



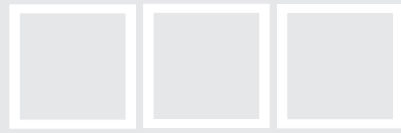
Genregulation Versuche

Das Umschlagbild zeigt die Blüte der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) vor einem Ausschnitt ihrer Genkarte. Diese Pflanze hat einen Generationszyklus von nur 8 Wochen und lässt sich einfach kultivieren, so dass sie seit Jahrzehnten die »Zimmerpflanze« von Botanikern und Genetikern ist. Ihr Genom mit etwa 25000 Genen wurde im Jahr 2000 entschlüsselt. Trotzdem ist die Funktionsweise ihres Genoms in weiten Teilen nicht bekannt. Ein kleiner, inzwischen verstandener Teil ihrer Genverbindungen steuert die Blütenentstehung. Das dazugehörige Netz aus Gen-Bausteinen lässt sich mit diesem Electron-Genbaukasten aufbauen und simulieren (Versuch 31).



Lectron

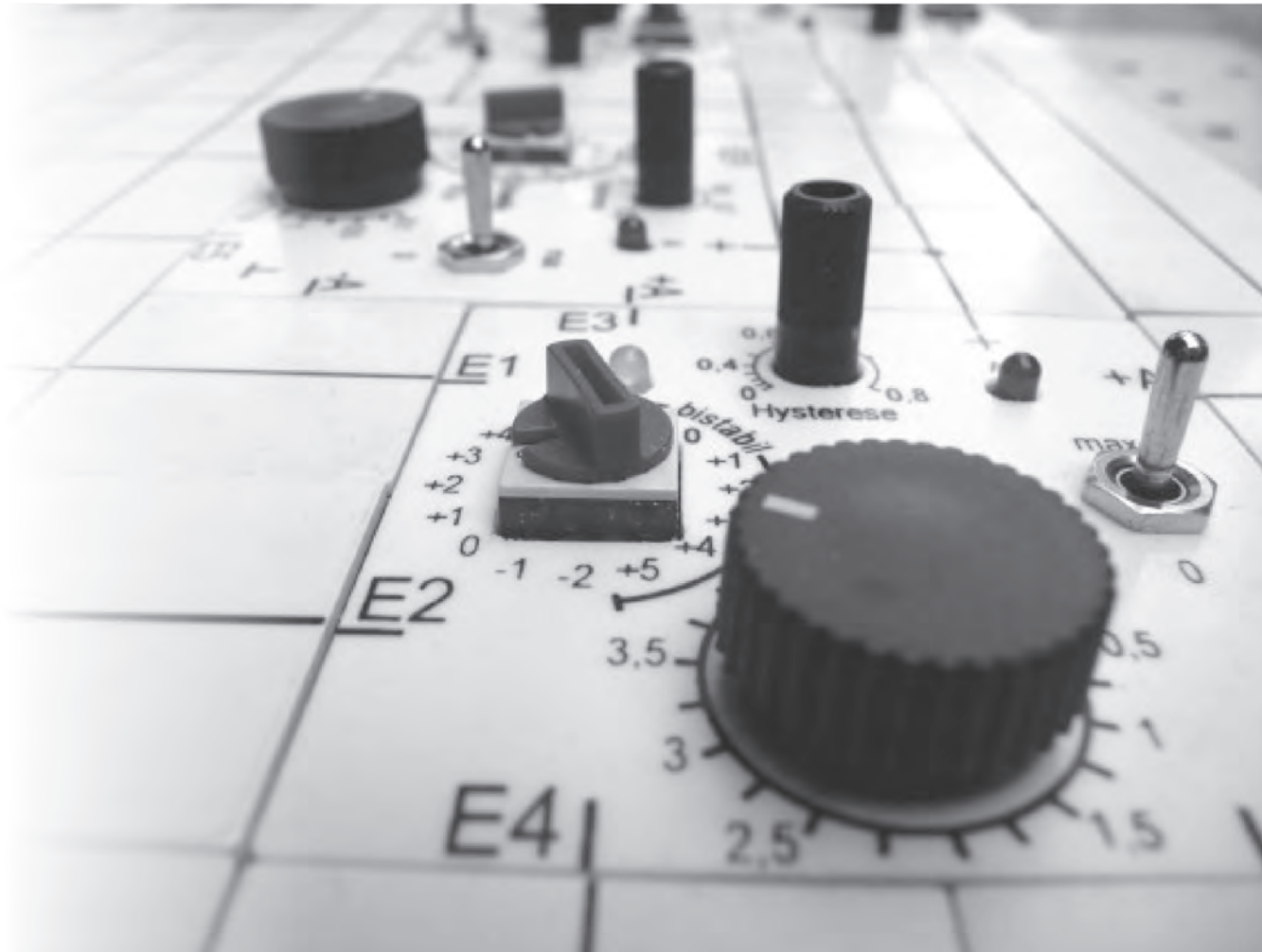
LECTRON Experimente
Genregulation
Autoren
Dr. Stefan Bornholdt
Gerd Kopperschmidt



