотический Cdc2-циклин В, Cdc2 активирует анафазо-стимулирующий комплекс (APC), который способствует деградации циклина и перевод его в неактивное (межфазное) состояние при митозе. Регуляция Cdc2 также включает контур положительной обратной связи: активатор (Cdc25) стимулирует белок Cdc2-циклин В клеточного цикла на фоне инактивации его ингибиторов (Wee1 и Myt1). В физиологических условиях петли положительной обратной связи могут функционировать как бистабильный триггер митоза, а проектирование биохимических осцилляторов на основе бистабильных триггеров может оказаться крайнее актуальным для микробиологических разработок, таких как регулирование клеточного цикла и других. Кроме того, эти данные способствуют правильному использованию базовой системной логики биохимического осциллятора митоза [67].

Накопленные данные по функционированию биологических осцилляторов — триггеров обеспечили возможность создания принципиально нового направления — синтетическая биология. Эта дисциплина использует синтетические генетические сети для того, чтобы изучить возможности реинжиниринга биологических организмов. Синтетические генетические цепи

были разработаны для отображения временных функций более высокого порядка, обеспечивают создание новых гипотез относительно логических операций в клетках, способствуют производству гетерологичных белков в микроорганизмах. Важно, что созданный набор инструментов расширяет разнообразие синтетических генетических сетей, которые могут быть построены, позволяя использовать основные механизмы, которые было бы трудно достичь *in vivo*.

Путем реконструкции и анализа математического моделирования митотического цикла в бесклеточной системе (*in vitro*) удалось уточнить ключевые особенности механизма действия осцилляторов митоза: 1) формирование петли отрицательной обратной связи; 2) оптимальный период задержки митоза; 3) «нелинейность» развития кинетической реакции; 4) функционирование петли положительной обратной связи, в соответствии с общими требованиями, представляемыми для проектирования биохимических осцилляторов [63].

В бесклеточной системе, наряду с разработкой образцов колебательного контура митоза, также созданы осцилляторы циркадного ритма *in vitro* на основе сразу трех белков (Kai A, Kai B, Kai C) цианобактерий в присутствии АТФ и в условии температурной компенсации [60]. При этом процесс упорядоченного фосфорилирования способствовал управлению осцилляциями одновременно трех белков циркадных часов [72].

Проектирование искусственных регуляторных белковых сетей стало возможным благодаря последним достижениям синтеза целевых биополимеров и репликативных систем *in vitro* [29]. Эти синтетические сети могут выполнять не только различные функции, такие как бистабильное переключение [49], транскрипционно / трансляционные преобразования [80], PCR (polymerase chain reaction) диагностика [50], но также могут вести себя как сетевые осцилляторы в молекулярной экосистеме [32], в транскрипционных сетевых биохимических колебательных системах [42], а также как сетевые осцилляторы неорганических химических реакций, в частности реакций Белоусова – Жаботинского [50].

Последние разработки в области синтетической биологии также позволяют создавать модульные сетевые осцилляторы на основе использования нуклеиновых кислот [89] или органических молекул [74], что оптимизирует возможность математического моделирования биологических триггерных

волн активации Cdk1 в бесклеточных системах *in vitro* [20] и помогает обеспечить пространственно-временную координацию биохимических событий в клетке.

На основе использования теоретических и экспериментальных подходов выявлено и проанализировано множество осцилляторных функциональных модулей (циклов) включающих временные периоды задержки и усиление функционирования петель отрицательной обратной связи [87]. К вспомогательным функциональным модулями биологических осцилляторов относятся: одновременно тестируемая (в рамках гипотезы) роль нескольких колебательных структур [41], а также роль динамических генных регулярных сетей [62] и гипотеза о робастном (устойчивом) состоянии системы в ответ на влияние внешних и внутренних возмущающих факторов) колебательном поведении биологических осцилляторов в регуляторных сетях живых организмов [17].

При помощи методов прогнозирования, используемых в функциональной геномике, биологу в области синтетической биологии значительно легче оценить биологические ансамбли сложных регуляторных сетей путем рационального проектирования генных и белковых цепей на фоне последующего осуществления надежного контроля естественных процессов, таких как экспрессия генов [59].

