

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za računalništvo
in informatiko



Sintetični biološki preklopni sistemi kot procesna platforma prihodnosti?

21. november
2016

prof.dr.Miha Mraz

<http://lrss.fri.uni-lj.si/bio/index.html>



Kazalo predavanja

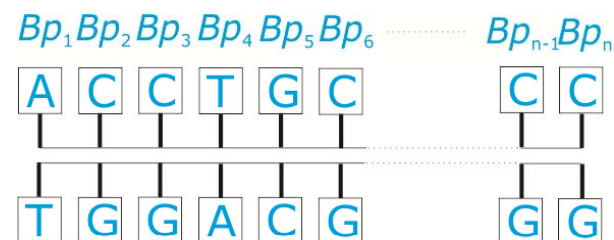
1. Računalniški pogled na delovanje enostavnega biološkega sistema
2. Modeliranje bioloških preklopnih sistemov
3. Metrike za snovanje bioloških preklopnih sistemov
4. Iskanje najustrežnejših sestavnih delov biološkega preklopnega sistema
5. Izhodišča za nadaljnje raziskave



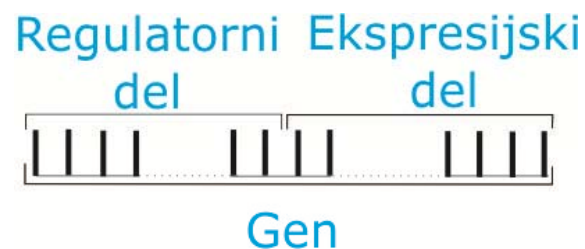
1. Računalniški pogled na delovanje enostavnega biološkega sistema



Sl.1: Dvojna DNA vijačnica.

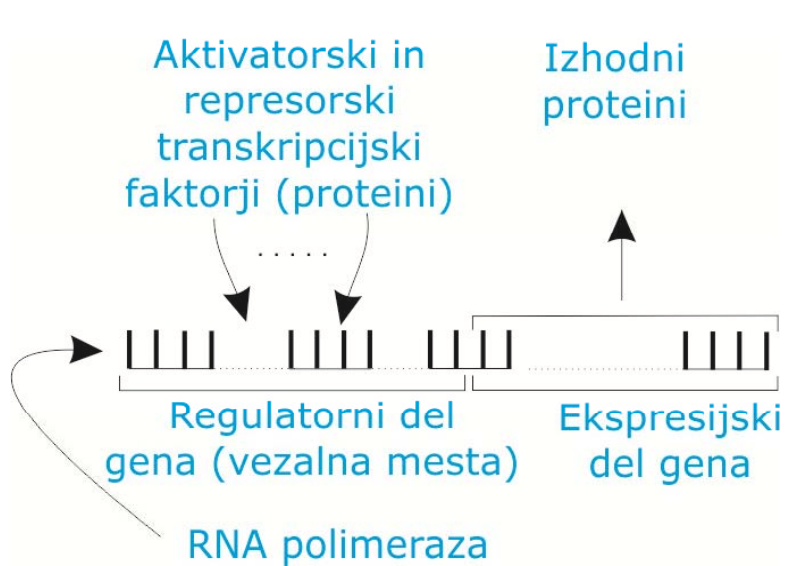


Sl.2: Genom sestavljen iz nukleinskih baz.

