果蝇昼夜生理节律之细胞质 PER-TIM 间隔定时器的大聚合物模型*

张志强 李丛鑫 谢平 王鹏业†

(中国科学院物理研究所, 软物质物理重点实验室, 北京凝聚态物理国家实验室, 北京 100190)

(2011 年 12 月 27 日收到; 2012 年 4 月 9 日收到修改稿)

昼夜生理节律使得生物体的生理和行为能够适应外界环境的昼夜循环变化. 实验发现在果蝇的细胞质中存在由 PER-TIM 复合体组成的间隔计时器. 本文提出了这个间隔定时器的一种可能的数学模型. 模型的特点是大聚合物, 快速交换, 不同磷酸化位点有不同功能. 模拟结果基本与实验相符, 符合 PER-TIM 间隔定时器的主要时间特征并重现了 per^L 变异细胞系中定时器的特点, 以及 PER 和 TIM 蛋白进入细胞核的三种不同类型的过程.

关键词: PER-TIM 生物钟, 间隔计时器, 翻译后调控

PACS: 87.18.Yt, 82.39.Rt, 87.15.R−, 87.17.Aa

1 引 言

昼夜生理节律是生物体以 24 h 为周期的内在生理和行为震荡, 它使得生物体的生理和行为能够适应外界光, 温度和其他环境因素的昼夜循环. 昼夜节律广泛存在于生物界中, 包括细菌, 真菌, 植物, 动物, 当然也包括人 [1−4].

普遍认为生理节律震荡的核心机理是正负因子组成的转录翻译反馈回路 [1]: 正因子激活钟基因的表达; 钟基因 (驱动节律生物输出) 编码抑制正因子激活的负因子. 结果, 负因子浓度上升, 与正因子结合抑制其激活, 这导致编码负因子基因的转录减少. 磷酸化诱导负因子的降解以减少其浓度, 导致正因子重新激活, 使循环再一次开始. 钟基因能够调控细胞内多个基因的周期性表达, 从而使生物体表现出周期性的生理活性. 这个震荡子可以接受环境的输入, 从而和环境同步 [3]. 对果蝇来说, 正因子是 CLOCK(CLK) 和 CYCLE(CYC), 负因子是 PERIOD(PER) 和 TIMELESS(TIM). CLK 和 CYC 组成异二聚体激活 period(per), timeless(tim) 基因的表达. PER 和 TIM 蛋白在细胞质中合成后, 被转运到细胞核中并结合到 CLK-CYC 蛋白上, 反过来抑制自身基因依赖于 CLK-CYC 的转录 [1,2,5].

近来越来越多的实验表明翻译后调控在昼夜节律的产生机理中扮演着非常重要的角色 (综述见文献 [6]). 翻译后调控包括磷酸化, 复合体形成, 蛋白降解, 转运, 甲基化, 乙酰化和 sumo 化. 翻译后调控对产生 24 h 的周期是必须的. 甚至有人提出翻译后调控可能是生理节律震荡机理的核心, 比如在单核生物蓝细菌中, 核心震荡子就完全是由翻译后调控组成的 [7−10]. 在果蝇中, 已经证明 PER 蛋白的磷酸化及 PER-TIM 蛋白复合体的形成对节律的产生以及正确的周期和相位都是必不可少的 [11]. 普遍认为 PER 和 TIM 在细胞质中缓慢结合形成异二聚体, 异二聚体一旦形成立即进入细胞核中, PER 和 TIM 的结合对应着产生 24 h 昼夜节律周期所必需的延迟 [12−14]. 然而,Meyer 等人用荧光共振能量转移技术研究 PER 和 TIM 的结合, 结果发现与此猜测不同, 翻译产生 PER 和 TIM 蛋白后, 二者立即结合形成异二聚体 [15]. 二者的结合维持约 5 h 后, 在很短时间 (约 40 min) 内迅速解离, 进入细胞核中.

* 国家自然科学基金 (批准号: 10834014, 10974248) 和国家重点基础研究发展计划 (973 计划)(批准号: 2009CB930704) 资助的课题.

† E-mail: pywang@aphy.iphy.ac.cn

© 2012 中国物理学会 Chinese Physical Society

也就是说细胞质中的 PER-TIM 复合体组成一个间隔计时器. 这个间隔计时器是翻译后调控的又一个典型例子. 这个间隔计时器背后形成的机理是什么? 有人提出需要一个额外的回路来解释 [16]. 我们在本文中提出的模型单纯用翻译后的相互作用也很好的模拟出了间隔计时器的效果. 我们提出 PER 蛋白不同位点的磷酸化有不同的作用, 这对生物体正确的生理节律调节可能是必须的 [17]. 本文建立的模型能较好的符合实验结果, 解释了翻译后调控背后的机理.