Наряду с этим, методы машинного обучения [7] и искусственного интеллекта [16] помогают оптимизировать протеиновый синтез в бесклеточных системах. Обладая существенными вычислительными мощностями можно создавать модели более сложных осцилляторных сетей в короткие отрезки времени и повышать пропускную способность моделирования [85]. В последние годы проблемы биологических осцилляторов затронули хронобиологию и хрономедицину [23].

Выводы. 1. Существенное значение в дальнейшем определении механизмов функционирования биологических осцилляторов приобретает системная и синтетическая биология.

2. Хотя в исследованиях по функционированию биологических осцилляторов и был достигнут определённый прогресс в выявлении особенностей работы естественных и искусственных осцилляторов, повышающих надежность и качество управления ритмами биологических реакций, однако роль

многих других второстепенных модификаций остается малоизученной. Для ее понимания необходимы дальнейшие как теоретические, так и экспериментальные исследования.

3. Крайне важной в продвижении системной и синтетической биологии становится роль

развития инструментов и методов биоинформатики, а уже устоявшиеся количественные подходы системной и синтетической биологии в трансдисциплинарном подходе с привлечением современных методик других областей знаний.

Литература.

1. Андронов А. А. Теория колебаний / Андронов А. А., Витт А. А., Хайкин С. Э. – М: Наука. – 1981. – 918 с.
2. Байрамов Ш. К. Новые математические модели биохимических осцилляторов / Байрамов Ш. К. // Биохимия. – 2005. – Том 70. – Вып. 12. – С. 1673-1681.
3. Клиньшов В. В. Синхронизация автоколебательных сетей с запаздывающими связями / Клиньшов В. В., Некоркин В. Н. // Успехи физических наук. – 2013. – Том 183. – № 12. – С. 1323-1336.
4. Лаврова А. И. Метод доминантного параметра в моделировании и анализа динамики биологических осцилляторов 03.01.02 Биофизика. Автореф. на соискание уч. ст. док. физ.-мат. наук / Лаврова А. И. – Санкт-Петербург. – 2018. – 31 с.
5. Патрушев Е. М. Использование автоколебательных систем с хаотической динамикой в системах передачи и обработки слабых измерительных сигналов на фоне преобладающих помех / Патрушев Е. М., Ноздрюхин И. С. // Ползуновский альманах. – 2015. – № 1. – С. 142-143.
6. Чернышева М. П. Временная структура биосистем и биологическое время / Чернышева М. П. – Санкт-Петербург: SUPER, 2016. – 218 с.
7. Anati, R. C., Lee, Y., Sato, T. K. et al. (2014). Machine learning helps identify CHRONO as a circadian clock component. *PLoS Biol.*, 12, e1001840.
8. Ainsworth, M., Lee, S., Cunningham, M. O. et al. (2012). Rates and rhythms: a synergistic view of frequency and temporal coding in neural network. *Neuron*, 75, 572-583.
9. Atkinson, M. R., Savage, M. A., Myers, J. T. et al. (2003). Development of genetic circuit exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in *E. coli*. *Cell*, 113, 597-607.
10. Antioch, M. P., Song, E. J., Chang, A. M. et al. (1997). Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, 89, 655-667.
11. Barkai, N., Leibler, S. (2000). Circadian clocks limited by noise. *Nature*, 403, 267-268.
12. Batchelor, E., Lower, A., Mock, C. et al. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.*, 7, 488.
13. Bell – Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J. et al. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.*, 6, 544-556.
14. Brown, H., Difrancesco, D., Noble, S. (1979). Cardiac pacemaker oscillations and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.*, 81, 175-204.
15. Cai, L., Dalal, C. K., Elowitz, M. B. (2008). Frequency – modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *BMC syst. Biol.*, 2, 75.
16. Cashera, F., Bedau, M. A., Buchanan, A. et al. (2011). Coping with complexity: machine learning optimization of cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 2218-2228.
17. Castillo – Hair, S. M., Villota, E. R., Coronado, A. M. (2015). Design principles for robust oscillatory behavior. *Syst. Synth. Biol.*, 9, 125-133.
18. Chen, A. H., Lobkowicz, D., Young, V. et al. (2015). Transplant ability of circadian clock to a non circadian organism. *Sci. Adv.*, 1, e1500358.
19. Chance, B., Hess, B., Betz, A. (1964). DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 182-187.
20. Chang, J. B., Ferrell, J. B. (2013). Mitotic trigger waves and the spatial coordination of the *Xenopus* cell cycle. *Nature*, 500, 603-607.
21. Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., Loros, J. J. (1997). *Neurospora* wc-1 and wc-2 transcription, photo response and origins of circadian rhythmicity. *Science*, 276, 763-769.
22. Danino, T., Mondragon – Palomino, O., Tsimring, L., Hasty, J. A. (2010). A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 463, 326-330.
23. Dart, A. (2016). Tumor genesis: cancer goes tick tock. *Nat. Rev. Cancer.*, 16, 409.
24. Dies, M., Galera-Laporta, L., Garcia-Ojalvo, J. (2016). Mutual regulation causes co - evhainment between a synthetic oscillatory and the bacterial cell cycle. *Integr. Biol.*, 8, 533-541.
25. Feillet, C., van der Horst, G. T., Levi, F. et al. (2015). Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth. *Front Neural*, 6, 96.
26. Ferrell J. E., Tsai, T. Y., Yang, Q. (2011). Modeling the cell cycle: who do certain circuit oscillate? *Cell*, 144, 874-885.
27. Fitz Hugh R. (1961). Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane. *Biophys J.*, 1, 445-466.
28. Flowitz, M. B., Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network транспирационных регуляторов. *Nature*, 403, 335-338.

