

Logički krugovi u staničnom signaliziranju

Bolanča, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:217:617685>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-05**



Repository / Repozitorij:

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



Prirodoslovno-matematički fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Biološki odsjek

Logički krugovi u staničnom signaliziranju

Logic circuits in cell signaling

Seminarski rad

Ivana Bolanča

Preddiplomski studij molekularne biologije

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Mrežni motivi	2
1.2. Booleova algebra	3
1.3. Logički sklopovi	4
2. ULAZNI SIGNAL	5
2.1. Detekcija ulaznog signala	5
2.2. Integracija signala	6
2.3. Detekcija i odgovori na promjene u amplitudi ulaznog signala	11
2.4. Detekcija trajanja ulaznog signala	12
3. IZLAZNI ODGOVOR	14
3.1. Modificiranje količine izlaznog odgovora	14
3.2. Trajanje izlaznog odgovora	16
4. ZAKLJUČAK	19
5. LITERATURA	20
6. SAŽETAK	22
7. SUMMARY	22

1. UVOD

Do početka 21. stoljeća biološka istraživanja su se vodila načelom redukcionizma, gdje se staničnim komponentama i molekulama pristupa kao zasebnim cjelinama. Takav pristup je doveo do brojnih otkrića u građi proteina, nukleinskih kiselina i organela, proširio je naše znanje o staničnim procesima i pokazao se prilično uspješnim. Razvojem proteomike i genomike postalo je jasnije da su stanični procesi sačinjeni od velikog broja molekula koje često imaju više od jedne uloge u nekom procesu, ali i da iste molekule mogu sudjelovati u više različitih procesa. Iz tog razloga su se istraživanja počela okretati od proučavanja zasebnih molekula k proučavanju čitavih mreža staničnih signalnih puteva. Jedan od problema s kojim su se istraživači susreli prilikom globalnih istraživanja je velika količina informacija koju je teško obraditi bez računala. Povećanjem procesivne moći računala grane poput bioinformatike i računske biologije su postale ključne u interpretaciji te velike količine informacija. Istovremeno dolazi do razvitka novih modela u teoriji mreža, što je znanstvena grana koja se razvila iz matematičke grane teorije grafova, a bavi se proučavanjem i opisivanjem složenih mreža kao što su telekomunikacijske, računalne, biološke i društvene mreže. Teorija mreža je iznjedrila zaključak da su arhitektonski elementi svih kompleksnih mreža slični, bilo da je riječ o biološkim sustavima, tehnologiji ili društvenim mrežama. Takva univerzalnost je temelj ideje da su sve složene mreže vođene istim pravilima. Zahvaljujući ovoj ideji znanstvenici su počeli uočavati pravila koja reguliraju računalne mreže i u signalnim sustavima u stanici. Složene mreže su građene od čvorišta, odnosno elemenata koji sudjeluju u uzajamnim interakcijama, i veza koje predstavljaju tip interakcije između dva elementa (Barabási i Oltvai 2004). Slično kao i računala stanica prima velik broj informacija iz okoliša ali i o svom unutarnjem stanju, te na temelju njih donosi odluke i izvršava naredbe. Na temelju nadolazećih informacija stanica odlučuje koje će gene transkribirati, a koje ne, hoće li rasti, dijeliti se, diferencirati ili krenuti u apoptozu. Najosnovnije jedinice računala su logički sklopovi koji predstavljaju čvorišta u mreži. Više logičkih sklopova je moguće spojiti u logičke krugove koji mogu procesirati složenije informacije od logičkih sklopova, a udruživanjem logičkih krugova dobivamo procesor koji može u kratkom vremenskom periodu obaviti velik broj funkcija. Unutar stanice postoji slična hijerarhijska struktura. Molekule predstavljaju osnovnu jedinicu složene signalne mreže tj. čvorišta, a usporedive su s logičkim sklopovima. Više molekula se udružuje u signalni put, a kombinacijom više puteva dobivamo signalnu mrežu kojom stanica koordinira velik broj staničnih procesa.

1.1. Mrežni motivi

Svaka mreža, bila ona tehnološka ili biološka, može se prikazati preko topološkog grafa, u kojem su pojedini dijelovi (čvorišta) međusobno gotovo pravilno povezani, što znači da čvorišta neće nasumično sudjelovati u interakcijama, ali i da jedno čvorište može sudjelovati u više od samo jedne interakcije. Važna svojstva svih, a posebice bioloških mreža su hijerarhijski odnos i postojanje mrežnih motiva. Mrežni motivi su uzorci interakcija između čvorišta koji se statistički značajno ponavljaju u kompleksnim mrežama. Kompleksne biološke signalne mreže su građene od većeg broja signalnih puteva koji su sačinjeni od molekula kao što su proteini i lipidi, čije međusobne ponavljajuće interakcije čine mrežne motive (Masoudi-Nejad i sur. 2012). Na temelju motiva koji se pojavljuju u nekom sustavu možemo zaključiti kakvu bi ulogu taj sustav mogao obavljati u stanici. Svi motivi se sastoje od čvorišta koja predstavljaju individualne molekule i od veza koje predstavljaju regulatorne odnose između čvorišta, odnosno molekula. Veze mogu biti pozitivne ili negativne ovisno o tome kakav utjecaj uzvodno čvorište ima na nizvodno. Ako uzvodno čvorište aktivira nizvodno, riječ je o pozitivnoj vezi ($\rightarrow$), ukoliko ga inhibira odnosno djeluje represivno, riječ je o negativnoj vezi ($\neg$) (Milo i sur. 2012).

Osnovni tipovi mrežnih motiva:

- 1) Kaskadni motiv se sastoji od niza čvorišta povezanih serijski pri čemu uzvodno čvorište kontrolira više nizvodnih. Ovakav motiv se koristi u sustavima u kojima je potrebno amplificirati ulazni signal, a često pokazuje svojstvo iznimne osjetljivosti, tj. takav sustav može naglo prijeći iz jednog stanja u drugo (Kolch 2015).
- 2) Motiv pozitivne povratne sprege se sastoji od čvorišta čiji izlazni signal ima pozitivan učinak na izvorišno čvorište. Ovakav motiv se koristi u sustavima gdje je potrebno amplificirati ulazni signal ili gdje je potrebno održavati izlazni signal.
- 3) Motiv negativne povratne sprege se sastoji od čvorišta čiji izlazni signal ima negativan učinak na izvorišno čvorište. Ovakav motiv se koristi u sustavima gdje je preciznost od velike važnosti i gdje je potrebno ograničiti izlazni signal (Kolch 2015).

- 4) Mrežni motiv „coherent feed forward“ se sastoji od uzvodnog čvorišta čiji izlazni odgovor se grana na dva različita puta, koji se ponovno ujedine kako bi na jednak način, pozitivno ili negativno, regulirali nizvodno čvorište.
- 5) Mrežni motiv „incoherent feed forward“ se sastoji od uzvodnog čvorišta čiji izlazni odgovor se grana na dvije grane koje imaju suprotno djelovanje na nizvodno čvorište koje proizvodi izlazni odgovor (Lim i sur. 2014).

