

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO

Oddelek za fiziko

DIPLOMSKO DELO

Rene Markovič

Maribor, 2011

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO

Oddelek za fiziko

Diplomsko delo

PRIMERJAVA MED PRENOSOM SIGNALA V BIOLOŠKIH IN ELEKTRIČNIH SISTEMIH

Mentor:

doc. dr. Vladimir Grubelnik

Kandidat:

Rene Markovič

Somentor:

red. prof. dr. Marko Marhl

Maribor, 2011

ZAHVALA

Za pomoč in svetovanje pri opravljanju diplomskega dela se zahvaljujem mentorju doc. dr. Vladimirju Grubelniku in somentorju red. prof. dr. Marku Marhlu ter ostalim pedagoškim sodelavcem.

Zahvalil bi se tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali pri diplomskem delu in me podpirali skozi celotni študij.

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA NARAVOSLOVJE IN MATEMATIKO

IZJAVA

Podpisani Rene Markovič, roj. 22. 06. 1985, študent Fakultete za naravoslovje in matematiko Univerze v Mariboru, študijskega programa enopredmetna fizika, izjavljam, da je diplomsko delo z naslovom

Primerjava med prenosom signala v bioloških in električnih sistemih

pri mentorju doc. dr. Vladimirju Grubelniku in somentorju red. prof. dr. Marku Marhlu, avtorsko delo. V diplomskem delu so uporabljeni viri in literatura korektno navedeni; teksti in druge oblike zapisov niso uporabljeni brez navedbe avtorjev.

(podpis študenta)

Maribor, 13. 6. 2011

POVZETEK

V diplomski nalogi primerjamo prenos signalov v bioloških in električnih sistemih. Osredotočili smo se na znotrajcelično signalizacijo, kjer obstajajo signalne poti, sestavljene iz proteinskih kaskad. Z matematičnim modelom smo opravili različne numerične simulacije in analizirali vlogo proteinskih kaskad pri prenosu signala v znotrajceličnem prostoru. Te vloge smo primerjali z različnimi električnimi sistemi, katerih delovanje je dobro znano in ga lahko opišemo matematično. Namen takšnih primerjav je bolje razumeti vloge signalnih poti v znotrajceličnem prostoru. Primerjave temeljijo na numeričnih izračunih in primerjavah diferencialnih enačb, ki tvorijo matematični modeli za opis delovanja določenega sistema. V diplomskem delu je pokazano, da lahko proteinski kaskadi dodelimo lastnosti stikala, ki ojačuje signal in deluje kot nizkofrekvenčno prepustno sito. Pokazali smo tudi, da lahko z uporabo pozitivne povratne zanke aktivnemu stikalu povečamo ojačanje, zmanjšamo mejno frekvenco in povečamo njegovo nestabilnost. Kadar v sistem vključimo negativno povratno zanko, povečamo stabilnost sistema, povečamo mejno frekvenco in zmanjšamo ojačanje. Izdelali smo tudi biološka logična vrata, ki temeljijo na logičnih operacijah v digitalni elektroniki. Z uporabo teh logičnih vrat smo izdelali še spominsko vezje, ki lahko pomni 1 bit podatkov.

KLJUČNE BESEDE: matematično modeliranje, proteinska kaskada, elektronika, prenos signala, ojačitve signala, nizkofrekvenčno prepustno sito, logična vrata, spominsko vezje.

ABSTRACT

In this thesis signal transduction pathways in biological and electrical systems are analyzed and compared. The main goal is to analyze intercellular signalization, in particular the pathways consisting of protein cascades. The protein cascades are studied by using mathematical models of signal transduction systems. The biological systems are compared with analogous electrical systems, which are well known and can easily be mathematically described. The main idea of comparing these systems is to gain better knowledge of the functioning of signaling pathways in the intercellular space. The comparison is based on numerical simulations and direct looking for analogies of the differential equations consisting the mathematical models of particular systems. We show that the protein cascades can function as switches that amplify signals and also serve as a low-frequency filter. Furthermore, we show that by introducing a positive feedback loop into an active switch, we can increase its gain, reduce the cutoff frequency and increase the instability of the system. On the other hand, if a negative feedback is applied, the system becomes more stable, the cutoff frequency rises and its gain drops. We also constructed biological logical gates, which are based on logical procedures used in digital electronics. On the basis of these gates, we designed a memory module, which can store 1 bit of information.

KEY WORDS: mathematical modeling, protein cascades, electronics, signal transduction, signal amplification, low-frequency filter, logical gate, memory module.

KAZALO

1 UVOD	1
2 SIGNALIZACIJA V BIOLOŠKIH SISTEMIH	3
2.1 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALIZACIJA.....	5
2.1.1 PROTEINSKE KASKADE	6
2.1.2 MATEMATIČNI MODEL PROTEINSKIH KASKAD	7
3 PRENOS SIGNALA V ELEKTRIČNIH SISTEMIH	10
4 PRIMERJAVA PRENOSA SIGNALA V BIOLOŠKIH IN ELEKTRIČNIH SISTEMIH	13
4.1 STIKALA.....	14
4.1.1 VKLOPNO—IZKLOPNE KARAKTERISTIKE.....	15
4.1.2 ULTRASENZITIVNOST	24
4.2 OJAČEVALNIKI.....	27
4.3 FREKVENČNI FILTRI.....	35
4.4 POVRATNE VEZAVE	43
4.4.1 POZITIVNA POVRATNA VEZAVA	44
4.4.2 NEGATIVNA POVRATNA VEZAVA	50
4.5 DIGITALNI SISTEMI.....	53
4.5.1 LOGIČNA VRATA	55
4.5.1.1 <i>NE</i> vrata	56
4.5.1.2 <i>ALI</i> vrata.....	58
4.5.1.3 <i>IN</i> vrata.....	60
4.5.2 SPOMINSKA VEZJA.....	62
4.5.2.1 <i>RS FLIP-FLOP</i>	62
5 ZAKLJUČEK	65
6 VIRI IN LITERATURA	68

1 UVOD

Tema diplomskega dela je iz področja matematičnega modeliranja dinamičnih sistemov v okviru znotrajcelične signalizacije. Celična signalizacija je eden od odločilnih procesov za delovanje bioloških sistemov, saj se s prenosom celičnih signalov uravnavajo številne celične funkcije. Poudarek je na mitogensko aktiviranih proteinskih kaskadah (MAPK), ki imajo pomembno vlogo v znotrajcelični signalizaciji [1]. Okoli leta 1960 je bilo znano, da lahko ta znotrajcelična signalizacijska pot deluje kot ojačevalec signala. 1972. leta so se pričele raziskovati še druge lastnosti takšnih kaskadnih mrež. Nove ideje o vlogi in razlage delovanja proteinskih kaskad, ki so sledile, so bile posledica primerjav z znanimi tehničnimi mehanizmi, katerih delovanje je dobro znano [2].

V diplomskem delu bo narejena primerjava vloge mitogensko aktiviranih proteinskih kaskad pri prenosu signala v znotrajceličnem prostoru z vlogo nekaterih električnih sistemov, ki se uporabljajo pri prenosu in procesiranju signalov, saj je delovanje teh znano in matematično dokaj enostavno opisljivo.

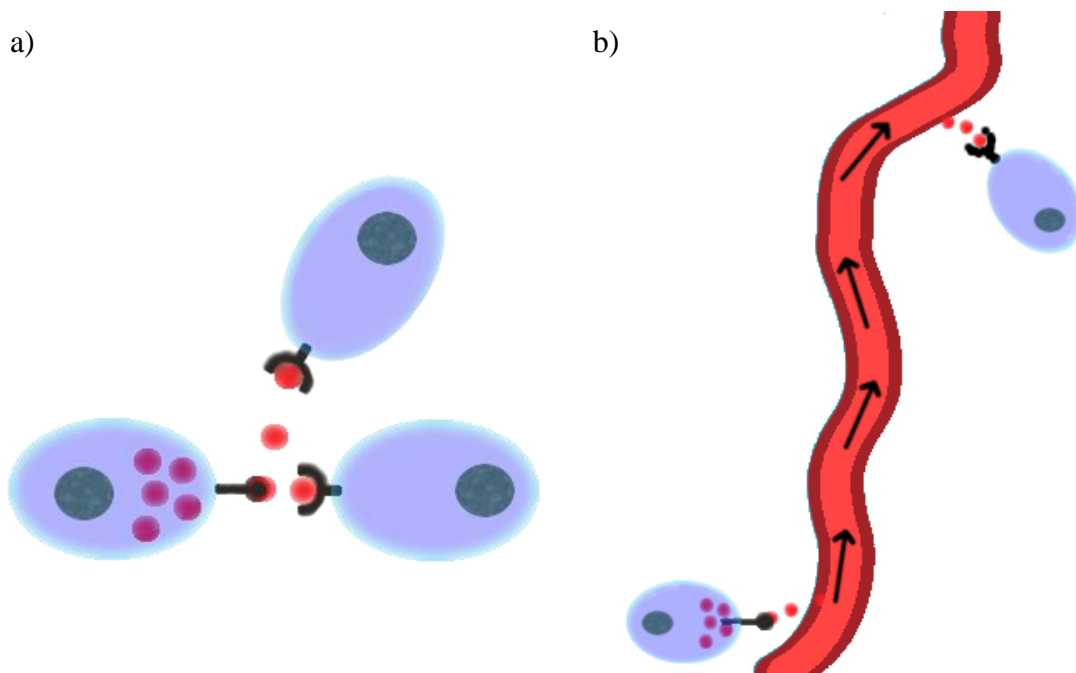
Namen diplomskega dela je, da na podlagi matematičnega modeliranja naredimo direktno primerjavo delovanja celične signalizacije s prenosom signalov v tehniki, kar nam omogoča boljše razumevanje prenosa signala v bioloških sistemih.

V delu bo zajeta signalizacija v bioloških sistemih, kjer bo izpostavljena vloga določenih delov tega sistema pri generiranju in prenosu signala na medcelični in znotrajcelični ravni. Sledil bo opis znotrajcelične signalizacijske poti, ki je sestavljena iz proteinskih kaskad. Zanje bo oblikovan matematični model za pridobitev rezultatov simulacij biološkega sistema. V nadaljevanju bo predstavljena signalizacija v električnih sistemih. Sledila bo primerjava vhodno—izhodnih karakteristik ter izhodnih karakteristik v časovnem in frekvenčnem prostoru med proteinsko kaskado in električnim sistemom. V sklopu primerjav se bomo osredotočili na stikalne lastnosti in proteinsko kaskado primerjali s tranzistorjem, saj se ta v mnogih vezjih uporablja kot stikalni element. Zaradi kompleksnosti tranzistorja bomo bistveno lastnost, ki vpliva na

kvaliteto stikala, predstavili z RC členom, na podlagi katerega bomo dobljene rezultate lažje primerjali. V sklopu primerjave bo predstavljena ultrasenzitivnost. Sledile bodo ojačevalne lastnosti proteinskih kaskad. Te lastnosti so značilne tudi za določene električne sisteme. V diplomskem delu bo uporabljen navadni operacijski ojačevalnik z napetostnim delilnikom v pozitivni povratni zanki. Tako bomo lahko primerjali vlogo konstant iz dobro raziskanega električnega sistema s konstantami v matematičnem modelu proteinskih kaskad. Sledila bo primerjava proteinske kaskade z nizkofrekvenčnim prepustnim filtrom. Ta se v elektroniki uporablja za izločanje šumov ali informacij, ki so nanesene na vhodni signal. Prikazano bo, da je vloga proteinskih kaskad v znotrajcelični signalizaciji podobna vlogi nizkofrekvenčno prepustnega sita, ki bo izdelan v pasivni in aktivni obliki. Opis nizkofrekvenčno prepustnega filtra bo nadgrajen z vpeljavo povratne vezave. Nadaljevali bomo s prikazom, kako se lahko oblikuje teoretični model za proteinske kaskade, ki ima lastnosti osnovnih elementov v digitalni elektroniki. Tako bodo izdelani teoretični modeli za IN, NE ter ALI vrata in kot zadnje RS-FF, ki se uporablja kot pomnilna enota. Po opravljeni primerjavi bo sledil povzetek dobljenih rezultatov in diskusija.

2 SIGNALIZACIJA V BIOLOŠKIH SISTEMIH

Biološki sistemi morajo biti prilagojeni okolici, v kateri bivajo. V teku milijard let se je življenjsko okolje močno spreminjalo in posledično so se biološki sistemi morali nenehno prilagajati na nove pogoje. Kljub nenehnih variacijam življenjskega prostora in mutacijam bioloških sistemov [3], je bila vsaka generacija bolj prilagojena na svoj biotop [4]. Pomemben člen pri regulaciji odzivov v bioloških sistemih glede na okolje, v katerem se ta nahaja, predstavlja celična signalizacija. Ta lahko poteka na medcelični ravni na več načinov. Celice lahko komunicirajo z bližnjimi celicami preko lokalnih posrednikov in kontaktnih molekul. Med oddaljenimi celicami skrbita za njihovo usklajeno delovanje živčni sistem in endokrini sistem [5]. Na sliki (1) sta prikazana načina komunikacije na medcelični ravni.



Slika 1. Prikaz medcelične signalizacije a) med sosednjimi molekulami in b) med oddaljenimi molekulami.

Pri zaznavanju okolice imajo ključno vlogo čutila, ki so del živčnega sistema. Razdelimo ga lahko na osrednji živčni sistem in obkrajni ali periferni živčni sistem. Prvega pri vretenčarjih sestavljajo možgani in hrbtenjača. Periferni živčni sistem pa

sestavljajo vsi ostali živci in nevroni. V živčnem sistemu se prekomerno nahajajo nevroni, ki jih imenujemo primarne celice. Informacije se lahko prenašajo po živčevju na dva načina, in sicer po živčnih vlaknih, kjer se prenaša informacija z akcijskim potencialom, ki je posledica prepustnosti membrane na posamezne ione, in s širjenjem informacij preko sinaps z difuzijo živčnega prenašalca oz. neurotransmitorja. V splošnem velja, da so učinki živčnega sistema hitri in kratkotrajni [6]. Zraven živčnega sistema, ki deluje kot most med zunanjim svetom in notranjostjo biološkega sistema, je potrebno omeniti tudi endokrini sistem. Njegova funkcija je opravljanje z žlezami, ki izločajo kemijske spojine, imenovane hormoni. K endokrinemu sistemu spadajo hipotalamus, hipofiza, češerika, ščitnica, obščitnica, srce, želodec in črevesje, jetra, trebušna slinavka, nadledvične žleze, ledvica ter koža. Za razliko od živčnega sistema ta sistem opravlja počasne in dolgotrajne regulacije. Hormoni potujejo po ožilju do celic, kjer sprožijo specifičen odziv celice za določen hormon. Oba sistema sta med seboj povezana in delujeta usklajeno [7].

Osnovi element te kompleksne mreže je celica. Ta je obdana s plazemsko membrano, ki je neprepustna za večino kemikalij, s katerimi pride v stik, in hkrati izolira celico od okolice. Na membrani sami so prisotni receptorji, ki zaznavajo le določene hormone ali spojine, na katere se celica odziva [8,9]. Receptorji celice delujejo kot senzorski sistem, ki spremlja okolico. Če pride v njej do spremembe, se ta informacija posreduje v notranjost celice, katera se na spremembo primerno odzove. Mehanizmi, ki so vključeni v ta proces, spadajo v znotrajcelično signalizacijo, ki bo predstavljena v nadaljevanju.

2.1 ZNOTRAJCELIČNA SIGNALIZACIJA

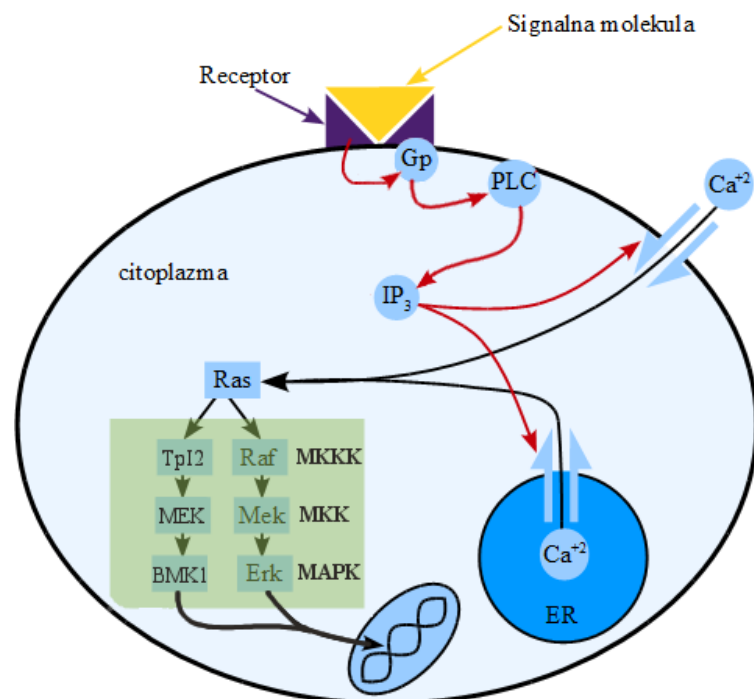
Procesi v znotrajceličnem prostoru, ki so posledica aktivacije določenega receptorja na celični membrani, so odvisni od kompleksnosti celice. Med manj kompleksne organizme spadajo prokarioti, enocelični organizmi. V njih se signal najpogosteje prenaša preko enega proteina [10]. Kompleksnejše grajeni organizmi pa so evkarioti. Ko receptorji teh celic zaznajo nek dražljaj, sprožijo različne nize stimulatorjev oziroma sekundarnih prenašalcev informacij. V isto skupino spada tudi kalcij [11], vloga katerega je bila v znotrajcelični signalizaciji prvič eksperimentalno prikazana z vbrizgavanjem kalcija v mišico žabe leta 1947. Posledica je bila kontrakcija mišičnih celic. Podoben poskus so izvedli tudi z magnezijem, natrijem in kalijem, vendar omenjenega pojava niso opazili [12]. Kasneje so ugotovili, da so oscilacije kalcija v citosolu posledica stimulacije celičnih receptorjev preko hormonov, nevrotansmitorjev ali pa membranskega potenciala [13].

Ob signalnih molekulah pri prenosu signala v znotrajceličnem prostoru sodelujejo tudi signalne kaskade, med katere sodijo proteinske kaskade. Signal se po proteinskih kaskadah prenaša s fosforilacijo proteinov. Signalna kaskada je lahko sestavljena iz več proteinov, naloga katerih je med drugimi tudi ojačanje določenega vhodnega signala kot je koncentracija prostega kalcija v citosolu, kar bo kasneje tudi prikazano. Izpostavljene bodo nekatere druge lastnosti proteinskih kaskad, ki jih bomo primerjali s sistemi v elektroniki. Takšne primerjave omogočajo boljše razumevanje mehanizmov, ki so prisotni v znotrajcelični signalizaciji, in vpliva na proces prenosa informacij. Delovanje elementov, ki se uporabljajo v elektroniki, in sistemov, ki so sestavljeni iz njih, je dobro raziskano. Zaradi podobnosti nekaterih karakteristik v obeh sistemih se skuša znanje prenesti iz enega področja na drugo in tako omogočiti bolj poglobljeno razumevanje delovanja mehanizmov, prisotnih v znotrajceličnem prostoru. Za primerjanje obeh sistemov je potrebno predstaviti matematični model za MAPK znotrajcelično signalizacijsko pot, ki bo predstavljena v nadaljevanju.

2.1.1 PROTEINSKE KASKADE

V znotrajceličnem prostoru obstajajo t.i. signalne poti, preko katerih se signal prenaša in procesira. V diplomskem delu se bomo osredotočili na Raf-Mek-Erk signalno pot, ki je znana pod imenom mitogensko aktivirane proteinske kaskade ali krajše MAPK, in na delovanje ene proteinske kaskade znotraj te signalizacijske poti. Možen scenarij, ki aktivira MAPK signalizacijsko pot, je prikazan na sliki (2).

Aktivacija določenega receptorja, ki se nahaja na zunanji strani celične membrane, je odvisna od signalne molekule. Če je molekula hormon ali nevrottransmitor, se ta veže na receptor na zunanji strani membrane, ki aktivira G protein na notranji strani membrane. Posledica aktivacije tega je aktivacija fosfolipaze C (PLC). Ta sproži sintezo sekundarnih prenašalcev diacilglicerola (DAG) in inozitol trifosfata (IP_3). Slednji aktivira receptor, povezan z ionskimi kanali, ki povzročijo porast kalcija v notranjosti celice. Kalcij prične prihajati tako iz zunajceličnega prostora kot tudi iz notranjosti celice. Posledica porasta kalcija je aktiviranje RAS proteina, ki aktivira MAPK signalizacijsko pot. Takšna aktivacija MAPK signalizacijske poti je le ena od mnogih.

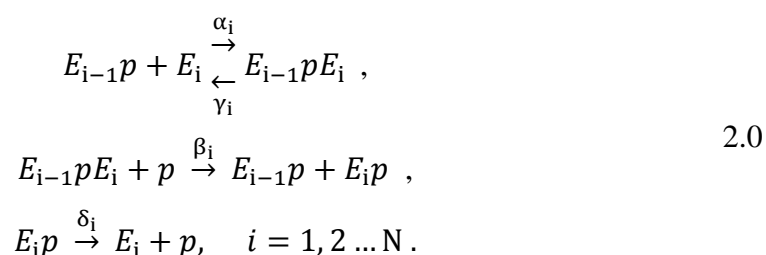


Slika 2. Aktivacija receptorja, povezanega z G proteinom, in MAPK signalizacijska pot.

Proteinske kaskade v znotrajcelični signalizaciji opravljajo več funkcij. Delujejo tudi kot nizkofrekvenčna prepustna sita in kot taka imajo lastnost dekodiranja frekvenčno kodiranega signala kot so oscilacije prostega kalcija v citoplazmi. V nadaljevanju bo predstavljen matematični model za proteinsko kaskado poljubne stopnje, ki ga bomo uporabljali za simuliranje delovanja znotrajcelične signalizacijske poti MAPK.

2.1.2 MATEMATIČNI MODEL PROTEINSKIH KASKAD

Znotrajcelična signalizacijska pot je sestavljena iz niza linearno razporejenih proteinskih kaskad, kot je prikazano na sliki (2). Posledica fosforilacije primarne kaskade (MKKK) je aktivacija naslednje kaskade (MKK). Ta proces omogoča prenašanje signala od primarne do terminalne kaskade (MAPK). V posameznem nizu lahko nastopi tudi defosforilacija, katere posledica je deaktivacija posamezne kaskade. V tem primeru se prenos informacij prekine. Signalna molekula S reagira s primarno kaskado E_1 , posledica te reakcije pa je kompleks SE_1 . Nastanek tega kompleksa je odvisen od sklopitvene konstante α_1 . Hkrati je možna tudi obratna reakcija, ki je odvisna od razklopitvene konstante γ_1 . Reakcijska konstanta β_1 določa fosforilacijo kinaze E_1 v kompleksu SE_1 . Tako nastane kompleks E_1p , ki ponazarja aktivno stanje kinaze. Ta je tako podvržena defosforilaciji, hitrost katere je odvisna od konstante δ_1 . Kompleks E_1p lahko nato deluje na naslednjo kinazo E_2 , kjer se omenjen proces ponavlja do terminalne oziroma zadnje kinaze. Omenjene reakcije lahko zapišemo kot:



V enačbi (2.0) predstavlja kompleks E_0p signalno molekulo S . A zapis procesa z reakcijsko enačbo (2.0) nam ne omogoča modeliranja dinamike sistema, zato moramo ta proces zapisati v obliki diferencialnih enačb. Za večjo preglednost le-teh bomo uporabili naslednje spremenljivke: $\tilde{z}_i = E_i$, $y_i = E_{i-1}pE_i$, $z_i = E_ip$ in $z_0 = S$.