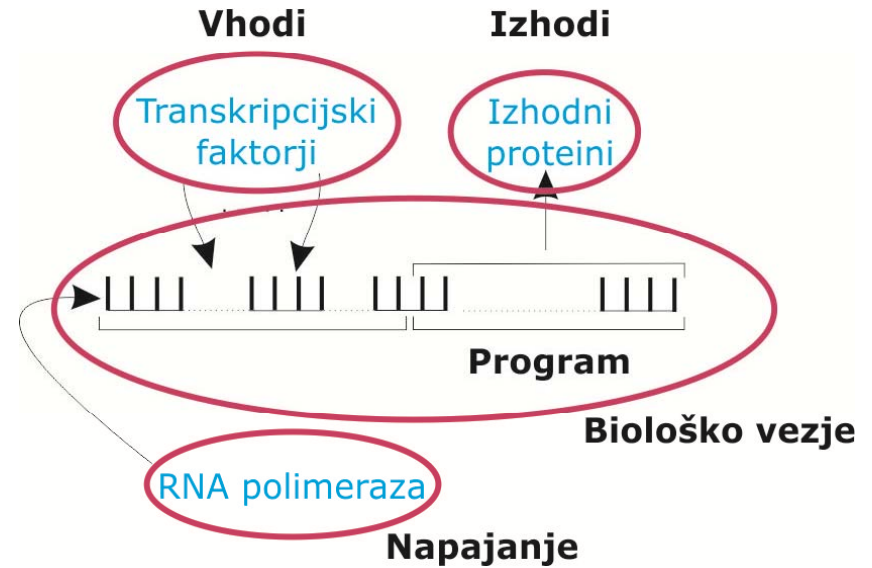


Sl.3: Gen.

Sintetični biološki preklonni sistemi
kot procesna platforma
prihodnosti?



Sl.4: Regulacija ekspresije gena.



Sl.5: Računalniška interpretacija ekspresije gena.



- Obstoj **vhodov, izhodov, programa**, vir energije (**napajanja**)
- **Aktivacijski** transkripcijski faktor: aktivira izražanje gena (tvorbo proteina)
- **Represorski** transkripcijski faktor: zavira izražanje gena (tvorbo proteina)
- Tvorba (sinteza proteina):
 - 1.faza: **transkripcija**: prepis gena v mRNK (T1) – intenzivnost pogojena s prisotnostjo – koncentracijo transkr.faktorja
 - 2.faza: **translacija**: prepis mRNK v ciljni protein (T2) – neodvisna intenzivnost



- Protein x aktivira izražanje proteina y (slika zgoraj)
- Protein x represira (zavira) izražanje proteina y (slika spodaj)
- Aktivacijski faktorji so proteini
- Aktivacijski faktorji se vežejo na regulatorni del gena (promotorski del)
- Promotorski del ima **vezavna mesta**, kamor se vežejo transkripcijski faktorji
- Omrežje krožečih proteinov (izhodi enega gena lahko vstopajo kot aktivacijski faktorji za drug gen)
- GRO – gensko regulatorna omrežja

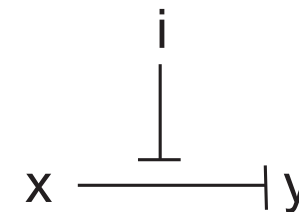
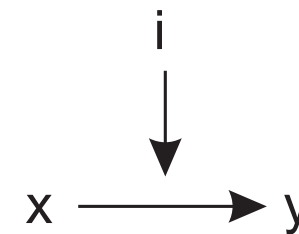
Sintetični biološki preklopni sistemi
kot procesna platforma
prihodnosti?

$x \longrightarrow y$
Aktivacija

$x \text{ ———— } | y$
Represija



- Vhodni segment
 - Aktivno stanje transkripcijskega faktorja – se veže na promotor
 - Neaktivno stanje – se ne veže na promotor
- Dopolnitev vhodnega segmenta z induktorjem (tudi protein):
 - Aktivator je aktiven, če je nanj vezan induktor (sl.zgoraj)
 - Represor je aktiven, če nanj ni vezan induktor (sl.spodaj)





- Izhodni segment:
 - Opazujemo koncentracijo izhodnega proteina kot rezultat ekspresije gena;
 - Če izhodni protein ne nastopa v vlogi transkripcijskega faktorja za drug gen, običajno za izhodni protein uporabimo GFP ali RFP (zeleni ali rdeči fluorescentni protein – lažje (vizuelno) zajemanje izhodne logične vrednosti)



- Ključne točke sintezne biologije:
 - Spreminjanje promotorskega dela gena: kateri proteini bodo nastopali kot transkripcijski faktorji (prožilci/zaviralci aktivnosti ekspresije gena)?
 - Spreminjanje ekspresijskega dela gena (programa): kateri proteini bodo zgenerirani?
 - Tako izhodne proteine kot tudi vhodne opazujemo skozi njihove koncentracije (ekvivalent električni napetosti, kot nosilca logičnih vrednosti)