29. Forster, A. C., Church, G. M. (2007). Synthetic biology projects in vitro. *Genome Res.*, 17, 1-6.
30. Friesen, W. O., Block, G. M. (1984). What is a biological oscillator? *Am. J. Physiol.*, 246, R847-R853.
31. Fung, E., Wong, W. W., Suen, J. K. et al. (2005). A synthetic gene-metabolic oscillator. *Nature*, 435, 118-122.
32. Fujii, T., Rondelez, Y. (2013). predator-prey molecular ecosystems. *ACS Nano*, 7, 27-34.
33. Gallego, M., Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the trebling of the circadian clock. *Net. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 139-148.
34. Helen, L., Anderson, G. A., Ferrell, J. E. (2014). Spatial trigger waves: positive feedback gets you a long way. *Mol. Biol. Cell.*, 25, 3486-3493.
35. Gerisch, G. (1968). Cell aggregation and differentiation in dictyostelium. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 3, 157-197.
36. Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A. et al. (1975). Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in differentiating dictyostelium cells. *Nature*, 255, 547-549.
37. Ghosh, A., Chance, B. (1964). Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 174-181.
38. Glass, L. (2001). Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature*, 410, 277-284.
39. Goldbeter, A. (Eds). (2007). Special Volume in Memory of Ilya Prigogine: Advances in Chemical Physics. New York: John Wiley Sons Inc. (Biological rhythms as Temporal Dissipative Structure).
40. Goodwin, B. C. (Ed) (1963). A dynamic theory of cellular control processes. New York: Academic Press.
41. Guantes, R., Poyatos, J. F. (2006). Dynamical principles of two-component genetic oscillators. *PLoS Computational Biology*, 2, E30.
42. Hasatanik, K., Leocmach, M., Genot, A. J. et al. (2013). High-throughput and long-term observation of compartmentalized biochemical oscillators. *Chem. Commun. (Cambrig)*, 49, 8090-8092.
43. Hemblen, M. J., White, N. E., Emery, P. T. J. et al. (1998). Molecular and behavioral analysis of four period mutants in *Drosophila melanogaster* encompassing extreme short, novel long, and unorthodox arrhythmic types. *Genetics*, 149, 165-178.
44. Higgins, J. (1964). Alchemical mechanism for oscillation of glycolytic intermediates in yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 51, 989-994.
45. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952). Current carried by sodium and potassium in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.*, 116, 449-472.
46. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117, 500-544.
47. Hussain, F., Gupta, C., Hiening, A. J. et al. (2014). Engineering temperature compensation in a synthetic genetic clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 972-977.
48. Isomura, A., Kageyama, R. (2014). Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. *Development*, 141, 3627-3636.
49. Kim, J., White, K. S., Winfree, E. (2016). Construction of an in vitro bitable circuit from synthetic transcriptional switches. *Mal. Syst. Biol.*, 2, 68.
50. Li, Z., Yang, Q. (2018). Systems and synthetic biology approaches in understanding biological oscillators. *Quant Biol.*, 6 (1), 1-14.
51. Liang, J., Luo, Y., Zhao, H. (2011). Synthetic biology: putting synthesis into biology. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 3 (1), 7-20.
52. Liu, Y., Tsinores, N. F., Johnson, C. H. et al. (1995). Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.*, 9, 1469-1478.
53. Liu, N., Prioris, G. (2008). Disruption of calcium homeostasis and arrhythmogenesis induced by mutations in the cardiac ryanodine receptor and calsequestrin. *Cardiovasc. Res.*, 77, 293-301.
54. Lohka, M. J., Hayes, M. K., Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3009-3013.
55. Mara, A., Holley, S. A. (2007). Oscillators and the emergence of tissue organization during rebrabish gametogenesis. *Trends Cell Biol.*, 17, 593-599.
56. Millins, A., Ueda, H. R. (2017). System biology – derived discoveries of intrinsic clocks. *Front Neurol.*, 8, 25.
57. Millar, A. J., Kay, S. A. (1997). The genetics of photo transduction and circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Bio Assays.*, 19, 209-214.
58. Mondragon – Palomino, U., Danino, I., Selimkhanov, J. et al. (2011). Entrainment of a population of synthetic genetic oscillators. *Science*, 333, 1315-1319.
59. Mukherji, S., van Oudenaarden, A. (2009). Synthetic biology: understanding biological design from synthetic circuits. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 859-871.
60. Nakajima, M., Imai, K., Ito, H. et al. (2005). Reconstruction of circadian of cyanobacteria *Kai C*. *Science*, 308, 414-415.
61. Nelson, D. E., Ihekweaba, A. E., Elliott, M. et al. (2004). Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 306, 704-708.
62. Noman, N., Monjo, T., Moscato, P. et al. (2015). Evolving robust gene regulatory networks. *PLoS One*, 10, e0116258.
63. Novak, B., Tyson, J. J. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Mol. Cell Biol.*, 9, 981-991.
64. Oates, A. C., Morelli, L. G., Ares, S. (2002). Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development*, 139, 625-639.
65. Olsen, O. F., Design, H. (1978). Oscillatory kinetics of the peroxidase-oxidase reactions in an open system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 523, 321-334.