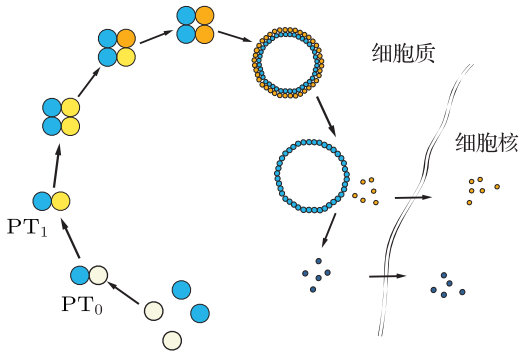

图 1 PER-TIM 间隔定时器模型示意图. PER (淡黄圆形) 和 TIM (蓝色圆形) 蛋白产生后迅速形成异二聚体, 之后 PER 蛋白上的第一个位点磷酸化 (黄色圆形). n 个 PER 第一个位点完成磷酸化的 PER-TIM 异二聚体形成多聚体 (图中 $n = 2$). 在多聚体中, PER 蛋白上的第二个位点开始磷酸化. 不同多聚体中的 PT 单体快速交换. m 个 PER 蛋白两位点都磷酸化 (深黄圆形) 的 PER-TIM 异二聚体组成簇集体. 簇集体一旦形成其中的 PER 蛋白迅速解离并进入细胞核, 而 TIM 继续聚集. 之后被修饰过的 TIM 寡聚体解离并进入细胞核.

2 模型和方法

我们的模型如图 1 所示, PER 蛋白和 TIM 蛋白在细胞质中翻译形成后, 二者迅速形成异二聚体 (PT_0). 我们假设 PER 蛋白上有两个功能不同的磷酸化位点. 形成 PER-TIM 异二聚体后, PER 蛋白上的第一个位点开始磷酸化, 第一个位点磷酸化完成后 (PT_1) 的 n 个 PER-TIM 异二聚体形成多聚体 (本文中多聚体特指第一个位点磷酸化完成后的 n 个 PER-TIM 异二聚体形成的蛋白复合体). 多聚体中 PER 的第二个位点继续磷酸化. 由于我们假设不同多聚体中的 PT 单体存在快速交换, 因此统计 PER-TIM 异二聚体中 PER 蛋白的磷酸化状态代替 PER-TIM 多聚体的磷酸化状态. m 个两位点都磷酸化的 PER-TIM 异二聚体组成簇集体 (本文中簇集体特指两个位点都完成磷酸化的 m 个 PER-TIM 异二聚体形成的蛋白复合体), 簇集体一旦形成, 其中的 PER 蛋白迅速解离 ($P_{\rm pc}$) 并进入细胞核, 而 TIM 继续聚集 ($T_{\rm cluster}$). 之后被修饰过的 TIM 寡聚体解离并进入细胞核. 这些过程可以用下面的方程描述:

