

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za računalništvo in informatiko

Optične tehnologije in nanotehnologije
Seminarska naloga

Deterministični model preklopnega genetskega stikala

Avtorji:

Samo Kralj, Maja Somrak, Dušan Vučko

Mentorja:

Miha Moškon, Miha Mraz

Ljubljana, januar 2011

Kazalo

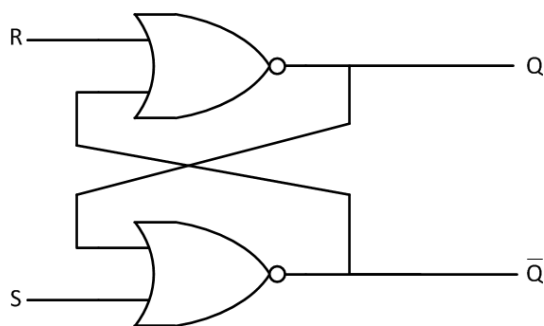
1. Uvod.....	3
2. Osnove genetskih omrežij	4
3. Genetsko stikalo	6
3.1. Teoretične osnove.....	6
3.2. Biološka realizacija.....	6
3.3. Matematični opis	10
4. Simulacija in analiza	12
4.1. Koncentracije represorjev v odvisnosti od časa.....	12
4.2. Koncentracija GFP v odvisnosti od IPTG.....	13
4.3. GFP v odvisnosti od IPTG in β	13
4.4. GFP v odvisnosti od IPTG in γ	16
4.5. GFP v odvisnosti od IPTG in η	18
4.6. GFP v odvisnosti od α_1 in α_2	20
4.7. GFP v odvisnosti od γ in β	22
5. Zaključek	25
6. Literatura.....	26
Dodatek A – MATLAB koda	27

1. Uvod

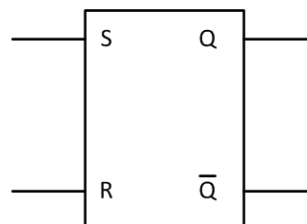
V nalogi je predstavljeno sintetično genetsko preklopno stikalo kot logični ekvivalent RS-pomnilni celici.

Klasična elektronska RS-pomnilna celica temelji na sekvenčni logiki in omogoča pomnjenje enega bita informacije. Ima dva vhoda (RESET, SET) in dva izhoda (Q , \overline{Q}). Pogosto kot vhod zaradi sinhronske zasnove vezja pišemo še urin signal (CLK), ki pa v našem primeru ni pomemben in ga ne omenjamo.

Realizacija RS celice z običajnimi logičnimi vrati je prikazana na sliki 1, simbol na sliki 2, pravilnostno tabelo pa podaja tabela 1. Vhod $S=1$ (SET) postavi stanje Q na 1; vhod $R=1$ (RESET) postavi stanje Q na 0; vhod $R=0$, $S=0$ ohrani stanje (nova vrednost Q je enaka stari). Vhod $R=1$, $S=1$ je prepovedan.



Slika 1. RS celica, zgrajena iz NOR vrat.



Slika 2. Logični simbol RS celice.

R	S	Q_{nov}	$\overline{Q}_{\text{nov}}$
0	0	Q	\overline{Q}
0	1	1	0
1	0	0	1
1	1	x	x

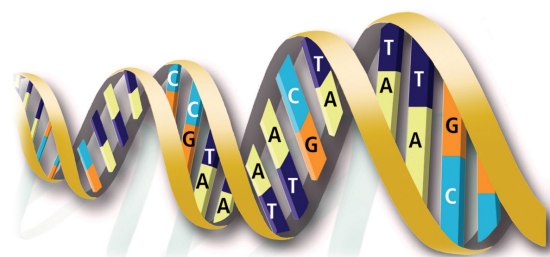
Tabela 1. Pravilnostna tabela RS celice.

Cilj naše naloge je bil v biološkem sistemu na osnovi dinamike tvorjenja proteinov preko genetskega oz. DNK zapisa postaviti in analizirati model preklopnega stikala. Slednje kot eden od gradnikov umetnih genetskih omrežij predstavlja korak bližje k logični regulaciji delovanja celic. Tako prispeva tudi v smeri omogočanja manipuliranja in opazovanja bioloških procesov na ravni genov.

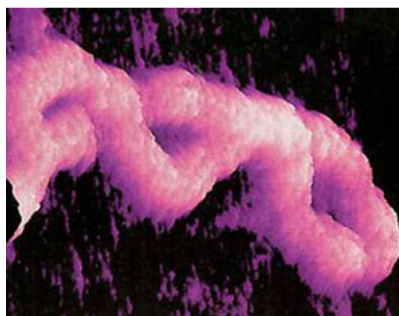
2. Osnove genetskih omrežij

Proteini (beljakovine) so molekule, ki skrbijo za opravila znotraj celice. Sestavljeni so iz aminokislin.

Genetska informacija celice je kodirana v molekulah **DNK** v notranjosti celice. Bistveni del DNK sestavljajo nukleotidi oz. dušikove baze A (adenin), C (citozin), G (gvanin) in T (timin). A vedno nastopa v paru s T, C pa v paru z G. Tako dobimo bazne pare. Shema DNK je prikazana na sliki 3, realna struktura pa na sliki 4.



Slika 3. DNK zapis.



Slika 4. 850.000-kratna povečava DNK z elektronskim mikroskopom.

DNK zapis je razdeljen na podenote, imenovane **geni** (slika 5). Geni predstavljajo navodila za sintezo proteinov. Z manipulacijo DNK oz. genov lahko vplivamo na to, kateri proteini se bodo sintetizirali in kako, s tem pa vplivamo na delovanje same celice.



Slika 5. Osnovna struktura posameznega gena. Kodon je zaporedje treh nukleotidov.

Sintezo proteina sestavljata dva koraka.

1. **Transkripcija:** encim (tudi encimi so proteini), imenovan polimeraza, se veže na promotor gena (tj. območje DNK na začetku gena). Nato začne ustvarjati kopijo DNK imenovano mRNK. Prvotno DNK sestavljata dve verigi (dvojna vijačnica), mRNK pa ena veriga. V mRNK namesto nukleotida T nastopa nukleotid U. Transkripcija se konča, ko polimeraza naleti na stop kodon.
2. **Translacija:** encim, imenovan ribosom, se veže na mRNK (kopijo DNK) oz. natančneje na mesto vezave ribosoma (RBS). Nato za vsako trojico nukleotidov mRNK (en kodon) določi ustrezno aminokislino; te skupaj sestavljajo končni protein. Translacija se konča, ko ribosom naleti na stop kodon.

Eden od načinov za regulacijo sinteze proteinov je vplivanje na hitrost transkripcije. To dosežemo z uporabo **transkripcijskih faktorjev**, posebnih proteinov, ki se pri transkripciji vežejo na promotor poleg polimeraze. S tem vplivajo na hitrost transkripcije DNK in s tem tudi na to, kako hitro oz. kako intenzivno se nek protein sintetizira. Transkripcijski faktorji močno vplivajo na končni organizem – npr. ljudje in miši imajo izredno podoben DNK zapis, vendar je regulacija transkripcije genov (koliko proteina se tvori oz. kako) zelo različna.

Transkripcijski faktorji so dveh vrst:

- **aktivatorji** – pospešujejo transkripcijo, tj. pospešujejo vezavo polimeraze;
- **represorji** – zavirajo (represirajo) transkripcijo, tj. zavirajo vezavo polimeraze.

Tudi protein, ki se zgenerira, je lahko transkripcijski faktor (ni pa nujno).

Osnova za matematično modeliranje transkripcijskih faktorjev so Hillove funkcije. Za našo nalogo je pomembna predvsem Hillova funkcija za represor. Naj bo $f(X)$ hitrost produkcije proteina. X je koncentracija vezanega represorja - nek signal (npr. molekula) povzroči, da se X veže na promotor in opravlja funkcijo represorja. Hillova funkcija za represor je tedaj:

$$f(x) = \frac{\beta}{1 + \left(\frac{X}{K}\right)^n}$$

Pri tem je:

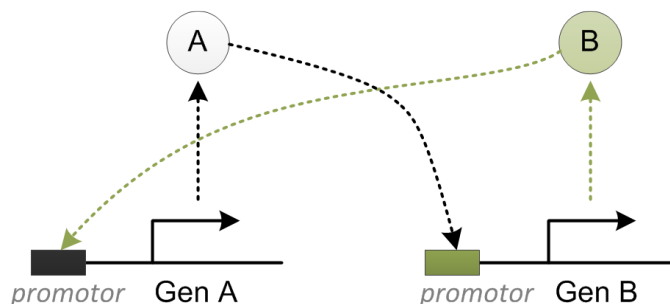
- β maksimalna možna stopnja (hitrost) transkripcije; dosežena je le, ko represor ni vezan na promotor oz. ko represije ni ($X=0$);
- K represijski koeficient – določa potrebno koncentracijo X , da se transkripcija dovolj močno represira;
- n Hillov koeficient - določa strmino funkcije.

