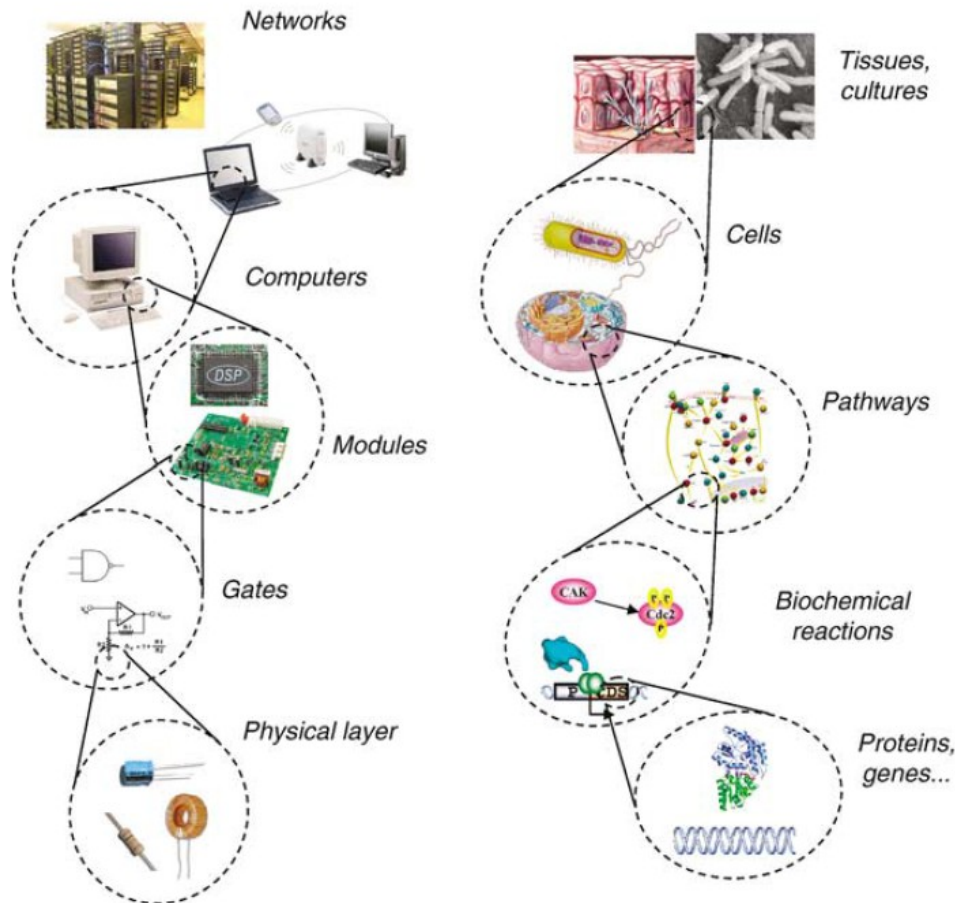


# Biološka vezja / Genetska vezja

Vezja v elektroniki predstavljajo med seboj povezane komponente, po katerih potujejo elektroni.

**Logično vezje** je v računalništvu povezava med logičnimi vrati, ki omogoča logične operacije s podatki – digitalnimi informacijami.

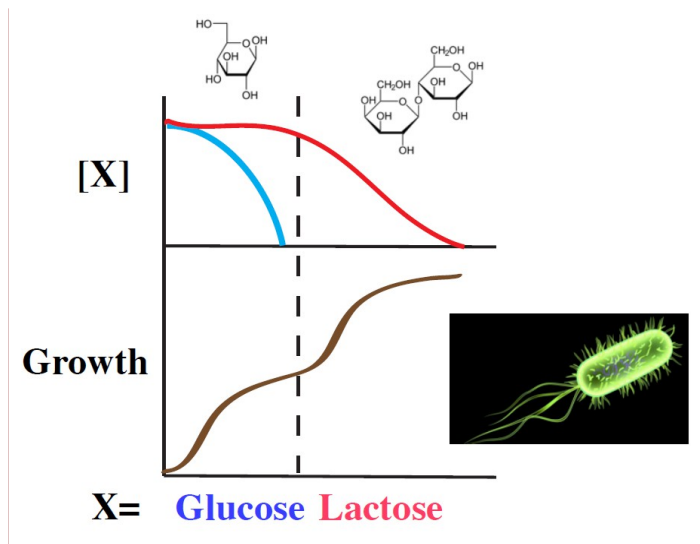
V biologiji so vezja med seboj povezani biološki elementi (proteini, nukleotidna zaporedja), ki opravljajo neko funkcijo v organizmu. Najpogosteje so povezana z regulacijo izražanja genov – govorimo o regulatornih vezjih. V osnovi so biološka vezja genetska vezja.



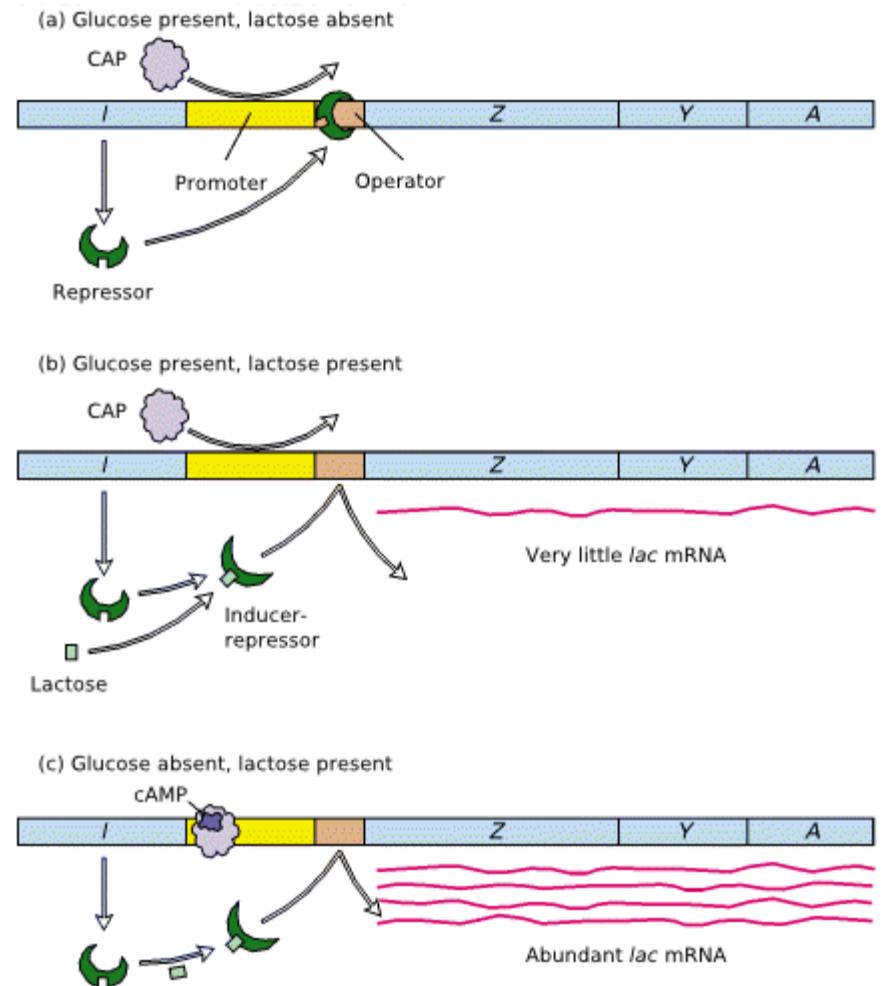
# Preprosta naravna biološka vezja

Prvi natančno opisan primer genetskega vezja je laktozni operon v povezavi z diavksično rastjo: operon *lac* ,se odloči' ali bo celica izrabljala laktozo ali ne.

Izraz ,biološko vezje' se najpogosteje pojavlja v biološkem inženirstvu / SB, ki temelji na načelih računalniškega inženirstva.



