

Evolucijska sistemska biologija

Kocijan, Tin

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:154542>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI
FAKULTET BIOLOŠKI ODSJEK

Evolucijska sistemska biologija
Evolutionary Systems Biology
SEMINARSKI RAD

Tin Kocijan
Preddiplomski studij Biologija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Damjan Franjević

Zagreb, 2017.

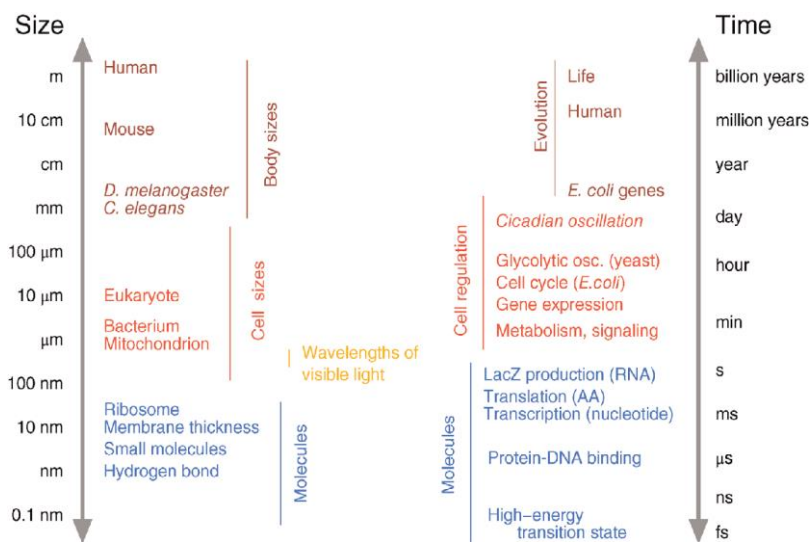
Sadržaj:

1. Uvod u sistemsku biologiju	3
2. Modeli i modeliranje	4
2.1 Matematičko modeliranje biokemijskih sustava	5
2.1.1. Pristupi modeliranju biokemijskih sustava	5
2.1.1.1. Modeli temeljeni na mrežama	6
2.1.1.2. Modeli temeljeni na pravilima	6
2.1.1.3. Statistički modeli	7
2.1.2. ODE sustav biokemijskih mreža	7
2.2. Strukturalno modeliranje i analiza biokemijskih mreža	8
2.2.1. Constraint-based reconstruction analysis (CoBRA) i flux balance analysis (FBA)	9
3. Mrežni motivi	10
3.1. Jednostavna genska regulacija i autoregulacija	12
3.1.1 Jednostavna genska regulacija	12
3.1.2. Autoregulacija	13
3.1.2.1. Negativna autoregulacija	13
3.1.2.2. Pozitivna autoregulacija	15
3.2. Feedforward loop i globalna struktura regulatorne genske mreže	16
3.2.1. Feedforward loop	16
3.2.2. Globalna struktura regulatorne mreže	19
3.3. Jedno-ulazni modul	20
4. Robusnost	22
5. Evolucija i optimalnost	23
5.1. Evolucija funkcija i modula	24
5.2. Evolucija modularnosti	24
6. Sažetak	25
7. Summary	25
8. Literatura	26

1. Uvod u sistemsku biologiju

Sistemska biologija mlada je znanstvena disciplina moderne biologije čija definicija lako podliježe pristupnom aspektu zbog njezine kompleksnosti i interdisciplinarnosti koja spaja mnogobrojna znanstvena područja. Zbog navedenog je sistemsku biologiju teško jednoznačno definirati. Kompleksnost definiranja sistemske biologije u biološkoj znanstvenoj zajednici najbolje predočava izjava znanstvenog pisca Christophera Wanjeka: „Upitajte pet astrofizičara da vam definiraju crnu rupu, i dobit ćete pet različitih odgovora. Upitajte pet sistemskih biologa da definiraju sistemsku biologiju i dobiti ćete deset različitih odgovora.“

„Sistemska biologija je znanstvena disciplina koja proučava sistemska svojstva i dinamičke interakcije u biološkim objektima, bili oni organizam, stanica, virus, ili zaraženi domaćin, u kvalitativnoj i kvantitativnoj naravi kombinirajući eksperimentalni pristup i matematičko modeliranje“ (Klipp i sur., 2016), a njezin cilj je opisati i shvatiti kompleksne biološke sustave koristeći dizajnerska načela koja ujedinjuju sustav u matematičkom okviru (Alon, 2006). Njezin brz razvoj u posljednjih desetak godina omogućile su pojave -OMICS tehnologija kao što su genomika, transkriptomika, proteomika i metabolomika (Stagljar, 2016). Opis bioloških entiteta i njihovih svojstava obuhvaća mnogobrojne razine biološke organizacije i različita vremenska mjerila. Sistemska biologija opisuje biološki fenomen na razini populacije, jedinice, organa, tkiva, stanice, i staničnih odjeljaka, sve do razine molekule i atoma (Slika 1.).



Slika 1. Veličina i vremenska mjerila u biologiji. (Preuzeto iz Klipp i sur., 2016)

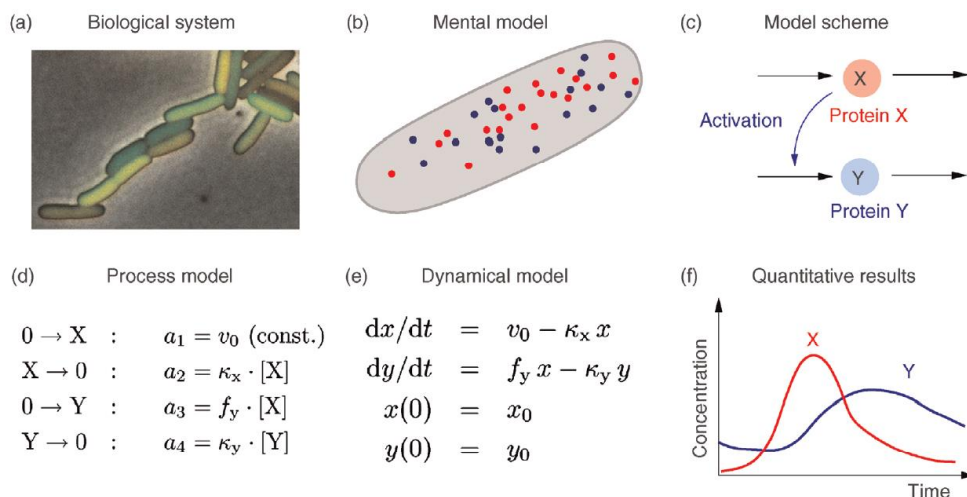
Paradigma systemske biologije očituje se holističkim pristupom u stanje proučavanog sistema (Palsson, 2015), što se nalazi na drugom kraju spektra i razlikuje se od analitičkog pristupa kojim se biološkom entitetu pristupa redukcionističkim metodama, rastavljanjem sustava na njegove osnovne komponente.

2. Modeli i modeliranje

Proučavanjem bioloških fenomena, znanstvenici se suočavaju s brojnim kompleksnim procesima koji često ne mogu biti objašnjeni na temelju osnovnih načela i čiji ishod ne može biti rezultat očekivanja intuicije. Usprkos tome što su opća biokemijska načela dobro utemeljena (npr. centralna dogma transkripcije i translacije, ili Michaelis-Mentenin model), biokemija individualnih komponenti i sustava ostaje nepoznata i uvelike varira između vrsta. Eksperimenti dovode do postavljanja bioloških hipoteza o zasebnim procesima, no često ostaje nejasno ukoliko te hipoteze mogu biti uklopljene u veće, koherentne sustave jer je teško predvidjeti njihovo kompleksno globalno ponašanje na temelju znanja o njihovim zasebnim komponentama. Matematičko modeliranje i računalne simulacije pomažu u razumijevanju prirode i dinamike istraživanih procesa i teže ka predviđanju budućeg razvoja i utjecaja interakcija koje dolaze iz okoliša. Dva su osnovna čimbenika koja određuju ponašanje sustava: a) utjecaji iz okoliša (ulazni signali) i b) procesi unutar sustava. Struktura sustava, odnosno odnosi njegovih varijabli, parametar, i konstanti, određuje kako su obrađene unutarnje ili vanjske sile. Dakako, različite sustavne strukture mogu rezultirati sličnim ponašanjem.

U najopćenitijem smislu, model je apstraktan prikaz objekta ili procesa koji objašnjavaju svojstva dotičnih objekata ili procesa (Slika 2.). Mreža biokemijskih reakcija može biti prikazana pomoću nacrtne skice koja prikazuje metabolite kao točke i strelice kao reakcije. Ista bi mreža mogla biti objasnjena koristeći diferencijalne jednačbe, koje omogućuju provođenje simulacije i predviđanje dinamike mreže. Ukoliko se model koristi za provođenje simulacija, potrebno je osigurati da model suštinski predvidi ponašanje sustava, u najmanju ruku, barem onih svojstava koja model treba pokriti. Modeli systemske biologije dobro su utemeljeni na fizikalnim zakonima koji objašnjavaju njihovu generalnu formu kao što je na primjer termodinamika biokemijskih reakcija. Pored toga, računalni modeli trebaju donijeti specifične odluke o sustavu od interesa, koje trebaju biti potvrđene eksperimentima i temeljene na biokemijskim spoznajama, a tek djelomice temeljena na ekstrapolaciji iz sustava. Takav model može sažeti utemeljeno znanje o

sustavu u koherentnoj matematičkoj formulaciji (Klipp i sur., 2016). U eksperimentalnoj biologiji, termin „model“ često se koristi kako bi se naznačila vrsta koja je posebice korisna za istraživanje, primjerice vinska mušica (*Drosophila melanogaster*) ili genetički modificirani miš koji može poslužiti za istraživanje ljudskih genskih poremećaja.