Genetsko omrežje sestavljajo proteini in njihove medsebojne interakcije (regulacija transkripcije, združevanje v nove komplekse ...). V genetska omrežja lahko posegamo z zunanjimi signali (npr. v obliki vnosa molekul) in tako vplivamo na njihovo dinamiko, s tem pa na dinamiko celic.

3. Genetsko stikalo

3.1. Teoretične osnove

Genetsko stikalo v splošnem določata dva represorska proteina, A in B, ki medsebojno zavirata sintezo drug drugega – A se obnaša kot represor za B, B pa kot represor za A. Bolj natančno, represor A se veže na promotor gena B - tako zavira transkripcijo na njem in s tem nastajanje proteina B. B pa se veže na promotor gena A in zavira sintezo proteina A. Omenjeni način interakcije proteinov imenujemo **medsebojna represija**. Splošno shemo takega stikala prikazuje slika 6.



Slika 6. Genetsko stikalo na osnovi medsebojne represije. Protein A nastaja s transkripcijo gena A in represira transkripcijo gena B. Protein B nastaja s transkripcijo gena B in represira transkripcijo gena A.

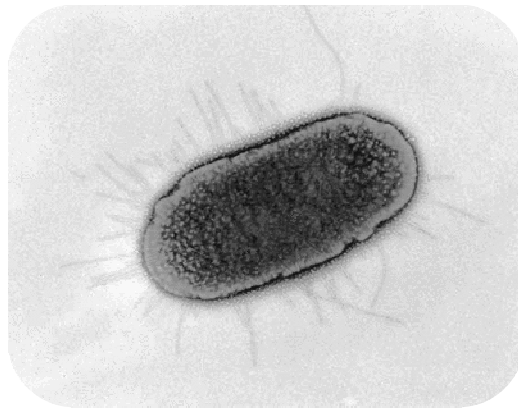
Idealno je teoretično za tak sistem značilna bistabilnost – ima natanko dve stabilni stanji:

- **prevlada proteina A:** če je koncentracija proteina A večja od koncentracije proteina B, A zavira nastajanje B bolj, kot B zavira nastajanje A. Proteina B je zaradi močnejše represije vedno manj, zato se tudi sinteza A vedno manj zavira - sčasoma prevlada protein A.
- **prevlada proteina B:** če je koncentracija proteina B večja od koncentracije proteina A, sčasoma prevlada protein B po enaki logiki kot za prejšnje stanje – B represira A močnejše, kot pa A represira B, zato se tvori vedno manj proteina A in vedno več proteina B.

Bistabilnost je minimalni pogoj za zmožnost pomnjenja v sistemu, zato tak pristop lahko izkoristimo za zasnovno stikala.

3.2. Biološka realizacija

Stikalo realiziramo v bakteriji *E. Coli*, saj je ta dobro raziskana in kot taka nudi primerno poznano okolje. To olajša ustrezno izbiro biokemijskih sestavin in nadzor ter manipulacijo delovanja. *E. Coli* sicer najdemo v prebavnem traktu ljudi in živali; tipično je dolga približno 2 μm in premera 0,5 μm . Prikazana je na sliki 7. Svoj DNK zapis hrani v notranjosti.



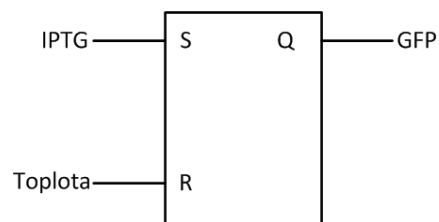
Slika 7. *E. Coli* bakterija.

Zunanja signala, ki opravljata enako vlogo, kot jo v RS celici opravljata SET in RESET, sta:

- **IPTG** (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid) – prisotnost te spojine postavi stikalo v stanje, ki ga interpretiramo kot logično 1 (SET). IPTG *E. Coli* ne presnavlja, zato vnešeno koncentracijo lahko obravnavamo kot konstantno;
- **toplotni pulz** – kot normalno temperaturo rasti celic oz. plazmidov vzamemo $32\pm 1^\circ\text{C}$; toplotni pulz pomeni dvig temperature na $42\pm 1^\circ\text{C}$ in postavi stikalo v stanje, ki ga interpretiramo kot logično 0 (RESET).

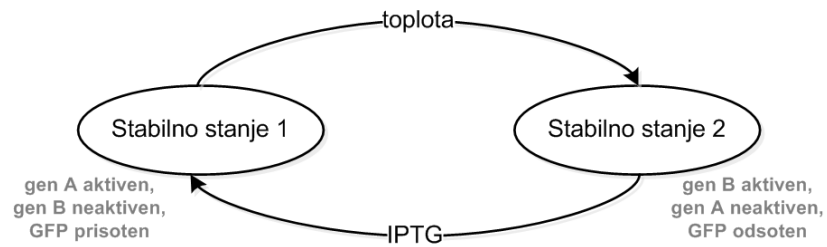
Ali se stikalo nahaja v stanju logične 0 ali 1 določimo glede na koncentracijo enega od dveh opazovanih proteinov. Za lažjo zaznavo vzporedno s proteinom, ki predstavlja logično 1, tvorimo še zeleni fluorescentni protein (**GFP** - *green fluorescent protein*), ki ga enostavno zaznamo z izpostavitvijo modri svetlobi. Prisotnost GFP torej pomeni stanje logične 1, odsotnost GFP pa stanje logične 0.

Tako genetsko stikalo lahko obravnavamo kot RS celico, prikazano na sliki 8.



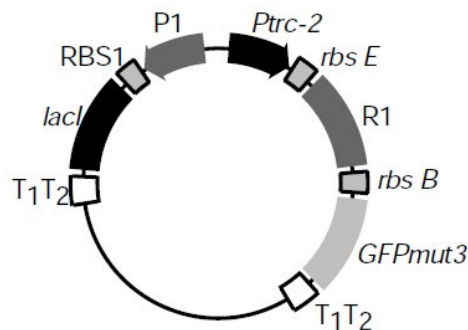
Slika 8. Genetsko stikalo kot RS celica.

Prehajanje med dvema stabilnima stanjema, doseženima z medsebojno represijo dveh proteinov, prikazuje slika 9.



Slika 9. Možni stanji stikala.

Vnos lastnega genetskega zapisa dosežemo z uporabo plazmidov. Plazmid je samostojna DNK molekula, tipično krožne oblike. Zasnova plazmida za genetsko stikalo je prikazana na sliki 10. Določa, kateri proteini se bodo tvorili in kako. V kombinaciji s signali (IPTG, toplotni pulz) sestavlja celotno stikalo.



Slika 10. Plazmid preklopnega genetskega stikala.

Sestavni deli plazmida so:

- promotorja P1 in Ptrc-2;
- RBS1, rbs E, rbs B – mesta, kamor se veže ribosom pri mRNA translaciji;
- geni lacI, R1 in GFPmut3;
- terminatorja T₁T₂.

Ustrezne gene bi lahko razporedili tudi na dva plazmida, brez da bi s tem vplivali na funkcionalnost stikala.

Glede na to, na katerem od obeh promotorjev poteka transkripcija (in nato translacija), ločimo dve situaciji:

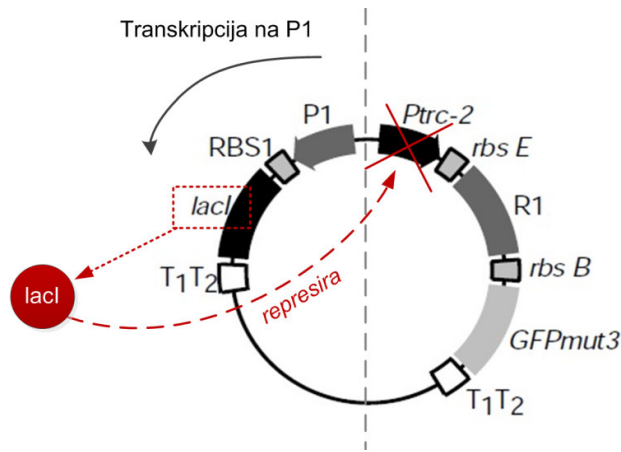
- s transkripcijo od promotorja **Ptrc-2** naprej nastajata represor **R1** in **GFP** (transkripcija genov R1 in GFPmut3); R1 deluje kot represorski protein za P1.
- s transkripcijo od promotorja **P1** naprej nastaja Lac represor (**lacI**), ki deluje kot represor za Ptrc-2.

Če se omejimo na stabilni stanji, jih lahko s transkripcijo povežemo na naslednji način:

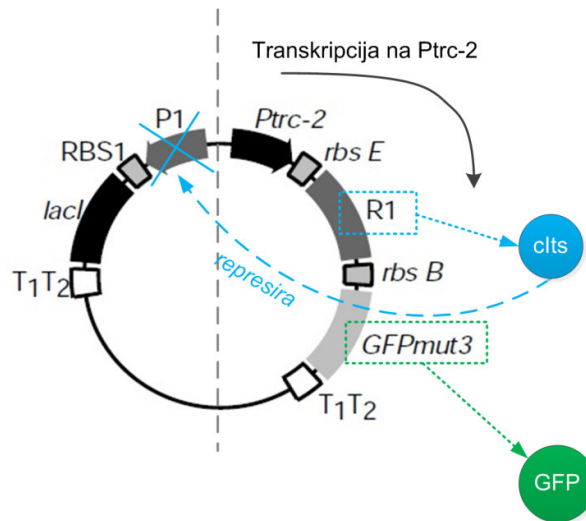
- **transkripcija na P1** → producira se lacI → lacI deluje kot represor za Ptrc-2 → represirana je transkripcija na Ptrc-2 in **GFP se ne tvori** (logična 0).