Diferencialne enačbe, ki sledijo iz reakcijskih enačb, lahko zapišemo kot:

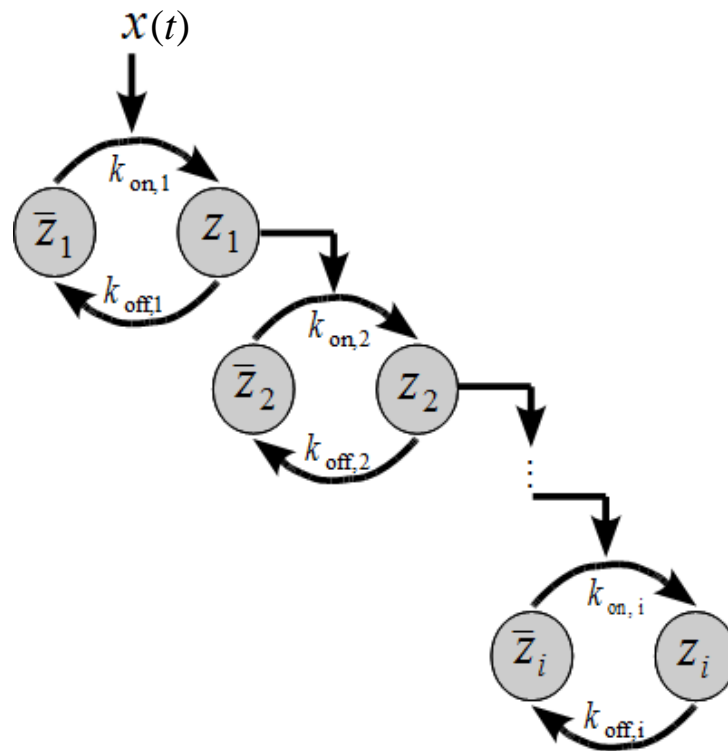
$$\begin{aligned}\frac{\partial \tilde{z}_i}{\partial t} &= -\alpha_i \tilde{z}_i z_{i-1} + \delta_i z_i + \gamma_i y_i \\ \frac{\partial y_i}{\partial t} &= \alpha_i \tilde{z}_i z_{i-1} - \beta_i p y_i - \gamma_i y_i\end{aligned}\tag{2.1}$$

$$\frac{\partial z_i}{\partial t} = \beta_i p y_i - \alpha_{i+1} \tilde{z}_{i+1} z_i + \beta_{i+1} p y_{i+1} + \gamma_{i+1} y_{i+1} - \delta_i z_i, \quad i = 1, 2 \dots N .$$

Enačbo (2.1) lahko poenostavimo, če upoštevamo, da je koncentracija kinaz in njenih kompleksov zanemarljiva v primerjavi s koncentracijo fosfata p , pri čemer je časovna sprememba koncentracije y_i zelo majhna ($\dot{y}_i \cong 0$). Z združitvijo konstant, ki vplivajo na razklopitev in sklopitev, lahko enačbo (2.1) še bolj poenostavimo. Zapišemo lahko diferencialno enačbo (2.2), ki opisuje način spreminjanja koncentracije aktiviranih proteinov v odvisnosti od časa za i -to kaskado:

$$\frac{\partial z_i}{\partial t} = k_{\text{on},i} z_{i-1} (z_{\text{tot}} - z_i) - k_{\text{off},i} z_i \quad ; \quad i = 1, 2 \dots N , \tag{2.2}$$

kjer je konstanta $k_{\text{on},i}$ določena z izrazom $\alpha_i \beta_i p / (\gamma_i + \beta_i p)$, konstanta $k_{\text{off},i}$ je enaka parametru δ_i , skupna koncentracija proteinov pa je označena z z_{tot} . Vrednost z_0 ponazarja signalizacijsko molekulo S , ki aktivira prvo kaskadno stopnjo znotraj MAPK-a. Koncentracija aktiviranih proteinov je označena z z , koncentracija neaktiviranih proteinov pa z \bar{z} . Vsota aktivnih in neaktivnih proteinov je vedno enaka skupni koncentraciji proteinov z_{tot} . Niz zaporednih proteinskih kaskad je prikazan na sliki (3).



Slika 3. N stopenjska proteinska kaskada. Signalna molekula je označena z $x(t)$.

Z enačbo (2.2) bomo simulirali vlogo znotrajcelične signalizacijske poti na prenos določenega vhodnega signala, ki ga bomo označili z $x(t)$ in bo ponazarjal signalizacijsko molekulo. Raziskali bomo vpliv konstant $k_{on,i}$ in $k_{off,i}$ na ojačanje vhodnega signala $x(t)$, ki je lahko časovno neodvisen ali pa se s časom spreminja. Signalizacijsko pot bomo analizirali v frekvenčnem prostoru, kjer bo razvidna vloga frekvenčnega sita, ki se v elektroniki uporablja v mnogih primerih za dekodacijo signala, na katerega so nanesene informacije. Ker bomo ta biološki sistem primerjali z električnimi sistemi, bo v nadaljevanju sledil opis poteka signalizacije v teh sistemih.

3 PRENOS SIGNALA V ELEKTRIČNIH SISTEMIH

Električni sistemi so oblikovani po namenu uporabe. To je izvedljivo, ker je delovanje posameznih elementov ali podsistemov, iz katerih je celotni sistem sestavljen, dobro znano in matematično opisljivo.

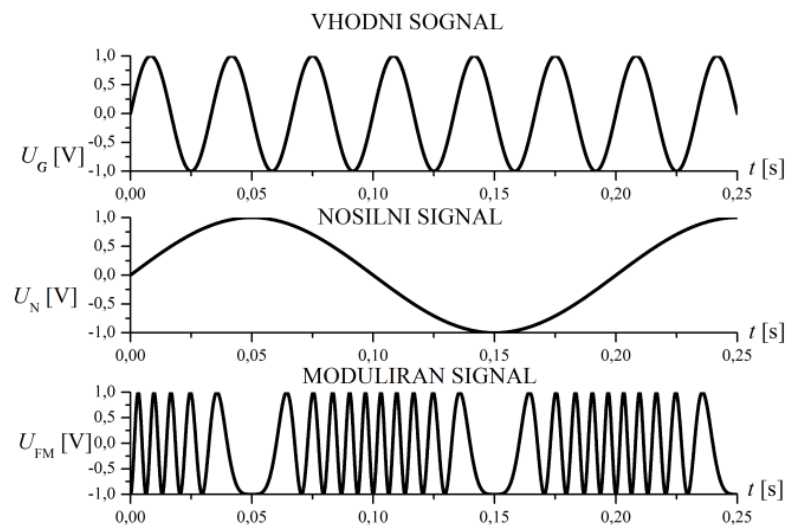
Večina električnih sistemov je zgrajenih za krmiljenje določenega procesa ali za opravljanje določenih funkcij. Tako so ti sistemi opremljeni z določenimi senzorji, ki zaznavajo svojo okolico in se na določene spremembe v njej ustrezno odzovejo. Nekateri električni sistemi so oblikovani tako, da lahko med seboj komunicirajo na daljavo ali pa med bližnjimi sistemi. Sredstvo, ki se uporablja za prenos signala je izbrano po določenih kriterijih, ki zajemajo ekonomski vidik izdelave in kvaliteto končnega izdelka.

V elektroniki se za procesiranje določenega signala, kjer ta navadno predstavlja določeno informacijo (osvetljenost, temperatura, ali katera druga fizikalna količina, ki jo želimo z električnim vezjem obdelati), uporabljajo tako kompleksni kot tudi manj kompleksni sistemi. Tako potrebujemo nek senzor, ki lahko te informacije zaznava in jih pretvori v amplitudo električne napetosti ali električnega toka, s čimer lahko nato dalje upravljamo. Senzor, ki lahko zaznava temperaturo, je lahko nek ohmski element, katerega dolžina se relativno močno spreminja s temperaturo, ali pa termistor, katerega upornost lahko z večanjem temperature narašča ali pada. Signal oziroma informacija, ki jo nek sistem pridobi s senzorji, predstavlja določeno časovno funkcijo neke fizikalne količine, ki je odvisna od ene ali od več spremenljivk. Pri načrtovanju vezja, ki služi procesiranju tega signala, je pomembno poznati obliko signala pri določenih vrednostih merjene količine, da ga lahko pravilno procesiramo.

Za primer uporabimo frekvenčno modulacijo tona. Kot senzor nam služi mikrofonski element, ki tlačne razlike zaradi frekvence tona spreminja v nihanje električne napetosti. Za frekvenčno modulacijo se navadno uporabljajo trije signali. Vhodni signal, ki je ton, nosilni signal in končni moduliran signal. Če bi za primer vhodnega signala vzeli nek ton, ki ga lahko opišemo s sinusno funkcijo, lahko te signale zapišemo kot:

- vhodni: $U_V(t) = \sin(2 \pi f_V t)$,
- nosilni: $U_Z(t) = \sin(2 \pi f_Z t)$,
- moduliran: $U_{FM}(t) = \sin(2 \pi (f_Z + df U_V(t))t)$.

Ker poznamo obliko vhodnega signala, ga lahko primerno obdelamo. Prednost takšne modulacije je v primerjavi z amplitudno modulacijo ohranjanje informacije, četudi se iz različnih razlogov amplituda moduliranega signala popači, saj je informacija nanosena na frekvenco.



Slika 4. FM moduliran signal. Vrednosti parametrov so $f_V = 30$ Hz, $f_N = 5$ Hz in $df = 5$ Hz.

Ko je vhodni signal frekvenčno moduliran, moramo najti način, kako informacijo, ki je nanosena v frekvenci, izločimo iz nje. Zato se uporabljajo frekvenčna sita, kot na primer RC, RL, LC in RLC, ki lahko prepuščajo samo nizke frekvence ali samo visoke frekvence ali pa le določen frekvenčni pas.

Omenjen primer je le en način, s katerim lahko informacije prenašamo v elektroniki. Pri tem je potrebno omeniti tudi tranzistor, ki se uporablja v različne namene. V nekaterih vezjih deluje kot stikalo, v drugih kot ojačevalnik, najpogosteje pa kot osnovni element, katerega naloga je pomnjenje podatkov. Ko ga uporabljamo kot stikalo, izkoriščamo njegovo lastnost prevajanja (neprevajanja) vhodnih signalov, ki so večji (manjši) od njegove zaporne napetosti. Ob tem pogoju morajo stikala v relativno kratkem času

doseči stacionarno stanje in hkrati biti zelo občutljiva na spremembe vhodnega signala. Tranzistor te pogoje izpolnjuje in ravno zato ga tako pogosto najdemo med stikalnimi elementi.

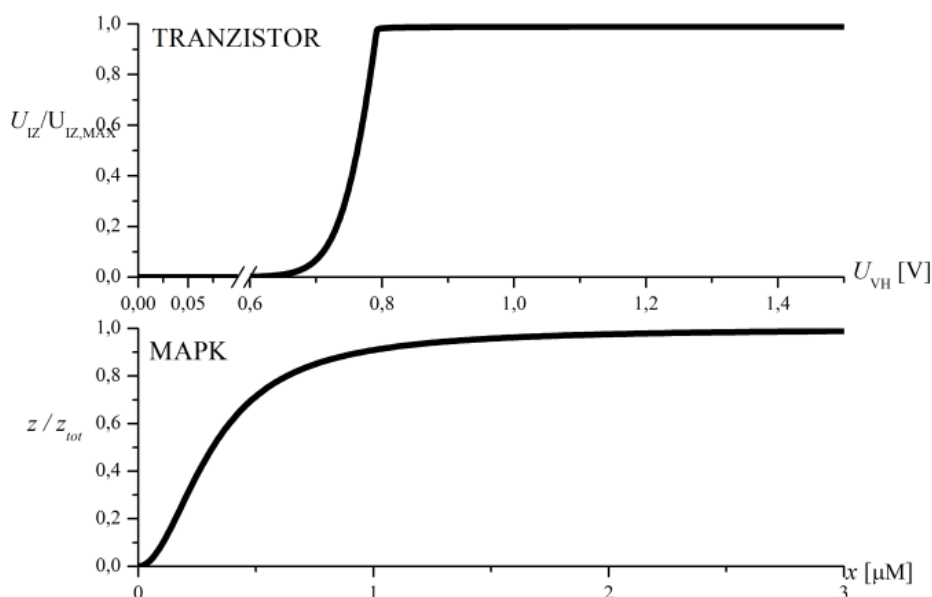
V električnih vezjih pogosto srečamo tudi povratne zanke. Njihov namen je, da še bolj poudarijo določeno želeno lastnost. Pozitivna povratna zanka poveča odzivnost sistema in hkrati njegovo nestabilnost. Negativna povratna zanka pa poveča stabilnost sistema in zmanjša odzivnost. Tudi v znotrajceličnih signalizacijskih poteh so prisotne tako pozitivne kot tudi negativne povratne zanke.

Opravičljivo je primerjati električni sistem z biološkim, saj lahko najdemo veliko podobnosti med njima. V nadaljevanju bodo sledile primerjave prenosa signala v bioloških in električnih sistemih, kjer bodo raziskane različne lastnosti znotrajcelične signalizacijske poti, ki so povezane z znanimi električnimi sistemi z enakimi lastnostmi.

4 PRIMERJAVA PRENOSA SIGNALA V BIOLOŠKIH IN ELEKTRIČNIH SISTEMIH

Pri prenosu signala lahko v električnih sistemih sodeluje več različnih podsistemov. Vsak od teh ima določeno funkcijo. Naloga enega je ojačanje signala, naloga drugega podsistema je, da izloča šum, ki je prisoten v signalu, itd. V tem poglavju bomo uporabili različne elektronske sisteme, ki bodo med prenosom signala, le-tega na določen način obdelali. Te sisteme bomo primerjali s proteinsko kaskado in med temi primerjavami spoznavali nekatere funkcije, ki jih proteinska kaskada opravlja med prenosom signala v znotrajcelični signalizaciji.

Če dodelimo proteinski kaskadi naziv osnovnega elementa v znotrajcelični signalizacijski poti, lahko za električni sistem ta naziv dodelimo tranzistorju. Najpogosteje se tranzistor uporablja, predvsem v digitalni elektroniki, kot stikalo in kot tak lahko deluje le na dveh področjih (lahko je popolnoma prevoden ali popolnoma neprevoden). Tudi proteinske kaskade lahko delujejo na enak način. Ena izmed poglobitnih podobnosti je vhodno—izhodna karakteristika tranzistorja in proteinske kaskade, ki je prikazana na sliki (5). V obeh primerih je iz vhodno—izhodne karakteristike razvidno, da majhna porast vhodnega signala izzove veliko spremembo izhodnega signala. Ta lastnost je znana kot ultrasenzitivnost in je zaželen pri stikalnih elementih [14,15]. Priporočljivo je tudi, da imajo stikala majhne vklopne in izklopne čase, saj s tem ohranjajo obliko signala in posledično tudi informacije, ki jih signal vsebuje.



Slika 5. Vhodno—izhodna karakteristika tranzistorja (2N3904) in proteinske kaskade.

V nadaljevanju bomo predstavili proteinsko kaskado kot stikalo in jo primerjali z električnim stikalnim sistemom. Predstavili bomo pomen časa aktivacije in deaktivacije stikala ter faktorje, ki vplivajo na ta časa tako za biološki kot tudi električni sistem. Vpeljali bomo hillov koeficient, ki se uporablja kot merilo ultrasenzitivnosti. Nato se bomo posvetili ojačevalnim lastnostim proteinske kaskade, predstavitvi proteinske kaskade v vlogi aktivnega nizkofrekvenčno prepustna sita, vplivu pozitivne in negativne povratne zanke na delovanje proteinske kaskade in izdelavi logičnih vrat ter spominskega vezja iz proteinskih kaskad. Pri obravnavi vsake od omenjenih funkcij si bomo pomagali z določenim električnim sistemom, ki opravlja enako nalogo. Na takšen način bomo tudi spoznali, kako določeni mehanizmi vplivajo na prenos signala v znotrajceličnem prostoru.

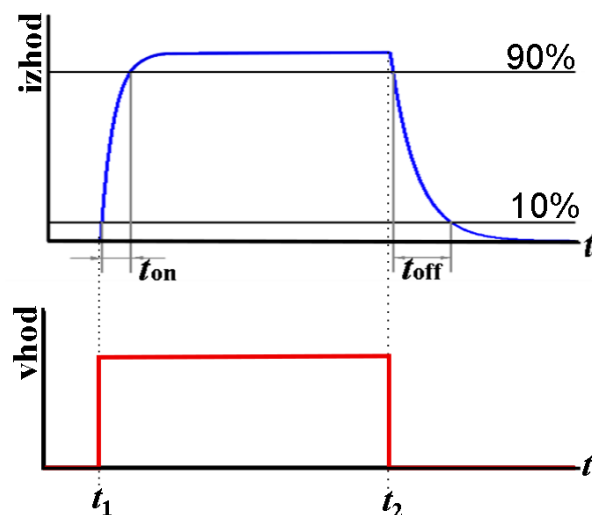
4.1 STIKALA

V poglavju o proteinskih kaskadah je bilo zapisano, da lahko te delujejo kot stikalni sistemi v znotrajcelični signalizaciji. Sledila bo predstavitev kaskad kot aktivni stikalni element. Posvetili se bomo vklopno—izklopni karakteristiki, iz katere lahko razberemo čas aktivacije in čas deaktivacije stikala, kjer na ta dva časa v biološkem sistemu vplivata konstanti k_{on} in k_{off} . Proteinsko kaskado bomo nato primerjali s tranzistorjem, ki je tudi aktivni element in se uporablja kot stikalo. Aktivni elementi v elektroniki

imajo svoje zunanje napajanje, kar jim omogoča ojačanje vhodnega signala. Tako lahko tranzistorju zraven stikalnih lastnosti pripišemo tudi ojačevalne lastnosti, katerim se bomo posvetili v poglavju o ojačevalnikih.

4.1.1 VKLOPNO—IZKLOPNE KARAKTERISTIKE

Pri stikalih elementih je zaželeno, da imajo kratek odzivni čas in tako hitro, po vklopu ali izklopu stikala, izhodni signal doseže stacionarno stanje. Čas aktivacije stikala označujemo s t_{on} , ki nam pove, v kolikšnem času se izhodni signal poveča iz 10 % maksimalnega izhodnega signala na 90 % maksimalnega izhodnega signala. Čas deaktivacije označujemo s simbolom t_{off} , ki nam pove, v kolikšnem času pade izhodni signal iz 90 % maksimalnega izhodnega signala na 10 % maksimalnega izhodnega signala [16]. Karakteristična časa t_{on} in t_{off} sta prikazana s sliko (6).

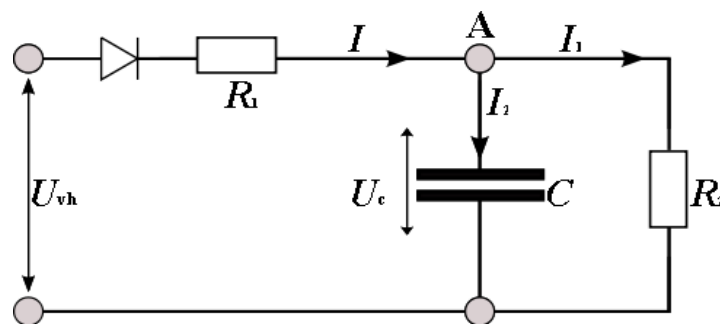


Slika 6. Odziv stikalnega elementa na stopničast vhodni signal.

Da bomo lahko raziskali vlogo konstant na čas aktivacije in čas deaktivacije, bomo za vhodni signal v obeh sistemih uporabili stopničast vhodni signal. V biološkem sistemu lahko ta stopnica ponazarja hipno porast koncentracije določenega sekundarnega prenašalca. V električnem sistemu pa bo vhodni signal predstavljala hipna porast napetosti na vhodu tranzistorja.

V primeru električnega stikala bo tranzistor v neaktivnem stanju, dokler napetost na vhodu ne doseže zaporne napetosti med bazo in emitorjem, ki znaša približno 0,7 V [17]. Ko napetost na vhodu preseže to vrednost, premagamo zaporno napetost in skozi bazo bo pričel teči večji tok in s tem tudi skozi kolektor in emitor. Zaradi lastne kapacitivnosti tranzistorja emitorski tok ne naraste v hipu na končno vrednost. Pojavi se časovna zakasnitev, ki je posledica vhodne kapacitivnosti tranzistorja med baznim in emitorskim priključkom (reda pF) [18]. V numerični simulaciji tranzistorskega stikala bomo uporabili podatke za model tranzistorja 2N3906, katerega čas $t_{on} = 35$ ns ter čas $t_{off} = 75$ ns, in podatke za tranzistor UMT2222A, katerega čas $t_{on} = 25$ ns in čas $t_{off} = 60$ ns.

Za izpostavitev vpliva vhodne kapacitivnosti na čas aktivacije in čas deaktivacije bomo uporabili RC člen. Za ta RC model bomo oblikovali diferencialne enačbe, ki bodo opisovale spreminjanje napetosti na izhodu člena v odvisnosti od časa. Na sliki (7) je ta model tudi prikazan. Upor R_1 predstavlja notranjo upornost baze, kondenzator C predstavlja notranjo kapacitivnost tranzistorja med bazo in emitorjem, upornost R_2 pa predstavlja upornost bremena, ki je priključena med emitor in skupno maso sistema. Diodo med bazo in emitorjem, ki preprečuje, da bi se kondenzator lahko praznil preko upora R_1 , predstavlja dioda na vhodu.



Slika 7. Električna shema RC člena. Napetost na vhodu je označena z U_{vh} , R_1 je vhodna upornost, C je vhodna kapacitivnost, R_2 je upornost bremena na izhodu, točka, kjer se tok cepi, pa je označena z A. Dioda na vhodu preprečuje, da bi se lahko kondenzator praznil preko upora R_1 .