- Transkripcijski faktorji (proteini) morajo biti **ortogonalni** (se ne vežejo na vezalna mesta drugih transk.faktorjev in ni med njimi navzkrižne reaktivnosti) – ne prihaja do interagiriranja s preostalim regulacijskim sistemom gostitelja
- Transkripcijski faktorji:
 - Naravni
 - Umetni (trenutno najbolj aktualni TAL efektorji, ki se jih modularno umetno sintetizira)



3. Modeliranje bioloških preklopnih sistemov

- Modeliranje preklopnih bioloških sistemov:
 - **Nosilec** informacije: **koncentracija** opazovane **kemijske zvrsti** (npr. proteina)
 - Osnovna delitev modelov:
 - **Kvalitativni** modeli
 - **Kvantitativni** modeli
 - Kvantitativni modeli:
 - **Deterministični** modeli (večinoma temeljijo na ODE (angl. *ordinary differential equations*))
 - **Stohastični** modeli (večinoma temeljijo na kemijski glavni enačbi (angl. *master equation approach*))

Sintetični biološki preklopni sistemi
kot procesna platforma
prihodnosti?



- Potrebni parametri za kvantitativno modeliranje:
 - Identifikacija vseh relevantnih **kemijskih reakcij** (vezave, razgradnje, transkripcije, translacije, itd.) v opazovanem sistemu
 - Za vsako reakcijo je potrebno zagotoviti **parametre** (hitrost transkripcije, hitrost translacije, osnovno izražanje gena, Hillov koeficient, koeficient aktivacije, hitrost razgradnje posameznega proteina, hitrost razgradnje mRNA itd.)



3.1. Gonilnik (bakteriofag λ)



(a)

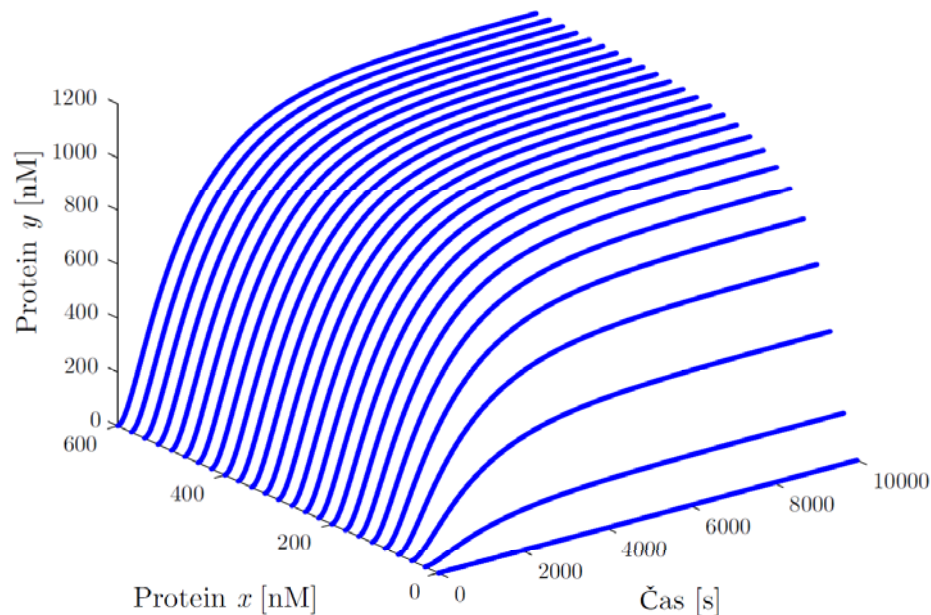


(b)

x	y
0	0
1	1

(c)

Logična shema, biološka shema, pravilnostna tabela gonilnika.



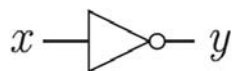
Simulacija ekspresije proteina y na osnovi prisotnosti proteina x (det.model).

Opazki: nelinearnost, počasnost odziva

Sintetični biološki preklopni sistemi kot procesna platforma prihodnosti?