$$
\begin{aligned}
\frac{{\rm d}P_{\rm c}}{{\rm d}t} =& k_{\rm dpt0}{\rm PT}_0 - k_{\rm pt0}P_{\rm c}T_{\rm c},\\
\frac{{\rm d}T_{\rm c}}{{\rm d}t} =& k_{\rm dpt0}{\rm PT}_0 - k_{\rm pt0}P_{\rm c}T_{\rm c},\\
\frac{{\rm d}{\rm PT}_0}{{\rm d}t} =& k_{\rm pt0}P_{\rm c}T_{\rm c} - k_{\rm dpt0}{\rm PT}_0 - \frac{v_{\rm pt0p}{\rm PT}_0}{k_{\rm pt0m}+{\rm PT}_0}\\
&+ \frac{v_{\rm pt1dp}{\rm PT}_1}{k_{\rm pt1m}+{\rm PT}_1},\\
\frac{{\rm d}{\rm PT}_1}{{\rm d}t} =& \frac{v_{\rm pt0p}{\rm PT}_0}{k_{\rm pt0m}+{\rm PT}_0} - \frac{v_{\rm pt1dp}{\rm PT}_1}{k_{\rm pt1m}+{\rm PT}_1}\\
&- k_{\rm clu0}{{\rm PT}_1}^n\cdot n\\
&+ k_{\rm clu0r}\cdot\left(\frac{C_1}{C_1+C_2}\right)^n\cdot(C_1+C_2),\\
\frac{{\rm d}C_1}{{\rm d}t} =& k_{\rm clu0}\cdot{{\rm PT}_1}^n\cdot n\\
&- k_{\rm clu0r}\cdot\left(\frac{C_1}{C_1+C_2}\right)^n\cdot(C_1+C_2)\\
&- \frac{v_{\rm c0p}\cdot C_1}{k_{\rm c0m}+C_1} + \frac{v_{\rm c1dp}\cdot C_2}{k_{\rm c1m}+C_2},\\
\frac{{\rm d}C_2}{{\rm d}t} =& \frac{v_{\rm c0p}\cdot C_1}{k_{\rm c0m}+C_1} - \frac{v_{\rm c1dp}\cdot C_2}{k_{\rm c1m}+C_2}\\
&- k_{\rm dclut}\cdot\left(\frac{C_2}{C_1+C_2}\right)^m\cdot(C_1+C_2)\\
&+ k_{\rm dclutr}\cdot P_{\rm pc}^m\cdot T_{\rm cluster}\cdot m,\\
\frac{{\rm d}P_{\rm pc}}{{\rm d}t} =& k_{\rm dclut}\cdot\left(\frac{C_2}{C_1+C_2}\right)^m\cdot(C_1+C_2)\\
&- n_{\rm p}\cdot P_{\rm pc} + c_{\rm p}\cdot P_{\rm pn},\\
\frac{{\rm d}T_{\rm cluster}}{{\rm d}t} =& k_{\rm dclut}\cdot\left(\frac{C_2}{C_1+C_2}\right)^m\cdot\frac{(C_1+C_2)}{m}\\
&- k_{\rm dtt}\cdot T_{\rm cluster},\\
\frac{{\rm d}T_{\rm pc}}{{\rm d}t} =& m\cdot k_{\rm dtt}\cdot T_{\rm cluster} - n_{\rm t}\cdot T_{\rm pc} + c_{\rm t}\cdot T_{\rm pn},\\
\frac{{\rm d}P_{\rm pn}}{{\rm d}t} =& n_{\rm p}\cdot P_{\rm pc} - c_{\rm p}\cdot P_{\rm pn},\\
\frac{{\rm d}T_{\rm pn}}{{\rm d}t} =& n_{\rm t}\cdot T_{\rm pc} - c_{\rm t}\cdot T_{\rm pn},
\end{aligned}
$$

这里的 P, T 分别表示处于游离状态 (没有形成复合体) 的 PER, TIM 蛋白的浓度, 下标 c, pc, pn 分别对应于细胞质中, 细胞质中磷酸化的和细胞核中磷酸化的蛋白. 比如, $P_{\rm pc}$ 代表细胞质中处于游离状态的磷酸化的 PER 蛋白的浓度. 多聚体中 PER 蛋白质有一个位点磷酸化的 PER-TIM 复合体的浓度

用 C_1 表示, 两个位点都完成磷酸化的 PER-TIM 复合体的浓度用 C_2 表示. $T_{\rm cluster}$ 代表 PER-TIM 簇集体中的 PER 蛋白解离后, 剩下的 TIM 组成的寡聚体的浓度. 根据我们的假设, 多聚体和簇集体中共包含有 C_1+C_2 个 PER-TIM 异二聚体. 其中簇集体浓度应该是 $C_2\times p_2^m$, 其中 $p_2=C_2/\left(C_1+C_2\right)$, 是两位点都完成磷酸化的 PER-TIM 异二聚体所占的比例. 簇集体以 $k_{\rm dclut}$ 的速率解离, 这样我们就可以写出簇集体浓度随时间变化的方程. 同理我们可以写出多聚体和 $T_{\rm cluster}$ 形成和解离的动力学方程.

PER 蛋白的磷酸化和去磷酸化用米氏反应动力学描述, 其他的过程都用质量反应定律来描述. 方程中涉及到的反应速率常数都列在表 1 中. 数值主要来自文献 [17]. 我们以尽量与实验结果相符为原则, 结合文献 [17] 并考虑其生物学意义的合理范围, 对这些参数进行了调整. 模型中的关键参数是簇集体大小 m 和多聚体大小 n, 这两个参数决定着 PER-TIM 复合体能否形成间隔定时器. 他们的不同取值对模拟的影响在结果部分第一小节进行了分析. 其他参数的大小不会影响间隔定时器的形成, 只对复合体什么时候解离和解离的快慢有影响. 体现在结果部分第三和第四小节中.