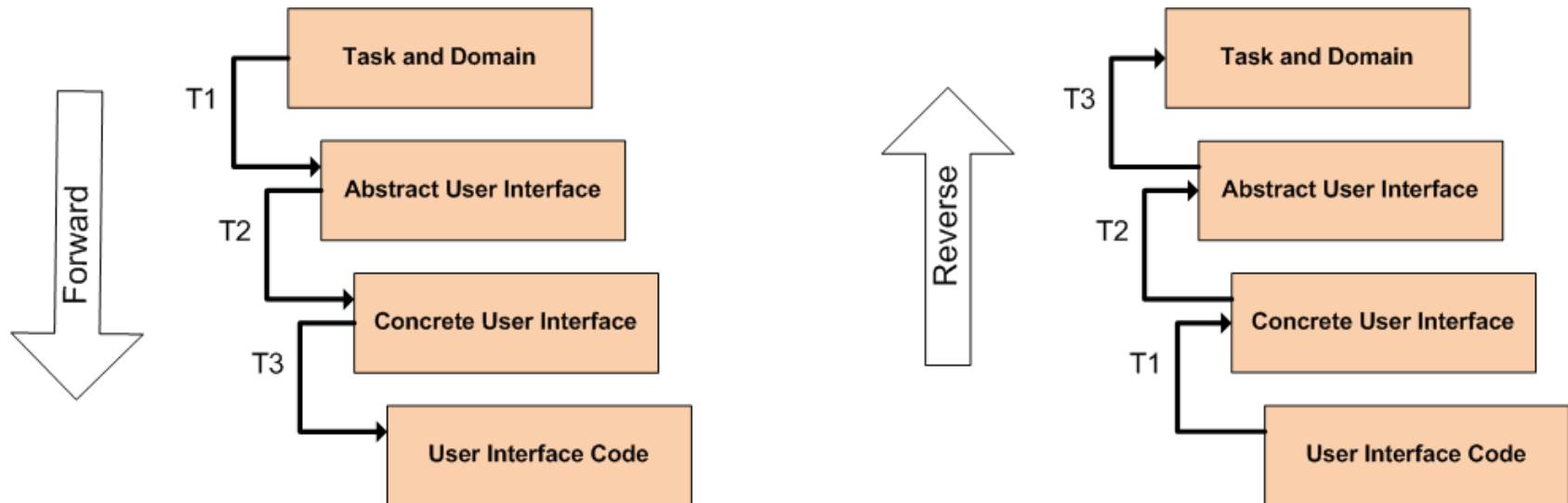
<http://amapress.gen.cam.ac.uk/wp-uploads/2012/06/Lecture-1-AMA-CDB.pdf>



## Forward engineering, reverse engineering

Projekcijsko inženirstvo (?) – v inženirstvu običajno izhajamo iz višjih ravni abstrakcije in načrtujemo naprave na osnovi logike, neodvisno od implementacije, in gremo šele nato v izgradnjo fizičnega sistema.

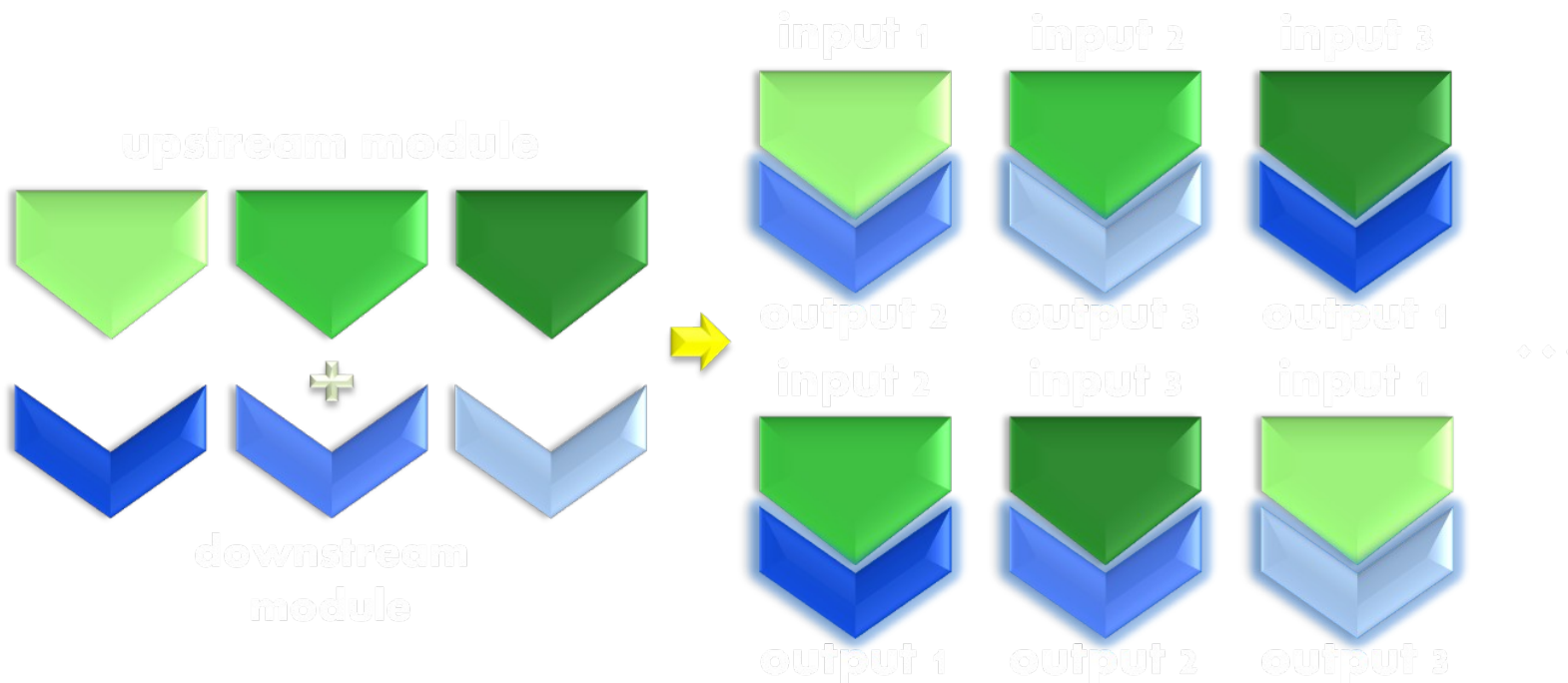
Obratno inženirstvo – z analizo nekega obstoječega sistema poskušamo najti njegove sestavne dele. Cilj je največkrat izdelati izboljšane sisteme ali preurejene kopije obstoječih sistemov.



# Modularnost

Sistemi so sestavljeni iz enostavnejših delov (modulov). Nove sisteme lahko zgradimo iz posameznih modulov, ki jih med seboj ustrezno povežemo. Ti moduli morajo biti dobro opisani.

Modularnost je skupaj s karakterizacijo in standardizacijo eden od temeljev inženirstva, kar velja tudi za sintezno biologijo. Module – biološke dele – povezujemo v naprave, sisteme in/ali sintezna biološka vezja.



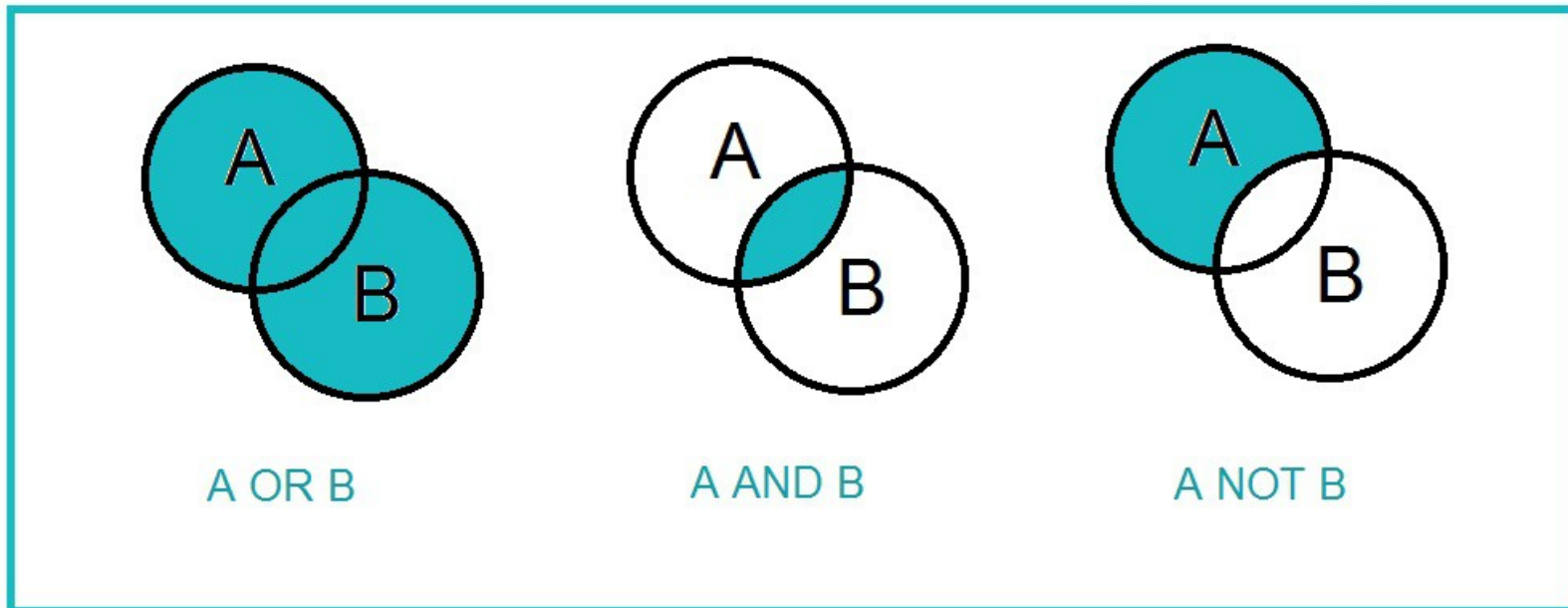
# Logična vezja v računalništvu

Računalniki so zgrajeni iz digitalnih vezij, po katerih potujejo elektroni kot biti informacij.

Bit ima lahko samo dve vrednosti, 1 ali 0, torej gre za dvojiški sistem operacij. Računalnik temelji na logičnih operacijah IN, ALI, NE (Boolovi operatorji), ki so osnova Boolove algebre.

V računalništvu ustreza vrednost 0  $\rightarrow$  0 V, vrednost 1 pa 5 V.

