

Predstavitev iGEM projektov

Seminarska naloga pri predmetu Optične in nanotehnologije

Tine Mele (63050173), Gašper Bistovič (63050014), Borut Jevševar (63050050), Andrej Veber (63030075)

Kazalo

1	Uvod	3
2	Kratka predstavitev projektov iz leta 2009	4
3	Lethbridge	9
3.1	Splošno	9
3.2	Projekt	10
3.3	Fluorescenca	10
3.4	Izražanje genov	11
3.5	FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	11
3.6	RiPS meritve	13
3.7	Lumazine Synthase (LS) - strukturno modeliranje	13
3.8	Rezultati	17
3.9	BioBrick	19
3.10	Zaključek	19
4	Davidson College – E.nigma, Viz-A-Brick	20
4.1	Uvod	20
4.2	E.nigma	20
4.2.1	Kriptografska zgoščevalna funkcija	20
4.2.2	XOR biološka vrata	22
4.2.3	Medcelični komunikacijski sistemi	25
4.2.4	Signalne molekule	26
4.2.5	Širjenje signala preko celic	27
4.2.6	Novi deli	27
4.2.7	Modeli	28
4.3	Viz-A-Brick	32
5	Valencia – Lightning Cell Display	33
5.1	Uvod	33
5.2	Določitev primerne celice	33
5.2.1	Rezultati testiranja	33
5.2.2	Kontrola snovi	34
5.2.3	Vpliv napetosti	35
5.2.4	Vpliv časa dovajanja elektrike	35
5.2.5	Vpliv ponavljanja	36
5.2.6	Čas osveževanja	36
5.3	Aktivacija LEC	36
5.4	iLEC polje	37
5.4.1	Izdelovanje podpore za vseh 96 pikslov	37
5.4.2	Kontroliranje sistema	38
5.5	BioBrick: BBa_K222000	39
5.5.1	Osnovne značilnosti	39
5.5.2	Kemijska stimulacija	40
5.5.3	Električna stimulacija	41

1. Uvod

Naša skupina je imela nalogo raziskati projekte predstavljene na tekmovanju iGEM leta 2009. Odločili smo se, da raziščemo na splošno vse projekte, ki so si prislužili zlato medaljo, tri pa bomo predstavili bolj podrobno.

iGEM

“The International Genetically Engineered Machine competition” (iGEM) je tekmovanje študentov v sintetični biologiji. Ekipe dobijo nekaj bioloških enot na začetku poletja iz registra standardnih delov. Na svojih fakultetah jih uporabljajo in naredijo nekaj novih. Z njimi sestavijo biološki sistem, ki ga preizkušajo v živih organizmih.

iGEM se je začel v 2003 z enomesečnimi predavanji na MIT. Vsako leto je bilo več ekip na tem tekmovanju, leta 2006 je bilo tekmovanje mednarodno z 32 ekipami, 2008 je bilo 84 ekip. Leta 2009 110 ekip s 1200 udeleženci.

2. Kratka predstavitev projektov iz leta 2009

Aberdeen Scotland

Odločili so se raziskati načine za reševanje preluknjanih cevi s pomočjo sintetične biologije. Bakterija mora zaznati luknjo in plavati proti njej, ko je blizu razpoke začne sproščati lepilo, ki luknjo zamaši.

Alberta

Razvili so metodo, s katero je možno razviti genom tako, da ga brez problema spremenimo. Primer na E.coli bakteriji: bakterijo so spremenili tako, da je imela samo 10% svoje velikosti (velikost celotnega sistema se zmanjša).

BCCS Bristol

Cilj je narediti sistem za usmerjeno dostavo določenih proteinov v celice. S tem naj bi bilo enostavno dostavljati toksične snovi v celice. S tem naj bi bilo mogoče uničevati celice raka.

Naredili so nov standard za povezovanje proteinov RFC44, ki podpira RFC10 in zato lahko uporablja večino že napisanih biobrikov.

Posodabljali so BSim, ogrodje za simulacijo interaktivnih populacij bakterij, ki so ga delali že v 2008.

Berkely Software

Izgradnja programov, ki pomagajo pri uporabi sintetične biologije. Dobili so nagrado za najboljši program. Naredili so tri programe.

Eugene - poseben domenski jezik za opisovanje bioloških konstruktov

Spectacles - vizualni okvir za urejanje, načrtovanje sestavljenih bioloških naprav

Kepler - orodje ki pomaga pri razvijanju in analizi modelov

Berkely Wetlab

Cilje je narediti sistem, ki vključuje vidnost celic. Tak sistem bi lahko uporabili vsi, ki hočejo rezultate v vizualni obliki.

Bologna

Naredili so napravo, ki nadzira sintezo izbranega proteina. Ta naprava deluje hitreje kot nadzirani promotorji.

British Columbia

Cilj je narediti biološki semafor. Biosenzor ki zaznava različne koncentracije, izhod pa se spreminja iz zelene preko rumene na rdečo, glede na različne koncentracije.

Calgary

Želijo razširiti pogled biologije na različna področja. Ta projekt vsebuje več komponent. "wetlab" omogoča usklajevanje obnašanja bakterij v bakterijskih kolonijah, ki so sposobne delovati kot posamezni subjekti. Raziskujejo kaj širša publika ve oz. ne ve o biološki sintezi, kaj menijo o tem področju, se jim zdi to etično.

Cambridge

Izdelava delov, ki bodo pomagali pri izdelavi bio senzorjev. Poleg zaznavanja stanja je potrebno izpisati informacijo v obliki, ki jo lahko vidimo/beremo. Najbolj pogosta metoda je izpis s fluorescentni proteini, ki so vidni z mikroskopom. Lepo bi bilo, če bi lahko videli rezultat z našimi očmi. Naredili so množico generatorjev barve.

Chiba

Izvedba časovne funkcije, da se geni aktivirajo po določenem času. Pošiljalne celice naredijo signalne molekule, katerih koncentracija raste. Ko doseže nek nivo sprejemne celice vklopijo izraz genov. Kot rezultat so naredili animirano sliko ure.

DTU Denmark

Naredili so sistem, ki zaznava razmerje NAD^+/NADH molekul. Senzor deluje kot induktivni transkripcijski faktor, ki deluje samo pri določenih razmerjih NAD^+/NADH molekul.

Edinburgh

Izdelava biosenzorja, ki zazna prisotnost TNT in nitritov/nitratov. Z njim je mogoče identificirati mine (od TNT do RDX) in preizkušati onesnaževanje gnojil z nitriti.

EPF Lausanne

Pokazali bi radi sposobnost proteinov občutljivih na svetlobo, da bi upravljali genetski izraz s kontroliranjem svetlobe. Uporabljali so hibridni protein LovTAP. Pri živih organizmih naj bi imeli možnost izklaplјati in vklaplјati gene z enostavnim dodajanjem ali odvzemom svetlobe.

Freiburg bioware

Razvili so osnovo za omejevalne encime, primarno za kloniranje, deluje pa tudi na živih organizmih.

Groningen

Ukvarjajo se z izdelavo bakterij, ki čistijo onesnaženo vodo. Bakterije iz vode izločajo ione kovin, ki se zberejo v njih, potem pa naredijo plin, ki jih spravi na površje.

Harvard

Enocelični organizmi med seboj ne komunicirajo optično. Ta ekipa je izdelala sistem da lahko optično "E. coli" bakterije v kvasovkah povzročijo prepis "lacZ" gena.

Heidelberg

Prva ekipa na iGEM, ki razvija BioBrick knjižnico za uporabo v celicah sesalcev. Osredotočili so se na sintetične sesalčeve promoterje.

HKU-HKBU

Izdelovali so bakterijski motor. Imeli so tri naprave: mikrometrski motor, nadzor smeri in nadzor hitrosti. Uporaben je za dostavo zdravil izbranim celicam, za odstranjevanje neželenih snovi iz žil.

Illinois-Tools

Spletna aplikacija za dodajanje funkcij presnove obstoječim mikro organizmom. Orodje uporablja bazo Kegg (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes) za kreiranje presnovnih poti, ki so optimizirane za proizvodnjo željenih vhodnih in izhodnih delov.

Imperial College London

Naredili so bakterije, lahko delajo zdravilne tablete, ki brez težav pridejo tudi v prebavila. To je sistem za proizvodnjo vseh biološko sestavljivih mešanic, brez dragega skladiščenja in čiščenja.

IPN UNAM Mexico

Na koloniji bakterij delajo vzorce kot jih imajo višje vrste živali. Sintetično lahko naredimo vzorec na mreži bakterij, ki se same organizirajo, brez da bi vzorec zakodirali v genom.

Johns Hopkins BAG

Ekipa se ukvarja z izdelavo novih tehnologij in standardov za sintetično izdelovanje genomov, ki omogoča izdelovanje daljših in kompleksnejših DNK brez nekaterih omejitev, ki jih imajo BioBriki.

KULeuven

Bakterija je narejena tako, da ob prisotnosti modre svetlobe izdeluje vanilin. Ima tudi kontrolni sistem, ki ohranja konstantno količino. Zaznava okolje in prilagaja proizvodnjo potrebam.

Minnesota

Pregledujejo splošna AND vrata in preučujejo posamezne elemente teh vrat. Ugotoviti želijo točno delujejo in narediti boljša AND vrata in bolj predvidljiv odziv na vhode.

MoWestern Davidson

Cilj te ekipe je uporabljati "E. coli" bakterije za izračunavanje NP polnih računskih problemov. Osredotočili so se na SAT, ki je prvi dokazan NP poln problem.

Paris

Narediti so želeli komunikacijo bakterij na dolgo razdaljo. Komunikacijsko okolje sestoji na kontrolirani proizvodnji zunaj membranskih mehurčkov.

Slovenia

Sestavljajo in testirajo modularne genetske elemente poimenovane "nanoBricks", da bi naredili samo-sestavljive materiale, ki bi sestavljali strukture, ki še ne obstajajo v naravi.

Za razliko od običajnih nano materialov lahko z DNK programiramo sestavljanje polipeptidnih nano materialov. S tem se lahko nadzira njihovo sestavljanje na nano nivoju in določa lastnosti teh materialov.

Uporabili so "nanoBricks" za pripravo ultrafiltracijske membrane in material, ki je lahko sestavljen ali razstavljen z dodajanjem majhnih molekul. Visoka stopnja kontrole na nano razdaljah, enostavnost in trajnost proizvodnje je zelo uporabna za proizvodnjo kompliciranih elementov, bio mineralizacijo in dostavo zdravil.

Stanford

Osredotočili so se na to, da bi ustvariti napravo, ki bi detektirala in se odzvala na nepravilnosti v dveh specifičnih podpopulacijah T celic (Th17 celice in Treg celice). Nepravilnosti pri teh dveh podpopulacijah lahko povzročijo nastanek avtoimunskih bolezni. Njihov cilj je ustvariti napravo, ki temelji na E.coli bakteriji, ki polarizira diferenciacijo limfocitov bodisi v Th17 ali Treg celicah.

Tokyo Tech

Njihov cilj je transformirati površino Marsa z bakterijami. S tem bi modificirali nezemeljsko okolje (atmosfera, temperatura, pritisk, topografija površine) v podobnega zemeljskemu.

Tsinghua

Pomembna procedura v genski terapiji je sestava vektorjev, ki prizadenejo samo določene celice in v njih izločijo zdravilo. Učinkoviti vektorji imajo tu pomembno vlogo. Do sedaj so raziskovalci uporabljali adenoviruse, ki so se izkazali kot učinkoviti vendar je njihova produkcija že pri majhnih količinah zelo draga. Njihov cilj je da v bakterijah ustvarijo prenašalca, ki bo zelo učinkovit.

TU Delft

Cilj njihovega projekta je ustvariti komunikacijo med celicami, ki bi širile večopravilna sporočila z možnostjo da se jih lahko resetira. Ta sistem bi bil lahko podlaga, na kateri bi lahko naredili biosenzor na dolge razdalje in ga uporabili pri zmanjševanju odpornosti bakterij na antibiotik.

Podobno zadevo je razvila skupina leta 2008, ki je podrobno predstavljena v našem seminarju.

UNICAMP-Brazil

Obstaja veliko industrijskih procesov, ki uporabljajo mikroorganizme, za proizvodnjo spojin kot so inzulin in etanol. Uspeh teh postopkov je odvisen od okužb z drugimi mikroorganizmi v času gojenja. Zato je namen njihovega projekta razvoj bakterij *E. Coli* in *S. cerevisiae*, ki so sposobne prepoznati in uničiti nezaželene organizme.

UNIPV-Pavia

Ukvarjali so se z razgradnjo laktoze, saj menijo, da bi lahko v procesu razgradnje pridobivali etanol. Razgradnjo so pohitrili, in maksimirali izkoristek.

USTC

Ekipa skuša upravljati z močjo evolucije. Končni cilj je zgraditi stroj *E. ADEM* (*E. coli* Automatic Directed Evolution Machine) s pomočjo katerega bi lahko zgradili celoten ekosistem iz bio-molekul. Ta stroj bi nam veliko pomagal v sintetični biologiji, ker se večina komponent lahko ustvari sama (encimi, RBS, receptorji, regulatorji, senzorji, logična vrata, ...). Celotna naprava sloni na evlucijskem algoritmu.

USTC Software

Cilj programa je pomagati pri razvoju plazmidov, da bi delovali tako kot je potrebno. Npr. če imamo nihanje na vhodu programa, na izhodu dobimo DNA, ki deluje kot oscilator v določenem organizmu.

Virginia

Skupina se je ukvarjala z onesnaženostjo vode z arzenom. Dosedanje metode čiščenja vode so drage in počasne, zato so se odločili, da bi vodo očistili s sintetično biologijo. Razvili so kolonijo celic, ki absorbirajo strupeni arzen. Poleg tega pa še kolonijo celic, ki privlači prvo kolonijo in tako odstrani celice, na katere se je vezal arzen.

Virginia Commonwealth

Razvili so nov UP-element (nov razred Biobrickov). Ta element je v bistvu transkripcijski ojačevalec, ki pospeši delovanje sistema.

Washington

Hiter in poceni razvoj proteinov je pogoj za hitro razvijanje sintetične biologije. Zaradi tega je ta skupina razvila shemo IPP (ideal protein purification), ki pospeši proizvodnjo proteinov.