- **transkripcija Ptrc-2** → producira se R1, ki je represor za P1 → represirana je transkripcija na P1 in **tvori se GFP** (logična 1).

Transkripcijo na plazmidu grafično prikazujeta slika 8 in slika 9.



Slika 11. Transkripcija na P1. Sintetizira se lacI.



Slika 12. Transkripcija na Ptrc-2. Sintetizirata se R1 (cIts) in GFP.

Naj represor skupaj s promotorjem, na katerem zavira transkripcijo, predstavlja promotorsko-represorski par. V plazmidu nastopata dva promotorsko-represorska para:

- 1. par (R1, P1 na sliki plazmida): R1 oz. λ represor je represor za promotor P1 (PL_s1con). λ represor je cIts – vrsta CI proteina. Občutljiv je na temperaturo – **toplotni pulz povzroči, da se λ represor (R1) zatre**, torej se intenzivnost transkripcije na P1 poveča, saj ob prisotnosti toplotnega pulza R1 transkripcije na P1 ne represira več dovolj. Ker se zato poveča intenzivnost transkripcije na P1, se tvori vedno več lacI represorja, ki zatre transkripcijo na Ptrc-2. Sčasoma je tako transkripcija na Ptrc-2 zatrta, zato se tudi GFP ne sintetizira več (oz. se

sintetizira kvečjem v zelo majhni meri) - **GFP je odsoten**, torej smo prišli v stabilno stanje logične 0, za katerega je značilna nizka koncentracija cIts.

- 2. par (R2, P2, t.j. lacI in Ptrc-2): protein lacI represira transkripcijo na Ptrc-2. Če je prisoten IPTG, ta nevtralizira lacI – **lacI se z IPTG veže v kompleks, ki ni več represor za Ptrc-2**. Transkripcija na Ptrc-2 se zato zavira vedno manj, istočasno pa se vedno bolj tvori R1 (cIts), ki represira P1. Sčasoma tako pridemo v stabilno stanje logične 1 (visoka koncentracija cIts), ko je transkripcija na P1 učinkovito zatrta, transkripcija na Ptrc-2 pa nemoteno teče – **sintetizira se GFP**. Koncentracija GFP je proporcionalna koncentraciji R1.

Povzamemo lahko, da IPTG vodi v močno povečano koncentracijo GFP (stanje logične 1), toplotni pulz pa močno zmanjšano koncentracijo GFP (stanje logične 0). Skladno s pravilnostno tabelo RS celice prisotnosti obeh signalov hkrati ne dopuščamo.

Kot začetno si lahko predstavljamo stanje, ko poteka transkripcija tako na P1 kot na Ptrc-2. Ko dodamo IPTG ali toplotni pulz pa stikalo v določenem preklopnem času zavzame enega od stabilnih stanj. Transkripcija nato izrazito poteka le na eni polovici plazmida.

Eksperimentalni preizkus pokaže, da stikalo, realizirano z opisanim plazmidom, obdrži zadnje inducirano stanje tudi, ko zunanji signal (IPTG ali toplotni pulz) odstranimo.¹ Npr., če sistem z IPTG vzbudimo v stanje visoke koncentracije R1/GFP in nizke koncentracije lacI, bo sistem ostal v stanju visoke koncentracije R1/GFP tudi, ko IPTG odstranimo. Analogno velja za drugo stanje. Zaključimo lahko, da ima stikalo v resnici sposobnost pomnjenja in da so njegova stanja stabilna.

3.3. Matematični opis

Koncentracijo obeh represorjev, u in v , podajata naslednji diferencialni enačbi:

$$\frac{dv}{dt} = \frac{\alpha_2}{1 + \left(\frac{u}{\left(1 + \frac{IPTG}{K}\right)^\eta} \right)^\gamma} - v \qquad \frac{du}{dt} = \frac{\alpha_1}{1 + \left(\frac{v}{\left(1 + \frac{Temp}{K}\right)^\eta} \right)^\beta} - u$$

v je koncentracija represorja R1 (cIts), u pa koncentracija represorja R2 (lacI). Parametri enačb:

- α_1 je efektivna hitrost sinteze (transkripcija + translacija) represorja u ;
- α_2 je efektivna hitrost sinteze (transkripcija + translacija) represorja v ;
- β je kooperativnost represije promotorja 2;
- γ je kooperativnost represije promotorja 1;
- η je kooperativnost vezave IPTG;
- K je disociativna konstanta, ki opisuje, kako hitro se IPTG loči od lacI;
- $IPTG$ je vrednost, ki predstavlja signal IPTG; ob odsotnosti IPTG je $IPTG=0$;
- $Temp$ je vrednost, ki predstavlja toplotni signal; ob odsotnosti tega signala je $Temp=0$.

Kooperativnost represije predstavlja eksponent, ki ga pripišemo represorju in pove končno moč represije oz. kako močno bo koncentracija represorja vplivala na represijo,

ki jo izvaja ta represor. Npr., za kooperativnost $\beta=1$ bo represija promotorja 2 naraščala linearno s koncentracijo represorja u (u^1), za $\beta=2$ pa kvadratno s koncentracijo represorja (u^2 – dvakratna količina represorja vodi v štirikrat močnejšo represijo) itd.

Koncentracijo posameznih represorjev v vsakem izmed stabilnih stanj določimo na podlagi presečišč rešitev $\frac{dv}{dt} = 0$ in $\frac{du}{dt} = 0$.

Koncentracijo GFP lahko aproksimiramo s Hillovo funkcijo za represor:

$$\frac{dGFP}{dt} = \frac{\alpha_2}{1 + \left(\frac{u}{K_{GFP}}\right)^\eta} - GFP$$

Kot represor je uporabljen u (lacI), ki represira nastajanje GFP. K_{GFP} je konstanta, ki podaja intenzivnost degradacije GFP.

Vrednosti posameznih parametrov so podane v naslednjem poglavju.

Opisani matematični modeli so deterministični in kot taki zadovoljivo opišejo obnašanje sistema zgolj do določene mere. Za natančnejši opis bi bilo potrebno uporabiti stohastični model.

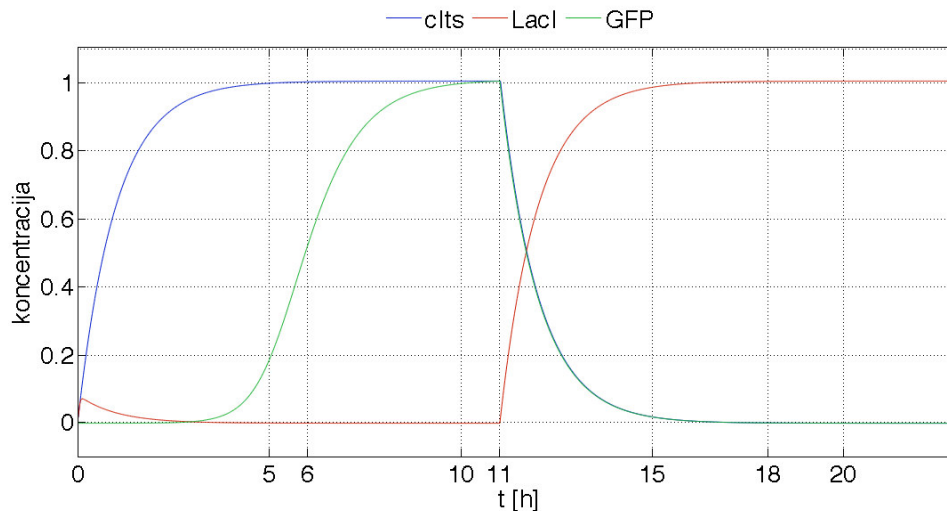
4. Simulacija in analiza

4.1. Koncentracije represorjev v odvisnosti od časa

Na podlagi enačb iz poglavja 3.3. simuliramo obnašanje stikala v 24 ur dolgem obdobju. Sistem se na začetku nahaja v stanju visoke *lacI*/nizke *clts* koncentracije. Simulacija poteka v naslednjih korakih:

- ob času $t=0$ dodamo 2mM IPTG (SET signal), zato sistem po preklopnem času preide v stanje visoke koncentracije *clts*/nizke koncentracije *lacI* – torej v stanje, ki ga obravnavamo kot logično 1, kar indicira tudi povečanje koncentracije GFP;
- po 6 urah ($t=6$) signal IPTG odstranimo; kot pričakovano sistem ostane v enakem stanju (visoka *clts*/nizka *lacI* koncentracija);
- po 11 urah ($t=11$) sprožimo toplotni pulz (RESET signal – $Temp=1$) tako, da dvignemo temperaturo na 42°C; po pričakovanju sistem po nekem preklopnem času preide v stanje logične 0, tj. stanje nizke koncentracije *clts*; sočasno s preklpom začne upadati tudi koncentracija GFP;
- po 18 urah ($t=18$) toplotni pulz odstranimo (znižamo temperaturo nazaj na običajnih 32°C); stikalo ostane v stanju logične 0, torej si uspešno zapomni zadnje stanje.