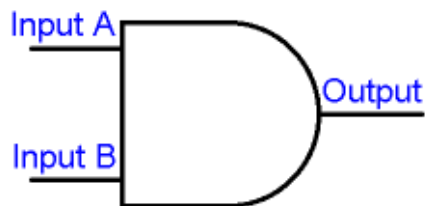
## Boolovi operatorji



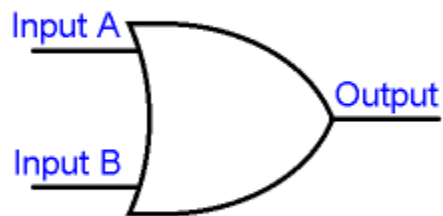
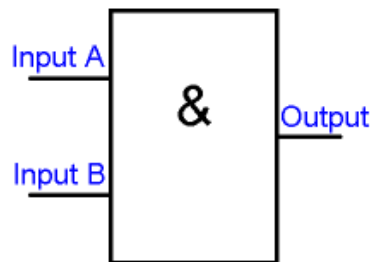
Grafični prikaz vezij temelji na črtah (žicah) in likih (logičnih vratih). ‚Žice‘ prenašajo podatke, ‚vrata‘ jih obdelajo.

Logična vrata imajo vstopne in izstopne signale. Vstopne signale logična vrata obdelajo v skladu z logično funkcijo (operatorjem), tako da je izhodni signal ustrezno spremenjen glede na vhodnega.

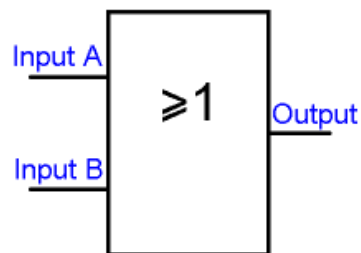
Obstaja več alternativnih načinov grafičnega prikaza, uporabljajo pa predvsem ‚klasični‘ (ameriški) in ‚IEC‘ (Internat. Electrotech. Commission).\_\_



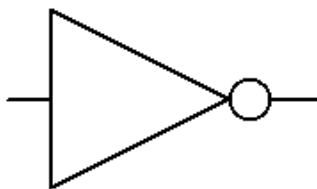
**IN**



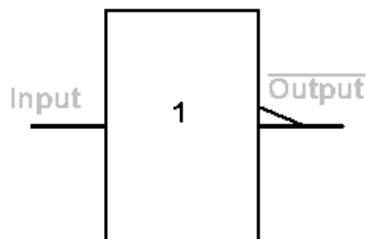
**ALI**

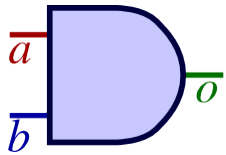


[www.dubdubdub.net.nz](http://www.dubdubdub.net.nz)



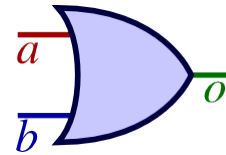
**NE**





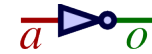
a	b	o
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

sok IN smetana



a	b	o
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	1

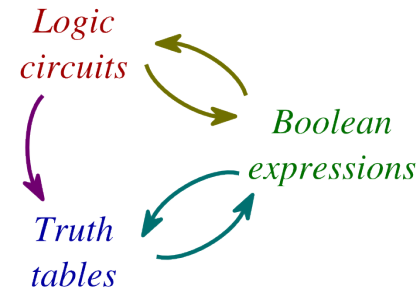
sok ALI smetana

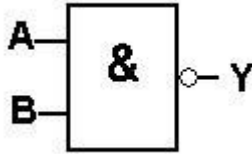
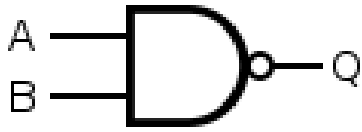


a	o
0	1
1	0

NE  
(nasprotno)

Resničnostna tabela = pravilnostna tabela: prikaz  
pravih izhodnih signalov za dane kombinacije  
vhodnih signalov.

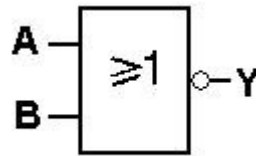




a	b	y
0	0	1
0	1	1
1	0	1
1	1	0

NE-IN – vrata (NAND)

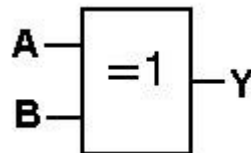
Samo če sta oba vhodna signala 1, je izhodni signal 0.



a	b	y
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

NE-ALI – vrata (NOR)

Samo če sta oba vhodna signala 0, je izhodni signal 1.



a	b	y
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	0

IZKLJUČUJOČI ALI – vrata (XOR)

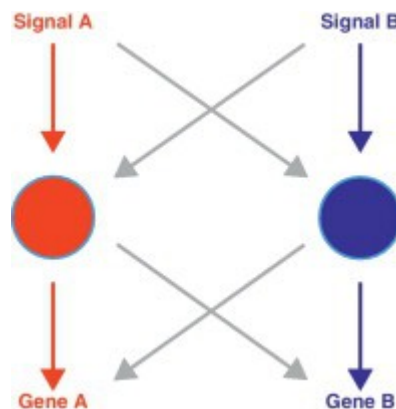
Samo če je en vhodni signal 1, je izhodni signal 1.



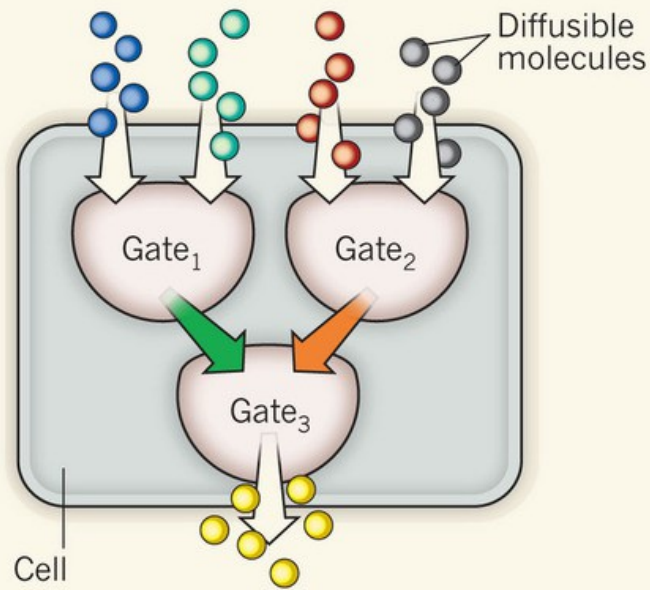
## Problem ortogonalnosti v sintezni biologiji

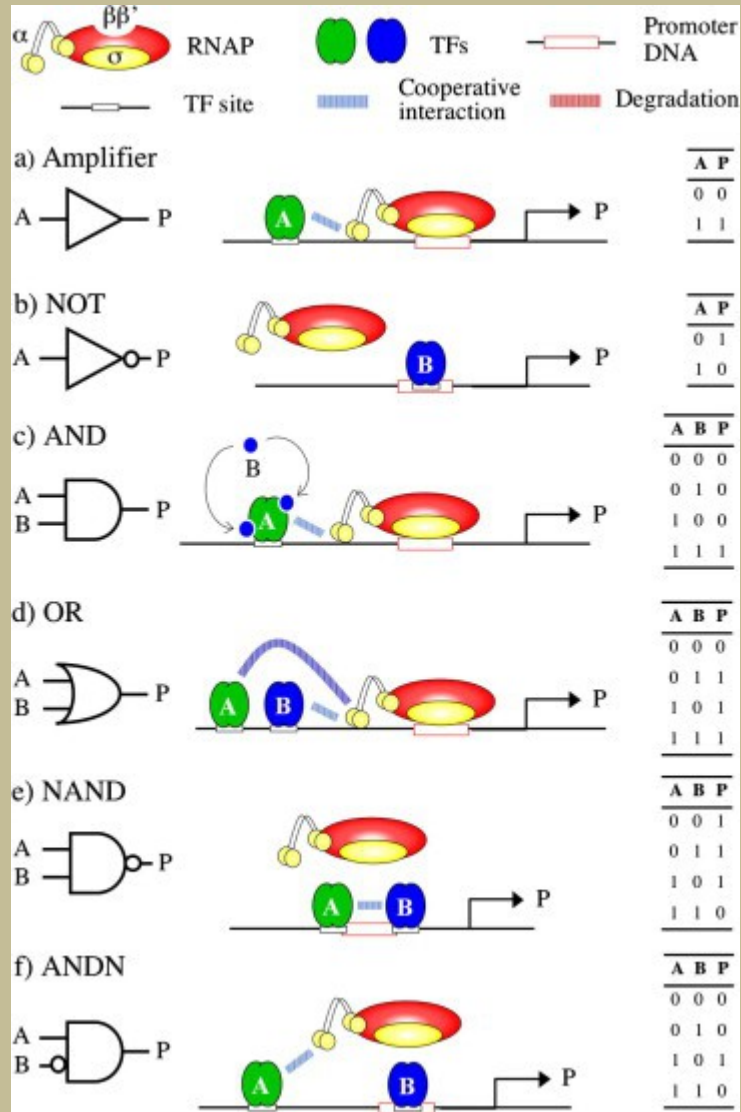
Elektronski elementi (logična vrata v vezjih) so med seboj povezani z žicami, zato prenos signalov ni moten. V bioloških sistemih pa ni ekvivalenta žic, zato signali prihajajo v stik s številnimi drugimi snovmi/signali.