Wash U

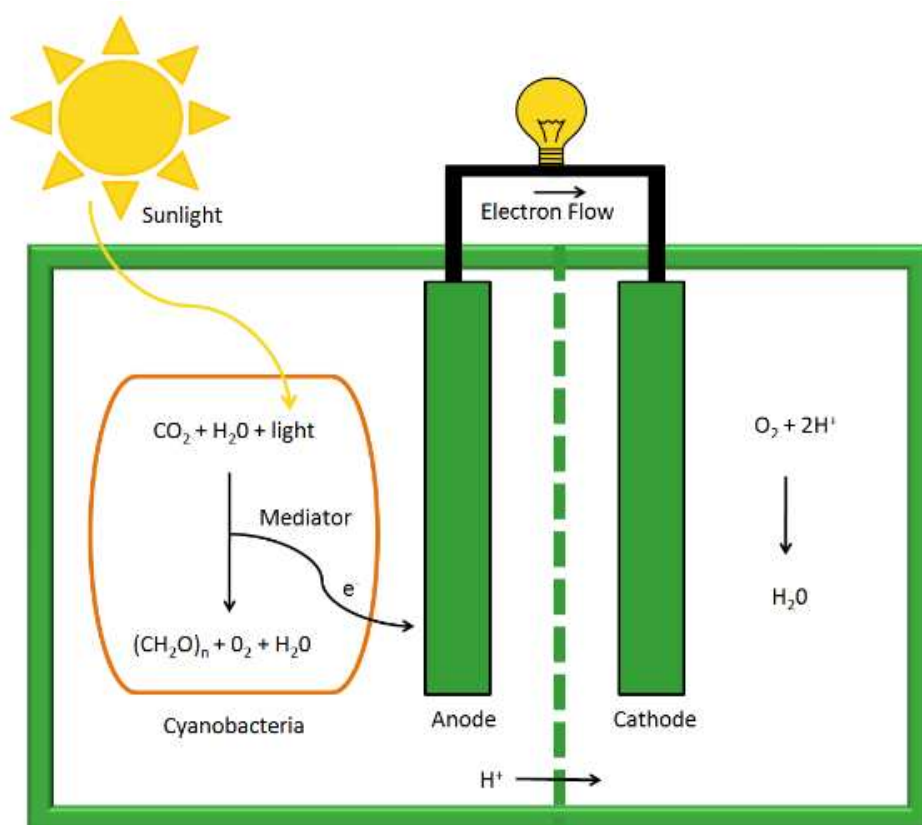
Naredili so sistem, ki maksimizira izkoristek sončne svetlobe pri fotosintezi. V naravi se pri fotosintezi uporabi le slaba polovica sončne svetlobe. Pri izboljšanem sistemu se uporabi kar 95% svetlobe.

3. Lethbridge

3.1. Splošno

Proizvajanje energije je v današnjih časih vse bolj zaskrbljujoče, saj je cena energije vse dražja, potrebno pa je tudi skrbeti za okolje. Mikrobne gorivne celice (Microbial fuel cells (MFCs)) uporabljajo biološke sisteme za proizvodnjo električnega toka. Ugotovili so da cianobakterije, ki so bile preučevane v MFCs, proizvajajo tok, čeprav to ne počnejo zelo učinkovito.

Cilj tega projekta je povečati učinkovitost cianobakterij z uvedbo microcompartimentov, s katerimi bi naredili bio baterijo. Microcompartimenti so ustvarjeni pri proizvodnji proteina lumazina, ko se le-ta spaja v obliko icosahedralnih ovojníc. Kot dokaz tega načela bodo ustvarili ta sistem v *Escherichia coli*. Ciljali bodo na dva različna fluorescentna proteina znotraj microcompartimenta, za opazovanje fluorescence resonance pri prenosu energije (FRET). Poleg tega bodo raziskovali še novo metodo za množično proizvodnjo enotnih nanodelcev, ki je bolj uspešna in stroškovno učinkovita od sedanjih metod.

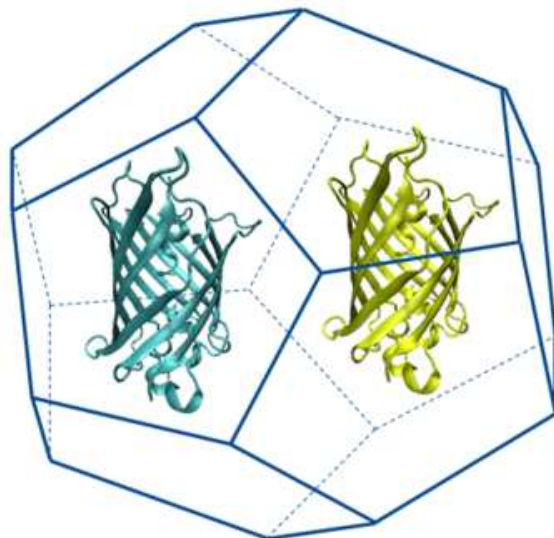


Slika 1. Slika prikazuje kako cianobakterija spreminja sončno svetlobo, vodo in ogljikov dioksid v ogljikov hidrat, ki je vir goriva in povzroča rast bakterij. Nastane negativen ogljikov vir goriva.

3.2. Projekt

Temeljni napredek v biotehnologiji bi predstavljala umetno narejena organela, ki bi lahko vsebovala presnovne beljakovine. V ta namen si ekipa Lethbridge prizadeva s sintezo lumazina ustvariti microcompartmente, ki predstavlja 60 podenot icosahedralnih ovojníc.

S tem, ko bi ustvarili negativno notranjost microcompartmenta upajo, da bi jih lahko usmerili do fluorescentnih beljakovin, označenih s pozitivno nabitimi termini v notranjost microcompartment-a. Z FRET med modro in rumeno fluorescentno beljakovino, bodo dokazali kolokalizacijo teh dveh beljakovin v microcompartment-u.



Slika 2. Slika prikazuje rumeno in ciano-fluorescentno beljakovino znotraj microcompartment-a

Da bi bila ta tehnologija v prihodnosti uspešna, bodo ciljali na beljakovine ki nastajajo pri fotosintezi, zato da bi naredili optimalno biološko fotosintezno gorivno celico. Ločevanje beljakovin in metabolitov povečuje učinkovitost celičnih procesov. Z ločevanjem Mms6 beljakovin znotraj *Escherichia coli* si prizadevajo ustvariti enotne nanodelce.

3.3. Fluorescenca

Fluorescenco bodo uporabljali za določitev lokacije ene fluorescentne beljakovine v microcompartment-ih. Da bi to naredili, bodo uporabili “overexpress” metodo nad Lumazine microcompartments z IPTG. Ker niso prepričani, če se microcompartments tvorijo okoli njihovih beljakovin, ali če so beljakovine v microcompartment-ih bodo opravili preizkus na dva različna načina:

1. Inducirana bo sinteza lumazina, tako da se bodo microcompartmenti lahko ustvarjali. Izražanje fluorescentnih proteinov (YFP ali CYP) pa bo zatrto z uporabo arabinoza. Arabinozni pulz se bo čez nekaj časa porabil in izražanje fluorescentnih proteinov se bo nadaljevalo.

2. Inducirana bo sinteza lumazina, tako da se bodo microcompartimenti lahko ustvarjali. Arabinoza ne bojo dodali, tako da se bojo fluorescentni proteini lahko izražali. Celice bodo nato opazovali v fluorimetru.

3.4. Izražanje genov

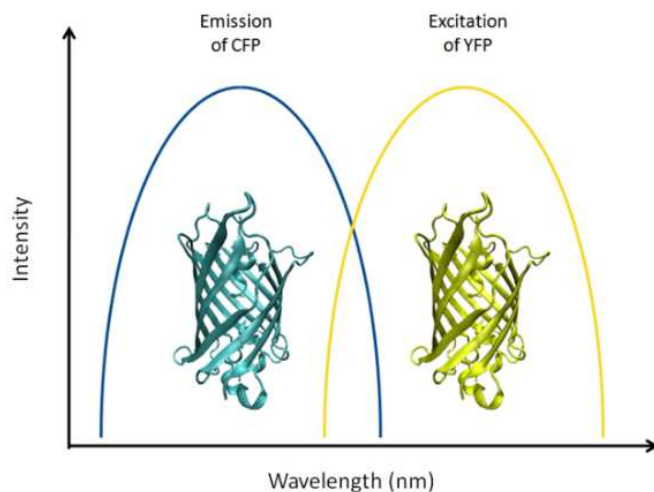
Izražanje določenega gena je mogoče zaznati z merjenjem količine beljakovin v različnih časovnih točkah. Gen mora biti kontroliran v nekem regulativnem načinu, da je lahko izračunljiv. Gen je treba preoblikovati tako, da lahko izraža svoje lastnosti. Tu dodamo regulativne kemikalije s katerimi induciramo ali zatiramo izražanje beljakovin. Vzorce sestavine vzamemo ob različnih časih. Celice se nato odpre in vsebina se pogleda s pomočjo nekaterih vizualnih tehnik, tipično SDS-PAGE. Ta način bodo uporabili na naslednjih vzorcih:

- pLacI:sRBS:mms6:dT (induciran z IPTG)
- pLacI:sRBS:Lumazine Synthase:dT (induciran z IPTG)
- pStrong:Riboswitch:cheZ:dT (induciran z Theophylline)
- pStrong:Riboswitch:GFP:dT (induciran z Theophylline)
- pBAD:RBS:TetR:dT:pTetR:mRBS:N-EYFP:dT (zatrt z Arabinose)
- pBAD:RBS:TetR:dT:pTetR:mRBS:C-EYFP:dT (zatrt z Arabinose)
- pBAD:RBS:TetR:dT:pTetR:mRBS:N-ECFP:dT (zatrt z Arabinose)
- pBAD:RBS:TetR:dT:pTetR:mRBS:C-ECFP:dT (zatrt z Arabinose)

Zatrtne konstrukte je veliko težje zaznati. Kot mero bodo uporabili fluorescentnost, saj je vsaka zatrtja beljakovina fluorescentna. Merjenje bodo naredili na enak način, z vzorci ob različnih časovnih točkah. Ker niso prepričani ali bo dejanska fluorescentnost celice vplivala na meritve bodo merili fluorescentnost celic ki so bile odprte in ki so bile zaprte (oboje so bile vzete iz iste sestavine na isti časovni točki). Z merjenjem sprememb bodo lahko določili učinek zatiranja genov.

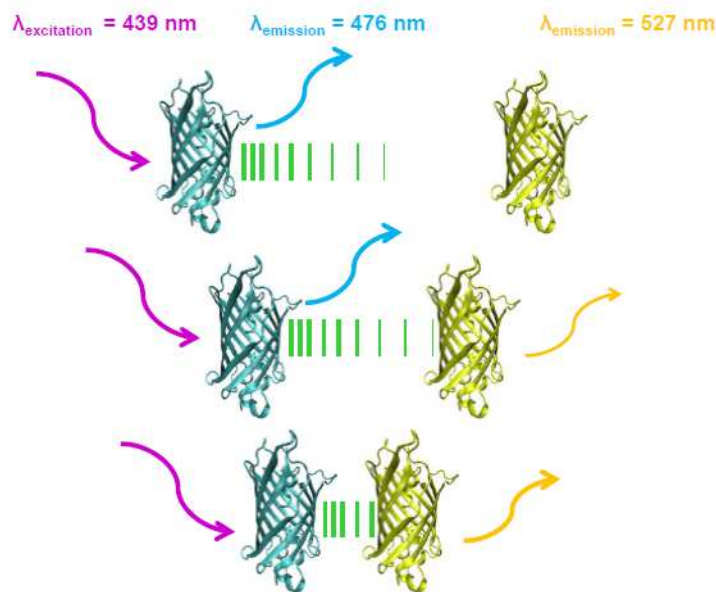
3.5. FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

FRET se bo uporabljal pri določanju kolokalizacije dveh fluorescentnih beljakovin znotraj microcompartment-a. Rumena fluorescentna beljakovina (YFP) in ciano fluorescentna beljakovina (CFP) sta FRET para in sta zato popolna za to metodo. Metoda deluje tako, da je donorska molekula, v tem primeru CFP, vzbujena z začetno valovno dolžino. Vzbujen CFP odda fluorescentno energijo s podobno valovno dolžino, ki smo jo uporabili pri vzbujanju akceptorske molekule, v našem primeru YFP. Fluorescentna energija se je tako prenesla na drugo molekulo z resonančno valovno dolžino. Akceptorska molekula tudi odda svojo fluorescentno energijo z valovno dolžino, ki je različna od valovnih dolžin s katerimi smo vzbujali molekule in s katerimi so te nato oddajale energijo. Prenos energije je odvisen od oddaljenosti. Če sta molekuli blizu (1-10nm) potem je energija prenesena učinkovito. Ta učinkovitost nato pada z večanjem razdalje med molekulama. Če sta več kot 10nm narazen se energija ne bo prenesla.



Slika 3. Slika prikazuje prerez med emisijo donorske CYP in vzbujanjem akceptorske YFP

CFP je vzbujen z valovno dolžino 436nm in oddaja fluorescentno energijo pri 480nm . YFP pa je vzbujen z 514nm in oddaja pri 538nm . Če sta beljakovini znotraj microcompartment-a pričakujemo da se bo energija prenesla učinkovito, drugače pa se sploh ne bo. Da bi pokazali fluorescenco prenosa energije bo notranja fluorescentnost celice uporabljena za ozadje, fluorescentnost samega CFP v celici pa bo primerjana z samim CFP znotraj microcompartment-a



Slika 4. Slika prikazuje kako oddaljenost med beljakovinami vpliva na učinkovitost prenosa energije

3.6. RiPS meritve

Fluorescenco se lahko uporabi tudi za oceno učinkovitosti »theophylline riboswitch-a« in rpsA TIR, z ustvarjanjem vrednosti RiPS (Ribosome initiation per second).