1.2. Booleova algebra

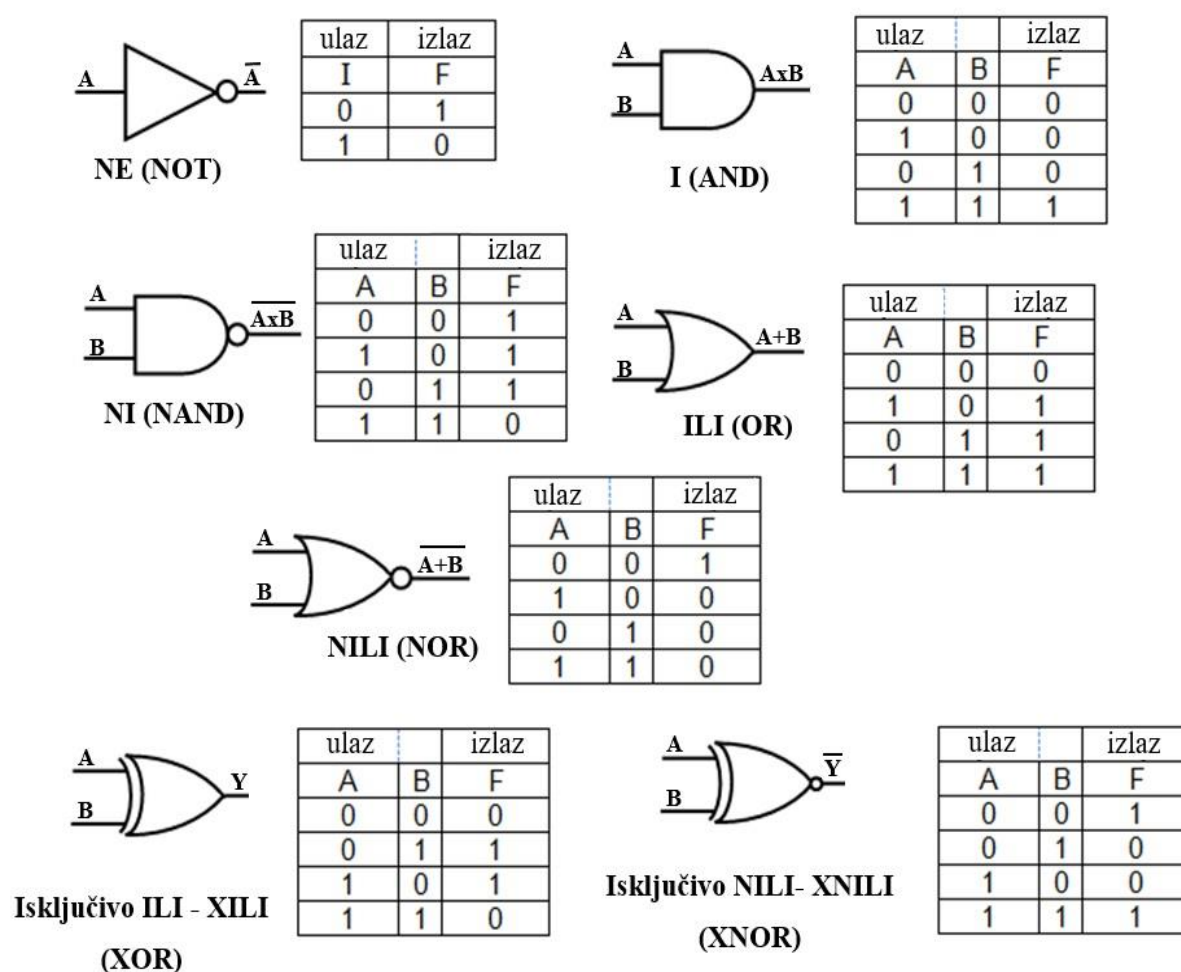
Logički sklopovi su uređaji koji funkcioniraju prema Booleovoj algebri. „Stanični uređaji“ koji se ponašaju poput logičkih sklopova unutar stanica također slijede njezina pravila. Booleova algebra se temelji na izjavama koje mogu biti ili točne ili netočne, 1 ili 0. Logičke izjave je moguće povezati logičkim operatorima čime dobivamo nove izjave. Osnovni logički operatori su I, ILI i NE. Operator I (Booleovo množenje, $x \wedge y$) daje istinu samo ako su obje izjave istinite, a operator ILI (Booleovo zbrajanje, $x \vee y$) daje istinu samo ako je barem jedna izjava istinita. Operator NE (Booleova negacija, $\neg x$) mijenja vrijednost logičke izjave iz istine u laž i obratno, iz laži u istinu (Slika 1.) (Galašev i sur. 2009).

x	y	$x \wedge y$	$x \vee y$	x	$\neg x$
0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	1	0
0	1	0	1		
1	1	1	1		

Slika 1. Tablica istinitosti koja prikazuje rezultate logičkih operacija ovisno o vrijednostima izjava koje mogu biti istinite (1) ili lažne (0) (preuzeto iz Galašev i sur. 2009).

1.3. Logički sklopovi

Logički sklop je uređaj koji primjenjuje Booleovu algebru na jedan ili više ulaznih signala pri čemu proizvodi samo jedan izlazni odgovor koji je rezultat jedne od osnovnih logičkih operacija. Za svaki logički operator postoji odgovarajući logički sklop koji vrši identičnu operaciju. Svaki sklop ima svoj simbol (Slika 2.) a njih je kao i operatore u Booleovoj algebri moguće međusobno spajati i kombinirati u složene sklopove (Galašev i sur. 2009).



Slika 2. Prikaz jednostavnih logičkih sklopova s njihovim pripadnim tablicama istinitosti (preuzeto i prilagođeno prema Galašev i sur. 2009).

U slučaju stanice izjava bi mogla biti prisutstvo liganda ili posttranslacijska modifikacija, a receptor koji prima ligand ili enzim čija aktivnost ovisi o modifikaciji su logički sklopovi koji vrše operacije identične pripadajućim logičkim operatorima.

2. ULAZNI SIGNAL

Ulazni signal predstavljaju molekule koje prenose određene informacije do stanice, a tu informaciju prenose tako da modificiraju druge molekule unutar stanice ili se vežu za njih. Kako bi stanice mogle pravilno odgovoriti na nadolazeće signale koriste „stanične uređaje“. „Stanični uređaji“ su molekule unutar stanice koje obavljaju niz osnovnih zadataka poput: detekcije ulaznog signala i njegove pretvorbe u karakteristični izlazni odgovor. Također, moraju biti u stanju odgovoriti na promjene u amplitudi (snazi) signala, te raspoznati kratkotrajne od dugotrajnih ulaznih signala.

2.1. Detekcija ulaznog signala

Ulazni signal detektiraju „stanični uređaji“ koje možemo naći unutar stanice ili na njezinoj membrani. Jednostavniji „stanični uređaji“ su obično građeni od proteina koji mogu promijeniti svoj izlazni odgovor ovisno o tipu ulaznog signala. Takve proteine možemo podijeliti u 4 kategorije: alosteričke sklopke, modularne alosteričke sklopke, složene proteinske sklopke i sklopke ovisne o prostoru.

Alosteričke sklopke su proteini čija se aktivna konformacija stabilizira vezanjem liganda ili uslijed kovalentnih modifikacija, poput fosforilacije ili ubikvitinacije. Nazivaju se sklopkama jer postoje u aktivnoj i inaktivnoj konformaciji, ovisno o prisutnosti odnosno odsutnosti spomenutih signala. Ovakvi mehanizmi detektiranja ulaznih signala su svojstveni kinazama. Na primjer, inzulinski receptor sadržava kinaznu domenu koja se aktivira fosforilacijom njezine aktivacijske petlje, što uzrokuje konformacijsku promjenu, pri čemu se aktivacijska petlja pomiče kako bi se omogućilo vezanje peptidnog supstrata (Nelson i Cox 2013).

Modularne alosteričke sklopke su proteini koji se sastoje od modularnih domena. Takve domene su građene od zasebnog katalitičkog mjesta i veznog mjesta za supstrat. Vezna mjesta sudjeluju u regulaciji katalitičkog mjesta, te na taj način reguliraju aktivnost proteina. Na primjer, tirozin fosfataza Shp2 (Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2), se sastoji od dvije domene SH2 (Src-homology 2 domain) i katalitičke domene PTP (protein tyrosine 2 domain) koja je zasebno (izvan proteina) konstitutivno aktivna. Kada promatramo terciarnu strukturu proteina uočavamo da se N-terminalna domena SH2 veže na katalitičku

domenu PTP blokirajući njezino aktivno mjesto, čime domena SH2 autoinhibira fosfataznu aktivnost. Međutim vezanje tirozin-fosforiliranog liganda na domene SH2 proteina dovodi do otpuštanja katalitičke domene PTP čime se oslobađa aktivno mjesto na njoj i protein postaje aktivan (Mayer 2015).

Složene proteinske sklopke sastavljene su od više polipeptida koji međusobno stupaju u interakcije i ponašaju se poput alosteričkih sklopki. Na primjer, protein kinaza A je sačinjena od katalitičke domene s kinaznom aktivnosti i od regulatorne domene koje se nalaze na različitim polipeptidnim lancima. Regulatorna domena je vezana za aktivno mjesto katalitičke domene preko pseudosupstratne sekvence i na taj način blokira kinaznu aktivnost. Ovaj kompleks se može aktivirati pomoću liganda cAMP (3', 5'-ciklički adenzin monofosfat). cAMP se specifično veže za regulatornu domenu pri čemu dolazi do konformacijske promjene koja dovodi do otpuštanja pseudosupstratne sekvence iz katalitičke domene, čime se oslobađa aktivno mjesto i aktivira katalitička domena (Voet i Voet 2006).