Ortogonalnost pomeni, da so naprave med seboj kompatibilne in da ne prihaja do neželenih interakcij z netarčnimi molekulami (vključno z nukleotidnimi zaporedji). Posredno to pomeni, da z vnosom novih naprav ne bo prišlo do oviranja delovanja siceršnjega molekularnobiološkega ustroja celice.

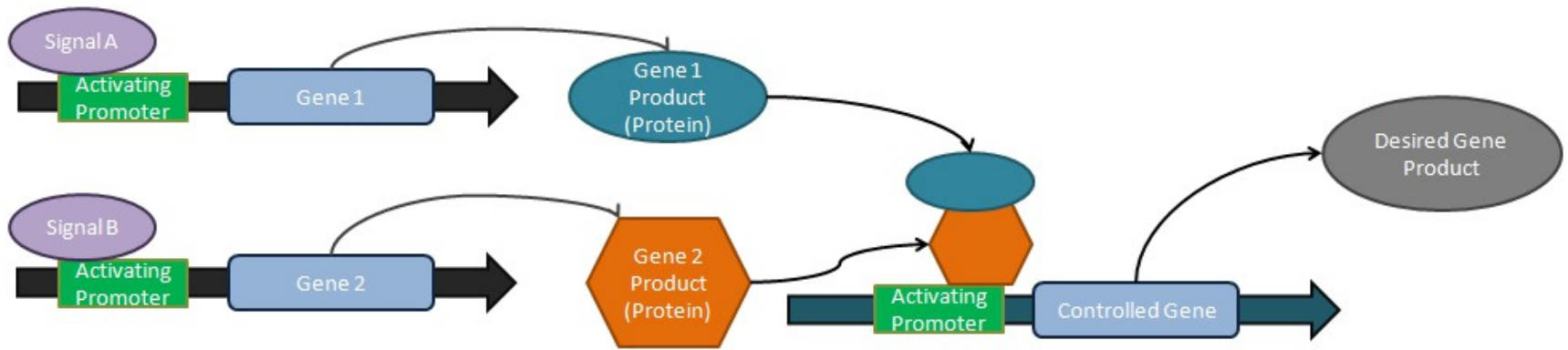


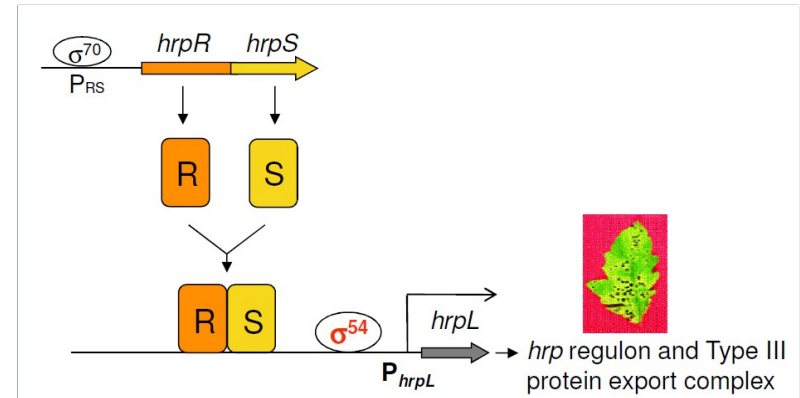
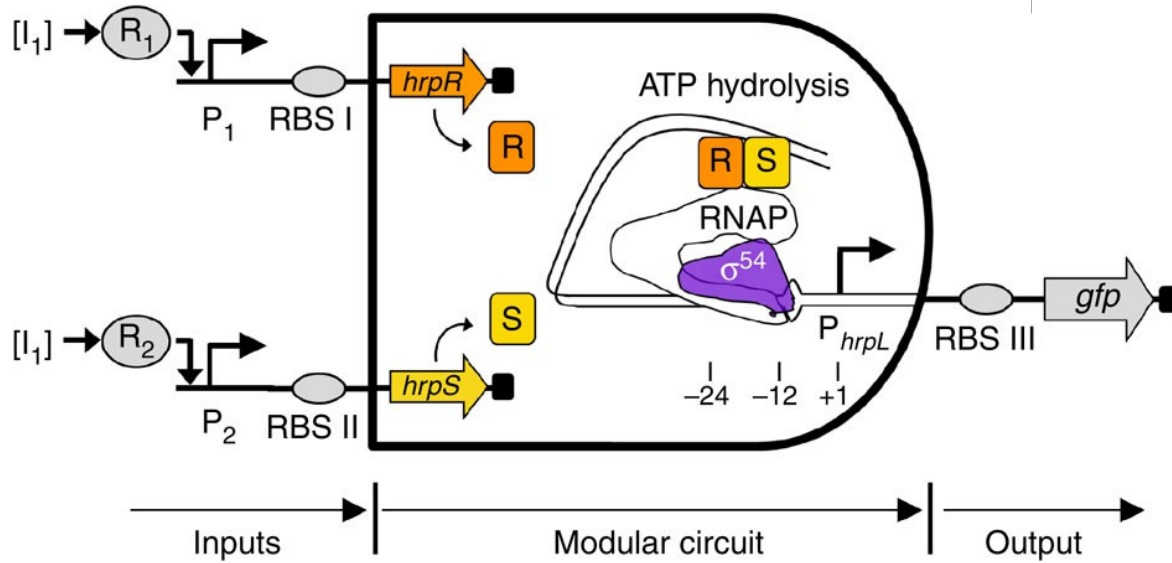
**a**





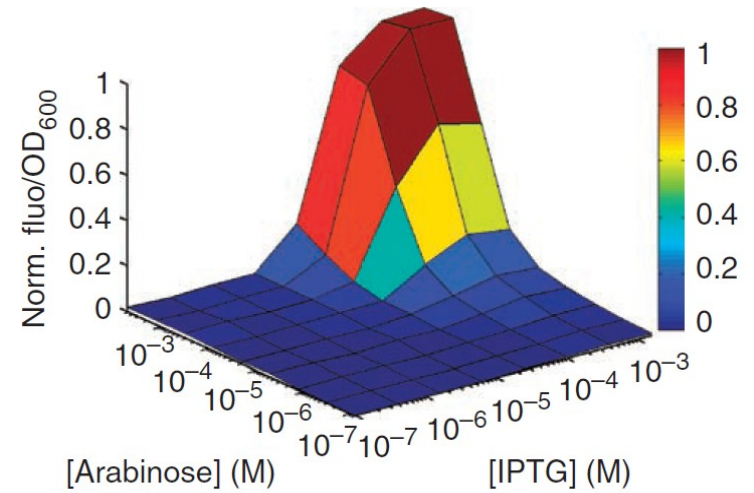
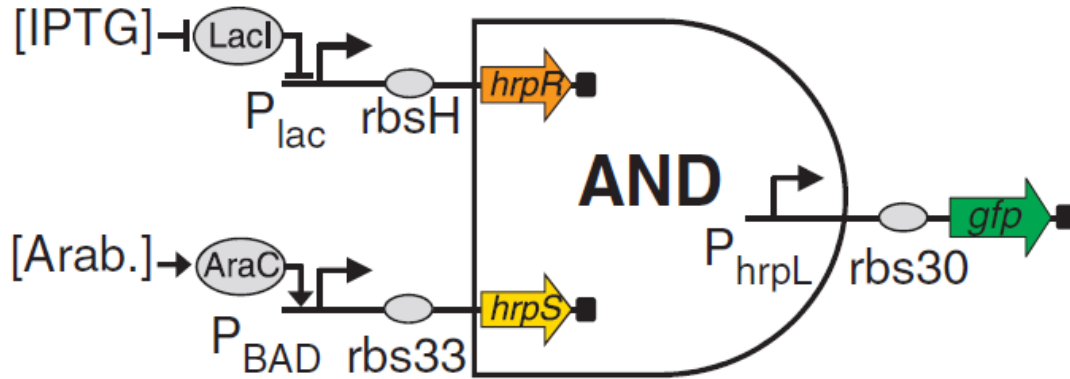
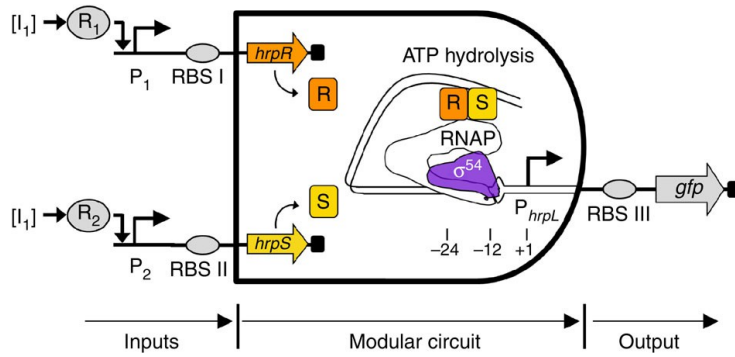
# Sinteznobiološka vrata IN