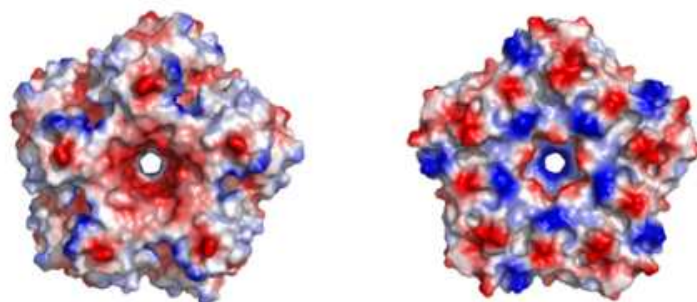
- pStrong:Riboswitch:GFP:dT
- pStrong:rpsA TIR:GFP:dT

Tako riboswitch kot TIR delujeta kot alternativna vezavna mesta (RBS). Z uporabo GFP, kot izražanje, je mogoče izračunati RiPS teh dveh delov. Deli se nato vstavijo v RiPS plasmido ustvarjeno z RiPS (proizvedel jo je GFP). Fluorescentnost GFP se lahko izmeri z fluorimetrom. Meri se v času, času vzpona in koliko časa se fluorescentnost izraža. Te vrednosti se nato uvozijo v modelirni program, kjer se izračunajo RiPS vrednosti za vsakega od delov.

Če želimo izmeriti RiPS za »theophylline riboswitch« je treba meriti fluorescentnost GFP v različnih koncentracijah theophyllin-a ($0,1\mu M$, $0,25\mu M$, $0,5\mu M$, $0,75\mu M$, $1,0\mu M$, $1,25\mu M$, $1,5\mu M$ in $2,0\mu M$). Če želimo izmeriti RiPS za rpsA TIR je treba meriti fluorescentnost GFP v različnih stresnih pogojih (minimalni medij, vročina, mraz, različni toksini itd.).

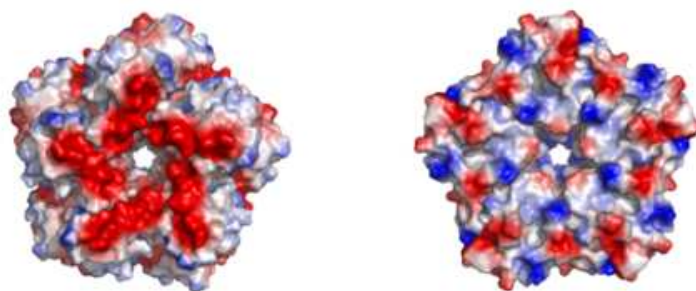
3.7. Lumazine Synthase (LS) - strukturno modeliranje

Aquifex aeolicus LS ustvari ali 60 podenotno icosahedralno capsido ali 180 podenotno capsido. Potencilani zemljevid elektrostatično površine divje LS je prikazan na spodnji sliki.



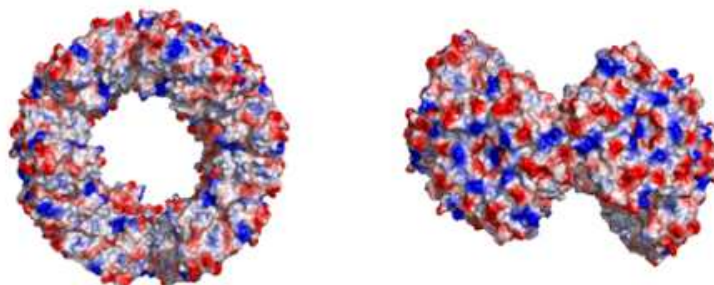
Slika 5. Leva slika kaže notranjost 5 mera, desna pa zunanost. Modra barva predstavlja pozitivno površino, rdeča pa negativno.

Z uvedbo glutamatnih ostankov na mestih 83, 86, 120 in 123 postane notranjost 5mera veliko bolj negativna. Uradni naboj divjega 5mera so izračunali na -15 ali -3 na monomer. Če pa upoštevamo zgornje mutacije se naboj poveča na -40 ali -13.3 na monomer. Uradni naboj divjega 60mera je -180, naboj mutiranega 60mera pa je tako postal -480.



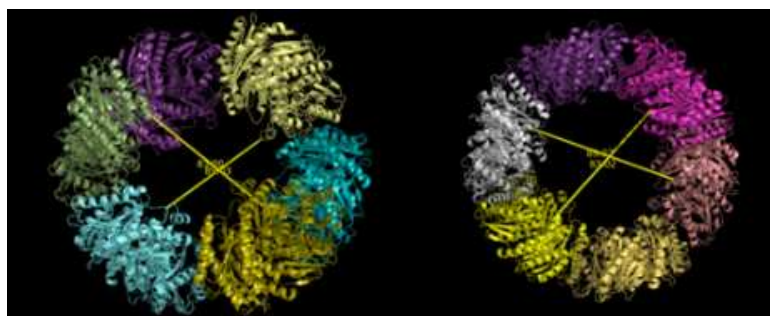
Slika 6. Leva slika kaže notranjost 5 mera, desna pa zunanost. Modra barva predstavlja pozitivno površino, rdeča pa negativno. Opazimo lahko občutno porast negativnega naboja na notranji plasti lumazine synthase 5mer-a.

Na spodnji sliki lahko vidimo obroč s šestimi podenotami v dveh različnih orientacijah, ki predstavljajo simetrijo celotne strukture.

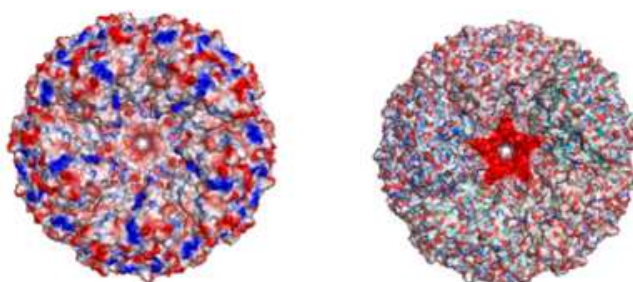


Slika 7. Levo je pogled od zgoraj na divji 5mer, desno pa pogled če ga obrnemo za 90 stopinj čez x-os.

Na podlagi te simetrije so izračunali razdalje med podenotami. Razdalje med katerima koli dvema točkama čez obroč je razdalja varirala med 83.00 in 89.03Å. Ker je capsida strukturno podobna krogli so lahko izračunali notranji volumen z $V = 4/3\pi r^3$. Rezultat dobijo med 299 in 369nm³. Mutacija, ki so jo uporabili ni imela nobenega vpliva na podenotne razdalje. (83,02 - 89,02Å)

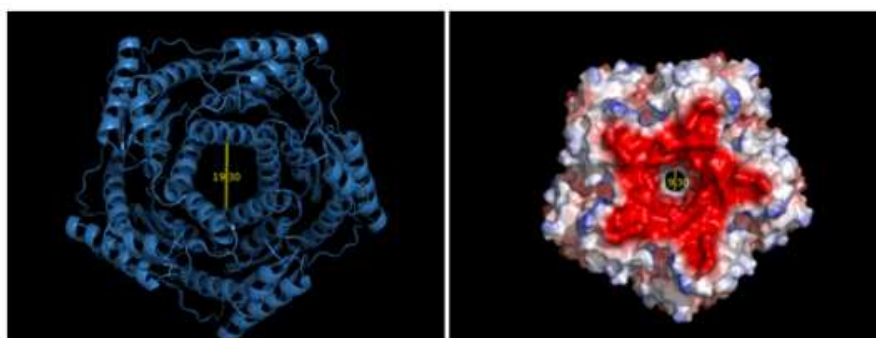


Slika 8. Slika prikazuje razdalje med podenotami čez obroč. Desno imamo mutiranega, levo pa ne. Različni 5meri so različno obarvani.



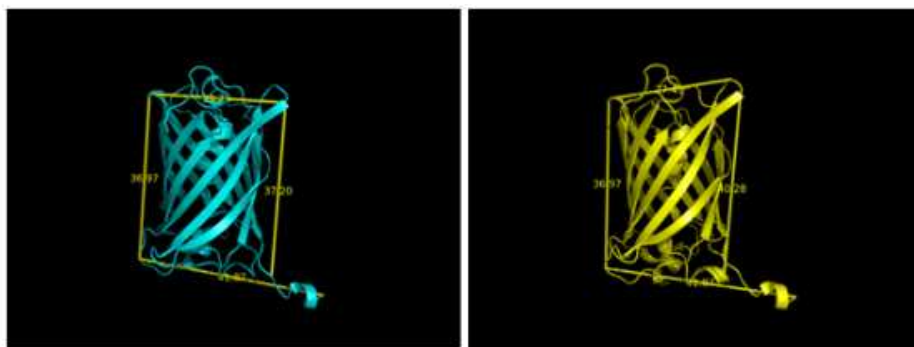
Slika 9. Slika prikazuje splošno strukturo 60merne capside. Desno je mutirana levo pa ne. 5mer v sredini je bil odstranjen, zato da lahko vidimo notranjost capside.

Problem pa predstavlja velikost ene pore, ki dovoljuje vstop CFP in YFP. Pora mutiranega lumazina je v najmanjši točki velika 19.3 angstromov (1 angstrom = 1.0×10^{-10} metra).



Slika 10. Slika prikazuje velikost pore 5mera. Desno je predstavljen kot elektrostatičen zemljevid notranjosti.

Posledično so bile določene dimenzije 236 amino kislin CFP in YFP.

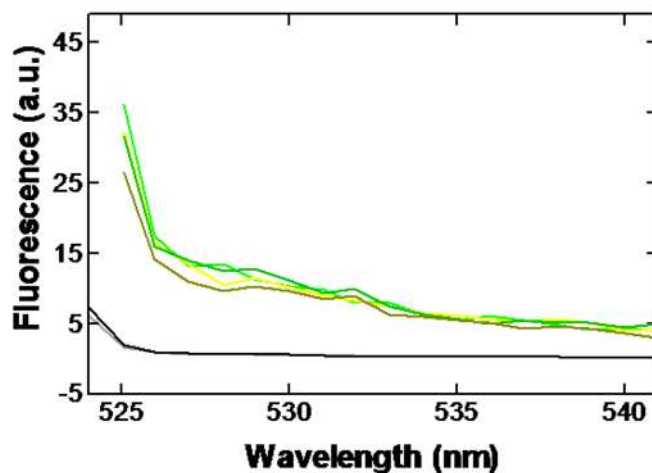


Slika 11. Približne dimenzije CFP in YFP. Levo je CFP in desno YFP. Dimenzije lahko razberemo iz slik.

Ker so beljakovine dejansko podobne valjem so lahko izračunali volumen ($V = \pi r^2 h$) pri dimenzijah ($h = 40.28\text{\AA}$; $r = 20.94\text{\AA}$) in dobili rezultat 55.49nm^3 . to pomeni da lahko v eno capsido z 60 podenotami spravijo 5 ali 6 fluorescentnih beljakovin. Vendar pa nobena beljakovine ne more iti skozi pore dokončno zgrajene capside, saj so prevelike. Tu imamo samo eno realno možnost in sicer, da gredo beljakovine v notranjost microcomaprtmenta preden je ta dokončan. To nam implicira na uporabo drugih metaboličnih beljakovin, saj ko bi bile enkrat v microcompartment-u bi bile zaščitene pred celično peptidazo, njihovi metaboličnimi produkti pa bi verjetno lahko prehajali skozi pore capside.

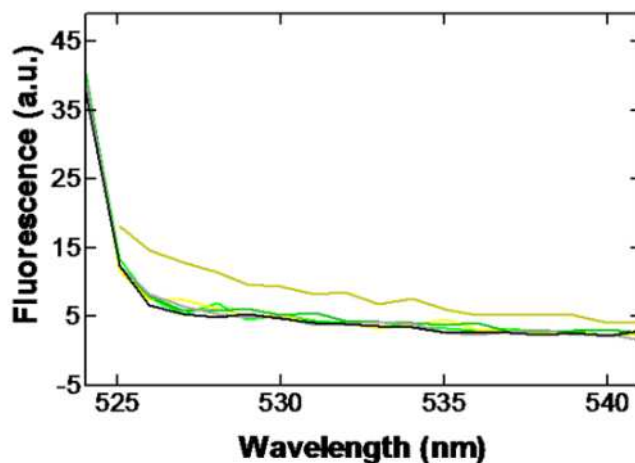
3.8. Rezultati

Testirana sta bila dva konstrukta (EYFP z bodisi N- ali C-terminalni 10Arg (10R)), bodisi v prisotnosti ali odsotnosti »arabinose«.



Prvi graf prikazuje fluorescentnost YFP konstruktov pod naravnimi pogoji. Kontrolerja »buffer TAKM« (črno) in *DH5α* (siva) ne kažeta nobene fluorescentnosti. Po eni uri rasti pa fluorescentnost kažejo sledeči:

- C-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (temno rumen)«
- C-terminalni R10 YFP v prisotnosti »arabinose (temno zelen)«
- N-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (svetlo rumen)«
- N-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (temno zelen)«



Drugi graf prikazuje fluorescentnost YFP konstruktov pod ne-naravnimi pogoji. Kontrolerja »8M urea« (črno) in *DH5α* (siva) ne kažeta nobene fluorescentnosti.

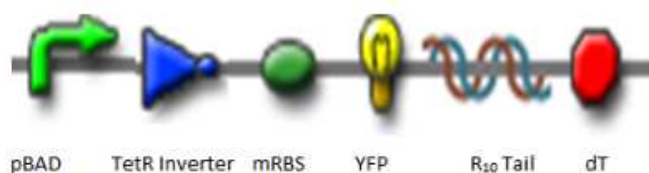
Pozitivne rezultate je pokazal samo C-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (temno rumen)«. Vsi ostali:

- C-terminalni R10 YFP v prisotnosti »arabinose (temno zelen)«
- N-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (svetlo rumen)«
- N-terminalni R10 YFP v odsotnosti »arabinose (temno zelen)«

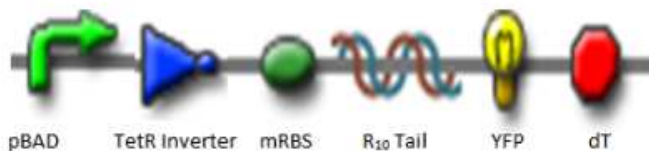
Pa niso pokazali skoraj nič fluorescentnosti pod ne-naravnimi pogoji. »8M urea buffer« je pokazal nekaj fluorescentnosti, če so ga vzbujali pri valovni dolžini 514nm.