Slika 2. Shematski prikaz apstrakcijskih koraka matematičkog modeliranja (Preuzeto iz Klipp i su., 2016)

Valja imati na umu da je modeliranje subjektivan i selektivan proces. Model predstavlja samo određene aspekte stvarnosti, ali ukoliko se svrsishodno upotrebljava, to je dovoljno budući da je njegova namjera da odgovori na određeno pitanje. Ako je jedini cilj modela predvidjeti rezultat izlaska, na temelju ulaznih komponenti, model treba adekvatno predvidjeti ulazno-izlazne odnose (*input-output relations*), dok se ostatak sustava smatra „crnom kutijom“ (Klipp i sur., 2016 i Alon, 2006). Matematička komponenta modela može biti ostati jednostavna kako bi se omogućila lakša implementacija i rezultati koji se mogu sažeti, ili može biti izmodelirano kako bi se čim realnije predstavljala stvarnost, što onda korelira s kompleksnošću modela. Niti jedan od navedenih pristupa ne čini nužno model točnim ili pogrešnim, već određuju je li model prikladan. Izjava Georga Boxa najbolje prikazuje prirodu problema: „U suštini, svi modeli su krivi, ali neki su korisni.“

2.1 Matematičko modeliranje biokemijskih sustava

2.1.1. Pristupi modeliranju biokemijskih sustava

Kao što je već napomenuto, razumijevanje bioloških sustava nije izravan, jednoznačan proces, već zahtjeva njihovo topološko razumijevanje ili strukture. Uključuje analizu dinamičkog

ponašanja i kontrolnih mehanizama koji se izvršavaju u sustavu. Također, zahtjeva interpretaciju kako se u općenitom kontekstu odnose njegov izgled i uloga. Osnovna načela izrade matematičkog modela su slijedeća: Na koje pitanje bi model trebao dati dogovor? Je li osmišljen tako da može objasniti iznenadne opservacije? Je li konstruiran da objasni neovisna opažanja i rastumačih na temeljima postojećih znanja? Najčešće je glavna uloga modela stvaranje pretpostavki o intrinzičnim procesima koji mogu biti testirani. Jedino ako postoji formalan opis modela, mogu se dokazati njegovi formalni odnosi ili potući određene pretpostavke.

Budući da matematički model je biološkog sustava može opisati različite aspekte, pribjegava se korištenju različitih pristupa.

Prema Klipp i sur., 2016 postoje tri glavna tipa računalnih modela:

1. Modeli temeljeni na mrežama (*network-based models*)
2. Modeli temeljeni na pravilima (*rule-based models*)
3. Statistički modeli

2.1.1.1. Modeli temeljeni na mrežama

Modeli temeljeni na mrežama opisuju i analiziraju svojstva, stanja i dinamiku mreža, odnosno njihovih komponenti i interakcija između njih. Najčešće korišteni mrežno-centrirani modeli su a) sustavi običnih diferencijalnih jednadžbi (*ordinary differential equations*, ODE) za mreže biokemijskih interakcija, b) stohastički opisi biokemijskih reakcijskih mreža i drugih procesa koji uzrokuju promjenu stanja, c) booleanovi modeli za genske regulatorne mreže i d) model Petrijeve mreže za metaboličke mreže ili za tranzicije u kompleksnim sustavima.

2.1.1.2. Modeli temeljeni na pravilima

Modeli temeljeni na pravilima predstavljaju različite pristupe modeliranju bioloških fenomena, ali, naravno, i fenomenima u drugim područjima. U njima svaka komponenta sustava može utjecati na njegovo stanje prema određenom setu pravila. Na primjer, pravilo nalaze da se protein X fosforilira ako njegova kinaza Y aktivirana i njegov inhibitor Z nije prisutan. Model temeljen na pravilima navodi sve potencijalne stanja zasebne komponente, a ne sva potencijalne promijene.

2.1.1.3. Statistički modeli

U tzv. big data eri, prouzrokovanu eksplozijom –omics tehnologija, statistički modeli igraju izrazito važnu ulogu u sistemskoj biologiji, Statistički modeli utemeljuju odnose između izmjerenih podataka i omogućuju vođenje za ekstrakciju unutarnje strukture bioloških sustava iz kojih su izmjereni podaci dobiveni. Primjer je detekcija linearnih ili višelinearnih odnosa kao što su linearna regresija ili ANOVA.

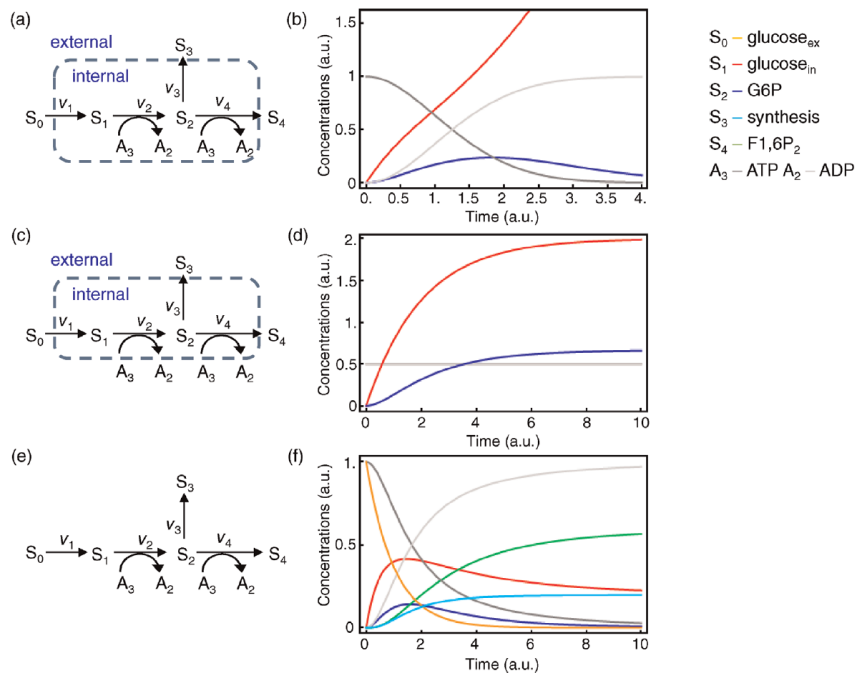
2.1.2. ODE sustav biokemijskih mreža

Osnovni podaci za dobivanje ODE modela za proučavanje mreža biokemijskih interakcija su a) da svi građevni blokovi trebaju biti spojevi i da sve reakcije pretvaraju spojeve jedan u drugi, o čemu govore stehiometrijski brojevi biokemijskih reakcija, b) osoba koja osmišljava model treba postaviti granicu sustava, odnosno odrediti koje komponente sustava će pratiti model, a komponente koje bi model trebao pratiti su one koje određuju i utječu na njegovo ponašanje, ali nisu promjenjive mijenjanjem njegove dinamike, c) svakoj reakciji koja je dio modela treba funkcijom biti pridružen zakon kinetike.

Ilustrativni primjer metaboličkog ODE modela je metabolička mreža prikazana na Slici 3 koja odgovara prvim koracima glikolize, glavnog metaboličkog puta iskorištavanja i inicijalnog fosforiliranja glukoze (Klipp i sur., 2007). Pretpostavimo da se van stanična glukoza naziva S_0 i njezina koncentracija S_0 . Unutar stanična glukoza S_1 , fosforilirana glukoza (glukoza-6-fosfat), S_2 , i fruktoza-1,6-bisfosfat, S_4 . Glukoza-6-fosfat isporučuje se uostalom biosintetske puteve stvarajući S_3 Fosforilacija se provodi kroz utrošak ATP molekule (A_3) i pretvara se u ADP (A_2).

Opis dinamike ove mreže može se izraziti nizom običnih diferencijalnih jednadžbi na slijedeći način:

$$\begin{aligned}\frac{dS_1}{dt} &= v_1 - v_2 \\ \frac{dS_2}{dt} &= v_2 - v_3 - v_4 \\ \frac{dA_2}{dt} &= -\frac{dA_3}{dt} = v_2 + v_4\end{aligned}$$


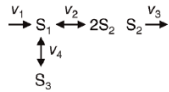
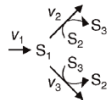
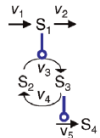


Slika 3. Primjer metaboličkog modela pomoću običnih diferencijalnih jednadžbi (Preuzeto iz Klipp i sur., 2016)

2.2. Strukturalno modeliranje i analiza biokemijskih mreža

Osnovni elementi modela metaboličke ili regulatorne mreže kemijski spojevi sa svojim koncentracijama i aktivnošću, i reakcijski ili transportni procesi koji mijenjaju i utječu na koncentraciju i aktivnost spojeva. U biološkom okolišu, reakcije su katalizirane enzimima, a transportne procese izvršavaju transportni proteini ili pore, te mogu biti pripisani određenom biokemijskom spoju.

Razlika između spojeva i reakcije koje ih pretvaraju rezultiraju opisom metaboličkih mreža kroz bipartitne grafove gdje spojevi jedan tip čvora, a reakcije koje ih pretvaraju drugi tip čvora. Kompaktni prikaz takvih mreža je stehiometrijska matrica (Klipp i sur., 2007) (Slika 4.). Ukoliko se mreža nalazi u stacionarnom stanju, iz nje se mogu derivirati odnosi između tokova koji su u skladu s pretpostavkom o stacionarnom stanju.