细胞质中 PER 蛋白和 TIM 蛋白的初始浓度设定为 10000 个分子 (约 10^4 nM). 其他反应物的初始浓度都设定为 0.

所有的模拟都是用开源软件 xppaut[18] 完成的.

3 结 果

3.1 m 和 n 的影响

在我们的模型中, 有两个很重要的参数. 它们是 PER 蛋白第一个位点磷酸化后的 PER-TIM 形成的多聚体包含的 PER-TIM 数目 n, PER 蛋白两个位点都磷酸化后的 PER-TIM 形成的簇集体包含的 PER-TIM 数目 m. 变换 n 和 m 的值, 我们观察了模型不同的表现 (图 2). 当 $n=1$ 时, PER-TIM 复合体不能快速解离, PER 也不能迅速进入细胞核. 当 $n=2$ 时, 结果有质的变化, 能够很好的符合实验结果 [15]. PER-TIM 复合体快速解离, PER 迅速进入细胞核 (图 2(a)). 而继续增大 n, 即使增大到 50, PER-TIM 和 PER 浓度随时间的曲线也没有明显的变化. 因此, 我们取定 $n=2$ 进行进一步的分析.

表 1 模型涉及到的反应速率常数

参数名/单位	值	描述
$k_{\rm pt0}/{\rm nM}^{-1}{\rm h}^{-1}$	0.01	PER-TIM 结合速率
$k_{\rm dpt0}/{\rm h}^{-1}$	0.1	PER-TIM 解离速率
$v_{\rm pt0p}/{\rm h}^{-1}$	2000	PER 蛋白第一个位点磷酸化的最大速率
$v_{\rm pt0p}/{\rm nM}$	1000	PER 蛋白第一个位点磷酸化的米氏常数
$v_{\rm pt1dp}/{\rm h}^{-1}$	0.02	PER 蛋白第一个位点去磷酸化的最大速率
$k_{\rm pt1m}/{\rm nM}$	5000	PER 蛋白第一个位点去磷酸化的米氏常数
$k_{\rm clu0}/{\rm nM}^{(n-1)}{\rm h}^{-1}$	0.1	PER-TIM 多聚体的结合速率
$k_{\rm clu0r}/{\rm h}^{-1}$	0.001	PER-TIM 多聚体的解离速率
$v_{\rm c0p}/{\rm h}^{-1}$	2500	PER 蛋白第二个位点磷酸化的最大速率
$k_{\rm c0m}/{\rm nM}$	500	PER 蛋白第二个位点磷酸化的米氏常数
$v_{\rm c1dp}/{\rm h}^{-1}$	10	PER 蛋白第二个位点去磷酸化的最大速率
$k_{\rm c1m}/{\rm nM}$	5000	PER 蛋白第二个位点去磷酸化的米氏常数
$k_{\rm dclut}/{\rm nM}^{(m-1)}{\rm h}^{-1}$	10	PER 蛋白从 PER-TIM 簇集体解离的速率
$k_{\rm dtt}/{\rm nM}^{(n-1)}{\rm h}^{-1}$	1	TIM 簇集体解离的速率
$n_{\rm p}/{\rm h}^{-1}$	5	PER 蛋白从细胞质向细胞核的转运速率
$c_{\rm p}/{\rm h}^{-1}$	0.01	PER 蛋白从细胞核向细胞质的转运速率
$n_{\rm t}/{\rm h}^{-1}$	5	TIM 蛋白从细胞质向细胞核的转运速率
$c_{\rm t}/{\rm h}^{-1}$	0.01	TIM 蛋白从细胞核向细胞质的转运速率

对 m 来说, m 取值 20 以下都与实验结果有较大偏离, m 取值在 20 以上时非线性逐渐增大, PER-TIM 和 PER 浓度随时间的曲线与实验结果越来越接近. 考虑到复合体不可能太大, 我们取一个恰当的值 $m = 50$.