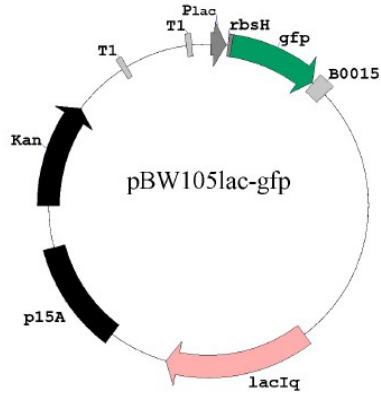


$I_1$	$I_2$	$P_{hrpL}$
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1

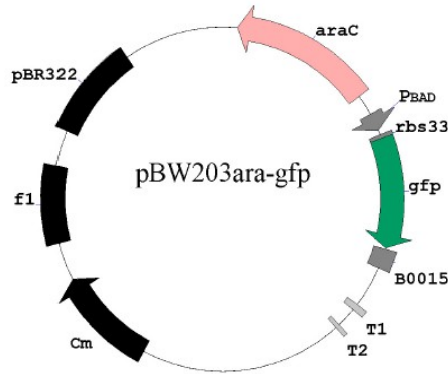
Logična vrata IN na osnovi heterodimernega aktivatorja HrpRS iz bakterije *Pseudomonas syringae*. Promotor *hrpL* je odvisen od faktorja sigma 54 (ne sigma 70), kar zagotavlja bolj natančno regulacijo izražanja (manj 'puščanja'). Izražanje vsake od podenot aktivatorja je pod kontrolo drugačnega promotorja, ki se odziva na snovi v okolju. Kot kaže pravilnostna tabela, se reporter izraža samo, ko se intenzivno izražata tako HrpR kot HrpS.



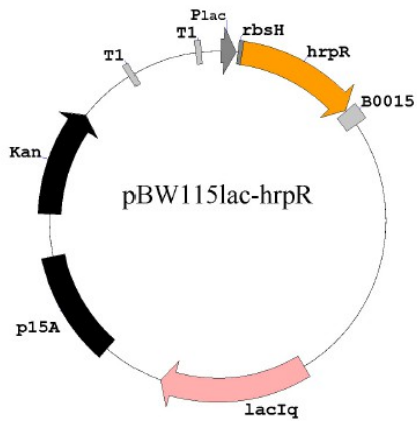
P<sub>lac</sub> input



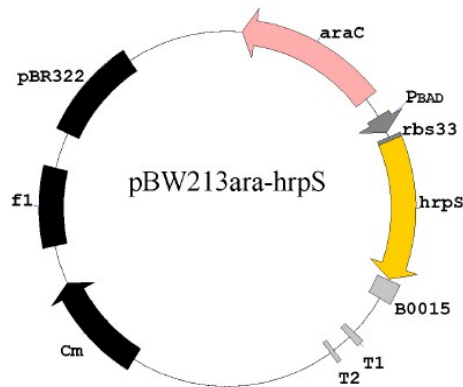
P<sub>BAD</sub> input



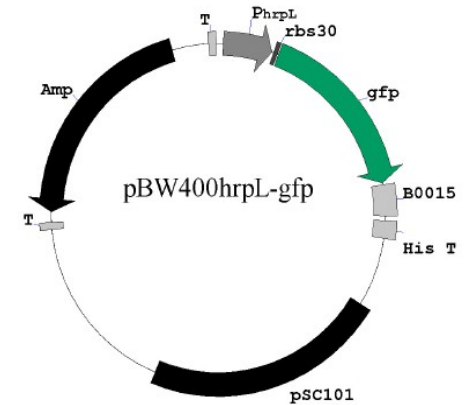
Input 1



Input 2



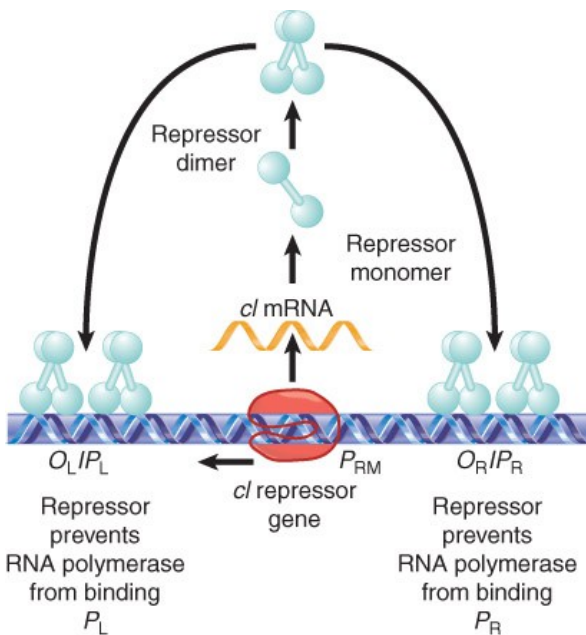
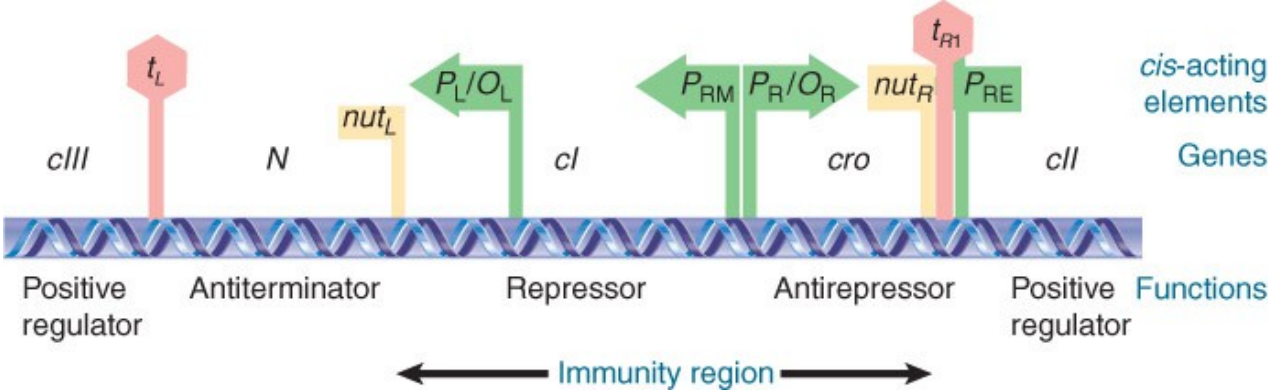
Output



Za izvedbo logičnih vrat je bilo najprej treba natančno opisati različne kombinacije promotor – rbs (uporaba ločenih reporterjev), potem pa sestavljanje naprave in testiranje, kakšna je odzivnost na posamezne induktorje in na kombinacijo obeh.

# LOGIČNA VRATA ,NE‘

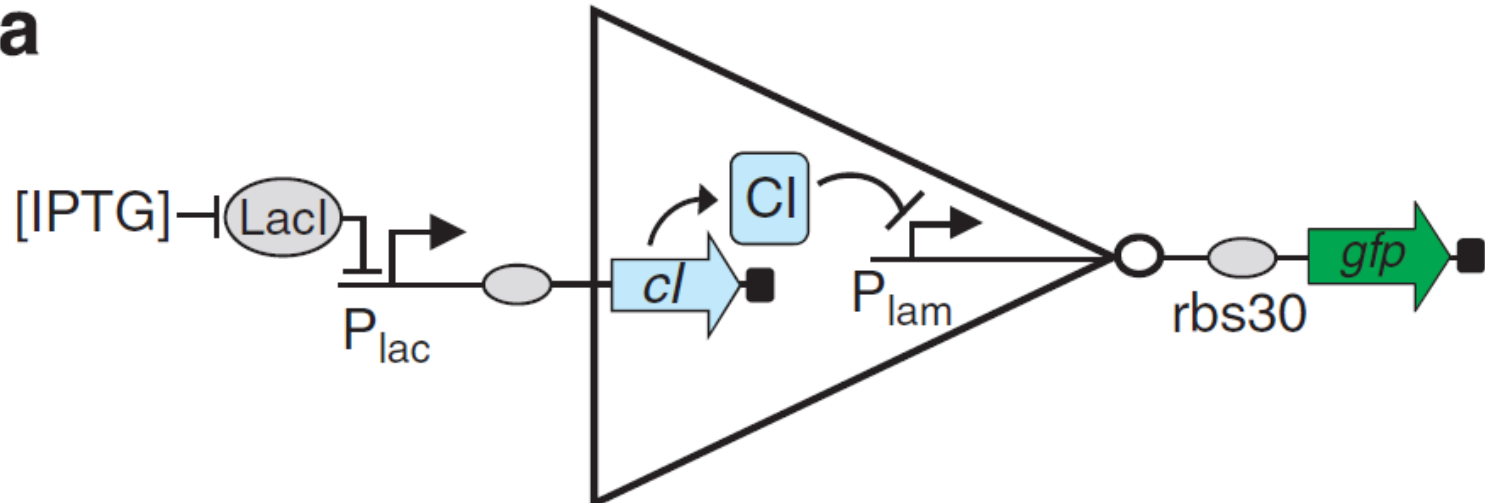
Izvedba, ki temelji na delovanju represorja *cl* iz faga lambda. Ta zagotavlja vztrajanje faga v lizogenem ciklu.