66. O'Neill, J. S., Feeney, K. A. (2014). Circadian redox and metabolic oscillation in mammalian system. *Autacoid Redox Signal*, 20 (18), 2966-2981.
67. Pomerening, J. R., Sontad, E. D., Ferrell, J. E. (2003). Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc 2. *Nat. Cell Biol.*, 5, 346-351.
68. Prigogine, I., Lefever, R., Goldbeter, A. et al. (1969). Symmetry breaking Instability in biological systems. *Nature*, 223, 913-916.
69. Prindle, A., Samayoa, P., Raznikov, I. et al. (2011). A sensing array of radically coupled genetic "bio pixels". *Nature*, 481, 39-44.
70. Purcell, O., Savery, N. J., Grierson, C. S. et al. (2019). A comparative analysis of synthetic genes oscillators. *J. R. Soc. Interface*, 7 (52), 1503-1524.
71. Pye, K., Chance, B. (1966). Sustained sinusoidal oscillations of reduced pyridine nucleotide in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 888-894.
72. Rust, M. J., Markson, J. S., Lane, W. S. et al. (2007). Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science*, 318, 809-812.
73. Scott, S. R., Hasty, J. (2016). Quorum sensing communication modules for microbial consortia. *ACS Synth. Biol.*, 5, 969-977.
74. Semenov, S. N., Kraft, L. J., Ainla, A. et al. (2016). Autocatalytic, bitable, oscillatory networks of biologically relevant organic reactions. *Nature*, 537, 656-660.
75. Sevim, V., Gong, X., Socolar, J. E. (2016). Reliability of transcriptional cycles and yeast cell-cycle oscillator. *PLOS Comput. Biol.*, 6, e000842.
76. Shitiri, E., Varlakos, A. V., Cho, H. S. (2018). Biological oscillators and Nano networks. *Sensore*, 18 (5), E1544.
78. Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M. R. et al. (2008). A fast, robust and final synthetic gene oscillator. *Nature*, 456, 516-519.
79. Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A. et al. (1995). The cyclostome, a large complex containing cyclic-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell.*, 6, 185-197.
80. Tan, C., Sanrabh, S., Brucher, M. P. et al. (2013). Molecular crowding shapes gene expression in syntactic cellular nano systems. *Nat. Nano-technol.*, 8, 602-608.
81. Tigges, M., Marguer-Lago, T. T., Stelliny, J. et al. (2009). A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature*, 457, 309-312.
82. Tigges, M., Denervand, N., Graber, D. et al. (2010). A synthetic low-frequency mammalian oscillator. *Nucleic Acid. Res.*, 38, 2702-2711.
83. Toettcher, J. E., Mock, C., Batchelor, E. et al. (2010). A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17047-17052.
84. Tomida, T., Takekawa, M., Saito, H. (2015). Oscillation of p53 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat. Commun.*, 6, 8350.
85. Trejo, Banos D., Millar, A. J., Sangnineti, G. A. (2015). Bayesian approach for structure learning in oscillating regulatory network. *Bioinformatics*, 31, 3617-3624.
86. Tsai, T. Y., Choi, Y. S., Ma, W. et al. (2000). Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. *Science*, 321, 126-129.
87. Tyson, J. J., Novak, B. (2010). Functional motifs in biochemical reaction networks. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 61, 219-240.
88. Wang, L. S., Wu, F., Flores, K. et al. (2016). Build to understand: synthetic approaches to biology. *Integr. Biol. (Camb.)*, 8 (4), 394-408.
89. Wang, F., Fan, C. (2016). DNA reaction networks: providing a panoramic view. *Nat. Chem.*, 8, 738-740.
90. Yang, Q., Ferrell, J. E. (2013). The Cdk1- APC/C cell cycle oscillator circuit functions as a time-delayed, ultrasensitive switch. *Nat. Cell. Biol.*, 15, 519-525.
91. Zambrano, S., De Toma, I., Pitter, A. et al. (2016). NF-kb oscillations translate into functionally related patterns of gene expression. *Elife*, Jan 14, 5, e09100.

