

Математическая модель циркадного осциллятора млекопитающих: взаимодействие с системой NAD⁺/SIRT1 и возрастные изменения экспрессии генов циркадного осциллятора

Н.А. Подколодный^{1,2}, Н.Н. Твердохлеб^{1,3}, О.А. Подколodная¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт вычислительной математики и математической геофизики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

Исследования последнего десятилетия позволяют по-новому посмотреть на возможную связь между процессами старения и циркадным ритмом. Одно из перспективных направлений в этой области появилось в связи с новыми данными относительно участия NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов SIRT1 в интеграции путей регуляции циркадного ритма и метаболизма и новой функции NAD⁺ как «метаболического осциллятора». Представлена модифицированная и расширенная нами наиболее детальная модель циркадного осциллятора, разработанная в 2012 г. J.K. Kim и D.B. Forger. В нее включена дополнительная обратная связь осциллятора с участием генов/белков NAMPT, SIRT1, а также NAM, NAD⁺. Участие транскрипционного фактора CLOCK/BMAL1 в регуляции транскрипции гена *NAMPT* определяет соответствующую ритмичность экспрессии мРНК и белка NAMPT. Поскольку фермент, продукт этого гена, является ключевым в пути биосинтеза и рециклирования NAD⁺, циркадный ритм характерен и для колебания уровня этого кофермента и активности NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов SIRT1. Деацетилирование этим ферментом компонент циркадного осциллятора замыкает обратную связь, опосредуемую этим путем. В частности, среди эффектов SIRT1 в циркадном осцилляторе можно выделить усиление деградации белка *Per2*, усиление транскрипции гена *Bmal1*, деацетилирование хроматина регуляторных областей генов циркадного осциллятора в области E-боксов с последующим подавлением транскрипции. Все эти процессы представлены в предложенной нами расширенной модели циркадного осциллятора. На основе экспериментальных данных об изменениях активности SIRT1 и уровня NAD⁺ с возрастом предпринята попытка исследовать влияние этих возрастных изменений на функционирование циркадного осциллятора. Данные моделирования свидетельствуют о снижении уровня экспрессии ряда генов циркадного осциллятора, в частности *Bmal1* и *Per2*, в старших возрастных группах. Отмечается также увеличение периода циркадных осцилляций. Полученные результаты свидетельствуют, что снижение активности SIRT1, связанное с возрастным нарушением метаболизма NAD⁺, может быть одной из причин нарушений функционирования циркадного осциллятора в супрахиазматических ядрах. Такие нарушения могут повлечь за собой и нарушения циркадных ритмов организма в целом.

Ключевые слова: циркадный ритм; математическое моделирование; SIRT1; NAD⁺; старение.

Computational model for mammalian circadian oscillator: interacting with NAD⁺/SIRT1 pathway and age-related changes in gene expression of circadian oscillator

N.L. Podkolodnyy^{1,2}, N.N. Tverdokhlebl^{1,3}, O.A. Podkolodnaya¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Computational Mathematics and Mathematical Geophysics SB RAS, Novosibirsk

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Studies of the last decade reveal a new sight on the possible link between aging processes and circadian rhythm. New data on the role of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1 in the integration of regulation pathways for circadian rhythms and metabolism as well as data on a new function of the NAD⁺ as the "metabolic oscillator" open a promising direction in this area. In the paper we suggested a modification and extension of the most detailed model for the circadian oscillator developed by Kim and Forger (2012). We included the additional feedback of the oscillator which concerns genes/proteins NAMPT, SIRT1, and also NAM, NAD⁺. The regulation of transcription for gene *NAMPT* by transcription factor CLOCK/BMAL1 determine the appropriate rhythm of mRNA and protein NAMPT expression. Since an enzyme product of this gene is a key in the pathway of biosynthesis and recycling of NAD⁺, therefore the circadian rhythm is also characteristic for the fluctuations in the level of this coenzyme and in the activity of NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. The deacetylation of circadian oscillator components by this enzyme closes the feedback mediated through this pathway. In particular, the effects of SIRT1 in circadian oscillator are the gain of degradation of protein *Per2*, increasing of the gene *Bmal1* transcription, deacetylation of chromatin in regulatory regions of circadian oscillator genes in the E-boxes area with subsequent suppression of transcription. We took into account all of these processes in our extended model of the circadian oscillator. Based on the experimental

data on the aging changes in the activity of SIRT1 and the level of NAD⁺, we attempted to study the effect of these age-related changes on the functioning of the circadian oscillator. Simulation data showed a decrease in expression level of several genes of the circadian oscillator, in particular, *Bmal1* and *Per2*, in the older age groups. In addition, our extended model predicted an increase in the period of oscillations. The results indicate that decrease in SIRT1 activity deal with age-related NAD⁺ metabolic disorder may be one of the reasons for the circadian oscillator dysfunctions in the suprachiasmatic nuclei. Such disorders may result in a breaking of the circadian rhythms in the body as a whole.

Key words: circadian oscillator; mathematical modeling; SIRT1; NAD⁺; aging.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Подкольный Н.Л., Твердохлеб Н.Н., Подкольная О.А. Математическая модель циркадного осциллятора млекопитающих: взаимодействие с системой NAD⁺/SIRT1 и возрастные изменения экспрессии генов циркадного осциллятора. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):848-856. DOI 10.18699/VJ16.201

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Podkolodny N.L., Tverdokhle N.N., Podkolodnaya O.A. Computational model for mammalian circadian oscillator: interacting with NAD⁺/SIRT1 pathway and age-related changes in gene expression of circadian oscillator. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):848-856. DOI 10.18699/VJ16.201

Исследования последнего десятилетия позволяют по-новому посмотреть на возможную связь между процессами старения и циркадным ритмом. Одно из перспективных направлений в этой области появилось в связи с новыми данными относительно участия NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов SIRT1 в интеграции путей регуляции циркадного ритма и метаболизма и новой функции NAD⁺ как «метаболического осциллятора» (Imai, 2010). Практически все биологические процессы в организме модулируются внутренними циркадными часами, которые оптимизируют физиологические и поведенческие характеристики в соответствии с изменяющимися требованиями внешней среды (Reppert, Weaver, 2002; Albrecht, Eichele, 2003; Ko, Takahashi, 2006).