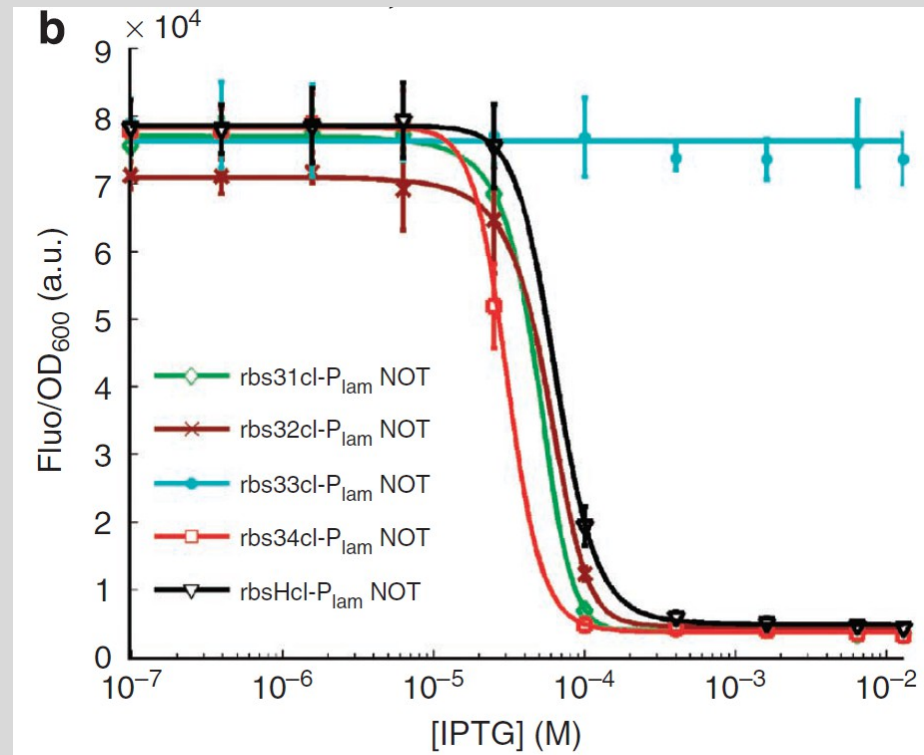
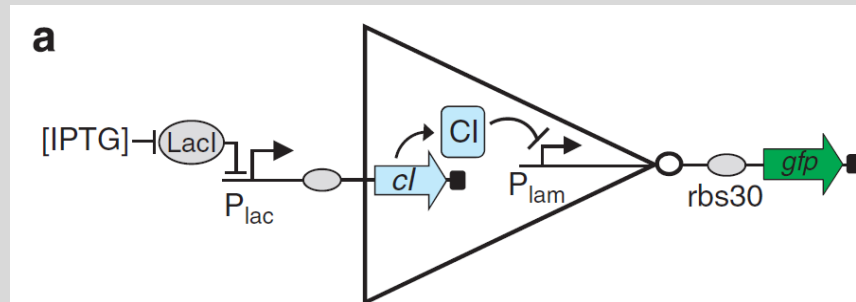


# LOGIČNA VRATA ,NE‘

a

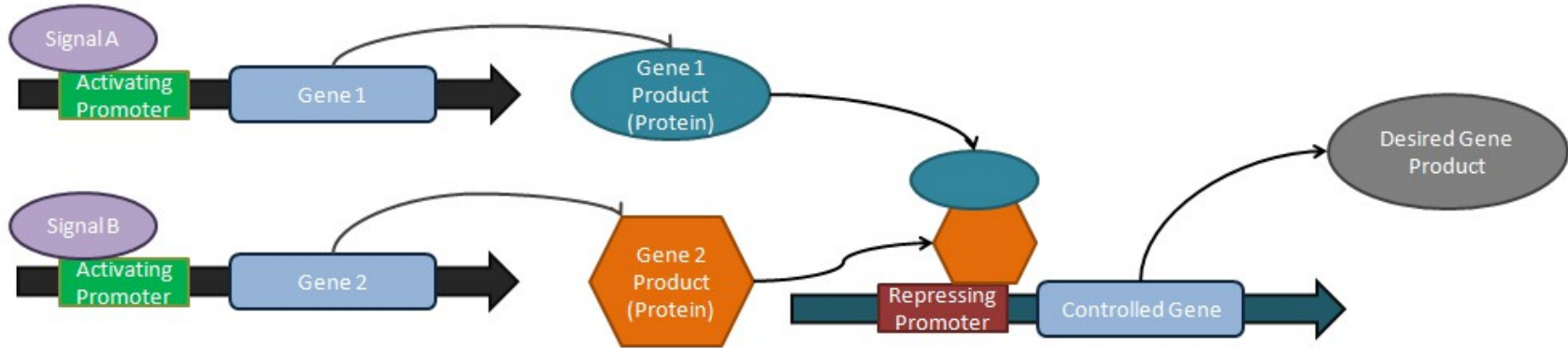


Z IPTG inducirajo izražanje represorja laktoznega promotorja, ta pa zavira laktozni promotor, ki so ga uporabili za uravnavanje izražanja lambda-represorja. Ta represor nato blokira lambda-promotor (PR) in do izražanja reporterja (GFP) ne pride. Vstopni signal je + (IPTG), izstopni pa – (GFP).

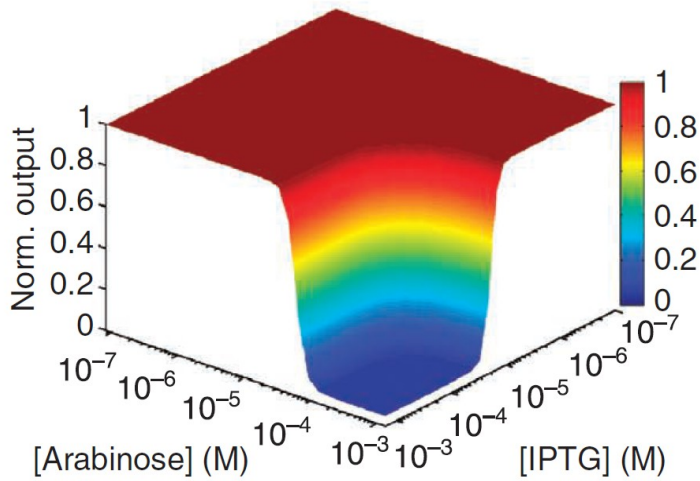
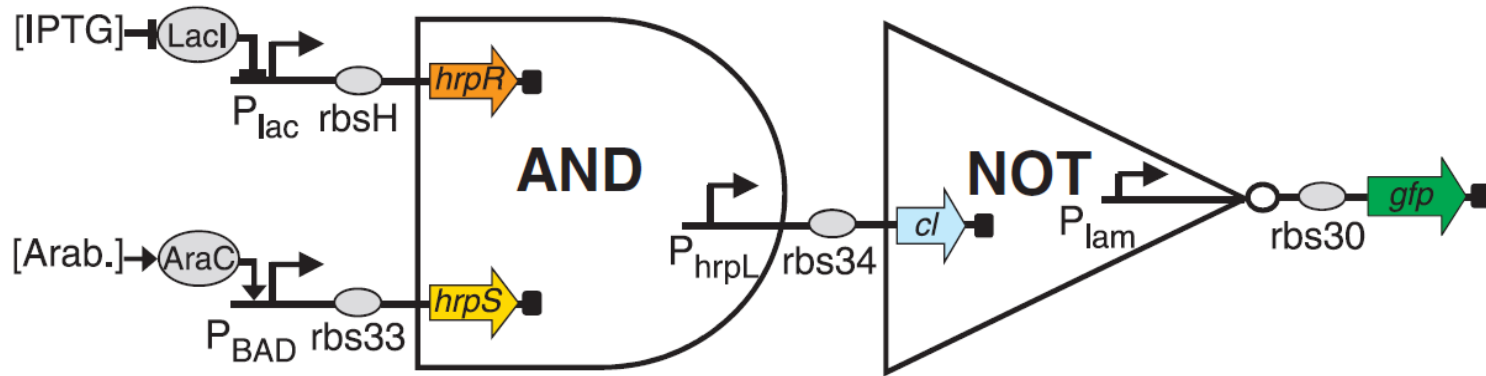


Preizkusili so 5 različnih RBS in preverjali odziv vrat pri različnih konc. induktorja. Sledila je povezava z vrati IN, s čimer so dobili vrata NE-IN (NAND).