Rezultat simulacije grafično prikazuje slika 13.



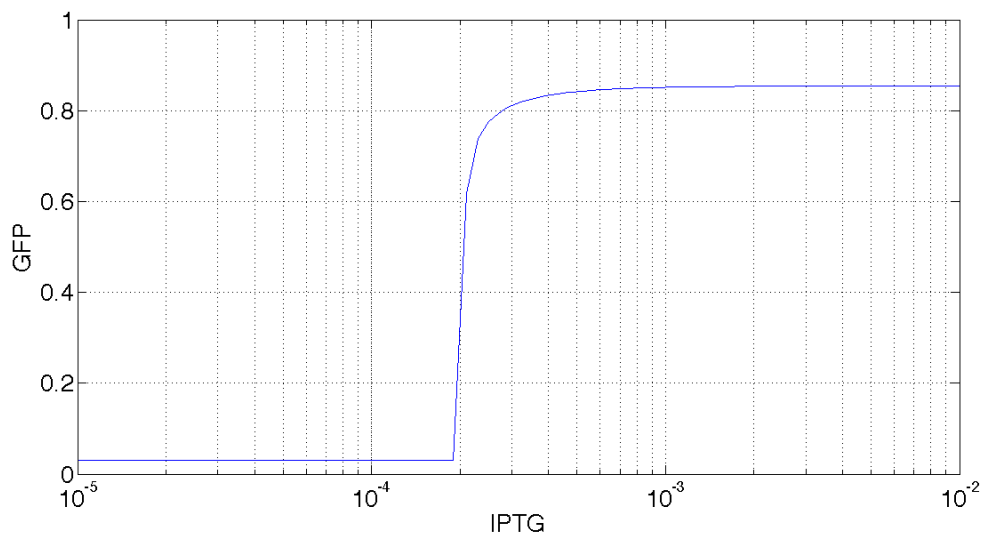
Slika 13. Normalizirana koncentracija represorjev *clts* in *LacI* ter proteina GFP v odvisnosti od časa.

Iz grafa lahko vidimo, da so preklopni časi – tj. čas med prehodom iz enega stabilnega stanja v drugo – relativno dolgi, saj trajajo več ur. Pri simulaciji so bile uporabljene naslednje vrednosti parametrov¹:

- $\alpha_1 = 156,25$;
- $\alpha_2 = 15,62$;
- $\beta = 2,5$;
- $\gamma = 1$;
- $\eta = 2,0015$;
- $K = 2,9618e-5$;
- $K_{GFP} = 0,0755$;

4.2. Koncentracija GFP v odvisnosti od IPTG

Na grafu koncentracije GFP (vzorci so vzeti po 8h simuliranja iz poglavja 4.1.) v odvisnosti od koncentracije IPTG (slika 14) opazimo zelo hiter prehod v visoko stanje pri koncentracijah, višjih od približno $2 \cdot 10^{-4}$. Pri koncentracijah IPTG, nižjih od $2 \cdot 10^{-4}$, se preklop v visoko stanje ne zgodi, že koncentracije le nekoliko višje od te mejne vrednosti pa so dovolj za zanesljiv preklop.



Slika 14. Normalizirana koncentracija GFP v odvisnosti od IPTG po 8h simulacije.

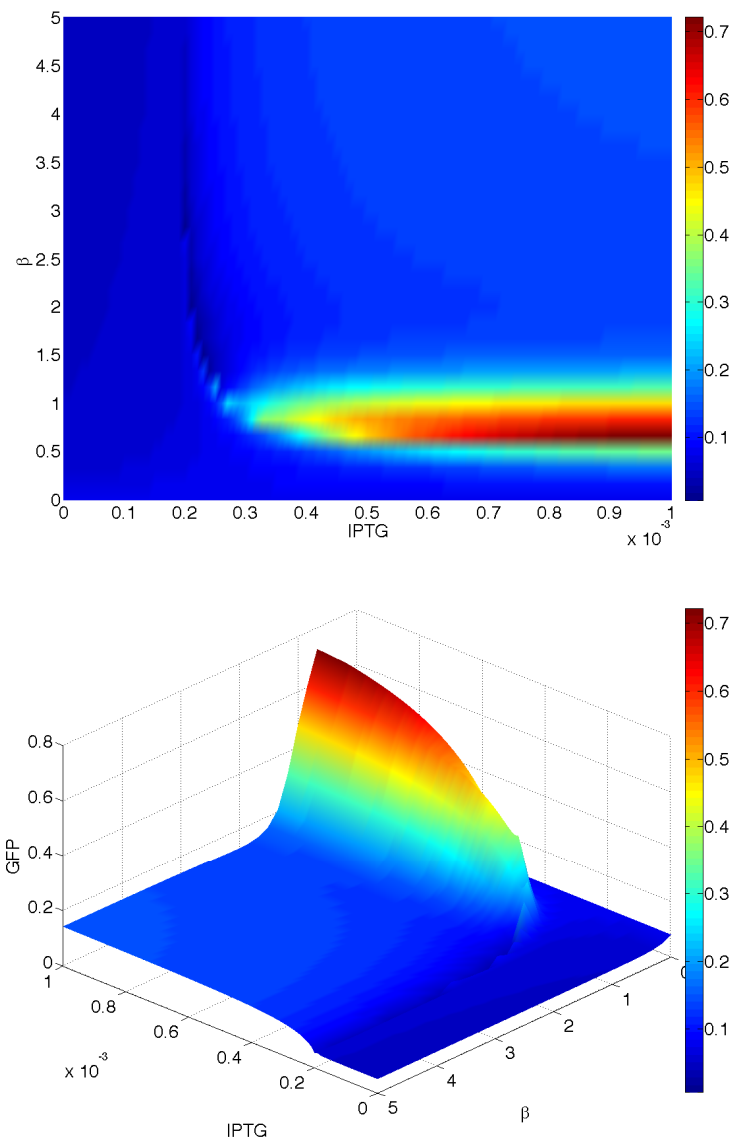
4.3. GFP v odvisnosti od IPTG in β

Vzemimo sistem (genetsko stikalo), ki ga simuliramo v skladu z opisom iz poglavja 4.1. Pri nadaljnjih testiranjih želimo preučiti vrednosti parametrov, ki nastopajo v determinističnem modelu. V ta namen obravnavamo stanje sistema po preklopu stikala iz logične 0 v 1 po 8 urah (v prvem primeru tudi po 4 urah) ter pri preklopu iz logične 1 v 0 po 16 urah. Pri preklopu iz 0 v 1 po 8 urah pričakujemo stabilno stanje logične 1 (visoka koncentracija GFP) – od SET signala (IPTG) je minilo 8 ur. Po 16 urah pa pričakujemo stanje logične 0, saj je od uporabe RESET signala (toplotni pulz ob $t=11$) minilo 5 ur. **Za ugodne parametre upoštevamo tiste, ki po času simulacije 8 ur privedejo v stanje logične 1, po času 16 ur pa v stanje logične 0.** Taki parametri so pogoj za bistabilno delovanje stikala.

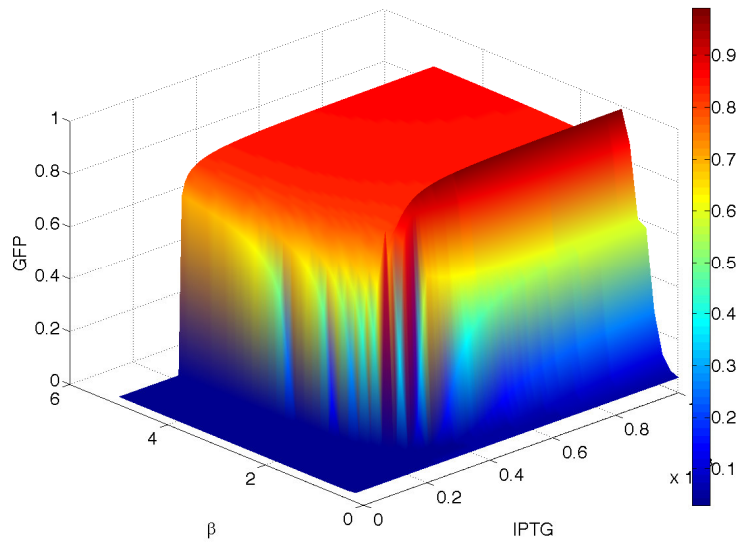
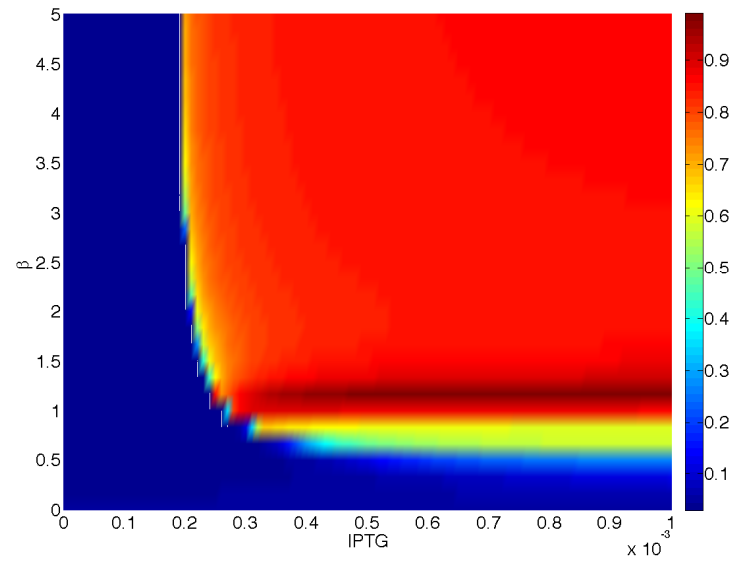
Najprej opazujemo normalizirano koncentracijo GFP v odvisnosti od vrednosti IPTG in β . Parametre smo določili na podlagi grafov na slikah 15, 16 in 17.

