



Часть 1. Закономерности молекулярной эволюции генетических систем: концепции и задачи.

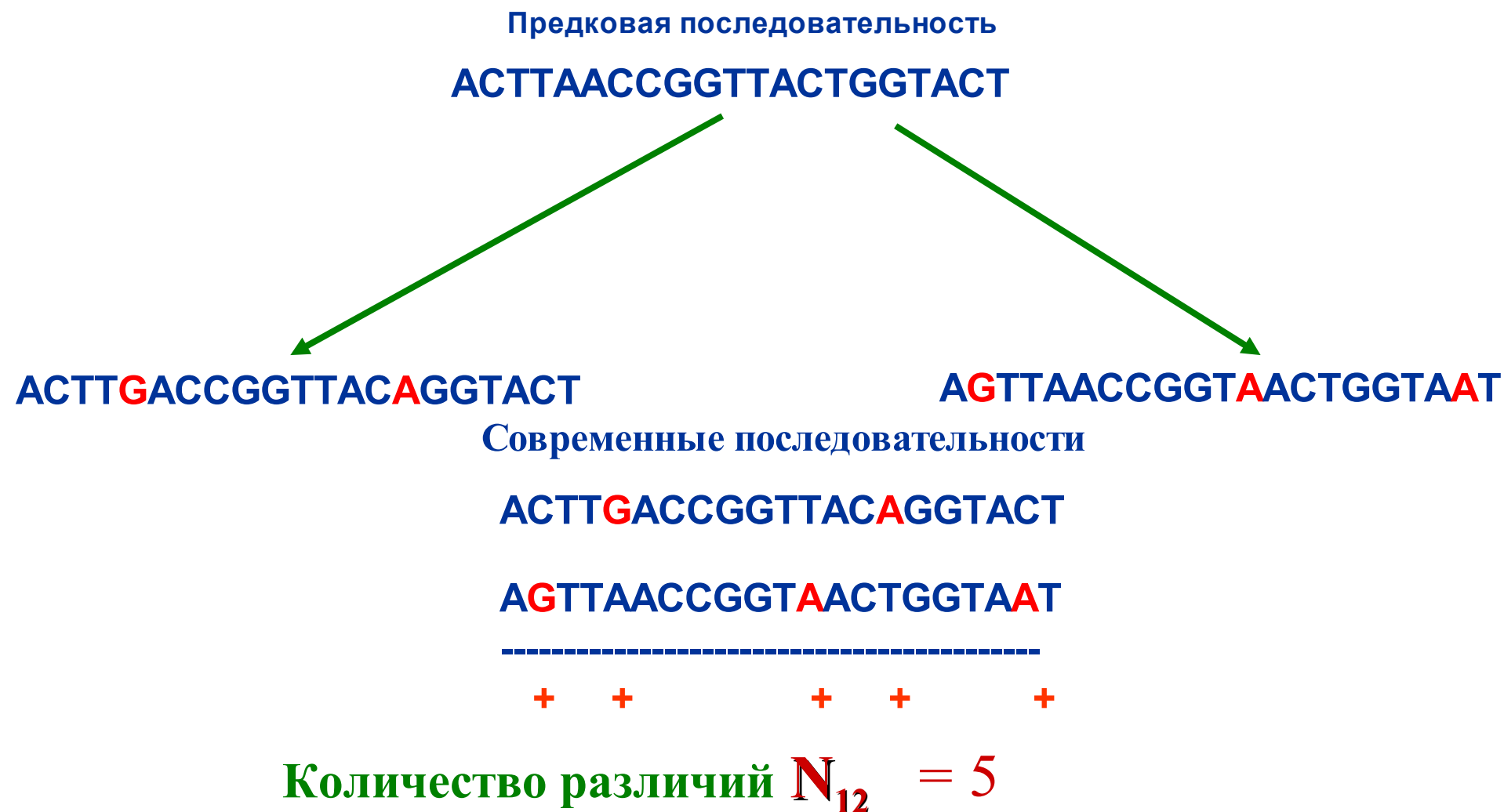
Часть 2. Проблемы компьютерного анализа и моделирования регуляторных генетических систем.

Проф. Колчанов Н.А.

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

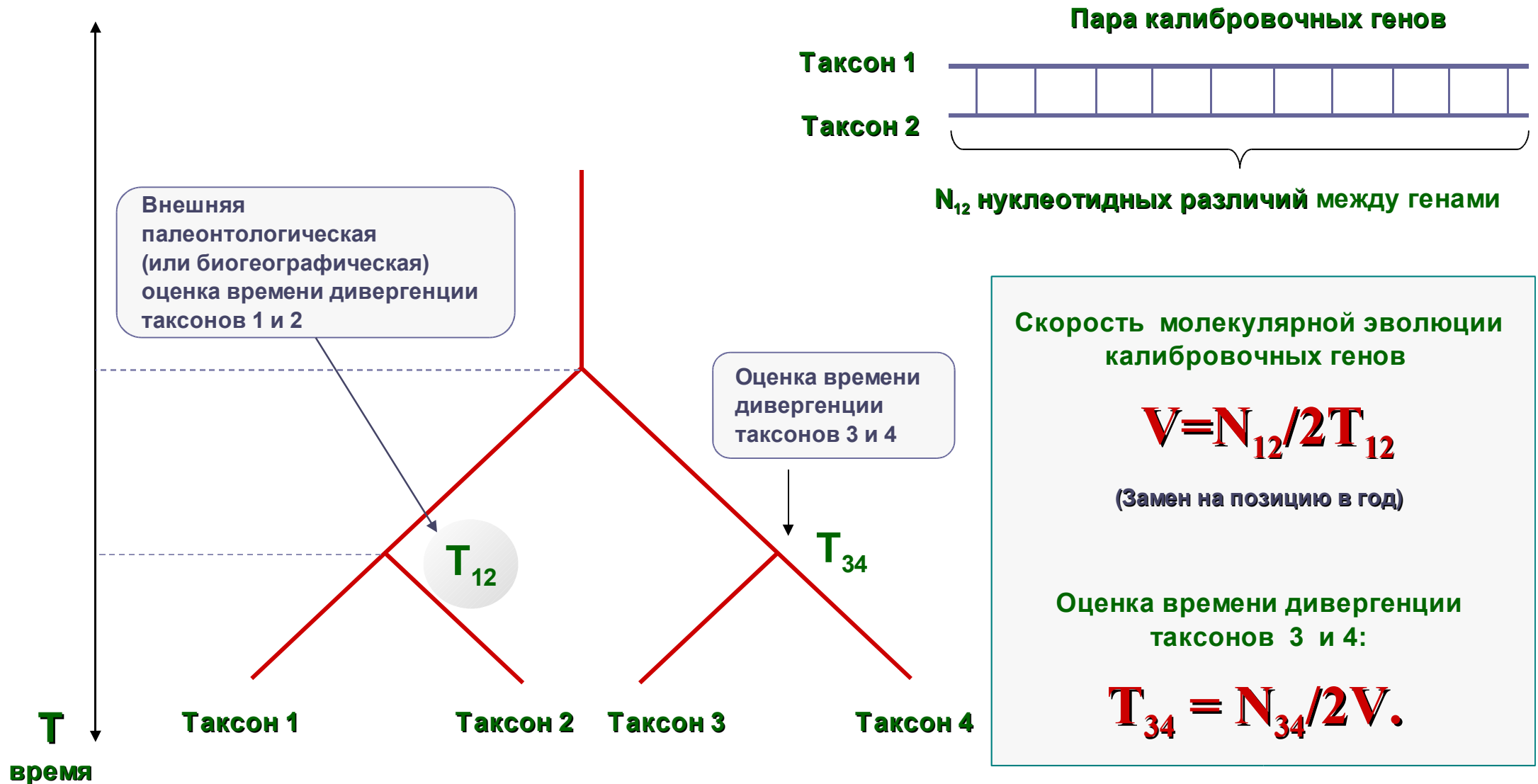


В ходе эволюции нуклеотидных последовательностей от общей предковой формы накапливаются нуклеотидные замены





МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЧАСЫ: оценка скоростей молекулярной эволюции и времени дивергенции видов





**РЕКОНСТРУКЦИЯ ОСНОВНЫХ
ЭТАПОВ ЭВОЛЮЦИОННОЙ
ДИВЕРГЕНЦИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С
ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ
МОЛЕКУЛЯРНОГО
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

Черными прямоугольниками обозначен
интервал вероятных оценок времени
дивергенции таксонов.



**Область применимости метода
молекулярных часов для датировки
эволюционных событий:
предположение о нейтральности
процесса молекулярной эволюции**



Согласно математической теории молекулярной эволюции (М. Кимура, 1984), скорость фиксации нейтральных мутаций равна скорости их возникновения в популяции:

$$V_n = M_n = F_0 \times M$$

Где V_n - скорость фиксации нейтральных замен;

M_n - скорость возникновения нейтральных замен в популяции;

F_0 – доля разрешенных замен в полном мутационном спектре белка;

M - полная скорость возникновения мутаций

Указанное обстоятельство позволяет использовать оценки скоростей фиксации нейтральных мутаций в качестве так называемых молекулярных часов.



Два типа нуклеотидных замен в кодонах



Синонимичные замены

Ala Ala Ala Ala
GCT → GCC → GCA → GCG

Tyr Tyr
TAT → TAC

Несинонимичные замены

Ala Val Ala Asp
GCT → GTT GCT → GAT

Tyr Ochre
TAT → TAA



Концепция нейтральности молекулярной эволюции (М.Кимура)



Подавляющее большинство мутаций, фиксирующихся в ходе эволюции любых семейств макромолекул, являются нейтральными, то есть не изменяют приспособленности несущих их особей

Фиксация адаптивных мутаций в ходе молекулярной эволюции наблюдается исключительно редко, если вообще имеет место



Критерий адаптивности молекулярной эволюции



Согласно математической теории молекулярной эволюции (М. Кимура, 1984), скорость фиксации адаптивных мутаций V_a выше скорости фиксации мутаций нейтральных V_n :

$$V_a / V_n > 1$$

Типичный класс нейтральных мутаций – синонимичные замены нуклеотидов в кодонах, то есть замены, не меняющие смысла кодируемых аминокислот.

Если V_{syn} - скорость фиксации несинонимичных замен в ходе эволюции определенного семейства нуклеотидных последовательностей достоверно превышает скорость фиксации синонимичных аминокислот V_{non} , это является доказательством адаптивного режима молекулярной эволюции

$$V_{non} / V_{syn} > 1$$

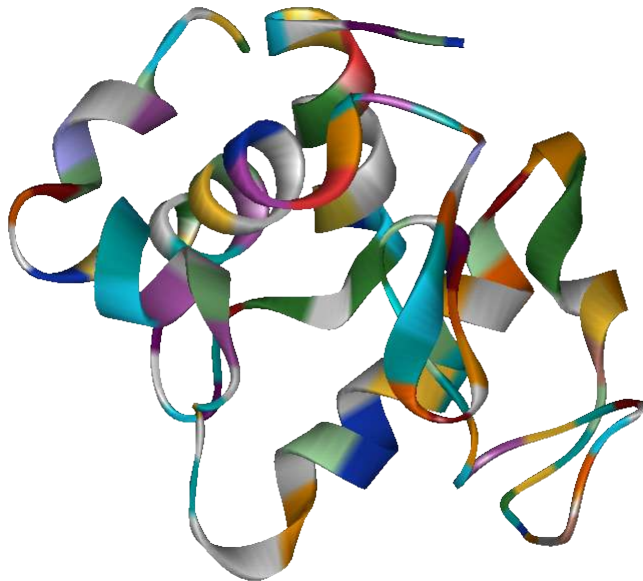


Молекулярный филогенетический анализ: адаптивная эволюция генов, кодирующих лизоцимы обезьян

Критерий адаптивной эволюции (Кимура, 1984):

$$Nn/Ns > 1$$

Здесь **Nn** и **Ns** - количество несинонимических замен, фиксировавшихся в исследуемом эволюционном маршруте



Recreating ancestral proteins, TREE, v 15, N3, 109 – 114

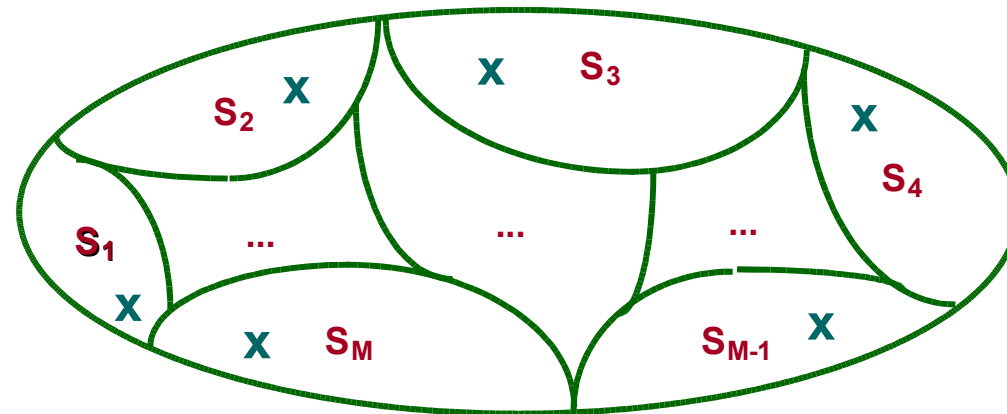


Ограничение Холдейна: невозможна адаптивная эволюция популяции по большому количеству локусов одновременно



При адаптивной эволюции по большому количеству локусов под негативный отбор хотя бы по одному фенотипическому признаку (параметру) попадет каждая из особей популяции, что приводит к ее вырождению (гибели).

Для популяций животных количество локусов, по которым возможен одновременный отбор, не может превышать 10 – 15.