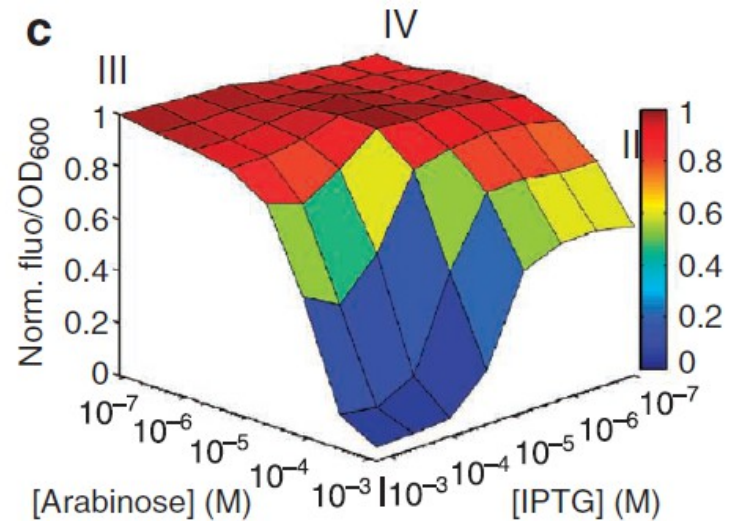
# Sinteznobiološka vrata NE-IN (NAND)



# LOGIČNA VRATA ,NE-IN‘

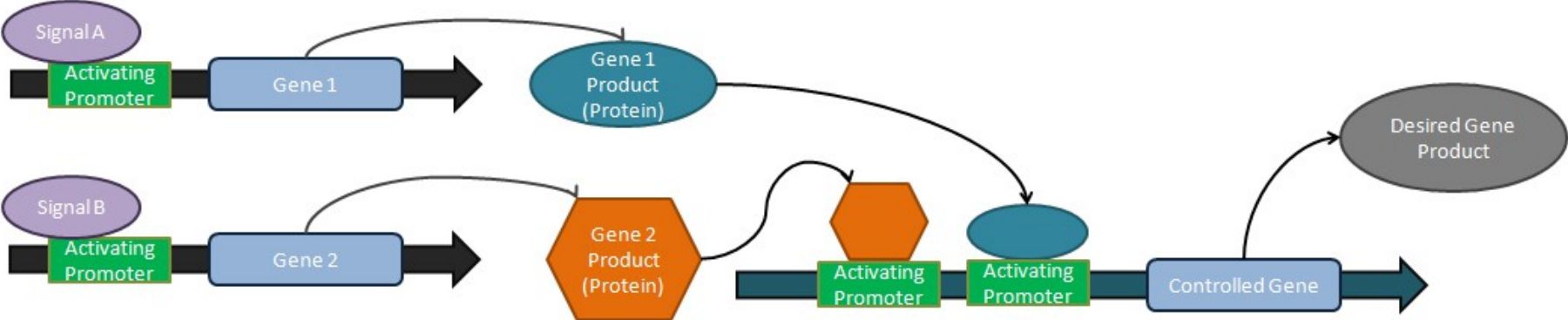


model



meritev

# Sinteznobiološka vrata ALI



Regulatory protein	Regulated promoters	Inducer
TetR	$P_{tet}, P_{LtetO}$	tetracycline
LacI	$P_{lac}, P_{lacO}, P_{trc}$	Lactose, IPTG
cI	$P_L, P_R, P_{RM}, P_{luxOR}$	
LuxR	$P_{lux}, P_{luxOR}$	AHL

# Transkripcijska aktivacija s tetraciklinom

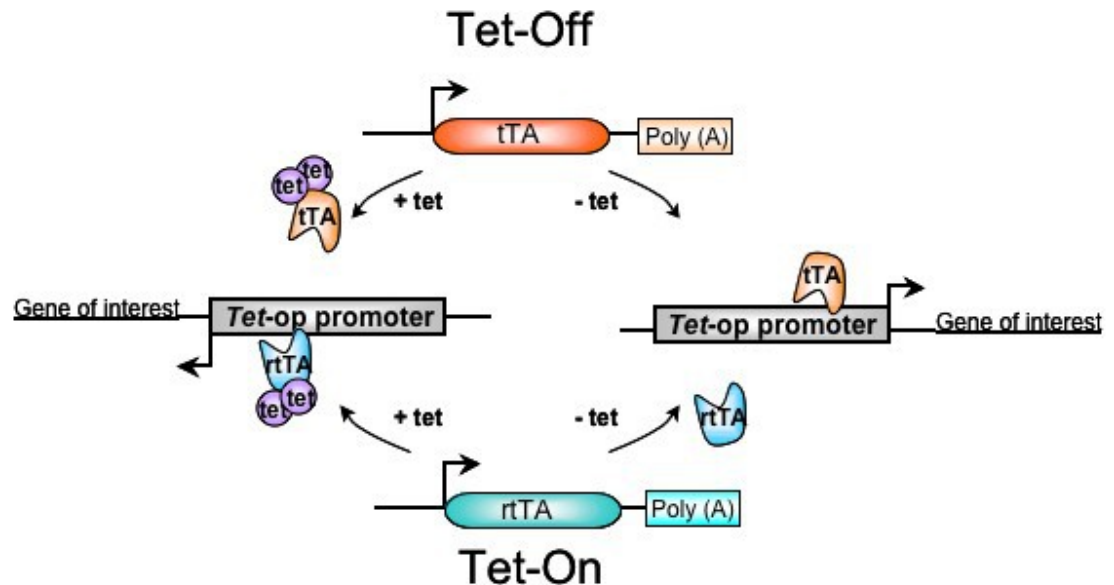
Uporabljajo jo predvsem pri transgenskih miših, kjer antibiotik tetraciklin (Tet) ali njegov stabilnejši analog doksiciklin (Dox) inducira izražanje genov pod kontrolo promotorja tet. V naravi promotor tet uravnava izražanje represorja TetR in črpalke TetA, ki prenaša tetraciklin iz celice. Kot princip regulacije lahko sistem uporabljamo tudi pri prokariotih.

## Sistem Tet-OFF

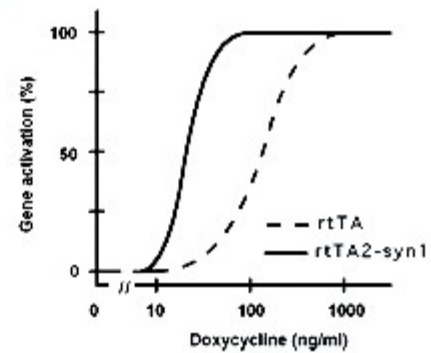
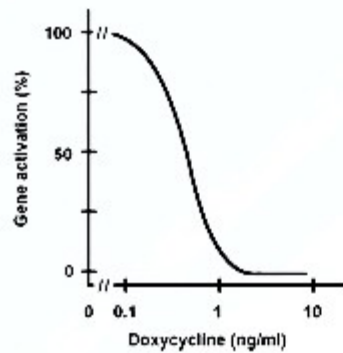
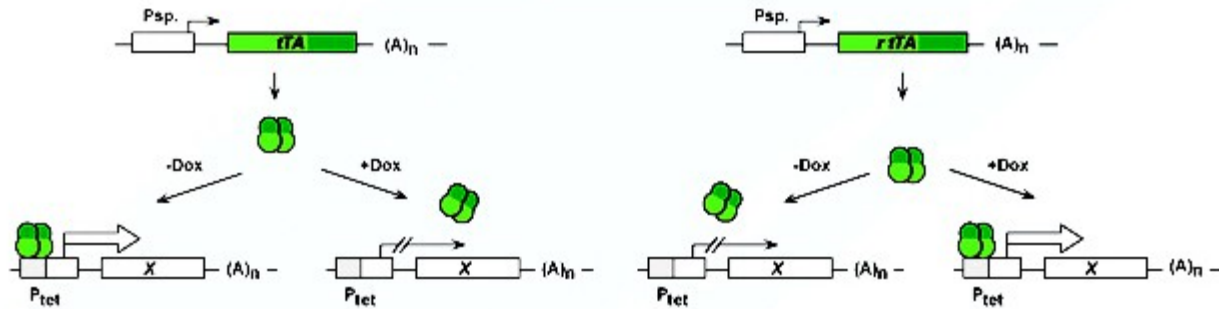
Sistem temelji na fuzijskem proteinu tetraciklinskem transaktivatorju (tTA), ki ga sestavljata TetR in aktivacijska domena proteina VP16 virusa *Herpes simplex*. tTA se veže na operatorska zaporedja, ki v kombinaciji z minimalnim promotorjem (npr. CMV) sestavljajo odzivni element za tetraciklin (TRE; 7x19 bp). Tetraciklin se veže na tTA, nastali kompleks pa se ne more več vezati na TRE, zato se izražanje zmanjša.

## Sistem Tet-ON

Ta sistem temelji na istih bioloških molekulah, a deluje nasprotno: tTA se veže na TRE samo, če je na tTA vezan Dox. To je možno, ker je tTA nekoliko drugačen (rtTA) – substitucija 4 ak.