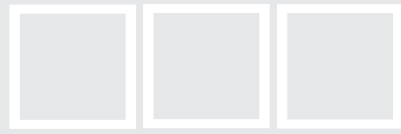
Lectron

Anleitungsbuch Genregulation

Herausgeber
Lectron 2015
Buchrainstraße 18
60599 Frankfurt
Tel.: +49 (0)69 90 50 12 82
Fax: +49 (0)69 90 50 12 83
Email: lectron@frankfurter-verein.de
www.lectron.de
ISBN 978-3-00-051404-3
© 2015 Bornholdt, Kopperschmidt



Bauteileübersicht



Lectron

Die Versuche V1 bis V23 sind mit den Bauteilen dieser beiden Paletten möglich

Verzeichnis der Versuche

Lectron

| | | | | | |
|---|----|--|-----|---|------------|
| Bauteileübersicht | 6 | V22 Ringschaltungen mit 4 Gen-Bausteinen | 60 | V42 Differenzierung bei Stammzellen | 138 |
| Verzeichnis der Versuche | 7 | V23 Ringschaltung mit 4 Gen-Bausteinen und doppelter Kopplung ($\pm\pm\pm\pm$) | 62 | V42A Zyklische Simulation Stammzellen Eigene Versuche | 142 146 |
| 1. Einleitung: Zu diesem Experimentierkasten | | V24 Ringschaltung mit 8 Gen-Bausteinen und doppelter Kopplung | 64 | 5. Schwarmverhalten von Mikroben | |
| Was ist Leben? | 8 | V25 Feed-forward loops | 66 | V43 Schwarmbildung | 148 |
| Eine kurze Einführung zur Genregulation / Transkription und Translation | 9 | V26 Gekoppelte Oszillatoren | 68 | V44 Quorum Sensing | 150 |
| Modelle und Simulationen | 14 | 4. Gen-Netze lebender Zellen | | V45 Verbessertes Modell I f. Quorum Sensing | 152 |
| 2. Der Gen-Baustein | | Zwischenbemerkung | 71 | V46 Verbessertes Modell II f. Quorum Sensing | 154 |
| Blockschaltbild des Gen-Bausteins | 15 | V27 Simulationsmodell der Bäckerhefe | 72 | V47 Repressilator und Quorum Sensing | 156 |
| V1 Aktivieren des Gen-Bausteins | 16 | Der Attraktor im Simulationsmodell | 81 | V48 Alternativer Aufbau dazu | 158 |
| V2 Oszillator mit Gen-Baustein | 18 | V28 Lichtabhängige Teilung b. d. Bäckerhefe | 82 | Der Operationsverstärker | 158 |
| V3 Speicherzelle mit Gen-Baustein | 20 | V29 Feinabgleich der Verzögerung | 84 | Die Ladungspumpe | 160 |
| V4 Speicherzelle m. Gen-Baustein (Bistab. Altern.) | 22 | V30 Simulationsmodell der Teilungshefe | 86 | Der LED-Anzeige-Baustein | 161 |
| V4A Mechan. Selbsthaltung & -unterbrechung | 23 | Mutationen | 87 | 6. Digitaltechnik mit dem Gen-Baustein | |
| V5 Dominante Setz- und Rücksetzfunktion | 24 | Attraktor der Teilungshefe | 91 | V49 Zähler m. 5-Eingangs-Majoritätsbaust. | 162 |
| V5A Koinzidenzspeicher | 26 | V31 Simulationsmodell d. Ackerschmalwand | 92 | V50 Zähler mit 4 Gen-Bausteinen | 164 |
| V6 Realisierbare Schwellwertfunktionen | 27 | Exkurs: Automat. Ablauf d. Blütensequenz | 101 | V51 Zähler mit 4 Gen-Bausteinen (Alternative) | 166 |
| V7 Zeitkonstante und Hysterese | 30 | V32 Signalverknüpfung mit Dioden | 101 | V52 Zähler mit 6 Gen-Bausteinen | 168 |
| 3. Kleine Gen-Schaltkreise | | V33 Taktgeber mit Timer Baustein | 104 | Der MOSFET | 169 |
| V8 Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (++) | 32 | V34 Taktgeber mit Timer Baustein (Alternative) | 106 | V52A Teilerstufe | 170 |
| V9 Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (--) | 34 | V35 LUG automatisch schalten | 107 | V52B Erweiterung der Teilerstufe | 172 |
| V10 Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (+-) | 36 | V36 LFY automatisch schalten | 107 | V52C Teilerstufe (Alternativer Aufbau) | 174 |
| V11 Zwei Master-Slave-gekopp. Gen-Bausteine. | 38 | V37 SUP automatisch schalten | 110 | V52D Teilerstufe (Alternativer Aufbau) | 175 |
| V12 Zwei einfach gekoppelte Oszillatoren | 40 | Zeitdiagramm Simul. Ackerschmalwand | 112 | V53 Schieberegister | 176 |
| V13 Zwei gegenseitig gekoppelte Oszillatoren | 42 | V38 Simul. Ackerschmalwand ohne Timer | 114 | V54 Schieberegister, alternative Version | 180 |
| V14 Wechselschalter | 44 | V39 Simulation der Segmententwicklung bei der Reismehlkäferlarve | 118 | Nützliche Ergänzungsbausteine | 182 |
| V15 Kopplung von drei Bausteinen (---) | 46 | V39A Simul. der Segmententwicklung bei der Reismehlkäferlarve (Altern. Aufbau) | 122 | V55 Schieberegister mit Rücksetzfunktion | 184 |
| V16 Repressilator | 48 | V40 Simulation der Segmententwicklung bei der Taufliede <i>Drosophila melanogaster</i> | 124 | V56 Schiebereg. mit Rücksetzfunktion 2. Vers. Nicht ganzzahlige Schwellen | 186 187 |
| V17 Kopplung von drei Bausteinen (++-) | 50 | V40A Zyklische Simulation <i>Drosophila mela.</i> | 130 | Bausteinübersicht V1 - V56 | 188 |
| V18 Kopplungen dreier Baust. (++-) & (+++) | 52 | V41 Simulation der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen | 132 | Literaturhinweise | 189 |
| V19 Doppelkopplungen dreier Bausteine ($\pm\pm\pm$) | 54 | | | | |
| V20 Doppelkopplungen dreier Bausteine (===) | 56 | | | | |
| V21 Kopplung von drei Oszillatoren | 58 | | | | |