Главный водитель циркадного ритма локализован в супрахиазматических ядрах (СХЯ) гипоталамуса. Он синхронизирует циркадные часы периферических тканей и органов. Центральные и периферические клеточные циркадные осцилляторы имеют схожую молекулярно-генетическую структуру. В основе ее лежит группа высококонсервативных генов (*Clock*, *Bmal1*, *Per1/2/3*, *Cry1/2*, *Rev-erba*, *RORα*), которая образует ядро циркадного осциллятора (ЦО) (Shearman et al., 2000). Часовой механизм функционирует за счет транскрипционно-трансляционных обратных связей между генами/белками ядра ЦО, формирующих осцилляции с периодом близким к 24 часам (Reppert, Weaver, 2002; Albrecht, Eichele, 2003; Ko, Takahashi, 2006). В основе ЦО лежат две базовые отрицательные обратные связи. Во-первых, гетеродимерный транскрипционный фактор CLOCK/BMAL1, связываясь с регуляторными районами генов *Per1/2/3* и *Cry1/2*, активировать их транскрипцию. Белки PER и CRY при достижении критической концентрации образуют гетеродимер и, связываясь с транскрипционным фактором CLOCK/BMAL1, подавляют его активность, а значит, и транскрипцию собственных генов. Вторая обратная связь направлена на регуляцию транскрипции гена *Bmal1* и вовлекает

транскрипционные факторы REV-ERBα and RORα. Ген *Rev-erba*, так же как и гены *Per* и *Cry*, активируется транскрипционным фактором CLOCK/BMAL1. Продукт этого гена – транскрипционный фактор REV-ERBα – подавляет транскрипцию гена *Bmal1*, функционально конкурируя с активатором транскрипции RORα за RRE элемент в промоторе гена *Bmal1*. Это влечет за собой снижение уровня белка BMAL1, а значит, и транскрипционного фактора CLOCK/BMAL1. Таким образом, транскрипционный фактор REV-ERBα, подавляя транскрипцию гена *Bmal1*, подавляет транскрипцию и собственного гена.

Ядро ЦО, и в первую очередь транскрипционный фактор CLOCK/BMAL1, контролирует множество генов вне осциллятора, обеспечивая регуляцию широкого спектра процессов и функций организма в циркадной манере. Некоторые из этих генов образуют дополнительные обратные связи с генами ЦО. Такие связи обеспечивают устойчивость функционирования осциллятора и его связь с другими молекулярно-генетическими системами и путями организма.

Одна из дополнительных обратных связей формируется с участием NAD⁺-зависимой деацетилазы гистонов SIRT1 (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009; Chang, Guarente, 2013; Wang et al., 2016). Ген *Sirt1* экспрессируется повсеместно. Белок SIRT1 локализуется преимущественно в ядре, хотя субклеточная его локализация может изменяться во время развития организма и в ответ на определенные физиологические и патологические стимулы (Tanno et al., 2007). Субстратами SIRT1 являются разнообразные структурные, каталитически активные и регуляторные белки, в том числе транскрипционные факторы семейства FOXO, LXR, HIF-1α, NF-κβ, P53, BMAL1, корегуляторы транскрипции p300, PPARγ коактиватор-1α (PGC-1α), Per2 и др. (Vaziri et al., 2001; Yeung et al., 2004; Bouras et al., 2005; Nemoto et al., 2005; Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009; Lim et al., 2010; Defour et al., 2012; Martínez-Redondo, Vaquero, 2013; Kim et al., 2015). Деацетилирование соот-

ветствующих белков влияет на их активность, стабильность и другие свойства (Haigis, Sinclair, 2010). Таким образом, SIRT1 оказывается вовлеченным в регуляцию широкого спектра процессов в клетке и организме. Его эффекты могут быть связаны с выживанием и дифференцировкой клеток, развитием организма и продолжительностью жизни, метаболизмом, воспалением, развитием нейродегенеративных заболеваний и рака (Cho et al., 2015; Masri, 2015). В целом подчеркивается, что активность SIRT1 критична для поддержания здоровья (Chang, Guarente, 2013; Imai, Guarente, 2014). Мишенями SIRT1 в ядре ЦО могут быть ген и белок BMAL1, белок PER2, а также хроматин в области сайтов связывания CLOCK/BMAL1 (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2009; Chang, Guarente, 2013; Wang et al., 2016). Ферментативная активность SIRT1 зависит от уровня NAD⁺, который в данном случае выступает в роли косубстрата для этой деацетилазы (Revollo et al., 2004; Yoshino et al., 2011; Stein, Imai, 2014). Лимитирующим звеном биосинтеза и рециклирования NAD⁺ является фермент NAMPT. Экспрессия гена *Nampt* регулируется транскрипционным фактором CLOCK/BMAL1 и проявляет циркадные осцилляции на уровне мРНК и белка (Revollo et al., 2004; Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009; Yoshino et al., 2011; Stein, Imai, 2014; Nikiforov et al., 2015). В соответствии с этим уровень NAD⁺, а значит и активность SIRT1, также изменяется с 24-часовым периодом.

Параметры циркадного ритма и экспрессия ряда генов циркадных часов как в СХЯ, так и в периферических тканях претерпевают существенные изменения с возрастом (Kolker et al., 2003; Wyse, Coogan, 2010; Chang, Guarente, 2013; Bonaconsa et al., 2014; Baburski et al., 2016; Banks et al., 2016). Известно также, что с возрастом снижается ферментативная активность SIRT1 (Herranz et al., 2010; Masri, 2015; Poulouse, Raju, 2015).

Цель нашего исследования – моделирование возрастных изменений функционирования циркадных часов, обусловленных влиянием системы NAMPT/NAD⁺/SIRT1, которая регулируется циркадными часами и воздействует на них, модифицируя компоненты циркадного осциллятора.

Предпосылки

Нами модифицирована и развита детальная модель ЦО, разработанная J.K. Kim и D.B. Forger (Kim, Forger, 2012). Эта модель отличается тем, что включает подробное описание компонентов молекулярно-генетического ЦО и регуляторные связи между ними, обеспечивающие функционирование осциллятора. Кроме того, она содержит все компоненты, необходимые для объединения модели ЦО и подсистемы регуляции активности SIRT1, включающей NAD⁺, NAM, ген *Nampt*, а также белки NAMPT и SIRT1. При моделировании мы использовали следующие положения, полученные из литературы.