	Network	Stoichiometric matrix	ODE system
N1	$S_1 + S_2 + S_3 \xrightarrow{v_1} S_4 + 2S_5$	$N = \begin{pmatrix} -1 \\ -1 \\ -1 \\ 1 \\ 2 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = \frac{dS_2}{dt} = \frac{dS_3}{dt} = -v_1$ $\frac{dS_4}{dt} = v_1$ $\frac{dS_5}{dt} = 2v_1$
N2	$v_1 \rightarrow S_1 \xrightarrow{v_2} S_2 \xrightarrow{v_3} S_3 \xrightarrow{v_4} S_4 \xrightarrow{v_5}$	$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2$ $\frac{dS_2}{dt} = v_2 - v_3$ $\frac{dS_3}{dt} = v_3 - v_4$ $\frac{dS_4}{dt} = v_4 - v_5$ $\frac{dS_5}{dt} = v_5$
N3		$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & -1 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2 - v_3 - v_4$
N4		$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2 - v_4$ $\frac{dS_2}{dt} = 2v_2 - v_3$ $\frac{dS_3}{dt} = v_4$
N5		$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & 1 \\ 0 & 1 & -1 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2 - v_4$ $\frac{dS_2}{dt} = -v_2 + v_3$ $\frac{dS_3}{dt} = v_2 - v_3$
N6		$N = \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$\frac{dS_1}{dt} = v_1 - v_2$ $\frac{dS_2}{dt} = v_4 - v_3$ $\frac{dS_3}{dt} = -v_4 + v_3$ $\frac{dS_4}{dt} = v_5$

Slika 4. Različite mreže reakcija, njihove stehiometrijske matrice te pripadni sustav ODE (Preuzeto iz Klipp i sur., 2016).

2.2.1. Constraint-based reconstruction analysis (CoBRA) i flux balance analysis (FBA)

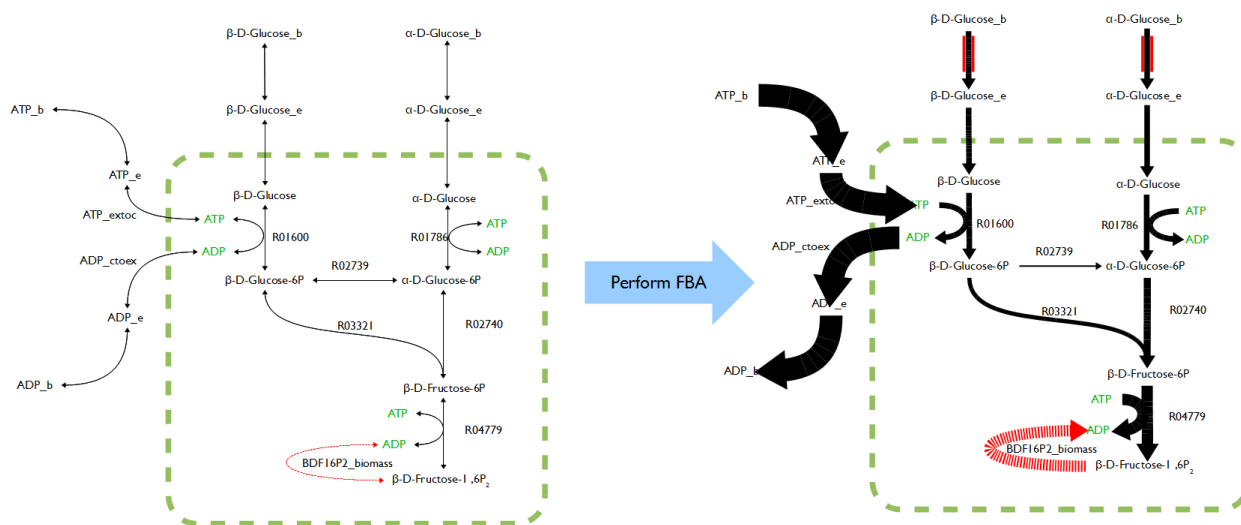
Skup metoda u fluksomici opisuje se kao Constraint-based reconstruction analysis (CoBRA). Iako metabolički tok može biti mjereno indirektnim metodama, on je ključna poveznica između gena, proteina i opaženog fenotipa (Palsson, 2015).

Flux balance analysis (FBA) je glavna matematička metoda za simulaciju metabolizma na rekonstruiranim metaboličkim mrežama na genomske skali (Palsson, 2000). Temelji se na:

- pretpostavljenom stacionarnom stanju
- ograničenjima izvedenih iz fizikalnih, kemijskih i ostalih relevantnih pretpostavki
- funkcioniranju proučavanog objekta kao što je brz rast mikroba

koje pojedinačnik može izvesti razumnu distribuciju tokova kroz čitavu mrežu. FBA istražuje teoretske sposobnosti i načine metabolizma testirajući ga s brojnim ograničenjima toka metaboličke distribucije.

Optimizacijske metode toka ne opisuju *kako* se ostvaruje određeni tok (kroz kinetiku ili regulaciju enzima), *koja* distribucija toka je najpovoljnija za sustav. Primjer za to je dopremanje najveće stope sinteze biomase na ograničen prtok nutrijenata izvana. To dozvoljava znanstvenicima predviđanje distribucije toka bez potrebe za kinetičkim opisima (Palsson i Reed, 2006; Thiele i Palsson, 2010). Iz samog genoma jedinke, teško je predvidjeti njezinu metaboličku mrežu, ali iako se ne zna apsolutno ništa o enzimskoj kinetici, može se dokučiti koje metabolite mreža može sintetizirati i koji su prekursori potrebni za proizvodnju biomase (Slika 5). Znajući broj nutrijenata, i hipotetske optimalne uvijete, za na primjer brzu produkciju biomase, može se predvidjeti optimalna distribucija toka u mreži (Klipp i sur., 2016).



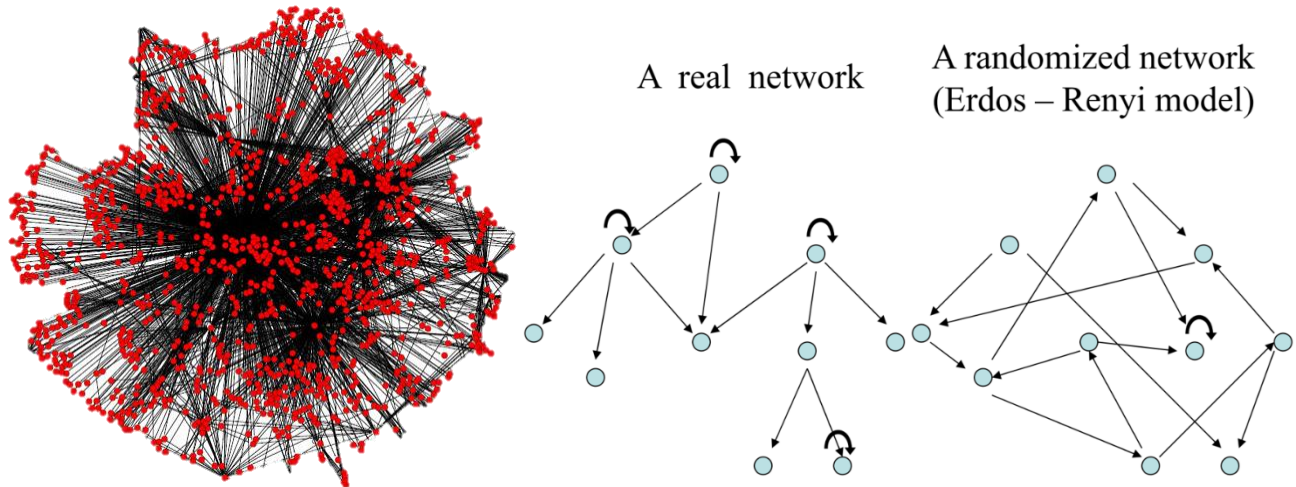
Slika 5. Prvih šest koraka glikolize prikazanih koristeći FBA metodu (Autor: Thomas Forth).

3. Mrežni motivi

Genska regulatorna mreža organizma *Escherichia coli* sadrži oko 4000 kodirajućih gena za transkripcijske faktore koji su u međusobnoj interakciji. Slika 2. prikazuje transkripcijsku regulatornu mrežu (*transcription regulatory network*, TRN) *E. coli* koja se sastoji od mnoštva crvenih točaka koje predstavljaju proteine (transkripcijske faktore), dok crne linije predstavljaju interakciju određene komponente s drugom ili nekoliko ostalih komponenti.

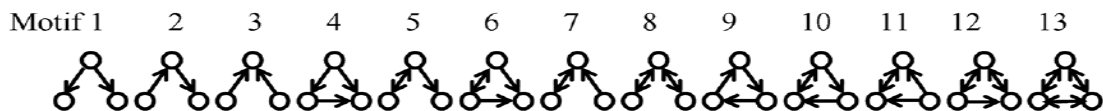
Svaka (regulatorna) mreža sastoji se od čvorova (*nodes*), na Slici 6. prikazanih kao transkripcijski faktori (crvene točke), dok se svaka interakcija naziva strelicom (*arrows*), na Slici 2. prikazana kao tamna linija (Shen-Orr i sur., 2002). Jedan od načina pristupanja analizi takve mreže jest njeno rastavljanje na proizvoljno male sastavne dijelove te određivanje standardne

devijacije značajnosti odstupanja njihove frekvencije od one koja se očekuje za danu vrstu interakcije navedenih dijelova u nasumičnoj mreži iste veličine (Slika 6). Nasumična mreža (znana kao Erdos-Renyi model) je ona mreža u kojoj se pretpostavlja da svaki čvor beskonačno mnogo puta može potencijalno ostvariti interakciju s bilo kojom drugom komponentom sustava (Alon, 2006).