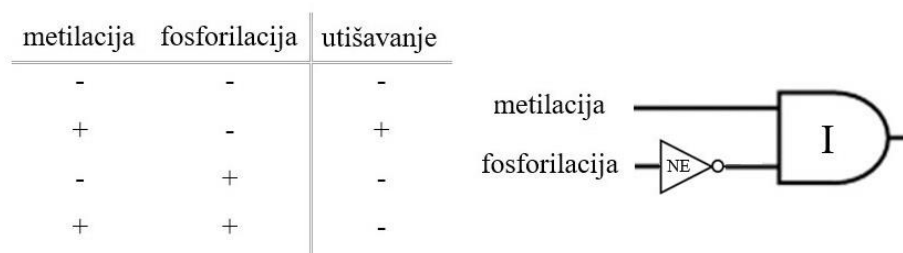
Sklopke ovisne o prostoru su proteini čija aktivnost i odgovor na ulazne signale ovisi o lokalizaciji unutar stanice. Na primjer, transkripcijski faktor Pho4 koji se uobičajeno nalazi u citoplazmi je inaktivan jer se ne može vezati na DNA koja se nalazi unutar jezgre. Detekcija ulaznog signala, odnosno defosforilacija Pho4, dovodi do unosa proteina u jezgru gdje postaje aktivan i veže se za slijed 5'-CACGTG-3' na molekuli DNA (Shao i sur. 1998).

2.2. Integracija signala

Većina procesa u stanici je regulirana s više ulaznih signala, što znači da unutar stanice možemo pronaći molekule koje su u stanju ponuditi jedan izlazni odgovor kada istovremeno prime više ulaznih signala. Takve molekule se ponašaju poput logičkih sklopova; na temelju jednog ili više signala proizvode jedan izlazni odgovor po principima Booleove algebre. Ovaj proces možemo nazvati integracija signala. Za razliku od elektroničkih logičkih sklopova, molekule ne pokazuju izričito aktivno i inaktivno stanje, jer ni signali koje detektiraju nisu jednoznačni. U elektroničkim sklopovima struja je ili prisutna ili odsutna, ali u stanici su molekule prisutne u različitim rasponima koncentracija. Molekule koje mogu integrirati signale možemo svrstati u 4 kategorije: proteini podložni modifikacijama, alosteričke kinaze, modularni proteini i transkripcijski promotori.

Proteini podložni modifikacijama su proteini koji prolaze kroz višestruke posttranslacijske modifikacije koje omogućavaju precizniju regulaciju izlaznog odgovora. Odnosi između posttranslacijskih modifikacija mogu biti antagonistički, kooperativni ili serijski:

- a) Antagonistički odnos podrazumijeva da jedna modifikacija poništava učinak druge modifikacije. Na primjer, Lys9 na N-terminalnom kraju histona H3 može metilirati enzim histon metil transferaza. Na metiliran N-terminalni kraj se može vezati protein HP1, čije vezanje uzrokuje utišavanje transkripcije u blizini ovog histona jer uzrokuje promjenu u strukturi kromatina. Za vrijeme mitoze enzim kinaza Aurora-B može fosforilirati obližnju aminokiselinu Ser10 na histonu H3. Fosforilacija Ser10 onemogućava vezanje proteina HP1 čak i kada je Lys9 metiliran. Ukratko metilacija potiče vezanje proteina HP1 koji utišava transkripciju, ali se to utišavanje može poništiti fosforilacijom (Slika 3.). Ovo ponašanje je analogno sklopu NE I (NOT AND) (Slika 3.).



Slika 3. Shematski prikaz antagonističke regulacije histona H3 metilacijom Lys9 na N-terminalnom kraju histona, odnosno fosforilacijom Ser10 preko logičkog sklopa NE I.

- b) Kooperativni odnos podrazumijeva da jedna modifikacija pojačava učinak druge modifikacije. Na primjer, enzim protein kinaza ATM (Ataxia telangiectasia mutated) može fosforilirati Thr8 na N-terminalnom kraju proteina p53 što potiče asocijaciju p53 s transkripcijskim koaktivatorom p300. Međutim dodatne fosforilacije Ser15 i Ser20 pojačavaju interakciju između p53 i p300 gotovo 80 puta i inhibiraju interakciju s MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) koji inhibira transkripciju p53 (Meek i Anderson 2009). Ovo ponašanje je analogno sklopu ILI (OR).

- c) Serijski odnos podrazumijeva da se prvo događa modifikacija A i tek nakon nje se može dogoditi modifikacija B. Na primjer, protein kinaza GSK-3 (kinaza glikogen sintaze 3) može fosforilirati samo one supstrate koje je prethodno fosforilirala neka druga kinaza, kao što su CK1 (kazein kinaza 1) ili CK2 (kazein kinaza 2). Ovo ponašanje je analogno sklopu I (AND).

Alosteričke kinaze integriraju više signala po principu sklopa I (AND). U stanju su prepoznati ligande i posttranslacijske modifikacije kao ulazne signale. Na primjer, da bi se enzim Cdk2 (ciklin ovisna kinaza 2) aktivirao, CAK (kinaza koja aktivira cikline) kompleks mora fosforilirati Thr160 na aktivacijskoj petlji, i mora vezati molekulu ciklina. Kako je enzim Cdk2 izuzetno važan u kontroli staničnog ciklusa, bitno je da se njegova aktivnost može i poništiti. Aktivnost se poništava po principu sklopa NILI (NOR). Dovoljno je da Cdk2 veže CDK inhibitorske proteine ili da se fosforilira na dodatna dva mjesta (Thr14 i Thr15). Vezanje CDK inhibitorskih proteina poput p27, mijenja konformaciju enzima tako da zauzima vezno mjesto supstrata i onemogućava vezanje molekule ATP (adenozin trifosfat), dok kinaze Wee1 i Myt1 fosforiliraju Thr14 i Thr15, što onemogućava kinaznu aktivnost enzima Cdk2 (Slika 4.).