Ko vhodni signal hipno naraste na določeno končno vrednost, govorimo o aktivaciji stikala. Kondenzator C se bo pričel polniti in koncentracija naboja na njem se bo pričela

večati. Ko kondenzator doseže stacionarno stanje, se dotok elektronov na kondenzator preneha. Pritekanje nabojev na kondenzator povzroča časovno zakasnitev ob vklopu. Da pridemo do enačbe, ki bo v časovnem prostoru opisovala, kako se spreminja napetost na kondenzatorju in s tem količina naboja, ki je shranjena na njem, uporabimo I. Kirchhoffov zakon za točko A na sliki (7). Iz zakona lahko po manjšem preoblikovanju enačbe pridemo do zapisa (4.1):

$$\frac{\partial U_C}{\partial t} = \frac{1}{R_1 \cdot C} \cdot (U_{vh} - U_C(t)) - \frac{1}{R_2 \cdot C} \cdot U_C(t) . \quad 4.1$$

Napetost na izhodu vezja je enaka napetosti na kondenzatorju, saj je izhod vezan vzporedno z njim. Napetost na kondenzatorju je sorazmerna s količino nabojev na njem. Tako bomo primerjali količino nabojev na kondenzatorju s številom oziroma koncentracijo aktiviranih proteinov v biološkem sistemu. Ko rešimo diferencialno enačbo (4.1) in jo preoblikujemo, pridemo do enačbe (4.2), ki narekuje, kako se spreminja napetost na kondenzatorju v odvisnosti od časa v primeru aktivacije:

$$U_C(t) = \frac{\frac{1}{R_1 \cdot C} \cdot U_{vh}}{\frac{1}{R_1 \cdot C} + \frac{1}{R_2 \cdot C}} \cdot \left[1 - e^{-t \cdot \left(\frac{1}{R_1 \cdot C} + \frac{1}{R_2 \cdot C} \right)} \right] . \quad 4.2$$

$$U_C(t) = U_S \cdot \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_{on}}} \right]$$

Sledi primer deaktivacije stikala, ko vrednost vhodnega signala pade na vrednost 0 V. Zaradi diode se kondenzator C ne more prazniti preko upora R_1 . Analiza vezja se zelo poenostavi, saj se kondenzator prazni preko zaporedno vezanega upornika R_2 .

$$\frac{\partial U_C}{\partial t} = -\frac{U_C}{R_2 \cdot C} . \quad 4.3$$

Ko rešimo diferencialno enačbo (4.3), dobimo enačbo, ki opisuje, kako se spreminja napetost na kondenzatorju v odvisnosti od časa za primer deaktivacije stikala:

$$U_C(t) = U_{C,\max} \cdot e^{-\frac{t}{R_2 \cdot C}} . \quad 4.4$$

Produkt upornosti, preko katere se kondenzator prazni, in kapacitivnosti kondenzatorja pa določa časovno konstanto τ_{off} :

$$\tau_{\text{off}} = R_2 C . \quad 4.5$$

Omejili se bomo le na eno proteinsko kaskado ($i = 1$). Enačba (4.6) opisuje časovni odziv ene proteinske kaskade v odvisnosti od časa pri določenem vhodnem signalu x :

$$\frac{\partial z}{\partial t} = k_{\text{on}} \cdot x \cdot (z_{\text{tot}} - z) - k_{\text{off}} \cdot z . \quad 4.6$$

Rešitev enačbe (4.6) preoblikujemo in pridemo do zapisa, ki podaja, kako se spreminja koncentracija aktiviranih proteinov v odvisnosti od časa.

$$z(t) = \frac{k_{\text{on}} x \cdot z_{\text{tot}}}{k_{\text{on}} x + k_{\text{off}}} \cdot [1 - e^{-t \cdot (k_{\text{on}} x + k_{\text{off}})}] \quad 4.7$$

$$z(t) = z_s \cdot \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{on}}}} \right] .$$

V primeru, ko je vhodni signal oziroma koncentracija prostega Ca^{+2} enaka nič, se enačba (4.7) zelo poenostavi. Zapišemo lahko:

$$z(t) = z_{\max} \cdot e^{-k_{\text{off}} t} \quad 4.8$$

$$z(t) = z_{\max} \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{\text{off}}}} ,$$

kjer z_{\max} predstavlja koncentracijo aktiviranih proteinov v trenutku, ko pade vrednost vhodnega signala x na vrednost nič. Časovne konstante iz enačb (4.2, 4.4, 4.7 in 4.8) so prikazane v tabeli (1).

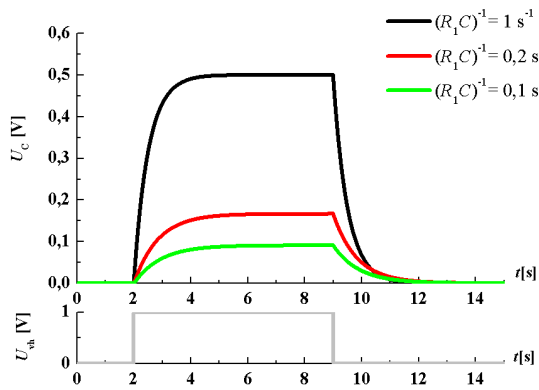
	električni sistem	biološki sistem
τ_{on}	$\frac{1}{\frac{1}{R_1 C} + \frac{1}{R_2 C}}$	$\frac{1}{k_{on}x + k_{off}}$
τ_{off}	$R_2 \cdot C$	$\frac{1}{k_{off}}$

Tabela 1. Časovne konstante iz enačb (4.2, 4.4, 4.7 in 4.8).

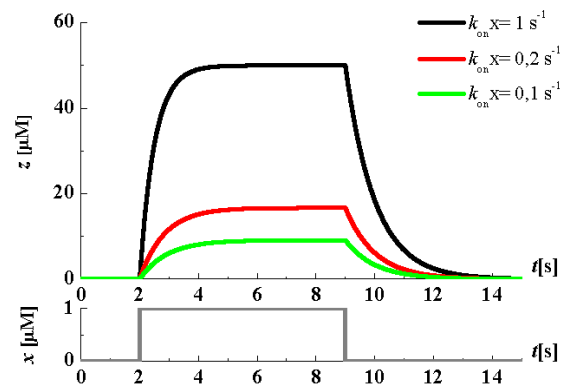
Časovni konstanti τ_{on} in τ_{off} lahko povežemo z aktivacijskim časom t_{on} in deaktivacijskim časom t_{off} z enačbo:

$$\begin{aligned} \tau_{on} &= \frac{t_{on}}{\ln(9)} \\ \tau_{off} &= \frac{t_{off}}{\ln(9)}. \end{aligned} \tag{4.9}$$

Časovna konstanta τ_{on} določa čas, v katerem se izhodni signal poveča iz vrednosti 0 na vrednost $1-e^{-1}$ končne vrednosti. V primeru RC člena bi to pomenilo čas, v katerem se na kondenzatorju nabere približno 63 % stacionarne vrednosti nabojev. V primeru biološkega sistema pa nam ta konstanta pove, koliko časa je potrebno, da se aktivira približno 63 % stacionarne vrednosti proteinov. Grafa, prikazana na slikah (8 in 9), prikazujeta vpliv te časovne konstante na dinamiko izhodne količine v biološkem in električnem sistemu.

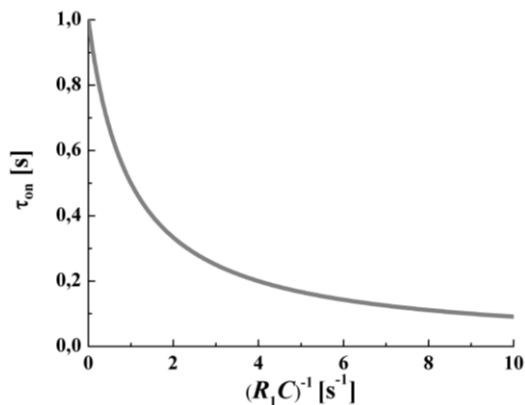


Slika 8. Odziv RC stikala na stopničasto porast vhodne napetosti. Parameter $R_2 C = 1$ s ter je v vseh treh primerih enak.

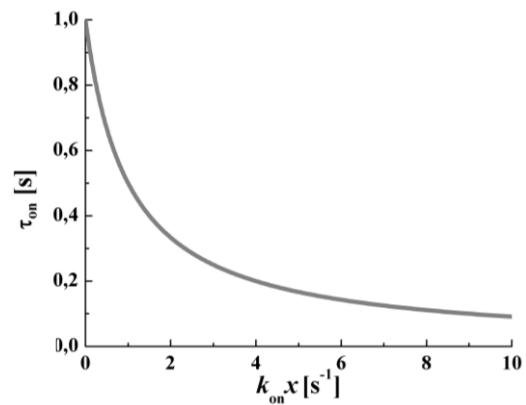


Slika 9. Odziv proteinske kaskade na stopničast vhodni signal x . Parameter $k_{\text{off}} = 1$ s⁻¹ ter je v vseh treh primerih enak.

Manjša kot je časovna konstanta τ_{on} , manj časa potrebuje izhodni signal, da doseže stacionarno stanje. Različne vrednosti tega časa vplivajo tudi na amplitudo stacionarnega stanja. Razlage različnih amplitud, ki jih pri različnih vrednostih časovnih konstant doseže izhodni signal, bodo sledile v poglavju o ojačevalnikih, kjer bodo uporabljeni tudi aktivni električni sistemi, kar pa RC člen ni.

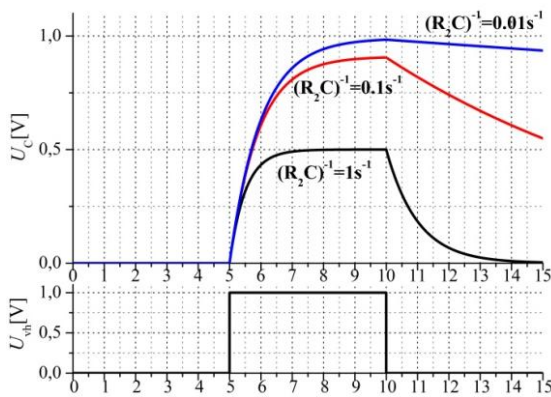


Slika 10. Vpliv upornosti R_1 in kapacitivnosti C na čas polnjenja (τ_{on}) RC člena. Produkt upornosti R_2 ter kapacitivnosti C je enak 1 s.

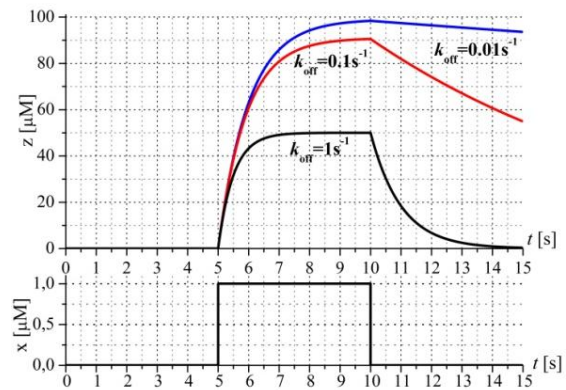


Slika 11. Vpliv parametra k_{on} na čas fosforilacije (τ_{on}). Vrednost vhodnega signala $x = 1$ μM ter vrednost parametra $k_{\text{off}} = 1$ s⁻¹.

Časovna konstanta τ_{off} določa, v kolikšnem času se bo izhodni signal zmanjšal na približno 37 % začetne vrednosti. Če torej povečujemo vrednost upornosti R_2 ali kapacitivnosti C , pričakujemo, da se bo električni sistem počasneje odzival na vhodni signal. Kadar pa v biološkem sistemu povečujemo konstanto k_{off} , s tem zmanjšujemo čas odziva na vhodni signal. Pri stikalih si želimo, da sta časovni konstanti τ_{off} in τ_{on} čim manjši in s tem izhodni signal v čim krajšem času doseže stacionarno stanje. Majhne vrednosti teh konstant pripomorejo tudi k ohranitvi oblike vhodnega signala, ki je navadno nosilec nekakšne informacije, ki je lahko v frekvenci, s katero signal niha, ali pa v amplitudi signala. Grafa na slikah (12 in 13) prikazujeta odziv električnega in biološkega sistema pri enakih vrednostih za τ_{on} in različnih vrednostih za τ_{off} .

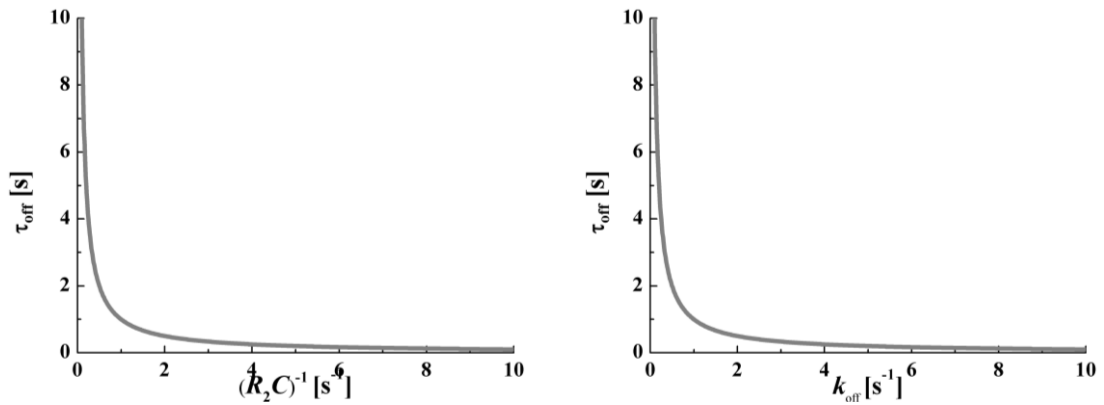


Slika 12. Odziv RC stikala na stopničasto porast vhodne napetosti. Parameter $R_1C = 1$ s ter je v vseh treh primerih enak.



Slika 13. Odziv proteinske kaskade na stopničasto porast koncentracije Ca^{+2} v citosolu. Parameter $k_{\text{on}} = 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ter je v vseh treh primerih enak.

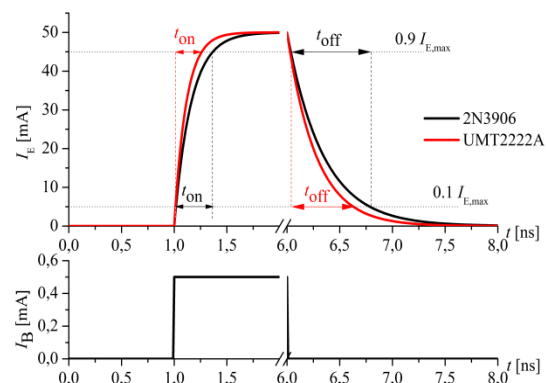
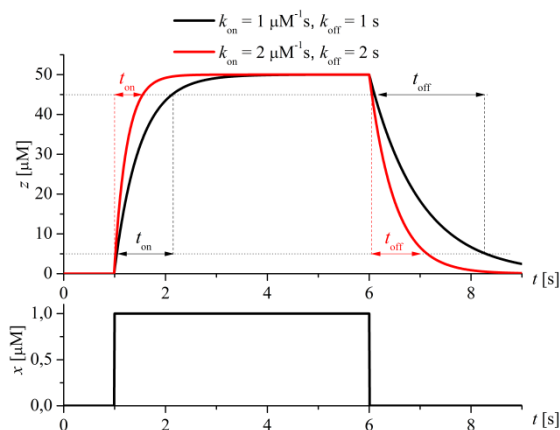
Tudi grafa na slikah (12 in 13) potrjujeta povezanost med časovnima konstantama v biološkem in električnem sistemu. V električnem sistemu ima večja vrednost konstante τ_{off} posledico, da se izhodna vrednost signala počasneje manjša. Da pade na končno vrednost, je tako potreben daljši čas. V biološkem sistemu, kjer je časovna konstanta k_{off} obratno sorazmerna s časovno konstanto τ_{off} , pa ima manjša vrednost te konstante počasnejšo deaktivacijo proteinov.



Slika 14. Vpliv upornosti R_2 in **Slika 15.** Odvisnost časa defosforilacije kapacitivnosti C na čas praznjenja (τ_{off}) (τ_{off}) od parametra k_{off} . RC člena.

Namen RC modela ni dejansko simuliranje tranzistorja, temveč le predstavitev vpliva kapacitivnosti na aktivacijski in deaktivacijski čas. Ob kapacitivnosti je še ogromno drugih dejavnikov, ki vplivajo na ta dva časa, kot so dolžina baze, število manjšinskih nosilcev, površina spoja med enim in drugim tipom polprevodnika itn. Matematični model tranzistorja je tako zaradi velike količine dejavnikov zelo zapleten.

Sledi primerjava med vklopno—izklopno časovno karakteristiko tranzistorja in mitogeno aktivirano proteinsko kaskado. V tej primerjavi bo prikazan pomen aktivacijskega in deaktivacijskega časa.



Slika 16. Odziv proteinske kaskade na stopničast vhodni signal ($z_{\text{tot}} = 100$).

Slika 17. Odziv tranzistorja na stopničast vhodni signal ($\beta = 100$).

Grafa na sliki (16) in sliki (17) prikazujeta odziv določenega sistema na stopničast vhodni signal. Na sliki (16) je prikazan odziv proteinske kaskade. Ta potrebuje, da doseže stacionarno stanje po pojavitvi vhodnega impulza, nekaj časa. Ko vhodni impulz pade na vrednost nič, se defosforilira, zakar pa prav tako potrebuje nekaj časa. Na sliki (17) je prikazan odziv tranzistorja na stopničast vhodni signal. Če bi takšen signal opazovali na osciloskopu, bi bilo potrebno zelo podrobno opazovati zaslon, da bi lahko zaznali časa t_{on} in t_{off} . Ta sta tako majhna, da bi izgledalo, kot da se tranzistor v trenutku preklopi iz enega stanja v drugo. Primerjava slik v vklopnem delu kaže, da je pri večji vrednosti k_{on} aktivacijski čas krajši, saj je konstanta k_{on} obratno sorazmerna s konstanto τ_{on} . Pri tranzistorju pa se opazi, da ima manjša časovna konstanta t_{on} posledično krajši čas, v katerem signal naraste na prej omenjeno vrednost. V primerjavi izklopnega dela je pri tranzistorju prisotna časovna zakasnitev. Tranzistor želimo preklopiti iz aktivnega v neaktivno stanje. Kondenzator, ki predstavlja notranjo kapacitivnost tranzistorja, je sedaj poln in ko napetost na vhodu tranzistorja pade na vrednost nič, se le-ta prične prazniti. In to praznjenje kondenzatorja prav tako povzroča časovno zakasnitev pri izklopu tranzistorja. Sledi spreminjanje koncentracije aktiviranih proteinov v odvisnosti od časa, ko pade vrednosti prostih Ca^{+2} v hipu na vrednost nič, in nadalje spreminjanje emitorskega toka tranzistorja, ko pade vhodni signal v hipu na vrednost nič. V spodnji tabeli so prikazane vse enačbe, ki smo jih uporabili v tem poglavju. Tako lahko najenostavneje še enkrat prikažemo pomen konstant.

	aktivacija	deaktivacija
biološki sistem	$z(t) = z_S \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{on}}}} \right]$	$z(t) = z_{\text{max}} \cdot e^{-k_{\text{off}} t}$
električni sistem	$U_C(t) = U_S \left[1 - e^{-\frac{t}{\tau_{\text{on}}}} \right]$	$U_C(t) = U_{\text{max}} e^{-\frac{t}{R_2 \cdot C}}$

Tabela 2. Enačbe za opis biološkega in električnega sistema ob aktivaciji in deaktivaciji.

Razvidno je, da na čas vklopa proteinske kaskade vplivajo vhodni signal x , konstanta k_{on} in k_{off} . Vklonni čas je obratno sorazmeren s temi količinami. Čas deaktivacije pa je odvisen le od konstante k_{off} . Tudi v tem primeru je deaktivacijski čas obratno sorazmeren z konstanto k_{off} . Hkrati imajo te konstante vpliv na stacionarno stanje proteinske kaskade.

V tem delu so bile opisane podobnosti med biološkim in tehničnim sistemom v okviru delovanja kot najosnovnejši člen signalizacijske mreže. V nadaljevanju sledi še ena lastnost proteinskih kaskad, ki je značilna za stikala, in sicer ultrasenzitivnost.

4.1.2 ULTRASENZITIVNOST

Pojem ultrasenzitivnosti je tesno povezan s sistemi s stikalnimi lastnostmi. Kot je bilo že prikazano, je ena izmed vlog mitogeno aktiviranih proteinskih kaskad v znotrajceličnem prostoru, da delujejo kot stikalni elementi. Njihova lastnost ultrasenzitivnosti je bila tema mnogih raziskovalnih člankov [19,20,21,22], kjer se kot merilo ultrasenzitivnosti uporablja hillov koeficient n_H , ki ga določamo po enačbi:

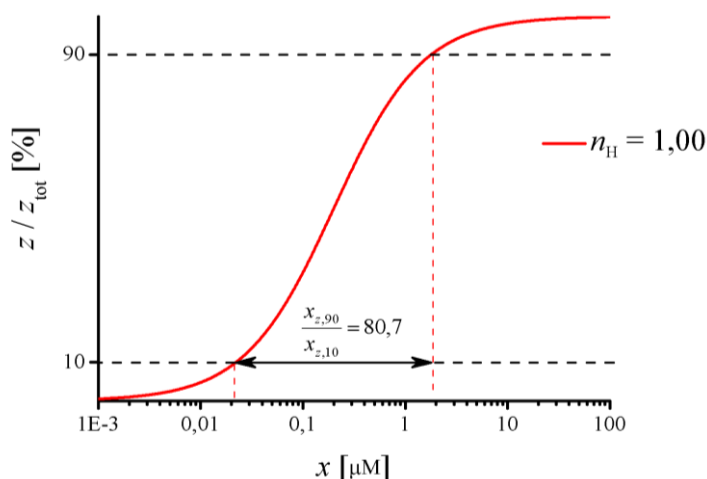
$$n_H = \frac{\log_{10}(81)}{\log_{10}\left(\frac{x_{z,90}}{x_{z,10}}\right)}, \quad 4.10$$

kjer je $x_{z,90}$ potrebna vrednost vhodnega signala, da izhodni signal naraste na 90 % maksimalne vrednosti in $x_{z,10}$ potrebna vrednost vhodnega signala, da izhodni signal naraste na 10 % maksimalne vrednosti.

Primer vhodno—izhodne karakteristike za proteinsko kaskado je prikazan na sliki (18). Podatki za izris grafa so bili dobljeni na podlagi enačbe (4.7), iz katere je razvidno, da je stacionarna koncentracija aktiviranih proteinov z_s enaka:

$$z_s = \frac{k_{\text{on}}x \cdot z_{\text{tot}}}{k_{\text{on}}x + k_{\text{off}}} . \quad 4.11$$

Enačbo (4.11) lahko uporabimo tudi za analitično določitev hillovega koeficienta n_H , kjer je dobljen rezultat vrednost 1,00. Omeniti je še potrebno, da hillov koeficient ni odvisen od parametrov k_{on} in k_{off} , kljub temu da se vhodno—izhodna karakteristika za različne vrednosti teh dveh parametrov razlikuje, a razmerje med $x_{z,90}$ in $x_{z,10}$ ostaja enako in posledično tudi n_H . Hillov koeficient je možno določiti tudi eksperimentalno za različne proteinske kaskade, ki so lahko tudi večstopenjske [23].



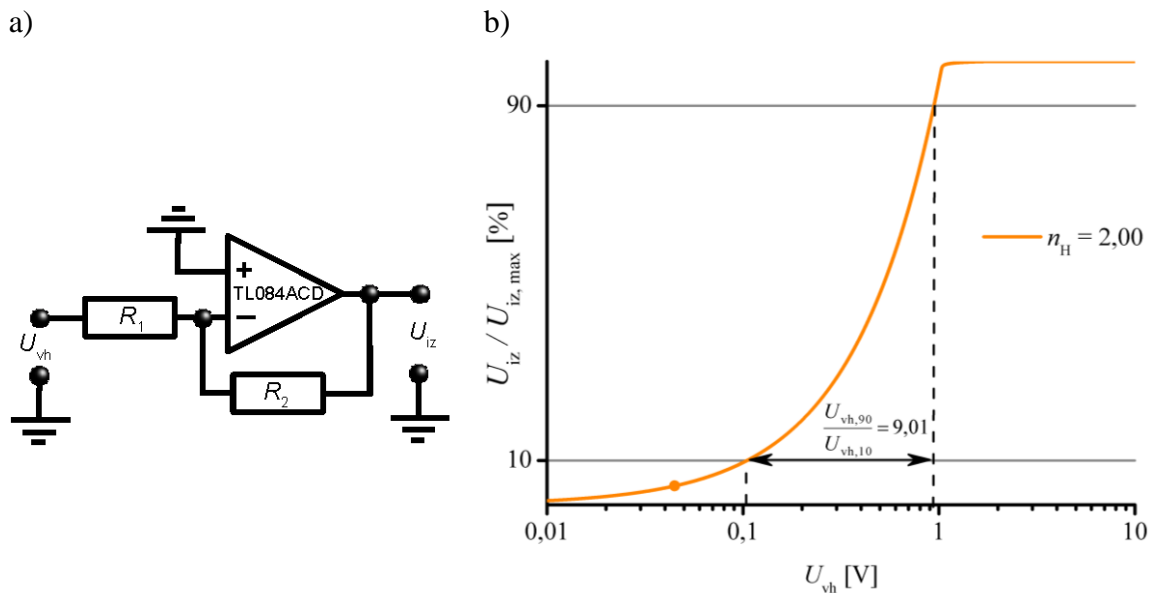
Slika 18. Vhodno—izhodna karakteristika za eno proteinsko kaskado. Vrednost parametrov je $k_{\text{on}} = 5 (\mu\text{Ms})^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1 \text{ s}^{-1}$ in $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$. Vrednost izračunanega hillovega koeficienta je 1,00.