Slika 6. Genska regulatorna mreža organizma *Escherichia coli* i shematski prikaz genske mreže i nasumične mreže (Preuzeto iz Salgado i sur., 2006)

Uri Alon i njegov tim znanstvenika su odlučili analizirati TRN *E. coli* na način da su proučavali sve moguće interakcije koje se mogu ostvariti između tri gena (Slika 7.). Analizom frekvencija pojavljivanja interakcija uočeno je da se određeni tipovi interakcija pojavljuju u TRN mnogo češće nego što je to očekivano u nasumičnoj mreži, što nalaže njihovu važnost s evolucijskog aspekta. Takvi obrasci međusobne povezanosti više gena koji se pojavljuje u regulatorijskoj mreži frekvencijom mnogo većom od očekivane u nasumičnim mrežama nazvani su mrežnim motivima. Mrežni motivi pomažu u razumijevanju mreža s gustim interakcijama u viših organizama (Alon, 2002).



Slika 7. Trinaest pretpostavljenih oblika interakcija između tri gena (Preuzeto iz Alon, 2007)

Više o mrežnim motivima u TRN *E. coli* biti će riječi u sekciji 3.2. te se nadalje okrećemo pregledu vrsta mrežnih interakcija koje se pronalaze u biološkim sistemima. Pregled

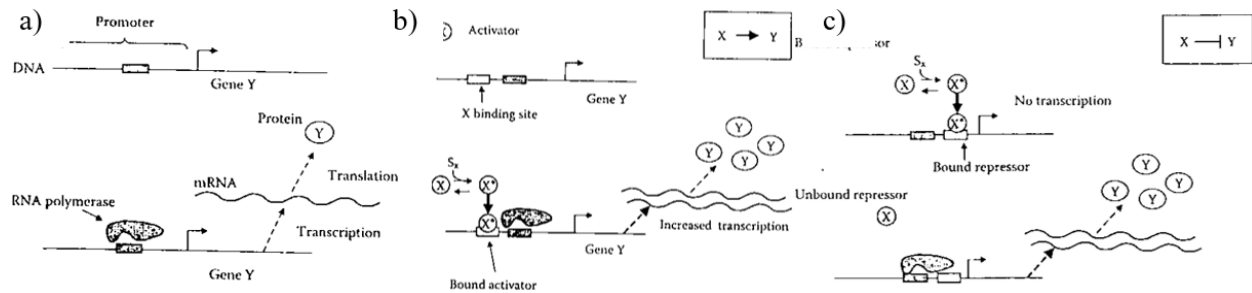
će se sastojati od motiva kategoriziranih prema kompleksnosti počevši od najjednostavnijih prema složenijima. Obradit će se tri velike obitelji mrežni motivi: jednostavna genska regulacija (*simple gene regulation*) i autoregulacija (*autoregulation*), feedforward loop (FFL) i jedno-ulazni modul (*single input module*).

Važno je napomenuti da svaki od navedenih motiva nosi specifičnu ulogu u procesiranju informacije (signala), da su te uloge analizirane koristeći matematičke modele modeliranje i testirane su dinamičkim eksperimentima u živim stanicama.

3.1. Jednostavna genska regulacija i autoregulacija

3.1.1 Jednostavna genska regulacija

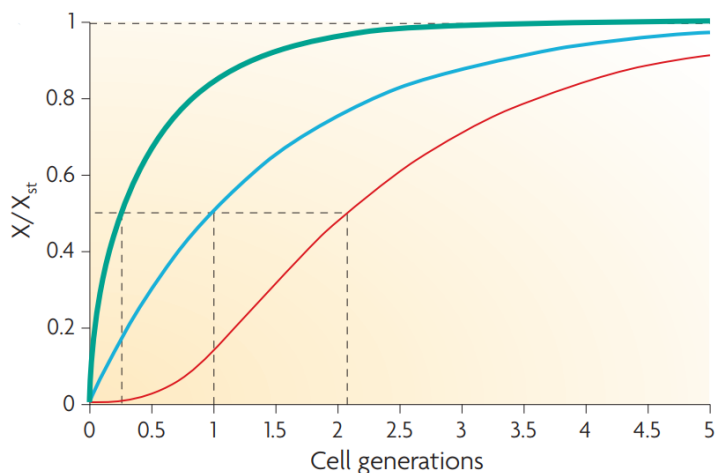
Jednostavna genska regulacija (*simple gene regulation*), je mrežni motiv koji suštinski predstavlja jednu strelicu unutar mreže i može poslužiti kao referenca za razumijevanje dinamičkog funkcioniranja mrežnih motiva. Do jednostavne genske regulacije dolazi kada transkripcijski faktor Y regulira gen X bez ostvarivanja dodatnih interakcija (Slika 8a). Y se aktivira signalom S_y koji može utjecati kao induktorska molekula na vezanje Y , ili na njegovu modifikaciju kroz kaskadu provođenja signala. Transkripcijski faktor Y može imati dvojaki utjecaj na produkt gena X , odnosno može povećati (Slika 8b) ili smanjiti (Slika 8c) njegovu koncentraciju.



Slika 8. (a) Model vezanja transkripcijskog faktora Y na gen X pod utjecajem signala S_y i dvojaki utjecaj transkripcijskog faktora na koncentraciju genskog produkta povećanjem (b) ili smanjenjem (c) njegove koncentracije

Početak transkripcije koncentracija produkta gena X raste i konvergira do nivoa stacionarnog stanja (*steady-state*) (Alon, 2002; Alon, 2007; Klipp i sur. 2016) (Slika 9). Nivo stacionarnog stanja jednak je omjeru stope sinteze i stope degradacije proteina, gdje degradacija uključuje aktivnu degradaciju produkta i efekt razrjeđenja uzrokovanog rastom stanice. Kada se sinteza terminira, koncentracija genskog produkta eksponencijalno opada. U oba slučaja vrijeme

odziva (*response time*), definirano kao potrebno vrijeme da se dosegne polovica vrijednosti konačne koncentracije, jednako je vremenu poluživota genskog produkta (Rosenfeld i sur., 2002). Što je brža stopa degradacije, kraće je vrijeme odziva. Za proteine koji se ne degradiraju aktivno, što je slučaj većinu proteina u bakterijskoj stanici, vrijeme odziva je jedno generacijsko vrijeme (Slika 9.) te je direktan rezultat efekta razrjeđenja prouzrokovanog rastom stanice (Davidson, 2006).



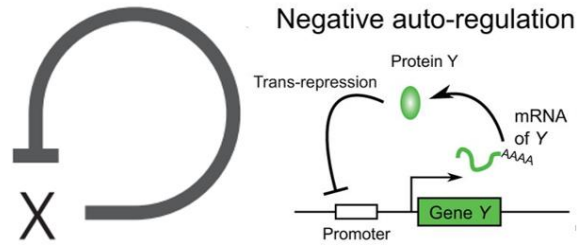
Slika 9. Korelacija vremena odziva u ovisnosti o stacionarnom stanju (plava linija predstavlja jednostavnu gensku regulaciju, zelena NAR i crvena PAR) (Preuzeto iz Alon, 2007)

3.1.2. Autoregulacija

Autoregulacija (*autoregulation, autogenous regulation*) je naziv za motiv unutar mreže kada je gen reguliran vlastitim produktom te može biti negativna (produkt inhibira ekspresiju gena) ili pozitivna (gen potiče ekspresiju vlastitog gena) (Alon, 2007)

3.1.2.1. Negativna autoregulacija

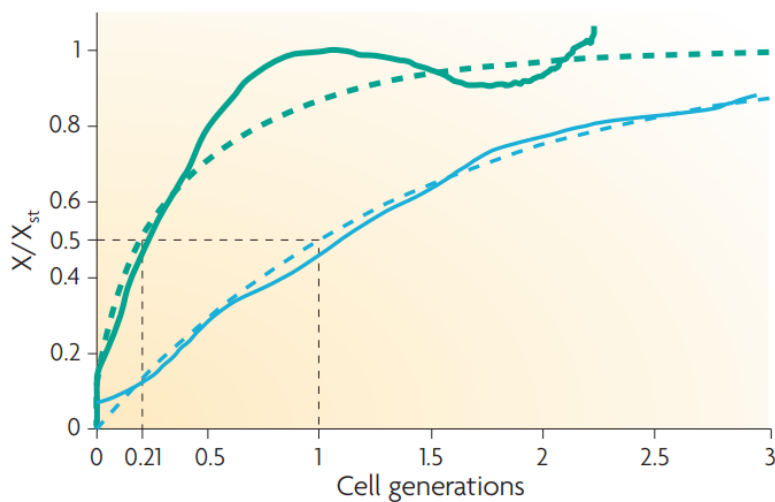
Negativna autoregulacija (*negative autoregulation, NAR*) je mrežni motiv koji se javlja kada transkripcijski faktor suprimira ekspresiju vlastitog gena vezujući se na promotorsku regiju (Savageau, 1974) (Slika 10.). NAR je učestali mrežni motiv koji se javlja u modelu djelovanja oko polovice transkripcijskih faktora *E. coli* (Thieffry i sur, 1998; Davidson, 2006) i eukariotskih represora (Lee, 2002). NAR ima dvije važne uloge: ubrzava vrijeme odziva i reducira međustanične varijacije u koncentracijama proteina.



Slika 10. Simbol negativne autoregulacije i shematski prikaz modela NAR-a (Preuzeto iz Isomura i Kageyama, 2014)

NAR ubrzava vrijeme odziva genskih krugova (Slika 9.) tako da NAR koristi jaki promotorski slijed kako bi se ostvario brzi početni rast koncentracije proteina. Kada koncentracija prijeđe supresijski prag za vlastiti promotor, sinteza genskog produkta opada (Becskei i Serrano, 2000). Dakle, koncentracija proteina osigurava da stacionarno stanje bude u približnoj razini supresijskog praga. Razina stacionarnog stanja može biti prilagođavana kroz evolucijski period kroz mutacije koje uzrokuju varijacije u supresorskom pragu proteina za vlastiti promotorski slijed.