Tu sta nastala tudi 2 nova BioBricka:

1. **C-terminal rumen fluorescentni protein (YFP) z tetracycline inverterjem**
Z arabinosem zatrta tetracycline inverzija YFP združen s C-terminalno arganine oznako za ciljanje v lumazine microcompartment. Ima srednji RBS in dvojni terminator.



2. **N-terminal rumen fluorescentni protein (YFP) z tetracycline inverterjem**
Z arabinosem zatrta tetracycline inverzija YFP združen z N-terminalno arganine oznako za ciljanje v lumazine microcompartment. Ima srednji RBS in dvojni terminator.



3.9. BioBrick

Naredili so veliko novih BioBrickov. Tu bi pogledali samo njihove 3 najljubše:

- **Lumazine Synthase (BBa_K249002):**

To je encim, ki ustvarja lumazin, produkt ki tvori votlo sfero, ki lahko deluje kot microcompartment ali umetna organela. Lumazin tvori negativno nabite pore, ki potem privlačijo beljakovine. Vse beljakovine, ki so bile ujete v microcompartment morajo biti označene z argininom. To je del kodiranja beljakovin.



Lumazine Synthase

- **N-terminal Arginine Fusion vector (BBa_K249004):**

Ta plazmida izkorišča BioFusion standard za montažo BioBricka na konec in navaden BioBrick standard za montažo na začetek. N-terminu beljakovine doda 10 arginin ostankov. Ta BioBrick je namenjen za delo v povezavi s Lumazine synthase microcompartment-om. Protein se bo ujel v jedro microcompartment-a.



N-terminus R10 Tail

- **C-terminal Arginine Fusion vector (BBa_K249005):**

Ta plazmida izkorišča BioFusion standard za montažo BioBricka na začetek in navaden BioBrick standard za montažo na konec. C-terminu beljakovine doda 10 arginin ostankov. Ta BioBrick je namenjen za delo v povezavi s Lumazine synthase microcompartment-om. Protein se bo ujel v jedro microcompartment-a.



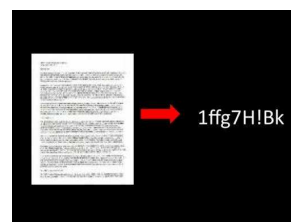
C-terminus R10 Tail

3.10. Zaključek

Ta projekt je dobil zlato medaljo na iGEM 2009. Naredili so kar 31 novih biobrick-ov, uspelo pa jim je tudi doseči njihov zastavljen cilj, to je ustvariti microcompartment-e in nanje ciljati z beljakovinami, te pa so po vstopu še vedno ostale funkcionalne.

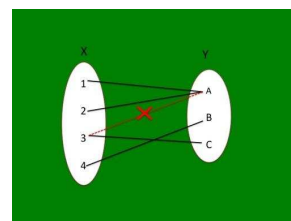
Karakteristike kriptografske zgoščevalne funkcije

- reducira tekst na heksa vrednost
- ni reverzibilna
- vsak vhod ima natanko en izhod
- dolžina teksta poljubna, heksa vrednost fiksne dolžine
- detekcija kolizije



Idealne lastnosti zgoščevalne funkcije

- minimalna kolizija
- nepredvidljive kolizije (Če so kolizije predvidljive, postanejo vzorci očitni in iz njih je razvidno kako funkcija deluje.)
- računanje v realnem času (hitrost)



Uporaba

- dokazovanje pristnosti dokumenta
- zaščita dokumentov
- zmanjšanje goljufanja na standardnih testih
- zaščita gesel
- detekcija ponarejenih slik oz slik s skritimi informacijami

Binarno kodiranje

Vhodno sporočilo mora biti binarno kodirano preden se lahko začne računanje. Za vsako črko dobimo iz ASCII tabele desetiško število za vsako črko, ki jo konvertiramo v dvojiško število.

Convert Message to Binary

• **Choose alphabet set**

– Ex: 8 character Alphabet, A-H

• **Convert letters to numbers**

$$A = 0_{10} = (0 \times 2^0) = 0_2$$

$$B = 1_{10} = (1 \times 2^0) = 1_2$$

$$C = 2_{10} = (1 \times 2^1) + (0 \times 2^0) = 10_2$$

$$D = 3_{10} = (1 \times 2^1) + (1 \times 2^0) = 11_2$$

$$E = 4_{10} = (1 \times 2^2) + (0 \times 2^1) + (0 \times 2^0) = 100_2$$

$$H = 7_{10} = (1 \times 2^2) + (1 \times 2^1) + (1 \times 2^0) = 111_2$$

XOR logika

Gradnja kriptografske zgoščevalne funkcije z E.coli temelji na xor logiki. $X + Y$, $X \oplus Y$, $X \neq Y$

X	Y	O	X	Y	O
0	0	0	0	0	1
0	1	1	0	1	0
1	0	1	1	0	0
1	1	0	1	1	1

Slika 12. XOR, XNOR

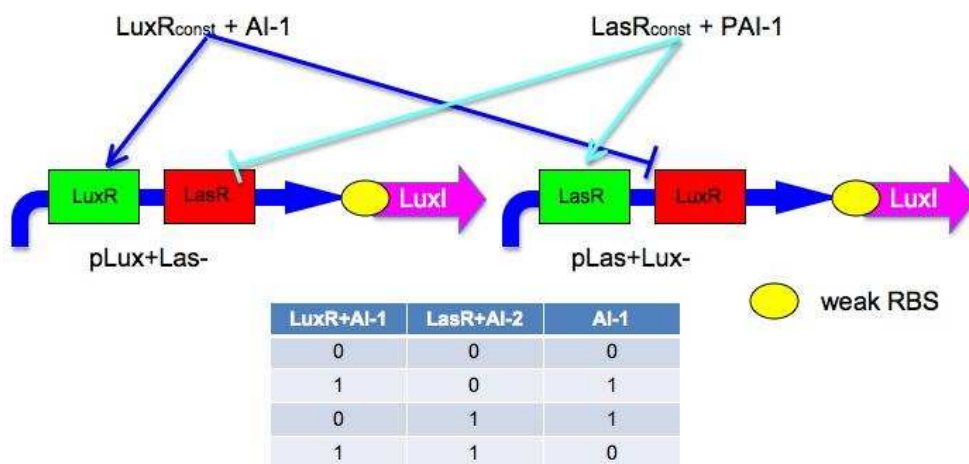
4.2.2. XOR biološka vrata

Razvili so 5 različic vrat, ki temeljijo na treh različnih vrstah medcelične komunikacije. Ko se na vratih pojavi pravilen vhod, se kot izhod tvori močen signal.

1. LuxR XOR Biological Design

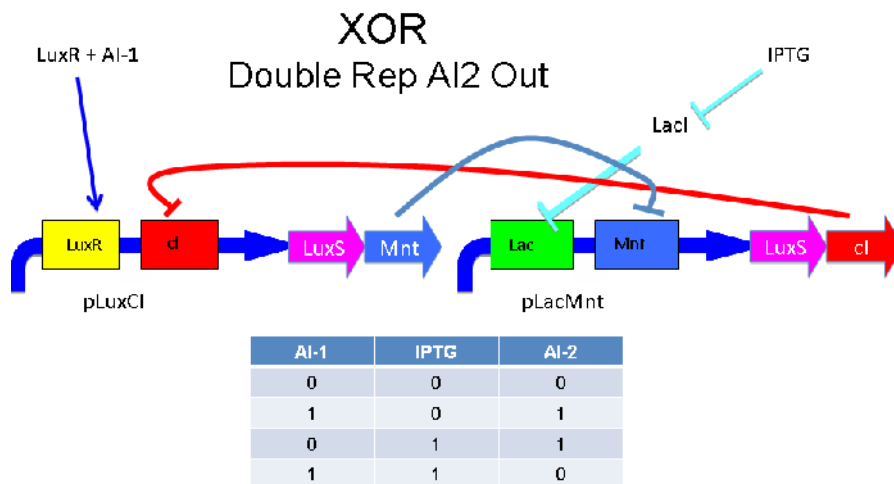
Ideja je v dveh zrcalnih delih. LasR je uravnavan z PAI-1 3-oxidodecanoyl-HSL(3OC12HSL), LuxR pa je aktiviran z AI-1 3-oxohexanoyl-homoserine lactone (3OC6HSL). Potencialni problem je, da dobimo od Lux polovice večkrat pozitivni rezultat kot od Las polovice. To so rešili z delom RBS in tako zmanjšali izločanje proteina. Represorjeva stran je locirana med -35 in -10 od promotorja. Aktivatorjeva pa -35 navzgor. To je podatek iz vira by Eglan and Greenberg.

XOR Gate

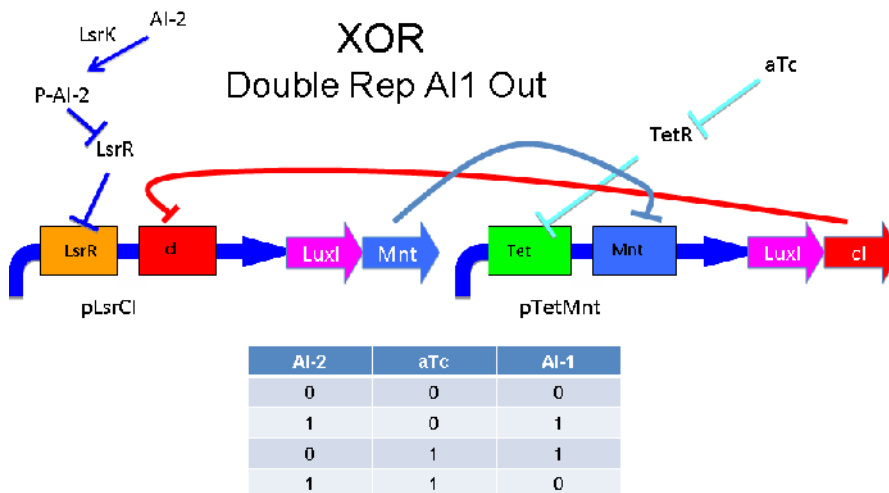


2. Lsr/Lux XOR Biological Design

Oba vezja dopolnjujeta drug drugega. Vsak del dobi medcelični signal (AI-1 ali AI-2) in kemični signal (IPTG ali AHL), ki ga procesira v medcelični signal. Kolonije, ki proizvajajo AI-1 se izmenjujejo s kolonijami, ki proizvajajo AI-2. Vhodno besedilo je tako lahko kodirano glede na prisotnost/odsotnost kemičnega signala, ki se ravno tako izmenjuje.



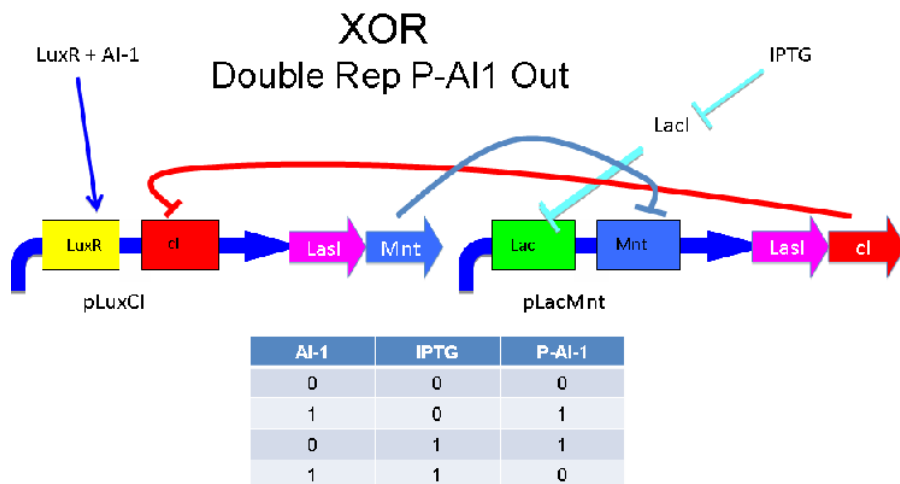
Vhod z AI-1 ali IPTG povzroči izločanje AI-2 v LuxS. Vhod z obema AI-1 in IPTG pa omogoči izločanje represorja cI in Mnt, ki zaustavi oba vezja (transkripcijo). Izločata se LuxR in LacI.



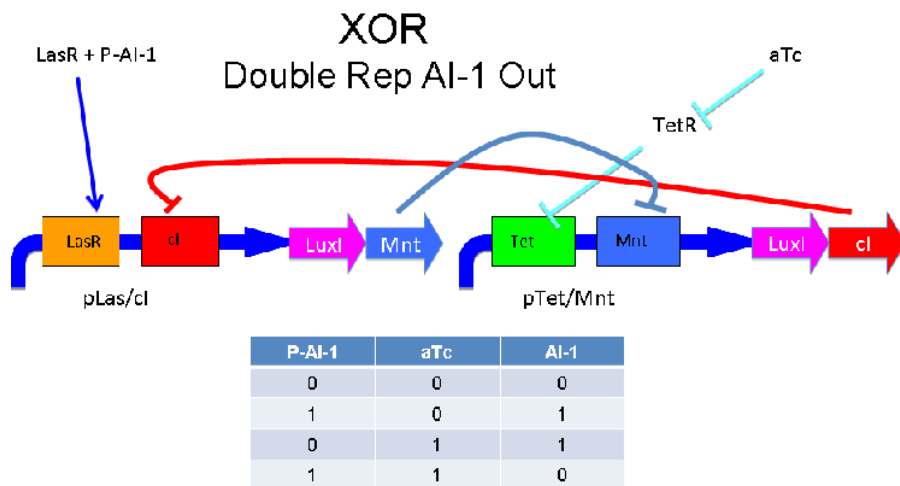
Vhod z AI-2 ali aTc povzroči izločanje AI-1 v LuxI. Vhod z obema AI-2 in aTc pa omogoči izločanje represorja cI in Mnt, ki zaustavi oba vezja (transkripcijo). Izločajo se LsrK, LsrR in TetR.

3. Las/Lux XOR Biological Design

Oba vezja dobita medcelični signal (AI-1 ali P-AI-1) in kemični signal (IPTG ali AHL), kar povzroči tvorjenje vnaprejšnjega medceličnega signala. Kolonije, ki proizvajajo AI-1 se izmenjujejo s kolonijami, ki proizvajajo P-AI-1. Vhodno besedilo je tako lahko kodirano glede na prisotnost/odsotnost kemičnega signala, ki se ravno tako izmenjuje.