Kadar je potrebno simulirati proteinske kaskade, ki imajo različne vrednosti hillovega koeficienta, je potrebno enačbo (4.11) preoblikovati tako, da vključuje hillov koeficient. Tako lahko zapišemo enačbo, ki določa stacionarno stanje proteinske kaskade z hillovim koeficientom, ki je lahko različen od 1:

$$z_S = \frac{k_{\text{on}} x^{n_H} \cdot z_{\text{tot}}}{k_{\text{on}} x^{n_H} + k_{\text{off}}} \quad 4.12$$

Večja kot je ultrasenzitivnost proteinske kaskade, manjša relativna porast vhodnega signala je potrebna, da se aktivira od 10 % do 90 % vseh proteinov.

Te stikalne lastnosti, kjer je aktivno oziroma neaktivno stanje izhoda krmiljeno z velikostjo določenega vhodnega signala, se uporabljajo tudi v elektroniki. Primer za to je ojačevalno vezje, ki je prikazano na sliki (19a) in izdelano iz operacijskega ojačevalnika z negativno povratno vezavo. Vhodno—izhodna karakteristika za to vezje je prikazana na sliki (19b).



Slika 19. a) Vezje operacijskega ojačevalnika z negativno povratno zanko in b) vhodno-izhodna karakteristika.

Opisali smo stikalne lastnosti proteinske kaskade, predstavili pomen konstant k_{on} in k_{off} na aktivacijski in deaktivacijski čas ter hillov koeficient, ki se uporablja kot merilo za ultrasenzitivnost biološkega stikala. V nadaljevanju sledijo ojačevalne lastnosti proteinske kaskade.

4.2 OJAČEVALNIKI

Kot ojačevalnik lahko v splošnem poimenujemo vsako napravo, ki je zmožna povečati ali zmanjšati amplitudo vhodnega signala. Navadno se ojačevalniki uporabljajo za povečevanje amplitude vhodnega signala. Ojačanje signala je določeno z razmerjem med vhodnim in izhodnim signalom, katera morata predstavljati enako fizikalno količino. Označujemo ga s črko A .

$$A = \frac{\text{izhodni signal}}{\text{vhodni signal}}$$

Ob osnovni nalogi ojačevalnika, ki je povečevanje amplitude vhodnemu signalu, se kvaliteta ojačevalnika kaže tudi v tem, da ohranja obliko vhodnega signala oziroma kaže se v majhni vrednosti aktivacijskega in deaktivacijskega časa. S tem se ne izgubljajo informacije, ki so nanesene na signal [24].

Za idealne ojačevalnike tako velja, da je vhodna kapacitivnost enaka nič in posledično ni prisotnih nobenih zakasnitev med aktivacijo ali deaktivacijo [25]. Pri realnih ojačevalnikih pa je zmeraj prisotna določena vhodna kapacitivnost. Vpliv te na izhodni signal lahko na najbolj pregleden način predstavimo v frekvenčnem prostoru z bode diagramom, ki prikazuje, kako se spreminja ojačanje sistema v odvisnosti od frekvence vhodnega signala. Mejna frekvenca ojačevalnika je podatek, ki pove, kolikšno frekvenco vhodnega signala ojačevalnik še ojača oziroma je razmerje med vhodnim in izhodnim signalom še večje od $1/\sqrt{2} A_{DC}$ [26]. $Z A_{DC}$ pa se označuje vrednost ojačanja, enosmernega vhodnega signala.

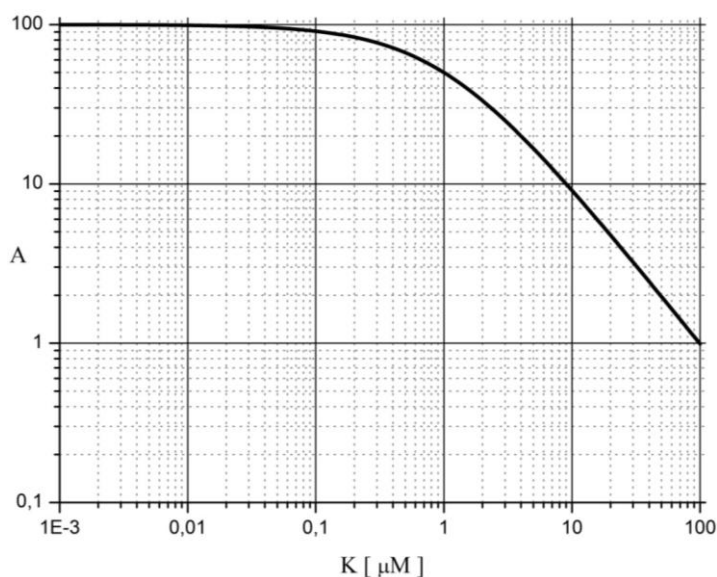
Analizirali bomo odziv celičnega ojačevalnika na stopničast vhodni signal. Dolžina impulza bo dovolj velika, da bosta oba sistema lahko dosegla stacionarno stanje, kjer je stacionarno stanje proteinske kaskade določeno z enačbo (4.11), iz katere sledi, da je koncentracija aktiviranih proteinov v stacionarnem stanju enaka

$$z_s = \frac{x_{\max}}{K + x_{\max}} \cdot z_{\text{tot}} \quad . \quad 4.13$$

Vrednost konstante K je določena z razmerjem med k_{off} in k_{on} . Iz enačbe (4.13) je razvidno, da je koncentracija aktiviranih proteinov v stacionarnem stanju in s tem je ojačanje proteinske kaskade odvisno tudi od konstante K . Tako zapišemo enačbo za faktor ojačanje za enostopenjsko proteinsko kaskado v primeru, ko se koncentracija signalne molekule v hipu poveča iz vrednosti $x = 0 \mu\text{M}$ na vrednost $x_{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$. Ta koncentracija nato ostaja enaka, dokler proteinska kaskada ne doseže stacionarnega stanja. Sledi vpliv konstante K na končno enosmerno ojačanje A_{DC} :

$$A_{\text{DC}} = \frac{z_s}{x_{\text{max}}} = \frac{z_{\text{tot}}}{K + x_{\text{max}}} . \quad 4.14$$

Iz slike (20) je razvidno, kako se enosmerno ojačanje A_{DC} manjša z večanjem konstante K .



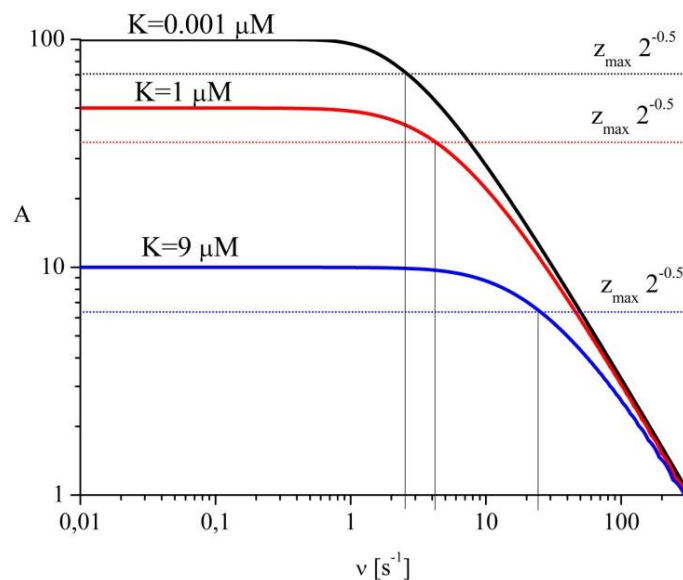
Slika 20. Odvisnost faktorja ojačanja A od konstante K . Vrednosti ostalih parametrov so $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$, $x_{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$ in $k_{\text{on}} = 0.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Iz enačbe (4.14) se da napovedati, za kakšne vrednosti konstante K so vrednosti izhodnega signala večje oziroma manjše od vhodnega signala x_{max} .

$$\begin{aligned} A_{\text{DC}} > 1 & \quad K > z_{\text{tot}} - x_{\text{max}} \\ A_{\text{DC}} < 1 & \quad K < z_{\text{tot}} - x_{\text{max}} \end{aligned}$$

Izhodni signal je večji od vhodnega v primeru, ko je razlika med celotno koncentracijo proteinov z_{tot} in največjo koncentracijo $\text{Ca}^{+2} x_{\text{max}}$ manjša od konstante K .

Pri frekvenčni karakteristiki za proteinsko kaskado, ki je prikazana na sliki (21), so na abscisni osi vrednosti frekvence vhodnega signala, na ordinatni osi pa maksimalne vrednosti koncentracije aktiviranih proteinov. Za vhodni signal je bila uporabljena funkcija sinus, saj lahko s to funkcijo najenostavneje določimo vpliv določene frekvence vhodnega signala na ojačanje. Tako se lahko direktno poveže stacionarno stanje sistema z določeno frekvenco nihanja vhodnega signala.

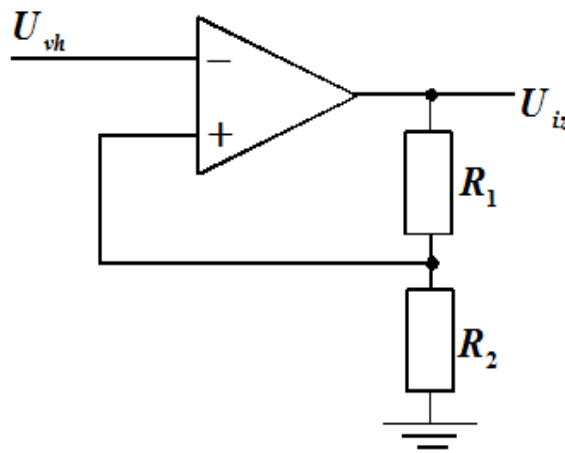


Slika 21. Frekvenčna karakteristika proteinske kaskade za različne vrednosti konstante K . Vrednosti parametrov so $k_{\text{on}} = 1 (\mu\text{Ms})^{-1}$, $x_{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$ in $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$.

Iz slike (21) je razvidno, da je pri večjih ojačanjih mejna frekvenca manjša in s tem bo izhodni signal bolj popačen ter vse manj podoben vhodnemu. Ker je bila maksimalna koncentracija Ca^{+2} zmeraj enaka in tudi skupno število proteinov je ostajalo enako, lahko mejno frekvenco in ojačanje povežemo neposredno s konstanto K . Z večanjem konstante K manjšamo ojačanje in hkrati večamo mejno frekvenco. Tudi v elektroniki lahko najdemo elemente s podobno lastnostjo. Dolgo časa se je za ojačevanje signalov uporabljal tranzistor. Danes se namesto tranzistorja uporabljajo razni ojačevalniki, ki so

sestavljani iz različnih vezav aktivnih elementov. Uporabili bomo diferenčni ojačevalnik in ga primerjali z delovanjem proteinske kaskade.

Kadar ojačevalnik obravnavamo kot idealen, njegovo ojačanje ni odvisno od frekvence vhodnega signala, saj se privzame, da sta aktivacijska in deaktivacijska časa enaka 0 s. Pri realnih operacijskih ojačevalnikih pa se pojavi frekvenčna odvisnost ojačanja izhodnega signala. Ta odvisnost nastopi ravno zaradi aktivacijskega in deaktivacijskega časa, ki določata, kolikšen čas potrebuje izhodni signal, da doseže stacionarno stanje. Na sliki (22) je prikazan diferenčni ojačevalnik.



Slika 22. Prikaz neinvertirajočega operacijskega ojačevalnika.

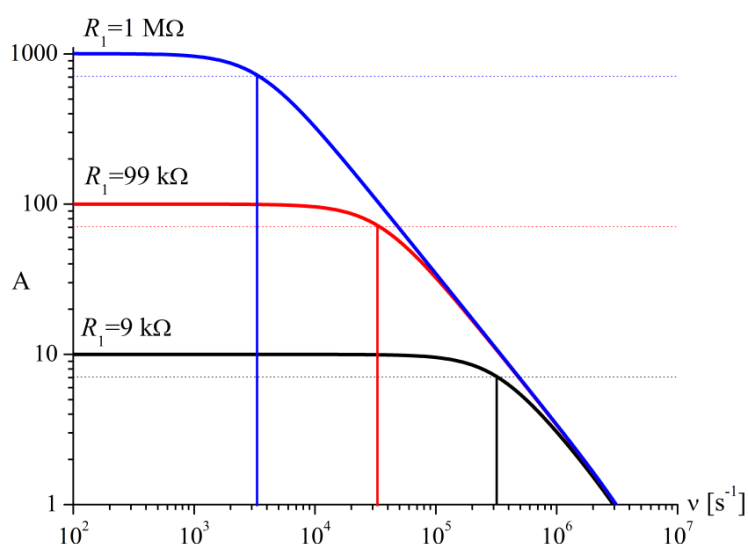
Ojačanje je določeno z razmerjem med izhodno in vhodno amplitudo signala. Za operacijski ojačevalnik lahko tako zapišemo:

$$A = \frac{U_{iz}}{U_{vh}} ,$$

kjer je napetost U_{vh} enaka napetosti na vhodu in kjer je napetost U_{iz} enaka napetosti na izhodu operacijskega ojačevalnika. Zaradi velike vhodne impedance operacijskega ojačevalnika velja, da v operacijski ojačevalnik ne teče tok. Tako lahko zapišemo enačbo (4.15), s katero je določeno enosmerno ojačanje A_{DC} za vezje, prikazano s sliko (22).

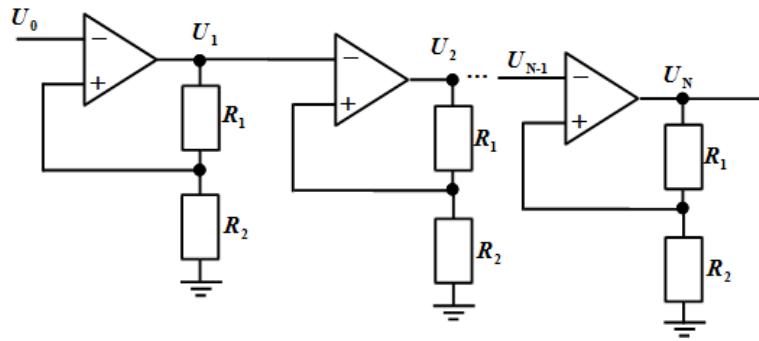
$$A_{DC} = 1 + \frac{R_1}{R_2} . \quad 4.15$$

Omenjeno ojačanje definira maksimalno razmerje med izhodno in vhodno amplitudo signala, kadar je frekvenca nihanja vhodnega signala enaka 0 Hz oziroma ko je vhodni signal enosmeren. Za izdelavo frekvenčne karakteristike, ki je prikazana na sliki (23), je bil uporabljen program National Instruments 10, s pomočjo katerega je bila izvedena navidezna meritev. Rezultati so bili izvoženi in nato obdelani s programom OriginPro 8. Uporabljen je bil model TL083 operacijskega ojačevalnika, iz katerega je bilo prikazano, kako se spreminja ojačanje sistema v odvisnosti od frekvence vhodnega signala. Za vhodni signal je bil uporabljen generator sinusne napetosti.



Slika 23. Frekvenčna karakteristika operacijskega ojačevalnika TL083. Vrednost upora $R_2 = 1 \text{ k}\Omega$.

Graf, prikazan na sliki (23), nam prikazuje, da z manjšanjem upornosti R_1 zmanjšujemo tudi amplitudo izhodnega signala in hkrati povečujemo mejno frekvenco. Če želimo torej na takšen način v tehniki ojačati signal, moramo skleniti nek kompromis med maksimalnim ojačanjem in kvaliteto ojačanega signala, ta pa je odvisna od mejne frekvence. Vendar obstaja način, kako lahko dosežemo večje ojačitve in hkrati ohranjamo kvaliteto signala. V elektroniki so ta problem rešili z zaporedno vezavo večih ojačevalnikov, kot je to prikazano na sliki (24).

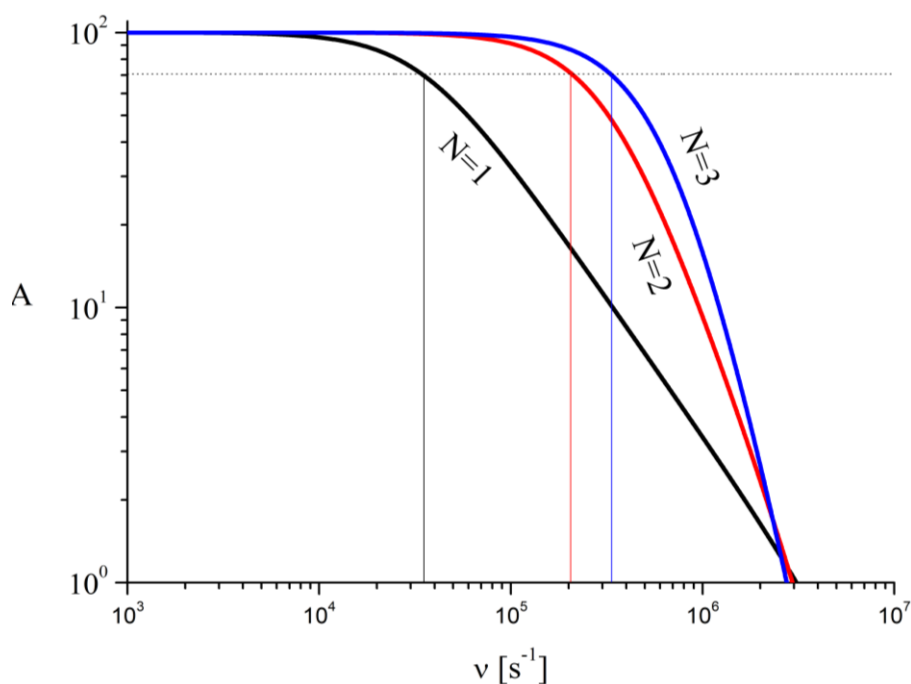


Slika 24. Zaporedna vezava večih neinvertirajočih operacijskih ojačevalnikov.

V kaskadni vezavi bodo imeli vsi upori R_1 in vsi upori R_2 enake vrednosti. V tem primeru se enačba za izračun končnega ojačanja zelo poenostavi, saj je le-to določeno kot produkt posameznih faktorjev ojačanja. Tako zapišemo:

$$A_i = \left(1 + \frac{R_1}{R_2}\right)^i . \quad 4.16$$

Podan je primer z enostopenjskim, dvo- in tristopenjskim ojačevalnikom. Vsak od teh ojačevalnikov bo imel končno ojačanje enako 100. Za primer enostopenjskega ojačevalnika bo vrednost upora $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$, vrednost upora R_2 pa lahko določimo s pomočjo enačbe (4.16) in dobimo, da je $R_2 = 99 \text{ k}\Omega$. Za dvostopenjski ojačevalnik bo vrednost $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ ter vrednost $R_2 = 9 \text{ k}\Omega$. Za tristopenjski ojačevalnik pa bo vrednost $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ ter vrednost $R_2 = 3,64 \text{ k}\Omega$. Na sliki (25) je prikazana frekvenčna karakteristika za eno-, dvo- in tristopenjski ojačevalnik.



Slika 25. Frekvenčna karakteristika operacijskega ojačevalnika TL083. Za enostopenjski ojačevalnik so vrednosti uporov $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ in $R_2 = 99 \text{ k}\Omega$, za dvostopenjski ojačevalnik $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ ter $R_2 = 9 \text{ k}\Omega$, za tristopenjski ojačevalnik pa $R_1 = 1 \text{ k}\Omega$ ter $R_2 = 3,64 \text{ k}\Omega$.

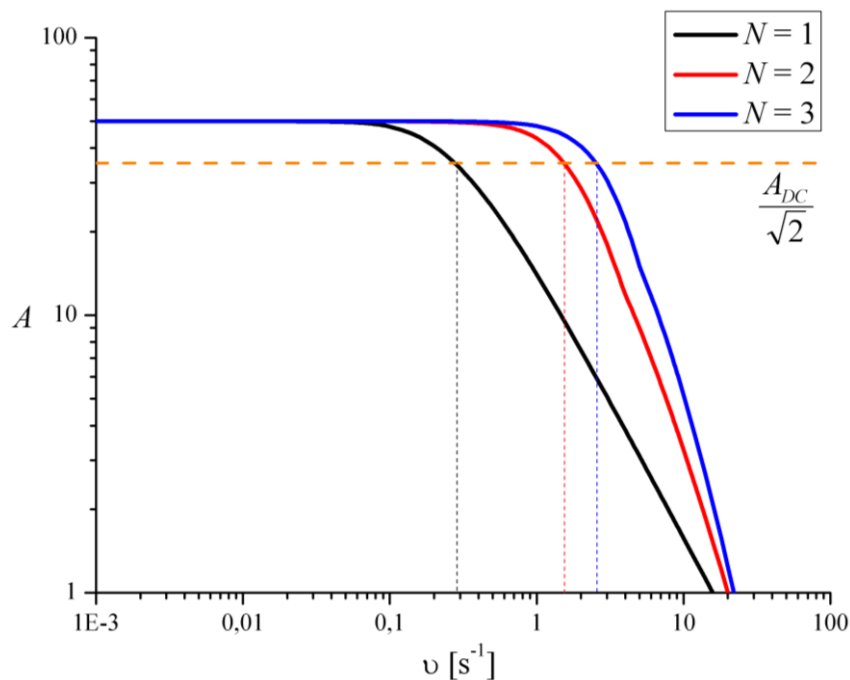
Z dodajanjem operacijskih ojačevalnikov lahko dosežemo zelo velika ojačanja brez da bi vhodni signal preveč popačili. Večje število operacijskih ojačevalnikov ima tako večjo mejno frekvenco. Podobno lastnost lahko tudi opazimo v bioloških sistemih. Kot je bilo že v poglavju o signalizaciji v bioloških sistemih omenjeno, so navadno proteinske kaskade v celicah med seboj povezane. Navadno je število med seboj povezanih kaskad med 3 in 4. Tako bomo v nadaljevanju prikazali, kako vplivajo večstopenjske proteinske kaskade v frekvenčnem prostoru na ojačanje in na mejno frekvenco. V tem primeru lahko določimo končno vrednost ojačanja na i -ti kaskadi s pomočjo enačbe:

$$A_{i,s} = \frac{z_{i,s}}{z_{i-1,s}} = \frac{A_{i-1,s} \cdot z_{\text{tot}}}{K + A_{i-1,s} \cdot x_{\text{max}}} , \quad 4.17$$

kjer je i število med 1 in N , za $A_{0,s}$ pa velja, da je enako 1. Enačbo (4.14) bomo razširili na večstopenjske proteinske kaskade. Tako velja, da je stacionarno stanje N -stopenjske proteinske kaskade določeno z enačbo:

$$z_{i,s} = \frac{z_{i-1,s}}{K + z_{i-1,s}} \cdot z_{\text{tot}} \quad , \quad 4.18$$

kjer je i število med 1 in N . Velja tudi, da je $z_{0,s} = x_{\text{max}}$. Če imamo dvostopenjsko proteinsko kaskado in želimo, da ima ta maksimalni faktor ojačanja 50, mora biti vrednost konstante K enaka $9,51 \mu\text{M}$. Če imamo tristopenjsko proteinsko kaskado in želimo, da ima ta isti faktor ojačanja, mora biti vrednost konstante K enaka $19,7 \mu\text{M}$. Sledi vpliv večstopenjske proteinske kaskade na mejno frekvenco, ki je prikazan na sliki (26).