References.

1. Andronov, A. A., Witt, A. A., Khaikin, S. E. (1981). *Teoriya kolebaniy [Theory of Oscillations]*. Moscow: Science. [In Russian].
2. Bayramov, Sh. K. (2005). *Novyye matematicheskie modeli biohimicheskikh ostsillyatorov [New mathematical models of biochemical oscillators]*. *Biohimiya (Biochemistry)*. 70; 12, 1673-1681. [In Russian].
3. Klinshov, V. V., Nekorkin, V. N. (2013). *Sinhronizatsiya avtokolebatelnykh setey s zapazdyvayuschimi svyazymi [Synchronization of self-oscillatory networks with retarded connections]*. *Uspеhi fizicheskikh nauk (Uspekhi Fiz. Nauk)*, 183; 12, 1323-1336. [In Russian].
4. Lavrova, A. I. (2018). *Metod dominantnogo parametra v modelirovanii i analiza dinamiki biologicheskikh ostsillyatorov*, 03.01.02 Biofizika, Avtoref. na soiskanie uch. st. Dok. fiz.-mat. nauk [The method of the dominant parameter in modeling and analysis of the dynamics of biological oscillators, 03.01.02 Biophysics, Author. for the Degree of the Doctor of Phys.-Mat. Sciences]. St. Petersburg. [In Russian].
5. Patrushev, Ye. M., Nozdryuhin, I. S. (2015). *Ispolzovanie avtokolebatelnykh sistem s haoticheskoy dinamikoю v sistemah peredachi i obrabotki slabyykh izmeritelnykh signalov na fone preobladayuschih pomех [Use of auto-oscillatory systems with chaotic dynamics in the systems for transmitting and processing weak measuring signals against the background of prevailing interference]*. *Polzunovskiy almanah (Polzunovsky almanac)*, 1, 142-143. [In Russian].
6. Chernysheva, M. P. (2016). *Vremennaya struktura biosistem i biologicheskoe vremya [Time structure of biosystems and biological time]*. St. Petersburg: SUPER. [In Russian].