3.2. Negator



(a)



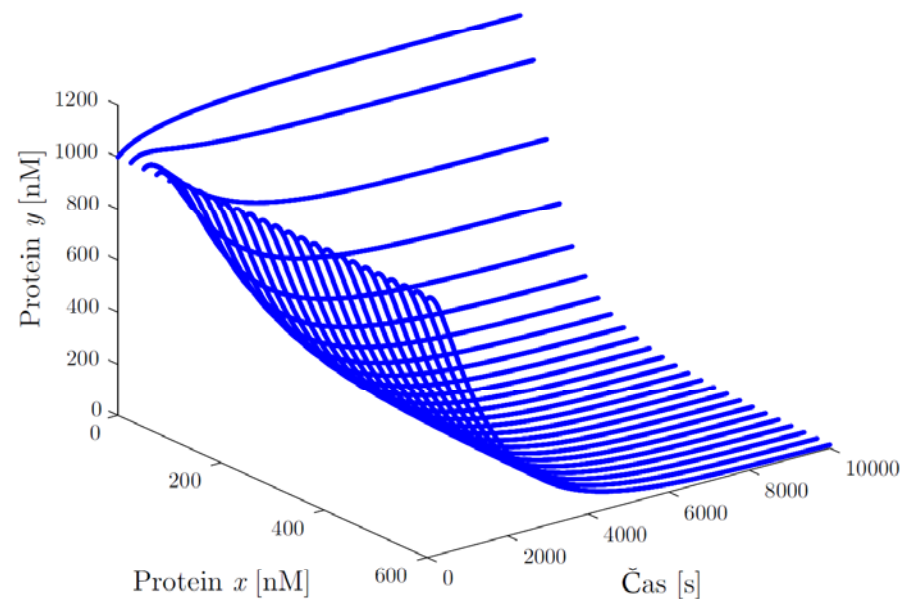
(b)

x	y
0	1
1	0

(c)

Logična shema, biološka shema, pravilnostna tabela negatorja.

Opazki: nelinearnost, počasnost odziva

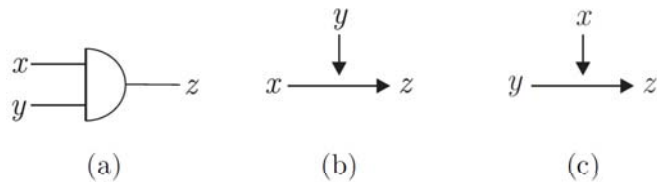


Simulacija ekspresije proteina y na osnovi prisotnosti proteina x (det.model).

Sintetični biološki preklopni sistemi kot procesna platforma prihodnosti?



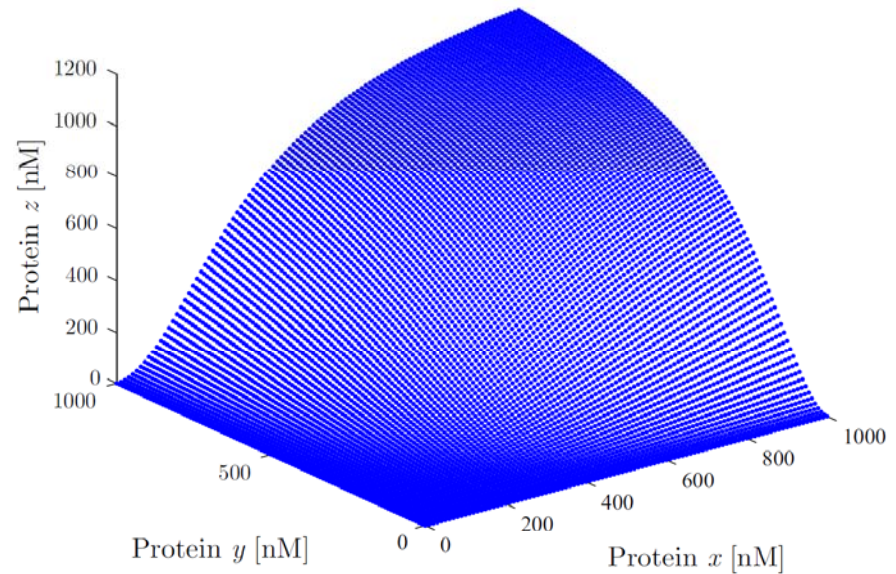
3.3. AND vrata



x	y	z
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

(d)

Logična shema, biološka
shema, pravilnostna tabela
AND vrat.