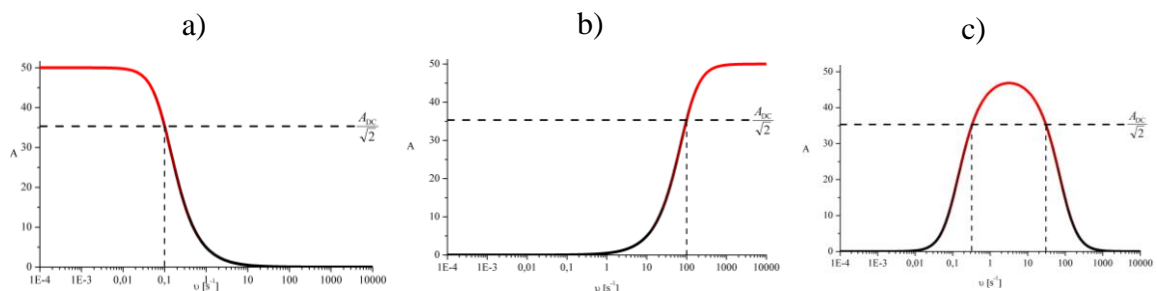


Slika 26. Frekvenčna karakteristika za eno-, dvo- in tristopenjsko proteinsko kaskado.

Kot je razvidno iz grafa, prikazanega na sliki (26), se mejna frekvenca z večanjem števila kaskad veča. Torej je vloga kaskadnih sistemov v znotrajcelični signalizaciji primerljiva z vlogo kaskadnih sistemov v električnih sistemih. Večje število kaskad tako pripomore k temu, da se oblika vhodnega signala ohranja in s tem tudi informacija, ki jo vsebuje. Takšen sistem zagotavlja zadostno ojačanje signala. V nadaljevanju sledijo dejavniki, ki vplivajo na mejno frekvenco. Tako bomo proteinsko kaskado primerjali z nizkofrekvenčnim prepustnim sitom.

4.3 FREKVENČNI FILTRI

Vloga frekvenčnih filtrov je izločanje nezaželenih signalov iz signala, ki ga želimo dodatno obdelati. V osnovi se uporabljata dva filtra. Kadar želimo iz signala izločiti samo visoke frekvence, uporabimo nizkofrekvenčno prepustni filter, za katerega definiramo določeno mejno frekvenco [27]. Frekvence, iz katerih je signal sestavljen, ki so večje od mejne frekvence, bo takšni filter pričel rezati. Na sliki (27a) je prikazana frekvenčna karakteristika nizkofrekvenčno prepustnega filtra. V nasprotnem primeru, ko želimo izločiti le nizke frekvence iz signala, uporabimo visokofrekvenčno prepustni filter. Na sliki (27b) je prikazana frekvenčna karakteristika takšnega filtra. Kadar pa želimo ohraniti le določen interval frekvenc, uporabimo pasovno prepustno sito, katerega frekvenčno karakteristiko prikazuje slika (27c).



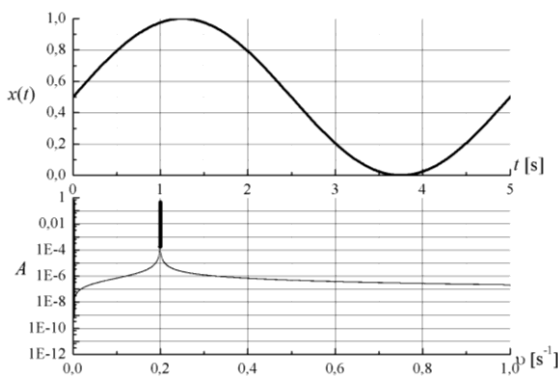
Slika 27. Bode diagrami za a) nizkofrekvenčno prepustni filter, b) visokofrekvenčno prepustni filter in c) pasovno prepustni filter.

Biološke celice uporabljajo kalcij za regulacijo različnih aktivnosti, ki jih izvajajo. Znano je tudi, da previsoke vrednosti Ca^{+2} povzročajo okvaro celic in v skrajnem primeru tudi njihovo smrt. Splošno sprejeto mnenje je, da se vrednost kalcija spreminja s kratkimi impulzi in s tem se lahko celica izogne škodljivim učinkom prevelikih vrednosti koncentracije kalcija v citosolu. Koncentracija kalcija se prične spreminjati, ko se na zunanje receptorje celice veže določen hormon ali nevrotansmitor. Ta aktivira inositol trifosfat IP_3 , ki hitro difundira v znotrajceličnem prostoru in aktivira IP_3 receptorje, ki nadaljnje aktivira kalcijeve kanale, ki se nahajajo na zunajcelični membrani in v membrani. Frekvenca, s katero se koncentracija kalcija v citosolu spreminja, je odvisna od koncentracije IP_3 .

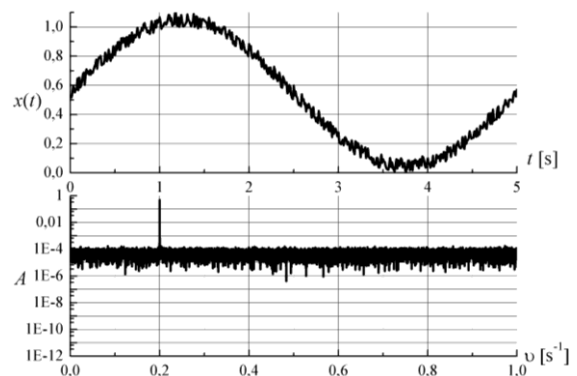
Sledila bo lastnost proteinskih kaskad v vlogi nizkofrekvenčno prepustnega sita, prikaz spreminjanja izhodnega signala v časovnem in frekvenčnem prostoru pri različnih vrednostih konstant k_{on} in k_{off} . Vhodni signal bo ponazarjala funkcija sinus, kateri bo dodan šum. Ta šum bo predstavljal motnje, ki so se dodale izvornemu signalu med potjo do cilja, ki je mitogensko aktivirana proteinska kinaza. Matematično lahko funkcijo zapišem kot:

$$x = \text{rand}(0 ; 0,1) + 0.5 \cdot (1 + \sin(2 \cdot \pi \cdot \nu \cdot t)) . \quad 4.19$$

Vrednost koncentracije Ca^{+2} bo zmeraj med $1,1 \mu\text{M}$ in $0 \mu\text{M}$. Zelo nerealen primer bi bil, če bi bila koncentracija kalcija v citosolu negativna. S pomočjo takšnega zapisa se izognemo takemu primeru. Frekvenca nihanja osnovnega signala bo v tem primeru enaka $0,2 \text{ s}^{-1}$. Najbolj nazoren način, da si ogledamo lastnosti signala, je v frekvenčnem prostoru. Zaradi motenj, ki jih dodamo z generatorjem naključnih števil, se spekter signala popači. Zraven osnovne frekvence, ki je enaka $0,2 \text{ s}^{-1}$, se pojavijo še druge frekvence v spektru, ki so posledica dodane motnje. Poglejmo si časovni potek takšnega spreminjanja koncentracije Ca^{+2} in njegov spekter. Omenjena vhodna signala sta prikazana na slikah (28 in 29).



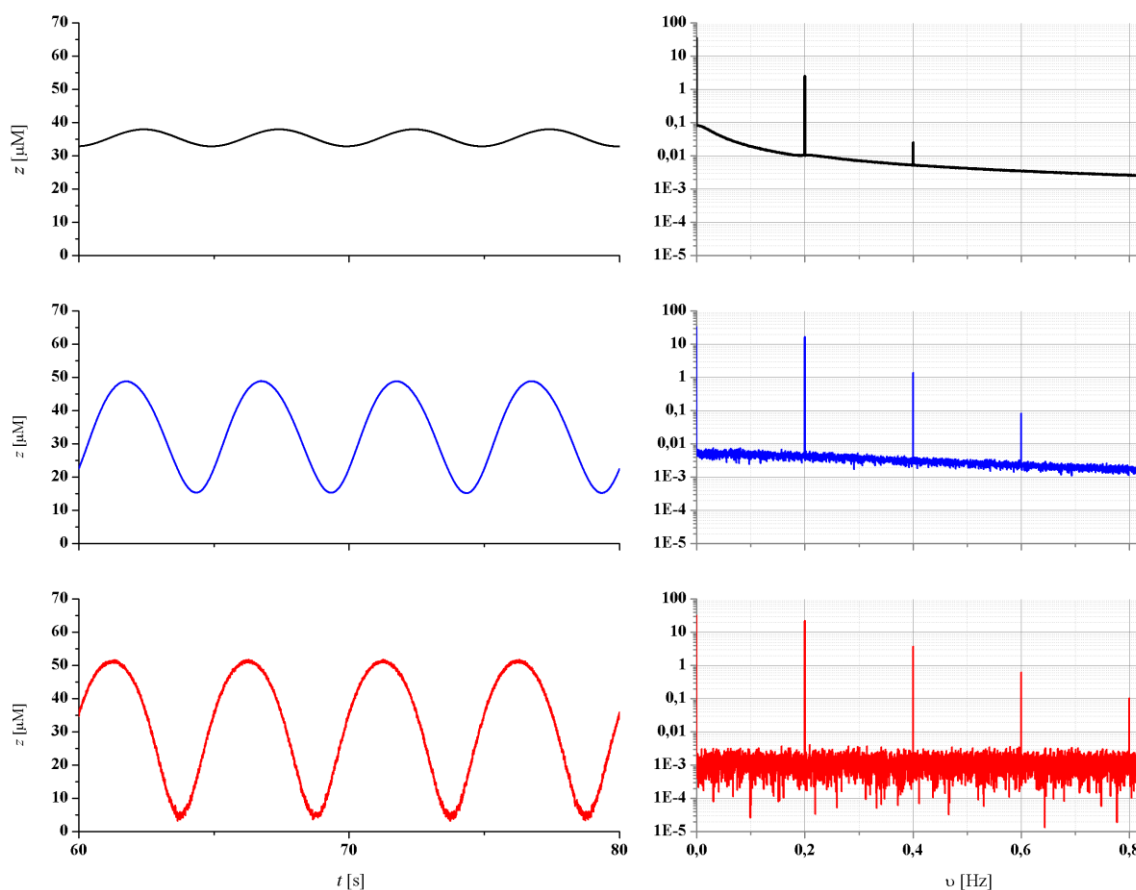
Slika 28. Časovni potek "čistega" vhodnega signala. Graf pod njim prikazuje jakost signala v frekvenčnem prostoru.



Slika 29. Časovni potek vhodnega signala, na katerega je nanesen šum, in frekvenčna karakteristika za ta signal.

V sliki (28) graf prikazuje vhodni signal, ki ne vsebuje motenj oziroma je razmerje med motnjo in signalom zelo veliko. V spektru tega signala sta dva izrazita vrha pri frekveni 0 s^{-1} in $0,2 \text{ s}^{-1}$. Vrh pri frekveni 0 s^{-1} je prisoten zaradi povprečne vrednosti signala, ki bi bil za funkcijo $\sin(x)$ enak 0. Toda v našem primeru pa periodična funkcija niha okoli neke ne ničelne vrednosti. Drugi vrh zaznamo pri frekveni $0,2 \text{ s}^{-1}$. Ta vrh ponazarja frekvenco, s katero niha vhodni signal. Zgornji graf na sliki (29) prikazuje vhodni signal, kateremu smo dodali šum. Če primerjamo spektra "čistega" vhodnega signala na sliki (28) in spekter vhodnega signala s šumom na sliki (29), lahko vidimo, da je razmerje med jakostjo vhodnega signala in šumom precej manjše kot v primeru "čistega" signala. Ista vrha sta prisotna tudi v primeru, ko vhodni signal vsebuje šum, a sta relativno manj izrazita.

Kako se MAPK odziva na spreminjanje koncentracije Ca^{+2} pri različnih vrednostih konstant k_{on} in k_{off} in ob enakem faktorju ojačanja, je prikazano na sliki (30). Če želimo to storiti, mora bit vrednost konstante K v vseh primerih enaka in tako lahko pri dani vrednosti za k_{off} in K določimo tudi k_{on} . Odziv proteinske kaskade v časovnem in frekvenčnem prostoru pri različnih vrednostih konstant k_{on} in k_{off} je prikaz na sliki (30).

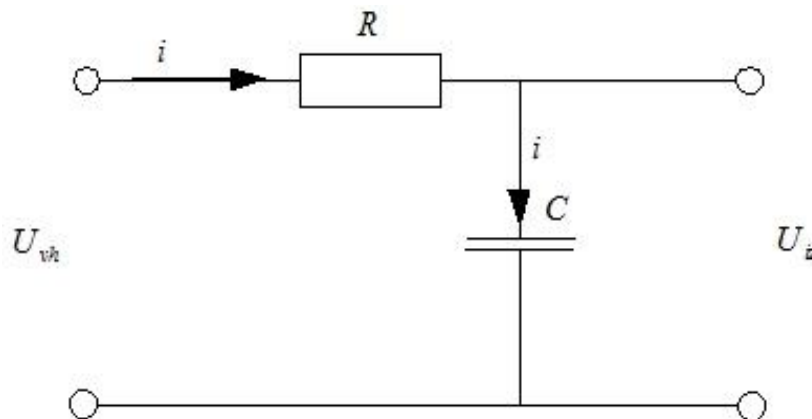


Slika 30. Odziv proteinske kaskade na vhodni signal s šumom. Vrednosti parametrov so $z_{\text{tot}}=100 \mu\text{M}$ in v vseh primerih je $K = 1 \mu\text{M}$. Vrednosti konstante k_{off} od vrha proti dnu so $0,1 \mu\text{M}$; $1 \mu\text{M}$ in $100 \mu\text{M}$.

Na sliki (30) so prikazani časovni odzivi MAPK-a pri različnih vrednostih konstant k_{off} in k_{on} . Razvidno je, da je MAPK, pri velikih vrednostih konstante k_{off} in posledično tudi konstante k_{on} , zelo občutljiv na spremembe vhodnega signala. Iz frekvenčnih odzivov lahko razberemo, da je večina šuma ostala v izhodnem signalu. Dekodacija vhodnega signala v tem primeru predstavlja konstanto koncentracijo aktiviranih proteinov v stacionarnem stanju. V tem primeru bi se informacija, ki je nanešena na vhodni signal, znotraj biološkega sistema napačno interpretirala in posledično bi celica napačno izvedla njeno nalogo. Iz prvih dveh grafov na sliki (30), je razvidno, da je večino višjih frekvenc kaskada prestregla ter da so v izhodnem signalu močnejše zastopane frekvence v nizkofrekvenčnem območju. Posledica tega bo relativno malo odstopanje koncentracije aktiviranih proteinov od stacionarnega stanja. Če bi torej bili časovni

konstanti k_{on} in k_{off} dovolj majhni, bi lahko v stacionarnem stanju govorili o konstantni koncentraciji aktiviranih proteinov.

Tudi v elektroniki se za izločanje šumov iz signalov, za izločanje informacij iz signala, za glajenje signala, ki ga želimo dekodirati, uporabljajo razni filtri. Vhodni signal, ki je voden na nizkofrekvenčni filter, predstavlja pomembne vzorce, ki nosijo določeno informacijo. Med prenosom se lahko temu signalu dodajo motnje. Te lahko odstranimo s filtrom, ki prepušča le določene frekvence. Predstavili bomo nizkofrekvenčno prepustno sito, sestavljeno iz RC člena. Da bi bolje razumeli, kako je prepustnost RC člena povezana s frekvenco, bomo ta člen analizirali v izmeničnem tokokrogu. Na sliki (31) je prikazana pasivna izvedba RC člena.



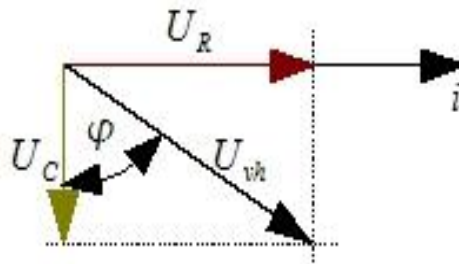
Slika 31. Vezje RC člena ali pasivnega nizkofrekvenčno prepustnega filtra.

Nizkofrekvenčno prepustno sito je sestavljeno iz upora (R) in kondenzatorja (C), kakor je to prikazano na sliki (31). Izhodni signal U_{iz} opazujemo na kondenzatorju, ki hkrati predstavlja izhod sita. Kadar je kondenzator priključen na enosmerno napetost, pravimo, da ima neskončno upornost. Tok skozi njega ne teče. V primeru, ko pa ga priključimo na izmenično napetost, lahko tudi izmerimo tok, ki teče po veji, v kateri je priključen kondenzator. Tok, ki ga izmerimo, ne predstavlja prehod elektronov iz ene plošče na drugo, temveč je posledica nihanja polaritete med ploščama. Če bi izvajali meritev tako, da bi spreminjali frekvenco vhodne napetosti in merili tok skozi kondenzator, bi ugotovili, da pri večjih frekvencah "skozi" kondenzator teče večji tok oziroma se njegova upornost manjša. To dejstvo je povezano z impedanco vezja. Impedanca je

upornost, ki jo sestavljata ohmska upornost in reaktanca, ki predstavlja navidezno upornost vezja. Navidezno upornost kondenzatorja lahko izračunamo s spodnjo enačbo.

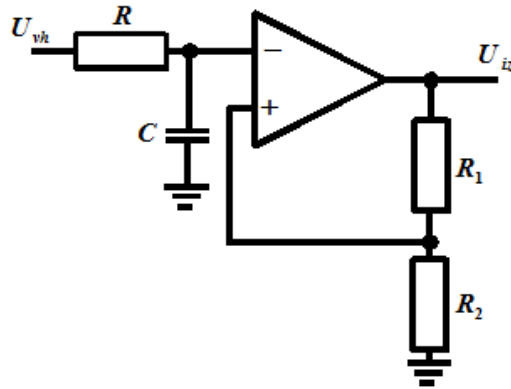
$$X_C = \frac{1}{j\omega C} . \quad 4.20$$

Ker sta upor in kondenzator vezana zaporedno, velja, da skozi oba teče isti tok. Za napetost na čisto ohmskem elementu velja, da je zmeraj v fazi s tokom, za napetost na kondenzatorju pa velja, da ta zaostaja glede na tok za fazo 90° . Zagotoviti moramo, da ima naprava, ki jo vežemo na izhod vezja, visoko impedanco. S tem zagotovimo, da skozi upor in kondenzator teče enak tok i oziroma da ni fazne razlike v toku skozi upor in kondenzator. S tem se analiza vezja zelo poenostavi in lahko narišemo fazni diagram, ki je prikazan na sliki (32).



Slika 32. Fazni diagram zaporednega RC člena, priklopljenega na AC napetost.

Sledi obravnava, kaj se zgodi, če pred operacijski ojačevalnik vežemo tak RC člen. Vezje aktivnega nizkofrekvenčno prepustnega sita je prikazano na sliki (33). Omenili smo, da mora imeti naprava, ki je priključena na RC člen, veliko impedanco, kar operacijski ojačevalnik tudi izpolnjuje, saj je njegova impedanca reda $M\Omega$



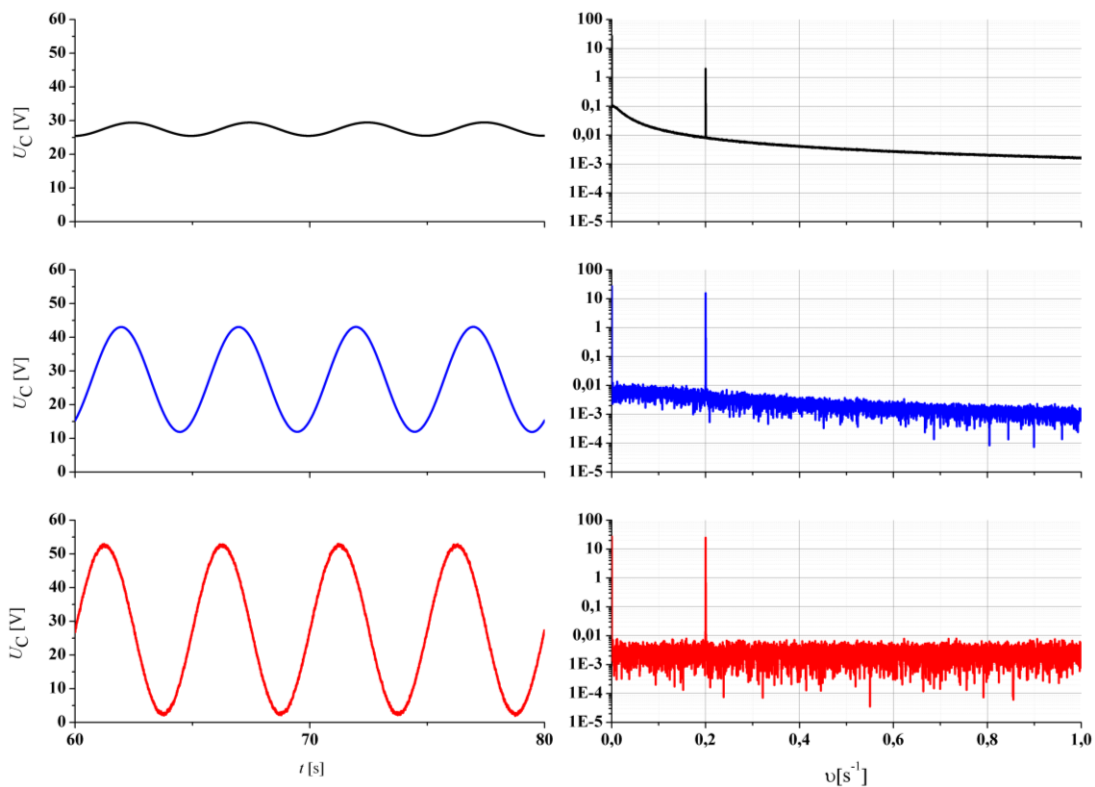
Slika 33. Vezje nizkofrekvenčno prepustnega sita.

Napetost na invertirajočem vhodu, ki je označen z znakom -, je enaka napetosti na kondenzatorju oziroma je sorazmerna s količino naboja, ki se nabere na njem. Ojačanje je v tem primeru odvisno od frekvence vhodnega signala. Če je vhodni signal sestavljen iz različnih frekvenc, pa vseh frekvenc ne bo enako dobro prepuščal. Za ojačanje nizkofrekvenčno prepustnega sita tako velja enačba:

$$A(\omega) = \frac{A_{DC}}{\sqrt{1 + \tau^2 \cdot \omega^2}} \quad 4.21$$

Iz enačbe (4.21) je razvidno, da večja kot je frekvenca signala, manjše je ojačanje. Signalu, ki vsebuje motnje višjih frekvenc, lahko te odstranimo s pomočjo takšnega vezja. Pomembno vlogo pri določanju mejne frekvence pa ima konstanta τ . Manjša kot je ta konstanta, večja je mejna frekvenca. V podanem primeru vrednost mejne frekvence ne sme biti manjša od $0,2 \text{ s}^{-1}$ oziroma konstanta τ ne sme biti večja od 5 s, saj bi v nasprotnem primeru pričeli izločati tudi signale, ki nihajo s frekvenco $0,2 \text{ s}^{-1}$.

Omeniti je potrebno tudi časovni odziv izhoda nizkofrekvenčno prepustnega sita, če na njegov vhod vodimo signal, ki ga opisuje enačba (4.19). Na vhodu bomo spreminjali vrednost konstante τ in s tem tudi mejno frekvenco sita. Rezultati te simulacije so prikazani na sliki (34).



Slika 34. Graf časovnega poteka ojačanega izhodnega signala, ko na vhod nizkofrekvenčnega sita vodimo signal, ki vsebuje šum. Za vsak signal je prikazan tudi frekvenčni spekter. Vrednost parametra τ je od vrha proti dnu 10 s, 1 s in 0,01 s.