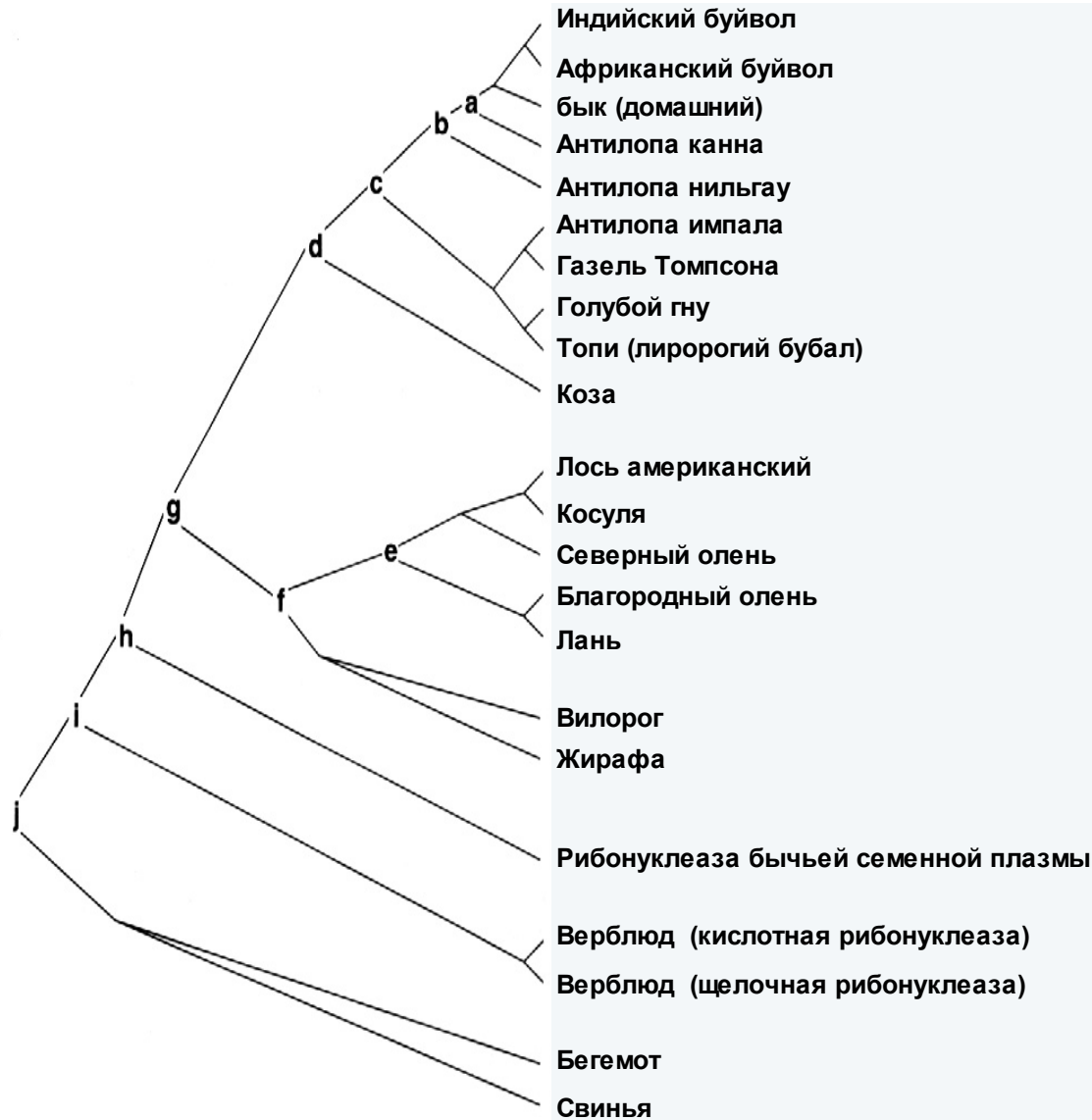


X - негативный отбор

Piskur J. 2001. Origin of duplicated regions in the yeast genomes. *TRENDS in Genetics*. V. 17. P. 302-303.



Филогенетический анализ: компьютерно-экспериментальная реконструкция предковых форм рибонуклеаз парнокопытных



Схематическое изображение рибонуклеазы

Реконструированные предковые рибонуклеазы:

- имеют высокий уровень каталитической активности при переваривании одонитевой РНК.
- обладали более высокой термальной стабильностью чем современные рибонуклеазы

Наиболее ранние предковые формы рибонуклеаз имеет существенно более высокую каталитическую активность переваривания двухнитевых РНК по сравнению с современными белками.



ЗАДАЧИ



КОМПЬЮТЕРНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ:

- Реконструкция эволюционных взаимоотношений между таксонами;
- Идентификация адаптивных режимов молекулярной эволюции.



ЗАДАЧИ



КОМПЬЮТЕРНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ:

- Исследование закономерностей молекулярной эволюции регуляторных районов генов



ЗАДАЧИ

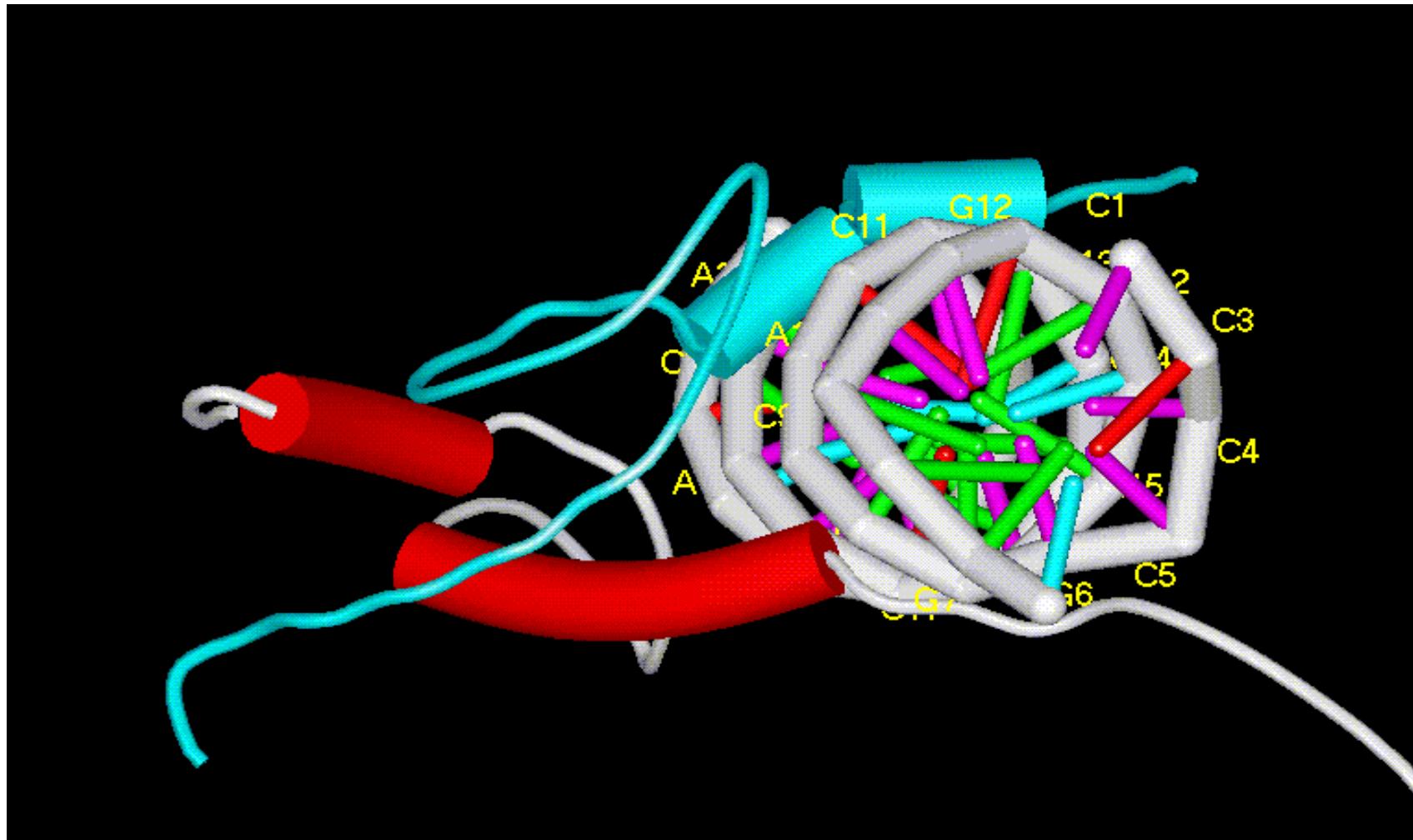


КОМПЬЮТЕРНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ:

- Исследование дупликаций как фактора эволюции генетических систем



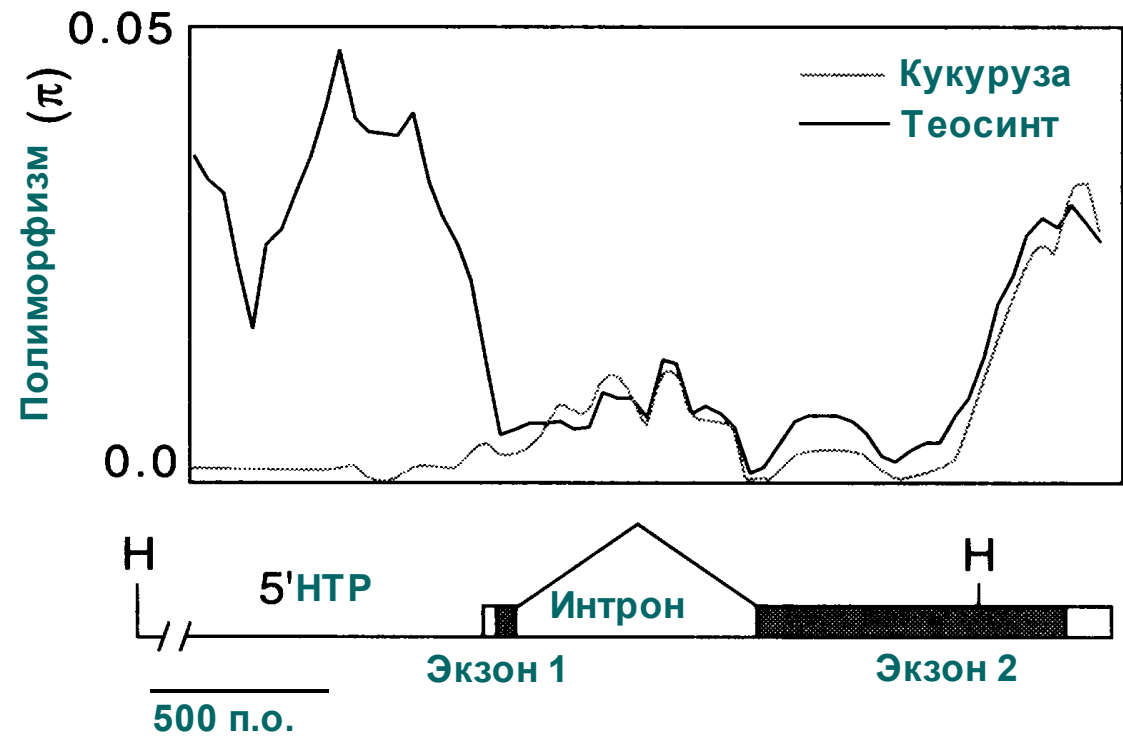
Трёхмерная структура днк-белкового комплекса между транскрипционным фактором **usf** человека и сайтом его связывания



http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/acts2/images/USF_X.html



Резкое снижение полиморфизма по регуляторному району **tb1** у кукурузы по сравнению с теосинтом



Rong-Lin Wang et al., Nature, v.398, p. 236-239



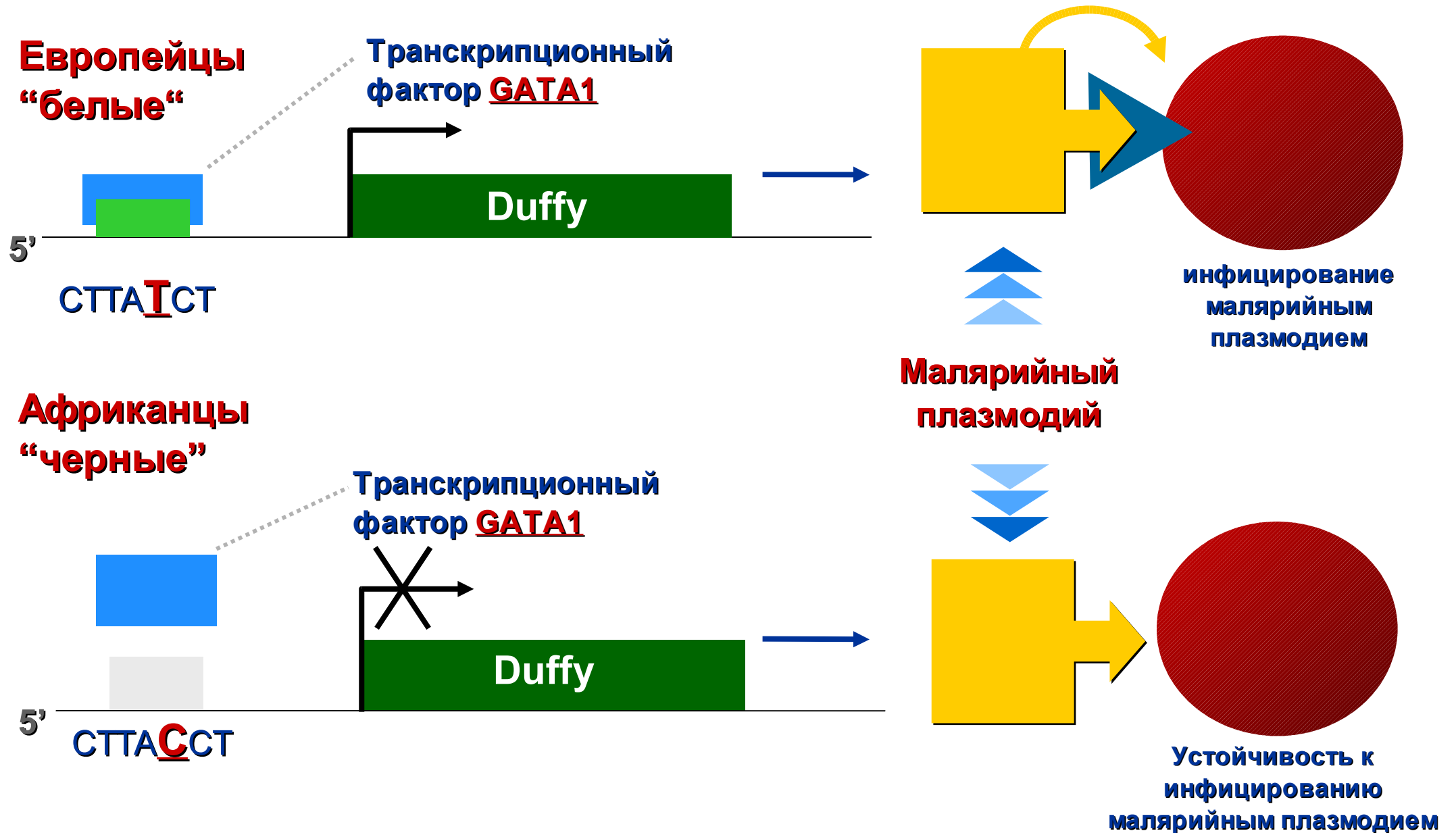
Примеры однонуклеотидного полиморфизма с известным клиническим эффектом в регуляторных районах генов

Заболевание	Ген	Район	ОНП	Последовательность ДНК	Ссылка
Восприимчивость к спонтанному и индуцированному мутагенезу в легких	<i>K-ras</i>	2 интрон 296 A/C 288 C/G 296 A/C	CA CC GC	5'-AAGAAA C TCCACTT A TCATGA-3' 5'-AAGAAA C TCCACTT C TCATGA-3' 5'-AAGAAA G TCCACTT C TCATGA-3'	Ryan et al, <i>J. Natl. Cancer Inst.</i> 79, 1351 (1987)
Лекарственная зависимость, синдром Туретта, нарушение внимания и гиперактивность	<i>TDO2</i>	6 интрон 663 G/A 666 G/T	WT M1 M2	5'-AAATAATG G CA G ATAAGAAT-3' 5'-AAATAATG A CA G ATAAGAAT-3' 5'-AAATAATG G CA T ATAAGAAT-3'	Comings et al, <i>Pharmacogenetics</i> 6, 307 (1996)
Острая малярия	<i>NTFα</i>	Промотор -376 G/A	α G α A	5'-TCCTGTCTGGAA G TTAGAAGGA-3' 5'-TCCTGTCTGGAA A TTAGAAGGA-3'	Knight, et al, <i>Nature Gen.</i> 22, 145 (1999)
Дефицит белка С типа I	<i>pC</i>	Промотор -114 C/T	WT MT	5'-TGTGGTTATGGA T TAACTCGAA-3' 5'-TGTGGTTATGGA C TAACTCGAA-3'	Spek et al, <i>J. Biol. Chem.</i> 273, 10168 (1998)
Синдром Бернарда - Соулье	<i>Gplbβ</i>	Промотор -133 C/G	WT MT	5'-TAGTGTGCTAT C TGCCGCTGCAG-3' 5'-TAGTGTGCTAT G TGCCGCTGCAG-3'	L. Ludlow et al, <i>J. Biol. Chem.</i> 271, 22076 (1996)
Гемофилия	<i>Factor VII</i>	Промотор -94 C/G	WT MT	5'-GTCCTCCCCTCC C CCATCCCTCT-3' 5'-GTCCTCCCCTCC G CCATCCCTCT-3'	Carew et al, <i>Blood</i> 92, 1639 (1998)
Фетальная форма гемоглобина	<i>Gγ globin</i>	Промотор -114 C/T	WT MT	5'-CTTGCCTTGAC C AATAGCCTTG-3' 5'-CTTGCCTTGAC T AATAGCCTTG-3'	Fucharoen, et al, <i>Nucl. Acids Res.</i> 18, 5245 (1990)

Базы данных HGMD, dbSNP, HGBASE, ALFRED, OMIM содержат более 100 ОНП в регуляторных районах генов, а также более 10⁴ ОНП в кодирующих частях и 10³ ОНП в сайтах сплайсинга.