1. Einleitung

Was ist Leben?

Diese Frage stellte der Physiker Erwin Schrödinger bereits vor mehr als einem halben Jahrhundert und weckte damit das Interesse an den Steuerungsvorgängen in der lebenden Zelle mit seinem gleichnamigen Buch, das den Untertitel hat: »Die lebende Zelle mit den Augen des Physikers betrachtet« [1]. Bis dahin waren Physiker eher als Fachleute für »tote Materie« bekannt, als Rechenkünstler für die Eigenschaften von Atomen und Molekülen, Metallen oder Baustoffen. Doch lebende Materie? Haut und Muskeln? Die sind ein so ganz anderes Material als ein Stein. Wer hat so etwas nicht schon erlebt: Ein Sturz mit dem Fahrrad und Blut strömt aus einer Schürfwunde am Knie. Was dann passiert hat etwas Wunderbares und zutiefst Rätselhaftes an sich: Das Blut trocknet und bildet eine Schutzschicht. Nach einigen Tagen fällt diese Schicht ab und die Verletzung darunter ist repariert, eine nagelneue Haut schimmert an deren Stelle! Was unsere Hautzellen hier leisten ist für uns alltäglich, doch wenn es nicht so wäre, könnte es auch aus einem cleveren Science-Fiction-Roman stammen.

Wie lebende Zellen das tun, wie ihre innere Steuerung »verdrahtet« ist und zu sinnvollem Verhalten der Zelle führt, das zu studieren ist ein spannendes Abenteuer. Mit diesem LECTRON-Genbaukasten können Sie das erleben!