Po 4h se zgodi preklop v visoko stanje pri koncentraciji $\text{IPTG} > 0,6 \cdot 10^{-3}$ pri $\beta \approx 0,6$. Po 8h (preklop 0→1) stanje logične 1 dosežemo pri koncentraciji $\text{IPTG} > 0,3 \cdot 10^{-3}$ za vse $\beta > 0,8$; pri $\beta = 1,2$ je preklop najbolj izrazit. Pri vrednosti $\beta > 2$ pa stanje logične 1 dosežemo že pri nižji koncentraciji $\text{IPTG} > 0,2 \cdot 10^{-3}$. Pri koncentracijah $\text{IPTG} < 0,2 \cdot 10^{-3}$ ali $\beta < 0,7$ se stanje ne spremeni.

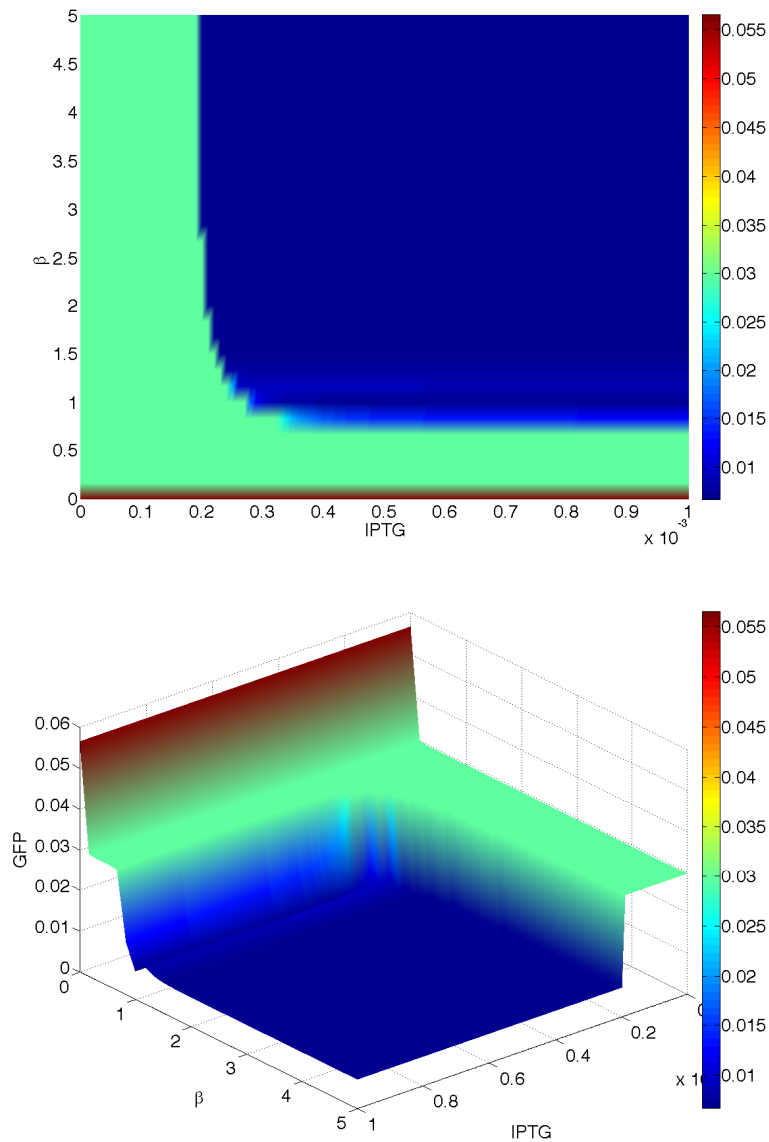
Po 16h (preklop 1→0) bo pri koncentracijah $\text{IPTG} < 0,2 \cdot 10^{-3}$ ali $\beta < 0,7$ stanje celice vedno na logični 0, saj pred tem ni prišlo do preklopa na logično 1. Pri koncentracijah $\text{IPTG} > 0,3 \cdot 10^{-3}$ in $\beta > 0,8$ pa se po 16h stanje ustrezno spremeni iz 1 v 0.



Slika 15. Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in β po 4h (preklop 0→1). Ugodni parametri so pri visoki koncentraciji GFP (>0,6).



Slika 16. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in β po 8h (preklop $0 \rightarrow 1$). Ugodni parametri so pri so pri visoki koncentraciji GFP.*



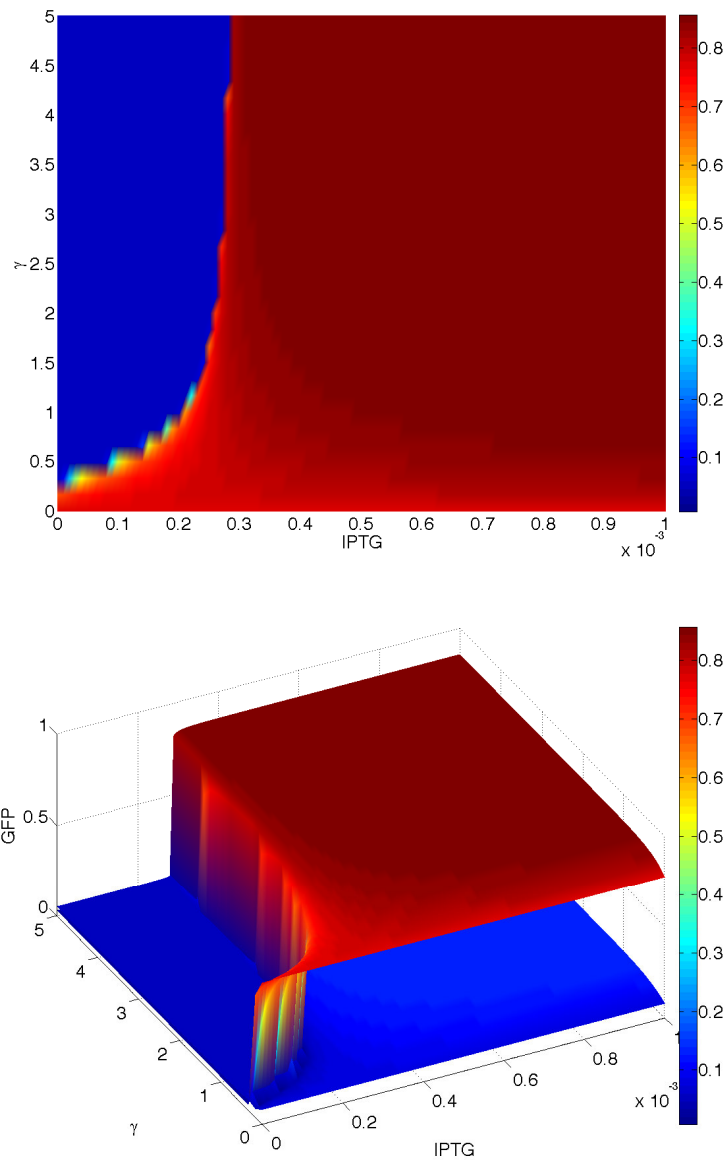
Slika 17. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in β po 16h (preklop 1 \rightarrow 0). Ugodni parametri so pri nizki koncentraciji GFP.*