7. Anati, R. C., Lee, Y., Sato, T. K. et al. (2014). Machine learning helps identify CHRONO as a circadian clock component. *PLoS Biol.*, 12, e1001840.
8. Ainsworth, M., Lee, S., Cunningham, M. O. et al. (2012). Rates and rhythms: a synergistic view of frequency and temporal coding in neural network. *Neuron*, 75, 572-583.
9. Atkinson, M. R., Savage, M. A., Myers, J. T. et al. (2003). Development of genetic circuit exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in *E. coli*. *Cell*, 113, 597-607.
10. Antioch, M. P., Song, E. J., Chang, A. M. et al. (1997). Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. *Cell*, 89, 655-667.
11. Barkai, N., Leibler, S. (2000). Circadian clocks limited by noise. *Nature*, 403, 267-268.
12. Batchelor, E., Lower, A., Mock, C. et al. (2011). Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol. Syst. Biol.*, 7, 488.
13. Bell – Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J. et al. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.*, 6, 544-556.
14. Brown, H., Difrancesco, D., Noble, S. (1979). Cardiac pacemaker oscillations and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.*, 81, 175-204.
15. Cai, L., Dalal, C. K., Elowitz, M. B. (2008). Frequency – modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *BMC syst. Biol.*, 2, 75.
16. Cashera, F., Bedau, M. A., Buchanan, A. et al. (2011). Coping with complexity: machine learning optimization of cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 2218-2228.
17. Castillo – Hair, S. M., Villota, E. R., Coronado, A. M. (2015). Design principles for robust oscillatory behavior. *Syst. Synth. Biol.*, 9, 125-133.
18. Chen, A. H., Lobkowicz, D., Young, V. et al. (2015). Transplant ability of circadian clock to a non circadian organism. *Sci. Adv.*, 1, e1500358.
19. Chance, B., Hess, B., Betz, A. (1964). DPNH oscillations in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 182-187.
20. Chang, J. B., Ferrell, J. B. (2013). Mitotic trigger waves and the spatial coordination of the *Xenopus* cell cycle. *Nature*, 500, 603-607.
21. Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., Loros, J. J. (1997). *Neurospora* wc-1 and wc-2 transcription, photo response and origins of circadian rhythmicity. *Science*, 276, 763-769.
22. Danino, T., Mondragon – Palomino, O., Tsimring, L., Hasty, J. A. (2010). A synchronized quorum of genetic clocks. *Nature*, 463, 326-330.
23. Dart, A. (2016). Tumor genesis: cancer goes tick tock. *Nat. Rev. Cancer.*, 16, 409.
24. Dies, M., Galera-Laporta, L., Garcia-Ojalvo, J. (2016). Mutual regulation causes co - evhainment between a synthetic oscillatory and the bacterial cell cycle. *Integr. Biol.*, 8, 533-541.
25. Feillet, C., van der Horst, G. T., Levi, F. et al. (2015). Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth. *Front Neural*, 6, 96.
26. Ferrell J. E., Tsai, T. Y., Yang, Q. (2011). Modeling the cell cycle: who do certain circuit oscillate? *Cell*, 144, 874-885.
27. Fitz Hugh R. (1961). Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane. *Biophys J.*, 1, 445-466.
28. Flowitz, M. B., Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network транспирационных регуляторов. *Nature*, 403, 335-338.
29. Forster, A. C., Church, G. M. (2007). Synthetic biology projects in vitro. *Genome Res.*, 17, 1-6.
30. Friesen, W. O., Block, G. M. (1984). What is a biological oscillator? *Am. J. Physiol.*, 246, R847-R853.
31. Fung, E., Wong, W. W., Suen, J. K. et al. (2005). A synthetic gene-metabolic oscillator. *Nature*, 435, 118-122.
32. Fujii, T., Rondelez, Y. (2013). predator-prey molecular ecosystems. *ACS Nano*, 7, 27-34.
33. Gallego, M., Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the trebling of the circadian clock. *Net. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 8, 139-148.
34. Helen, L., Anderson, G. A., Ferrell, J. E. (2014). Spatial trigger waves: positive feedback gets you a long way. *Mol. Biol. Cell.*, 25, 3486-3493.
35. Gerisch, G. (1968). Cell aggregation and differentiation in *dictyostelium*. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 3, 157-197.
36. Gerisch, G., Fromm, H., Huesgen, A. et al. (1975). Control of cell-contact sites by cyclic AMP pulses in *differentiating dictyostelium* cells. *Natuure*, 255, 547-549.
37. Ghosh, A., Chance, B. (1964). Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 174-181.
38. Glass, L. (2001). Synchronization and rhythmic processes in physiology. *Nature*, 410, 277-284.
39. Goldbeter, A. (Eds). (2007). Special Volume in Memory of illya Prigogine: *Advances in Chemical Chysics*. New York: John Wiley Sons Inc. (Biological rhythms as Temporal Dissipative Strueture).
40. Goodwin, B. C. (Ed) (1963). A dynamic theory of cellular control processes. New York: Academic Press.
41. Guantes, R., Poyatos, J. F. (2006). Dynamical principles of two-component genetic oscillators. *PLoS Computational Biology*, 2, E30.
42. Hasatanik, K., Leocmach, M., Genot, A. J. et al. (2013). High-throughput and long-term observation of comport – winterized biochemical oscillators. *Chem. Commun. (Cambrig)*, 49, 8090-8092.
43. Hemblen, M. J., White, N. E., Emery, P. T. J. et al. (1998). Molecular and behavioral analysis of four period mutants in *drosophila melanogaster* encompassing extreme short, hovel long, and unorthodox arrhythmic types. *Genetics*, 149, 165-178.
44. Higgins, J. (1964). Alchemical mechanism for oscillation of glycolytic intermediates in yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 51, 989-994.

45. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952). Current carried by sodium and potassium in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.*, 116, 449-472.
46. Hodgkin, A. L., Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.*, 117, 500-544.
47. Hussain, F., Gupta, C., Hiening, A. J. et al. (2014). Engineering temperature compensation in a synthetic genetic clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 972-977.
48. Isomura, A., Kageyama, R. (2014). Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. *Development*, 141, 3627-3636.
49. Kim, J., White, K. S., Winfree, E. (2016). Construction of an in vitro bitable circuit from synthetic transcriptional switches. *Mal. Syst. Biol.*, 2, 68.
50. Li, Z., Yang, Q. (2018). Systems and synthetic biology approaches in undestaudiny biological oscillators. *Quant Biol.*, 6 (1), 1-14.
51. Liang, J., Luo, Y., Zhao, H. (2011). Synthetic biology: putting synthesis into biology wiley interdiscip. *Rev. Syst. Biol. Med.*, 3 (1), 7-20.
52. Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johuson, C. H. et al. (1995). Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genens Dev.*, 9, 1469-1478.
53. Liu, N., Prioris, G. (2008). Disruption of calcium homeostasis and arrhythmogenesis induced by mutations in the cardiac ryanodine receptor and calsequestrin. *Cardiovasc. Res.*, 77, 293-301.
54. Lohka, M. J., Hayes, M. K., Maller, J. L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an in fracclalar regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3009-3013.
55. Mara, A., Holley, S. A. (2007). Oscillators and the emergence of tissue organization during rebrabish gametogenesis. *Trends Cell Biol.*, 17, 593-599.
56. Millins, A., Ueda, H. R. (2017). System biology – derived discoveries of intrinsic clocks. *Front Neurol.*, 8, 25.
57. Millar, A. J., Kay, S. A. (1997). The genetics of photo transduction and circadian rhythms in *Arabinopsis*. *Bio Assays.*, 19, 209-214.
58. Mondragon – Palomino, U., Danino, I., Selimkhanov, J. et al. (2011). Entrainment of a population of synthetic genetic oscillators. *Science*, 333, 1315-1319.
59. Mukherji, S., van oudenaarden A. (2009). Synthetic biology: understanding biological desigual from synthetic circuits. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 859-871.
60. Nakajima, M., Imai, K., Ito, H. et al. (2005). Reconstruction of circadian of cyanobacteria *Kai C*. *Science*, 308, 414-415.
61. Nelson, D. E., Ihekwebaba, A. E., Elliott, M. et al. (2004). Oscillations in NI-kb signally control the dynamics of gene expression. *Science*, 306, 704-708.
62. Noman, N., Monjo, T., Moscato, P. et.al. (2015). Evolving robust gene regulatory networks. *PLOS One*, 10, e0116258.
63. Novak, B., Tpson, J. J. (2008). Design principles of biochemical oscillators. *Nat. Mol. Cell Biol.*, 9, 981-991.
64. Oates, A. C., Morelli, L. G., Ares, S. (2002). Patterning embryos with oscillations: structure, function and dynamics of the vertebrate segmentation clock. *Development*, 139, 625-639.
65. Olsen, O. F., Design, H. (1978). Oscillatory kinetics of the peroxidase- oxidase reactions in an open system. *Biochim. Biophys. Acta.*, 523, 321-334.
66. O’Neill, J. S., Feeney, K. A. (2014). Circadian redox and metabolic oscillation in mammalian system. *Autacoid Redox Signal*, 20 (18), 2966-2981.
67. Pomerening, J. R., Sontad, E. D., Ferrell, J. E. (2003). Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of *Cdc 2*. *Nat. Cell Biol.*, 5, 346-351.
68. Prigogine, I., Lefever, R., Goldbeter, A. et al. (1969). Symmetry breaking Instability in biological systems. *Nature*, 223, 913-916.
69. Prindle, A., Samayoa, P., Raznikov, I. et al. (2011). A sensing array of radically coupled genetic “bio pixels”. *Nature*, 481, 39-44.
70. Purcell, O., Savery, N. J., Grierson, C. S. et al. (2019). A comparative analysis of synthetic genes oscillators. *J. R. Soe. Interface*, 7 (52), 1503-1524.
71. Pye, K., Chance, B. (1966). Sustained sinusoidal oscillations of reduced pyridine nucleotide in a cell-free extract of *S. carlsbergensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 55, 888-894.
72. Rust, M. J., Markson, J. S., Lane, W. S. et al. (2007). Ordered phosphorylation governs oscillation of a three-protein circadian clock. *Science*, 318, 809-812.
73. Scott, S. R., Hasty, J. (2016). Quorum sensing communication modules for microbial consortia. *ACS Synth. Biol.*, 5, 969-977.
74. Semenov, S. N., Kraft, L. J., Ainla, A. et al. (2016). Autocatalytic, bitable, oscillatory networks of biologically relevant organic reactions. *Nature*, 537, 656-660.
75. Sevim, V., Gong, X., Socolar, J. E. (2016). Reliability of transcriptional cycles and yeast cell-cycle oscillator. *PLOS Comput. Biol.*, 6, e/000842.
76. Shitiri, E., Varlakos, A. V., Cho, H. S. (2018). Biological oscillators and Nano networks. *Sensore*, 18 (5), E1544.
78. Stricker, J., Cookson, S., Bennett, M. R. et al. (2008). A fast, robust and final synthetic gene oscillator. *Nature*, 456, 516-519.
79. Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A. et al. (1995). The cyclostome, a large complex containing cyclic-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell.*, 6, 185-197.
80. Tan, C., Sanrabh, S., Brucher, M. P. et al. (2013). Molecular crowding shapes gene expression in syntactic cellular nano systems. *Nat. Nano-technol.*, 8, 602-608.
81. Tigges, M., Marguer-Lago, T. T., Stelliny, J. et al. (2009). A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature*, 457, 309-312.