Iz slike (34) je razvidno, da je izhod nizkofrekvenčno prepustnega sita manj občutljiv na spremembe vhodnega signala pri manjših vrednostih konstante τ . Vidimo lahko, da je pri večjih vrednostih časovne konstante τ signal tudi bolj zglajen. To se pozna tako v časovnem kot tudi v frekvenčnem prostoru.

Ko je časovna konstanta τ enaka 1 s, je izhodni signal kar dobro zglajen. Razmerje med šumom in vhodnim signalom je dokaj veliko in vpliv višjih frekvenc je vedno manjši. Ko je časovna konstanta enaka 10 s, vidimo, da je v izhodnem signalu manjša prisotnost nosilnega signala. Pri časovni konstanti, večji od 5 s, je menja frekvenca manjša od $0,2 \text{ s}^{-1}$. Tako filter prične izločati tudi te frekvence oziroma informacijo samo. Ko je časovna konstanta torej enaka 10 s, je mejna frekvenca enaka $0,1 \text{ Hz}$ in posledično to aktivno sito ne prepušča več niti informacije same tako dobro.

Do sedaj smo obravnavali pomen proteinske kaskade pri prevajanju, ojačevanju in glajenju signala. V nadaljevanju bomo obravnavali vprašanje, kako lahko te lastnosti še dodatno izboljšamo ali jih celo zatremo. Pozornost bo usmerjena na povratne vezave.

4.4 POVRATNE VEZAVE

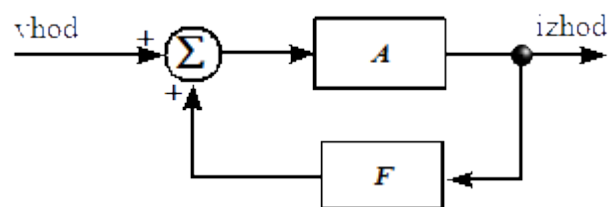
Osnovna ideja povratne vezave je, da del izhodnega signala vodimo nazaj na vhod, kjer se lahko vhodni in izhodni signal odštejeta ali seštejeta. Kolikšen del izhodnega signala se vodi nazaj na vhod, pa določa jakost povratne vezave. Tako v osnovi ločimo dve povratni vezavi. Pozitivno povratno vezavo, ki povzroča, da se sistem hitro znajde v limitnem stanju, ki je določeno z zunanjimi faktorji. Sistemi, ki vsebujejo pozitivno povratno zanko, so zelo občutljivi na spremembe vhodnega signala. Poznamo še negativno povratno vezavo, pri kateri signal, ki ga vodimo nazaj na vhod, deluje tako, da nasprotuje spremembam na vhodu sistema. Tako ostaja sistem v stabilnem stanju [28]. V nadaljevanju bodo sledile posamezne povratne vezave v biološkem in električnem sistemu.

Preprost model povratne zanke je termostat. Če vklopimo klimatsko napravo in na termostatu nastavimo določeno temperaturo, bo naprava toliko časa dovajala topel ali hladen zrak, dokler v sobi, kjer se nahaja termostat, ni dosežena nastavljena temperatura. Ko v sobi dosežemo željeno temperaturo, termostat pošlje signal nazaj v klimatsko napravo in ji sporoči, naj preneha z dovajanjem toplega ali hladnega zraka. Drugi model povratne zanke je količina izpušnih plinov in potreba po energiji. Ker slednja vedno bolj raste, nastajajo nove elektrarne, da se zagotovi dovolj energije. Nekatere od teh novih elektrarn uporabljajo fosilna goriva in tako se z večjim številom elektrarn povečuje tudi količina izpušnih plinov.

Na mitogensko aktivirano proteinsko kinazo lahko gledamo kot na nek kontrolni sistem, ki regulira delovanje drugih sistemov. V takšen sistem vodimo nek zunanji signal, ki se na določen način obdela in nato vodi na ciljno mesto. Kadar del tega izhodnega signala vodimo nazaj na vhod in tako vplivamo na izhodni signal, govorimo o povratni zanki. V nadaljevanju se bomo posvetili pozitivni povratni zanki.

4.4.1 POZITIVNA POVRATNA VEZAVA

Sistemi, v katerih je prisotna pozitivna povratna vezava, veljajo za nestabilne. Ena izmed lastnosti takšnih sistemov je bistabilnost, pri kateri sistem skokovito preklopi iz enega skrajnega stanja v drugo. Navadno je eno izmed stanj določeno z visoko vrednostjo izhodnega signala ali z visoko koncentracijo aktiviranih proteinov. Drugo stanje pa je določeno z nizko vrednostjo izhodnega signala ali nizko koncentracijo aktiviranih proteinov. Obe stanji veljata za stabilni. Pri določenih pogojih lahko nastopa oscilirajoča dinamika ali kaotična dinamika sistema. Na sliki (35) je prikazana shema, kjer je v sistemu vključena pozitivna povratna zanka.



Slika 35. Shema pozitivne povratne zanke. Vhodnemu signalu se v točki Σ prišteje določen delež izhodnega signala.

Pozitivne povratne zanke lahko najdemo tudi v nekaterih znotrajceličnih signalizacijskih poteh. Spoznali smo že, da je odziv proteinskih kaskad ultrasenzitiven in da lahko imajo različne proteinske kaskade tudi različne hillove koeficiente, ki so merilo ultrasenzitivnosti. Izkazalo se je, da pozitivna povratna zanka poveča stopnjo ultrasenzitivnosti. In večja kot je vrednost hillovega koeficienta, manjša porast vhodnega signala je potrebna, da preide proteinska kaskada iz stanja, kjer je aktiviranih manj kot 10 % vseh proteinov, v stanje, kjer je aktiviranih več kot 90 % vseh proteinov [29].

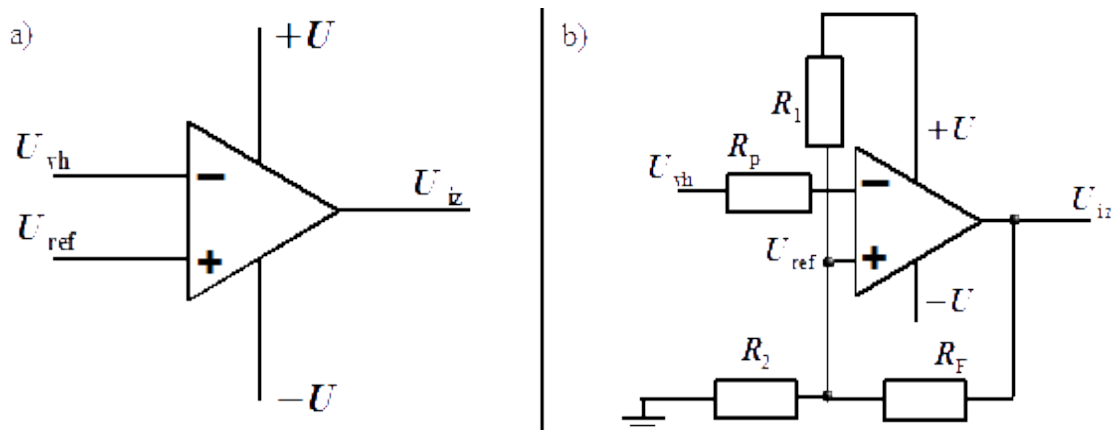
Velika občutljivost proteinske kaskade na vhodni signal pa ima posledično za sistem le dve stabilni stanji. Prvo stabilno stanje je, kadar so vsi proteini deaktivirani, in drugo stanje je, ko so vsi proteini aktivirani. Sistem se lahko, zaradi strmine aktivacije in deaktivacije, nahaja le v enem od teh dveh stanj. To lastnost imenujemo tudi bistabilnost in je ena od posledic pozitivne povratne vezave ter jo pogosto najdemo v stikalnih sistemih.

V konkretnem primeru bomo uporabili komparator, ki je prikazan na sliki (36a), s pozitivno povratno vezavo, kot je to prikazano na sliki (36b). Ta vezava deluje tako, da primerja vhodno napetost z referenčno napetostjo. Napetost na izhodu je sorazmerna z razliko med vhodno in referenčno napetostjo, dokler izhodna napetost ne doseže mejne vrednosti. Ta je določena z $+U$ in $-U$, katero pa komparator hitro doseže zaradi velikega ojačanja. Posledično bo izhodna napetost zavzemala le dve vrednosti, skrajno pozitivno ali skrajno negativno. Izhod bo zavzemal skrajno pozitivno napetost, ko bo vhodna napetost manjša od referenčne napetosti, in skrajno negativno vrednost, ko bo vhodna napetost večja od referenčne napetosti. Zaradi različnih polaritet, ki jih izhodna napetost zavzema, se referenčni napetosti razlikujeta [30]. Določimo ju po enačbi:

$$U_1 = +U \cdot \frac{R_2 \cdot (R_1 - R_F)}{R_2 \cdot (R_1 + R_F) + R_1 \cdot R_F}$$

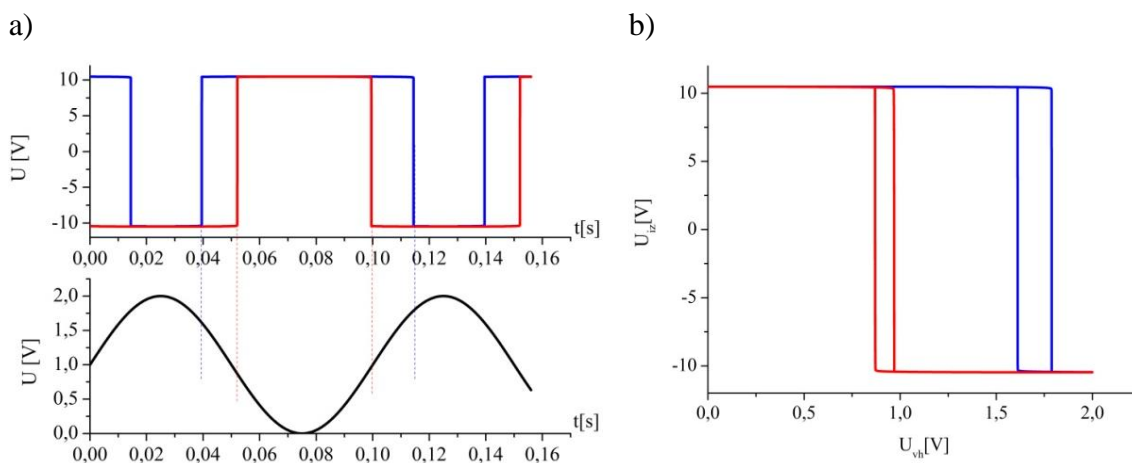
$$U_2 = +U \cdot \frac{R_2 \cdot (R_1 + R_F)}{R_2 \cdot (R_1 + R_F) + R_1 \cdot R_F} .$$

Vhodni signal bo predstavljala funkcija $U_{vh}(t) = 0,5V(1 + \sin(2 \cdot \pi \cdot 0,2 \text{ s}^{-1} \cdot t))$, vrednosti posameznih uporov pa bodo $R_1 = 600 \Omega$, $R_2 = 100 \Omega$ in $R_F = 10 \text{ k}\Omega$. Na podlagi teh podatkov lahko napovemo, da se bo na izhodu komperatorja prvič menjala polariteta, ko bo vrednost vhodnega signala manjša od $U_1 = 1,6 \text{ V}$, in nato drugič, ko bo vrednost vhodnega signala večja od $U_2 = 1,8 \text{ V}$. Ker imamo periodično funkcijo, bi se ta cikel ponavljal, dokler ne bi izklopili vhodnega signala. Ta opis velja za idealni operacijski ojačevalnik. Za realni operacijski ojačevalnik pa seveda ni čisto tako. Občutljivost komperatorja je odvisna predvsem od odprtozančnega ojačanja, ki je navadno reda 100 000. Ta faktor ojačanja in napajalna napetost vplivata na zgornjo in spodnjo vrednost odstopanja od referenčne vrednosti, znotraj katere izhod naraste na maksimalno vrednost ali pa pade na minimalno vrednost.



Slika 36. a) Komparator brez povratne vezave, b) komparator s pozitivno povratno vezavo.

S programom National Instruments 10 je bila opravljena simulacija sistema, prikazanega na sliki (36b). V simulaciji je bil uporabljen model operacijskega ojačevalnika TL083. Z osciloskopom v programu je bil posnet vhodni in izhodni signal. Dobljeni podatki simulacije so bili izvoženi in obdelani. Meritve so bile opravljene za različne vrednosti upora R_2 . Rezultati simulacije so prikazani na sliki (37).



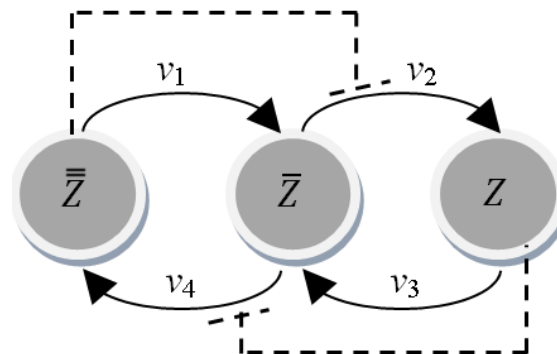
Slika 37. a) Časovni potek izhodnega in vhodnega signala komparatorja, b) spreminjanje izhodne napetosti v odvisnosti od vhodne.

Na sliki (37a) je prikazan časovni potek spreminjanja izhodne napetosti na komparatorju, za primer, ko je $R_2 = 50 \Omega$ (modra črta) in primer ko je $R_2 = 100 \Omega$ (rdeča črta). Slika (37b) prikazuje, kako se spreminja izhodna napetost v odvisnosti od vhodne

napetosti, pa lahko opazimo histerezo zanko, za katero je značilno, da je preklapljanje iz enega stanja v drugo stanje nesimetrično, le-ta pa je ena od pokazateljev bistabilnosti.

Vidimo lahko, da upornik R_2 deluje kot regulator. S spreminjanjem vrednosti tega upora nastavljamo referenčni napetosti U_1 in U_2 ter posledično napetostni pas, v katerem je sistem v aktivnem stanju ali v neaktivnem stanju. Hkrati s spreminjanjem tega upora spreminjamo tudi jakost pozitivne povratne zanke.

V tehniki se takšna vezja uporabljajo predvsem za pretvarjanje analognih signalov v digitalne. Vežja, ki opravljajo takšno nalogo, imenujemo analogno digitalni pretvorniki. Ta primer je izbran z namenom, saj se tudi proteinskim kaskadam pripisujejo lastnosti moduliranja signala. Za prikaz pomena pozitivne povratne zanke v bioloških sistemih bomo uporabil model, ki temelji na dvojni fosforilaciji [31]. V tem modelu predstavlja $\bar{\bar{Z}}$ neaktivirano proteinsko kinazo, \bar{Z} enkrat fosforilirano proteinsko kinazo in Z dvakrat fosforilirano proteinsko kinazo. Shema modela je prikazana na sliki (38).



Slika 38. Prikazan modela proteinske kaskade z dvojno fosforilacijo in vključenimi zankami, ki vplivajo na pozitivno povratno vezavo.

Slika (38) ponazarja omenjen model z dvojno fosforilacijo. Ko stimuliramo takšno kaskado, se pričnejo neaktivirani proteini fosforilirati. Hitrost, s katero poteka ta proces, določa spremenljivka v_1 . Proteini, na katere je že vezan en fosfat, se nato še enkrat fosforilirajo. Hitrost tega procesa določa spremenljivka v_2 . Hitrost, s katero se koncentracija dvojno fosforiliranih proteinov zmanjšuje in prehaja v stanje z enojno fosforilacijo določa spremenljivka v_3 . Vrednost spremenljivke v_4 pa določa, kako hitro enojno fosforilirani proteini prehajajo v neaktivno stanje. Pri tem procesu so prisotne

zaviralne zanke, ki vplivajo na hitrost teh prehodov. Prva zanka direktno vpliva na vrednost spremenljivke v_2 in povezuje neaktivne proteine ter dvojno fosforilirane proteine. Druga zanka direktno vpliva na vrednost spremenljivke v_4 in povezuje dvojno fosforilirane proteine z enojno fosforiliranimi proteini. Vpliv zanke je tak, da večja koncentracija \bar{Z} zmanjšuje vrednost v_2 in posledično upočasnjuje hitrost fosforilacije Z . Vpliv druge zanke je tak, da večja koncentracija Z zmanjšuje vrednost spremenljivke v_4 in posledično hitrost defosforilacije \bar{Z} . Te interakcije pa vodijo do pozitivne povratne zanke, ki spodbuja nastanek \bar{Z} . Matematična povezava med temi količinami je povzeta v spodnjih enačbah .

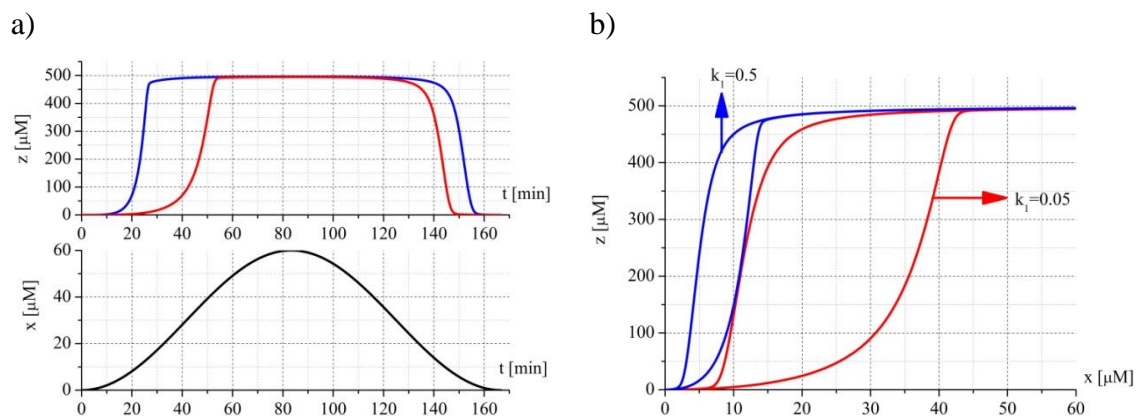
$$\begin{aligned} \frac{\partial \bar{Z}}{\partial t} &= v_4 - v_1 & v_1 &= \frac{k_1^{\text{cat}} \cdot \frac{x}{K_{m1}} \cdot Z}{1 + \frac{\bar{Z}}{K_{m2}} + \frac{Z}{K_{m1}}} \\ \frac{\partial Z}{\partial t} &= v_2 - v_3 & v_2 &= \frac{k_2^{\text{cat}} \cdot \frac{x}{K_{m2}} \cdot \bar{Z}}{1 + \frac{\bar{Z}}{K_{m2}} + \frac{Z}{K_{m1}}} \\ \frac{\partial \bar{Z}}{\partial t} &= -\left(\frac{\partial \bar{Z}}{\partial t} + \frac{\partial Z}{\partial t}\right) & v_3 &= \frac{k_3^{\text{cat}} \cdot \frac{\text{Phos}}{K_{m3}} \cdot \bar{Z}}{1 + \frac{\bar{Z}}{K_{m3}} + \frac{\bar{Z}}{K_{m4}} + \frac{Z}{K_{m5}}} \\ Z_{\text{tot}} &= \bar{Z} + \bar{Z} + Z & v_4 &= \frac{k_4^{\text{cat}} \cdot \frac{\text{Phos}}{K_{m4}} \cdot \bar{Z}}{1 + \frac{\bar{Z}}{K_{m3}} + \frac{\bar{Z}}{K_{m4}} + \frac{Z}{K_{m5}}} \end{aligned}$$

V tabeli (3) so podane vrednosti parametrov, ki se v nadaljnjih primerih ne bodo spreminjale.

Michaelisove konstante	$K_{m1} = 50$	$K_{m2} = 500$	$K_{m3} = 22$	$K_{m4} = 18$	$K_{m5} = 86$
Katalitične konstante	$k_2^{\text{cat}} = 15$	$k_3^{\text{cat}} = 0.06$	$k_4^{\text{cat}} = 0.084$		

Tabela 3. Vrednosti konstant za numerični model dvojno fosforilirane proteinske kaskade.

S pomočjo numeričnega programa je bila napravljena simulacija odziva takšne kaskade. Za vhodni signal je bila uporabljena funkcija sinus, ki je nihala med vrednostma 0 in 60. Perioda funkcije je bila zelo velika ($t_0 = 10000\text{s}$), tako da je imela kaskada na razpolago dovolj časa, da se je odzvala na povečanje vhodnega signala in dosegla stacionarno stanje. Pri simulaciji smo opazovali, kako se spreminja koncentracija dvojno fosforiliranih proteinov v odvisnosti od časa. Opravili smo dve simulaciji za različne vrednosti parametra k_1^{cat} . V sliki (39a) je prikazano, kako se je spreminjala koncentracija dvojno fosforiliranih proteinov v odvisnosti od časa in hkrati tudi časovni potek vhodnega signala. V sliki (39b) pa je prikazana vhodno—izhodna karakteristika tega sistema za obe vrednosti parametra k_1^{cat} .

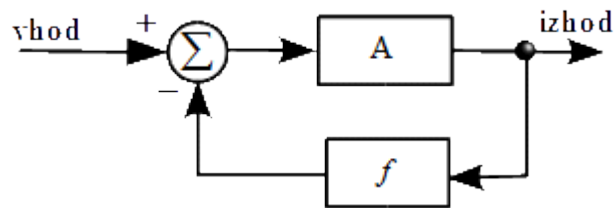


Slika 39. Časovni potek spreminjanja koncentracije vhodnega signala in koncentracije dvojno fosforiliranih proteinov: a) časovni potek vhodnega in izhodnega signala in b) vhodno—izhodna karakteristika. Vrednosti konstant so podane v tabeli (3)

Pri različnih vrednostih konstante k_1^{cat} je odziv biološkega sistema drugačen. Manjša kot je vrednost te konstante, manjša vrednost vhodnega signala je potrebna, da biološki sistem preklopi iz aktivnega v neaktivno stanje in obratno. Prisotna je tudi bistabilnost, ki je pokazatelj na pozitivno povratno zanko. Tudi vhodno—izhodna karakteristika nam prikazuje histerezno zanko. Vlogo konstante k_1^{cat} lahko primerjamo z vlogo upornika R_2 . Naloga obeh je nastavljanje referenčne vrednosti oziroma vrednosti, pri kateri izhod sistema preide iz aktivnega v neaktivno stanje ali nasprotno. Referenčni vrednosti se tudi v tem primeru razlikujeta ob aktivaciji in deaktivaciji proteinske kaskade. Zaradi tega je tudi v tem primeru prisotna nesimetrija vklopno—izklopne karakteristike.

4.4.2 NEGATIVNA POVRATNA VEZAVA

Kadar se del izhodnega signala vodi nazaj na vhodni signal na način, da se ta dva odštejata, govorimo o negativni povratni zanki, ki je prikazana v sliki (40). Navadno za del izhodnega signala, ki se vodi nazaj na vhod, govorimo, da je v nasprotni fazi z vhodnim signalom. Nekatere lastnosti negativne povratne zanke so zaviranje šumov, stabilizacija sistema in manjšanje amplitude ob povečevanju mejne frekvence.



Slika 40. Shema negativne povratne zanke.