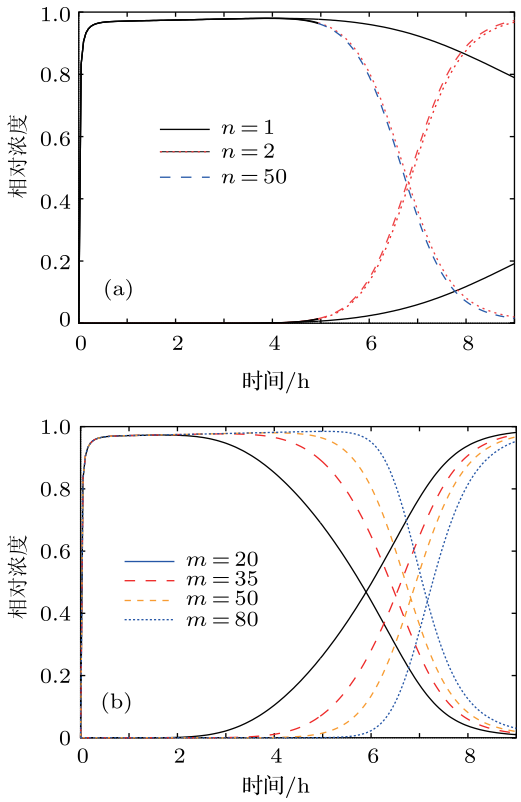

图 2 PER-TIM 多聚体包含的 PER-TIM 数目 n, 簇集体包含的 PER-TIM 数目 m 分别取如图所示各不同值时, 模型所产生的细胞质中处于各种态 (包括 PT_0, PT_1, C_1, C_2) 的 PER-TIM 异二聚体 (下降曲线) 及细胞核中的 PER 蛋白 (上升曲线) 相对浓度随时间的变化曲线. (a) 展示的是 PER-TIM 多聚体包含的 PER-TIM 数目 n 取不同值的情形. 其中 n 取 10, 20 时的曲线与 n 取 50 时的曲线高度重合, 以致肉眼不能区别这三者. 因此没有单独列出 n 取 10, 20 时的曲线. (b) 展示的是簇集体包含的 PER-TIM 数目 m 取不同值的情形

3.2 PER-TIM 迅速解离

确定了模型中的相关参数后, 我们成功地再现了间隔计时器. 计算细胞中 PER-TIM 异二聚体浓度随时间的变化, 包括自由的 PER-TIM 异二聚体以及在多聚体和簇集体中的 PER-TIM 异二聚体. 翻译形成后, 细胞质中的 PER-TIM 浓度迅速达到最大, 这个最大值一直维持到约 5 h, 之后 PER-TIM 异二聚体浓度迅速减少, 同时 PER 蛋白进入细胞核, 细胞核中的 PER 蛋白随着 PER-TIM 异二聚体的减少迅速升高 (图 3), 能够较好地与实验符合.

Meyer 等的实验 [15] 发现 PER, TIM 蛋白形成的 PER-TIM 异二聚体开始均匀分布在细胞质中, 随着时间的推移蛋白逐渐聚集到大亮点 (foci) 中. 我们模拟的结果与实验中观察到的一致, 开始时蛋白大部分处在离散状态的 PER-TIM 异二聚体 (PT_0) 中, 然后 PT_0 逐渐减少, 处于多聚体状态的 C_1, C_2 浓度相继升高. 而 m 个 C_2 将形成簇集体, 这簇集体正对应于实验中观察到的大亮点 (foci).

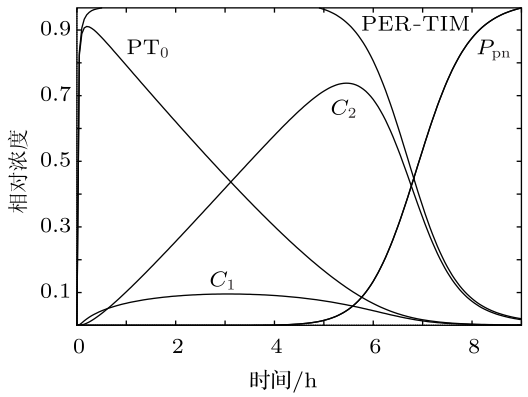

图 3 细胞质中的处于各种态的 PER-TIM 异二聚体 (PER-TIM), 没有磷酸化的 PER 蛋白与 TIM 蛋白组成的 PER-TIM 异二聚体 (PT_0), 多聚体中 PER 第一个位点磷酸化的 PER-TIM(C_1), 多聚体中 PER 两个位点都磷酸化的 PER-TIM(C_2) 及细胞核中的 PER 蛋白相对浓度 (P_{pn}) 随时间的变化. PER-TIM 包括 PT_0, PT_1, C_1, C_2