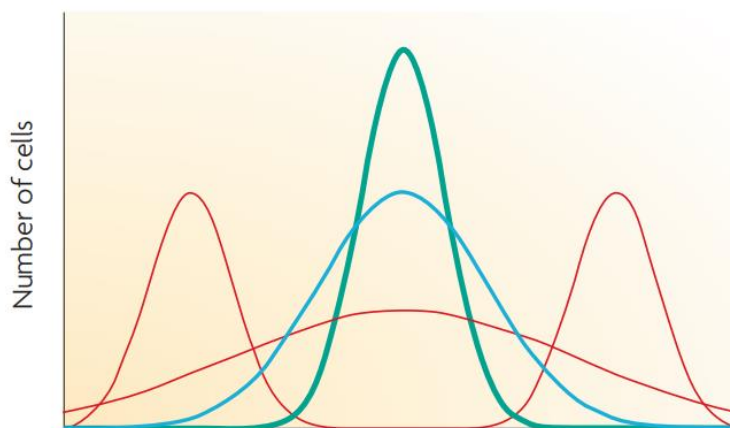
Usporedno s jednostavnom genskom regulacijom, gen koji takvom interakcijom doseže jednako stacionarno stanje treba koristiti slabiji promotor. Rezultat razlika jest da NAR 50% stacionarnog stanja u mnogo kraćem periodu nego gen reguliran jednostavnom genskom regulacijom. Dinamika NAR-a pokazuje brzo početno povećanje koncentracije nakon koje slijedi iznenadno zaključavanje u stacionarno stanje, najčešće popraćenih prigušnim oscilacijama ili prelaskom stacionarnog stanja (Alon, 2007) (Slika 11.).



Slika 11. Usporedba brzine doseganja polovice stacionarnog stanja u NAR (zeleno) i jednostavne genske regulacije

(plavo). Kod NAR-a se nakon brzog početnog rasta uočava preljetanje preko stacionarnog stanja popraćeno prigušenim oscilacijama (Preuzeto iz Alon, 2007)

Pored ubrzavanja vremena odziva, druga važna uloga NAR-a je redukcija proteinskih u međustaničnim varijacijama. Pojavu varijacija može uzrokovati inherentan izvor pozadinskog šuma zbog kojeg stope sinteze proteina fluktuiraju u razmjerima i do 10% (Kærn i sur., 2005). Uzrok šuma su međustanične varijacije u koncentracijama proteina. NAR može reducirati takve varijacije – visoke koncentracije produkta dovode do smanjenja stope vlastite sinteze, dok niske koncentracije uzrokuju njezin rast. Rezultat takve regulacije je uža distribucija proteinske koncentracije od one kakva se javlja u jednostavnoj genskoj regulaciji (Becskei i Serrano, 2000; Camas i sur., 2006; Dublanche i sur. 2005) (Slika 12.). Nadalje, važno je za napomenuti da ako NAR povratna sprema posjeduje dugačak period odgode uzrokuje amplifikaciju šuma.

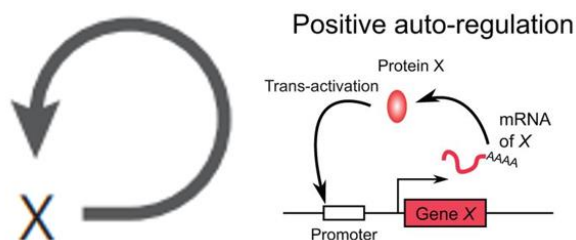


Slika 12. Distribucije proteinskih koncentracija u NAR-u (zeleno), PAR-u (crveno) i jednostavnoj genskoj regulaciji (plavo) (Preuzeto iz Alon, 2007)

3.1.2.2. Pozitivna autoregulacija

Pozitivna autoregulacija (*positive autoregulation*, PAR) pojavljuje se kada transkripcijski faktor djeluje kao pojačivač na stopu vlastite sinteze (Slika 13.). Posljedice PAR-a su u antagonističnom odnosu s NAR-om, odnosno vrijeme odziva je sporo i varijacije u koncentracijama proteina su izraženije. PAR usporava vrijeme odziva jer u ranim stadijima, kada je koncentracija proteina niska, sinteza je također spora. Sinteza raste tek kada se koncentracija proteina približi aktivacijskom pragu za vlastiti promotor, a to uzrokuje da se stacionarno stanje doseže u obliku krivulje u obliku slova „S“ (Slika 9.). Eksperimentalno (Maeda i Sano, 2006) i teoretski (Kalir i sur., 2005) je dokazano da je vrijeme odziva duže i u odnosu na jednostavnu

gensku regulaciju.



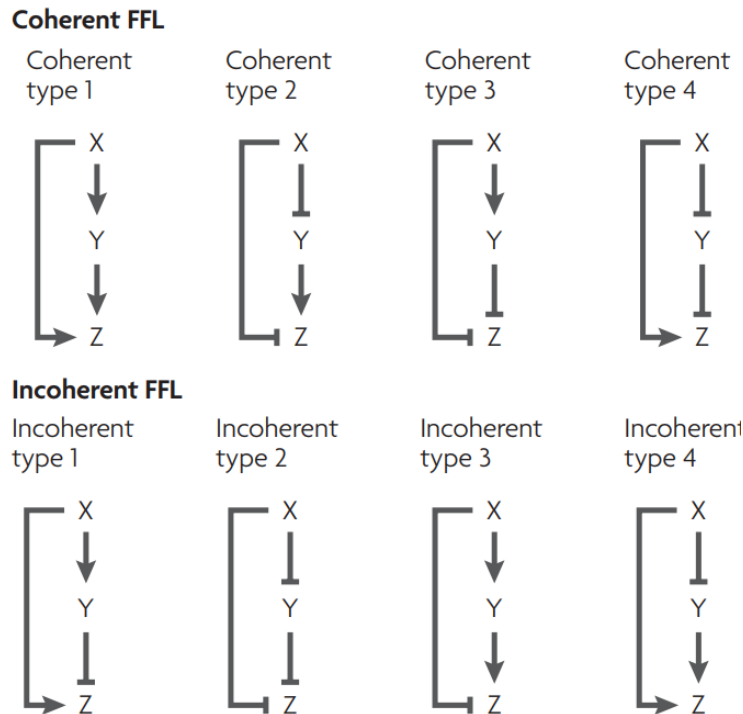
Slika 13. Simbol pozitivne autoregulacije i shematski prikaz modela PAR-a (Preuzeto iz Isomura i Kageyama, 2014)

Tendencija PAR-a je da povećava međustaničnu varijabilnost. Ako je utjecaj PAR-a slab, odnosno produkt povremeno pojavama vlastitu stopu sinteze, međustanična distribucija proteina očekivano će biti šira, čak i usporedbi s jednostavnom genskom regulacijom (Slika 12.). Jak utjecaj PAR-a dovodi do bimodalne distribucije (*bimodal distribution*) čime dovodi do efekta da je koncentracija proteina viša u jednim, a manja u drugim stanicama. Stanice u kojima je koncentracija visoka, protein aktivira vlastitu sintezu i neodređen period je drži na visokoj razini. Jak signal PAR-a stoga dovodi do razdvajanja dviju populacija stanica na način vrlo sličan diferencijaciji. Ponekad PAR može biti korišten kao memorija za održavanje genske ekspresije što je vrlo važno u razvojnim genskim regulatornim mrežama (Becksei, 2001; Kramer i Fussenegger, 2005). U ostalim slučajevima bimodalna distribucija pripomaže staničnim populacijama da održe raznovrsnost fenotipa kako bi mogle bolje reagirati na stohastički okoliš (Wolf i Arkin, 2003).

3.2. Feedforward loop i globalna struktura regulatorne genske mreže

3.2.1. Feedforward loop

Feedforward loop (FFL) je druga obitelj najčešćih mrežnih motiva. Pokazalo se da stotine genskih sistema u *E. coli* (Shen-Orr, 2002; Mangan i sur., 2003) i kvasca (Milo, 2002; Lee, 2002), a i drugih organizama (Milo, 2004). FFL motivi se sastoje od tri gena: regulatora X koji regulira Y, i Z gena koji je reguliran i s regulatorom X i Y. Budući da svaka od tri regulacije može dati drugačiji rezultat, FFL mogu biti aktivirajućeg (koherentne, [+]) ili suprimirajućeg (nekoherentne, [-]) efekta, a svode se na osam strukturalnih tipova (Alon, 2007; Klipp i sur., 2016) koje prikazuje Slika 14.