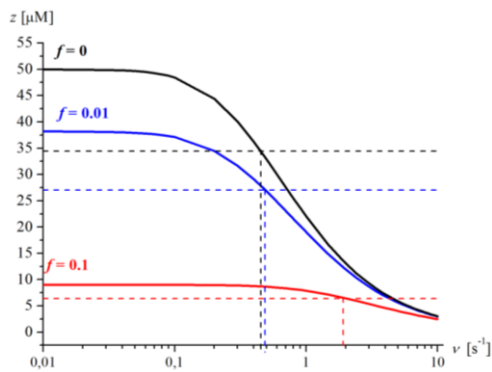
Vpliv negativne povratne zanke bomo prikazali na eni proteinski kaskadi, katere izhodni signala vodimo preko negativne povratne zanke nazaj na vhod. Vpliv negativne povratne zanke bomo v matematični obliki upoštevali tako, da od dejanskega vhodnega signala x odštejemo določen del izhodnega signala. Kolikšen pa ta del je, je odvisno od jakosti povratne vezave f . Z enačbo (4.22) bomo opisali dinamiko proteinske kaskade z negativno povratno vezavo.

$$\frac{\partial z}{\partial t} = k_{\text{on}}(x - fz)(z_{\text{tot}} - z) - k_{\text{off}}z \quad . \quad (4.22)$$

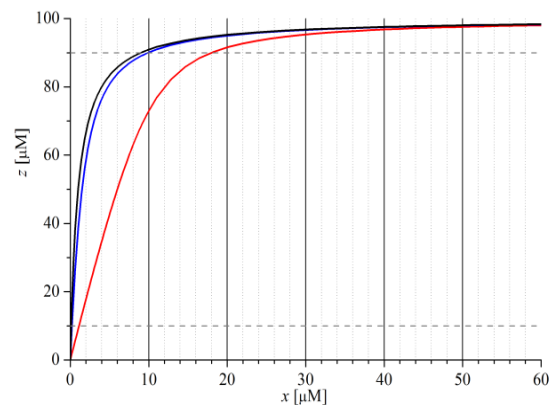
Če je negativna povratna vezava nastavljena pravilno, to omogoča večjo stabilnost sistema, kjer je stabilnost sistema pogojena z odvisnostjo izhodnega signala od vhodnega. Pri pozitivni povratni zanki smo pokazali stikalne lastnosti takšnih sistemov, ki so posledica nestabilnosti. Sistem je hitro preklopil iz enega stanja v drugo stanje in se nato več ni odzival na spremembe vhodnega signala. Pri negativni povratni zanki pa lahko dosežemo večjo odvisnost izhodnega signala od vhodnega. V poglavju o stikalih smo omenili ultrasenzitivnost. Ker negativna povratna zanka zmanjšuje

ultrasenzitivnost, posledično tudi zmanjšuje hillov koeficient, ki služi kot merilo ultrasenzitivnosti.

Da lahko preverimo te trditve na proteinski kaskadi, sta bili napravljene dve simulaciji. V prvi smo na proteinsko kaskado vodili sinusni signal in opazovali, kako se spreminja amplituda aktiviranih proteinov v odvisnosti od frekvence vhodnega signala in jakosti negativne povratne vezave. Rezultati simulacije so prikazani na sliki (41). V drugi simulaciji pa smo raziskali, kako se spreminja koncentracija aktiviranih proteinov v odvisnosti od amplitude vhodnega signala. Rezultati druge simulacije so prikazani s sliko (42).



Slika 41. Pri izračunih so imele konstante vrednost $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$, $k_{\text{on}} = 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in $k_{\text{off}} = 1 \text{s}^{-1}$.



Slika 42. Odziv proteinske kaskade na različne vrednosti prostega kalcija v citosolu pri različnih vrednostih jakosti povratne zanke. Parametri so isti kot parametri, uporabljeni pri sliki (41).

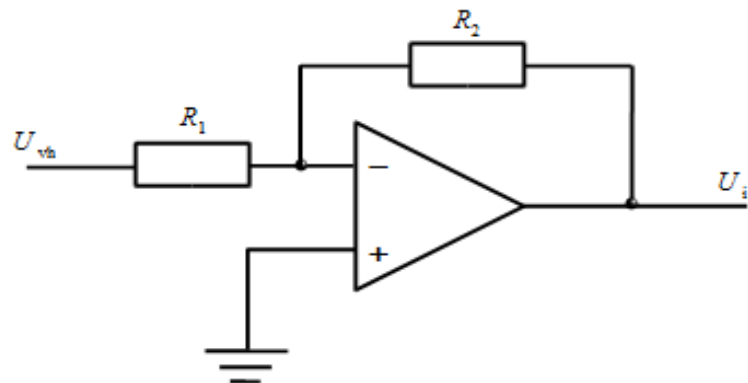
Iz slike (41) je razvidno, da se z večjo jakostjo negativne povratne vezave povečuje tudi vrednost mejne frekvence in hkrati zmanjšuje ojačanje. Pri večji mejni frekvenci je izhodni signal bolj podoben vhodnemu. Rezultati v sliki (42) pa prikazujejo, kako se spreminja stacionarna vrednost koncentracije aktiviranih proteinov v odvisnosti od amplitude vhodnega signala. Vidimo lahko, da strmina krivulje z večanjem jakosti povratne vezave pada. Posledično je potreben večji vhodni signal, da doseže izhod proteinske kaskade stacionarno stanje in je tako koncentracija aktiviranih proteinov v večjem intervalu odvisna od vhodnega signala.

Graf na sliki (42) prikazuje močno odvisnost odzivnosti kaskade od jakosti negativne povratne zanke. Merilo za odzivnost proteinske kaskade je hillov koeficient, ki nam pove, v kolikšnem intervalu vhodnega signala koncentracija aktiviranih proteinov naraste iz 10 % na 90 % vseh proteinov. Oglejmo si hillove koeficiente za zgornje tri krivulje, ki so zapisani v tabeli (4).

	$f = 0$	$f = 0,001$	$f = 0,1$
$x_{z,10}$	0,12	0,13	1,12
$x_{z,90}$	9,01	9,10	18,00
n_H	0,98	0,97	0,63

Tabela 4. Vrednosti hillovih koeficientov za različne vrednosti jakosti povratne vezave.

Tudi v elektroniki lahko najdemo ogromno sistemov, ki vsebujejo negativno povratno zanko, zaradi omenjenih lastnosti. Posledice negativne povratne zanke bomo prikazali na operacijskem ojačevalniku TL084ACD, kjer bomo neinvertirajoči vhod vezali na maso, na invertirajoči vhod pa bomo vodili vhodni signal. Jakost negativne povratne zanke je pri tem določena z uporoma R_1 in R_2 . Na sliki (43) je prikazan tak ojačevalnik.

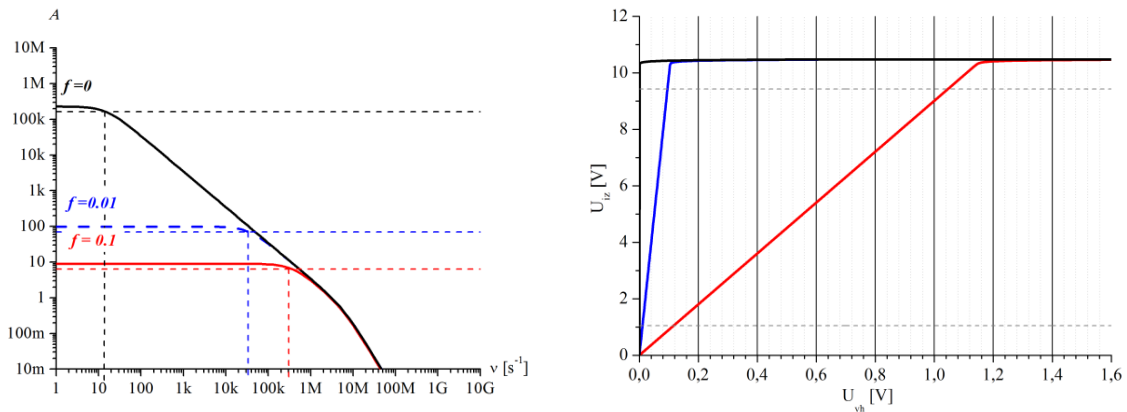


Slika 43. Ojačevalnik z negativno povratno zanko.

Ključnega pomena za pravilno delovanje takšnega operacijskega ojačevalnika je jakost negativne povratne zanke, saj lahko v nasprotnem primeru pride do oscilacij ali stikalnega delovanja ojačevalnika. Za ojačevalnik na sliki (43) jakost negativne povratne zanke določimo z enačbo (4.23).

$$f = \frac{R_1}{R_1 + R_2} \quad (4.23)$$

Sledi prikaz bode diagrama in vhodno—izhodne karakteristike ojačevalnika z negativno povratno zanko, ki je prikazan v sliki (44).



Slika 44. Desni graf prikazuje frekvenčno karakteristiko ojačevalnika pri različnih vrednostih negativne povratne zanke. Graf na levi prikazuje vhodno—izhodno karakteristiko ojačevalnika pri različnih vrednostih negativne povratne zanke.

Iz bode diagrama je razvidno, da je mejna frekvenca pri večji jakosti povratne vezave večja. Prednost večjega frekvenčnega prepustnega območja je seveda večja količina ohranjenih informacij, ki so nanese na signal. Iz grafa na sliki (44), na katerem so prikazane vhodno—izhodne lastnosti ojačevalnika pri različnih vrednostih negativne povratne zanke, lahko vidimo, da se poveča tudi območje, kjer lahko izhod ojačevalnika krmilimo z vhodno napetostjo, s čimer se poveča stabilnost sistema.

4.5 DIGITALNI SISTEMI

Do sedaj smo primerjali lastnosti proteinske kaskade z določenimi aktivnimi in pasivnimi analognimi električnimi sistemi. Izhajali smo iz lastnosti električnih elementov, ki sestavljajo določen električni sistem in te projicirali na proteinsko kaskado. Naslednji korak je primerjava z digitalnimi električnimi sistemi.

Pod osnovne elemente v digitalni elektroniki spadajo logična vrata, ki jih sestavljajo analogni električni elementi kot je tranzistor. Logična vrata morajo hitro preklopiti iz aktivnega stanja (1) v neaktivno stanje (0). Vendar ti stanji nista določeni z eno samo vrednostjo vhodnega signala, temveč znotraj določenega intervala. Najpogosteje se uporabljata TTL in CMOS vrata [32]. V tabeli (5) so podani intervali za določeno logično stanje za en in drugi tip logičnih vrat.

	vhodni signal			izhodni signal		
	U_{MIN} [V]	U_{MAX} [V]	logična vrednost	U_{MIN} [V]	U_{MAX} [V]	logična vrednost
TTL	0	0,8	0	0	0,5	0
	2	5	1	2,7	5	1
CMOS	0	1,5	0	0	0,05	0
	3,5	5	1	4,95	5	1

Tabela 5. Vrednosti logičnih stanj za TTL in CMOS logična vrata.

Vir: Pridobljeno 5. 6. 2011 iz http://www.interfacebus.com/voltage_threshold.html.

Z različno kombinacijo osnovnih vrat (NE, IN ter ALI) lahko sestavljamo druga vrata, ki jih lahko združimo v še bolj kompleksne sisteme kot so digitalni seštevalniki, spominska vezja, pretvorniki ...

Teoretično lahko proteinsko kaskado obravnavamo podobno kot logična vrata v digitalni tehniki, kadar ima ta hitre preklopne čase in se lahko nahaja le v dveh stanjih. V enem stanju je določeno število proteinov aktiviranih (1) in v drugem je določeno število proteinov neaktiviranih (0). Iz digitalne elektronike lahko vidimo, da je opravičeno definiranje logične vrednosti 1 in 0 znotraj nekega določenega intervala, vhodnega in izhodnega signala ali koncentracije. Slednjo lahko določimo na podlagi enačbe (4.13). Iz te enačbe lahko določimo, kolikšna je vrednost koncentracije aktiviranih proteinov pri določeni koncentraciji vhodnega signala. Logična stanja bomo definirali na podlagi konstante K . Logična vrednost vhodne koncentracije je v biološkem sistemu povezana z izhodno koncentracijo. V tabeli (6) imamo navedene logične vrednosti vhodne in izhodne koncentracije glede na konstanto K .

vhodni signal			izhodni signal		
x_{MIN}	x_{MAX}	logična vrednost	z_{MIN}	z_{MAX}	logična vrednost
0	$x < K$	0	0	$z_s < 0,5 z_{\text{tot}}$	0
	$x > K$	1	$z_s > 0,5 z_{\text{tot}}$	$z_s = z_{\text{tot}}$	1

Tabela 6. Logične vrednosti vhodnega in izhodnega signala za biološki sistem.

V digitalni elektroniki je izhodni signal omejen z napajalno napetostjo logičnih vrat. Tudi v bioloških sistemih je koncentracija aktiviranih proteinov omejena s koncentracijo razpoložljivih proteinov, ki se lahko aktivirajo. Vhodni signal v digitalni elektroniki lahko zavzema kakršno koli vrednost, a je zaradi bolj natančnega delovanja omejen na interval od 0 V do 5 V. Tudi v bioloških sistemih lahko koncentracija kalcija v citosolu zavzema kakršno koli vrednost, ki jo omogoča biološki sistem, a zaradi samega delovanja celice in varnostnih mehanizmov, ki preprečujejo nepravilno delovanje celice, je ta vrednost omejena.

V nadaljevanju bo sledila predstavitev osnovnih logičnih vrat v digitalni elektroniki. Vzporedno s predstavitvijo posameznih vrat bomo na podlagi njenih lastnosti oblikovali biološka logična vrata, ki delujejo na enak način. Dobljeni rezultati bodo grafično prikazani in komentirani. Ko bodo vsa vrata predstavljena, bomo iz njih izdelali tudi digitalni RS-FF, ki deluje kot spominsko vezje. Tega bomo za proteinsko kaskado matematično oblikovali.

4.5.1 LOGIČNA VRATA

V digitalni elektroniki se uporabljajo tri osnovna vrata. Ta lahko med seboj kombiniramo in tako dobimo bolj kompleksna vrata kot so to na primer XALI vrata. Spodaj so navedena imena teh treh vrat, ki jih bomo sestavil iz proteinske kaskade.

- NE vrata,
- IN vrata,
- ALI vrata.

Vrata NE so negacijska vrata in so sestavljena le iz enega vhoda (A) in enega izhoda (X). Ta vrata lahko vežemo tudi na izhod drugih logičnih vrat in jih tako negiramo. Logično delovanje teh vrat lahko opišemo kot :

$$X = \bar{A} \text{ (x je enak ne A-ju) .}$$

Vrata IN opravljajo funkcijo množenja binarnih števil. Najosnovnejši modeli teh vrat so sestavljeni iz dveh vhodov (A in B) in enega izhoda (X). Če na izhod vežemo negator, dobimo NEIN vrata. Logično delovanje IN vrat lahko opišemo:

$$X = A \cdot B \text{ (Če A in B, potem X) .}$$

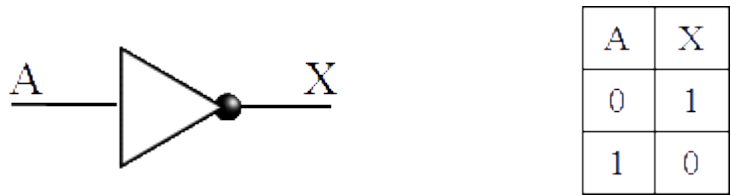
Vrata ALI delujejo kot seštevalnik binarnih števil. Tudi v tem primeru je osnovni model sestavljen iz dveh vhodov in enega izhoda. Če na izhod teh vrat vežemo negator, dobimo NEALI vrata. Logično delovanje ALI vrat lahko opišemo kot:

$$X = A + B \text{ (Če A ali B, potem X) .}$$

V nadaljevanju bomo podrobneje predstavili lastnosti posameznih vrat in vzporedno s tem izdelali tudi biološka logična vrata, ki izpolnjujejo enake lastnosti kot vrata, ki bodo predstavljena.

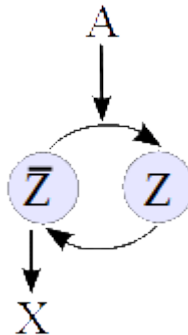
4.5.1.1 NE vrata

Edina naloga, ki jo opravljajo logična vrata NE, je, da vhodno vrednost negirajo. Negiranje pomeni, da izhod zavzema nasprotno vrednost vhoda. Na sliki (45) so prikazana NE vrata in tabela logičnih stanj.



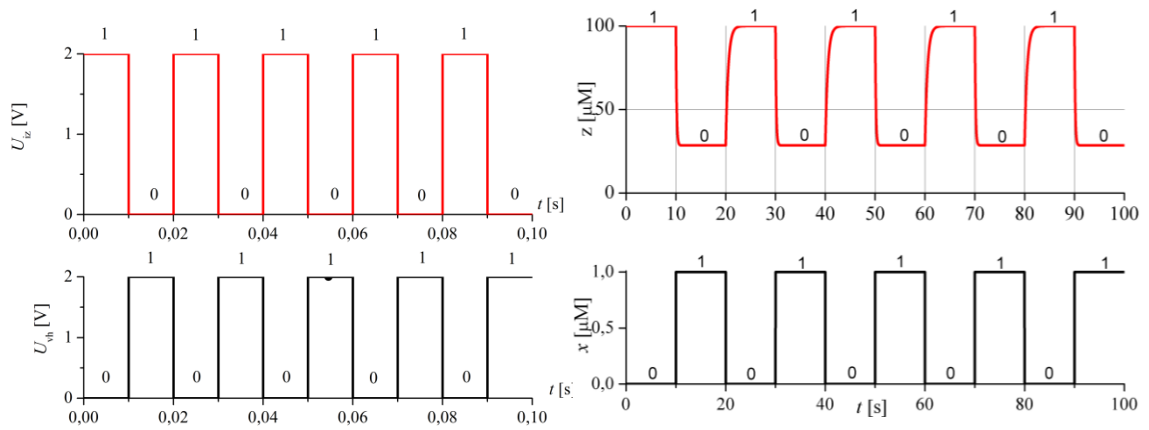
Slika 45: Logična NE vrata.

Tudi na proteinske kaskade lahko gledamo kot na logična NE vrata, kjer je vhodni signal A enak na primer koncentraciji prostega kalcija v citosolu, izhodni signal pa je enak koncentraciji neaktiviranih proteinov. Logična NE vrata iz proteinske kaskade so prikazana na sliki (46).



Slika 46: Biološka NE vrata.

V nadaljevanju sledijo časovni odzivi, ki jih dobimo v biološkem in električnem sistemu. Električni sistem je bil analiziran s programom National Instruments. Podatki so bili obdelani v programu Origin. Biološki sistem smo numerično simulirali s pomočjo programa Madonna in dobljene rezultate obdelali v programu Origin. Rezultati so prikazani s sliko (47).

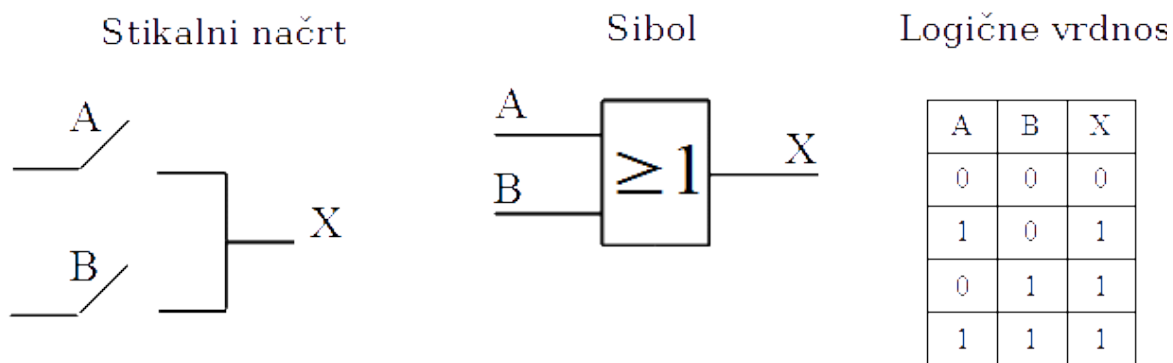


Slika 47. Leva stran slike prikazuje odziv NE vrat, izdelanih z NEIN vrati 74HC00D. Desna slika prikazuje koncentracijo neaktiviranih proteinov na stopničaste spremembe vhodnega signala. Vrednosti parametrov za biološki sistem so $x_{\max} = 1 \mu\text{M}$, $k_{\text{off}} = 10 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on}} = 50 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$. Vrednosti 0 in 1, ki so vrisane v grafih, ponazarjajo logične vrednosti.

Na vhod digitalnega sistema so bili vodeni stopničasti napetostni impulzi (slika 47, levo spodaj). Vidimo lahko, da je izhodni signal zmeraj negiran. Ko na vhodu NE vrat signal zavzema vrednost logičnega stanja 1, izhodni signal zavzema vrednost logičnega stanja 0. Tudi na vhod biološkega sistema je bil voden periodičen stopničast signal (slika 47, desno spodaj). Izhod za biološki sistem je predstavljala koncentracija neaktiviranih proteinov. Takšno proteinsko kaskado lahko uporabimo za izdelavo NE vrat, saj je izhodni signal zmeraj negiran.

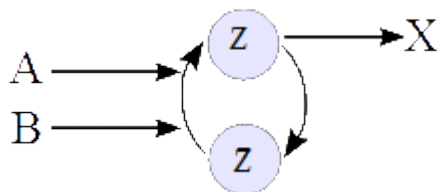
4.5.1.2 ALI vrata

Logična ALI vrata, prikazana na sliki (48), delujejo kot seštevalnik. Izhod takšnih vrat nam v vsakem primeru vrne logično vrednost 1, razen, ko sta oba vhoda enaka nič.



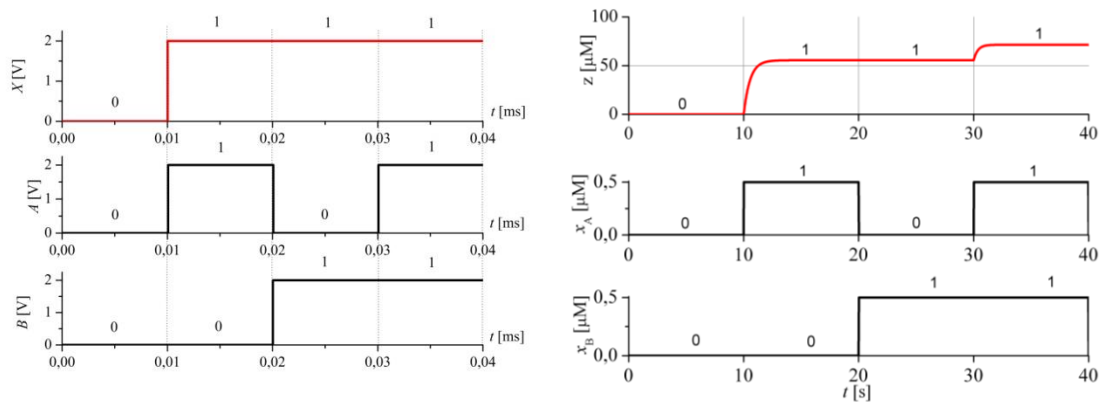
Slika 48. Logična vrata ALI.

Tudi biološki sistem lahko deluje na tak način. Predstavljajmo si, da bi na vhod proteinske kaskade vodili dva signala. Ta dva signala lahko zavzemata le določeno vrednost. Vsak od teh dveh signalov lahko sam aktivira več kot 50 % vseh proteinov. Tako lahko tudi v tem primeru dodelimo določenemu vhodnemu signalu logično vrednost 1 in logično vrednost 0.



Slika 49. Shema ALI vrat za biološki sistem.

V obeh primer sta imela oba vhoda obliko stopničastih impulzov. Stopničasti impulzi, ki so bili vodeni na vhod A, so imeli dvakrat večjo frekvenco kot stopničasti impulzi, ki so bili vodeni na vhod B. S takšnima vhodnima signaloma lahko preverimo stanje izhoda, ki se mora ujemati s tabelo, ki je prikazana na sliki (48).