4.4. GFP v odvisnosti od IPTG in γ

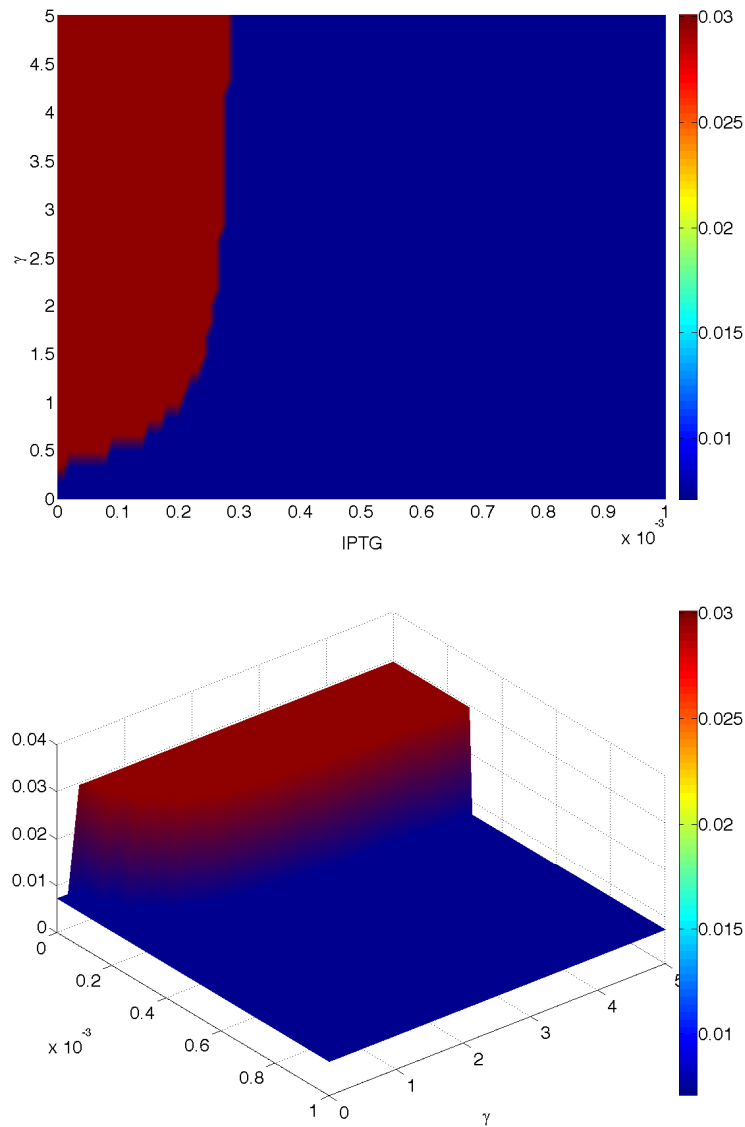
Parametre za ta primer določimo na podlagi grafov na slikah 18 in 19.

Po 8h (preklop 0 \rightarrow 1) stanje 1 dosežemo pri koncentraciji $\text{IPTG} > 0,3 \cdot 10^{-3}$, **neodvisno od vrednosti γ** . Le pri vrednosti $\gamma \ll 1$ dosežemo preklop tudi pri nižji koncentraciji IPTG-ja.

Po 16h (preklop 1 \rightarrow 0) pri koncentraciji $\text{IPTG} > 0,3 \cdot 10^{-3}$ za vse možne vrednosti γ sistem pravilno preklopi v nizko stanje. Pri tistih vrednostih parametrov, pri katerih se ni zgodil preklop v visoko stanje, je tudi po 16h stanje sistema brez sprememb.



Slika 18. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in γ po 8h (preklop $0 \rightarrow 1$). Ugodni parametri so pri so pri visoki koncentraciji GFP.*



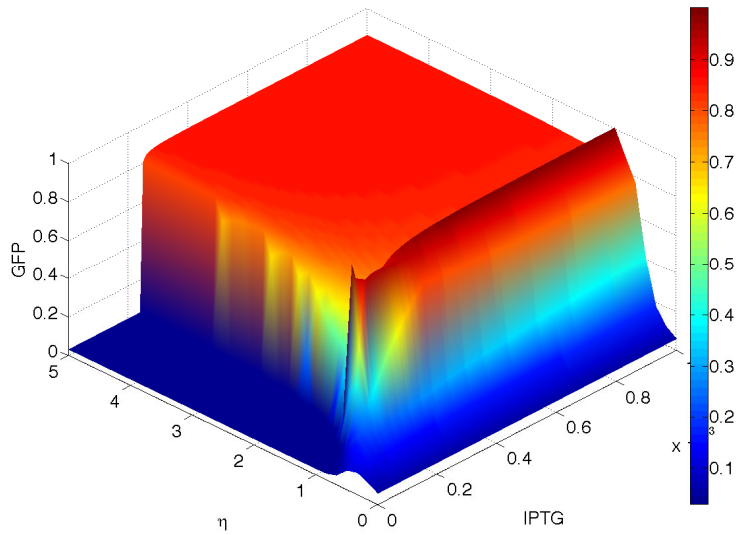
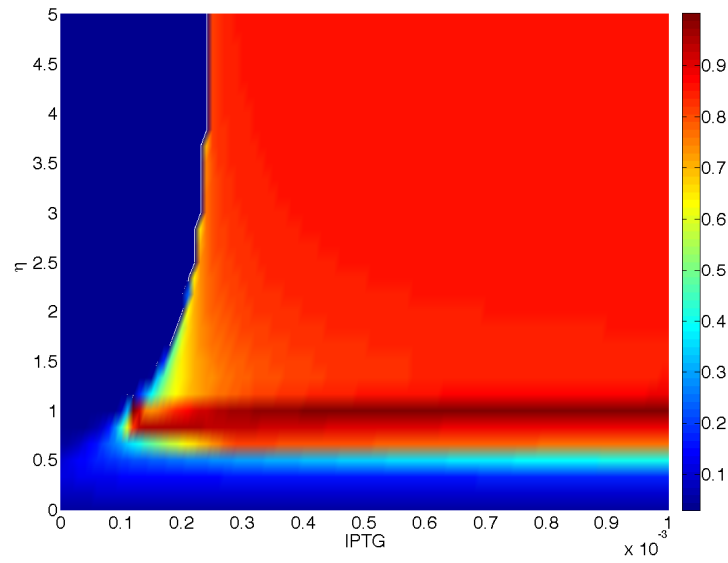
Slika 19. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in γ po 16h (preklop 1→0). Ugodni parametri so pri so pri nizki koncentraciji GFP.*

4.5. GFP v odvisnosti od IPTG in η

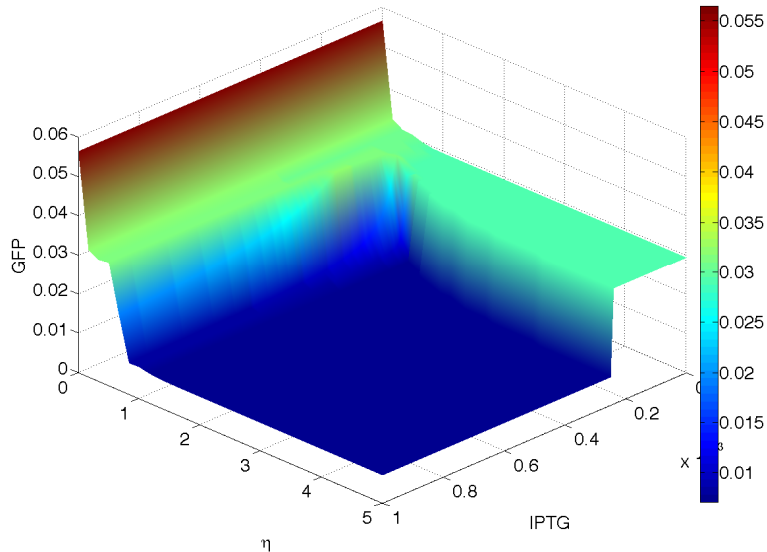
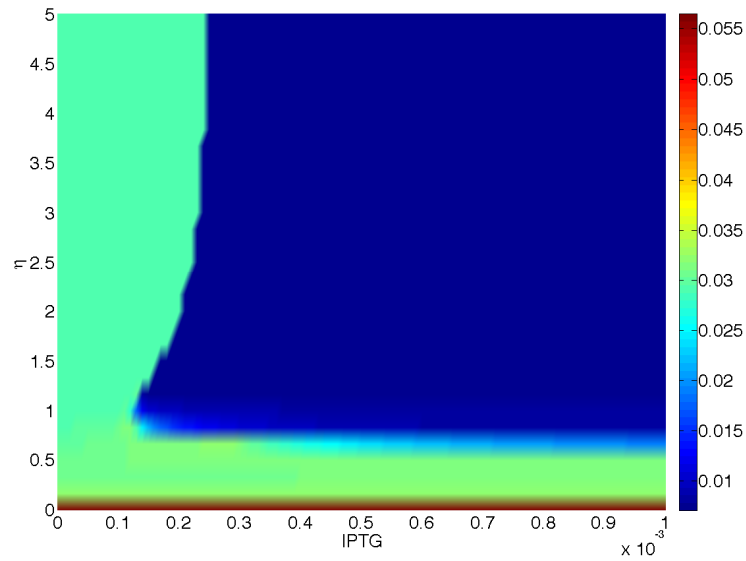
Parametre za ta primer določimo na podlagi grafov na slikah 20 in 21.

Po 8h (preklop 0→1) dosežemo visoko stanje pri koncentracijah $\text{IPTG} > 0,3 \cdot 10^{-3}$ za vse $\eta > 0,7$. Če je vrednost $\eta < 0,7$, se stanje sistema ne spremeni. Preklop je najbolj izrazit pri $\eta = 1$, pri koncentracijah IPTG med $0,1 \cdot 10^{-3}$ in $0,3 \cdot 10^{-3}$ pa se zgodi preklop le v primeru, ko je $0,8 \leq \eta \leq 1$.