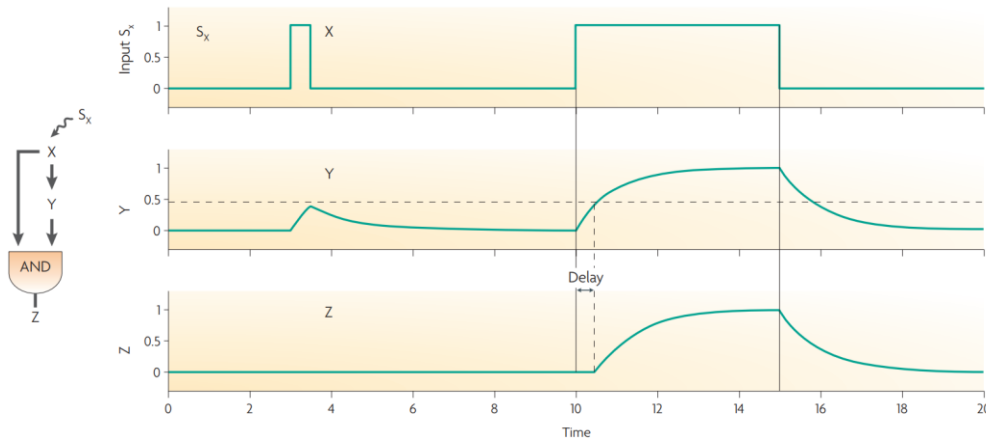
Slika 14. Osam strukturnih koherentnih i nekoherentnih FFL mrežnih motiva (Preuzeto iz Klipp i sur., 2016)

Za bolje razumijevanje FFL mrežnih motiva potrebno je shvatiti integraciju X i Y kako bi regulirali Z promotor. (Yuh, 1998; Buchler i sur., 2003) Dva najčešća ulazna modula temelje se na boolean operatorima, a oni su tzv. *AND gate* i, u kojem su oba (X i Y) potrebni kako bi aktivirali Z, ili *OR gate*. Mnoge aktivnosti FFL mrežnih motiva mogu biti shvaćene kroz ova dva ulazna modula, iako mogu postojati i hibridi AND i OR modula (Shen-Orr, 2002; Alon, 2006; Alon, 2007).

Kako je i bilo najavljeno uvodnom dijelu mrežnih motiva, u TRN *E. coli*, dva od osam strukturalnih tipova FFL mrežnih motiva pojavljuju se mnogo češće nego ostalih šest motiva u nasumičnim i biološkim regulatornim mrežama, a to su koherentni prvi tip FFL (C1-FFL) i nekoherentni prvi tip FFL (I1-FFL). Dva navedena mrežna motiva su od funkcionalne važnosti za stanicu. C1-FFL koristi se kao element odgode ovisne o predznaku (*sign-sensitive delay*) i detektor postojanosti (*persistence detector*) (Klipp i sur., 2016), dok se I1-FFL koristi kao generator impulsa i akcelerator odgovora (Alon, 2007).

U slučaju C1-FFL *AND gate* ulaznog modula, C1-FFL pokazuje odgodu nakon podražaja, ali istu ne pokazuje kada podražaj nestane (Slika 15.) Takvo dinamičko ponašanje

naziva se elementom odgode ovisnim o predznaku, a njegovo trajanje ovisi o biokemijskim parametrima regulatora Y. Npr. visokim aktivacijskim pragom regulatora Y za promotor Z biti će i dulje vrijeme odgode aktivacije. Takva odgoda korisna je s funkcionalne strane za organizam jer pomaže regulatornim mrežama razlučiti kratke, pulsirajuće šumove koji su konstanti u biokemijom okruženju od onih koji se trebaju percipirati kao trajniji i postojani.



Slika 15. Dinamičko ponašanje C1-FFL mrežnog motiva s odgodom ovisnom o predznaku (Preuzeto iz Alon, 2007)

U slučaju *OR gate* ulaznog modula za Z promotor, FFL mrežni motiv će imati suprotan efekt od *AND gate* ulaznog modula – neće doći do pojave odgode po dolasku signala, ali će se odgoda ispoljiti nakon prestanka signala. C1-FFL s *OR gate* ulaznim modulom dozvoljava kontinuiranu sintezu unatoč suočavanju s prijelaznim gubitkom ulaznog signala.

U I1-FFL mrežnom motivu dvije grane se antagonistički ponašaju: X aktivira Z i istovremeno suprimira Z tako da aktivira supresor Y. Rezultat takve interakcije je da podražaj uzrokuje da X zauzme aktivnu konformaciju, Z se brzo stopom sinteze proizvede, a nakon nekog vremena, akumulacijom Y, prelazi se supresijski prag za Z promotor. Dolazi do smanjena produkcije proteina Z i njegova koncentracija naglo pada, rezultirajući generacijom impulsa (Alon, 2006). Eksperimentalna potvrda ovakvog dinamičkog ponašanja pokazana je u LuxR sustavu *E. coli* (Basu i sur., 2004).

Uz funkciju generatora impulsa, I1-FFL može izvršavati još jednu dinamičku funkciju: može biti akcelerator odgovora. Akcelerator odgovora je korisno dinamičko ponašanje mrežnog motiva kada na primjer Y ne suprimira u potpunosti sintezu na promotoru Z, čime Z dostiže razinu svog stacionarnog stanja. Zbog izrazite početne stope sinteze proteina Z, u istom vremenskom periodu prije nego Y suprimira Z promotor, Z brzo dostiže stacionarno stanje što

dovodi do kraćeg vremena odziva nego od onog vremena u jednostavnoj genskoj regulaciji ili autoregulaciji (Klipp i sur, 2016).

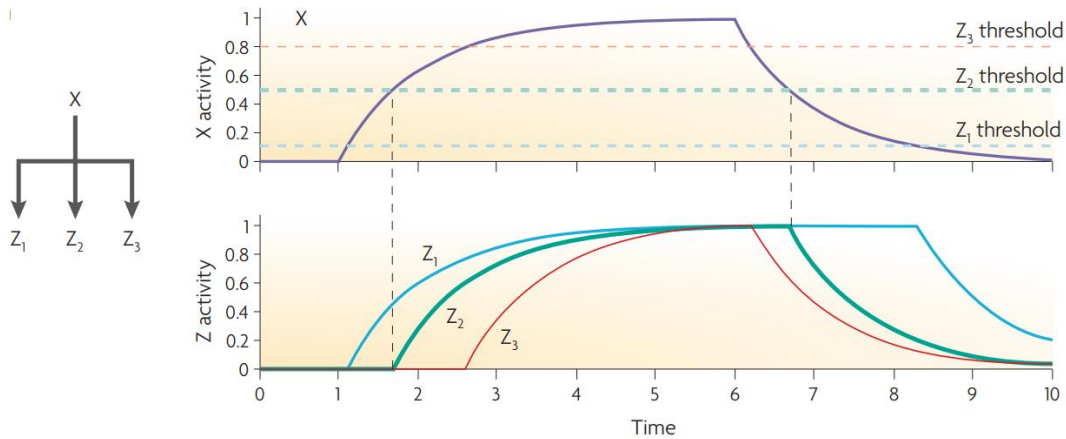
3.2.2. Globalna struktura regulatorne mreže

Navedene tri velike obitelji mrežnih motiva cine glavne građevne blokove senzornih mreža, ali glavno pitanje je kako se mrežni motivi kombiniraju i povezuju kako bi stvorili veću, globalnu mrežnu strukturu. Mrežni motivi pomažu u portretiranju mreža u kompaktnoj formi, koristeći simbole. SIM i FFL mrežni motivi integriraju su u guste preklapajući regulone (*dense overlapping regulons*, DORs), veće i kompleksnije motive u kojima više ulaznih modula regulira više izlaznih modula. DOR se pojavljuju u jednom sloju, tj. ne postoji DOR kao izlazni modul ili neki drugi DOR. To dovodi do obrade signala u jednom „sloju“ promotora na izlaznom modulu DOR-a (Slika 16.)

Jedan od razloga takve arhitekture je potreba za brzim odgovorom na podražaj, jer, kao što je navedeno prije, vrijeme odziva može biti prolongirano i na jednu generaciju da bi se informacija prenijela kroz kaskadni put (Alon, 2006). Senzorne mreže koje se sastoje od brzo-reagirajući motiva mogu biti limitirane za korištenje u dugačkim kaskadama (Beer i Tavazoie, 2004).

Ponašanje mrežnih motiva za vrijeme globalne dinamike genskih mreža može biti gledano kroz DNA microarray. Na primjer, transkripcijska dinamika gena sisavaca u odgovoru da podražaj čimbenikom rasta svakako je saglediva kroz odgovarajuće mrežne motive (Amit i sur., 2007)

drugačije aktivacijske pragove za svaki gen zbog varijacija u slijedu i okolnostima stvaranja interakcija s veznim mjestom za svaki promotor. Značajnim povećanjem koncentracije regulatornog proteina kroz određeni period prelazi se aktivacijski prag u točno određenom uzorku – prvo onaj koji je najniži, a potom sljedeći s najnižim pragom dovodeći na kraju do cijelog niza vremenski reguliranih aktivacija. Isto rasuđivanje može se primijeniti kada se regulator ponaša kao represor.