## The Tet regulatory system



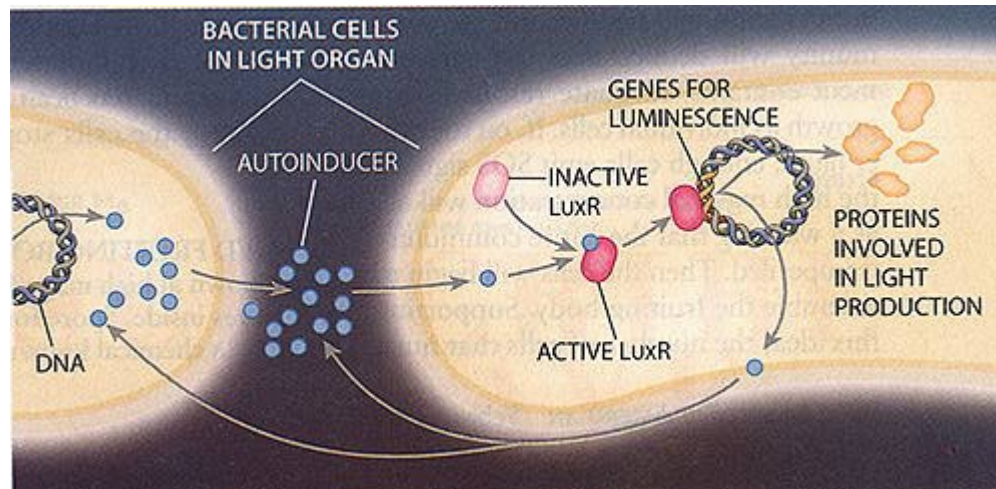


## Regulacija operona *lux*

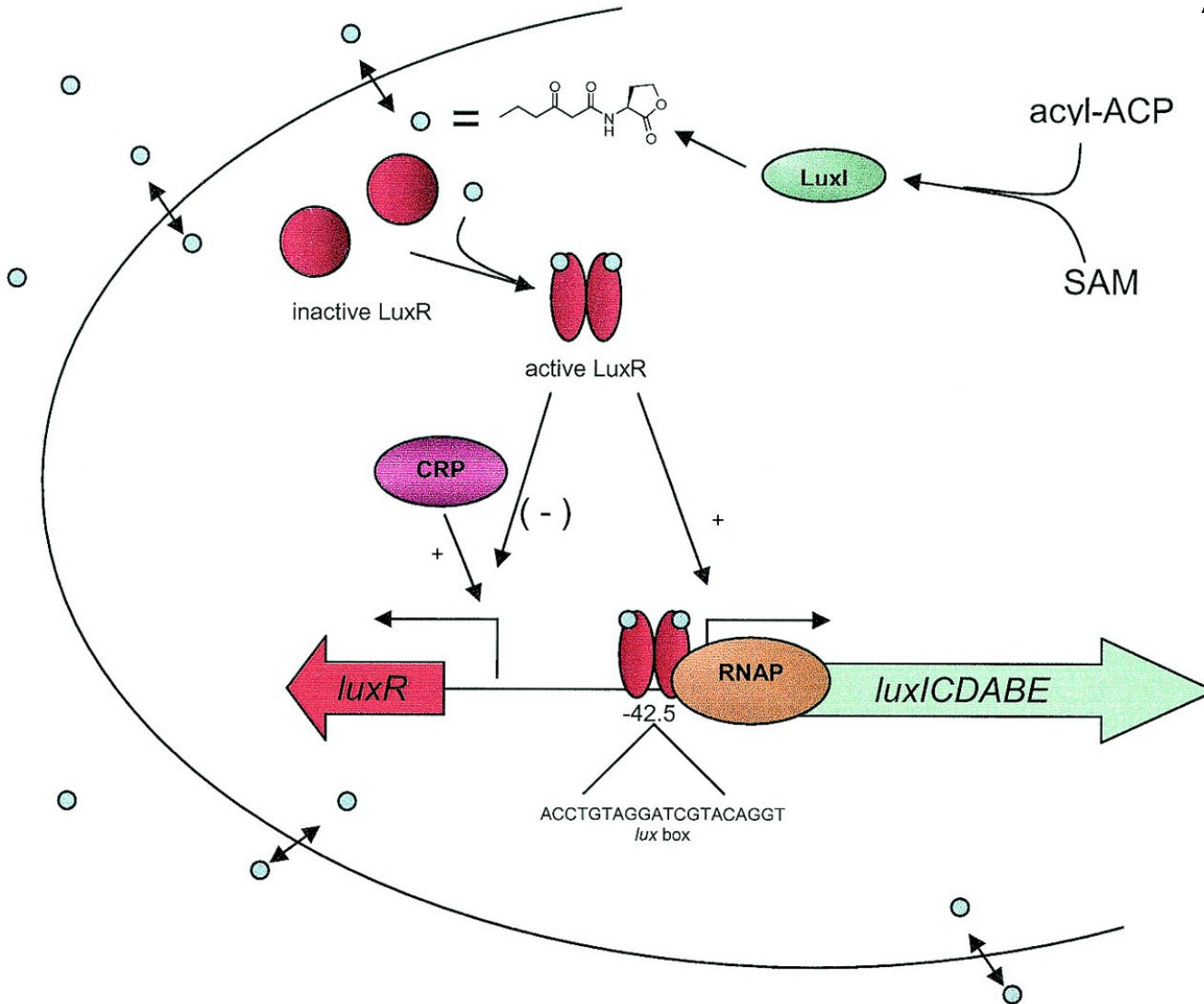
Pri *Vibrio fischeri* je operon *lux* odgovoren za sintezo bioluminiscenčnega proteina in se samostojno uravnava. Regulacija poteka preko prisotnosti/odsotnosti acilhomoserinlaktona (AHL), ključni proteinski regulator pa je transkripcijski aktivator LuxR.

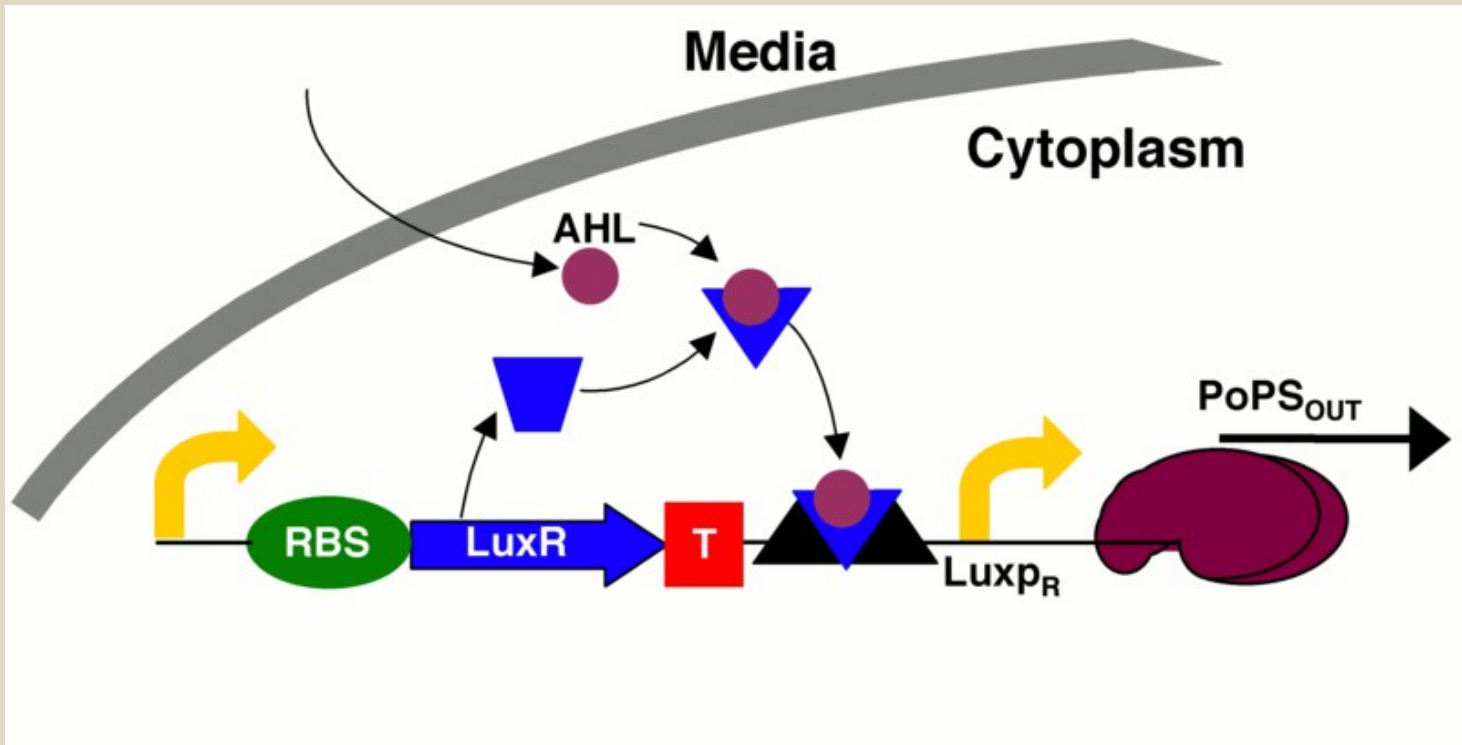
LuxR se izraža konstitutivno in ima vezavno mesto za AHL. V prisotnosti AHL (vsaj 10 nM) preko promotorja pLuxR (desni promotor) stimulira transkripcijo LuxI, to je AHL-sintaza, ki pretvarja S-adenozilmetionin (SAM) v AHL. Tako nastane pozitivna povratna zanka, vzporedno z *LucI* pa se poveča tudi sinteza luciferaze. Pri zelo visoki koncentraciji AHL deluje LuxR kot represor.

AHL pri nizkih koncentracijah deluje kot avtoinduktor, ker pa ga celice tudi izločajo, deluje kot signalna molekula za zaznavanje celične gostote (quorum sensing).



SAM...S-adenozilmetionin  
 ACP...acilprenašalni protein  
 CRP... receptorski protein za cAMP  
 AHL... acetilhomoserinlaktone





<http://parts.igem.org/File:Luxrreceiverschematic.png>