Po 16h (preklop 1→0) za vse vrednosti IPTG in η , pri katerih preide sistem v visoko stanje, pride do pravega preklopa nazaj na logično ničlo.



Slika 20. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in η po 8h (preklop $0 \rightarrow 1$). Ugodni parametri so pri so pri visoki koncentraciji GFP.*



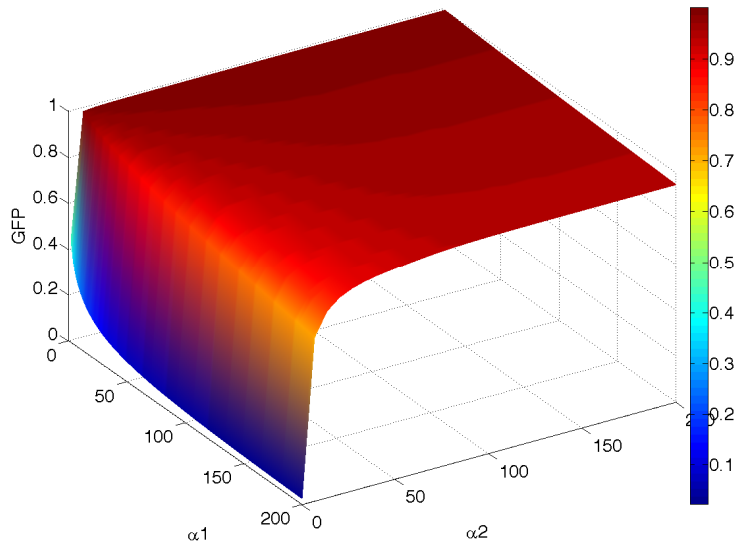
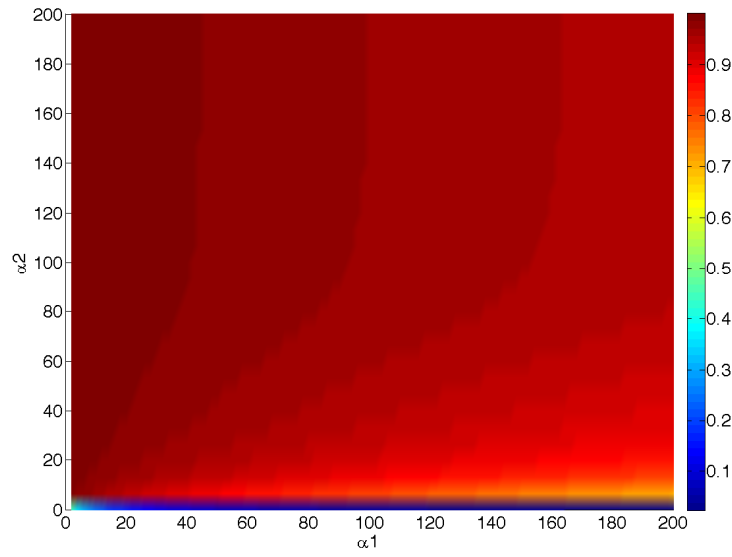
Slika 21. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov IPTG in η po 16h (preklop 1 \rightarrow 0). Ugodni parametri so pri so pri nizki koncentraciji GFP.*

4.6. GFP v odvisnosti od α_1 in α_2

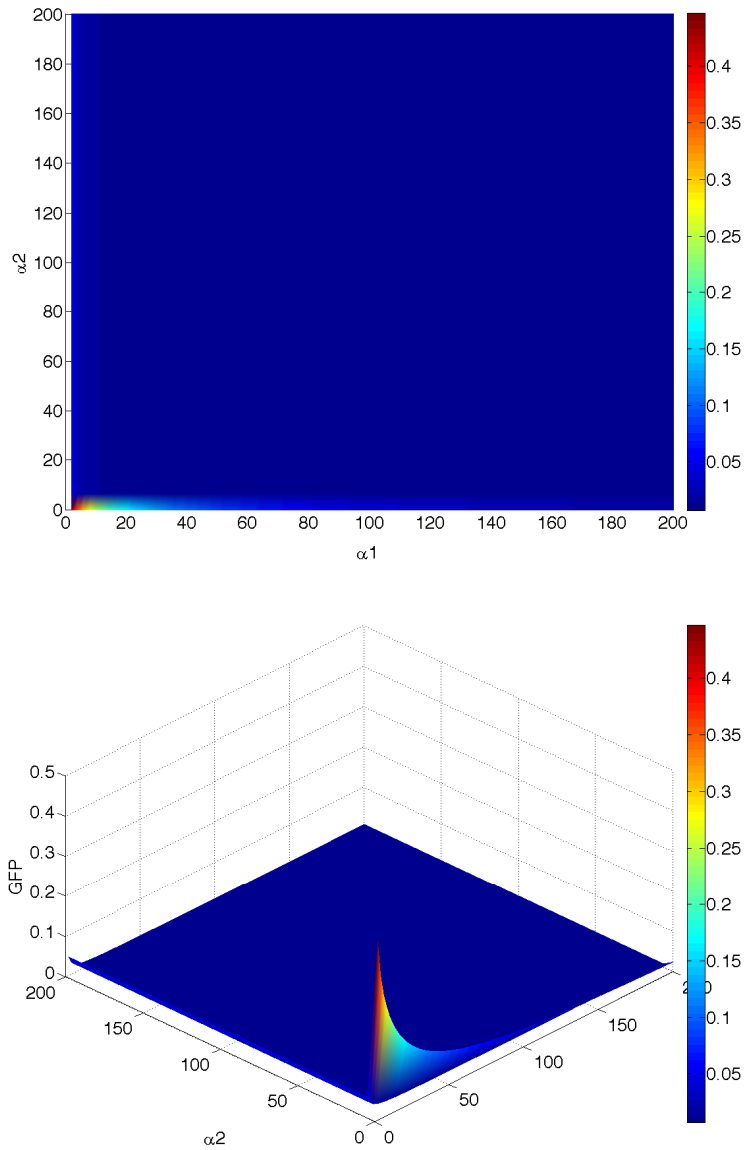
Parametre za ta primer določimo na podlagi grafov na slikah 22 in 23.

Po 8h (preklop 0 \rightarrow 1) velja, da se stanje spreminja tem hitreje, kolikor večje je razmerje α_2/α_1 . Celica preide v stanje logične 1 za vse α_1 in tiste α_2 , kjer je $\alpha_2 > 5$.

Po 16h (preklop 1 \rightarrow 0) sistem preide v nizko stanje, neodvisno od vrednosti parametrov α_1 in α_2 .



Slika 22. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov α_1 in α_2 po po 8h (preklop $0 \rightarrow 1$). Ugodni parametri so pri so pri visoki koncentraciji GFP.*



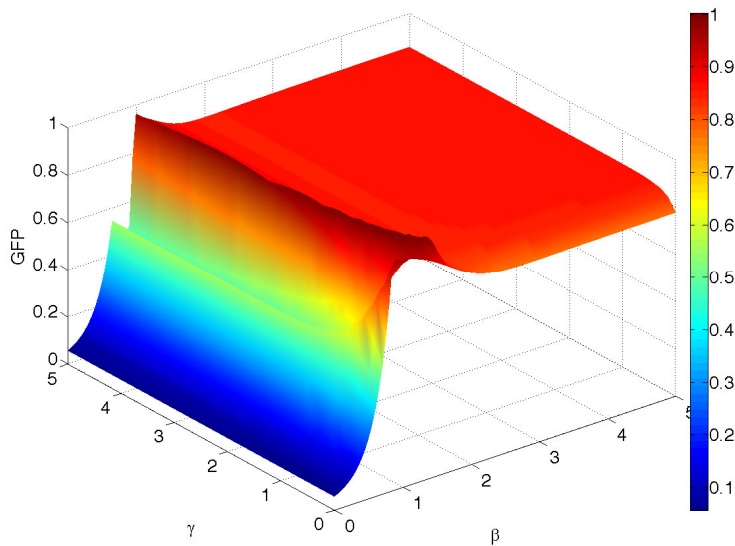
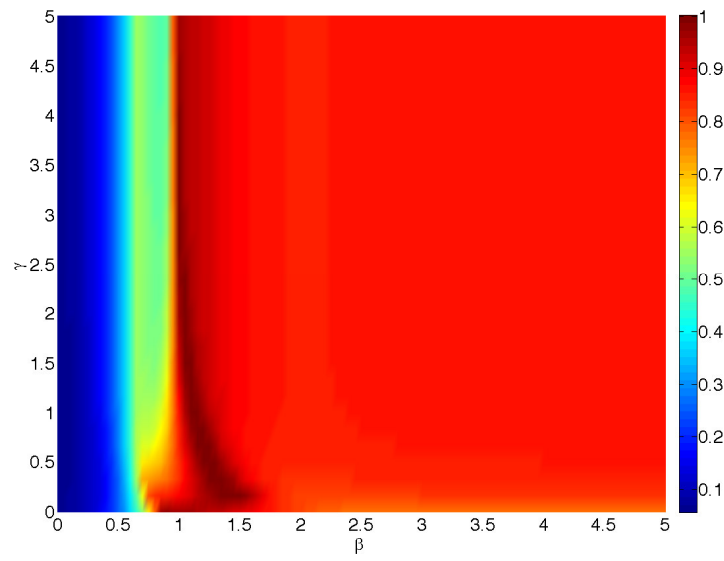
Slika 23. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov α_1 in α_2 po 16h (preklop 1 \rightarrow 0). Ugodni parametri so pri so pri nizki koncentraciji GFP.*