Vhod z AI-1 ali IPTG povzroči izločanje AI-2 v LuxS. Vhod z obema AI-1 in IPTG pa omogoči izločanje represorja cI in Mnt, ki zaustavi oba vezja (transkripcijo). Izločata se LuxR in LacI.



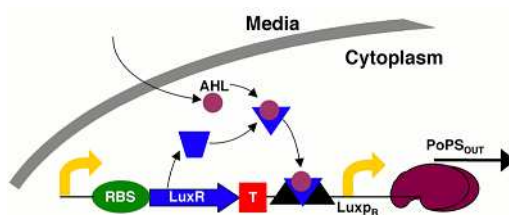
Vhod z AI-2 ali aTc povzroči izločanje AI-1 v LuxI. Vhod z obema AI-2 in aTc pa omogoči izločanje represorja cI in Mnt, ki zaustavi oba vezja (transkripcijo). Izločajo se LsrK, LsrR in TetR.

4.2.3. Medcelični komunikacijski sistemi

E.nigma projekt se zanaša na zmožnost celice, da lahko komunicira z drugo celico (kemični signal). V tem projektu je uporabljen "quorum sensing systems". To je medcelični komunikacijski sistem, ki je bil najden v naravnem svetu, in sicer v bakterijah *Vibrio fischeri*, *E. coli*, in *Pseudomonas aeruginosa*.

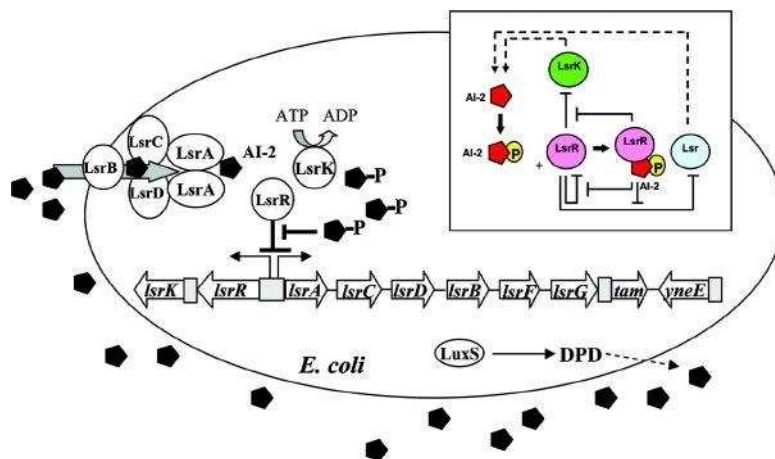
1. Lux signalni sistem

- Signalne molekule:** N-acyl-homoserine lactone (AHL)
- Vrste bakterij:** odkrite v *Vibrio fischeri*, delujejo v *E. coli*
- Prejemni protein:** LuxR protein prejme signal iz AHL
- Sinteza signalnih molekul:** LuxI



2. Lsr signalni sistem

- Signalne molekule:** AI-2 (furanosyl borate diester v V. skupini), vse so izvirajo iz DPD
- Vrste bakterij:** lsrA,B,C,D,F,G,R,K: Escherichia coli HS, SMS-3-5, str. K12 substr. MG1655, in substr. DH10B; lsrE:Escherichia coli str. K12 substr. MG1655 ; LuxS:Escherichia coli HS, SMS-3-5, APEC O1, str. K12 substr. MG1655, substr. DH10B, in UTI89.
- Prejemni protein:** LsrR protein prejme signal iz sensor proteina
- Sinteza signalnih molekul:** Pfs encim, potem LuxS autoinducirna sinteza
- Geni:** lsr operon, vključno ABC transporter in LsrK družina



3. Las signalni sistem

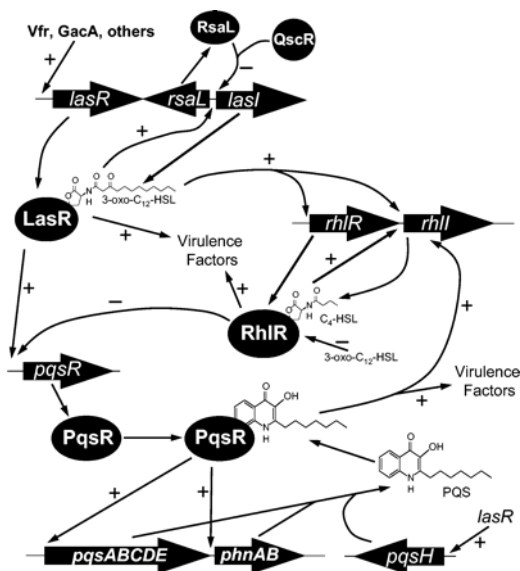
Signale Molekule: AHL imenovane PAI-2 (Plasminogen aktivator inhibitor-2),
N-butanoyl-homoserine lactone (C4HSL)

Vrste bakterij: Pseudomonas aeruginosa, gram(-)

Prejemni protein: Rhl R

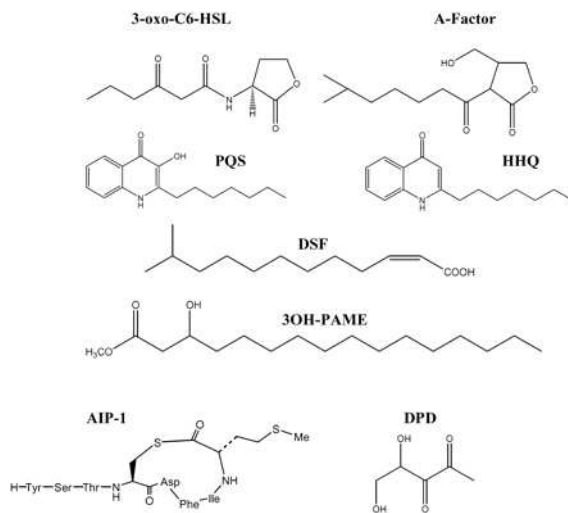
Sinteza: RhlA in RhlB

Geni: pqsABCDE in phnAB



4.2.4. Signalne molekule

Spodnje signalne molekule so bile uporabljene v medcelični komunikaciji. Z njimi so regulirali učinek posameznega promoterja



Gram (-) bakterija potrebuje

3-oxo-C6-HSL, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, an AHL
 DPD, the AI-2 precursor, 4,5 dihydroxy-2,3-pentanedione
 HHQ, 2-heptyl-4(1H)-quinolone, an AQ

Gram (+) bakterija potrebuje

DPD, the AI-2 precursor, 4,5 dihydroxy-2,3-pentanedione
 A-Factor, 2-isocapryloyl-3-hydroxymethyl-butylolactone
 PQS, pseudomonas quinolone signal, 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone
 DSF, 'diffusible factor', cis-11-methyl-2-dodecenoic acid
 3OH-PAME, hydroxyl-palmitic acid methyl ester;
 AIP-1, staphylococcal autoinducing peptide 1

4.2.5. Širjenje signala preko celic

Veliko projektov v času tekmovanja iGEM je zahtevalo komunikacijo med celicami in da se celice, ki sprejemajo sporočilo odzovejo le takrat, ko sporočilo res dobijo. Problem je bil, da so celice rasle hkrati, ne pa šele takrat, ko so dobile sporočilo. Pri tem projektu je bila potrebna ravno taka komunikacija. Problema so rešili postopku:

- Po površini so istočasno »posejali« celice
- Ena kolonija je odporna na ampicilin (zgornji desni kot), druge pa ne
- Ko omenjena kolonija raste sproti uničuje antibiotik
- To omogoča rast drugih celic, ki niso odporne na ampicilin

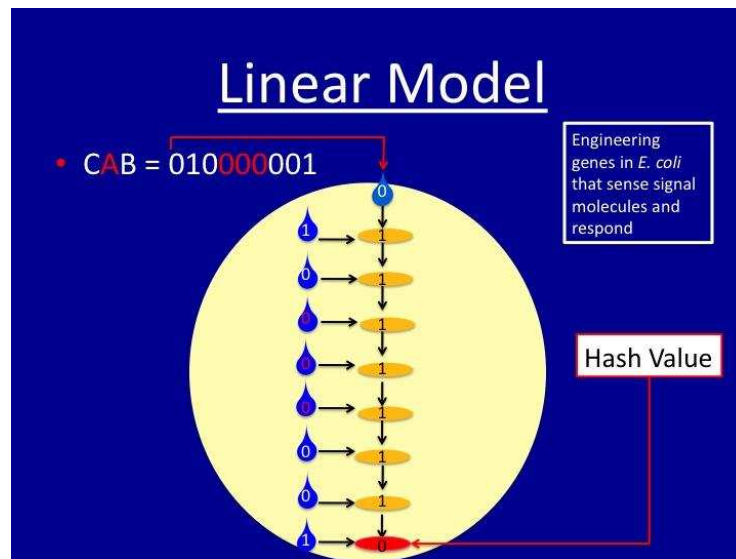
*4.2.6. Novi deli*

Skupina je razvila veliko novih delov in jih prispevala v Register.

- hibridni promotorji (5)
- sistemi za pošiljanje in prejemanje (3)
- XOR vrata

4.2.7. Modeli

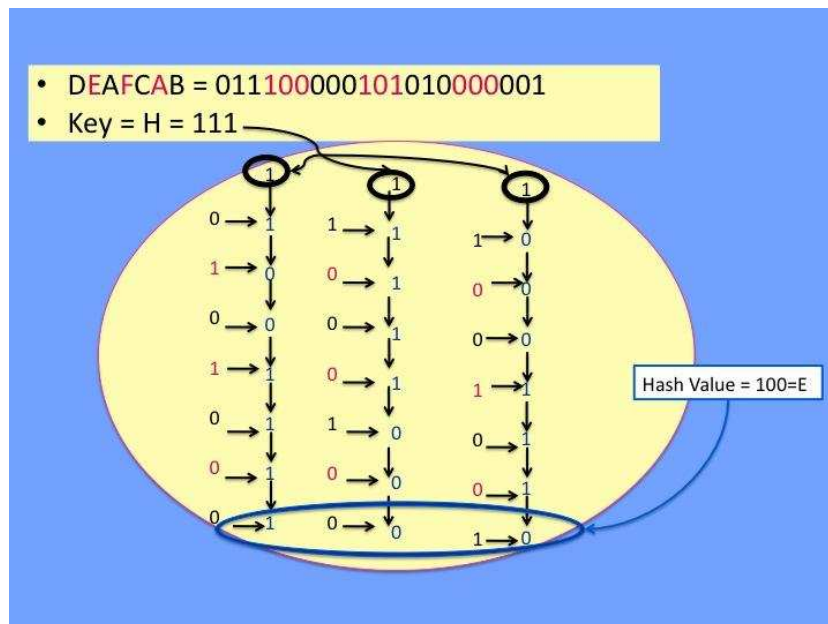
1. Linearni model



Slika 13. Diagram prikazuje kako lahko implementiramo preprosto zgoščevalno funkcijo v petrijevi posodi z *E.coli* bakterijo. Ta model je osnova vseh ostalih modelov.

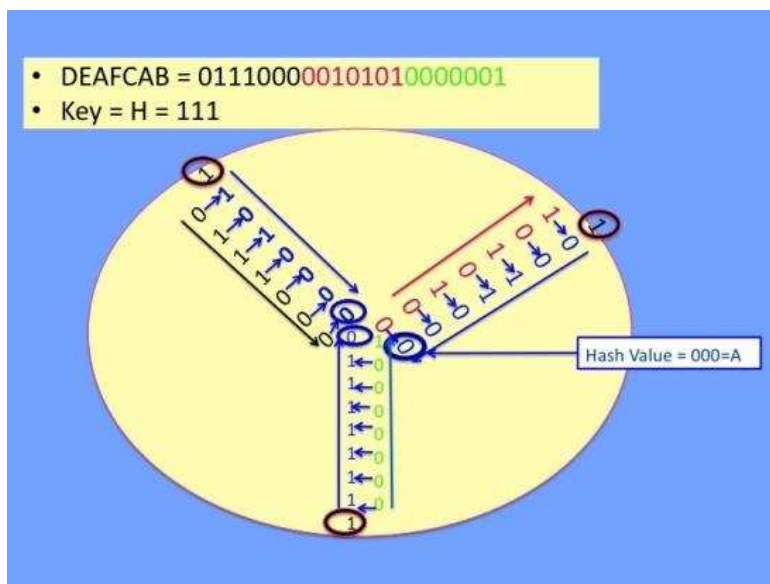
- zlato obarvane elipse predstavljajo kolonije opažene na površini
- vhodni niz »CAB« je konvertiran v niz ničel in enic (1-prisotnost, 0-odsotnost molekule)
- prvi znak je uporabljen kot ključ na vrhu modela
- drugi znaki so prikazani v modrih kapljicah
- vsaka kolonija izračuna XOR dveh vhodov (1.vhod=zgornja kolonija, 2.vhod=spodnja kolonija)
- zgoščena vrednost je vrednost zadnje kolonije

2. Split model



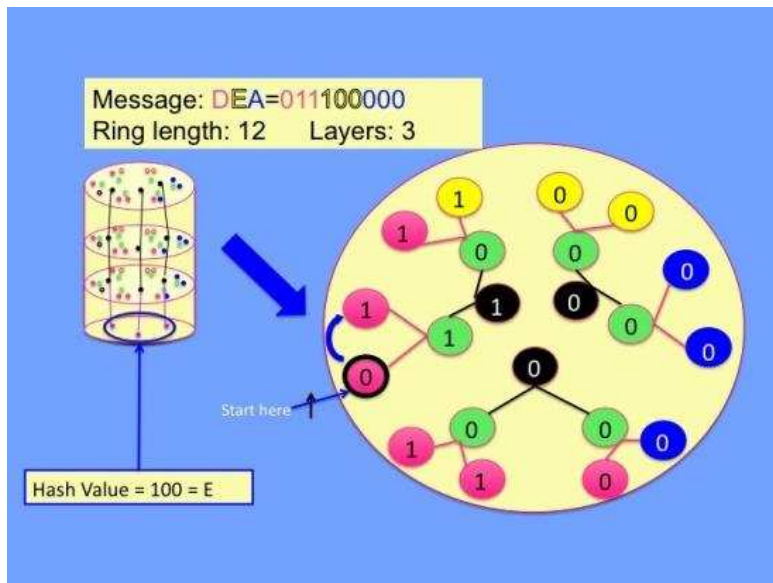
Slika 14. Vsak bit ključa je XOR-an s prvim bitom sporočila. Rezultat ponovno XOR-amo z drugim bitom ...