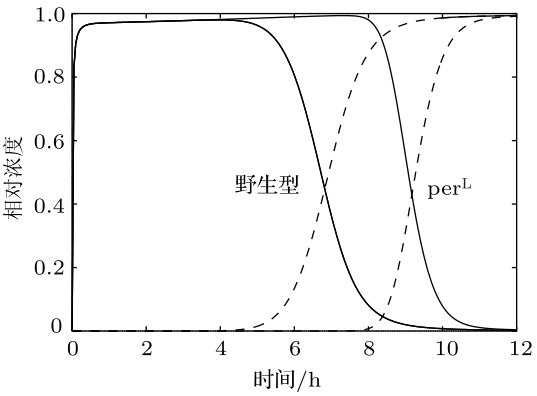

图 4 $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 变异细胞系细胞质中的 PER-TIM 异二聚体相对浓度 (实线) 及细胞核中的 PER 蛋白相对浓度 (虚线) 随时间的变化及其与正常细胞对应量的比较. 靠左的两条曲线对应野生型细胞, 靠右的两条曲线对应 $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 变异细胞

3.3 变异细胞系

我们的模型成功地再现了 Meyer 等人实验中的 $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 变异细胞系表现型 [15]. $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 是昼夜节律周期变为 28 h 的 PER 变异体. 在 $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 细胞系中, 由于磷酸化变慢, PER-TIM 异二聚体的解离

时间延迟为激活后 8.2 h, PER 蛋白向细胞核的输运时间也相应延迟, 我们降低 PER-TIM 异二聚体中 PER 第二个位点的磷酸化速率 (v_{c0p} 由 2500 h^{-1} 变为 1500 h^{-1}), 成功的再现了 $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ 变异细胞系中, PER-TIM 异二聚体解离和 PER 进入细胞核延迟的现象 (图 4).

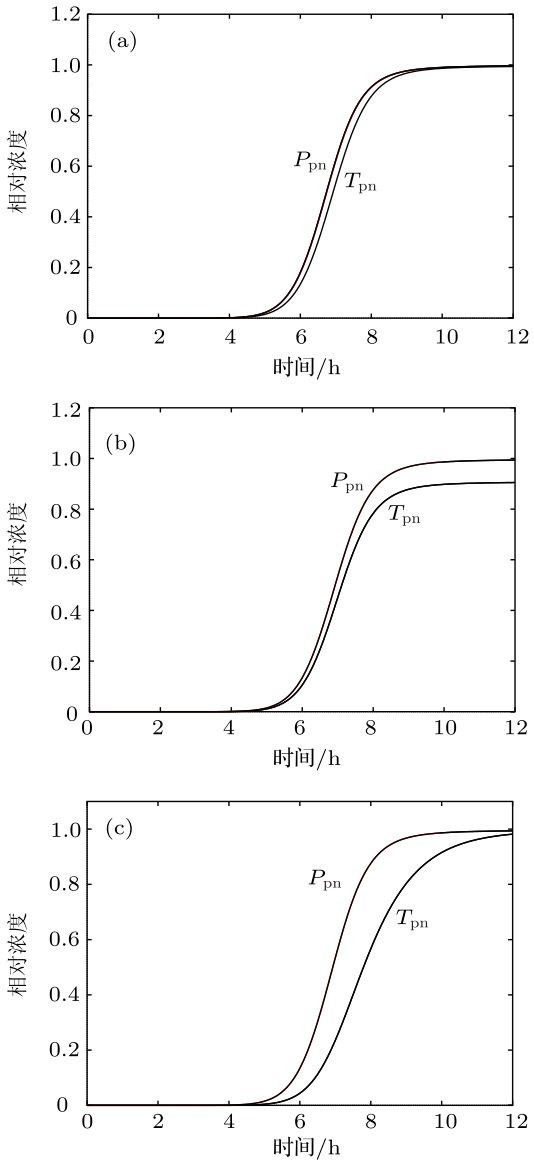

图 5 模型生成的三种不同类型的 PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核时间曲线相互关系 (a) PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核的时间曲线的轮廓和起始时间都相同; (b) PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核的时间曲线的轮廓不同但起始时间相同; (c) PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核的时间曲线的轮廓相同但起始时间不同

3.4 PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核相对时间关系的不同类型

把 PER 蛋白进入细胞核的时间曲线的拐点定义为进入细胞核的起始时间, Meyer 等人发现起始时间集中在一个狭窄范围内: 野生型细胞系中热激活后 340±70 min.