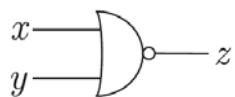
Simulacija ekspresije
proteina z na osnovi prisotnosti
proteinov x in y (determ.model).

**Opazke: nelinearnost,
počasnost odziva, z protein ima drugačem maksimum
koncentracije kot x in y**

Sintetični biološki preklopni sistemi
kot procesna platforma
prihodnosti?



3.4. NOR vrata



(a)



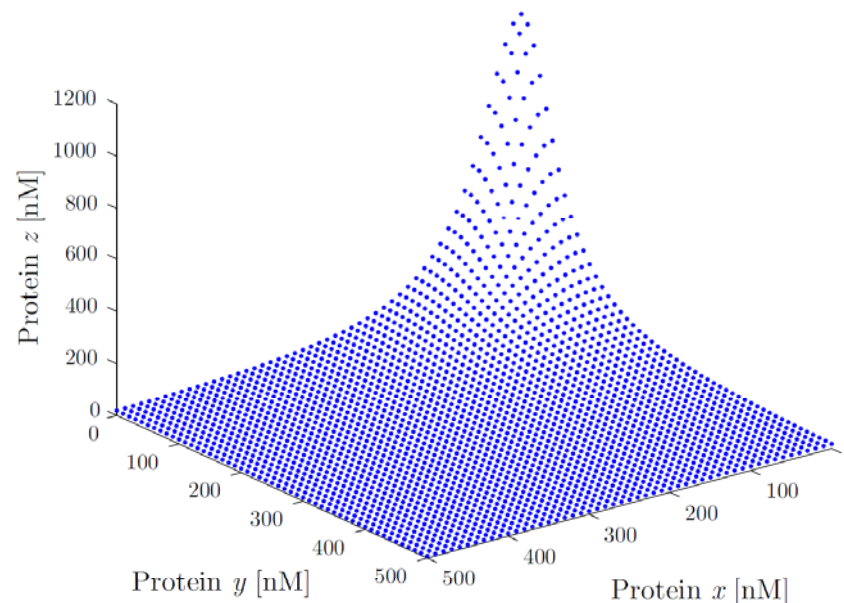
(b)

x	y	z
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

(c)

Logična shema, biološka shema, pravilnostna tabela NOR vrat.

Opazke: nelinearnost, počasnost odziva, z protein ima drugačem maksimum koncentracije kot x in y



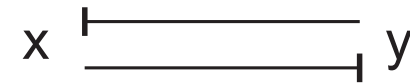
Simulacija ekspresije proteina z na osnovi prisotnosti proteinov x in y (determ.model).

Sintetični biološki preklopni sistemi kot procesna platforma prihodnosti?



3.5 Bistabilen sistem

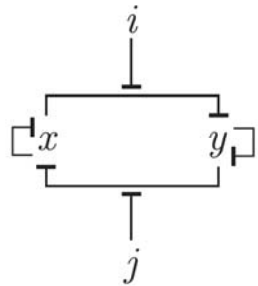
- Enostavno stikalo, ki ni zmožno preklopa – pomnilni element
- Dve stabilni stanji sistema (01) in (10)
- Protein posredno aktivira samega sebe



x	y	D ¹ x	D ¹ y
0	0	?	?
0	1	0	1
1	0	1	0
1	1	?	?



3.6 Preklopno stikalo – RS pomnilna celica



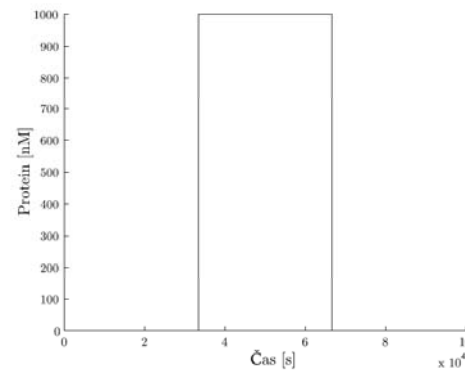
(a)

i	j	D^1x	D^1y
0	0	x	y
0	1	1	0
1	0	0	1
1	1	!	!