3. Spoke model



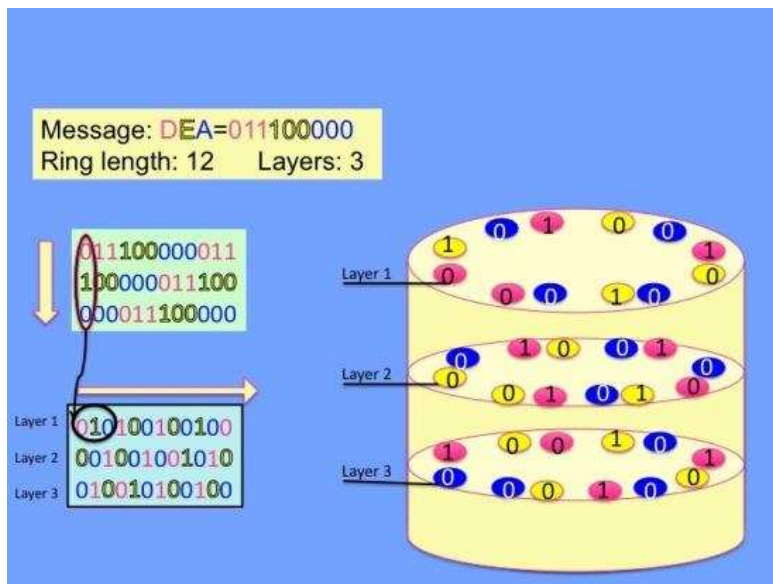
Slika 15. Deluje podobno kot 'Split model'

4. Net model



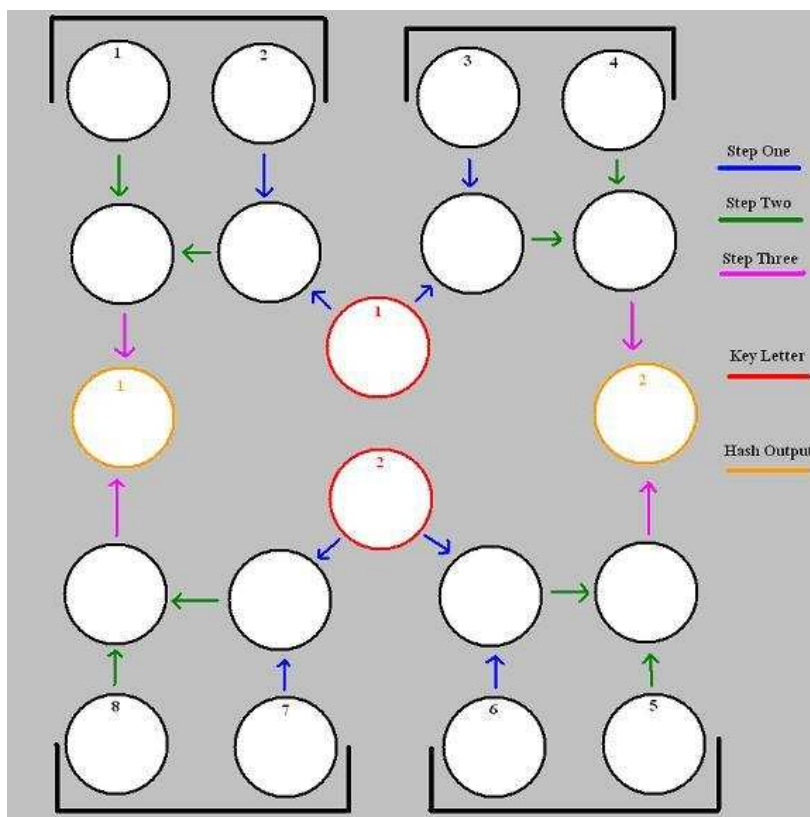
Slika 16. Vhod (biti) se preoblikuje v krožne celote. Koliko je takih celot mora določiti uporabnik. Ko se sporočilo konča in če krožne celote niso polne, se sporočilo ponavlja do zasedenosti. Posamezni biti so zgoščeni s svojimi sosednjimi biti. Ti biti pa so potem zgoščeni z biti iz nižjih krožnic. To se ponavlja dokler se ne doseže spodnjega nivoja. Prednost tega modela je v fleksibilni velikosti, medtem ko je pri drugih modelih velikost fiksna.

5. Twist model



Slika 17. Deluje podobno kot 'Net model'

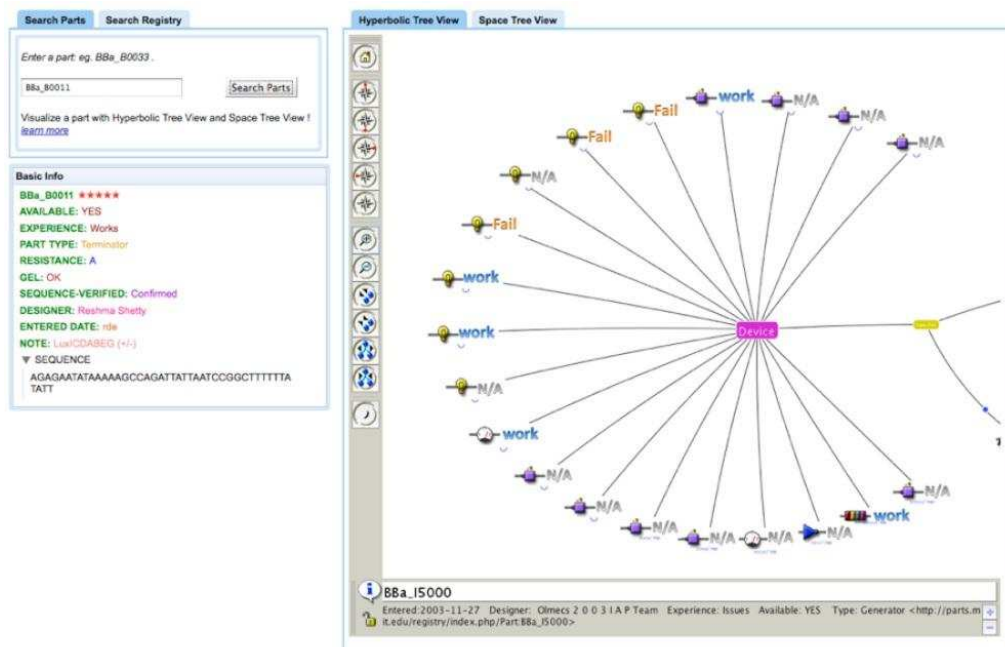
6. Workin' in, workin' out model



Slika 18. Ta model je bil poskus narediti zgoščeno funkcijo v petrijevi posodi, pri kateri bi zelo težko prišlo do kolizije. Poskus je deloma uspel. Funkcija zadovoljuje pogoje dobre zgoščevalne funkcije

4.3. Viz-A-Brick

To je grafični vmesnik nad registrom standardnih bioloških delov. Z njim se iskanje in predstava precej poenostavi. Hiter in lahek dostop do samega dela in njegove povezave z ostalimi je pogoj za razvoj sintetične biologije.



Zgornja slika prikazuje primer, ko smo iskali BBa_B0011. Iskan del se nato prikaže povezan z vsemi subparts (parts oz. intermediates), ki jih vsebuje ter z vsemi superparts (devices oz. intermediates), ki iskan del vsebujejo. Vmesnik omogoča hitro izbiranje posameznega dela v diagramu. Diagram pa se ustrezno spremeni glede na novi izbrani del.

Vmesnik nam ponudi tudi informacije o kvaliteti ter izkušnjah o posameznem delu. Vsak del ima svojo oceno, ki nam hitro pove kakšna je izkušnja s posameznim delom.

Dostopen zastoj na <http://gcat.davidson.edu/VizABrick/>

5. Valencia – Lightning Cell Display

5.1. Uvod

Namen projekta je dokazati, da je možno nadzirati fiziološko delovanje celic neposredno z dovajanjem električne energije. Zato so se domislili bio-monitorja, sestavljenega iz živih celic, katere se aktivira s pomočjo električne napetosti. Celice morajo proizvajati svetlobo.

Znano je, da se živčne in mišične celice ter celice srčne mišice odzivajo na električne impulze. Vse uporabljajo »second messenger system«, ki deluje na podlagi kalcijevega iona Ca^{2+} , ki spodbudi njihov odziv, ko so pod napetostjo. Na žalost pa imajo te celice tudi slabe lastnosti:

- Zelo so izpostavljene okužbam
- Manipulacija z njimi je komplicirana in draga
- Občutljive so na zunanje vplive

Projekt je razdeljen na tri dele:

- Določitev primerne celice (LEC – light emitting cell)
- Analiza obnašanja celice
- Iz celic sestaviti iLEC

5.2. Določitev primerne celice

Projekt na katerega se je skupina osredotočila je ugotoviti, kako kontrolirati fiziološko obnašanje celic s pomočjo električnih šokov. Pri tem pa je pomembno, da so celice sposobne proizvajati svetlobo. Zato so delali na proteinu imenovanem aequorin. Najdemo ga v meduzah in nekaterih drugih morskih živalih in je bistven za svetlobo, ki jo proizvajajo ti organizmi. Da aequorin proizvede svetlobo, ga je potrebno spojiti s coelenterazinom. Coelenterazin oksidira, ko se kalcijevi ioni vežejo na zmes aequorin-coelenterazin, pri tem pa se sprošča svetloba. To ni fluorescentna reakcija, ker aequorin ni potrebno spodbuditi s svetlobo.

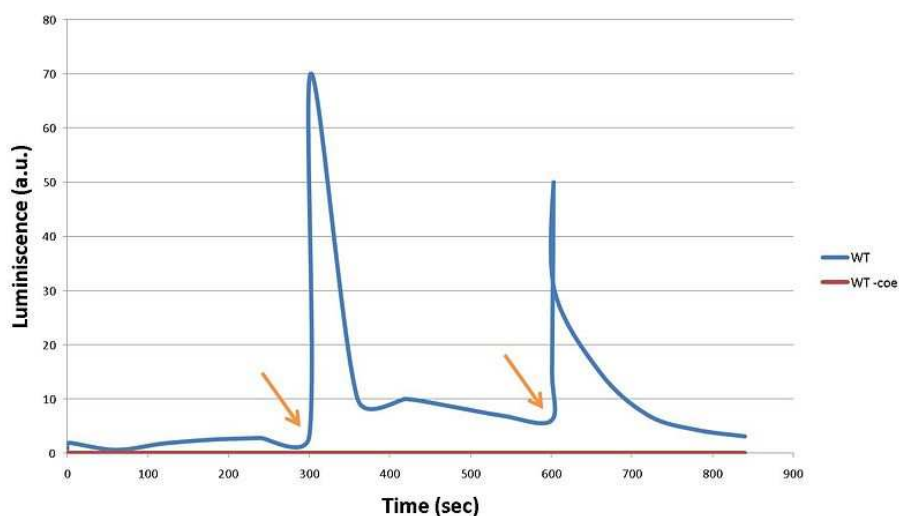
Ker v laboratoriju niso želeli delati z meduzami, so uporabili *Saccharomyces cerevisiae*, ki spadajo v družino kvasovk. Tako so lažje izvajali poizkuse in jih uporabili na bio-zaslону. Uporabili so gensko spremenjeno družino kvasovk, katera vsebuje aequorin. Če le-te gojimo skupaj z umetno skupino coelenterazin, se kot rezultat kemičnih reakcij skozi kalcijeve kanale sprošča svetloba.

Vendar glavni namen je bil električno nadziranje teh reakcij. Zato so s kratkimi električnimi šoki depolarizirali membrane. Tako so povzročili napetostno odvisno odpiranje kalcijevih kanalov, ki omogočajo vstop kalcija do citosola, kar povzroča sproščanje svetlobe.

5.2.1. Rezultati testiranja

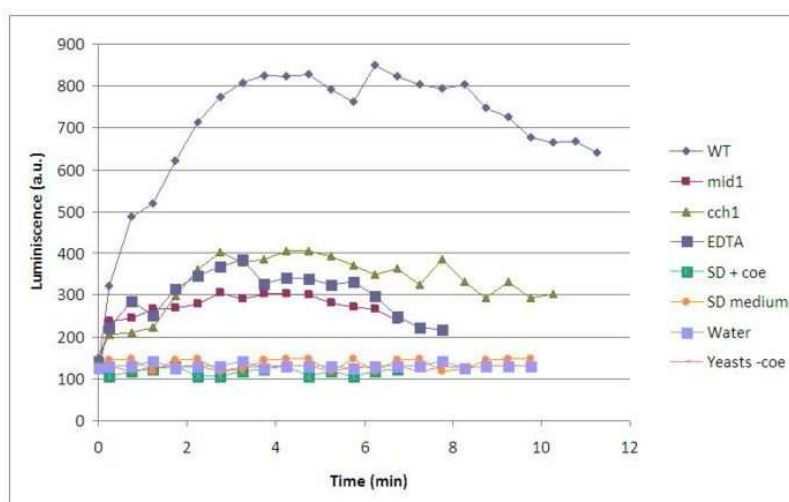
WT – prikazuje zmes, ki vsebuje aequorin, coelenterazina in Ca^{2+}

WT-coe – prikazuje zmes, ki vsebuje aequorin



Slika 19. Puščice na grafu prikazujejo trenutek, ko so zmes postavili pod napetost 16V. Šok je trajal 5 sekund.