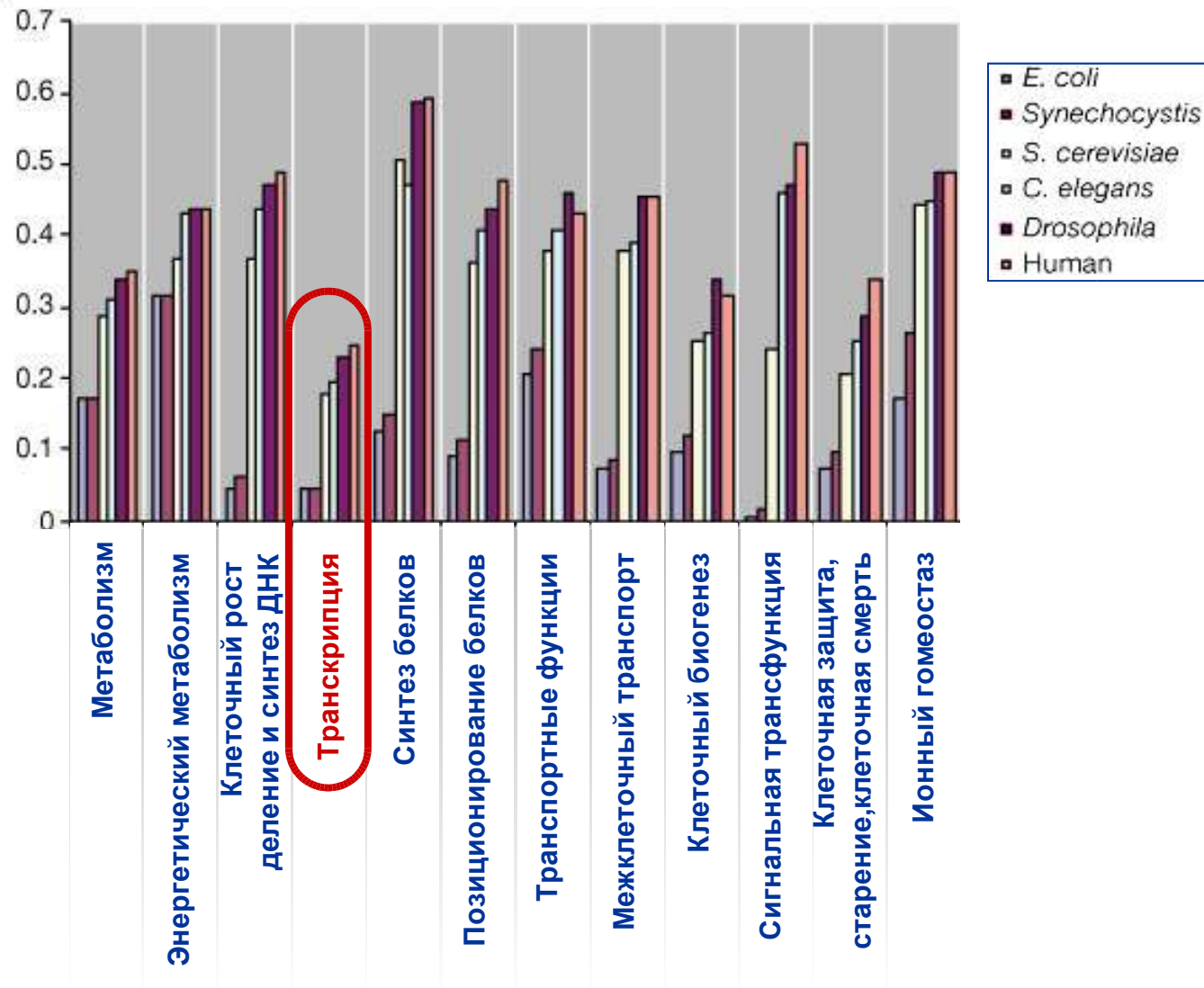


Влияние мутаций на регуляторные районы генов. Полиморфизм по регуляторному району гена **duffy**



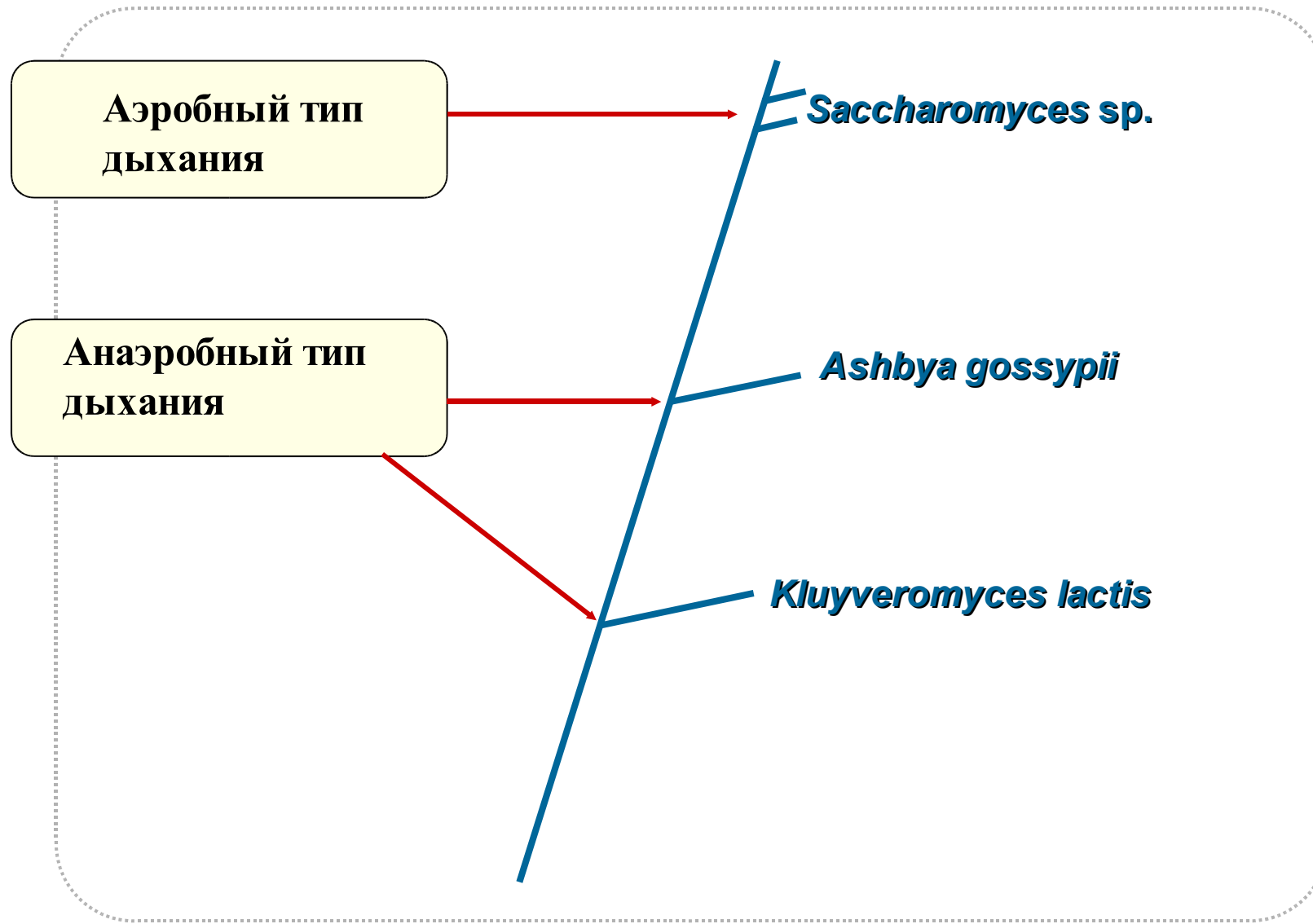


Белки транскрипционной машины арабидопсиса обладают максимально высокой скоростью эволюции по сравнению с другими функциональными классами белков





Переходу *saccharomyces* на анаэробный энергетический обмен предшествовала дупликация протяженного фрагмента геномной ДНК, содержащей большой кластер генов.





Эволюционная дивергенция приматов сопровождалась многократными дупликациями гена **morpheus** и адаптивной эволюцией его второго экзона. Критерий адаптивной эволюции (Кимура, 1984): $Nn/Ns > 1$



Отношение Nn/Ns количества несинонимических (Nn) и синонимических (Ns) замен, фиксировавшихся в ходе эволюционной дивергенции последовательностей 2-го интрона гена **morpheus** приматов.

Сравниваемая пара последовательностей	Nn/Ns	Значимость отклонения от 1
HSA PRT	4.5	<0.0001
HSA GGO	2.67	<0.01
HSA PPY	3.61	<0.0005
HSA HKL	3.52	<0.0005
HSA OW	13.00	<0.00001
PTR GGO	2.64	<0.01
PTR OW	11.75	<0.0001
PTR OW	7.78	<0.0001
PTR PTR	3.93	<0.01
HSA HSA	4.75	<0.001

HSA – Homo sapiens, PTR – Pan troglodytes, GGO – Gorilla gorilla, PPY – Pongo pygmaeus, HKL – Hylobates klossi, OW – Old World monkeys.

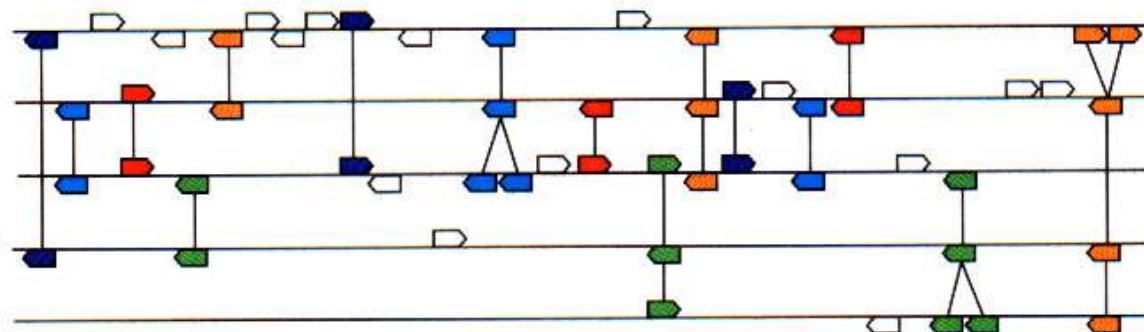
(M.E. Johnson, Nature, 2001, 413, 514- 518)



Консервативность порядка генов в дублицированных фрагментах геномной ДНК, расположенных на различных хромосомах арабидопсиса (сравнение с геномом томатов)

Согласно молекулярным данным, первая полиплоидизация генома арабидопсиса произошла примерно 180 млн. лет назад, а вторая полиплоидизация - 112 млн. лет назад. Следы этих событий – дублицированные геномные фрагменты, расположенные на разных хромосомах арабидопсиса.

Хромосома 2 арабидопсиса
Хромосома 4 арабидопсиса
Хромосома 2 томата
Хромосома 5 арабидопсиса
Хромосома 3 арабидопсиса

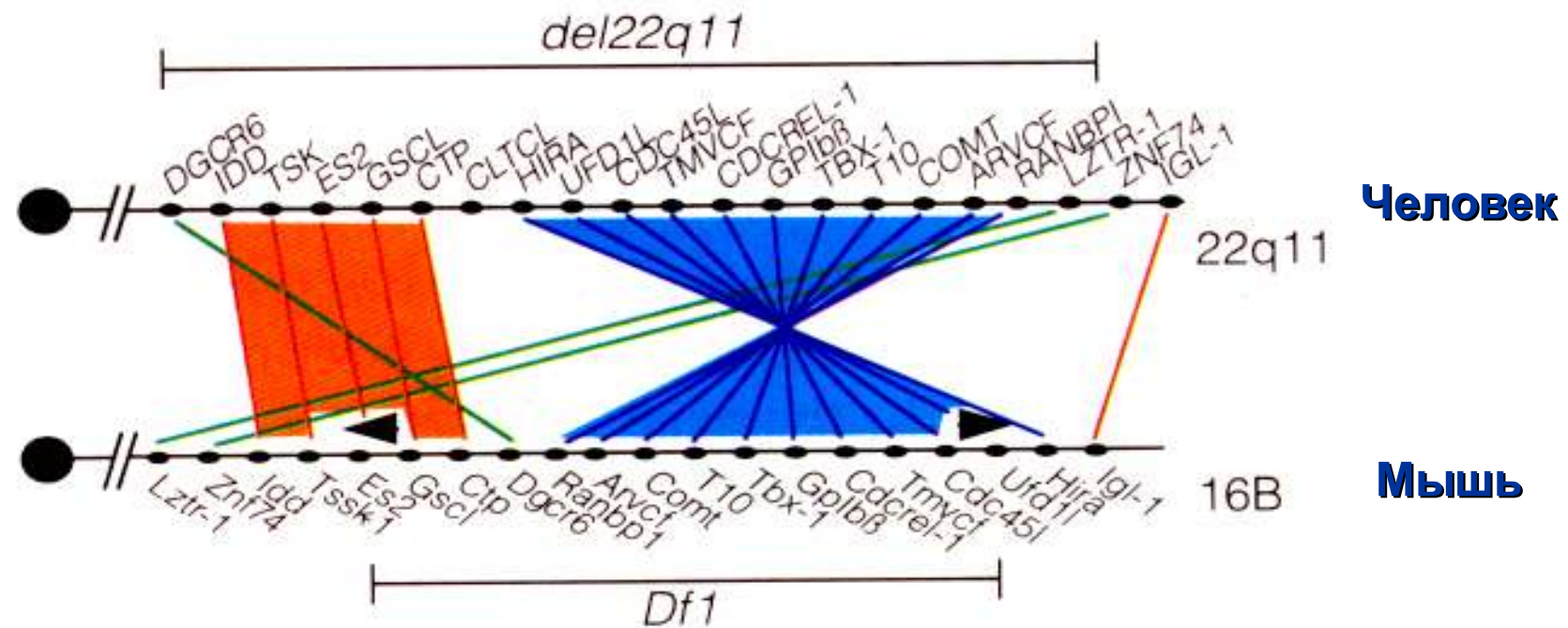


TRENDS in Genetics

Гомологичные гены соединены линиями. Цветными прямоугольниками обозначены гомологичные гены, присутствующие в других сегментах. Белые прямоугольники обозначают отсутствие гомологии.



Сравнительный анализ района 22-й хромосомы человека и 16-й хромосомы мыши



Фрагмент геномной ДНК, содержащий группу генов, контролирующую некоторые процессы развития сердца, находится у мыши (16-я хромосома) и человека (22-я хромосома) в инвертированном положении друг относительно друга.