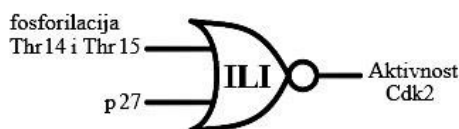
AKTIVACIJA Cdk2

Thr 160	ciklin	aktivnost Cdk2
-	-	-
+	-	-
-	+	-
+	+	+



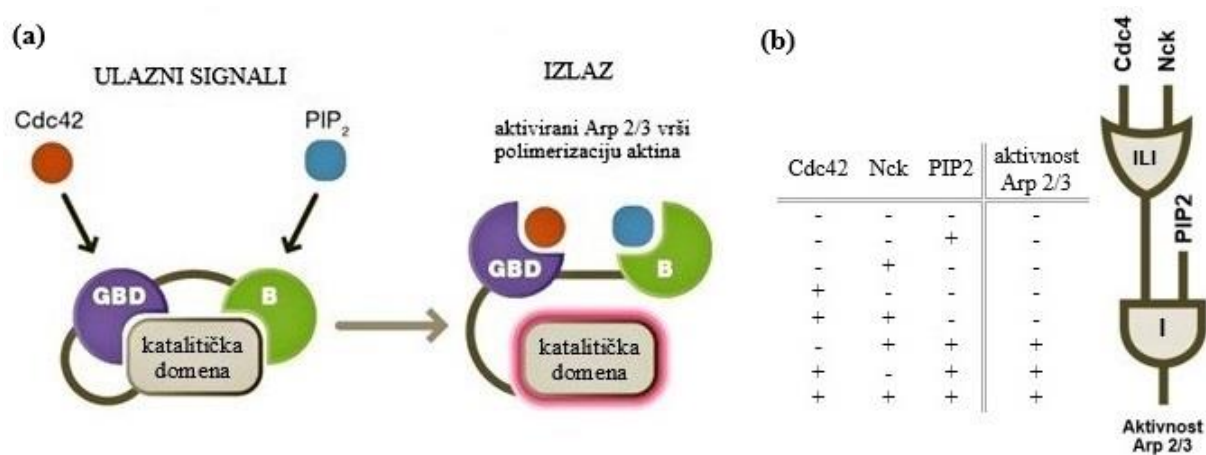
REPRESIJA Cdk2

p27	Thr 14 i Thr 15	aktivnost Cdk2
-	-	+
+	-	-
-	+	-
+	+	-



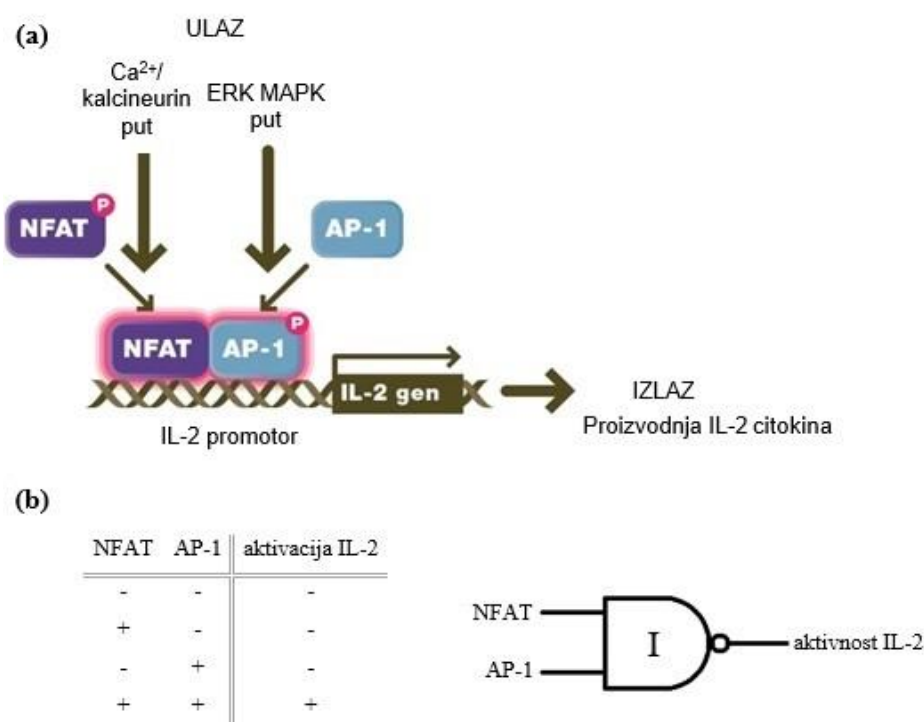
Slika 4. Aktivacija alosteričke kinaze Cdk2 funkcioniра analogno sklopu I, mora vezati na sebe ciklin i Thr 160 treba biti fosforiliran. S druge strane, represija ove kinaze funkcioniра poput sklopa ILI. Dovoljna je interakcija s inhibitorom p27 ili fosforilacija ostataka Thr14 i Thr15 da se kinazna aktivnost enzima onemogući.

Modularni proteini su proteini koji se sastoje od katalitičke domene o kojoj ovisi izlazni odgovor i autoinhibitornih domena koje inhibiraju katalitičku domenu ovisno o prisutnosti ulaznih signala. Autoinhibitorne domene djeluju po principu sklopa I (AND), svaka inhibitorna domena mora vezati odgovarajući ulazni signal da bi došlo do aktivacije katalitičke domene. Ukoliko ulazni signali nisu prisutni, katalitička domena će ostati inhibirana. Na primjer, N-WASP (Neuralni protein Wiskott Aldrich sindroma) je regulatorni protein aktinskog citoskeleta građen od većeg broja modularnih domena koji aktivira protein Arp 2/3. Uključen je u procese kao što su kretanje stanice, endocitoza i fagocitoza, zbog čega je bitno da je njegova regulacija prostorno i vremenski precizno regulirana. Njegova kontrolna regija sastoji se od domene koja veže protein G (GBD) i osnovne domene (B) koja veže fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat (PIP₂). U bazalnom stanju ove dvije domene kooperativno autoinhibiraju aktivnost katalitičke domene. U slučaju kada su proteini Cdc42 i PIP₂ prisutni, vežu se na odgovarajuće domene što dovodi do konformacijske promjene koja prekida autoinhibiciju te katalitičko mjesto proteina postaje aktivno čime može stupiti u interakciju s proteinom Arp 2/3 i aktivirati ga (Slika 5. pod a). Uz naveden način regulacije, N-WASP može dodatno vezati i proteine koji sadržavaju domenu SH3 (SRC Homology 3) kao što je adaptorski protein Nck. Protein Nck može zamijeniti ulogu Cdc42, što znači da su za aktivaciju katalitičke domene N-WASP proteina potrebni PIP₂ i Nck ili Cdc42 (Slika 5. pod b). Ovakav sustav s 3 moguća ulazna signala se sastoji od sklopova ILI (OR) i I (AND) (Lim i sur. 2014).



Slika 5. Shematski prikaz aktivacije katalitičke domene N-WASP proteina otpuštanjem autokatalitičkih domena (a) i prikaz regulacije N-WASP proteina preko logičkih sklopova ILI i I (b) s tri moguća ulazna signala (preuzeto i prilagođeno prema Lim i sur. 2014).

Transkripcijski promotori mogu po principu sklopa I (AND) integrirati veći broj ulaznih signala putem mreže transkripcijskih faktora koji se aktiviraju drugačijim signalnim putevima. Na primjer, prilikom aktivacije T stanica antigen-prezentirajućim stanicama, dolazi do aktivacije interleukin-2 promotora što je popraćeno sekrecijom citokina IL-2, koji potiče opstanak i proliferaciju aktiviranih T limfocita. Interleukin-2 promotor se ponaša kao sklop I (AND) koji detektira dvije različite grane puta aktivacije T stanica (Slika 6. pod b). Jedan od puteva koji se uključi kada T stanice stupe u kontakt s antigen-prezentirajućim stanicama je put Erk MAPK. Aktivan Erk fosforilira i aktivira transkripcijski faktor AP-1, no ovaj faktor nije dovoljan za aktivaciju transkripcije interleukin-2 promotora. Drugi put koji se aktivira uključuje signalizaciju sekundarnim glasnikom Ca^{2+} . Otpuštanje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma aktivira fosfatazu kalcineurin koja defosforilira transkripcijski faktor NFAT (jezgrin faktor aktiviranih T-stanica), nakon čega se NFAT može transportirati u jezgru. Interleukin-2 promotor ima vezna mjesta za oba transkripcijska faktora, AP-1 i NFAT. Tek kada se oba istovremeno vežu na DNA će doći do početka transkripcije (Slika 6. pod a). Na ovaj način stanica provjerava je li došlo do aktivacije oba puta, što se događa isključivo prilikom ustaljene aktivacije T stanica (Macian i sur. 2013).

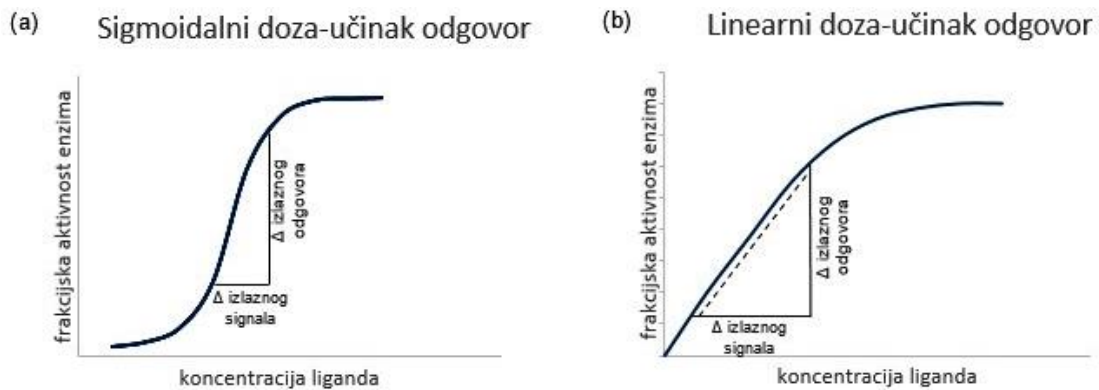


Slika 6. Prikaz ekspresije gena IL-2 ovisno o aktivaciji ERK MAPK puta i Ca^{2+} / kalcineurin puta shematski (a) i preko logičkog sklopa I (b) (preuzeto i prilagođeno prema Lim i sur. 2014).