5.2.2. Kontrola snovi

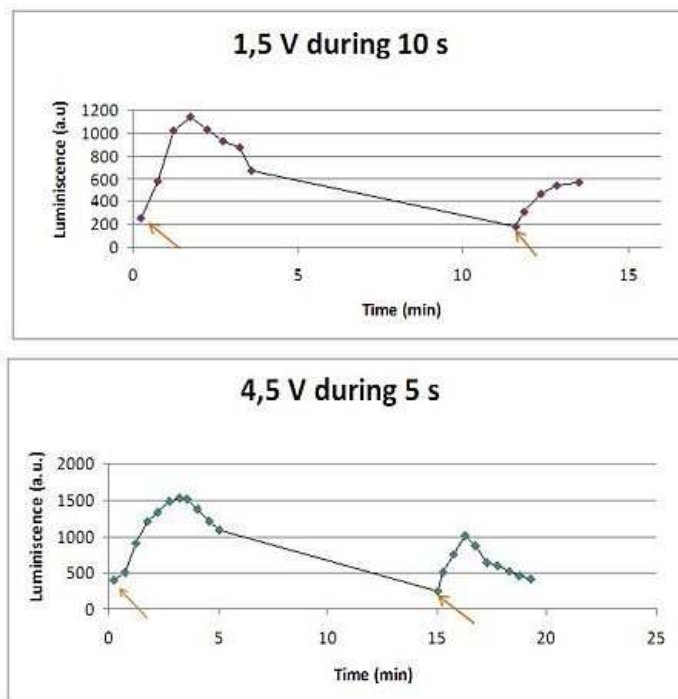


Slika 20. Graf prikazuje obnašanje različnih zmesi po šoku z napetostjo 4V.

Kot vidimo dobimo tri skupine rezultatov

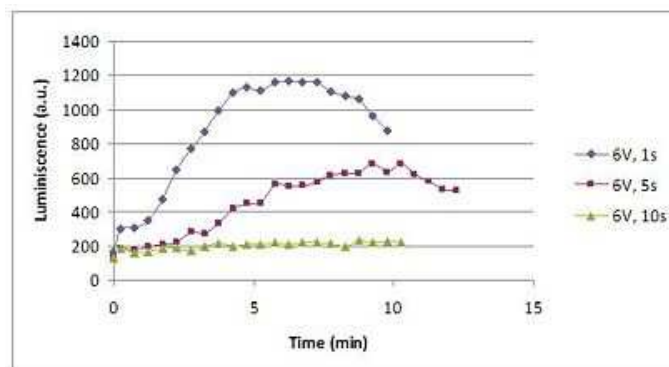
- WT-popolna celica, ki vsebuje aquorin, coelenterazin in polno delujoče kalcijeve kanale. Pri tem vidimo da je proizvedene največ svetlobe.
- CCH1, EDTA, MID1- celice, ki vsebujejo vse potrebne komponente, vendar so kalcijevi kanali zaprti (na različne načine). Rezultat je malo proizvedene svetlobe.
- SD+coe, SD medium, Yeasts-coe – celice, katerim je bila vzeta vsaj ena od komponent potrebnih za želeno delovanje. Rezultat je nič proizvedene svetlobe.

5.2.3. Vpliv napetosti



Slika 21. Puščice prikazujejo trenutek, ko so začeli dovajati elektriko. V teh primerih opazujemo časa vzpona in padca ter maksimalno jakost svetlobe.

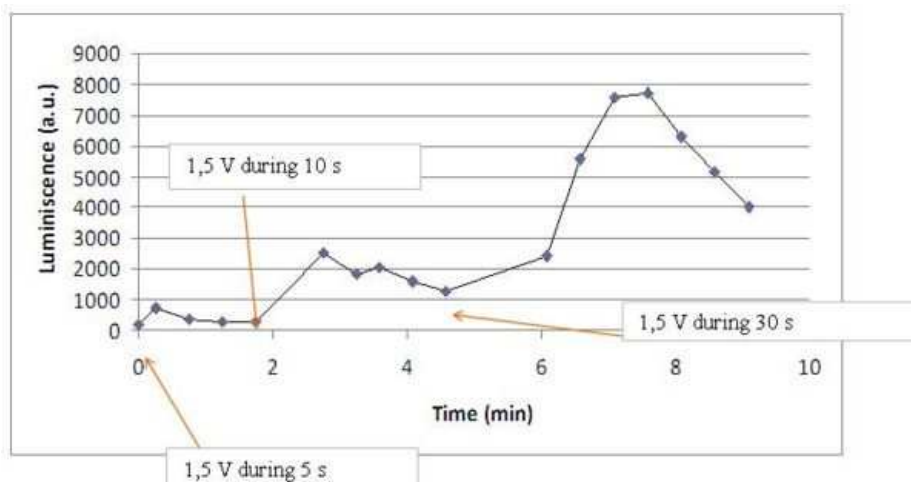
5.2.4. Vpliv časa dovajanja elektrike



Slika 22. S spreminjanjem časa v katerem je naša celica pod napetostjo so dobili naslednje rezultate

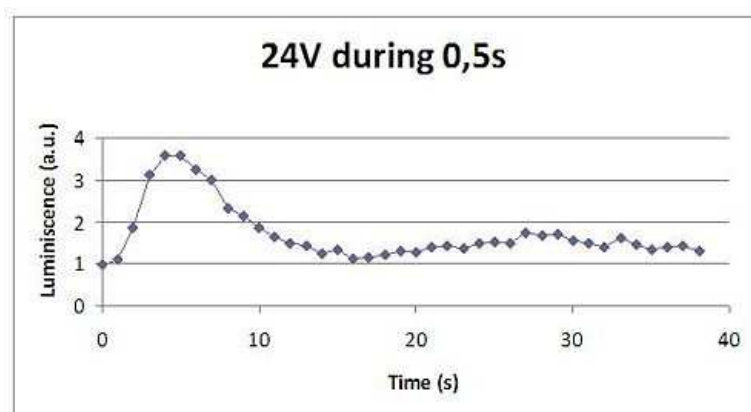
Iz slike je razvidno, da lahko celico predoziramo. To pa povzroči, da ne proizvede svetlobe.

5.2.5. Vpliv ponavljanja



Slika 23. Testirali so tudi ponavljanje vzbujanja celice pod določeno napetostjo, z različnimi časi vzbujanja

5.2.6. Čas osveževanja



Slika 24. Namen tega testiranja je bil odkriti najkrajši možen čas osveževanja. Tega so odkrili pri napetosti 24V in času vzbujanja 0,5s. Čas osveževanje je 12s.

5.3. Aktivacija LEC

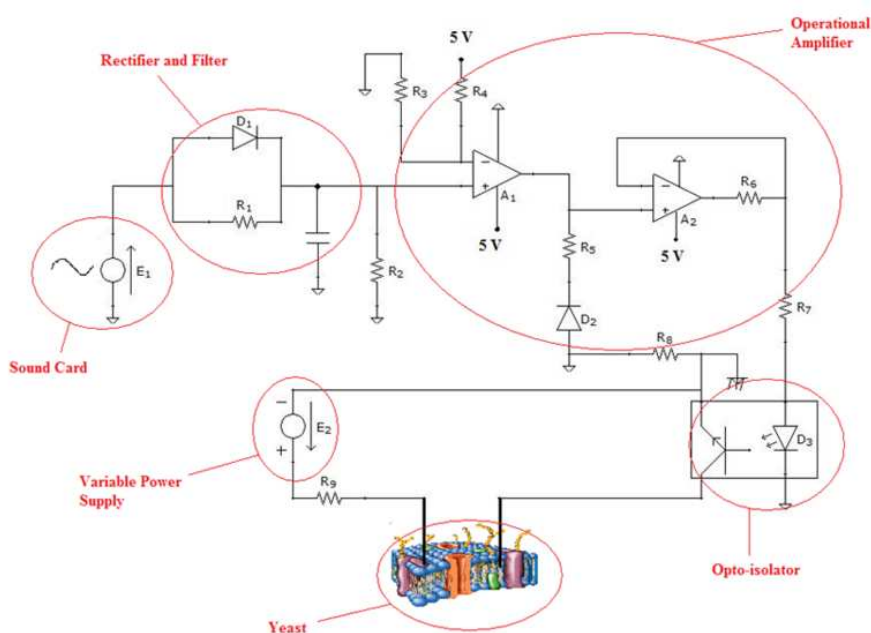
Ekipa se ponaša z povezovanjem elektronike in biologije na neposreden in inovativen način. Zato so porabili veliko časa za razvoj vezij in opreme, za hitro in robustno kontrolo celične fiziologije.

Razvili so elektronsko vezje, ki lahko dovaja napetosti med 0 in 24V z natančnostjo 0.1V. Vezje lahko kvasovkam dovaja tok v časovnih intervalih do 20ms. To vezje je bilo uporabljeno pri opisovanju elementa BBa_K222000 (oz. LEC). Ta sistem poskrbi za začetno stimuliranje celic. Rezultate pa izmerimo z luminometrom.

Naprava je sestavljena iz naslednjih komponent:

- Prva komponenta je sestavljena iz napetostnega vira in dveh elektrod za vzbujanje celic.
- Drugi del je optocoupler, ki opravlja funkcijo elektronskega stikala. Sestavljen je iz led diode in fototranzistorja.
- Zadnji del je odgovoren za nadzor časovnega intervala, v katerem je celica izpostavljena napetosti. Pri tem so si pomagali s PC zvočno kartico in MatLab-om.

Izhodni signal iz zvočne kartice je bil spremenjen s posebnim filtrom in poslan skozi 2 operacijska ojačevalnika, da bi dobili kar se da točen signal za aktivacijo optocoupler-ja. Ojačevalnika sta napajana z 5V in ozemljena. Tako imamo na izhodu 5V, ko je zvočna kartica aktivna in 0V ko ni aktivna.



Slika 25. Tak sistem nam omogoča spodbujanje enega kanala v eni LEC. Za večji sistem (zaslon) potrebujemo polje elektrod povezanih na multiplekser.

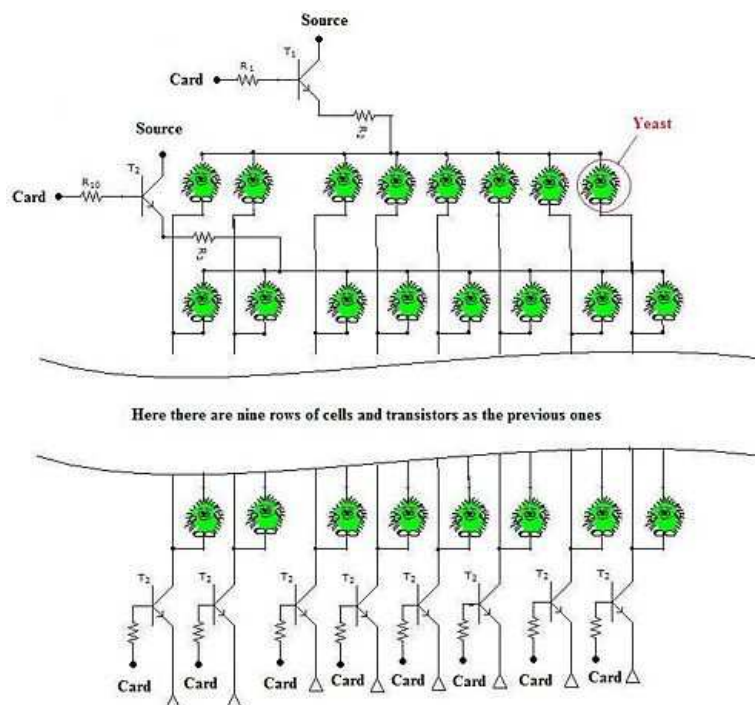
5.4. *iLEC* polje

Ko so opisovali značilnosti svetlobnega odziva kvasovk na stimulacijo z električnim pulzom, so ugotovili, da je čas osveževanje približno 10s. Odločili so se za polje 96 samostojnih pikslov (celičnih kultur), tako da lahko sodelujejo pri kreiranju animiranih slik. Ta sistem predstavlja prvi zaslon, ki je sestavljen iz živih celic.

5.4.1. Izdelovanje podpore za vseh 96 pikslov

Da bi lahko postavili 96 izhodov na želeno napetost, so zamenjali zvočno kartico z 24 kanalov široko podatkovno kartico, ki je sposobna ločeno kontrolirati vhodne amplitude in časovno varirajoče električne impulze. Ker ima kartica 24 izhodov,

potrebno pa je kontrolirati 96 pikslov, nam električno vezje omogoča identifikacijo vsakega piksla z kombinacijo 20-ih izhodov. Ti pulzi so signali za prižiganje in ugašanje stikala nad poljem pikslov.



5.4.2. Kontroliranje sistema

Za kontroliranje podatkovne kartice na tak način, da bi jo lahko uporabili za izbiro primernih pikslov, so implementirali poseben program. Program sliko najprej razdeli na 96 delov, nato pa glede na intenziteto slike pošlje signal preko podatkovne kartice, ki je preko USB priključena na prenosnik, izbranemu pikslu. Tak sistem omogoča pošiljanje več zaporednih slik, kar nam omogoča predvajanje različnih črno-belih animacij.

5.5. BioBrick: Bba_K222000

Rezultat celotne raziskave je BioBrick: Bba_K222000 ali aequorin. To je poseben protein, ki je izoliran iz svetlečih meduz in drugih morskih organizmov. Prvi ga je uspel izolirati Osamu Shimomura. Danes poznamo več tipov aequorina, odvisno od organizma iz katerega izvira.



Celice ki vsebujejo ta del, lahko proizvajajo apoprotein. Le-ta sam ne proizvaja svetlobe. Potrebno ga je združiti skupaj z coelenterazinom v prisotnosti Ca^{2+} iona. Dve komponenti aequorina se rekonstruirajo spontano in tako tvorijo nov protein. Ta ima tri mesta na katera se lahko vežejo kalcijevi ioni, kar povzroči da se začne protein spreminjati. Pretvarja se z oksidacijo coelenterazina v stimuliran coelenteramid in CO_2 . Ko se spodbujen coelenteramid vrača v osnovno stanje, se sprošča modra svetloba.

5.5.1. Osnovne značilnosti

Kompleks aequorina in coelenterazina potrebuje Ca^{2+} ione za proizvodnjo svetlobe. Kalcij vstopi skozi posebne kalcijeve kanale prisotne v celičnih membranah. Kanale odpremo s spreminjanjem transmembranskega potenciala, zato jim tudi rečemo napetostno odvisni kanali. Enačba ki opisuje prehod kalcija skozi kanale:

$$I_{Ca} = g(t, V)(V - E_{Ca})$$

Pri tem je g prevodnost (kalcijeva prevodnost) kanala, V je transmembranski potencial, E_{Ca} pa je Nernst-ov potencial (električni potencial, ki se vzpostavi zaradi različne koncentracije ionov na eni in drugi strani membrane).