4.7. GFP v odvisnosti od γ in β

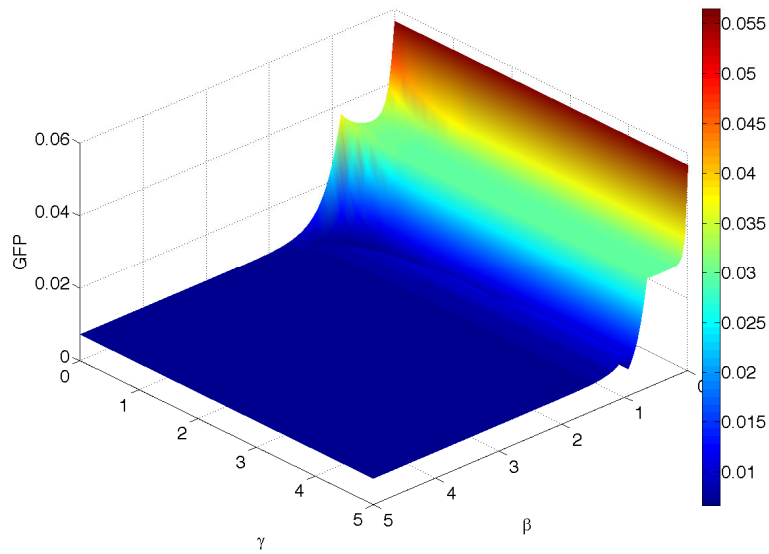
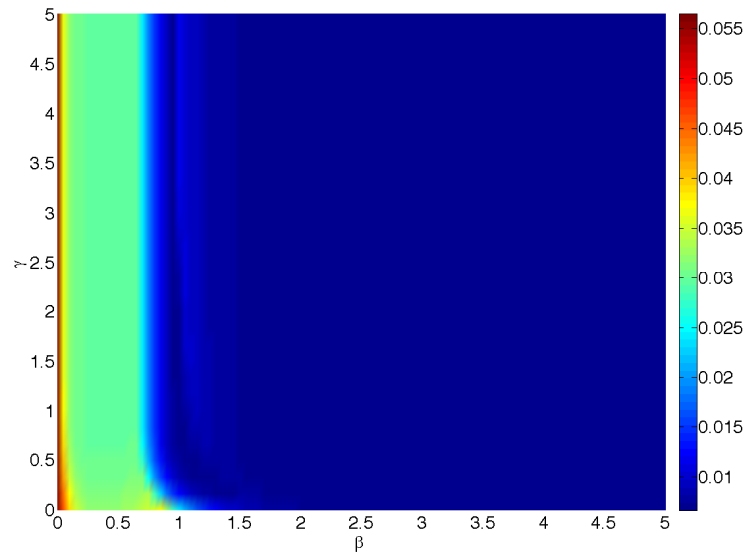
Parametre za ta primer določimo na podlagi grafov na slikah 24 in 25.

Po 8h (preklop 0 \rightarrow 1) je delovanje celice neodvisno od γ ; sistem preide v visoko stanje, če je $\beta \geq 1$.

Po 16h (preklop 1 \rightarrow 0) sistem preide v nizko stanje pri $\beta \geq 1$, pri nižjih vrednostih pa se stanje tako ali tako ni spremenilo.



Slika 24. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov γ in β po po $8h$ (preklop $0 \rightarrow 1$). Ugodni parametri so pri so pri visoki koncentraciji GFP.*



Slika 25. *Koncentracija GFP v odvisnosti od parametrov γ in β po 16h (preklop $1 \rightarrow 0$). Ugodni parametri so pri so pri nizki koncentraciji GFP.*

5. Zaključek

Deterministični model opisanega preklopnega stikala se dobro ujema z eksperimentalnimi rezultati².

Slabost stikala je predvsem dolg preklopni čas med enim in drugim stabilnim stanjem, ki traja po več ur. Če za indikator stanja sistema vzamemo koncentracijo GFP, se prekop iz stanja 0 v 1 v našem modelu zgodi v približno 7 urah; prekop iz visokega v nizko stanje pa traja približno nekaj manj kot 3 ure. V realnih eksperimentalnih okoliščinah prekop 0→1 sicer traja do približno 6 ur, prekop 1→0 pa do 35 minut². Razlika nastane zaradi eksperimentalnih specifik in kot posledica zasnove našega modela – teoretični deterministični model, ki ga opisujemo, je namreč aproksimacija delovanja eksperimentalnega sistema. Kljub temu pa je pri obeh sistemih jasno očitno, da je prekop 1→0 hitrejši kakor prekop 0→1. Vzrok za hitrejši prekop iz visokega v nizko stanje je hitra toplotna destabilizacija λ represorja (R1), do katere pride ob uporabi toplotnega pulza.

Genetsko stikalo bi bilo mogoče uporabiti kot senzor določenih proteinov ali drugih kemijskih molekul (pri npr. biokemičnem orožju), ali pa bi lahko služilo kot osnova za konstrukcijo naprednejših genetskih sistemov. Tak je npr. dvo-stanjski genetski oscilator, ki alternirajoče producira enega izmed dveh možnih proteinov. Do oscilacij pri tem prihaja neprestano in brez zunanje stimulansa. Periodo in amplitudo takšnih oscilacij je možno regulirati.

Druga področja uporabe genetskega stikala so npr. genetska terapija preko regulacije genov in druge oblike manipuliranja funkcij oz. delovanja celic.

6. Literatura

1. Gardner, T. S., Cantor, C. R. & Collins, J. J., Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* (2000).
2. Gardner, T. S., Design And Construction Of Synthetic Gene Regulatory Networks (2000).
3. Moškon, M., Ciglič, M., Jerala, R., Zimic, N. & Mraz, M., Model realizacije funkcionalosti RS-pomnilne celice v biološkem sistemu. *Elektrotehniški vestnik*.
4. Alon, U., *An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits* (Chapman and Hall/CRC, 2006).
5. Moškon, M. & Mraz, M., Analysing the information processing capabilities of biological systems.
6. Loinger, A., Deterministic and Stochastic Analysis of Simple Genetic Networks in Single Cells (2006).
7. Hasty, J., McMillen, D. & Collins, J. J., Engineered gene circuits. *Nature* (2002).
8. Tigges, M., Marquez-Lago, T., Stelling, J. & Fussenegger, M., A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature* (2009).
9. Brown iGEM Team 2007 - Tri-Stable Switch, http://openwetware.org/wiki/IGEM:Brown/2007/Tri-Stable_Switch (2007).
10. U.S. Department of Energy Office of Science - genomics.energy.gov, <http://genomics.energy.gov/>.

Dodatek A – MATLAB koda

V nadaljevanju je podana osnovna MATLAB koda za simulacije iz poglavja 4. Podaja simulacijo stikala v skladu z opisom v poglavju 4.1.

```
function [U V GFP] = bioswitch(alpha1, alpha2, beta, gamma, K, Kgfp, eta, cIPTG)

Temp = 0;           % toplotni signal
IPTG = 0;          % IPTG signal

Hours = 24;        % čas dolžine simulacije
SamplesPerHour = 60;
SAMPLES = Hours*SamplesPerHour;
dt = 1/SamplesPerHour;

% tabele vrednosti ob nekem času (za kasnejši izris grafov)
U = zeros(1,SAMPLES);
V = zeros(1,SAMPLES);
I = zeros(1,SAMPLES);
H = zeros(1,SAMPLES);
GFP = zeros(1,SAMPLES);

u=0;
v=0;
gfp=0;
counter=1;

for s=0:dt:(Hours-1) % s podaja čas simulacije
    if s == 0
        IPTG = cIPTG; % cIPTG je tipično 2e-3
    end
    if s == 6
        IPTG = 0;
    end
    if s == 11
        Temp = 1; % dvignemo temperaturo (toplotni pulz)
    end
    if s == 18
        Temp = 0;
    end
    end

    % izračun spremembe koncentracij represorjev (diferencialne enačbe)
    dv = dt*(alpha2 / ( 1 + ( u / (1+IPTG/K))^eta )^gamma) - v);
    du = dt*(alpha1 / ( 1 + ( v / (1+Temp/K))^eta )^beta) - u);
    dgfp = dt*(alpha1 / (1+(u/Kgfp)) - gfp);

    u = u+du;
    v = v+dv;
    gfp = gfp+dgfp;

    % shranimo vse vrednosti za vsak korak
    I(counter) = IPTG;
    H(counter) = Temp;
    U(counter) = u;
    V(counter) = v;
    GFP(counter) = gfp;
    counter = counter+1;
end
```