1. Ген *Nampt* кодирует фермент NAMPT. Промоторная область гена *Nampt* содержит три высококонсервативных у млекопитающих E-боксов (E-box), связывающих транскрипционный фактор CLOCK/BMAL1 (Nakahata et al., 2009). Данный транскрипционный фактор, являющийся главным активатором транскрипции ЦО, обеспечива-

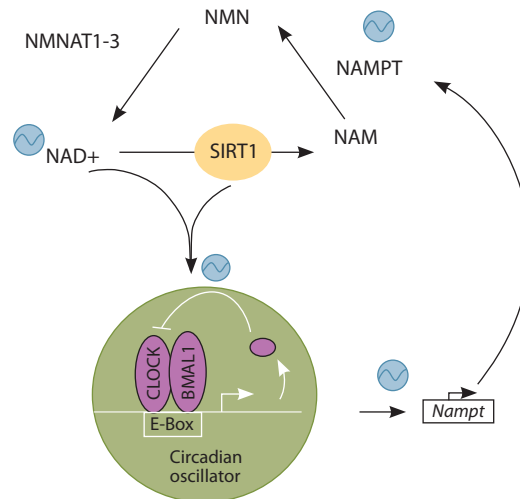


Fig. 1. Schematic representation of the circadian regulation of the NAD⁺ level and SIRT1 activity in mammals.

The *Nampt* gene is directly controlled by the circadian oscillator. Its mRNA and protein levels exhibit circadian oscillations. NAMPT is a key enzyme in NAD⁺ biosynthesis and recycling; therefore, the level of NAD⁺, and hence the SIRT1 activity vary in a rhythmic manner.

- ет ритмический характер экспрессии этого гена. Как мРНК, так и белок NAMPT демонстрируют циркадные осцилляции (Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009).
2. Фермент NAMPT служит лимитирующим звеном рециклирования и биосинтеза NAD⁺ в клетке. Циклические изменения уровня NAD⁺ в клетке являются отражением циркадного характера экспрессии гена и белка NAMPT (Revollo et al., 2004; Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009; Nikiforov et al., 2015).
 3. NAD⁺ является косубстратом деацетилазы гистонов SIRT1. Активность SIRT1 определяется уровнем NAD⁺, и поскольку уровень NAD⁺ меняется в циркадной манере, такой же характер носит и изменение активности SIRT1 (Revollo et al., 2004; Nakahata et al., 2009; Nikiforov et al., 2015) (рис. 1). Продукт реакции деацетилирования белков с участием SIRT1 и NAD⁺, никотинамид (NAM) поступает в систему рециклирования и вновь превращается в NAD⁺ с участием фермента NAMPT. NAM подавляет активность SIRT1. Тем самым SIRT1 контролирует колебательный синтез собственного косубстрата.
 4. Деацетилирование PER2 снижает его стабильность (Asher et al., 2008) (рис. 2). Гетеродимер CLOCK/BMAL1 активирует транскрипцию генов *Per*, *Cry*. Как только уровень белков PER и CRY достигает до некоего критического значения, они формируют комплекс с транскрипционным фактором CLOCK/BMAL1 и репрессируют его активность, тем самым подавляя транскрипцию собственных генов. SIRT1 деацетилюет PER2 в комплексе CLOCK/BMAL1:PER2/CRY. Деацетилированный PER2 подвергается деградации (Asher et al., 2008). Это снижает репрессирующее действие комплекса PER/CRY на CLOCK/BMAL1.
 5. SIRT1 деацетилюет коактиватор транскрипции PGC1 α , тем самым повышая его активность (Nemoto

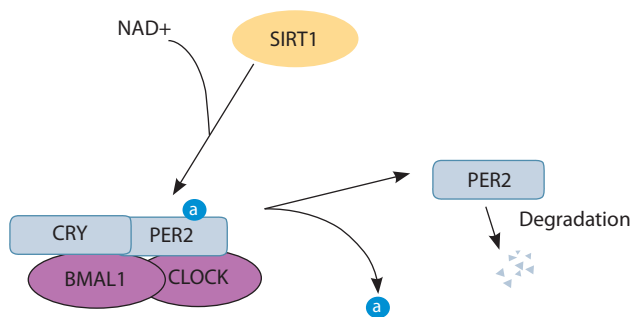


Fig. 2. Schematic representation of the effect of SIRT1 on PER2 deacetylation and degradation.

The PER2/CRY heterodimer (gray bars) binds to CLOCK/BMAL1 transcription factor (open ovals), suppressing its activity. The complex contains acetylated PER2. SIRT1 deacetylates PER2, and the latter is degraded.

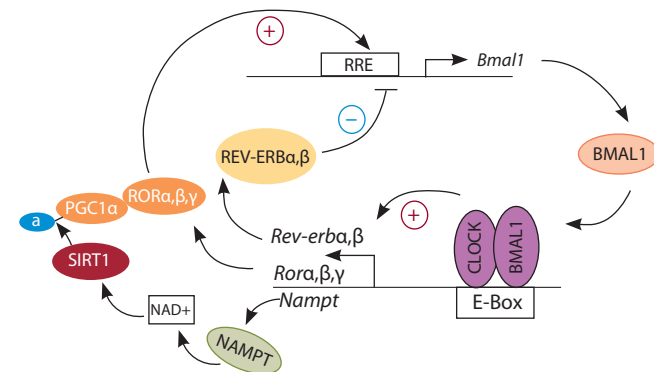


Fig. 3. Schematic representation of SIRT1-mediated *Bmal1* gene activation. Depicted is the oscillating loop that increases the expression of BMAL1 and targets of CLOCK/BMAL1 transcription factor.

et al., 2005; Rodgers et al., 2005; Gurd, 2011). PGC1 α является коактиватором транскрипционного фактора ROR α , участвующего в регуляции транскрипции гена *Bmal1* (Akashi, Takumi, 2005; Liu et al., 2007). Таким образом, SIRT1 участвует в регуляции транскрипции этого гена (Chang, Guarente, 2013) (рис. 3).

6. Деацетилаза SIRT1 привлекается комплексом CLOCK/BMAL1 к E-боксам регуляторных областей циркадных генов и модулирует ацетилирование гистонов, тем самым способствуя ритмическому ремоделированию хроматина и, соответственно, ритмической регуляции транскрипции генов (Nakahata et al., 2008).
7. Уровень NAD⁺ снижается с возрастом (Revollo et al., 2004; Ramsey et al., 2009; Yoshino et al., 2011; Stein, Imai, 2014; Wang et al., 2016).
8. Активность SIRT1 снижается с возрастом (Revollo et al., 2004; Yoshino et al., 2011; Chang, Guarente, 2013; Stein, Imai, 2014; Wang et al., 2016).

Методы

Модификация и расширение математической модели циркадного осциллятора SCN мыши, созданной J.K. Kim и D.B. Forger (Kim, Forger, 2012), выполнена путем добавления в нее следующих подсистем.