ЗАДАЧИ



КОМПЬЮТЕРНАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ФИЛОГЕНИЯ:

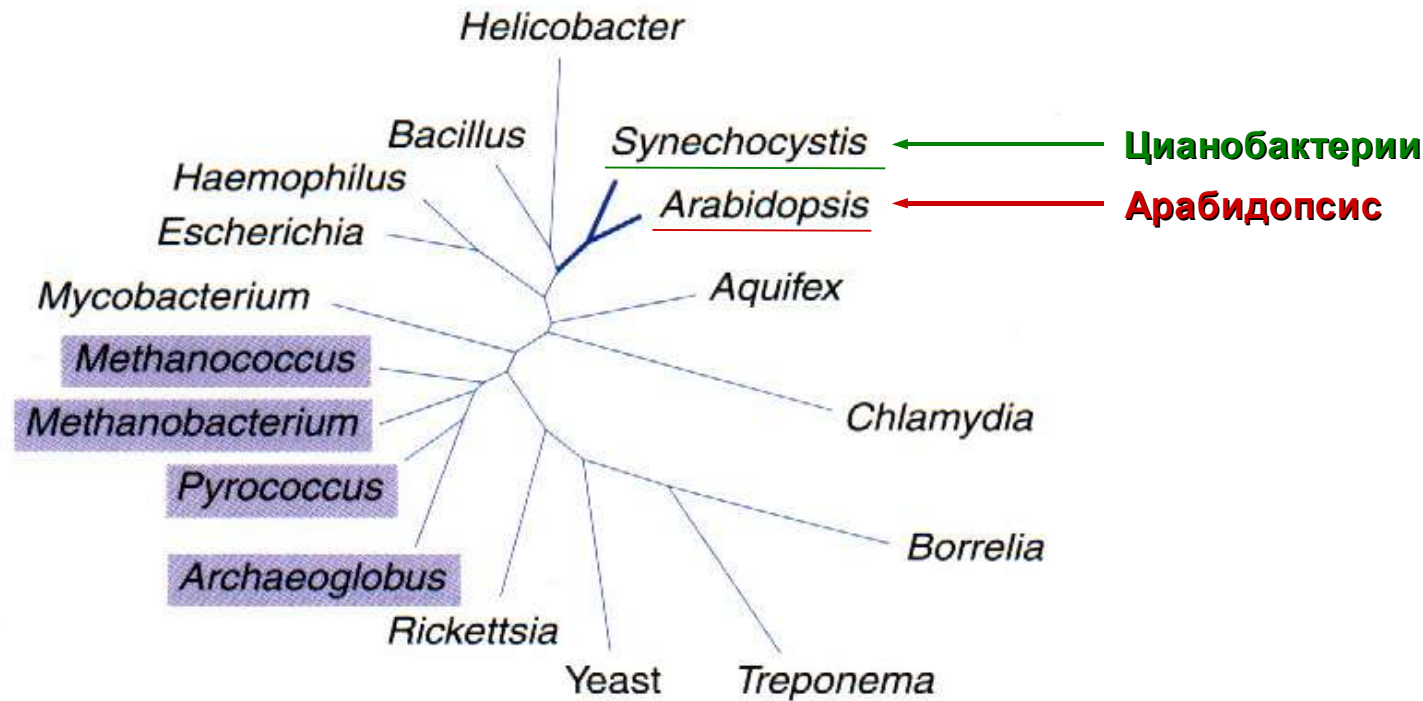
- **Исследование роли горизонтального переноса генетической информации в эволюции биологических самовоспроизводящихся систем**



Горизонтальный перенос генетической информации от цианобактерий (эволюционных предшественников пластид) в геном арабидопсиса: филогенетические деревья генов арабидопсиса и прокариот



Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (CrtE)



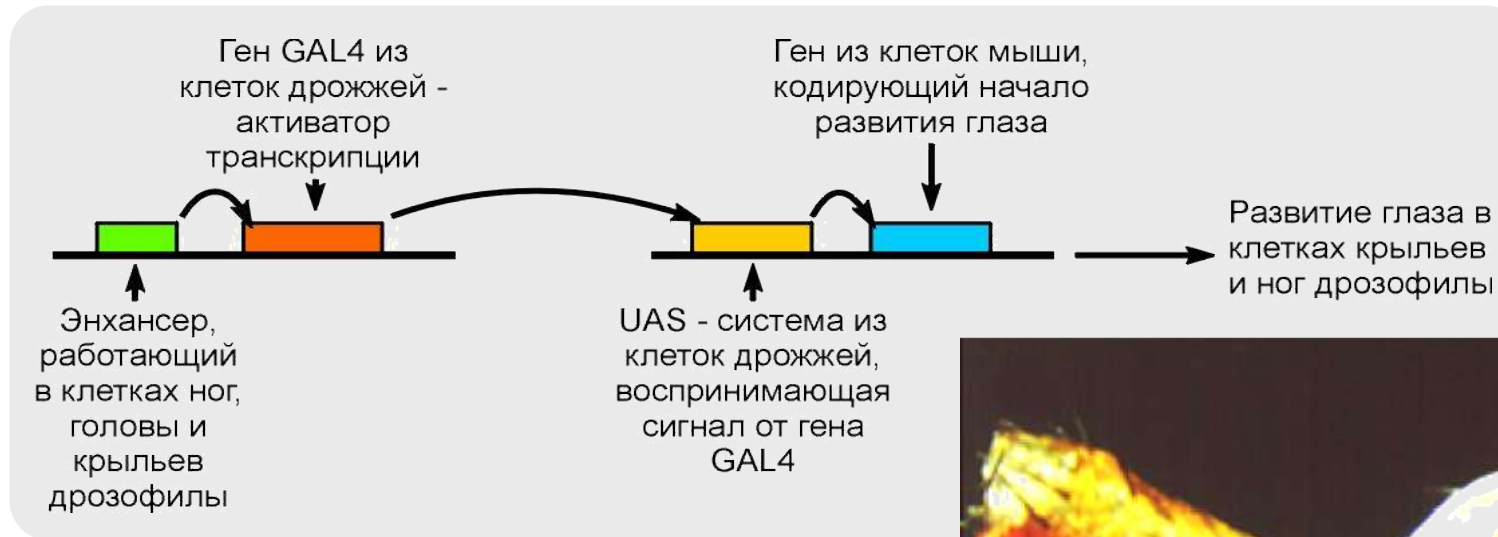
Полученные оценки показывают, что в геном арабидопсиса, содержащий до 25 тысяч генов, было перенесено от 400 до 2200 генов из генома предковой формы сине-зеленых водорослей - эволюционного предшественника пластид

Rujan T. and Martin W. 2001. How many genes in Arabidopsis come from cyanobacteria? An estimate from 386 protein phylogenies. TRENDS in Genetics. V. 17. P. 113-120.

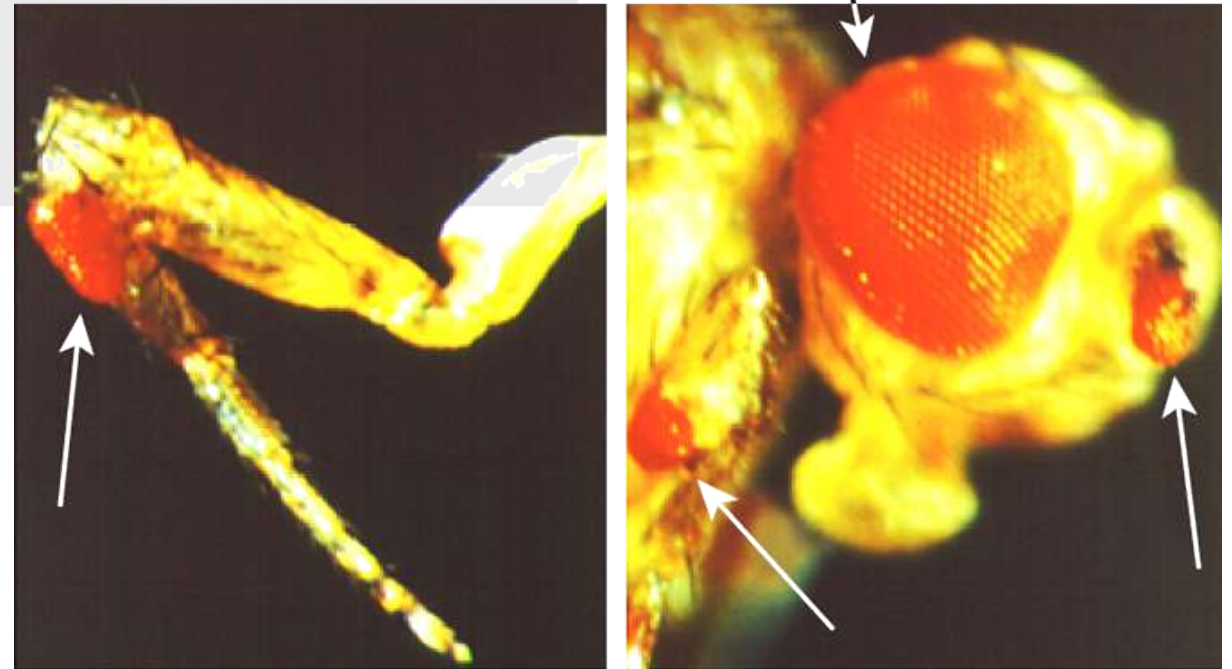


Фенотипические эффекты, связанные с нарушениями критических стадий онтогенеза, могут моделироваться с использованием методов генетической инженерии и трансгенеза

Генно-инженерная конструкция, вызывающая формирование дополнительных глаз в различных частях тела плодовой мушки дрозофилы



Нормальный глаз



Стрелками указаны дополнительные глаза



Часть 2. Проблемы компьютерного анализа и моделирования регуляторных генетических систем.

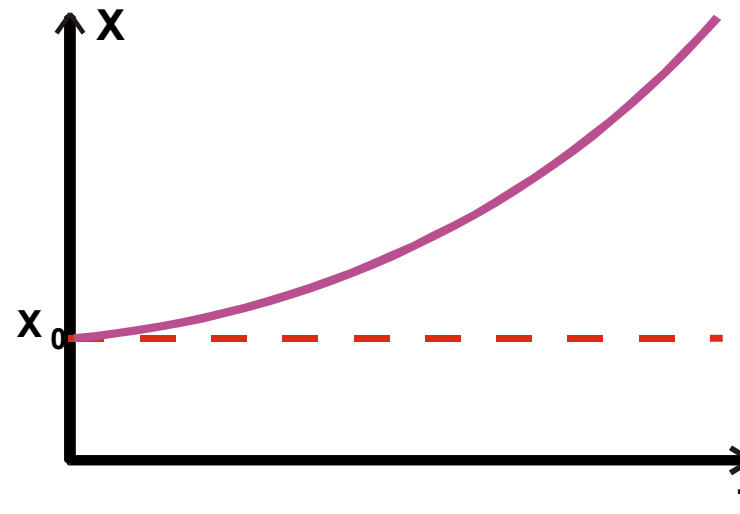
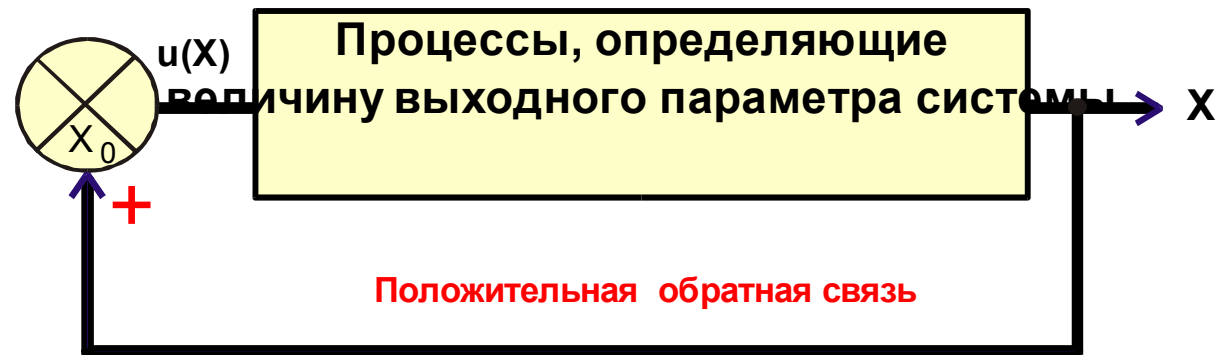
Проф. Колчанов Н.А.



Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

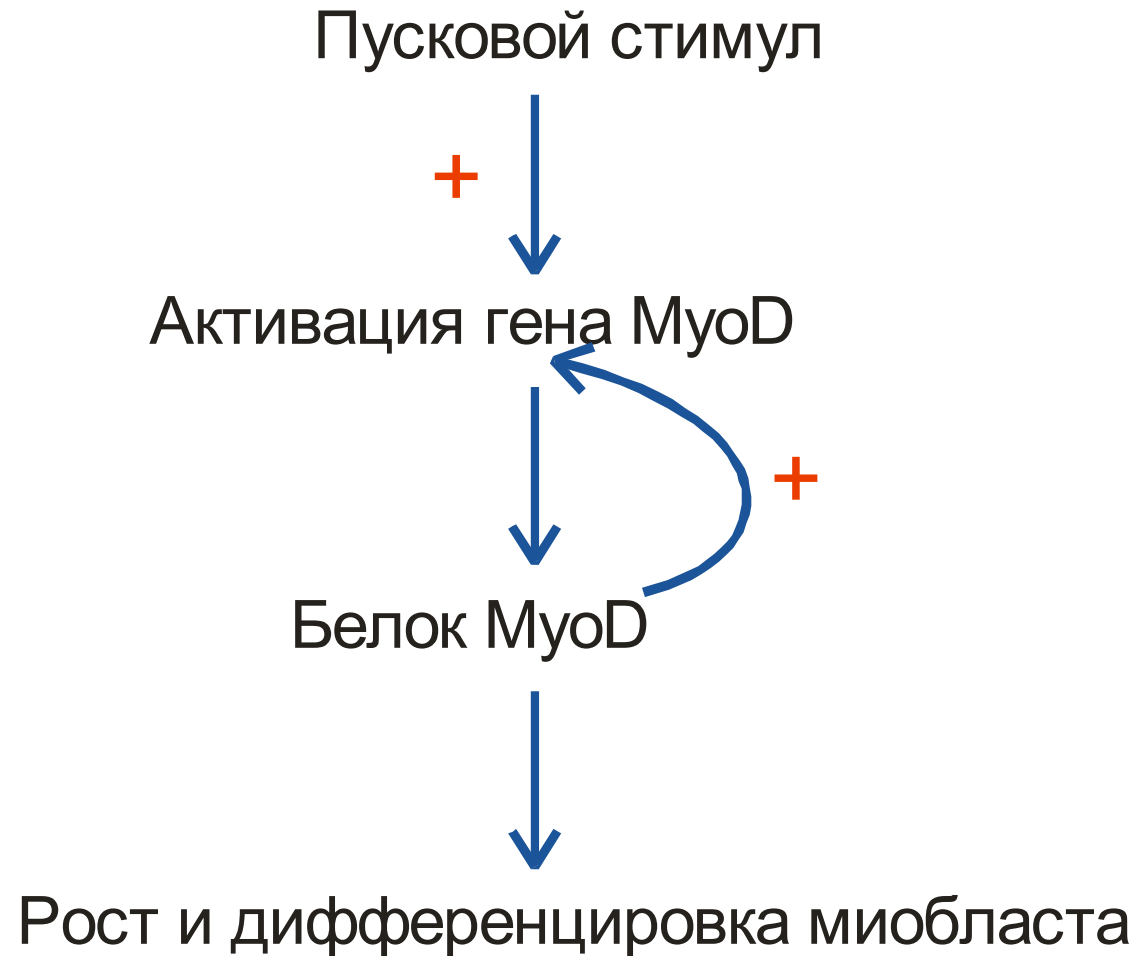


Принципиальная схема контура регуляции с положительной обратной связью



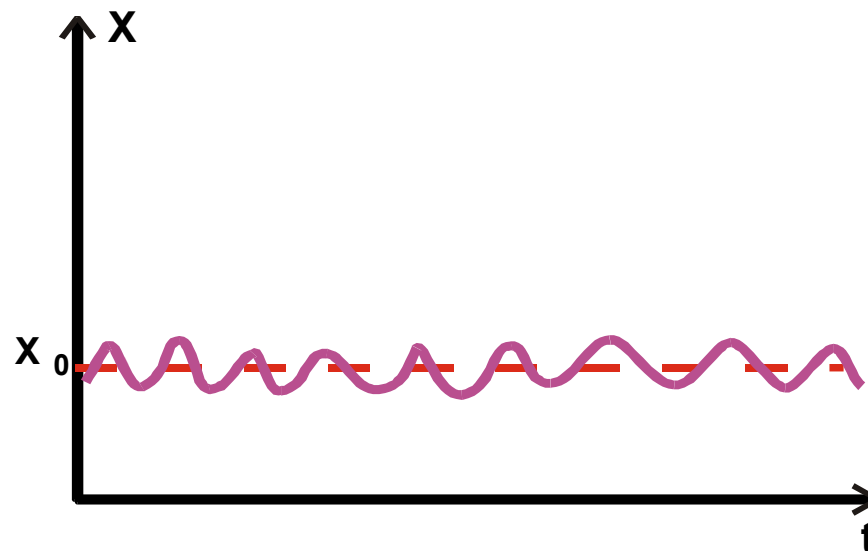
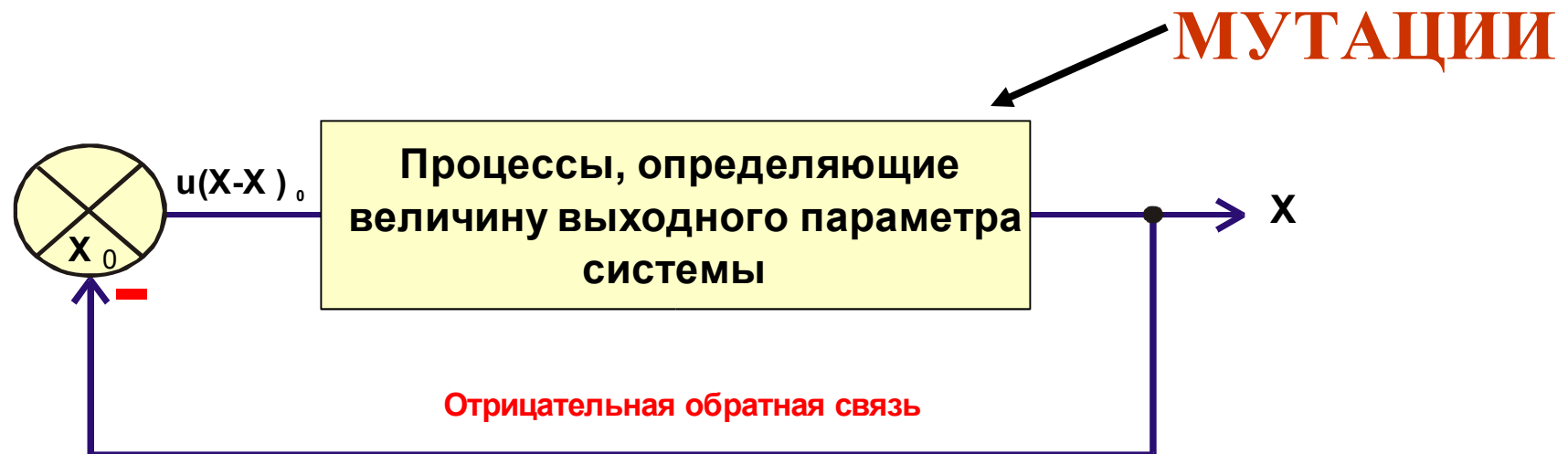


Рост и дифференцировка миобластов контролируются по механизму положительной обратной связи



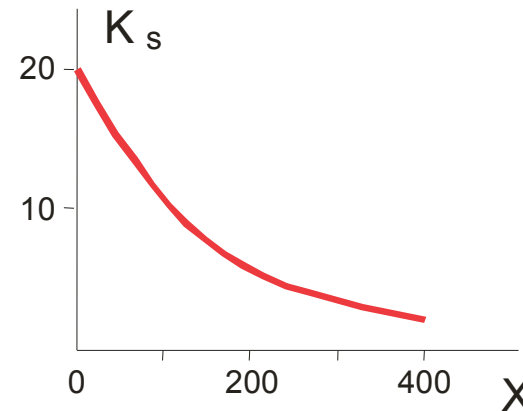


Принципиальная схема контура регуляции с отрицательной обратной связью

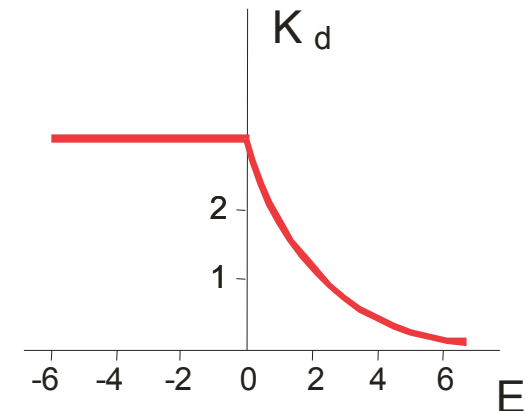




Простейший регуляторный контур с отрицательной обратной связью, контролирующей концентрацию белка при мутационном изменении его конформационной стабильности



ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ
БИОСИНТЕЗА БЕЛКА K_s
ОТ ЕГО КОНЦЕНТРАЦИИ
 X



ЗАВИСИМОСТЬ КОНСТАНТЫ
ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ
ДЕГРАДАЦИИ
БЕЛКА K_d ОТ
ЕГО КОНФОРМАЦИОННОЙ
СТАБИЛЬНОСТИ E

СИСТЕМА БЕЗ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ
ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

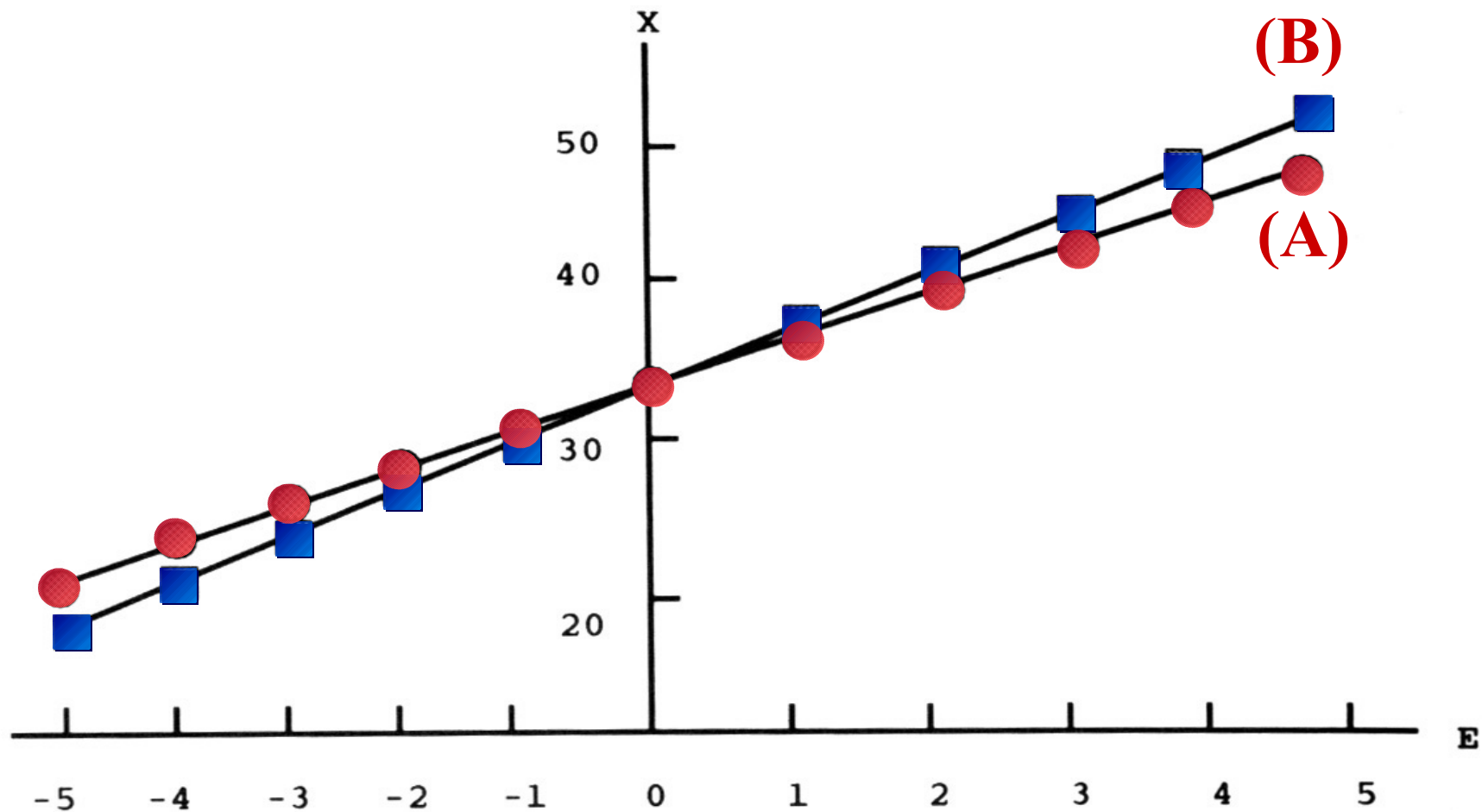
СИСТЕМА С РЕГУЛЯЦИЕЙ

$$K_s = \text{CONST}$$

$$K_s = \frac{C_5}{1 + (X/C_2)}$$



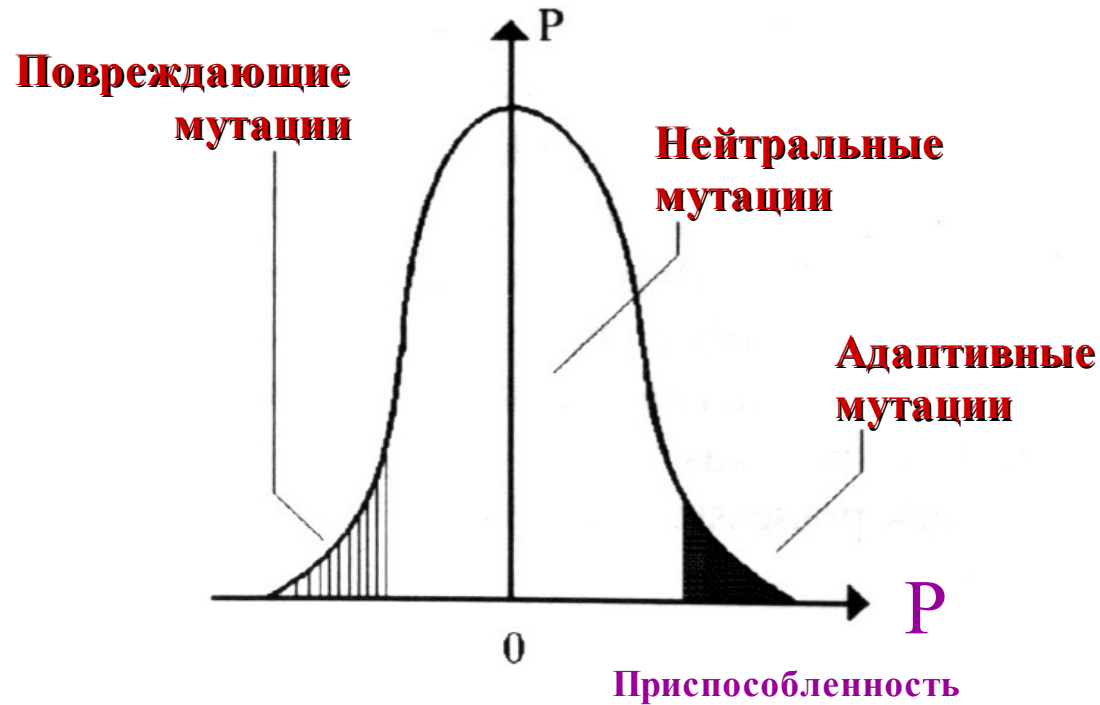
Зависимости равновесной концентрации белка **X** от мутационного изменения стабильности **E**. **(A)** - система с отрицательной обратной связью; **(B)** - система без отрицательной обратной связи.



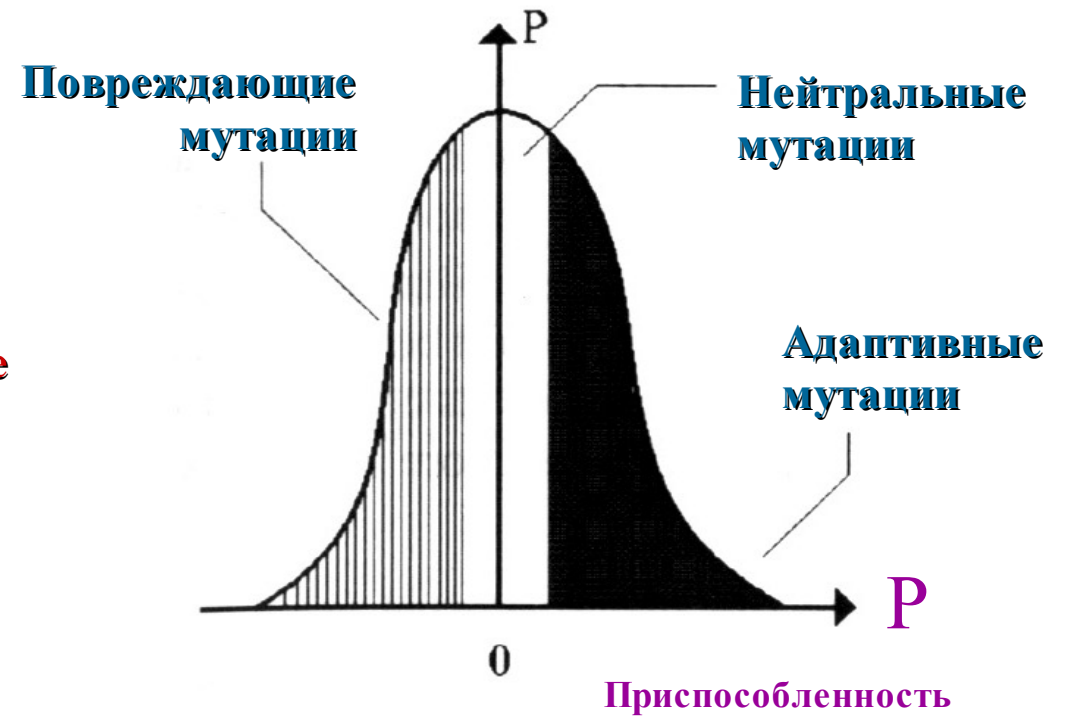
E - конформационная стабильность белка



Качественная иллюстрация эффекта «обнейтрализации» мутационного спектра



(а) Система с отрицательной обратной связью

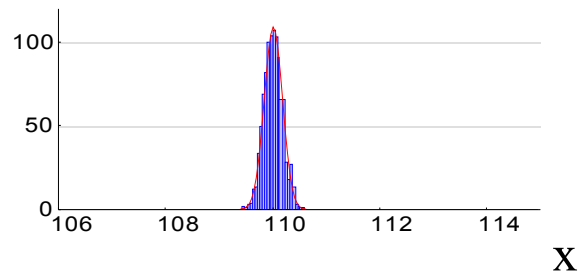


б) Система без отрицательной обратной связи



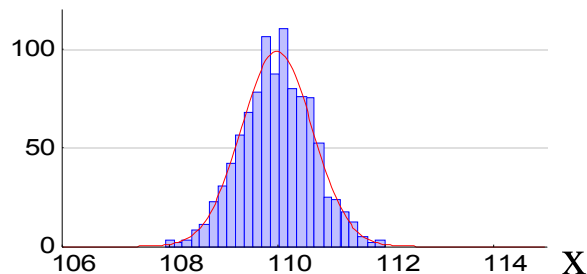
«Нейтрализация» мутационного спектра под действием отрицательной обратной связи