2.3. Detekcija i odgovori na promjene u amplitudi ulaznog signala

Stanice mogu na dva načina odgovoriti na promjenu u amplitudi (snazi) ulaznog signala: linearno ili digitalno. Kod linearnog odgovora sustav detektira raspon ulaznog signala i na temelju njega proizvodi izlazni odgovor koji je proporcionalan ulaznom signalu. Linearni sustav pokazuje graduirano ponašanje, kako raste ulazni signal raste i izlazni odgovor. Kod digitalnog odgovora stanica zanemaruje sve ulazne signale čija je amplituda ispod određenog praga, te odgovara samo na signale čija amplituda je veća od određenog praga. Digitalni sustav se ponaša po principu sve ili ništa, ako je amplituda ulaznog signala niža od potrebne, sustav neće proizvoditi izlazni odgovor.

Ova dva načina odgovora možemo usporediti pomoću krivulje doza-učinak. Ulazni signal se mjeri preko koncentracije liganda, a izlazni odgovor preko frakcijske aktivnosti enzima (omjer koncentracije slobodnog enzima i ukupne koncentracije enzima), a krivulja prikazuje aktivnost enzima (koliko molekula supstrata se obrne u jedinici vremena). Kod linearnih sustava krivulja je izgleda hiperbole (Slika 7. pod a). Pri niskim koncentracijama liganda, tj. pri niskoj amplitudi ulaznog signala, izlazni odgovor je gotovo jednak ulaznom. No kada je koncentracija liganda toliko visoka da se sustav zasiti, izlazni odgovor se uravnotežuje, a krivulja prestaje rasti. Osjetljivost (omjer promjene amplitude izlaznog odgovora i promjene amplitude ulaznog signala) ovog tipa odgovora je niska. Linearni odgovor koriste sustavi koji sudjeluju u odgovoru na stres, kao i sustavi koji detektiraju hormone. Digitalni sustavi imaju sigmoidalnu krivulju (Slika 7 pod b). Pri uskom rasponu koncentracije liganda krivulja pokazuje eksponencijalan porast, ali izvan tog raspona krivulja stagnira. Osjetljivost ovog tipa odgovora je vrlo visoka, jer se pri uskom rasponu amplitude ulaznog signala, količina izlaznog odgovora naglo poveća. Zbog visoke osjetljivosti digitalnog sustava koriste ga složeniji sustavi poput onih koji sudjeluju u diferencijaciji stanica (Lim i sur. 2014).



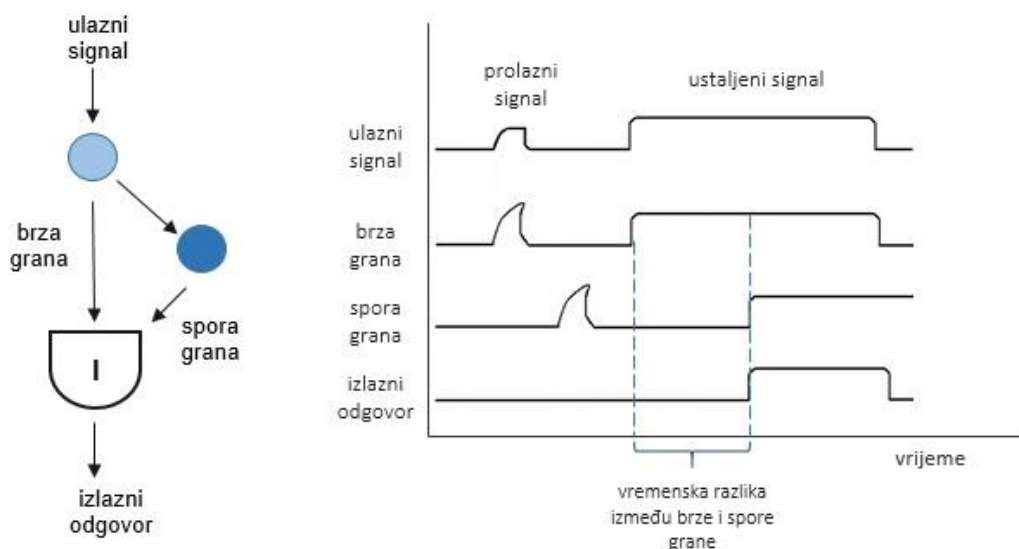
Slika 7. Sustav kod kojeg je aktivacija enzima potaknuta vezanjem liganda daje hiperboličnu krivulju, koja je u početnom dijelu pokazuje linearni porast. Početni linearni porast je razlog zašto se ovakvi sustavi nazivaju linearni (a). Digitalni sustavi daju sigmoidalnu krivulju, a do aktivacije sustava dolazi tek pri određenoj koncentraciji liganda.

2.4. Detekcija trajanja ulaznog signala

Sustav koji može razlučiti prolazni od ustaljenog ulaznog signala posjeduje veću preciznost i neće uzaludno trošiti energiju stanice na procese koji joj u tom trenutku nisu potrebni. Jedan od načina na koji signalni sustavi unutar stanice raspoznaju signale različitih trajanja je preko mrežnog motiva „coherent feed forward“. U takvom mrežnom motivu izlazni odgovor nekog uzvodnog čvorišta se grana na dva različita puta, koji se ponovno ujedine kako bi na jednak način regulirali nizvodno čvorište (Slika 8.). Dva karakteristična svojstva omogućuju ovom tipu mrežnog motiva razlikovanje prolaznog od dugotrajnog ulaznog signala:

- 1) brzina putovanja signala niz grane različitih puteva „coherent feed forward“ mrežnog motiva se mora razlikovati (aktivacija jedne grane je brza, a druge spora);
- 2) nizvodno čvorište (u kojem se grane dva različita puta ujedinjavaju) mora djelovati po principu sklopa I (AND), koji se aktivira samo kada obje grane različitih puteva „coherent feed forward“ mrežnog motiva istovremeno prenesu pozitivan signal.

Ovakav sustav proizvodi izlazni odgovor samo kada je stimuliran ulaznim signalom čije je trajanje dulje od vremenske razlike između grana dvaju puteva. Ukoliko je trajanje ulaznog signala kraće od te vremenske razlike, brza grana će se aktivirati i poslati svoj izlazni odgovor nizvodnom čvorištu, a spora grana će se aktivirati tek nakon određenog vremenskog perioda, što znači da nizvodno čvorište neće proizvesti izlazni odgovor, jer signali ovih dviju grana nisu stigli u isto vrijeme (Slika 8.).



Slika 8. Lijevo je prikaz brze i spore grane mrežnog motiva „coherent feed forward“ i čvorišta koje poput sklopa I prepoznaje signale tih grana. Desno je prikazan graf koji uspoređuje brzine putovanja signala niz grane te ovisnost pojave izlaznog odgovora o usklađenosti oba signala (preuzeto i prilagođeno prema Alon 2007).

Princip djelovanja mrežnog motiva „coherent feed forward“ možemo uočiti na primjeru regulacije ekspresije gena čiju transkripciju potiče transkripcijski faktor Fos. Fos se ponaša poput sklopa I (AND). Za aktivaciju ovog transkripcijskog faktora potrebna su dva ulazna signala: jedan signal uključuje njegovu proteinsku ekspresiju, a drugi signal ga stabilizira, budući da je proteolitički nestabilan. Ova dva ulazna signala aktiviraju protein Erk (kinaza regulirana izvanstaničnim signalom), različitom brzinom. Brzi put je izravna fosforilacija transkripcijskog faktora Fos, Erk kinazom čime se njegova stabilnost povećava. Spori put uključuje reakcije u kojima Erk fosforilira intermedijarne transkripcijske faktore koji povećavaju transkripciju Fos gena, što rezultira povećanom koncentracijom faktora Fos. Do ekspresije gena reguliranih Fos faktorom će doći samo kada je koncentracija aktivirane Erk kinaze ustaljena kroz određen vremenski period, jer će tek tada moći djelovati na ekspresiju faktora Fos i stabilizirati ga (Murphy i sur. 2002).