Seit Schrödingers Buch aus dem Jahr 1944 hat sich eine Menge getan: Rückblickend markiert es die Geburtsstunde der modernen Molekularbiologie. Bis heute haben Molekularbiologen die Maschinerie der lebenden Zelle in vielen Einzelheiten herausgefunden, die chemischen Zahnradchen also, die die Zellsteuerung ausmachen. Heute wissen wir nicht nur, dass der Bauplan eines Lebewesens im Zellkern jeder seiner Zellen als DNA-Strang gespeichert ist, sondern kennen von vielen Organismen, auch für den Menschen, weitgehend deren Buchstabenfolgen. Jenseits der chemischen Zahnradchen jedoch sieht man oft noch immer den Wald vor lauter Bäumen nicht. Wie dieser genetische Code ausgeführt wird, wie er die Entwicklung eines Menschen, einer Pflanze oder eines Tieres steuert, das wird erst heute stückweise entschlüsselt.

Selbst wie die einzelne lebende Zelle ihren »Tagesbetrieb« steuert, ist noch in weiten Teilen unbekannt und wohl das spannendste Forschungsabenteuer dieser

Tage. Das neue Forschungsgebiet der Systembiologie, quasi die Denkabteilung der Molekularbiologie, widmet sich diesen Fragen und möchte letztlich die heute noch unheilbaren Krankheiten verstehen, die durch Störungen im Steuerungsapparat der Zelle ausgelöst werden.

Ein wichtiger Teil der Zellsteuerung besteht aus Genen, einer Art chemischer Zahnradchen, die als Schalter funktionieren und große Netze aus sich gegenseitig schaltenden Schaltern bilden. Diese Netze sorgen z.B. dafür, dass die Zelle es bei ihrer Vermehrung (Teilung) bewerkstelligt, die dazu benötigten Proteine, deren Baupläne im DNA-Strang gespeichert sind, zur richtigen Zeit in richtiger Konzentration herzustellen und die einzelnen Schritte in der passende Folge ablaufen zu lassen.

Solche Gen-Netze bilden den Ausgangspunkt für den vorliegenden Experimentierbaukasten »Gen-Regulation«. Natürlich wollen wir nicht alle chemischen Zahnradchen und herum flitzenden Moleküle der Zelle im Detail nachbauen, das wäre viel zu kompliziert. Das Kernstück des Experimentierkastens, der neue Gen-Baustein, lässt hier fünf gerade sein und kümmert sich nicht um die chemischen Details.



Lectron

Statt dessen nimmt er es sehr genau, die wichtigen Schalt- und Regeleigenschaften der Gene nachzubilden. Als elektronischer Nachbau eines Gen-Schalters hat der Baustein dazu auch noch einige Knöpfe und Schalter, an denen wir seine Eigenschaften nach Wunsch einstellen können, und zwei Lämpchen, die uns seinen inneren Zustand verraten. Zusammen mit den Lämpchen anderer Gen-Bausteine ergibt das Blink- und Leuchtmuster, an denen wir verfolgen können, wie ein Gen-Netz arbeitet und wie seine Gene wirken. Sehr zum Vergnügen von uns Experimentatoren übrigens, denn die Leuchtlawinen haben durchaus einen gewissen ästhetischen Charme. Neben dreizehn dieser Gen-Bausteine enthält der Kasten ein Netzteil und sehr viele Verbindungsbausteine zum Aufbau der Experimente.

Wenn Sie den LECTRON-Genbaukasten bereits erworben haben, dürfen wir Ihnen gratulieren: Es kann losgehen!

Falls Sie sich den, zugegeben sehr großen, Experimentierkasten nicht gleich komplett zulegen wollen, gibt es eine Möglichkeit hineinzuschnuppern: Mit zunächst vier Gen-Bausteinen und einer kleinen Anzahl von Verbindungsbausteinen können die Versuche V1-V23 auf einer DIN A3 Aufbauplatte aufgebaut werden (in der Bauteilübersicht ist dieser Teilesatz rot umrandet). Für die weiteren Versuche, insbesondere für die Simulation großer

biologischer Netze, werden dann die zusätzlichen Gen-Bausteine, weitere Verbindungen und vor allen Dingen eine größere (DIN A2) Platte benötigt (siehe Bauteilübersicht). Die Übersicht am Ende der Anleitung gibt die benötigte Anzahl Bausteine für jeden Versuch an, die bei Bedarf auch einzeln bestellt werden können.