1. Путь усиления деградации PER2 после его деацетилирования ферментом SIRT1. Поскольку для подавления активности транскрипционного фактора CLOCK/BMAL1 критичен уровень белка PER2, это действие SIRT1 может быть весьма эффективным регулятором циркадных часов (см. рис. 2). Активность фермента SIRT1 определяется концентрацией NAD⁺. Поэтому данный путь представлен в модели в виде линейной зависимости скорости деградации PER2 в ядре от концентрации NAD⁺.
2. Путь влияния SIRT1 на транскрипцию гена *Bmal1* через активацию корегулятора транскрипции PGC1 α посредством его деацетилирования. Мишенью PGC1 α в системе ЦО, согласно гипотезе (Chang, Guarente, 2013), является транскрипционный фактор ROR α , активирующий транскрипцию гена *Bmal1* (см. рис. 3). В нашей модели влияние активности SIRT1 на транскрипцию

гена *Bmal1* описано линейной зависимостью скорости трансляции гена *Bmal1* от концентрации NAD⁺ с базовым уровнем транскрипции, который соответствует ситуации нокаута гена (мутации *Sirt1*^{-/-}).

3. Путь влияния SIRT1 на скорость освобождения комплекса CLOCK/BMAL1 от E-боксов. В данном случае моделируется эффект SIRT1, проявляющийся в деацетилировании гистонов в области E-боксов, связывающих CLOCK/BMAL1. Для описания этого механизма в модель введена явная зависимость от уровня NAD⁺ нормализованной скорости освобождения комплекса CLOCK/BMAL1 от генов E-боксов *Per1/2*, *Cry1*, гена *Rev-erba* (константы unbin, unbinr соответственно (Kim, Forger, 2012)).
4. Подсистема, включающая NAMPT/NAD⁺/SIRT1 путь. Этот путь представляет обратную связь, которая через регуляцию транскрипции гена *Nampt* транскрипционным фактором CLOCK/BMAL1 приводит к ритмическому накоплению NAD⁺ – косубстрата деацетилазы SIRT1 (см. рис. 1). Механизм регуляции транскрипции гена *Nampt* определяется наличием трех E-боксов в промоторе этого гена и описан в нашей модели аналогично регуляции генов *Per1*, *Per2* и *Cry1* в модели (Kim, Forger, 2012).

Таким образом, мы включили в модель пути, обеспечивающие циркадную регуляцию активности деацетилазы SIRT1, и пути, обеспечивающие эффекты этого фермента в системе ЦО.

Оценка значений вновь добавляемых параметров выполнялась в два этапа. На первом этапе мы нашли значения параметров, которые обеспечивают соответствие динамики концентраций мРНК основных генов ЦО в ядре клетки экспериментальным данным, используемым при идентификации модели (Kim, Forger, 2012), а также уровни и фазы осцилляций мРНК и белка NAMPT, NAD⁺ и NAM, описанных в базе данных CircaDB (<http://circadb.hogeschlab.org/query>), а также в работах (Nakahata et al., 2009; Ramsey et al., 2009).

На рис. 4 представлены кривые относительного уровня мРНК генов *Per2* и *Bmal1*, рассчитанные с помощью нашей расширенной модели ЦО, и значения уровней

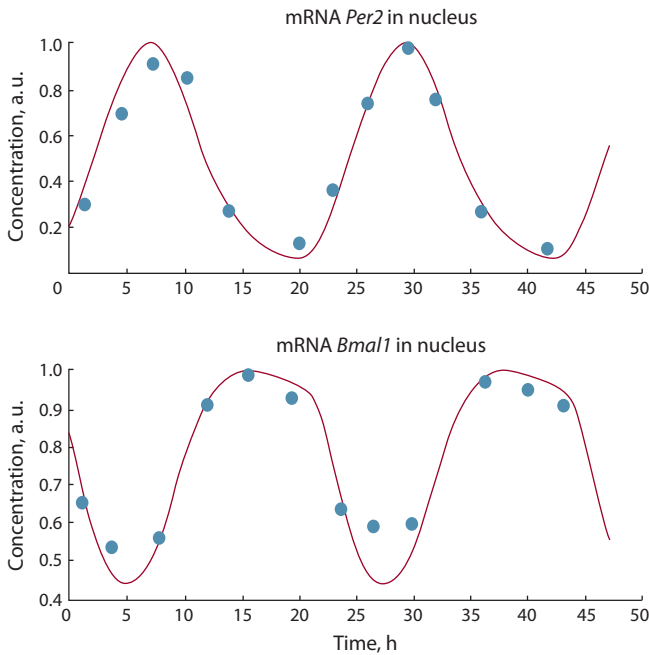


Fig. 4. Comparison of the oscillatory behavior simulated by the extended model for the mRNA *Per2* and *Bmal1* genes with the experimental data. Dots on the curve indicate the experimental data used in Kim & Forger's (2012) model.

экспрессии, полученные в экспериментальных исследованиях (Kim, Forger, 2012). Как видно из рис. 4, изменения, внесенные нами в модель, не нарушили ее адекватности, и кривые осцилляций основных компонент модели соответствуют экспериментальным данным.

На следующем этапе была выполнена подгонка значенных параметров модели с использованием экспериментальных данных, полученных в синхронизированной культуре нативных нейрональных клеток мыши N2a и при деплеции SIRT1 (Chang, Guarente, 2013), а также экспериментальных данных по изменению уровня NAD⁺ у мышей с возрастом (Wang et al., 2016).

Моделирование выполнялось в среде Matlab с использованием решателя ОДУ – ode15s.

Результаты и обсуждение

Математическая модель ЦО млекопитающих, представленная в работе (Kim, Forger, 2012), была модифицирована и расширена нами путем добавления в нее следующих подсистем:

- Подсистема, включающая NAMPT/NAD⁺/SIRT1 путь (см. рис. 1).
- Путь усиления деградации PER2 после его деацетилирования ферментом SIRT1 (см. рис. 2).
- Путь влияния SIRT1 на транскрипцию гена *Bmal1* (см. рис. 3).
- Путь влияния SIRT1 на ингибирование через деацетилирование гистонов функции CLOCK/BMAL1, связанного с E-боксом.

Таким образом, в модель были включены пути, обеспечивающие циркадную регуляцию активности деацетилазы SIRT1, и пути, обеспечивающие эффекты этого фермента в системе ЦО. Расширенная модель представлена в виде си-

стемы 186 обыкновенных дифференциальных уравнений (186 переменных и 81 параметр). Исходная модель (Kim, Forger, 2012) включала 180 переменных и 70 параметров.