При увеличении силы отрицательной обратной связи происходит снижение наблюдаемого уровня фенотипической изменчивости в популяции



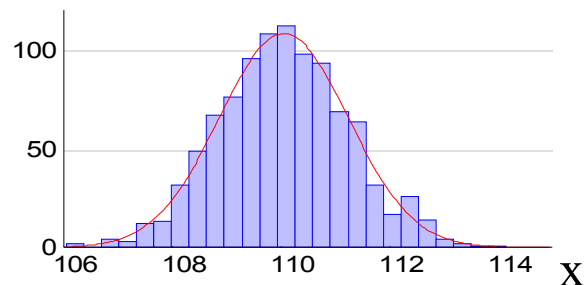
kf=1

Очень сильная
отрицательная
обратная связь



kf=0.1

Отрицательная
обратная связь
промежуточной силы



kf=0.03

Очень слабая
отрицательная
обратная связь

$$W(X_i) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{X_i - X_0}{\sigma_X} \right)^2}$$

$$X_i = -\frac{C_2}{2} + \sqrt{\frac{C_2^2}{4} + \frac{C_5 C_2}{C_3} (E_i + C_4)}$$

$$P(E_i) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{E_i - E_0}{\sigma_E} \right)^2}$$

$$kf = 1 / C_2$$



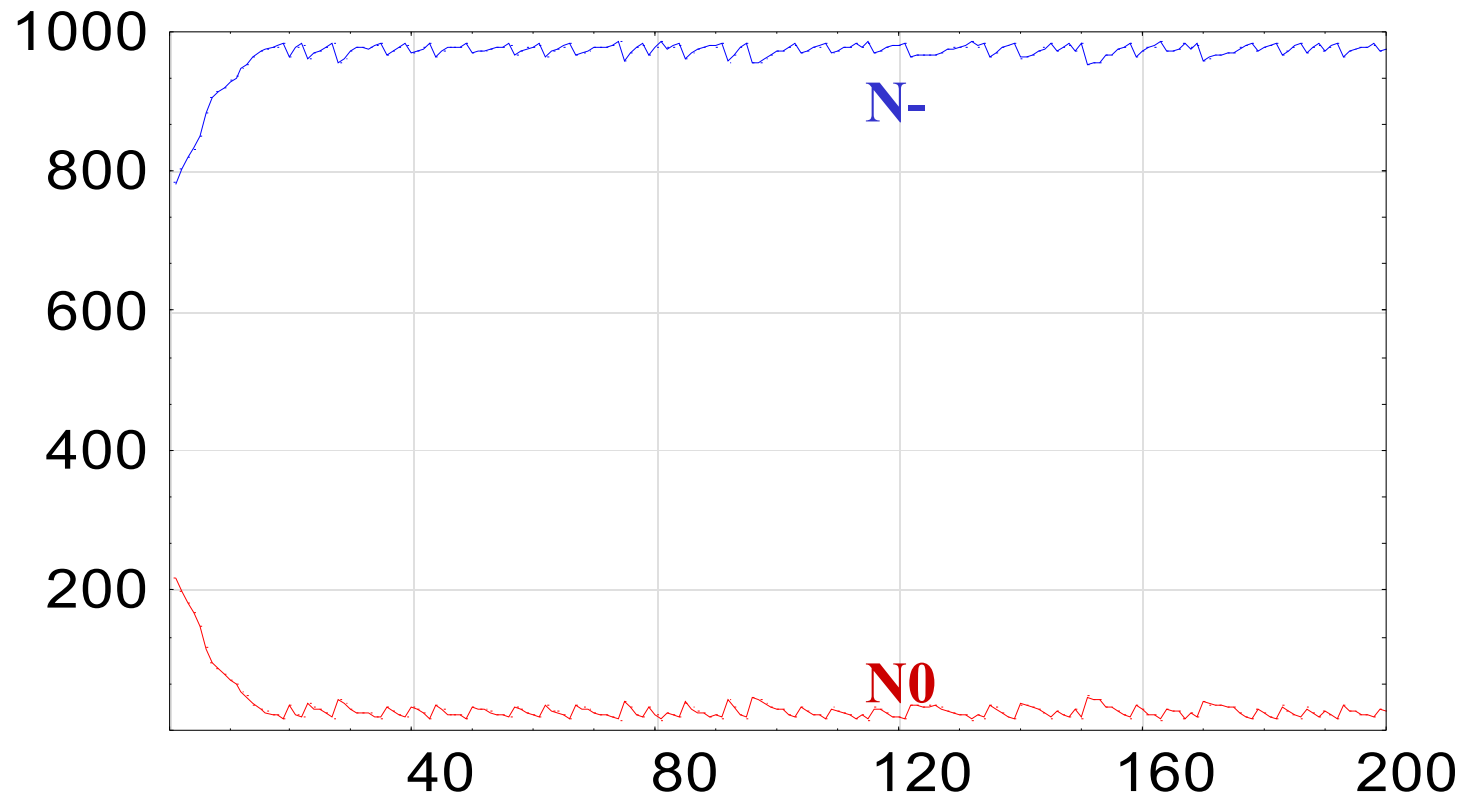
Компенсаторный эффект отрицательной обратной связи



- Любая отрицательная обратная связь минимизирует (маскирует) фенотипическое проявление мутаций за счет компенсаторного изменения интенсивности регулируемых процессов;
- Под действием отрицательных обратных связей происходит нейтрализация мутационных спектров: значительная часть мутаций, которые в отсутствии отрицательных обратных связей носили адаптивный или повреждающий характер, становятся в присутствии регуляторных контуров нейтральными;
- Компенсаторный эффект отрицательных обратных связей является одним из главных факторов, обуславливающих нейтральный характер большинства мутаций, фиксирующихся в ходе эволюции.



Конкуренция особей с отрицательной обратной связью (N-) и без нее (N0) в ходе эволюции популяции под действием стабилизирующего отбора



Размер популяции
 $N = \text{const}$

Начальные условия:
50% особей имеют
отрицательную
обратную связь;
50% особей не имеют
отрицательной
обратной связи.

Стабилизирующий отбор,
 X_0 – оптимальная концентрация белка = const

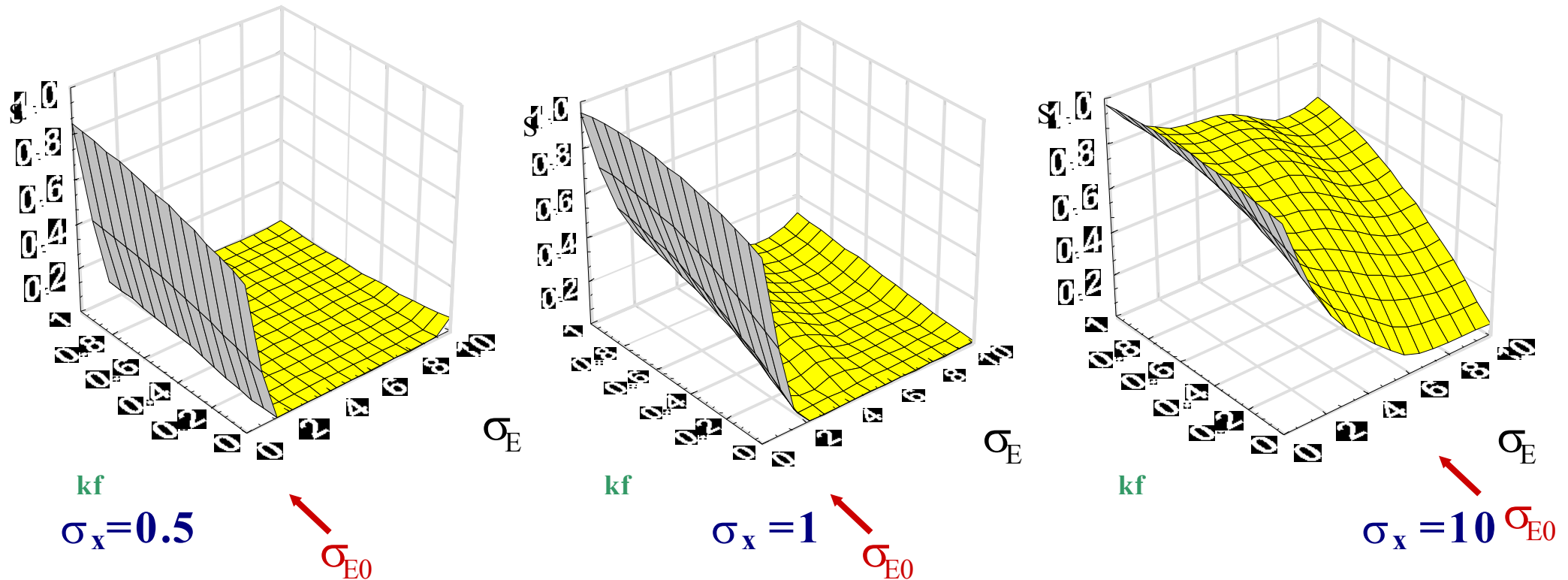
X_i – концентрация белка с измененной
стабильностью DE_i

$$P(E_i) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{E_i - E_0}{\sigma_E} \right)^2}$$

$$W(X_i) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{X_i - X_0}{\sigma_X} \right)^2}$$



Влияние силы отрицательной обратной связи (k_f) и интенсивности мутационного процесса (σ_E) на среднюю приспособленность популяции



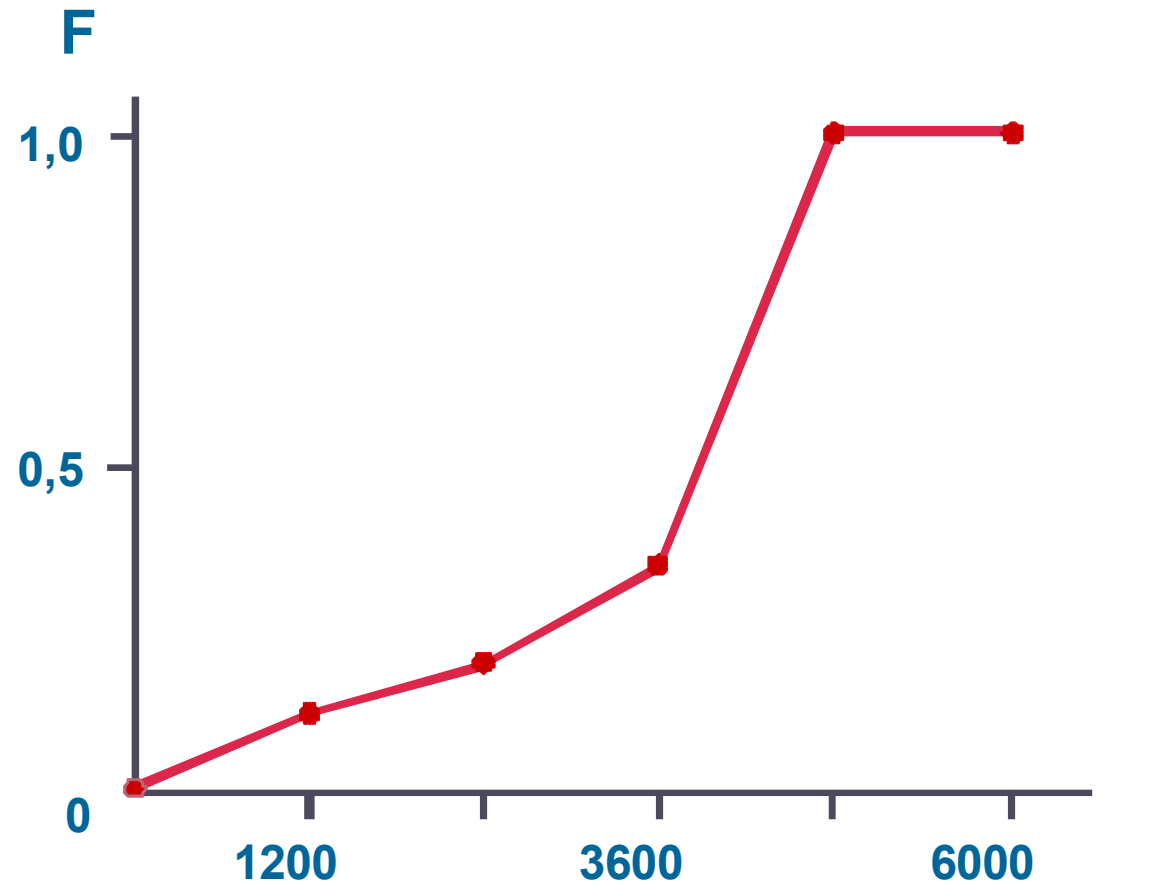
Средний размах изменчивости σ_x

Средняя приспособленность $S = \sum w(i)/N$ ($0 < S < 1$)

ПРИ УВЕЛИЧЕНИИ СИЛЫ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ СРЕДНЯЯ ПРИСПОСОБЛЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ УВЕЛИЧИВАЕТСЯ, А ГРАНИЦА КАТАСТРОФЫ ОШИБОК СДВИГАЕТСЯ ВПРАВО. ТАКИМ ОБРАЗОМ, ПРИ СТАБИЛИЗИРУЮЩЕМ ОТБОРЕ ЭВОЛЮЦИЯ ПОПУЛЯЦИИ НАПРАВЛЕНА В СТОРОНУ УСИЛЕНИЯ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ОБРАТНЫХ СВЯЗЕЙ, КОТОРЫЕ ЯВЛЯЮТСЯ ФАКТОРОМ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ.