Eine kurze Einführung zur Genregulation Transkription und Translation

Wir haben unseren Experimentierkasten »Gen-Regulation« genannt, aber was ist das eigentlich, was wir hier modellieren wollen? Lassen Sie uns kurz einen Blick auf die chemische Maschinerie werfen, die den Kern der Steuerung der Zelle bilden. Für die nachfolgenden Versuche können wir die chemischen Details zum Glück gleich wieder vergessen.

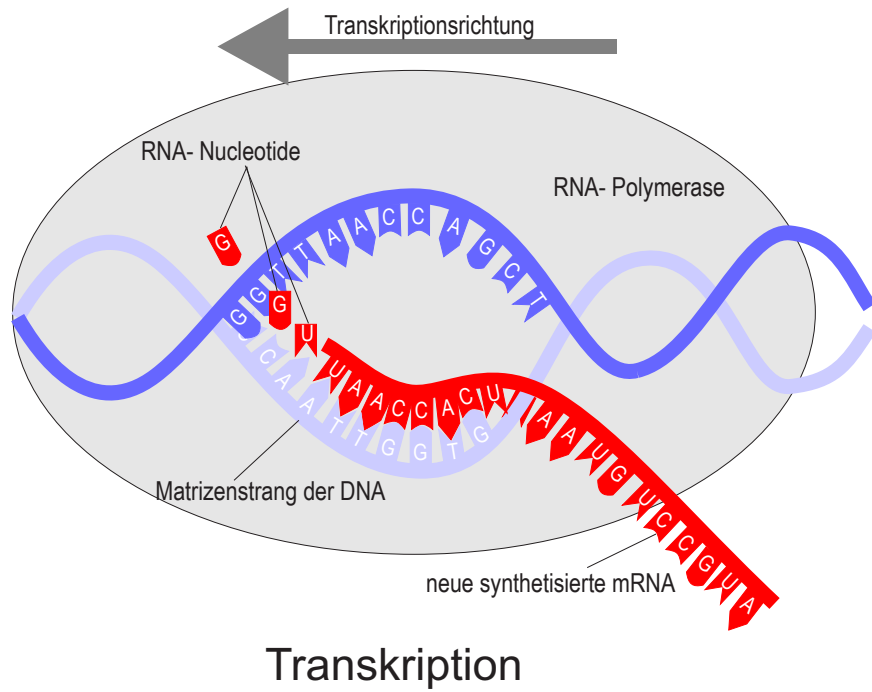
Wie der menschliche Bauplan chemisch auf einer Molekülkette im Zellkern jeder Zelle gespeichert ist haben vor etwa 60 Jahren die Wissenschaftler Watson und Crick entdeckt, als Doppelhelixstruktur von DNA-Strängen nämlich, die etwas an verdrehte Strickleitern erinnert. Beide Forscher sagen übrigens von sich, dass sie sich für ihr Studienfach Genetik entschieden haben, weil sie das Buch von Schrödinger gelesen haben. Inzwischen wissen wir, dass die auf dem DNA-Strang hinterlegte Information durch maschinenartige Riesenmoleküle ausgelesen

und genutzt wird, die die Information kopieren und übersetzen oder, wie der Molekularbiologe sagt: durch *Transkription* und *Translation* (siehe Abbildung S.10). Aus dem DNA-Code entstehen so bestimmte Proteine, die wichtigsten Baumaterialien der Zelle. Den DNA-Abschnitt zu einem Protein nennt man traditionell ein Gen. Manche dieser Proteine beeinflussen wiederum die Herstellung anderer Proteine, z.B. indem sie sein Gen blockieren oder freigeben, was zu Steuerungszwecken benutzt wird. Oft sagt man, ein Gen schaltet ein anderes Gen an oder aus, und das ist es, was wir für unsere Experimente im Kopf behalten sollten.