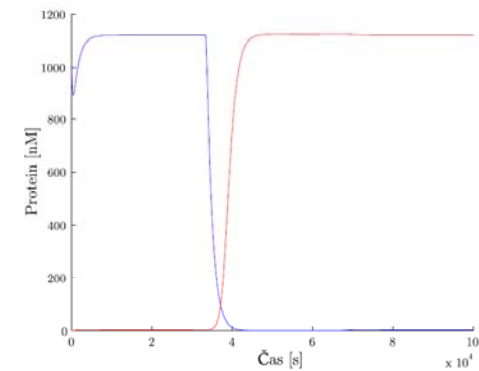
(b)

Logična shema, biološka shema, pravilnostna tabela preklopnega stikala; i in j sta induktorja.

x visok, y nizek, prihod i : i se veže na x , x postane neaktiven, oživi ekspresija y , x se razgradi (odtod časovni zamik); ob umiku i se stanje ohrani;



(a)



(b)

Simulacija ekspresije proteinov x in y na osnovi začasne prisotnosti proteina i .

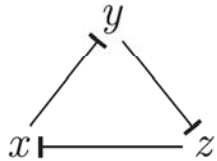
Sintetični biološki preklopni sistemi kot procesna platforma prihodnosti?



- Pomen **samorepresije** proteinov x in y : v stanju pomnjenja enega stanja lahko pride do prekomerne formacije „visokega“ proteina, kar bo kasneje onemogočalo „hiter“ preklop; slednje imenujemo za **samoregulacijo proteinov**
- Samorepresija mora biti „šibkejša“ od represije drugega proteina (merjenje moči različnih vplivov)



3.7. Represilator - oscilator

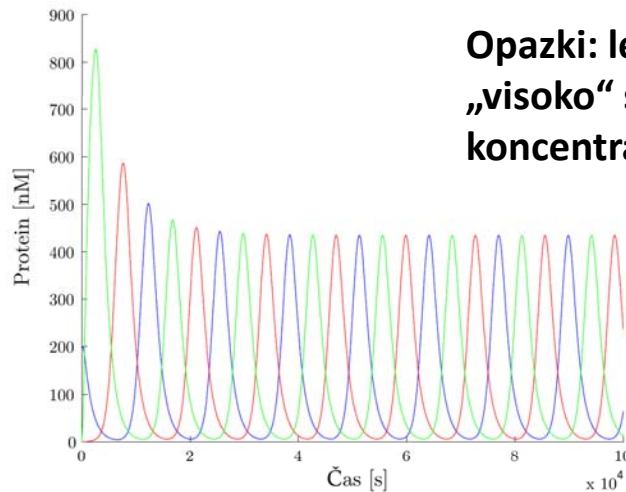


(a)

x	y	z	D^1x	D^1y	D^1z
0	0	1	0	1	0
0	1	0	1	0	0
1	0	0	0	0	1

(b)

Biološka shema,
pravilnostna tabela
represilatorja.



Opazki: legalno začetno stanje sistema predvideva le eno „visoko“ stanje (le eden od proteinov je v „visoki“ koncentraciji, posredno samorepresiranje)

Simulacija ekspresije
proteinov x , y in z na osnovi
Samorepresije (det.model).

Sintetični biološki preklopni sistemi
kot procesna platforma
prihodnosti?



- Cilj oscilatornih sistemov:
 - Samodejno vzdrževanje oscilacij
 - Ujemanje v amplitudi in frekvenci
- Oscilator zgrajen na osnovi represije mora tvoriti **liho število** represijskih proteinov. Slednji morajo biti **ortogonalni**.



3.8 NOR vrata in 16 dvovhodnih logičnih funkcij

- Glej članek: Rok Gaber, et.al.: Designable DNA-binding domains enable construction of logic circuits in mammalian cells (Nature chemical biology, DOI:10.1083/NCHEMBIO.1433)