Моделирование эволюционного возникновения отрицательной обратной связи под действием стабилизирующего отбора



F - параметр, определяющий силу отрицательной обратной связи

i - количество поколений эволюции

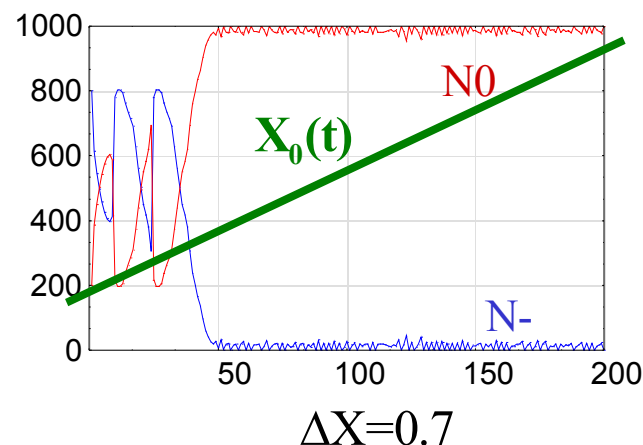
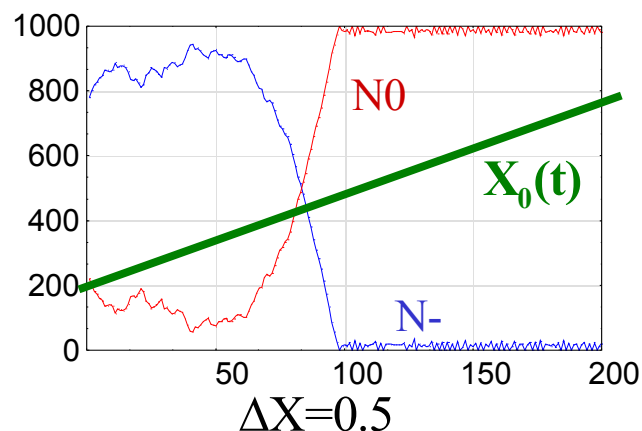


Конкуренция особей с отрицательной обратной связью (N-) и без нее (N0) в ходе эволюции популяции под действием движущего отбора

$$P(\Delta E) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{\Delta E}{\sigma_E}\right)^2}$$

$$W(X) = \sqrt{1/2\pi} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{X-X_0}{\sigma_X}\right)^2}$$

$$X_0(t_{k+1}) = X(t_k) + \Delta X$$



Размер
популяции
 $N=\text{const}$

Оптимальная концентрация белка X_0 на каждом этапе эволюции изменяется на величину ΔX ; $X_{i+1}=X_i+\Delta X$



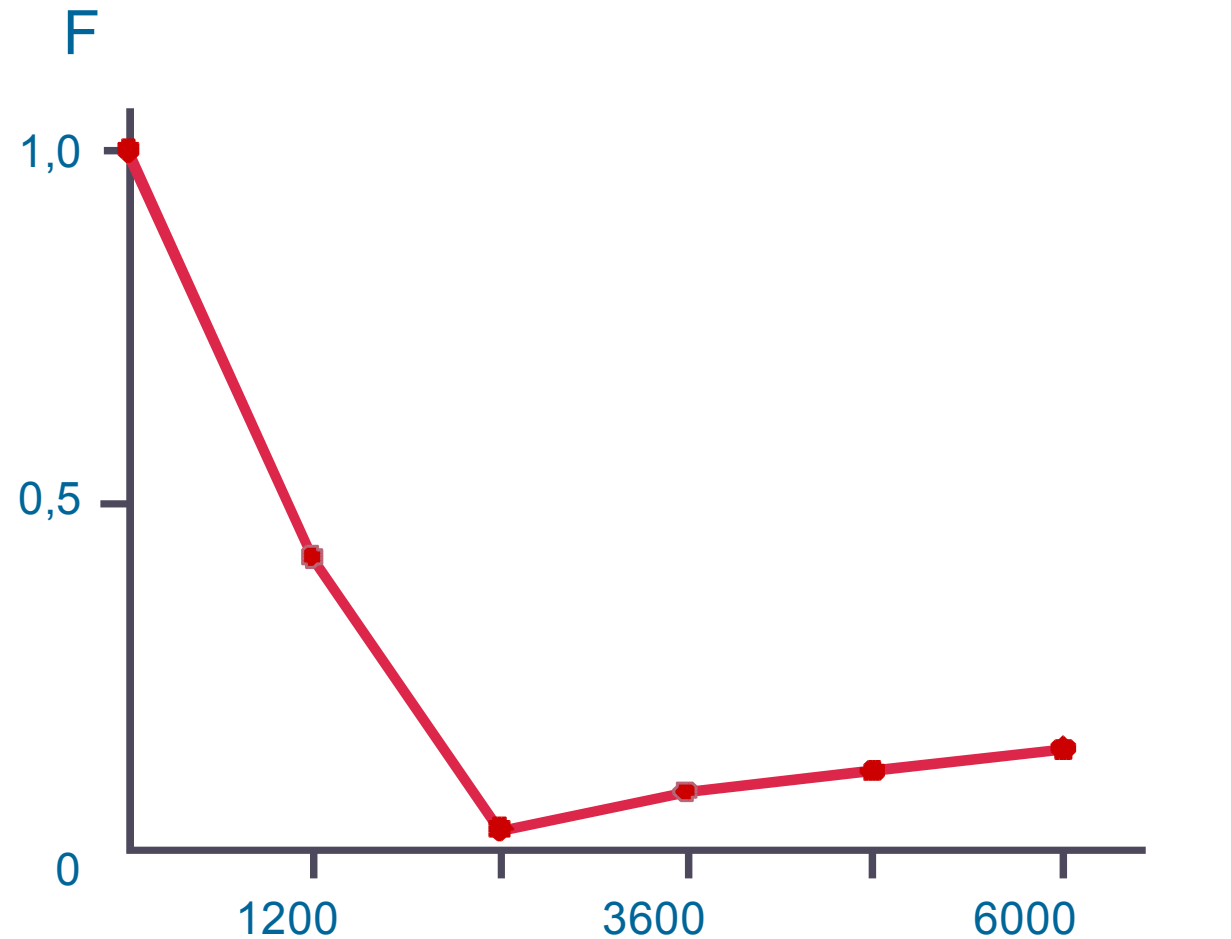
Эволюция отрицательной обратной связи под действием изменяющихся условий среды (движущий отбор)



- **Отрицательная обратная связь предотвращает адаптацию особей к новым условиям, поддерживая критический параметр организма X , от которого зависит его приспособленность, на постоянном уровне, близком к X_0 , не соответствующем изменившимся условиям среды.**
- **Следовательно, при движущем отборе особи без отрицательной обратной связи (или с ослабленной обратной связью) имеют преимущество перед особями с сильными обратными связями.**



Моделирование эволюционной элиминации отрицательной обратной связи под действием движущего отбора

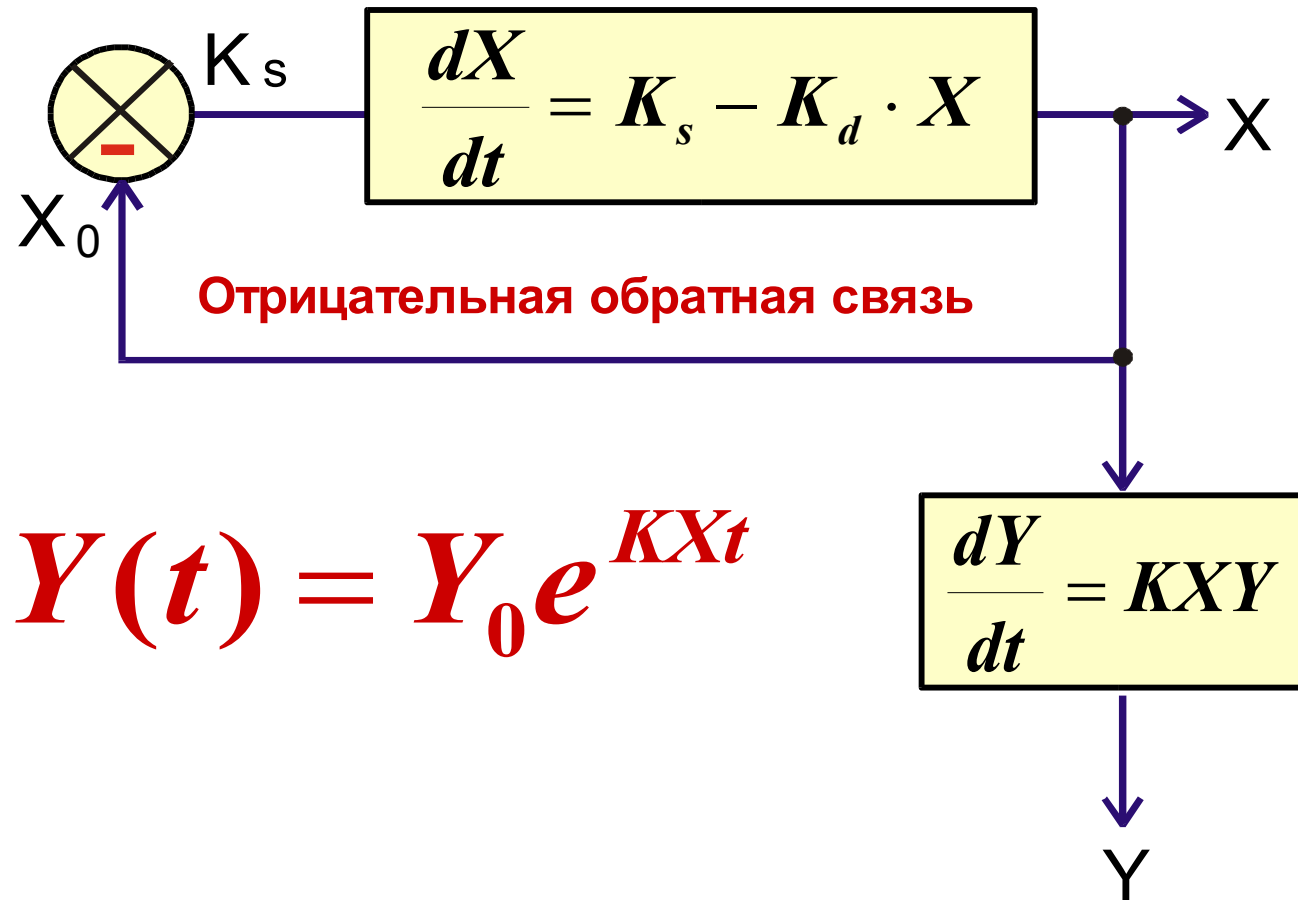


F - параметр, определяющий силу отрицательной обратной связи

i - количество поколений эволюции

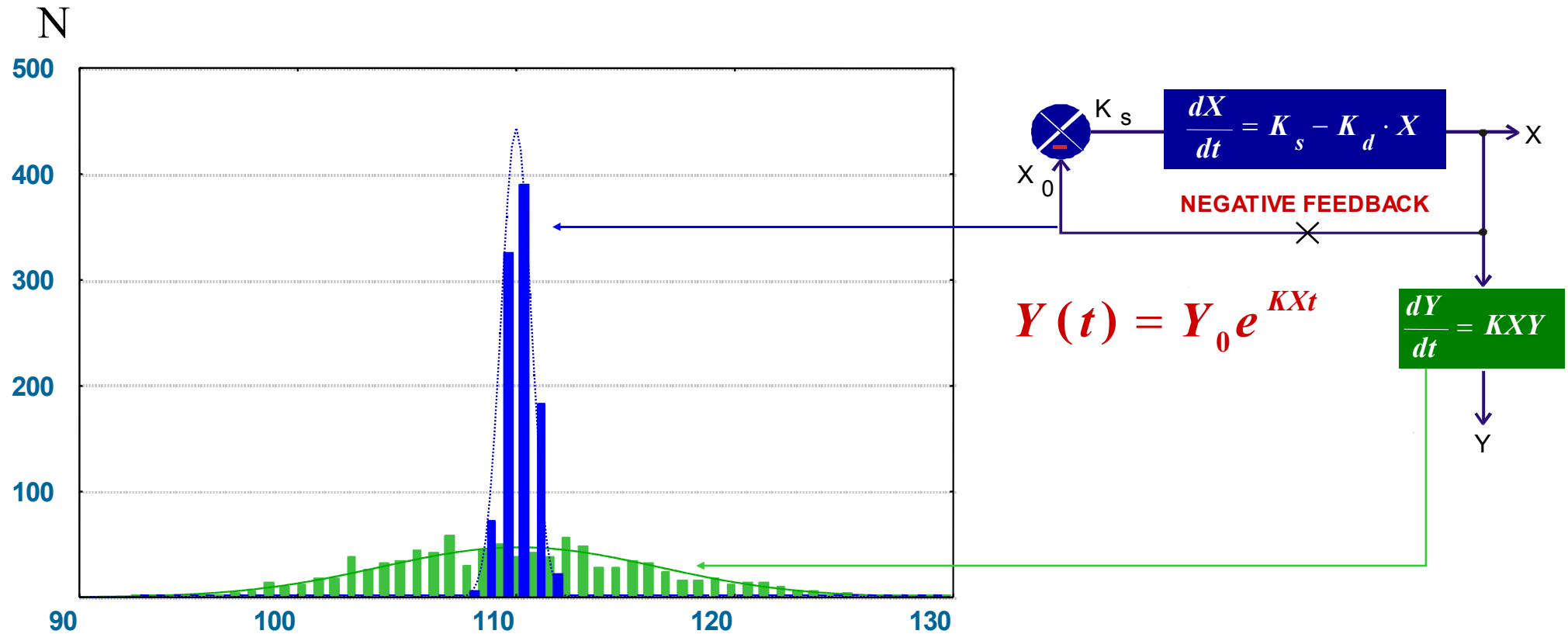


Простейшая модель иерархически организованной биологической системы





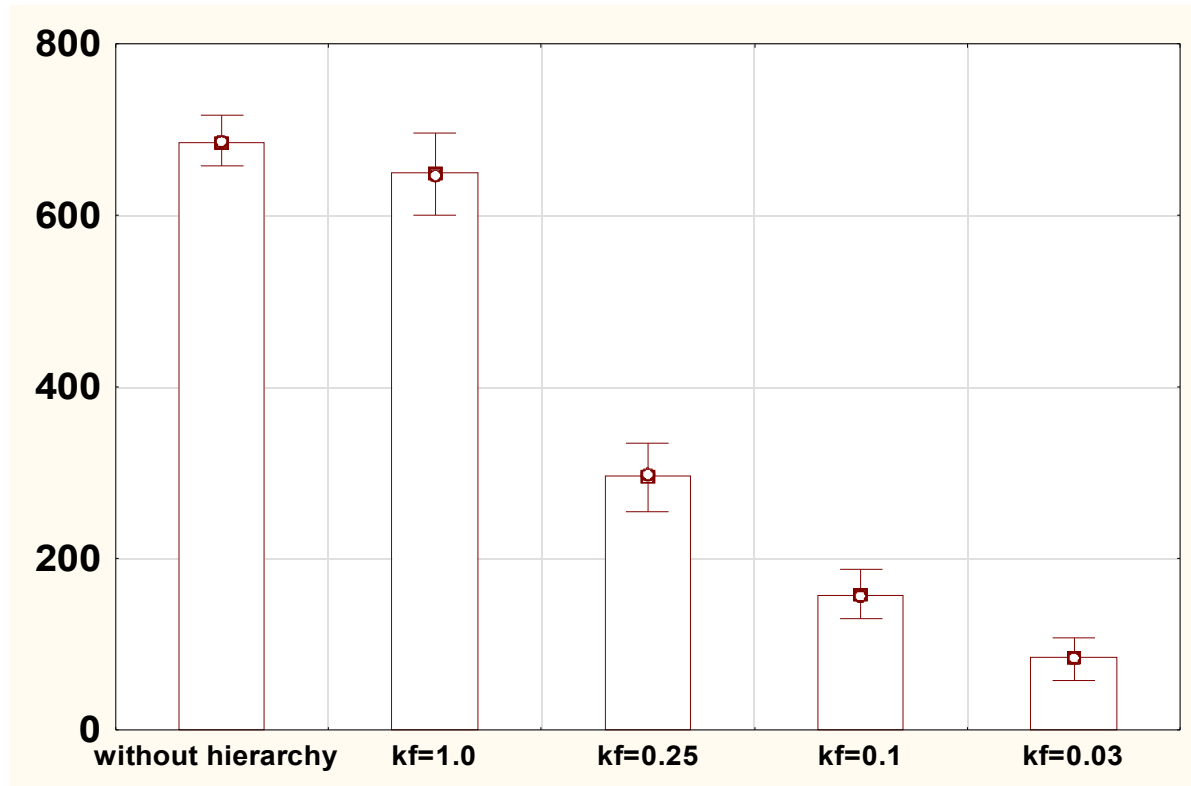
Гиперманифестация мутационного спектра при иерархической организации биологической системы



- Иерархически подчиненный параметр Y экспоненциально зависит от иерархически более высокого параметра X .
- В силу этого мутационные изменения параметра X экспоненциально усиливаются на иерархически подчиненном уровне, приводя к существенно более выраженным изменениям параметра Y .
- Этот эффект называется гиперманифестацией мутационного спектра иерархически подчиненного параметра Y по отношению к мутационному спектру иерархически более высокого параметра X .