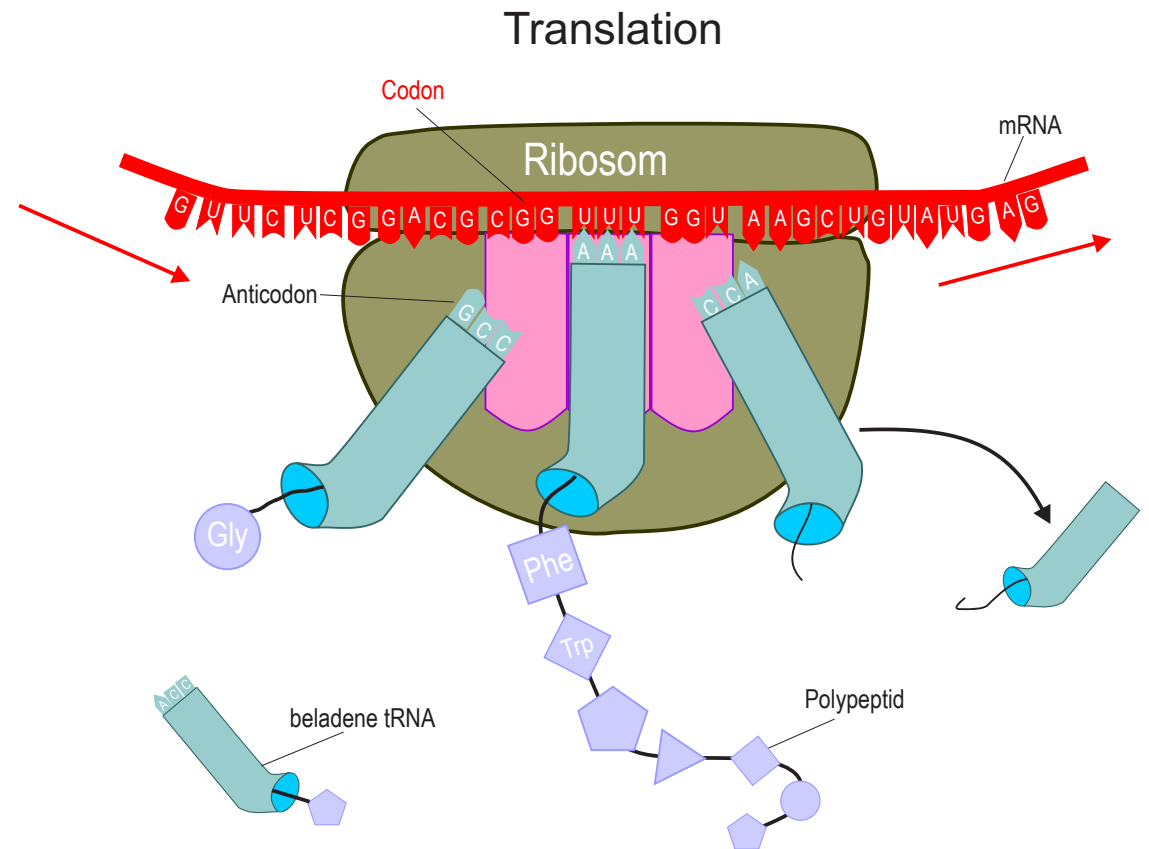
Für über 90% des DNA-Strangs fand man übrigens keine solche Übersetzung in Proteine, er galt praktisch als vernachlässigbarer Schrott. Nach neueren Forschungsergebnissen jedoch kodiert dieser vermeintliche Schrott für RNA-Moleküle, die auch vielfältige regulatorische Aufgaben erfüllen könnten.

Im Rahmen dieses Anleitungsbuchs wollen und können wir nicht alle Vorgänge, die von den Genen initiiert werden, detailliert beschreiben. Wer Genaueres wissen möchte, findet auf jedem Niveau genügend Stoff in unzähligen Büchern und im Internet, ein Klassiker ist zum Beispiel: Molekularbiologie der Zelle, L. Jaenicke, B. Alberts, et al. (2013) Wiley-VCH, Berlin [2]. Statt dessen soll nur

Lectron



Transkription





Lectron

knapp anhand der Abbildung skizziert werden, wie aus der gespeicherten Information letztlich ein Protein entsteht: Der Fluss der Information geht von der DNA über die RNA zum Protein, wobei die beiden wesentlichen Schritte die Transkription und die Translation sind.

Die Transkription beginnt damit, dass ein Enzym, die RNA-Polymerase, den DNA-Doppelstrang so »streckt«, dass er ablesbar wird. Bei der Transkription bildet das Gen die Vorlage für die Herstellung einer Boten-RNA (messenger RNA, oder kurz: mRNA). Einer der beiden DNA-Einzelstränge der Doppelhelix dient dabei als Vorlage für die Synthese eines mRNA-Moleküls von spiegelbildlicher Basensequenz. Dreierkombinationen aus den vier Nukleotid-Molekülen Adenin A, Thymin T (wird in der RNA durch Uracil U ersetzt), Guanin G und Cytosin C sind die Codewörter, durch die alle Aminosäuren codiert werden können. Jedes dieser Triplets (auch Codon genannt) steht für eine Aminosäure. Es korrespondieren immer A mit T, (bzw. U in der RNA) sowie G mit C. Beispielsweise codiert die Folge AGT die Aminosäure Serin. In der mRNA erscheint das Triplett AGT als UCA.