Динамика изменения основных компонент расширенной модели ЦО соответствует экспериментальным данным, которые были использованы в исходной модели (Kim, Forger, 2012) (см. рис. 4). Моделирование поведения модели при минимизации активности SIRT1 показало, что экспрессия генов ЦО сохраняет ритмичность в этих условиях (рис. 5). Однако амплитуда колебаний и общий уровень экспрессии ряда генов, в том числе *Per2*, *Bmal1* и *Rev-erb*, снижаются, что согласуется с экспериментальными данными, полученными на синхронизированной культуре нейрональных клеток мыши N2a с деплецией SIRT1 (Chang, Guarente, 2013). Кроме того, отмечено снижение амплитуды осцилляций уровня белка BMAL1 и комплекса CLOCK/BMAL1 – основного позитивного регулятора транскрипции ЦО.

Отметим, что в литературе приводятся противоречивые сведения о влиянии ингибирования/истощения SIRT1 на экспрессию циркадных генов. Так, в работах (Nakahata et al., 2008, 2009) показано, что экспрессия мРНК *Per2* увеличивается в этих условиях, в то время как другими авторами получен противоположный результат (Asher et al., 2008). Поскольку через NAD⁺/SIRT1 путь сигналы (как активирующие, так и ингибирующие транскрипцию генов) могут передаваться как минимум четырьмя механизмами, теоретически возможны оба эффекта. Для того чтобы учесть особенности регуляции через NAD⁺/SIRT1 путь, требуются дополнительные исследования.

Результаты, полученные с помощью нашей модели, находятся в соответствии с выводами (Asher et al., 2008). К аналогичным выводам пришли авторы работы (Luna et al., 2015) при математическом моделировании влияния скорости биосинтеза NAD⁺, а значит, и изменения активности SIRT1 на экспрессию мРНК *Per/Cry*.

Еще один результат, выявленный нами при моделировании поведения ЦО при минимизации активности *Sirt1*, – удлинение периода осцилляций примерно на 3%. Это согласуется с экспериментальными данными (Chang, Guarente, 2013), хотя в упомянутом исследовании период оценивался на основе актограммы BSKO (brain specific SIRT1 knockout) мышей, а не на уровне молекулярно-генетического осциллятора, что может объяснять менее выраженное изменение периода циркадного ритма, чем в нашей модели. Таким образом, поведение разработанной нами модели ЦО соответствует результатам, полученным в эксперименте.

Экспериментальные данные свидетельствуют о снижении экспрессии и активности SIRT1 с возрастом (Chang, Guarente, 2013; Wang et al., 2016). Эти изменения наблюдаются как в печени, так и в супрахиазматических ядрах гипоталамуса. Представленные в литературе сведения позволяют предположить, что возрастное снижение активности SIRT1 может быть обусловлено соответствующим снижением уровня NAD⁺ (Revollo et al., 2004; Yoshino et al., 2011; Stein, Imai, 2014).

Основываясь на экспериментальных данных по возрастной динамике активности SIRT1 (Chang, Guarente, 2013; Wang et al., 2016), мы включили в модель в качестве

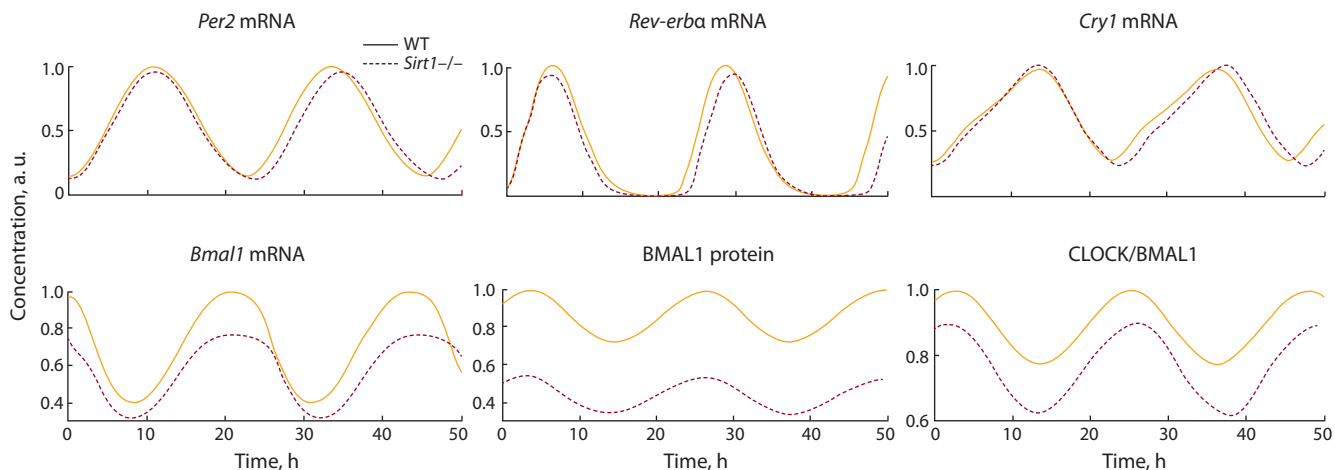


Fig. 5. The oscillatory behavior of *Per2*, *Rev-erba*, *Cry1*, and *Bmal1* mRNAs; BMAL1(B) protein; and the CLOCK/BMAL1 complex in the norm and under the conditions of SIRT1 depletion: simulation with the extended model.

параметра возраст, что позволило моделировать возрастные изменения поведения ЦО. При этом было выявлено снижение экспрессии мРНК генов *Bmal1*, *Per2*, *Rev-erba* и удлинение периода осцилляций с возрастом (рис. 6).