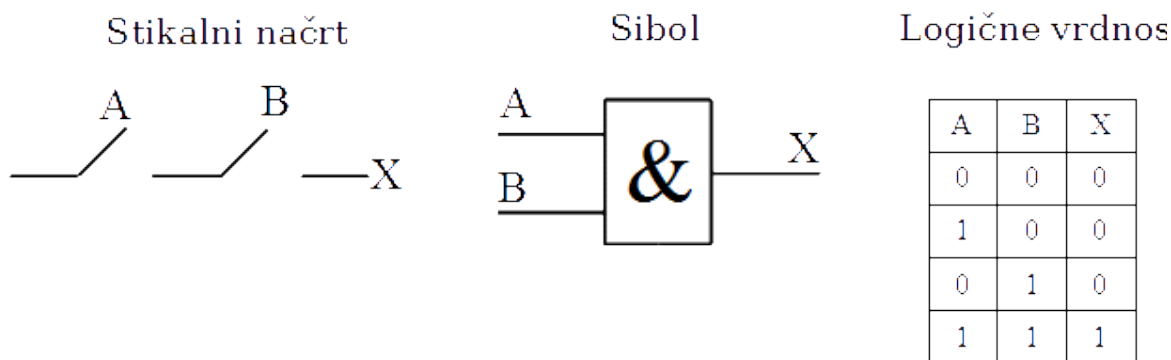


Slika 50. Leva slika predstavlja ALI vrata tipa 74HC00D . Desna slika pa biološka ALI vrata. Vrednosti parametrov so: $x_{B, \max} = 0,5 \mu\text{M}$, $x_{A, \max} = 0,5 \mu\text{M}$, $k_{\text{off}} = 30 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on}} = 100 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$.

Grafa na sliki (50) prikazujeta logična stanja, ki jih zasedata izhoda biološkega in električnega sistema pri določeni kombinaciji vhodnega signala. Razvidno je, da proteinska kaskada v tem primeru deluje kot logična ALI vrata in je tako izhod enak logičnemu stanju 0, a le, ko je vrednost obeh vhodnih signalov enaka 0.

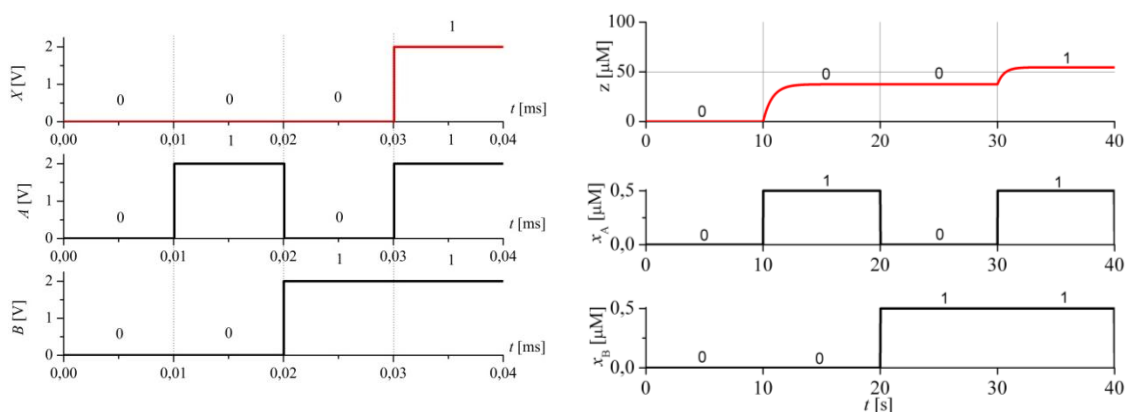
4.5.1.3 IN vrata

Logičnim IN vratom, ki so prikazana na sliki (51), je dodeljen simbol &. V vhod vrat vodimo dva signala. Vrednosti signala A in signala B sta lahko le 0 ali 1. Tako imamo, kot v prejšnjem primeru, na vhodu 4 možne kombinacije. Zanima nas, kakšno vrednost zavzema izhod teh vrat pri določeni kombinaciji vhodnih signalov A in B.



Slika 51. Logična IN vrata.

V biološkem sistemu bi lahko dosegli tako delovanje, če bi na vhod vodili dva signala in en sam signal ne bi mogel aktivirati dovolj proteinov, medtem ko bi oba signala skupaj lahko aktivirala dovolj proteinov, da sistem preide iz stanja 0 v stanje 1.



Slika 52. Leva slika prikazuje vrata tipa 74HC00D . Desna slika pa biološka ALI vrata.

Vrednosti parametrov so $x_{B, \max} = 0,5 \mu\text{M}$, $x_{A, \max} = 0,5 \mu\text{M}$, $k_{\text{off}} = 65 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on}} = 100 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$.

Iz grafov na sliki (52) so razvidna logična stanja tehničnega in biološkega sistema pri določeni kombinaciji dveh vhodnih signalov. V tem primeru proteinska kaskada deluje kot IN vrata ter zaseda aktivno stanje, a le v primeru, ko sta oba vhodna signalna v aktivnem stanju.

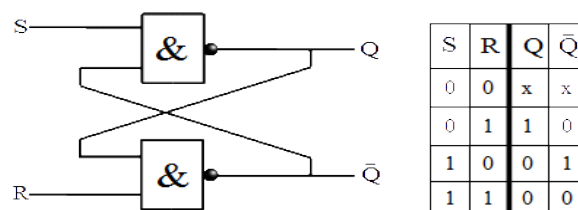
4.5.2 SPOMINSKA VEZJA

Že ime, spominsko vezje pove, da je namen teh vezij shranjevanje podatkov. V digitalni elektroniki se operira z dvojiškim zapisom števil in tako se vse matematične operacije opravljajo znotraj te množice števil. V mnogih primerih se uporablja nek analogen signal, katerega naknadno digitalno obdelamo in ga vrnemo nazaj v analogno obliko ali pa ga ohranimo v digitalnem zapisu. Postavimo se vprašanja, kaj v tem analognem signalu predstavlja informacijo in kako določimo, koliko informacij tak signal vsebuje ali pa, kako velik sistem potrebujemo, da se lahko shrani določena količina informacij.

V digitalnih sistemih je najmanjša enota za informacijo en bit, kjer lahko ta zavzema vrednost 0 ali 1. Količina informacij oziroma število bitov, ki jih lahko spominsko vezje shrani, se lahko povečuje z večanjem kombinacij, ki jih lahko digitalni sistem zavzema. V n -bitnem spominskem vezju je število teh kombinacij enako 2^n . V nadaljevanju bomo predstavili RS (reset-set) FLIP-FLOP, ki predstavlja osnovno pomnilno enoto, ki lahko shrani 1 bit informacij.

4.5.2.1 RS FLIP-FLOP

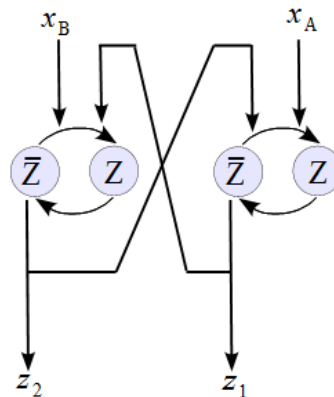
Najpreprostejša izvedba RS-FF-ja je sestavljena iz dveh NEIN ali NEALI vrat. Prikazali bomo izvedbo NEALI vrat, ki je prikazana na sliki (53). RS FLIP-FLOP je sestavljen je iz dveh vhodov in dveh izhodov. S pomočjo vhoda S (set) lahko izhod Q postavimo na logično vrednost 1. S pomočjo vhoda R (reset) lahko izhod Q postavimo na logično vrednost 0. Tako lahko vhoda S in R uporabljamo za shranjevanje ali brisanje informacij. FLIP-FLOP še vsebuje negiran izhod \bar{Q} , ki se navadno veže na maso, lahko pa ga tudi uporabimo za nadaljnje krmiljenje.



Slika 53. Shema RS-FF iz dveh ALI vrat in pravilnostna tabela.

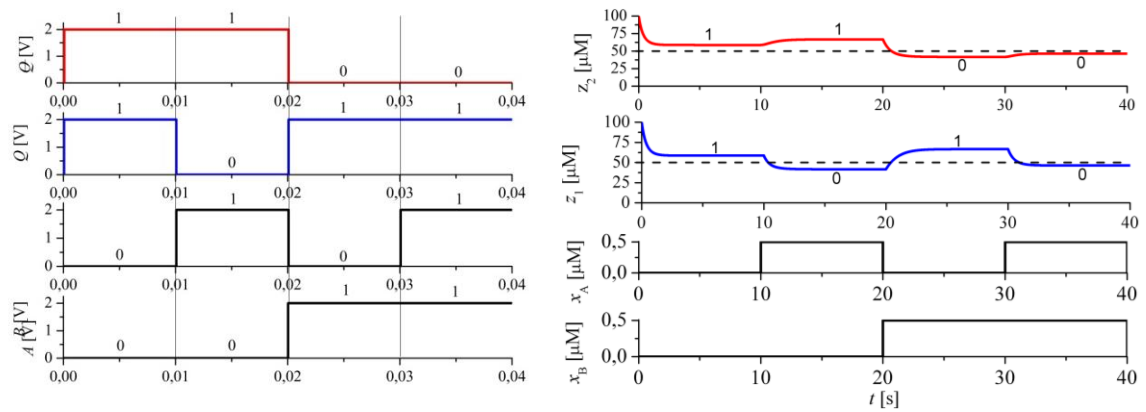
Na delovanje RS-FF-ja vpliva predhodno stanje izhoda. V primerih, ki bodo sledili, bo začetno stanje izhodov zmeraj enako logičnemu stanju 0. Pri tem je potrebno omeniti, da obstaja tudi tako imenovano prepovedano stanje. Ko sta oba vhoda enaka 1, bi moral RS-FF hkrati izbrisati stanje na izhodu in shraniti novo stanje, tako je to stanje definirano kot prepovedano stanje. Tudi stanje, ko sta oba vhoda enaka 0, nam lahko vrne neželjeno izhodno stanje. Vendar se stanje, ko sta oba vhoda ena nič, obravnava kot ohranitev predhodnega stanja. Sledi primer delovanja RS-FF-ja, ko na vhod S vodimo logično vrednost 1 in na vhod R logično vrednost 0. Ker je predhodno stanje na obeh izhodih enako 0, nam IN vrata z vhodom S na negiranem izhodu vrnejo 1. Izhod Q je tako enak 1. Na IN vrata z vhodom R vodimo logično vrednost 1. Na negiranem izhodu teh vrat je tako novo stanje 1. Končno stanje RS-FF-ja pa je tako na obeh izhodih enako 1.

Da izdelamo takšno spominsko vezje, potrebujemo dve proteinski kaskadi. Ti dve kaskadi morata delovati kot IN vrata. Izhod kaskade bo število neaktiviranih proteinov. Tako dobim negirana IN vrata. S pomočjo pozitivne povratne zanke, katere jakost bo 0,005, bomo del izhodnega signala vodili na vhod IN vrat. Na sliki (54) je prikazana shema proteinske kaskade v vlogi RS-FF-ja.



Slika 54. Shema dveh proteinskih kaskad, ki delujeta kot RS-FF.

Na sliki (55) so grafi, ki prikazujejo stanja izhodov električnega in biološkega FLIP-FLOP-a pri različnih kombinacijah vhodnih signalov.



Slika 55. Graf na levi strani prikazuje odzive RS-FF-ja, izdelanega iz dvojnih IN vrat tipa 74HC00D, in dveh negacijskih vrat tipa ZTX694B. Graf na desni prikazuje odzive biološkega FLIP-FLOP-a, ki je izdelan s proteinskima kaskadama s pozitivno povratno zanko. Vrednosti konstant sta pri obeh proteinskih kaskadah enake $k_{\text{on}} = 1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_{\text{off}} = 1,2 \text{ s}^{-1}$, $z_{\text{tot}} = 100 \mu\text{M}$ in $x_{\text{max}} = 1 \mu\text{M}$.

Grafa na sliki (55) prikazujeta, kakšno stanje zasede RS-FF in biološki FLIP-FLOP pri določeni kombinaciji dveh vhodnih signalov. Kot je razvidno, je izhodno stanje v obeh primerih pri enaki kombinaciji vhodnih signalov enako. Toda v primeru, ko oba vhodna signala zavzemata stanje 1, se izhodni stanji razlikujeta, vendar kot je bilo že omenjeno, je to stanje prepovedano, saj je ukaz, ki se mora izvršiti, dvoumen.

5 ZAKLJUČEK

V diplomskem delu smo primerjali prenos signala v bioloških sistemih in električnih sistemih. V obeh se uporabljajo diferencialne enačbe za opis dinamike sistema. Tako iz podobnosti v enačbah kot tudi iz grafičnih rezultatov lahko sklepamo na pomen določenih konstant ter na njihov vpliv na delovanje in funkcijo proteinske kaskade, saj je pomen konstant v električnih sistemih dobro znan.

Sprva smo proteinsko kaskado primerjali z aktivnim električnim elementom, ki se v elektroniki zelo pogosto uporablja, s tranzistorjem, ki deluje kot stikalo. Numerični model tranzistorja je zelo zahteven. V tem modelu je vključenih veliko dejavnikov. Ker smo hoteli izpostaviti le karakteristična časa aktivacije in deaktivacije tega električnega stikala, je bil izdelan RC člen, ki predstavlja vzrok, zaradi katerega ta dva časa nastopita. Oblikovali smo enačbe, ki opisujejo delovanje tega RC vezja in jih nato primerjal z enačbami, ki opisujejo časovni potek aktivacije proteinov v mitogensko aktivirani proteinski kaskadi. Zaradi podobnosti enačb je bilo možno hitro sklepati na pomen konstant k_{on} in k_{off} . Ti vplivata na hitrost preklopa iz enega stanja v drugo, podobno kot v RC vezju na hitrost vplivata konstanti R_1C in R_2C . Da bi nadgradili razlago o stikalih, smo dodali pojav ultrasenzitivnosti. Pokazali smo vhodno—izhodno karakteristiko proteinske kaskade in za njo izračunali hillov koeficient. Tako smo za primer operacijskega ojačevalnika napravili vhodno—izhodno karakteristiko in določili hillov koeficient tega sistema. V obeh primerih smo spoznali, da je prisotna ultrasenzitivnost, kar pomeni, da je izhod določenega sistema močno odvisen od velikosti vhodnega signala. V naslednjem koraku smo primerjali ojačevalne lastnosti proteinske kaskade z operacijskim ojačevalnikom. Primerjava je bila opravičena, saj so v mnogih člankih izpostavljali lastnosti proteinske kaskade pri ojačanju vhodnega signala. Iz primerjave, ki je bila narejena, je razvidno, da imata konstanti k_{on} in k_{off} zraven vpliva na hitrost preklopa tudi vpliv na ojačanje izhodnega signala. Da bi še bolje raziskali pomen teh dveh konstant, smo izhodni signal proteinskih kaskad analiziral v frekvenčnem prostoru s pomočjo bode diagrama, iz katerega je razvidno, da konstanti vplivata na frekvenčno prepustnost. Zato je v nadaljevanju sledila primerjava proteinske kaskade z aktivnim nizkofrekvenčnim prepustnim sitom. Izkazalo se je, da

proteinska kaskada deluje na podoben način. Sicer je bilo to že razvidno v poglavju o stikalih, da s spreminjanjem konstant k_{on} in k_{off} vplivamo na obliko izhodnega signala in s tem tudi na frekvenčno karakteristiko, a smo hoteli posamezne lastnosti predstaviti postopoma. Aktivacija proteinov je tako odvisna od frekvence vhodnega signala, kar je pomemben dejavnik pri frekvenčni dekodaciji signala. Pokazano je že bilo, da je frekvenca ali amplituda, s katero kalcij niha v citosolu, odvisna od signalizacijske molekule, ki aktivira ionske kanale, kateri povzročijo porast kalcija v citosolu. Tako je v frekvenci ali amplitudi nanosena informacija, ki jo je potrebno ohraniti. Delovanje proteinske kaskade kot aktivno nizkofrekvenčno prepustno sito omogoča, da določena amplituda ali frekvenca vhodnega signala izzove specifičen izhodni signal, ki pa ponovno izzove nek specifičen učinek. Podobno nalogo imajo tudi aktivna nizkofrekvenčna prepustna sita v elektroniki, ki filtrirajo informacijo, nanoseno v frekvenci določenega vhodnega signala. Po tej primerjavi smo se posvetili vlogi povratnih zank, ki so prisotne v bioloških sistemih. Primerjali smo vpliv pozitivne povratne zanke pri proteinski kaskadi z dvojno fosforilacijo in komperatorjem. V obeh primerih je izstopala bistabilnost. Oba sistema sta v tem primeru lahko obstajala le v dveh stanjih. Vhodno—izhodna karakteristika je v obeh sistemih pokazala histerezo zanko. Posledica vpliva pozitivne povratne zanke je tako v biološkem kot tudi v električnem sistemu, da je sistem zelo nestabilen in vhodni signal močno ojačan. Po tej primerjavi je sledila še primerjava z operacijskim ojačevalnikom z negativno povratno zanko in proteinsko kaskado, pri kateri se del izhodnega signala preko negativne povratne zanke vrne nazaj na vhod. Izkazalo se je, da je imela negativna povratna zanka v obeh primerih enak učinek. Vrednost mejne frekvence se je z večanjem jakosti negativne povratne zanke tudi večala, a se je hkrati manjšalo ojačanje. V poglavju o ojačevalnikih so bile predstavljene lastnosti kaskadnih sistemov, pri katerih je skupno ojačanje produkt posameznih ojačanj. Če bi takšno negativno povratno zanko vpeljali v ta kaskadni sistem, bi s tem še dodatno povečali mejno frekvenco in hkrati ohranili zadostno ojačanje. Vsem tem primerjavam je sledila še primerjava z digitalno elektroniko. V sklopu te veje elektronike je informacija definirana z biti. Signal lahko ima le dve vrednosti 0 ali 1. S temi vrednostmi se manipulira z logičnimi vrati. Ta smo lahko tudi teoretično izdelali in primerjali. Ko so bila izdelana vsa osnovna logična vrata, je bil še matematično sestavljen RS-FF, ki služi kot spominska enota.

Na podlagi primerjav so razvidne podobnosti, ki so prisotne v med seboj različnih sistemih. Te podobnosti lahko uporabimo in jih tudi prenesemo na druge sisteme ter jih tako bolje razumemo. Razlago lastnosti proteinskih kaskad v znotrajceličnem prostoru lahko s takšnimi primerjavami dopolnujemo in nadgrajujemo.

6 VIRI IN LITERATURA

- [1] R. Donaldson in M. Calder, *Modelling and Analysis of Biochemical Signalling Pathway Cross-talk*, EPTCS **19**, 40 (2010).
- [2] M.Sauro in B. N. Kholodenko, *Quantitative analysis of signaling networks*, Progress in Biophysics & Molecular Biology **86**, 5 (2004).
- [3] A. Wagner, *Robustness and Evolvability in Living Systems* (Princeton university press, Princeton, 2005).
- [4] C. Adami, C. Ofira in T. C. Collier, *Evolution of biological complexity*, PNAS **9** (97), 4463 (1986).
- [5] V. Grubelnik, *Ojačitev in glajenje kalcijevih signalov s primerjavo prenosa signalov v tehniki*, (Doktorska disertacija, Maribor, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, 2008).
- [6] R. D. Keynes in D. J. Aidley, *Nerve and Muscle*, (Cambridge university press, Cambridge, 2001).
- [7] Wikipedia, *Endocrine system*, pridobljeno 23. 3. 2011, iz http://en.wikipedia.org/wiki/Endocrine_system.
- [8] Home science tool, *Cell Anatomy*, pridobljeno 24. 3. 2011 iz <http://www.hometrainingtools.com/anatomy-of-a-cell-science-teaching-tip/a/1203/>.
- [9] R. A. Bowen, Hormones and control system, pridobljeno 24. 3. 2011 iz <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/endocrine/basics/hormones.html>.
- [10] L. E. Ulrich, E. V. Koonin in I. B. Zhulin, *One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes*, TRENDS in Microbiology **13** (2), 52 (2005).

- [11] J. W. Kimball, *Second Messenger*, pridobljeno 23. 3. 2011 iz http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/S/Second_messengers.html.
- [12] K. A. P. Edman in H. O. Schild, *The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the uterus*, *J. Physiol.* **161**, 424 (1962).
- [13] T. Meyer in L. Stryer, *Calcium spiking*, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **20**, 153 (1991).
- [14] J. E. Ferrel, *Building a cellular switch: more lessons from a good egg*, *BioEssays* **21**, 866 (1999).
- [15] C. F. Huang in J. E. Ferrell, *Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade*, *Biochemistry* **93**, 10078 (1999).
- [16] J. C. Shah, *Pulse risetime and falltime measurements*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz http://www.ntu.edu.sg/home/askklee/scope/Page_6/AppOp7.html.
- [17] P. Agarwal, *Bipolar Transistor*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz http://nptel.iitm.ac.in/courses/Webcourse-contents/IIT-ROORKEE/BASIC-ELECTRONICS/lecturers/lecture_10/lecture10_page2.htm.
- [18] B. Van Zeghbroeck, *Bipolar Junction Transistors*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz http://ecee.colorado.edu/~bart/book/book/chapter5/ch5_6.htm.
- [19] B. N. Kholodenko, *Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades*, *Eur. J. Biochem.* **267**, 1583 (2000).
- [20] C. P. Bagowski, J. Besser, C.R. Frey in J. E. Ferrell, *The JNK Cascade as a Biochemical Switch in Mammalian Cells: Ultrasensitive and All-or-None Responses*, *Current Biology* **13**, 315 (2003).

- [21] A. R. Asthagiri in D. A. Lauffenburger, *Bioengineering models of cell signaling*, Annu. Rev. Biomed. Eng. **2**, 31 (2000).
- [22] S. Haney, L. Bardwell in Q. Nie, *Ultrasensitive Responses and Specificity in Cell Signaling*, BMC Systems Biology **4**, 119 (2010).
- [23] E. C. O'Shaughnessy, S. Palani, J. J. Collins in C. A. Sarkar, *Tunable Signal Processing in Synthetic MAP Kinase Cascades*, Cell **144**, 119 (2011).
- [24] Wayne Storr, *Introduction to the Amplifier*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz http://www.electronics-tutorials.ws/amplifier/amp_1.html.
- [25] C. R. Nave, *The ideal op-amp*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/electronic/opamp.html>.
- [26] Wikipedia, *Low-pass filter*, pridobljeno dne 20. 5. 2011 iz http://en.wikipedia.org/wiki/Low-pass_filter.
- [27] Erik Cheever, *Frequency Response and Active Filters*, pridobljeno dne 5. 6. 2011 iz <http://www.swarthmore.edu/NatSci/echeeve1/Ref/FilterBkgrnd/Filters.html>.
- [28] Alan A. Berryman, *Stability and Instability*, pridobljeno dne 5. 6. 2011 iz <http://classes.entom.wsu.edu/529/Stability.htm>.
- [29] J. E. Ferrell Jr, *Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability*, Current Opinion in Chemical Biology **6**, 140 (2002).
- [30] Hyperphysics, *The Schmitt Trigger*, pridobljeno dne 5. 6. 2011 iz <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/electronic/schmitt.html>.
- [31] V. Chickarmane, B. N. Kholodenko in H. M. Sauro, *Oscillatory dynamics arising from competitive inhibition and multisite phosphorylation*, Journal of Theoretical Biology **244**, 68 (2007).

[32] The British Amateur Electronics Club Archive, *Chip Power Supplies: 5V TTL and 12V CMOS (can be in range 3V-15V)*, pridobljeno dne 5. 6. 2011 iz <http://baec.tripod.com/MARCH92/chips.htm>.