Bei der folgenden Translation wird die in der mRNA codierte genetische Information in die spezifische Abfolge der Aminosäuren eines Proteins übersetzt.

Dies geschieht durch eine weitere chemische Maschinerie der Zelle, den sogenannten Ribosomen. Jedes Codon der mRNA führt zum Einbau einer der 20 Aminosäuren an der richtigen Position in der Polypeptidkette. Start- und Stoppcodons geben den Anfang und das Ende der genetischen Botschaft vor. Der Start auf der mRNA ist stets AUG, als Stoppcodons fungieren UAA, UAG und UGA.

Herangeschafft werden die zum Aufbau erforderlichen Aminosäuren von den Transfer-RNAs (tRNA), wobei diese ein Anticodon an ihrem einen Ende und eine bestimmte Aminosäure an ihrem anderen haben.

Nun ist aber die Proteinherstellung nicht die ganze Geschichte. Manche Proteine können wiederum an den DNA-Strang andocken, und zwar an ganz bestimmte Stellen, an sogenannte Promoter - Bereiche bestimmter Gene und dadurch die Transkription der DNA durch die Polymerase beeinflussen, nämlich aktivieren oder hemmen.

Wir wollen kurz ein Beispiel zur Gen-Regulation etwas näher anschauen. Die Antwort auf die Frage, wie das Ein- und Ausschalten von Genen vor sich geht, fanden die beiden französischen Forscher Jacob und Monod 1961. Sie fanden heraus, wie sich das Kolibakterium auf zwei verschiedene Zuckerarten als Nahrungsquelle einstellt, oder ge-

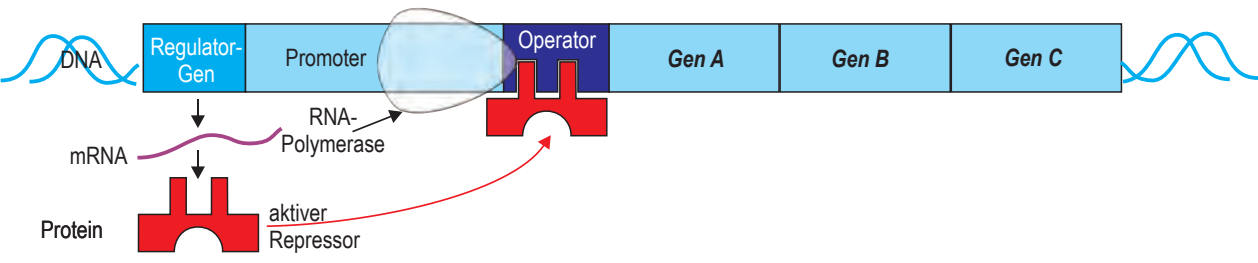
nauer: Die Forscher fanden heraus, dass hier einige Gene zusammen einen »genetischen Schalter« bilden, der die Verdauung zwischen den verschiedenen Zuckerarten »umschalten« kann. Wenn man dem Bakterium *E. coli* die Wahl lässt, bevorzugt es Glukose als Energiequelle. Für die Verdauung von Laktose braucht das Bakterium zusätzliche Enzyme, deren Baupläne in den Genen A, B und C gespeichert sind (siehe Abbildung S.12). Je nachdem welcher Zucker, Lactose oder Glukose, oder beides, vorhanden ist, wird deren Transkription bei Bedarf angeschaltet. Links von den Genen befindet sich noch ein Promoter als Startsignal für die Kopiermaschine (RNA Polymerase), und ein Operator genanntes DNA-Stück, das als Schalter fungiert: Wenn hier ein exakt passendes Protein bindet, blockiert es die Kopiermaschine.