在 Meyer 等人的文章中, 发现 PER 蛋白和 TIM 蛋白并不是同时进入细胞核 [15], PER 蛋白进入细胞核的时间通常早于 TIM 蛋白, 与其他人的实验结果一致 [19]. PER 蛋白和 TIM 蛋白进入细胞核的时间关系可以分成三种类型. 选择合适的参数, 我们的模型能够生成这三种类型 (图 5). 第一种, PER 和 TIM 进入细胞核的起始时间和曲线轮廓都相同. 相对表 1 所列的反应速率参数值, 我们把 TIM 寡聚体解离的速率 k_{dtt} 从 1 $\mathrm{nM}^{(n-1)}\mathrm{h}^{-1}$ 提高到 100 $\mathrm{nM}^{(n-1)}\mathrm{h}^{-1}$, TIM 蛋白从细胞质向细胞核的转运速率 n_{t} 从 5 h^{-1} 提高到 500 h^{-1} 可以产生这种类型. 第二种是二者起始时间相同, 曲线轮廓不同. 相对表 1 中的反应速率参数值, 我们把 TIM 寡聚体解离的速率 k_{dtt} 从 1 $\mathrm{nM}^{(n-1)}\mathrm{h}^{-1}$ 提高到 10 $\mathrm{nM}^{(n-1)}\mathrm{h}^{-1}$, TIM 蛋白从细胞核向细胞质的转运速率 c_{t} 从 0.01 h^{-1} 提高到 0.5 h^{-1}, 可以产生这种类型. 第三种进入曲线轮廓相同, PER 的起始时间早于 TIM 蛋白 25±11 min. 这种类型正是表 1 所列的参数所生成的.

4 讨 论

我们研究了了果蝇昼夜节律的中的一个重要现象的: 细胞质中的 PER-TIM 间隔定时器. PER-TIM 定时器的特殊之处在于, PER-TIM 在很长一段时间保持结合状态, 之后到了特定的时间点, 一起迅速解离并进入细胞核. 要再现这种现象, 需要使不同 PER-TIM 蛋白的状态维持同步, 并有某种机理使得符合特定条件的所有蛋白一起由结合状态迅速变为解离状态. 我们的模型通过多个位点的磷酸化修饰控制 PER-TIM 蛋白的状态, 通过单体的快速交换来维持不同复合体的磷酸化同步. 通过大簇集体来使得蛋白由结合状态迅速变为解离状态. 具体来说, 第一, PER 蛋白有两个磷酸化位点, 不同的磷酸化位点有不同的作用, 通过不同位点磷酸化修饰的控制实现对 PER-TIM 复合体状态的同步和迅速解离; 第二, PER 蛋白第一个位点磷酸化后的多聚体之间有快速的单体交换, 这使得不同多聚体之间的磷酸化程度保持同步; 第三, 两个位点都磷酸化的 PER-TIM 多聚体会形成一个大的簇集体, 之后簇集体解离, 这使得多个 PER-TIM 复合体

都完全磷酸化后, 一起迅速解离, 产生定时器的行为. 这三点是模型最核心的部分. 另外, PER 蛋白先从簇集体解离, 而 TIM 蛋白继续积聚在一起; 这使得 PER 蛋白先于 TIM 蛋白进入细胞核. 而通过调节磷酸化, PER-TIM 二聚化, 蛋白进出细胞核等过程的参数, 再现了 $\mathrm{per^L}$ 突变体和不同的 PER, TIM 进入细胞核的三种不同类型的过程.

模型中的假设与已有的一些实验研究相符. 对昼夜节律震荡的核心因子 PER 蛋白, 已经发现它被激酶 DBT 和 $\mathrm{CK_2}$ 磷酸化 [20], 被磷酸化酶 PP2A 去磷酸化 [21]. 文献 [22] 区分了 PRE 蛋白上的至少 21 个磷酸化位点. 21 个位点中有的距离很近, 这些残基可能形成一组, 其中某个残基的磷酸化会引起其他残基的磷酸化. 我们的模型中简化为假设 PER 蛋白有两个作用效果不同的磷酸化位点, 这对生物体正确的生理节律调节可能是必须的. 有许多研究表明蛋白不同的磷酸化状态有不同的生物效应 [8,17,23,24]. 而在 Meyer 等人的实验中发现 PER 蛋白和 TIM 蛋白形成异二聚体后, 开始均匀分布在细胞质中, 之后逐渐聚集, 形成离散的大亮点 (foci). 因此我们假设 PER-TIM 异二聚体会形成包含多个 (比如 50 个) 异二聚体的簇集体, 对应于实验中观察到的离散的大亮点. 另外, 在解释蓝细菌中完全由蛋白形成的昼夜节律震荡的模型中,Emberly 等 [7] 也假设了存在大聚集体并且多聚体中的不同单体存在快速交换.

与 Meyer 等人的实验结果相比, 我们的模型 PER-TIM 解离不够快. 实验中在约 1 h 的时间内解离, 而在我们的模型中需要 2 h 多才能解离. 这可能是由于存在我们的模型还没有包含的机理能够进一步加快解离速度, 需要进一步的实验和理论研究.