Glede na to, da ti kanali prepuščajo samo kalcij in imajo samo dve stanji (odprto in zaprto), lahko celotno prevodnost glede na število kalcijevih kanalov izrazimo kot množenje maksimalne prevodnosti g in deležem odprtih kanalov. Ta delež je izražen s spremenljivkami m in h , ki sta odvisni od napetosti in časa šoka.

$$I_{Ca} = \bar{g}m(t, V)h(t, V)(V - E_{Ca})$$

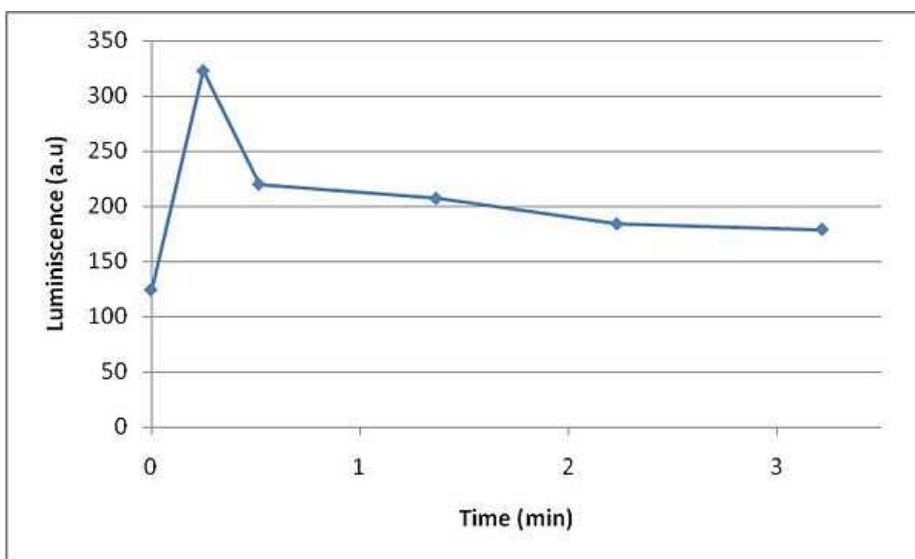
Maksimalna prevodnost g je pri bolj raziskanih celicah (npr. živčne celice) znana. Pri *Saccharomyces cerevisiae*, pa ta vrednosti ni znana. Zato so jo morali določiti eksperimentalno.

$$\bar{g} = 21.368\mu S$$

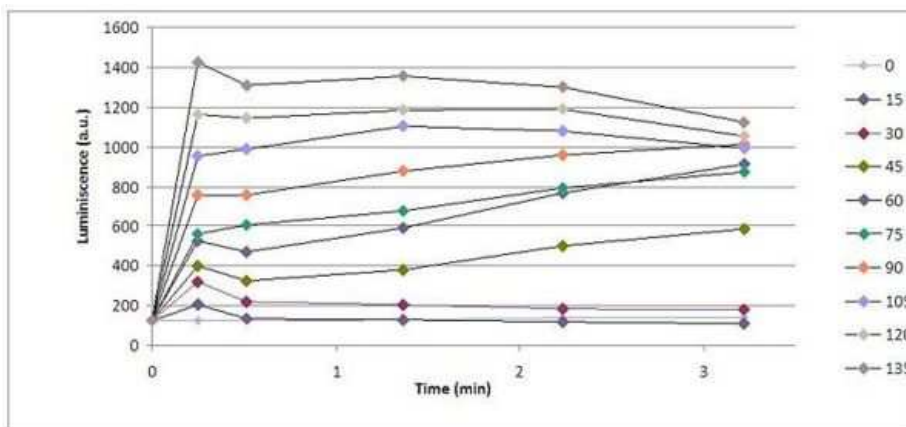
Odpiranje teh vrat in posledično vstop kalcija v citoplazmo, kar povzroči svetlobo, lahko povzročimo na dva načina kemijsko in električno.

5.5.2. *Kemijska stimulacija*

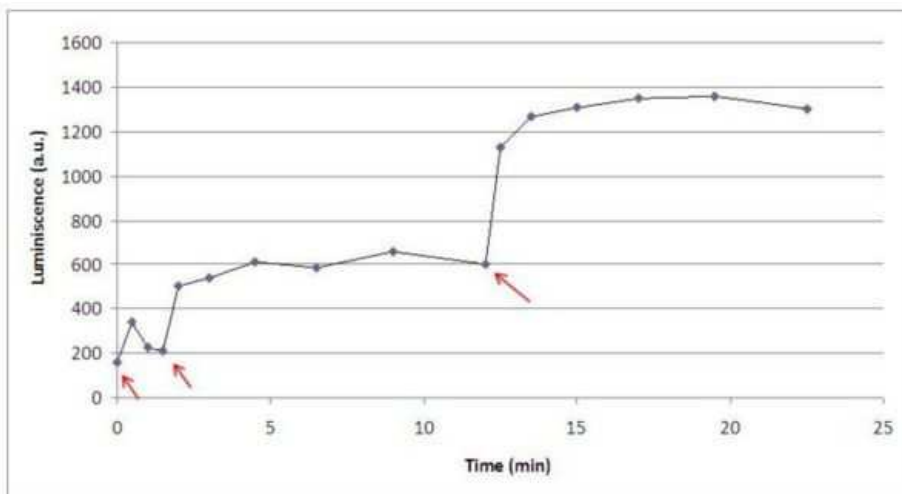
Alkalijski šok, ki ga sprožimo z KOH, povzroči vstop kalcija v citoplazmo. Graf prikazuje odziv na $30\mu L$ KOH.



Opazili so tudi, da s večanjem količine KOH, dobijo več svetlobe. Količina KOH izražena v legendi je v μL .

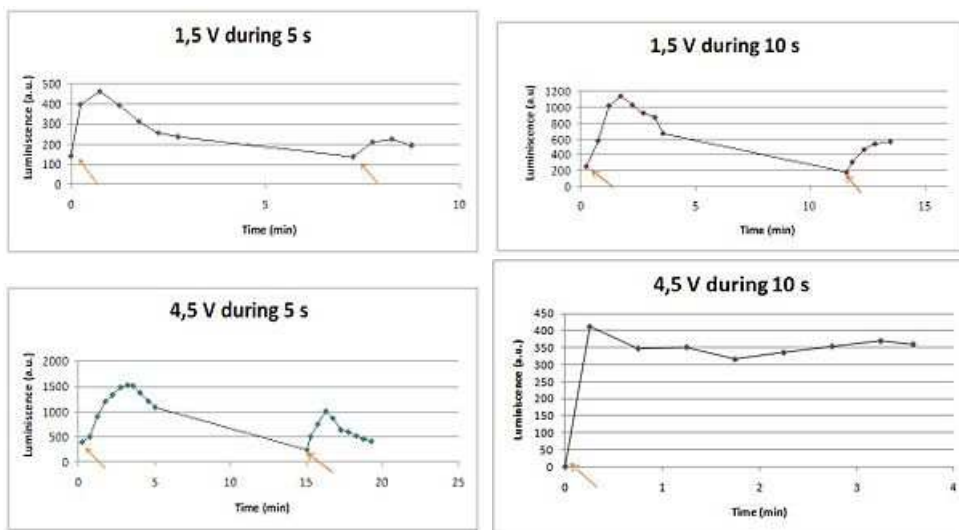


Opazili so tudi, da lahko pri primerni količini aequorina in coelenterazina sprožijo več stimulacij eno za drugo.

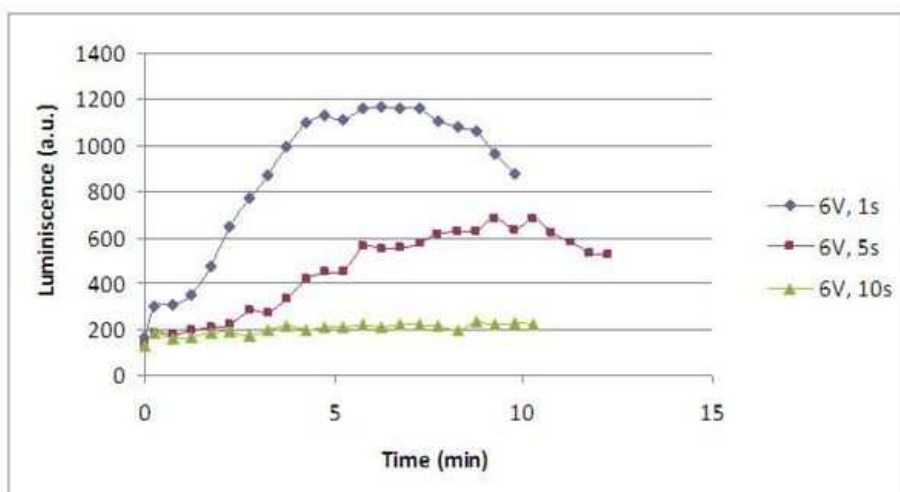


5.5.3. Električna stimulacija

Kalcijeve kanale lahko odpremo tudi z električnim šokom. Količina svetlobe, ki se sprosti je odvisna od trajanja električnega šoka in jakosti le-tega.

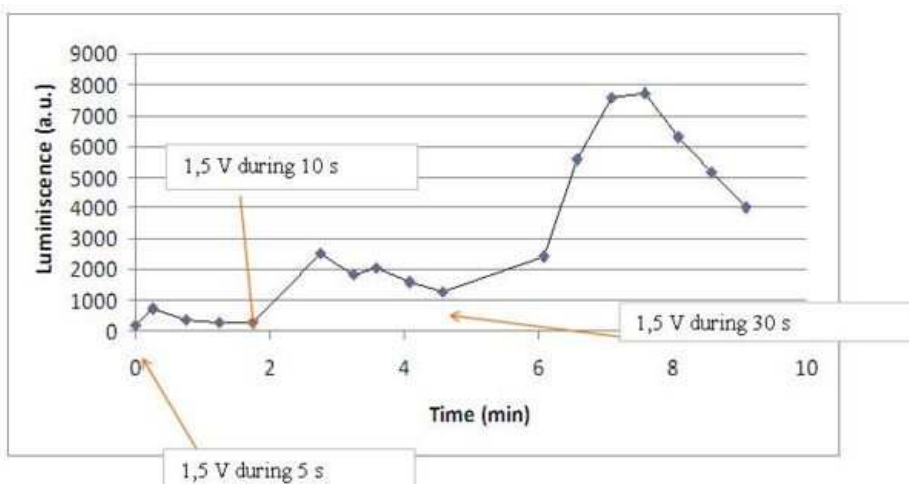


Ključnega pomena je čas dovajanja elektrike. Opazimo, da pri kratkem in močnem šoku celica odreagira hitro (graf je zelo špičast), pri daljšem šoku, pa je graf bolj položen.

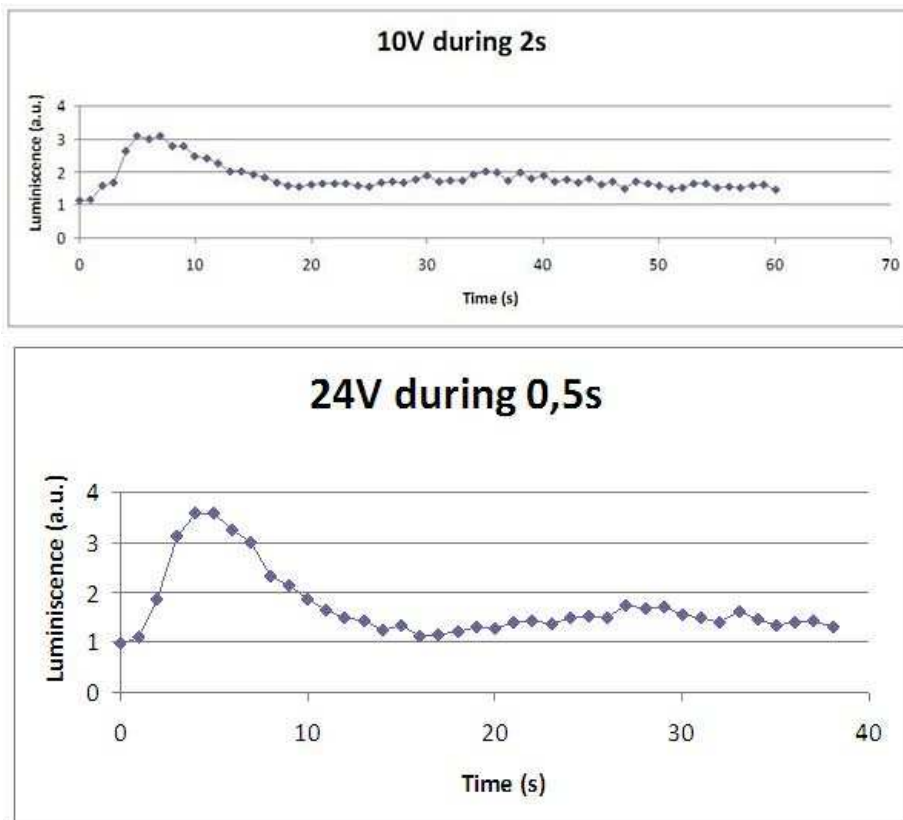


Do tega pride, ker daljše izpostavljanje električnemu toku, povzroči poškodbo celic. Vsebina celic (vključno z aequorinom in coeletterazinom) se razlije po mediju in reakcija sproščanja svetlobe je bolj enakomerna (glede na čas). V primeru nizke napetosti (npr. 1,5V), do tega pojava ne pride.

Čeprav prejšnji grafi kažejo, da druga stimulacija povzroči manjše vrhove, lahko z različnimi časi električnih šokov dosežemo drugačne rezultate.



Po daljšem testiranju, da bi odkrili najbolj primeren način stimuliranja so našli spodnjo rešitev.



Tako so dobili najkrajši čas osveževanja 12s, pri 24V v 0,5 sekunde.

Literatura

- Spletna stran iGEM 2009: <http://2009.igem.org/>