82. Tigges, M., Denervand, N., Graber, D. et al. (2010). A synthetic low-frequency mammalian oscillator. *Nucleic Acid Res.*, 38, 2702-2711.
83. Toettcher, J. E., Mock, C., Batchelor, E. et al. (2010). A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 17047-17052.
84. Tomida, T., Takekawa, M., Saito, H. (2015). Oscillation of p53 activity controls efficient pro-inflammatory gene expression. *Nat. Commun.*, 6, 8350.
85. Trejo, Banos D., Millar, A. J., Sangnineti, G. A. (2015). Bayesian approach for structure learning in oscillating regulatory network. *Bioinformatics*, 31, 3617-3624.
86. Tsai, T. Y., Choi, Y. S., Ma, W. et al. (2000). Robust, tunable biological oscillations from interlinked positive and negative feedback loops. *Science*, 321, 126-129.
87. Tyson, J. J., Novak, B. (2010). Functional motifs in biochemical reaction networks. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 61, 219-240.
88. Wang, L. S., Wu, F., Flores, K. et al. (2016). Build to understand: synthetic approaches to biology. *Integr. Biol. (Camb.)*, 8 (4), 394-408.
89. Wang, F., Fan, C. (2016). DNA reaction networks: providing a panoramic view. *Nat. Chem.*, 8, 738-740.
90. Yang, Q., Ferrell, J. E. (2013). The Cdk1- APC/C cell cycle oscillator circuit functions as a time-delayed, ultrasensitive switch. *Nat. Cell. Biol.*, 15, 519-525.
91. Zambrano, S., De Toma, I., Pitter, A. et al. (2016). NF- κ B oscillations translate into functionally related patterns of gene expression. *Elife*, Jan 14, 5, e09100.