3. IZLAZNI ODGOVOR

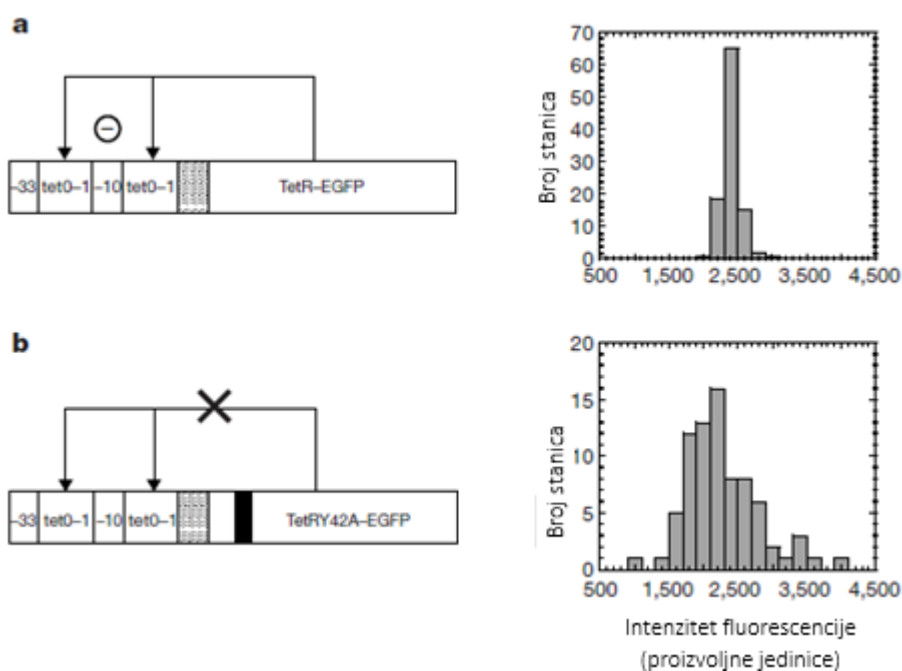
Kako bi signalni sustavi mogli pouzdano i usklađeno funkcionirati moraju biti u stanju regulirati količinu izlaznog odgovora, ali i trajanje tog odgovora.

3.1. Modificiranje količine izlaznog odgovora

Ulazni signali se često proizvode u niskim koncentracijama, ali ipak uspjevaju utjecati na ponašanje cijele stanice. Ova pojava je moguća zahvaljujući amplifikaciji. Amplifikacija je proces kojim iz niske koncentracije ulaznih signala dobijemo visoku koncentraciju izlaznih odgovora korištenjem enzima. Jedan aktivirani enzim može aktivirati mnoštvo molekula supstrata, a lančanim povezivanjem više enzima u kaskadni mrežni motiv dobivamo niz reakcija u kojima se enzimi međusobno aktiviraju čime amplificiraju izlazni odgovor. Kaskadni motiv će imati amplificirajući učinak samo kada je koncentracija svakog nizvodnog enzima veća od njegovog uzvodnog aktivatora i ukoliko enzimi mogu slobodno difundirati unutar stanice. Primjer ovakvog motiva je signalni sustav koji koristi cAMP (3', 5'-ciklički adenozin monofosfat). Ulazni signal aktivira molekulu adenilil ciklaze koja može katalizirati pretvorbu velikog broja adenozin trifosfata u cAMP i pirofosfat. cAMP kao sekundarni glasnik dalje prenosi signal tako da aktivira protein kinazu A ili ionske kanale koji potom dalje šire pristigli signal.

Određenim signalnim sustavima je preciznost odgovora bitnija od njegovog širenja, stoga im je potreban način pomoću kojeg mogu prigušiti izlazni odgovor, kako bi ga vratili u ustaljeno stanje. Prigušivanje se može postići stvaranjem motiva negativne povratne sprege. U ovakvom motivu količina izlaznog odgovora sustava se ograničava tako da njegova vrijednost uvijek bude bliska ravnotežnom stanju, odnosno da ne ovisi o naglim promjenama u ulaznom signalu. Ovakav motiv imaju putevi koji koriste Ca^{2+} kao sekundarni glasnik. Uzvodni proteini ovakvih sustava aktiviraju ionske kanale na endoplazmatskom retikulumu koji propuštaju Ca^{2+} u citosol sve dok njegova koncentracija ne prijeđe 10^{-6} M. Pri toj koncentraciji se aktiviraju uniporterski kanali na mitohondrijskoj membrani koji primaju ione Ca^{2+} iz citosola. Bez ovakvog sustava koncentracija Ca^{2+} u stanici bi mogla doseći toksičnu razinu (Nelson i Cox 2013). Preciznost ovog mehanizma dokazana je i pokusom u kojem se pratila ekspresija dvije sintetski stvorene mreže genske ekspresije. Kontrolna mreža genske ekspresije se sastojala od gena fuzioniranog s GFP proteinom (kako bi se ekspresija gena

mogla mjeriti kao razina fluorescencije) pod kontrolom inducibilnog promotora na plazmidu i represora tog promotora čija je uloga regulacija transkripcije navedenog gena mehanizmom negativne povratne sprege (Slika 9 pod a). Druga mreža je bila istovjetna prvoj osim što je u promotor unesena mutacija zbog koje je postao inaktivan zbog čega sustav više nije autoreguliran (Slika 9 pod b). Indukcija promotora je u prvoj mreži pokazala veliku varijabilnost u intenzitetu fluorescencije između stanica, dok je indukcija promotora na drugoj mreži pokazala puno manju razliku u intenzitetu fluorescencije između stanica (Slika 9). Ova razlika postoji zbog toga što se u drugoj mreži, kada god ekspresija gena poraste iznad ravnotežnog stanja, dolazi do povećanja ekspresije inhibitora koji djeluje represivno na transkripciju tog gena. S druge strane kada se razina transkripcije gena spusti ispod ravnotežnog stanja, ekspresija inhibitora se smanjuje, što dovodi do povećane transkripcije gena (Becskei i Serrano 2000).

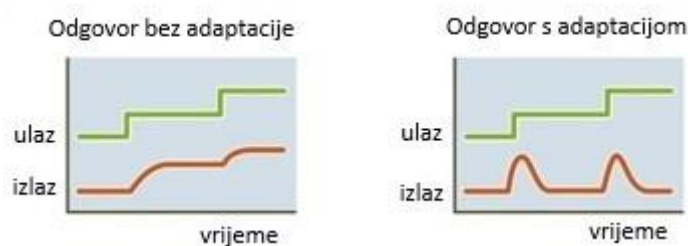


Slika 9. (a) Prikaz sintetski napravljene mreže genske ekspresije koja se sastoji od gena fuzioniranog s proteinom GFP i represorom koji mehanizmom negativne povratne sprege vrši autoregulaciju sustava. Desno je prikazana distribucija opažene fluorescencije po stanicama. (b) Prikaz neregulirane mreže genske ekspresije koja je istovjetna onoj pod a izuzev mutiranog i nefunkcionalnog represora. Desno je prikazana distribucija fluorescencije po stanicama koja za razliku od one pod a značajno varira od stanice do stanice (preuzeto i prilagođeno prema Becskei i Serrano 2000).

3.2. Trajanje izlaznog odgovora

Izlazni odgovori mogu biti prolazni, odnosno trajati sve dok ima ulaznog signala, mogu trajati i kraće od trajanja ulaznog signala, ali mogu biti i dugotrajni, odnosno trajati čak i kada je ulazni signal nestao.

Adaptacija je svojstvo koja omogućuje sustavima unutar stanica da trajanje izlaznog odgovora bude kraće od trajanja ulaznog signala. Naime, kad je sustav izložen ustaljenom ulaznom signalu, najprije će izlazni odgovor proporcionalno povećati, a nakon određenog perioda će se vratiti na bazalnu razinu, usprkos tome što se amplituda ulaznog signala nije smanjila (Slika 10.). Glavna značajka ovog svojstva je što omogućava sustavima da njihov izlazni odgovor bude proporcionalan relativnoj promjeni amplitude ulaznog signala, umjesto apsolutnoj, zbog čega takav sustav može odgovoriti na puno veći raspon ulaznih signala. Drugim riječima, adaptacija omogućava sustavima da dinamično povećaju raspon ulaznih signala koje su sposobni detektirati i na njih odgovoriti, zbog čega je ovo svojstvo osnova većine osjetljivih sustava.



Slika 10. Sustavi koji nemaju svojstvo adaptacije pokazuju porast izlaznog odgovora proporcionalan porastu ulaznog signala dok ne dođe do zasićenja. Sustavi sa svojstvom adaptacije prilikom povećanja amplitude ulaznog signala privremeno povećaju izlazni odgovor nakon čega se amplituda izlaznog odgovora vraća na bazalnu razinu, čak i kada riječ o ustaljenom ulaznom signalu (preuzeto i prilagođeno prema Lim i sur. 2014).

Postoje dvije vrste mrežnih motiva kojima se adaptacija može ostvariti:

- 1) pomoću motiva negativne povratne sprege ili
- 2) preko mrežnog motiva „incoherent feed forward“.