Slika 118. Vremenski redoslijed ekspresije gena u SIM-u (Preuzeto iz Alon, 2007)

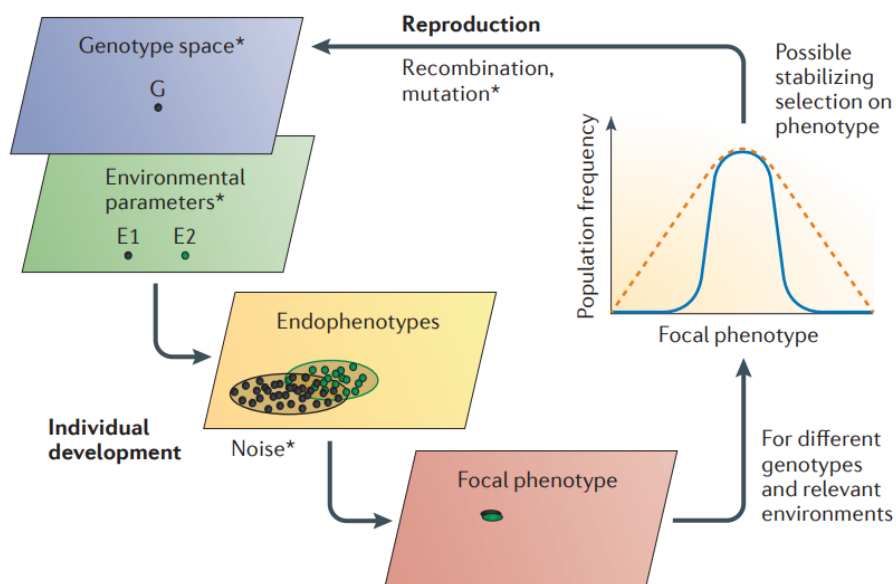
Takav vremenski poredak uočava se u nekoliko sustava *E. coli* koji nose SIM arhitekturu. Važna karakteristika takvih modula je ta da vremenski poredak odgovara funkcionalnom poretku gena (Ronen i sur., 2002; Zaslaver i sur., 2004) (Slika 18.). Što je gen ranije potreban u multigenkom procesu, time će se njegov promotor ranije aktivirati. Takav ekspresijski program sprječava nepotrebnu sintezu proteina prije nego što je on potreban. Primjer SIM-a je biosintetski sustav arginina u kojem represor ArgR regulira nekoliko operona koji kodiraju enzime važne za argininov biosintetski put (Slika 17.). Micanjem arginina iz medija promotori se aktiviraju u vremenskom redoslijedu unutar nekoliko minuta od aktivacije glavnog promotora, a vremenski redoslijed odgovara poziciji enzima u biosintetskom argininskom putu (Zaslaver i sur., 2004). Isti princip uočava se u linearnom bioisintetskom putu i sustavu odgovornom za reakcije na stresne uvijete kao što su SOS odgovor ili popravak DNA (Ronen i sur., 2002). Brojni su primjeri vremenskog poretka, uključujući i sintezu biča u *E. coli* (Kalir, 2001) i *Caulobacter crescentus* (Laub, 2000), geni uključeni u stanični ciklus (McAdams, 2003; Spellman i sur, 1998) i u razvojnim programima (Levine i Davidson, 2005).

4. Robusnost

Biološki putevi sastoje se od mnoštva proteinskih molekula. Neizbježno je da koncentracije proteina mogu varirati od stanice do stanice, a to dovodi glavnog svojstva bioloških sustava – pojave šuma, odnosno, nesposobnosti specifikiranja točne koncentracije danog proteina (Alon, 2006).

Kako bi biološki sustavi mogli normalno i točno funkcionirati u fazi pozadinskog šuma došlo je do pojave svojstva robusnosti. Robusnost se karakterizira kao invarijantna ekspresija fenotipa pri izlaganju s genetskim i/li okolišnim pertrubacijama. Iako je fenotipska varijacija centralna mjera za mapiranje genotipa i okoliša za fenotip u kvantitativnoj evolucijskoj genetici, robusnost je također ključna u sistemskoj biologiji, rezultirajući u nelinearnim kvantitativnim odnosima između uzvodnih i nizvodnih komponenti sustava (Felix i Barkoulas, 2015).

Robusnost se pojavljuje na svim razinama organizacije i mehanistički se može ostvariti na mnogo načina. Stanične mreže sadrže razne strukture kao što su negativne povratne sprege koje posebice pridonose robusnosti. Kvantitativna robusnost i kontrolna svojstva mogu se ostvariti iz skaliranja svojstava biokemijskih sustava, na primjer, iz podatka da se izlazeća varijabla proporcionalno skalira unutar vremena potrebnog za ponovno skaliranje sustava (Klipp i sur., 2016).



Slika 19. Shematski prikaz odnosa razine varijacija individualnih komponenti u populaciji i u evoluciji (Preuzeto iz Felix i Barkoulas, 2015)

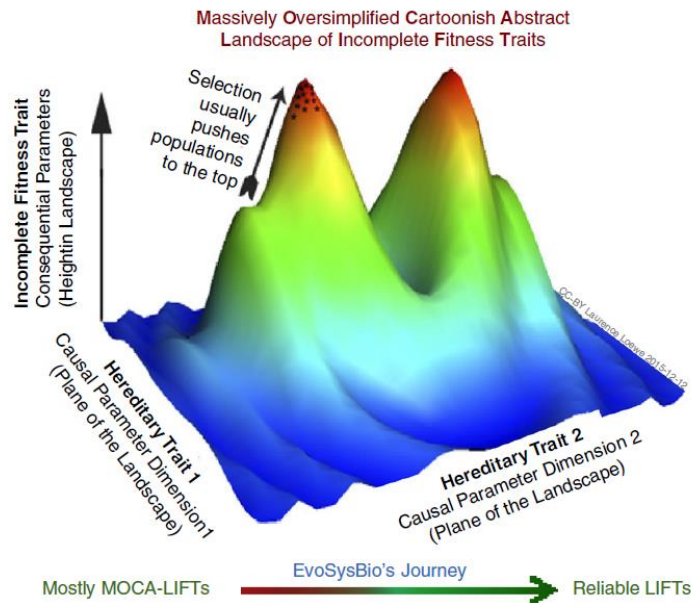
Osnovni princip robusnosti je da su biološki sustavi evoluirali, odnosno bili pod utjecajem prirodne selekcije kako bi određena struktura koja izvršava specifičnu ulogu bila neosjetljiva na varijacije koje se pojavljuju u prirodi (Alon, 2006).

Slika 19. prikazuje shematski odnos između razine varijacije u individualnom razvoju (genotipskim i okolišnim parametrima, sumu, endofenotipu ili intermedijerima razvojnih fenotipova i fokalnih fenotipova) u populaciju i u evoluciji.

5. Evolucija i optimalnost

Evolucijska systemska biologija je pod-grana systemske biologija s glavnom misli vodiljom - modifikacijom poznate Dobzhankyjeve izreke: „Ništa u biologiji nema smisla osim [kada je] *pravilno kvantificirano* u svjetlu evolucije“ (Loewe, 2009).

Cilj evolucijske systemske biologije je svrsishodno kvantificirati biološki sustav kako bi se steklo bolje razumijevanje *fitness landscape*-a (Slika 20.) koji vodi evolucijsku dinamiku. Budući da je evolucijska systemska biologija iznimno mlado područje istraživanja, trenutne težnje primarno leže u prikupljanju reproducibilne analize podataka i razvoja računalne tehnologije. Evolucijska systemska biologija obuhvaća cijelu biološku disciplinu, jer sve u biologiji pripada u neki sustav, a sustavi u biologiju evoluiraju, s ogromnim implikacijama za razumijevanje prošlih, kao i budućih evolucijskih događaja (Loewe 2016).



Slika 20. *Fitness landscape* (Preuzeto iz Loewe, 2016)

Potencijal evolucijske systemske biologije leži i u tome da bi se pratila evolucija samih mrežnih motiva, kako su se mijenjali kroz evolucijsku prošlost i jesu li se održali između homolognih gena ili pak se pojavljuju značajno u određenim razvojnim stadijima. Također, može se i pratiti evolucija njihove modularnosti (Shubin, 2017).

5.1. Evolucija funkcija i modula

Biološki sustavi nisu dizajnirani, već oblikovani mutacijama i selekcijom, koje ih konstanto izmjenjuju kroz pomne modifikacije. Postojeće strukture mogu biti modificirane, ili se ponovno iskorišteni u nove svrhe (Klipp i sur.,2016). Takav proces više podsjeća na lemljenje ili krpanje, nego na inženjerstvo (Alon, 2003). Počevši od organizama koji već posjeduju funkcionalne sposobnosti, pomoću genske rekombinacije i mutacija uvode se novine ili preoblikuju postojeće strukture. Pod selekcijskim pritiskom, takve nasumične promijene dovode do funkcionalnih adaptacija. Prirodna selekcija će odabrati ona rješenja koja najbolje funkcioniraju, neovisno jesu li ona nama razumljiva, a biološki sustav kao produkt može izgledati potpuno drugačije od rješenja koje bi inženjeri zamislili. Razlika između inženjerskih mreža (npr. računalni čip) i evoluiranih mreža (npr. TRN) podsjeća na razlike između strukturiranih računalnih programa i umjetnih neuralnih mreža. Utrenirana neuralna mreža sposobna je riješiti kompleksan računalni problem raznih tipova, ali neće primjenjivati logičku strukturu tih prometa na razumljiv način (Klipp i sur., 2016).

5.2. Evolucija modularnosti

Biološki sustavi, poput TRN, pokazuju modularnost i povratnost struktura te su specijalizirani za određenu ulogu. Pitanje koje se postavlja jest koji je razlog evolucije modularnosti? Potencijalno objašnjenje da modularnost kao takva doprinosi robusnosti. Kao banalan primjer može se uzeti samo postojanje stanica. Stanice su odvojene membranom jedna od druge ili od ostatka okoliša u kojem se nalaze i stanice u tkivima mogu izvršiti apoptozu bez da utječu na funkcionalnost susjednih stanica. Također, modularnost se oslanja na robusnost. Kako bi biološki sustavi bili iskoristivi u biokemijskom smislu (stadiji stanica ili stanični tipovi), biološki moduli kao što su signalni putevi trebaju biti robusni na tipične varijacije koje proizlaze iz različitih tipova stanica.

Selektivna prednost slijedi činjenici da moduli doprinose evolubilnosti (Kirschner i

Gerhart, 1998). U simulaciji eksperimentu, Kashtan i Alon evoluirali su hipotetički električni krug s nasumičnim mutacijama i selekcijom i na temelju njega shvatili optimalno izvođenje zadataka koji procesiraju dva signala. U evolucijskom scenariju s jednim konstantnim zadatkom, evolucija stvara različite visoko-optimizirane krugovi koji nisu modularni. U drugom scenariju, zadatak se sastojao od dva podzadatka koji su se pojavljivali u različitim kombinacijama. Iz toga su modularni krugovi nastali iz evolucije. Iako su bili suboptimalni za svaki od zadataka, lakše su podlijegali evokaciji jer su manje genetičke primjene bile dovoljne kako bi se bavili drugim zadatkom (Kashtan i Alon, 2005).