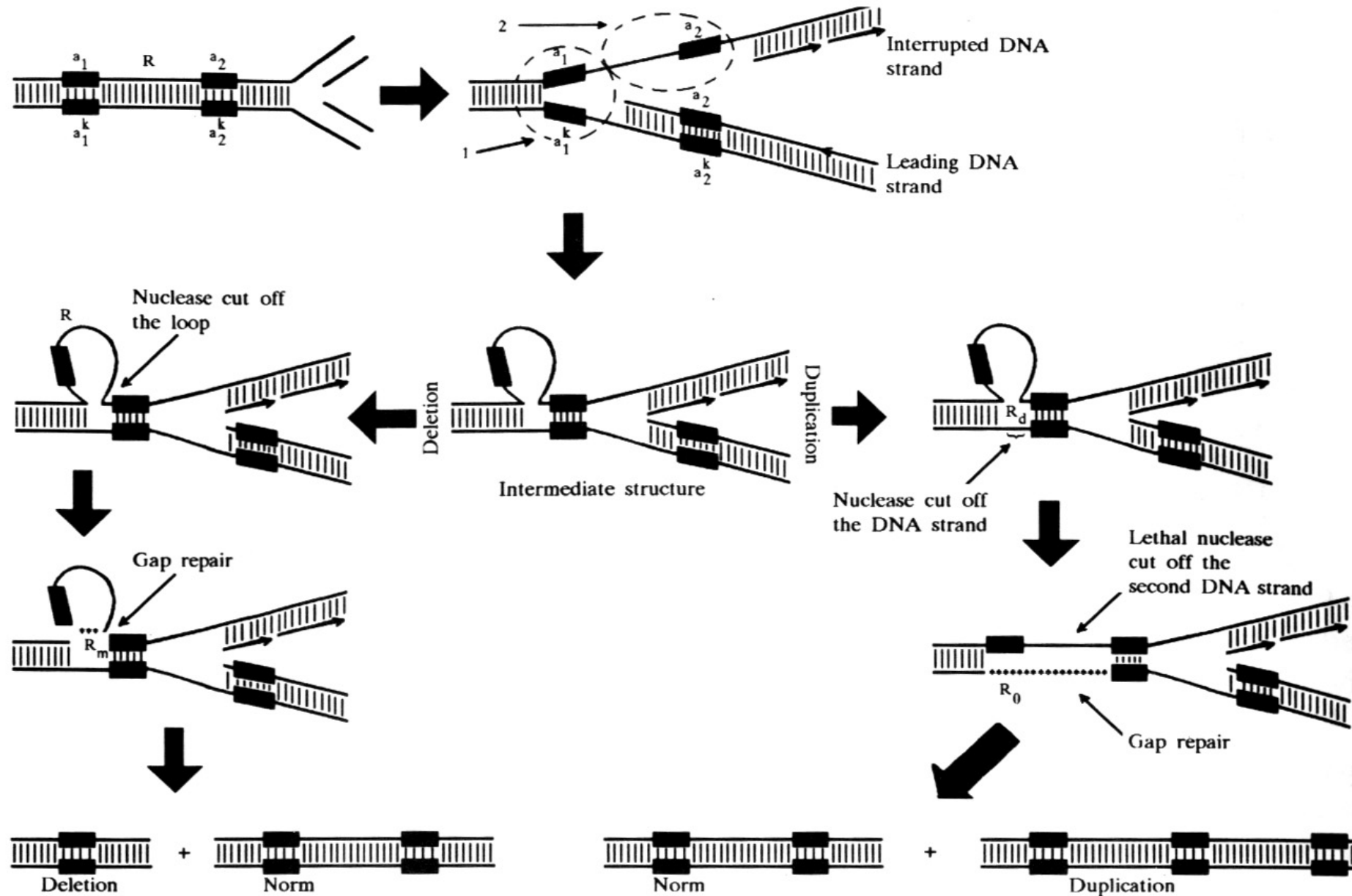
Воздействие отрицательной обратной связи, контролирующей параметр X , на приспособленность популяций, зависящую от параметра Y



- При увеличении силы отрицательной обратной связи, контролирующей параметр X , происходит рост приспособленности популяции по параметру Y .
- При очень выраженной силе отрицательной обратной связи эффект гиперманифестации может быть подавлен.
- Качественно это означает, что при эволюционном возникновении иерархической организации биологических систем одновременно должны усиливаться механизмы контроля иерархически наиболее высоких уровней управления, ограничивающие фенотипическое проявление их мутационной изменчивости и, тем самым, подавляющие эффекты гиперманифестации на подчиненных уровнях.

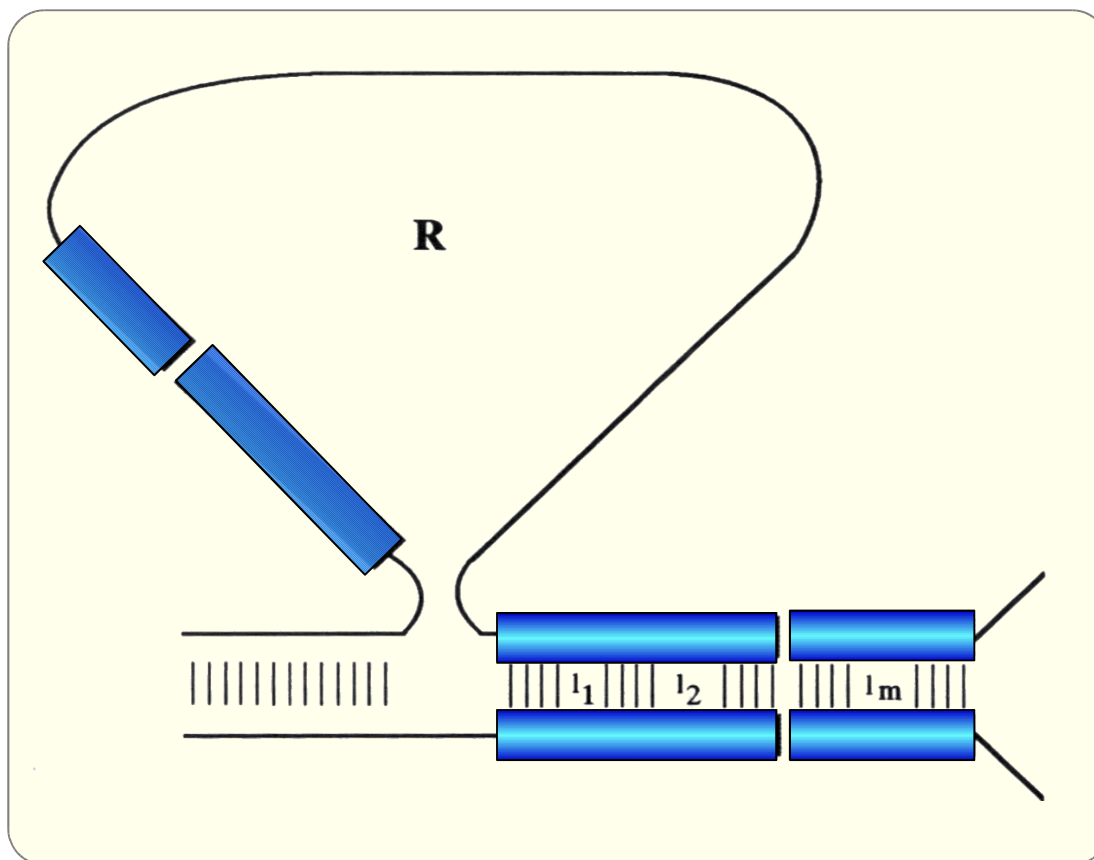


Молекулярный механизм возникновения делеций и дупликаций на основе неправильного спаривания взаимно-комплементарных участков коротких повторов





Формирование промежуточного гетеродуплекса в результате неправильного спаривания взаимно-комплементарных участков прямых повторов.



Взаимно-комплементарные участки прямых повторов обозначены черными прямоугольниками.

R – расстояние между повторами.

$l_1, l_2, \dots, l_m$ – размеры внутренних петель гетеродуплекса



Формулы для вычисления частоты возникновения делеций и дупликаций на основе коротких повторов

Делеции

$$P^{del} = (6.35 \times 10^{-7} / R^{1.67}) \times \exp(0.25w - 1.32m)$$

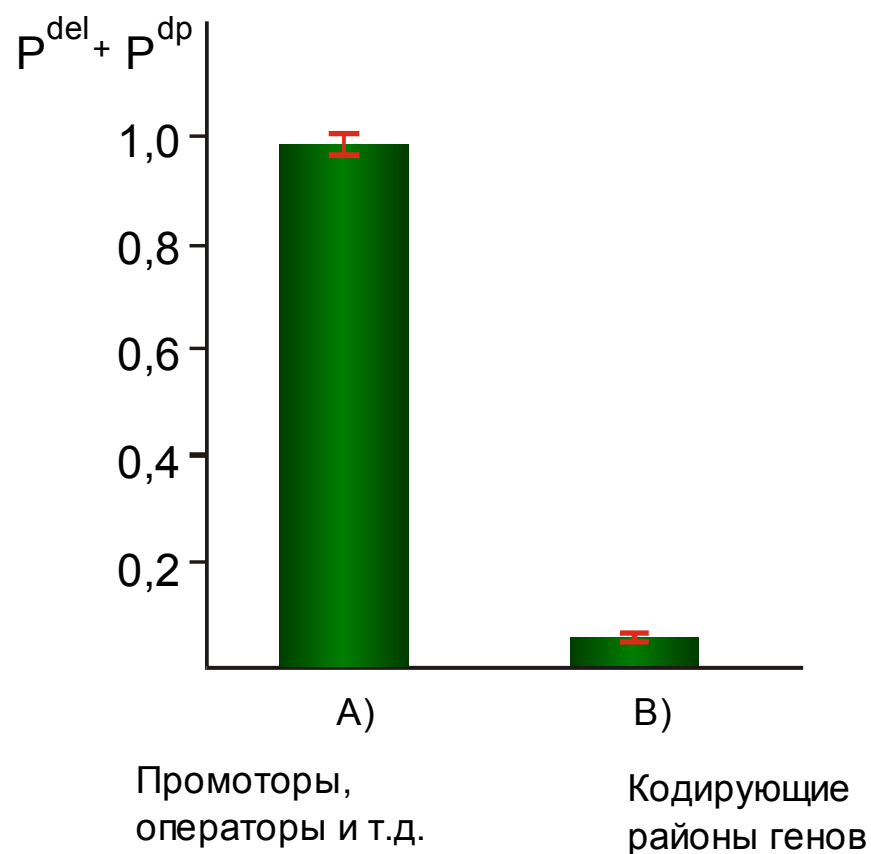
Дупликации

$$P^{pd} = \frac{G \times \exp(-bw - cm)}{R^d \exp(R)}$$

Здесь m и w – параметры гетеродуплекса, R – расстояние между повторами



Частота мутаций в районах генома *E.coli*, соответствующая двум иерархическим уровням организации ($\times 10^3$) – регуляторным районам и кодирующим частям генов





ЗАДАЧИ



**Теоретическое исследование и компьютерное
моделирование механизмов дестабилизирующего
отбора**



Дестабилизирующий отбор (Д.К. Беляев)

Дикие лисицы
характеризуются
агрессивным по
отношению к человеку
поведением





Дестабилизирующий отбор: дружественное поведение одомашненных лисиц по отношению к человеку





Дестабилизирующий отбор (Д.К. Беляев)

Фенотипические
характеристики
лисиц с
дружественным по
отношению к
человеку поведением





Дестабилизации фенотипа - наличие системных фенотипических отклонений от нормы.

Резкое увеличение размаха фенотипической изменчивости, частые нарушения отдельных стадий онтогенеза, в том числе - приводящие к нарушениям симметрии организма.

Особенности фенотипической дестабилизации проявляют генетическую нестабильность - имеют высокую частоту реверсии в ряду поколений.



Дестабилизирующий отбор: качественное описание механизмов



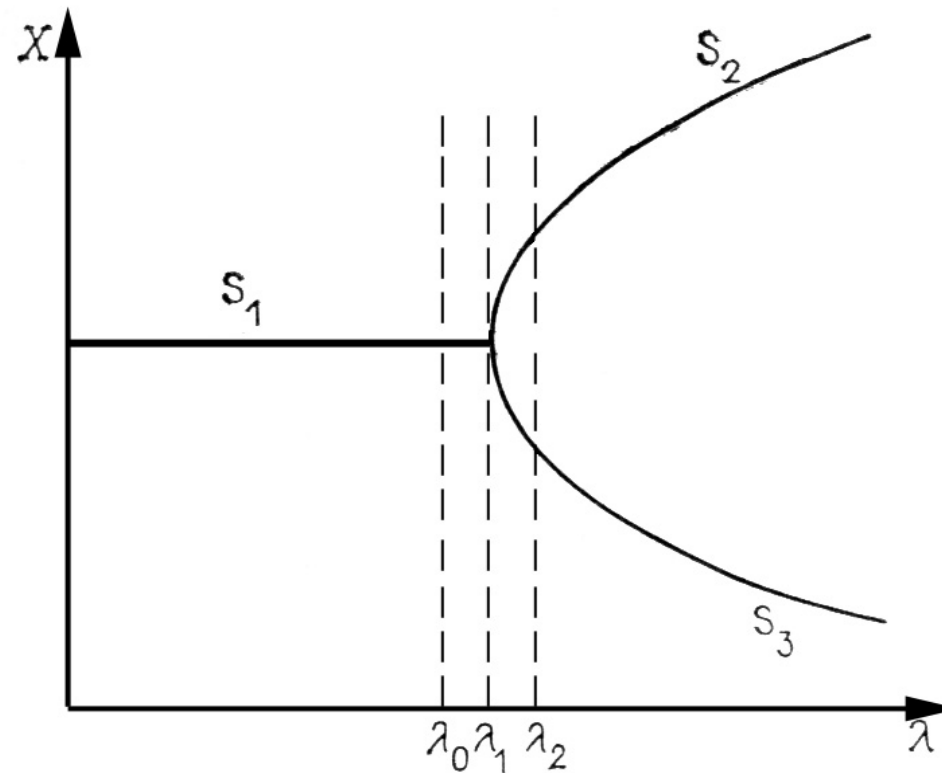
- В результате интенсивного движущего отбора происходит "срыв" иерархически высоких контуров регуляции с отрицательными обратными связями.
- Происходит взрывообразное увеличение размаха фенотипической изменчивости, ранее маскировавшейся компенсаторными эффектами регуляторных контуров, затрагивающее иерархически высокие уровни организации.
- На более низких уровнях эта вскрытая изменчивость многократно усиливается в результате эффекта гиперманифестации.
- При этом гиперманифестация изменчивости оказывается тем больше, чем более высокие уровни управления разрушаются в ходе дестабилизирующего отбора.



В случае, если изменчивость затрагивает критические этапы индивидуального развития, следует ожидать потери динамической устойчивости при прохождении критических стадий онтогенеза (в частности - стохастического выбора траекторий развития при прохождении таких критических стадий).



Дестабилизирующий отбор может приводить к потере динамической устойчивости онтогенеза со случайным выбором альтернативных траекторий развития



Схематическое представление выбора альтернативных состояний (траекторий) онтогенетического развития в зависимости от величины регуляторного параметра λ .

S_1 — нормальное состояние; S_2 и S_3 — аномальные состояния, реализующиеся при существенно измененных значениях параметра λ .