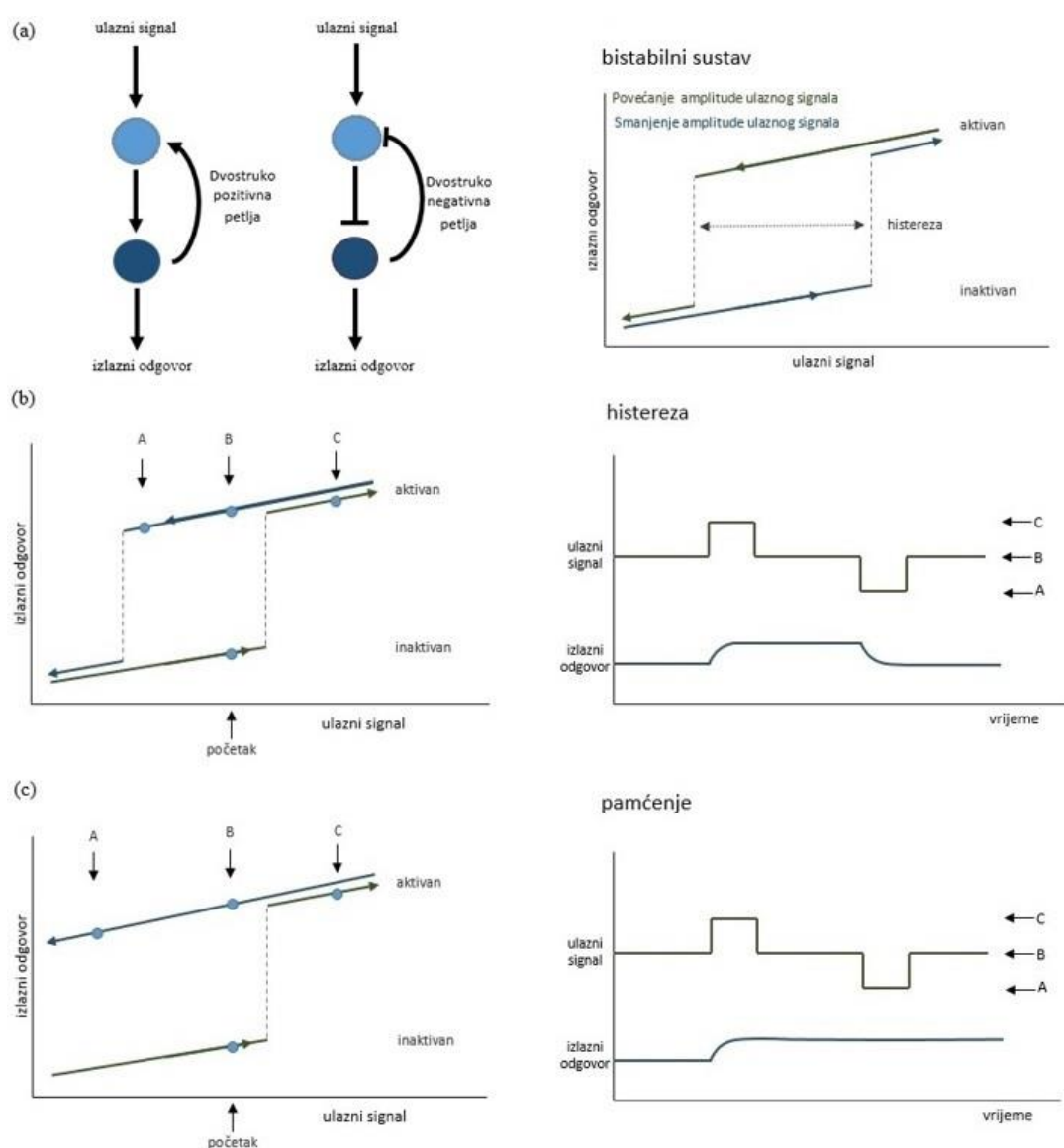
Motiv negativne povratne sprege ublažava izlazni odgovor pomoću regulatornog čvorišta koje inhibira uzvodnu signalizaciju čime smanjuje proizvodnju izlaznog odgovora na bazalnu razinu. Na regulatorno čvorište djeluju dva enzima, jedan enzim je produkt izlaznog

odgovora, a drugi poništava učinak prvog. Za funkciju ovog sustava je ključno da oba enzima budu zasićena, odnosno koncentracija supstrata mora biti veća od K_m (Michaelisove konstante) oba enzima, kako bi aktivnost regulatornog čvorišta ovisila samo o aktivnosti enzima koji je produkt izlaznog odgovora, a ne o koncentraciji supstrata, i da reakcija stvaranja izlaznog odgovora brža od reakcije aktivacije regulatornog čvorišta. Na primjer, kada se amplituda ulaznog signala poveća, privremeno se poveća i količina izlaznog odgovora jer je reakcija inhibicije spora, nakon toga izlazni odgovor aktivira regulatorno čvorište koje inhibira uzvodnu signalizaciju, što dovodi do smanjenja količine izlaznog odgovora na početnu razinu.

Mrežni motiv „incoherent feed forward“ sastoji se od dviju grana koje imaju suprotno djelovanje na čvorište koje proizvodi izlazni odgovor. Prva grana, ujedno i brža grana, predstavlja receptorsko čvorište koje prenosi aktivacijski signal do regulatornog čvorišta i do čvorišta koje proizvodi izlazni odgovor. Drugu, sporiju granu čini regulatorno čvorište koje negativno regulira čvorište koje proizvodi izlazni odgovor proporcionalan snazi ulaznog signala, zbog čega se količina izlaznog odgovora vraća na ustaljenu razinu. Razlika u kinetici reakcija ovih dviju grana omogućava stvaranje veće količine izlaznog odgovora koja privremeno odstupa od ustaljene. Drugim riječima, ukoliko se amplituda ulaznog signala poveća, u početku će doći do povećanja količine izlaznog odgovora jer će receptorsko čvorište aktivirati čvorište koje proizvodi izlazni odgovor prije nego li regulatorno čvorište stigne pojačati inhibiciju čvorišta koje proizvodi izlazni odgovor. Ali kada regulatorno čvorište, proporcionalno povećanju amplitude ulaznog signala, pokrene inhibiciju, čvorište koje proizvodi izlazni odgovor će sniziti količinu izlaznog odgovora na početnu razinu (Ma i sur. 2009).

Složenim procesima kao što su razvoj i imunosni odgovor potrebna je trajna pohrana informacija odnosno pamćenje, što podrazumijeva pretvorbu privremenih ulaznih signala u trajni izlazni odgovor. Sustavi temeljeni na mrežnom motivu pozitivne povratne sprege su često bistabilni (Slika 11 pod a), odnosno mogu postajati u dva moguća stabilna stanja, a pokazuju i svojstvo histereze, tj. stanje sustava ovisi o početnim uvjetima i prethodnoj izloženosti ulaznim signalima (Slika 11 pod b). Ulazni signal pri kojem sustav prelazi iz jednog stabilnog stanja u drugo će se razlikovati ovisno je li došlo do porasta ili do smanjenja u amplitudi ulaznog signala. Ovakav sustav može pohraniti informacije tako da prijeđe iz stanja u kojem proizvodi niske količine izlaznog odgovora u stanje koje proizvodi velike

količine kad detektira kratkotrajni porast u amplitudi ulaznog signala. Ukoliko je amplituda ulaznog signala potrebna za prelazak sustava u osnovno stanje niža od bazalne amplitude, tada će količina izlaznog odgovora ostati povišena čak i kada se amplituda ulaznog signala spusti na bazalnu razinu. Količinu izlaznog odgovora možemo smanjiti samo ako sustav resetiramo, tj. vratimo ga u početno stanje-stanje u kojem proizvodi niske količine izlaznog odgovora. Sustav će se resetirati ukoliko se amplituda ulaznog signala smanji ispod bazalne razine (Slika 11 pod c). Valja napomenuti da se amplituda ulaznog signala potrebna za prijelaz u stanje veće proizvodnje razlikuje od amplitude potrebne za prijelaz u stanje niže proizvodnje (Burrill i Silver 2010).