Полученные результаты совпадают с данными целого ряда экспериментальных работ, выполненных на различных организмах и в различных тканях. В частности, при увеличении возраста отмечено снижение экспрессии генов ЦО *Bmal1* и *Per2* в SCN мыши (Chang, Guarente, 2013). Аналогичные изменения выявлены в SCN и других областях мозга сирийского хомячка (Duncan et al., 2013). Наблюдалось снижение экспрессии генов *Bmal1* и *Clock* в SCN мыши в возрасте 16 мес. (Wyse, Coogan, 2010). У крыс в возрасте 24 мес. продемонстрировано снижение экспрессии генов *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3* и *Rev-erba* в клетках Лейдига по сравнению с 3- и 18-месячными животными (Baburski et al., 2016). Следует отметить, что данный результат воспроизводится не во всех исследованиях. Это же касается и удлинения периода осцилляций. Определенное объяснение подобных расхождений экспериментальных данных можно найти в работе (Nakamura et al., 2015), где показано, что с увеличением возраста в клетках SCN происходит удлинение периода свободно текущего циркадного ритма и уменьшение амплитуды. Наиболее выражены эти эффекты при длительном содержании животных в условиях постоянной темноты и менее выражены или не проявляются вовсе при содержании в условиях ритмичной смены света и темноты или при коротком периоде темновой адаптации, предшествующей эксперименту. Авторы объясняют это стимулирующим действием ежедневной циклической смены свет/темнота на молекулярно-генетический ЦО клеток СХЯ, которое маскирует проявление эффектов старения в системе циркадных часов.

Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что возрастное снижение активности SIRT1 может быть одной из причин нарушений функционирования ЦО СХЯ, которые могут повлечь за собой и нарушения циркадных ритмов организма в целом.

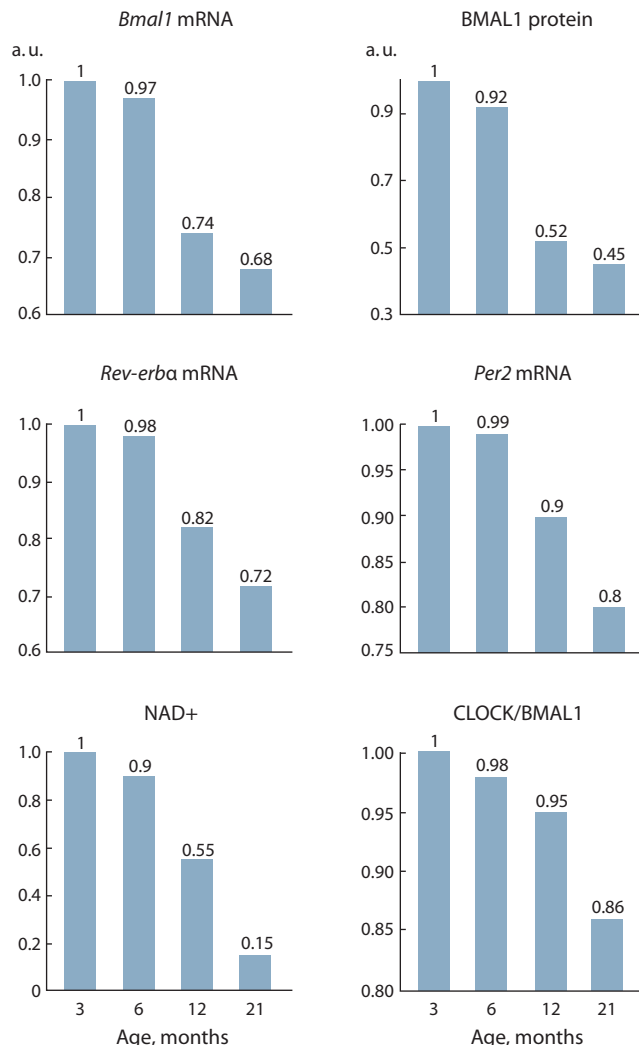


Fig. 6. Variation of the expression of the *Bmal1*, *Per2* and *Rev-erba* genes with age.

Data on the expression at the age of 3, 6, 12, and 21 months calculated with the extended model are presented

Остается открытым вопрос о причинах возрастного снижения активности SIRT1. Как показано в экспериментальных исследованиях, такие изменения, вероятно всего, являются следствием снижения уровня NAD⁺ и/или его доступности для SIRT1, которое может происходить несколькими путями. Прежде всего это возрастные изменения активности фермента NAMPT, зафиксированные экспериментально, происхождение которых пока окончательно не выяснено (Revollo et al., 2004; Yoshino et al., 2011; Stein, Imai, 2014). Вторая причина – увеличивающаяся с возрастом конкуренция за NAD⁺ между SIRT1 и другими NAD⁺ потребляющими ферментами, в частности PARP1, PARP2 и CD38/157 (Imai, Guarente, 2016). Увеличение активности этих ферментов с возрастом происходит из-за нарастания процессов, сопровождающих оксидативный стресс, которые могут проявляться уже в среднем возрасте (Braidy et al., 2011; Massudi et al., 2012). В условиях генотоксического стресса каталитическая активность PARP1 может возрастать более чем в 500 раз, при этом уровень NAD⁺ в клетке снижается до 10–20 % от исходного в течение 5–15 мин (Berger, 1985; Houtkooper et al., 2010). Утверждается, что с учетом соотношения концентрации NAD⁺ и величины констант Михаэлиса (K_m) ферментов PARP1 и CD38/157 для NAD⁺ уровень последнего не является ограничением для их активности в клетке (Houtkooper et al., 2010). Однако указанные ферменты, будучи глобальными потребителями NAD⁺, могут ограничивать его доступность для SIRT1, который характеризуется значительно более высокой K_m . Это, безусловно, может оказывать существенное влияние на активность SIRT1 при увеличении с возрастом экспрессии и активности его конкурентов в потреблении NAD⁺. В подтверждение этого положения можно привести данные об увеличении уровня NAD⁺ и активности SIRT1 у животных с нокаутом или ингибированием генов/белков PARP1 и CD38 (Aksoy et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Houtkooper et al., 2010; Bai et al., 2011; Sahar et al., 2011). Кроме того, у CD38^{-/-} мышей отмечается также изменение параметров циркадного ритма. В частности, фиксируют укорочение его периода, а также увеличение экспрессии генов *Per2* и *Nampt*, что соответствует предположениям, которые могут быть получены из нашей модели (Sahar et al., 2011). Наблюдаются изменения некоторых характеристик циркадных часов и у мышей с нокаутом PARP1 (Asher et al., 2010). Таким образом, конкуренция за доступный NAD⁺ может быть одной из причин возрастных изменений активности SIRT1 и соответствующих изменений параметров циркадных часов.