总之, 我们提出了果蝇细胞质中 PER-TIM 间隔定时器形成的一种可能的机理. 其中包含两个实验可以验证的设想: 多个 PER-TIM 蛋白形成大的簇集体, 不同 PER-TIM 多聚体之间存在快速的单体交换. 这为实验上进一步研究 PER-TIM 间隔定时器的产生机理提供了一种思路.

[1] Bell-Pedersen D, Cassone V M, Earnest D J, Golden S S, Hardin P E, Thomas T L, Zoran M J 2005 *Nat. Rev. Genet.* **6** 544

[2] Allada R, Chung B Y 2010 *Annu. Rev. Physiol.* **72** 605

[3] Rutter J, Reick M, McKnight S L 2002 *Annu. Rev. Biochem.* **71** 307

[4] Levi F, Schibler U 2007 *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47** 593

[5] Williams J, A Sehgal A 2001 *Annu. Rev. Physiol.* **63** 729

[6] Gallego M, Virshup D M 2007 *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 139

[7] Emberly E, Wingreen N 2006 *Phys. Rev. Lett.* **96** 038303

[8] Tomita J, Nakajima M, Kondo T, Iwasaki H 2005 *Science* **307** 251

[9] Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T 2005 *Science* **308** 414

[10] Li C, Chen X, Wang P, Wang W 2009 *PLoS Comput. Biol.* **5** e1000568

[11] Curtin K D, Huang Z J, Rosbash M 1995 *Neuron* **14** 365

[12] Sehgal A, Rothenfluh-Hilfiker A, Hunter-Ensor M, Chen Y, Myers M P, Young M W 1995 *Science* **270** 808

[13] Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown A M, Myers M P, Sehgal A, Young M W, Weitz C J 1995 *Science* **270** 811

[14] Allada R, Emery P, Takahashi J S, Rosbash M 2001 *Annu. Rev. Neurosci.* **24** 1091

[15] Meyer P 2006 *Science* **311** 226

[16] Kuczenski R S, Hong K C, Garcia-Ojalvo J, Lee K H 2007 *PLoS Comput. Biol.* **3** e154

[17] Holmberg C I, Tran S E, Eriksson J E, Sistonen L 2002 *Trends Biochem. Sci.* **27** 619

[18] Ermentrout B, Mahajan A 2003 *APPL. MECH. REV.* **56** B53

[19] Shafer O T, Rosbash M, Truman J W 2002 *J. Neurosci.* **22** 5946

[20] Kivimae S, Saez L, Young M W 2008 *PLoS Biol.* **6** e183

[21] Fang Y, Sathyanarayanan S, Sehgal A 2007 *Genes Dev.* **21** 1506

[22] Schlosser A, Vanselow J T, Kramer A 2005 *Anal. Chem.* **77** 5243

[23] Park K S, Mohapatra D P, Misonou H, Trimmer J S 2006 *Science* **313** 976

[24] Wu R C, Qin J, Yi P, Wong J, Tsai S Y, Tsai M J, O'Malley B W 2004 *Mol. Cell* **15** 937

A big cluster model of the PER-TIM interval timer in drosophila cytoplasm for the circadian clock*

Zhang Zhi-Qiang Li Cong-Xin Xie Ping Wang Peng-Ye†

(*Key Laboratory of Soft Matter Physics, Beijing National Laborartory for Condensed Matter Physics, Institute of Physics, Chinese Academy of Science, Beijing* 100190*, China*)

(Received 27 December 2011; revised manuscript received 9 April 2012)

Abstract

Circadian rhythm makes physiology and behaviors of organisms adapt to the day and night cycle in the environment. Recent experiment indicated a PER-TIM interval timer in Drosophila melanogaster cytoplasm. In this paper, we present a possible mathematical model for this interval timer. The characters of the model are the formation of big clusters, fast exchange and different functions of phosphorylation of different sites. The experimental results on features of the PER-TIM interval timer of mild type and $\mathrm{per}^{\mathrm{L}}$ mutant and on the existence of three different types of temporal profiles of nuclear accumulation of PER and TIM in single cells are reproduced by our simulations.

Keywords: PER-TIM, circadian clock, interval timer, post-translational regulation

PACS: 87.18.Yt, 82.39.Rt, 87.15.R−, 87.17.Aa

* Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 10834014, 10974248), and the National Basic Research Program of China (Grant No. 2009CB930704).

† E-mail: pywang@aphy.iphy.ac.cn