Slika 11. (a) Sustavi s ova dva motiva pozitivne povratne sprege pokazuju svojstvo bistabilnosti tj. sustavi mogu postajati u aktivnom ili inaktivnom stanju. Također bistabilni sustavi pokazuju i svojstvo histereze, gdje se prelazak između mogućih stanja razlikuje ovisno

o tome povećava li se ili smanjuje amplituda ulaznog signala. (b) Sustav sa svojstvom histereze može pokazati oblik pamćenja kada prijeđe u aktivni oblik nakon porasta amplitude ulaznog signala (oznaka C) ukoliko je bazalna amplituda ulaznog signala (oznaka B) viša od amplitude potrebne da se sustav resetira (oznaka A), odnosno vrati u inaktivno stanje. (c) Trajna pohrana informacija odnosno pravo pamćenje pokazuje sustav koji ima ekstremno oblik histereze. U takvom sustavu nikakvo smanjenje amplitude ulaznog signala neće biti dovoljno da se sustav vrati u inaktivno stanje (preuzeto i prilagođeno prema Lim i sur. 2014).

4. ZAKLJUČAK

Opisivanje signalnih sustava pomoću teorije logičkih krugova čini razumijevanje njihovih mehanizama lakšim, pomaže prilikom njihove kvantifikacije i omogućava lakše predviđanje mehanizama kojima bi dosad neopisani sustavi mogli funkcionirati. Primjerice kompjutersko modeliranje signalnih puteva stanica karcinoma nam može pomoći da shvatimo na koje načine tumorske stanice izbjegavaju apoptozu ili postaju otporne na lijekove. Na temelju takvih modela znanstvenici mogu predvidjeti koliko bi lijeka bilo potrebno za terapiju specifičnog karcinoma kako bi pacijent primao minimalnu dozu lijekova umjesto, kako se danas liječe, s maksimalnom dozom koju može tolerirati. Smanjenje potrebne doze lijekova koji imaju teške nuspojave bez smanjenja njihove učinkovitosti bi značajno poboljšala današnje terapije (Kolch i sur. 2015). Osim u razumijevanju signalnih sustava, teorija logičkih krugova može doprinijeti i razvoju sintetičkih signalnih sustava s mnogobrojnim primjenama, kao što je logički sklop I koji poput senzora razlikuje maligne od zdravih stanica, te inducira njihovu smrt. Takav sklop se aktivira u prisutnosti dva transkripcijska faktora koja su u dostatnoj količini eksprimirana isključivo u malignim stanicama, a izlazni signal mu je transkripcija luciferaznog reporter gena ili indukcija stanične smrti (Nissim i Bar-Ziv 2010). Dizajnirane su i bakterijske stanice koje funkcioniraju u parovima, a potencijalno bi mogle detektirati onečišćenje u okolišu. Jedna stanica procesira toluen u benzen, a druga stanica zasvijetli kada detektira taj benzen (Silva-Rocha i de Lorenzo 2014). Na stanicama *E. coli* je pokazano da je moguće sastaviti 16 različitih sklopova s dva ulaza koji pokazuju dugotrajno pamćenje, u trajanju od najmanje 90 generacija (Siuti i sur. 2013). Na temelju dosadašnjih postignuća očigledno je da su logički krugovi izvrsna podloga za buduće inovacije u području biotehnologije, ekologije i medicine, zbog čega su daljnja istraživanja signalnih sustava u ovom kontekstu iznimno bitna.

5. LITERATURA

- Alon U. (2007): Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics* **8**: 450-461.
- Barabási L. A., Oltvai N. Z. (2004): Network biology: Understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* **5**: 101-113.
- Becskei A., Serrano L. (2000): Engineering stability in gene networks by autoregulation. *Nature* **405**: 590-593.
- Burrill D. R., Silver P. A. (2010): Making Cellular Memories. *Cell* **140**: 13-18.
- Galašev V., Brođanac P., Korać M., Miletić Lj., Grabusin S., Babić S., Soldo Z., Kralj L., Sokol G., Kovač D. (2009): *Informatika i Računalstvo*. SysPrint, str. 38-55.
- Kolch W., Halasz M., Granovskaya M., Kholodenko B. N. (2015): The dynamic control of signal transduction networks in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* **15**: 515-527.
- Lim W., Mayer B., Pawson T. (2014): *Cell Signaling*. Garland Science, str. 275-330.
- Ma W., Trusina A., El Samad H., Lim W. A., Tang C. (2009): Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation. *Cell* **138**: 760-773.
- Macian F., Lopez-Rodriguez C., Rao A. (2001): Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**: 2476-2489.
- Masoudi-Nejad A., Schreiber F., Kashani Z. R. (2012): Building blocks of biological networks: A review on major network motif discovery algorithms. *IET Systems Biology* **6**: 164-174.
- Mayer B. J. (2015): The discovery of modular binding domains: Building blocks of cell signaling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**: 691-698.

- Meek D. W., Anderson C. W. (2009): Posttranslational Modification of p53: Cooperative Integrators of Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**: a000950.
- Milo R., Shen-Orr S., Itzkovitz S., Kashtan N., Chklovskii D., Alon U. (2002): Network motifs: simple building blocks of complex networks. *Science* **25**: 824-827.
- Murphy L.O., Smith S., Chen R.H., Fingar D.C., Blenis J. (2002): Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biology* **4**: 556-564.
- Nelson D. L., Cox M. M. (2013): *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, str. 439-449.
- Nissim L., Bar-Ziv R. H. (2010): A tunable dual-promoter integrator for targeting of cancer cells. *Molecular Systems Biology* **6**: 444.
- Shao D., Creasy C.L., Bergman L.W. (1998): A cysteine residue in helixII of the bHLH domain is essential for homodimerization of the yeast transcription factor Pho4p. *Nucleic Acids Research* **26**: 710-714.
- Silva-Rocha R., de Lorenzo V. (2014): Engineering multicellular logic in bacteria with metabolic wires. *American Chemical Society Synthetic Biology* **3**: 204-209.
- Siuti P., Yazbek J., Lu T. K. (2013): Synthetic circuits integrating logic and memory in living cells. *Nature Biotechnology* **31**: 448-452.
- Voet D., Voet J. G. (2006): *Fundamentals of Biochemistry*. Wiley, str. 492.

6. SAŽETAK

Razvojem proteomike i genomike postalo je jasnije da su stanični procesi sačinjeni od velikog broja molekula koje mogu sudjelovati u više različitih procesa. Iz tog razloga su se istraživanja počela okretati od proučavanja zasebnih molekula k proučavanju čitavih mreža staničnih signalnih puteva. Teorija mreža je iznjedrila zaključak da su arhitektonski elementi svih kompleksnih mreža slični, bilo da je riječ o biološkim sustavima, tehnologiji ili društvenim mrežama. Takva univerzalnost je temelj ideje da su sve složene mreže vođene istim pravilima. Zahvaljujući ovoj ideji znanstvenici su počeli uočavati pravila koja reguliraju računalne mreže i u signalnim sustavima u stanici. Osnovnu jedinicu složene signalne mreže tj. čvorišta predstavljaju molekule, a usporedive su s logičkim sklopovima koji čine najosnovnije jedinice računala. Ovaj rad preko teorije logičkih sklopova objašnjava osnovne principe po kojima funkcioniraju već opisani signalni putevi, a koji su primjenjivi i prilikom opisivanja još uvijek neopisanih sustava te navodi moguće primjene ove teorije u području biotehnologije razvojem staničnih linija *E. coli* koje pokazuju dugoročno pamćenje, u ekologiji prilikom dizajniranja bakterija koje mogu detektirati okolišno onečišćenje i u medicini gdje mogu pomoći u selektivnom uklanjanju malignih stanica.

7. SUMMARY

Advancement in the fields of proteomics and genomics made it obviously clear that most biological characteristics arise from complex interactions of numerous molecular constituents inside a cell. Research that followed this advancement was no longer based on studying individual molecules instead focusing on signaling networks. Network theory proposed that architectural features of complex networks were shared by all complex systems, such as molecular networks, computer chips and social networks. This universality was a key idea behind the usage of well described logic circuits in characterizing signaling pathways. Basic components of complex signaling networks are molecules that represent nodes in the network, similarly to logic gates that are the basic component of a computer network. This paper uses the theory behind logic circuits to describe principles that govern already established signaling pathways, which can later be used to describe the mechanism of unknown pathways as well as possible applications of this theory in fields of biotechnology when designing *E. coli* strains that show long term memory, in ecology when designing bacterial cells that can detect environmental pollution and medicine where it can be used to induce cell death exclusively in cancer cells.