Закключение

SIRT1 является одним из метаболических сенсоров, реагирующих на различные внешние стимулы. Его деацетилирующая активность направлена на широкий спектр субстратов, среди которых есть и структурные, и регуляторные белки, поэтому изменение активности SIRT1 влияет на самые разнообразные процессы как на клеточном, так и на системном уровне. В данной работе мы предприняли попытку исследовать влияние возрастных изменений активности SIRT1 на состояние ЦО с использованием математического моделирования. При построении модели

мы исходили из экспериментальных данных о мишенях SIRT1 в системе молекулярно-генетического ЦО, а также принимали во внимание зависимость активности SIRT1 от уровня его косубстрата NAD⁺. Наши исследования показали, что изменение активности SIRT1 действительно может оказывать влияние на параметры ЦО, изменяя экспрессию его отдельных компонентов и период осцилляции. Вероятно, возрастные изменения активности SIRT1, вызванные истощением NAD⁺, способствуют разобщению метаболических процессов и суточного ритма, что само по себе может играть важную роль в процессе старения. Исходя из имеющихся экспериментальных данных, мы планируем продолжить работу над расширением модели. Прежде всего в модель будут внесены дальнейшие изменения, касающиеся эффектов SIRT1, которые он может оказывать на отдельные компоненты ЦО. В частности, это еще один потенциальный эффект SIRT1 в ЦО – деацетилирование BMAL1 в комплексе CLOCK/BMAL1 с последующим усилением его деградации.

С использованием нашей расширенной математической модели ЦО млекопитающих в дальнейшем может быть исследован целый ряд задач. Одна из них – изучение влияния возрастных изменений активности SIRT1 на фазовые характеристики осциллятора, а также на характеристики кривой фазной реакции осциллятора в старших возрастных группах. Это направление имеет большое значение, поскольку считается, что снижение способности циркадных часов захватываться внешними сигналами, такими как свет, поступление пищи, часто выявляемое в старших возрастных группах животных и людей, может вызывать рассогласование метаболических систем организма с последующим формированием патологий, развивающихся при старении. Кроме того, несомненно интересным будет дальнейшее расширение модели с включением PARP1 и CD38, конкурирующих за потребление NAD⁺ с SIRT1. Тем более что все три фермента участвуют в регуляции процессов, нарушение которых приводит к формированию патологических состояний, сопровождающих старение (диабет второго типа, рак, воспалительные и нейродегенеративные заболевания).

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 14-24-00123.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Akashi M., Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005;12:441-448.
- Aksoy P., Escande C., White T.A., Thompson M., Soares S., Benech J.C., Chini E.N. Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;349(1):353-359. Epub 2006 Aug 22.
- Albrecht U., Eichele G. The mammalian circadian clock. *Curr. Opin. Genetics Development.* 2003;13(3):271-277.
- Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppele F., Mostoslavsky R., Alt F.W., Schibler U. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell.* 2008;134(2):317-328. DOI 10.1016/j.cell.2008.06.050.