6. Sažetak

Sistemska biologija je mlada znanost koja kroz holistički pristup biološkom sustavu pokušava opisati njegova svojstva koristeći matematičke modele. Pristup biološkim entitetima u potpunosti se razlikuje od analitičkih redukcionističkih metoda te se sustav sagledava u cjelini sa svim svojim svojstvima. Matematički modeli su apstraktni prikazi objekata ili procesa koji pokušavaju objasniti njihova svojstva. Temelj su razvika modelasu metode kao što su constraint-based reconstruction analysis (CoBRA) i Flux-based analysis (FBA). Razumijevanje kompleksnih bioloških mreža omogućilo je otkriće mrežnih motiva, jednostavnih oblika interakcija koje se u regulatornim genskim mrežama pojavljuju frekvencijom mnogo češće od one koja je očekivana u nasumičnim mrežama. Značaj pojedinih mrežnih motiva i njihova frekvencija sugeriraju njihovu evolucijsku važnost.

Evolucijska sistemska biologija pristupa evoluciji sistema u striktnom kvantificiranom smislu uz pomoć tzv. *fitness landscape*-a te pokušava objasniti evoluciju modularnosti mrežnih motiva i zašto su se njihova svojstva razvila na način na koji jesu te koje promjene dovode do poboljšavajućih ili pogoršavajućih utjecaja na funkcionalnost pojedinih modula mrežnih motiva. Pored evolucije same modularnosti, evolucijska sistemska biologija može pratiti evoluciju i samih mrežnih motiva. Evolucijska sistemska biologija je iznimno mlada znanstvena grana koja je tek u svome začetku razvoj metoda i pristupa biološkim problemima.

7. Summary

Systems biology is a young scientific field that holistically approaches to a biological system and tends to describe it by using mathematical models. A mathematical model is an abstract representation of objects or processes that explains features of these objects or processes.

Approaches taken by systems biology for a given entity contrast the reductional and analytical approach and considers a system as a whole. Understanding of complex biosystems was largely enlightened with a discovery of network motifs, simple patterns that occur much more frequently in a regulatory network than it would be expected by chance in a random network. The significance of particular network motifs suggests their evolutionary importance.

Evolutionary systems biology approaches to systems' evolution in a strictly quantifiable manner with a help of fitness landscape and tries to explain the evolution of modularity of network motifs and why did their properties evolved in such a way, and which changes lead to improved or decreased effects on the functionality of [particular network motifs. Besides modularity, evolutionary systems biology can track the evolution network motifs themselves. Evolutionary systems biology is extremely young field of science that is still in its initial state of developing methods and tools to approach the biological problem.

8. Literatura

- Alon, U. (2003). Biological Networks: The Tinkerer as an Engineer. *Science*, 301(5641), pp.1866-1867.
- Alon, U. (2006). *An introduction to systems biology*. 1st ed. Boca Raton, Chapman&Hall/CRC, str.5
- Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics*, 8(6), str.450-461.
- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Vaisman, N., Segal, E., Rechavi, G., Alon, U., Mills, G., Domany, E. and Yarden, Y. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nature Genetics*, 39(4), str.503-512.
- Basu, S., Mehreja, R., Thiberge, S., Chen, M. and Weiss, R. (2004). Spatiotemporal control of gene expression with pulse-generating networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(17), pp.6355-6360.
- Becskei, A. (2001). Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *The EMBO Journal*, 20(10), str.2528-2535.
- Becskei, A. and Serrano, L. (2000). Engineering stability in gene networks by autoregulation *Nature*, 405(6786), str.590-593.
- Beer, M. and Tavazoie, S. (2004). Predicting Gene Expression from Sequence. *Cell*, 117(2), pp.185-198.

- Buchler, N., Gerland, U. and Hwa, T. (2003). On schemes of combinatorial transcription logic. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), pp.5136-5141.
- Camas, F., Blazquez, J. and Poyatos, J. (2006). Autogenous and nonautogenous control of response in a genetic network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34), str.12718-12723.
- Davidson, E. (2006). *The Regulatory Genome: Gene Regulatory Networks In Development And Evolution*. 1st ed. Burlington: Academic Press.
- Dublanche, Y., Michalodimitrakis, K., Kümmerer, N., Foglierini, M. and Serrano, L. (2006). Noise in transcription negative feedback loops: simulation and experimental analysis. *Molecular Systems Biology*, 2.
- Edwards, J., Letscher, D. and Palsson, B. (2000). Combining pathway analysis with flux balance analysis for the comprehensive study of metabolic systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(4), pp.286-306.
- Félix, M. and Barkoulas, M. (2015). Pervasive robustness in biological systems. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), str.483-496.
- Isomura, A. and Kageyama, R. (2014). Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. *Development*, 141(19), str.3627-3636.
- Kærn, M., Elston, T., Blake, W. and Collins, J. (2005). Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nature Reviews Genetics*, 6(6), str.451-464.
- Kalir, S. (2001). Ordering Genes in a Flagella Pathway by Analysis of Expression Kinetics from Living Bacteria. *Science*, 292(5524), str.2080-2083.
- Kalir, S., Mangan, S. and Alon, U. (2005). A coherent feed-forward loop with a SUM input function prolongs flagella expression in Escherichia coli. *Molecular Systems Biology*, 1(1)
- Kashtan, N. and Alon, U. (2005). Spontaneous evolution of modularity and network motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), pp.13773-13778.
- Klipp, E., Liebermeister, W., Helbig, A., Kowald, A. and Schaber, J. (2007). Systems biology standards—the community speaks. *Nature Biotechnology*, 25(4), pp.390-391.
- Klipp, E., Liebermeister, W., Wierling, C. and Kowald, A. (2016). *Systems Biology*. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, str.3.
- Kramer, B. and Fussenegger, M. (2005). Hysteresis in a synthetic mammalian gene network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27), str.9517-9522.
- Laub, M., McAdams, H., Feldblyum, T., Fraser, C. and Shapiro, L. (2000). Global Analysis of the Genetic Network Controlling a Bacterial Cell Cycle. *Science*, 290(5499), str.2144-2148.
- Lee, T. (2002). Transcriptional Regulatory Networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 298(5594), str.799-804.

- Levine, M. and Davidson, E. (2005). Gene regulatory networks for development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), str.4936-4942.
- Maeda, Y. and Sano, M. (2006). Regulatory Dynamics of Synthetic Gene Networks with Positive Feedback. *Journal of Molecular Biology*, 359(4), str.1107-1124.
- Mangan, S., Zaslaver, A. and Alon, U. (2003). The Coherent Feedforward Loop Serves as a Sign-sensitive Delay Element in Transcription Networks. *Journal of Molecular Biology*, 334(2), str.197-204.
- McAdams, H. (2003). A Bacterial Cell-Cycle Regulatory Network Operating in Time and Space. *Science*, 301(5641), str.1874-1877
- Milo, R. (2002). Network Motifs: Simple Building Blocks of Complex Networks. *Science*, 298(5594), pp.824-827.
- Milo, R. (2004). Superfamilies of Evolved and Designed Networks. *Science*, 303(5663), pp.1538-1542.
- Palsson, B. (2015). *Systems Biology*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, str.8.
- Reed, J., Famili, I., Thiele, I. and Palsson, B. (2006). Towards multidimensional genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, 7(2), pp.130-141.
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. and Alon, U. (2002). Assigning numbers to the arrows: Parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), str.10555-10560.
- Rosenfeld, N., Elowitz, M. and Alon, U. (2002). Negative Autoregulation Speeds the Response Times of Transcription Networks. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), str.785-793.
- Salgado, H. (2006). RegulonDB (version 5.0): Escherichia coli K-12 transcriptional regulatory network, operon organization, and growth conditions. *Nucleic Acids Research*, 34(90001)
- Savageau, M. (1974). Comparison of classical and autogenous systems of regulation in inducible operons. *Nature*, 252(5484), str.546-549.
- Shen-Orr, S., Milo, R., Mangan, S. and Alon, U. (2002). Network motifs in the transcriptional regulation network of Escherichia coli. *Nature Genetics*, 31(1), str.64-68.
- Shubin, N. (2017). Gene regulatory networks and network models in development and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23), str.5782-5783.
- Spellman, P., Sherlock, G., Zhang, M., Iyer, V., Anders, K., Eisen, M., Brown, P., Botstein, D. and Futcher, B. (1998). Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization. *Molecular Biology of the Cell*, 9(12), str.3273-3297.
- Stagljar, I. (2016). The power of OMICs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479(4), str.607-609.

- Thieffry, D., Huerta, A., Pérez-Rueda, E. and Collado-Vides, J. (1998). From specific gene regulation to genomic networks: a global analysis of transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *BioEssays*, 20(5), str.433-440.
- Thiele, I. and Palsson, B. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature Protocols*, 5(1), pp.93-121.
- Wolf, D. and Arkin, A. (2003). Motifs, modules and games in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), str.125-134.
- Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Proliferation*, 41, pp.51-56.
- Yuh, C. (1998). Genomic Cis-Regulatory Logic: Experimental and Computational Analysis of a Sea Urchin Gene. *Science*, 279(5358), str.1896-1902.
- Zaslaver, A., Mayo, A., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., Tsalyuk, M., Surette, M. and Alon, U. (2004). Just-in-time transcription program in metabolic pathways. *Nature Genetics*, 36(5), str.486-491.