- Asher G., Reinke H., Altmeyer M., Gutierrez-Arcelus M., Hottiger M.O., Schibler U. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. *Cell*. 2010; 142(6):943-953. DOI 10.1016/j.cell.2010.08.016. Epub 2010 Sep 9.
- Baburski A.Z., Sokanovic S.J., Bjelic M.M., Radovic S.M., Andric S.A., Kostic T.S. Circadian rhythm of the Leydig cells endocrine function is attenuated during aging. *Exp. Gerontol.* 2016;73: 5-13. DOI 10.1016/j.exger.2015.11.002. Epub 2015 Nov 4.
- Bai P., Cantó C., Oudart H., Brunyánszki A., Cen Y., Thomas C., Yamamoto H., Huber A., Kiss B., Houtkooper R.H., Schoonjans K., Schreiber V., Sauve A.A., Menissier-de Murcia J., Auwerx J. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metabolism*. 2011;13(4):461-468. DOI 10.1016/j.cmet.2011.03.004.
- Banks G., Nolan P.M., Peirson S.N. Reciprocal interactions between circadian clocks and aging. *Mamm. Genome*. 2016;27(7-8):332-340. DOI 10.1007/s00335-016-9639-6.
- Barbosa M.T., Soares S.M., Novak C.M., Sinclair D., Levine J.A., Aksoy P., Chini E.N. The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity. *FASEB J.* 2007;21(13):3629-3639. Epub 2007 Jun 21.
- Berger N.A. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res.* 1985;101(1):4-15.
- Bonaconsa M., Malpeli G., Montaruli A., Carandente F., Grassi-Zucconi G., Bentivoglio M. Differential modulation of clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and heart of aged mice. *Exp. Gerontol.* 2014;55:70-79. DOI 10.1016/j.exger.2014.03.011. Epub 2014 Mar 24.
- Bouras T., Fu M., Sauve A.A., Wang F., Quong A.A., Perkins N.D., Hay R.T., Gu W., Pestell R.G. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J. Biol. Chem.* 2005;280(11):10264-10276. Epub 2005 Jan 4.
- Braidy N., Guillemin G.J., Mansour H., Chan-Ling T., Poljak A., Grant R. Age related changes in NAD⁺ metabolism oxidative stress and Sirt1 activity in wistar rats. *PLoS One*. 2011;6(4):e19194. DOI 10.1371/journal.pone.0019194.
- Chang H.C., Guarente L. SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging. *Cell*. 2013; 153(7):1448-1460. DOI 10.1016/j.cell.2013.05.027.
- Cho S.H., Chen J.A., Sayed F., Ward M.E., Gao F., Nguyen T.A., Krabbe G., Sohn P.D., Lo I., Minami S., Devidze N., Zhou Y., Coppola G., Gan L. SIRT1 deficiency in microglia contributes to cognitive decline in aging and neurodegeneration via epigenetic regulation of IL-1 β . *J. Neurosci.* 2015;35(2):807-818. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2939-14.2015.
- Defour A., Dessalle K., Castro Perez A., Poyot T., Castells J., Gallot Y.S., Durand C., Euthine V., Gu Y., Béchet D., Peinnequin A., Lefai E., Freyssenet D. Sirtuin 1 regulates SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner in skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(9): e43490. DOI 10.1371/journal.pone.0043490. Epub 2012 Sep 11.
- Duncan M.J., Prochot J.R., Cook D.H., Smith J.T., Franklin K.M. Influence of aging on Bmal1 and Per2 expression in extra-SCN oscillators in hamster brain. *Brain Res.* 2013;1491:44-53. DOI 10.1016/j.brainres.2012.11.008. Epub 2012 Nov 15.
- Gurd B.J. Deacetylation of PGC-1 α by SIRT1: importance for skeletal muscle function and exercise-induced mitochondrial biogenesis. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2011;36(5):589-597. DOI 10.1139/h11-070. Epub 2011 Sep 2.
- Haigis M.C., Sinclair D.A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual Rev. Pathol.* 2010;5:253-295.
- Herranz D., Muñoz-Martin M., Cañamero M., Mulero F., Martínez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.* 2010;1:3. DOI 10.1038/ncomms1001.
- Houtkooper R.H., Cantó C., Wanders R.J., Auwerx J. The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocr. Rev.* 2010;31(2):194-223. DOI 10.1210/er.2009-0026. Epub 2009 Dec 9.
- Imai S. "Clocks" in the NAD World: NAD as a metabolic oscillator for the regulation of metabolism and aging. *Biochim. Biophys. Acta*. 2010;1804(8):1584-90. DOI 10.1016/j.bbapap.2009.10.024. Epub 2009 Nov 6.
- Imai S., Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* 2014;24(8):464-471. DOI 10.1016/j.tcb.2014.04.002. Epub 2014 Apr 29.
- Imai S.I., Guarente L. It takes two to tango: NAD⁺ and sirtuins in aging/longevity control. *Aging Mechanisms Disease*. 2016;2:16017. DOI 10.1038/npjamd.2016.17; Epub 2016 Aug 18.
- Kim H.N., Han L., Iyer S., de Cabo R., Zhao H., O'Brien C.A., Manolagas S.C., Almeida M. Sirtuin1 suppresses osteoclastogenesis by deacetylating FoxOs. *Mol. Endocrinol.* 2015;29(10):1498-1509.
- Kim J.K., Forger D.B. A mechanism for robust circadian timekeeping via stoichiometric balance. *Mol. Syst. Biol.* 2012;8:630. DOI 10.1038/msb.2012.62.
- Ko C.H., Takahashi J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 2006;15;15(Spec.2):R271-7.
- Kolker D.E., Fukuyama H., Huang D.S., Takahashi J.S., Horton T.H., Turek F.W. Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters. *J. Biol. Rhythms*. 2003;18(2):159-169.
- Lim J.H., Lee Y.M., Chun Y.S., Chen J., Kim J.E., Park J.W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol. Cell*. 2010;38(6):864-878. DOI 10.1016/j.molcel.2010.05.023.
- Liu C., Li S., Liu T., Borjigin J., Lin J.D. Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. 2007;447:477-481. PubMed: 17476214.
- Luna A., McFadden G.B., Aladjem M.I., Kohn K.W. Predicted role of NAD utilization in the control of circadian rhythms during DNA damage response. *PLoS Comput. Biol.* 2015;11(5):e1004144. DOI 10.1371/journal.pcbi.1004144.eCollection 2015.
- Martínez-Redondo P., Vaquero A. The diversity of histone versus non-histone sirtuin substrates. *Genes Cancer*. 2013;4(3-4):148-163. DOI 10.1177/1947601913483767.
- Masri S. Sirtuin-dependent clock control: new advances in metabolism, aging and cancer. *Curr. Opinion Clin. Nutrition Metabolic Care*. 2015;18(6):521-527. DOI 10.1097/MCO.0000000000000219.
- Massudi H., Grant R., Braidy N., Guest J., Farnsworth B., Guillemin G.J. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One*. 2012;7(7):e42357. DOI 10.1371/journal.pone.0042357. Epub 2012 Jul 27.
- Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 2008;134(2):329-340. DOI 10.1016/j.cell.2008.07.002.
- Nakahata Y., Sahar S., Astarita G., Kaluzova M., Sassone-Corsi P. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*. 2009;324(5927):654-657.
- Nakamura T.J., Nakamura W., Tokuda I.T., Ishikawa T., Kudo T., Colwell C.S., Block G.D. Age-related changes in the circadian system unmasked by constant conditions. *eNeuro*. 2015;2(4). pii: ENEURO.0064-15.2015. DOI 10.1523/ENEURO.0064-15.2015.
- Nemoto S., Fergusson M.M., Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 2005;280(16):16456-16460. Epub 2005 Feb 16.
- Nikiforov A., Kulikova V., Ziegler M. The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2015;50(4):284-297. DOI 10.3109/10409238.2015.1028612. Epub 2015 Apr 2.
- Poulose N., Raju R. Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochim. Biophys. Acta*. 2015;1852(11):2442-2455. DOI 10.1016/j.bbadis.2015.08.017.
- Ramsey K.M., Yoshino J., Brace C.S., Abrassart D., Kobayashi Y., Marcheva B., Hong H.K., Chong J.L., Buhr E.D., Lee C., Takahashi J.S., Imai S., Bass J. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. *Science*. 2009;324(5927): 651-654. DOI 10.1126/science.1171641. Epub 2009 Mar 19.

- Reppert S.M., Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;29:418(6901):935-941.
- Revollo J.R., Grimm A.A., Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279(49):50754-50763. Epub 2004 Sep 20.
- Rodgers J.T., Lerin C., Haas W., Gygi S.P., Spiegelman B.M., Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*. 2005;434:113-118.
- Sahar S., Nin V., Barbosa M.T., Chini E.N., Sassone-Corsi P. Altered behavioral and metabolic circadian rhythms in mice with disrupted NAD⁺ oscillation. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(8):794-802.
- Shearman L.P., Sriram S., Weaver D.R., Maywood E.S., Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee C.C., van der Horst G.T., Hastings M.H., Reppert S.M. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*. 2000;288(5468):1013-1019.
- Stein L.R., Imai S. Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging. *EMBO J.* 2014;33(12):1321-1340. DOI 10.1002/embj.201386917. Epub 2014 May 8.
- Tanno M., Sakamoto J., Miura T., Shimamoto K., Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J. Biol. Chem.* 2007;282(9):6823-6832. Epub 2006 Dec 30.
- Vaziri H., Dessain S.K., Eaton Ng.E., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 2001;107:149-159.
- Wang R.H., Zhao T., Cui K., Hu G., Chen Q., Chen W., Wang X.-W., Soto-Gutierrez A., Zhao K., Deng C.-X. Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging. *Sci. Rep.* 2016;6:28633.
- Wyse C.A., Coogan A.N. Impact of aging on diurnal expression patterns of CLOCK and BMAL1 in the mouse brain. *Brain Res.* 2010;1337:21-31. DOI 10.1016/j.brainres.2010.03.113. Epub 2010 Apr 9.
- Yeung F., Hoberg J.E., Ramsey C.S., Keller M.D., Jones D.R., Frye R.A., Mayo M.W. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004;23(12):2369-2380.
- Yoshino J., Mills K.F., Yoon M.J., Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 2011;14:528-536.