Folgende vier Situationen können nun vorkommen:

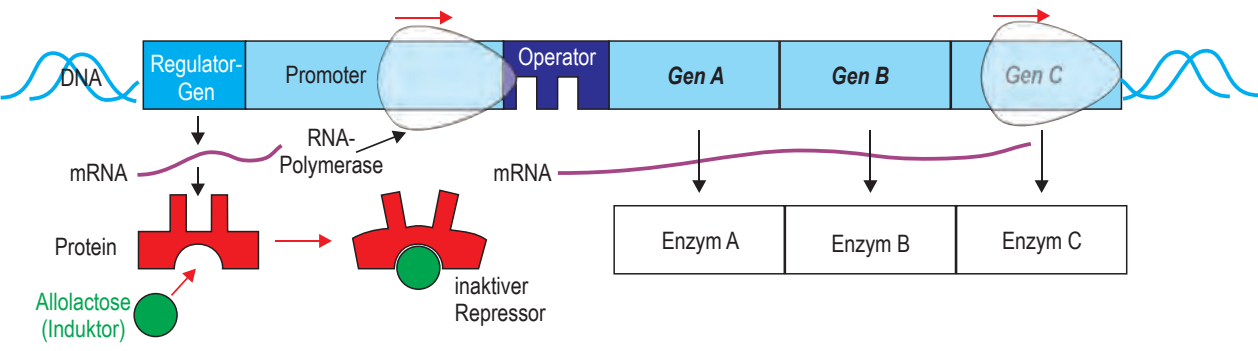
a) Wenn keine Lactose im Nährmedium vorhanden ist, werden die Enzyme des Lactosestoffwechsels durch ein Repressorprotein unterdrückt. Dessen Herstellung übernimmt das Gen ganz links. Das Repressorprotein bindet an die Operatorregion und verhindert so die Transkription der Enzymgene A, B und C.

b) Ist Lactose im Medium vorhanden, startet diese

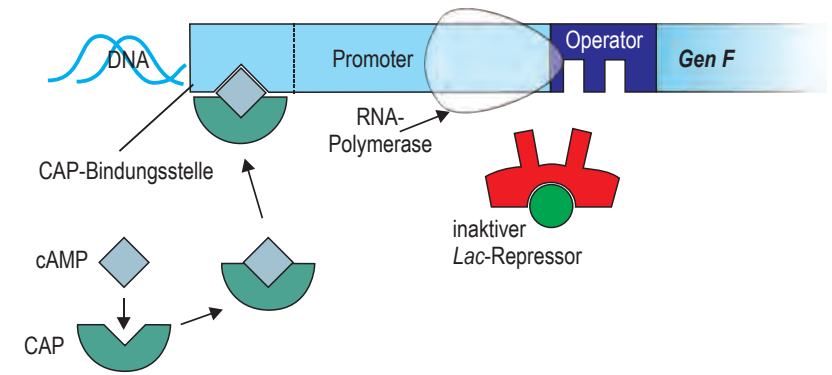
Lectron



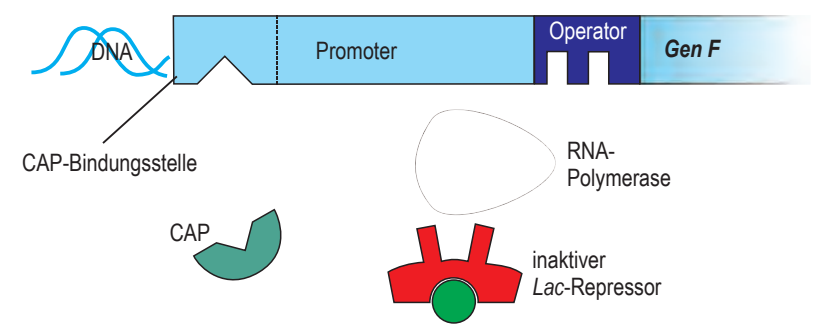
a) Lactose abwesend, Repressor aktiv, Gene abgeschaltet



b) Lactose anwesend, Repressor inaktiv, Gene angeschaltet



c) Lactose anwesend, Glucose abwesend (hoher cAMP-Spiegel, »Hungersignal«): starke Transkription der Gene



d) Lactose anwesend, Glucose anwesend (niedriger cAMP-Spiegel): schwache Transkription der Gene



die Produktion der benötigten Verdauungsenzyme: Durch Bindung an das Repressorprotein »verbiegt« sich dieses, und passt nicht mehr an die Operatorregion. Die Zelle ernährt sich dann von Lactose.

c) Wenn längere Zeit keine Glukose vorhanden ist, stellt sich das Bakterium längerfristig auf Lactose ein: Die Zelle produziert dann das »Hungersignal« cAMP. Das Molekül cAMP geht mit dem Genaktivatorprotein CAP eine Verbindung ein, die an den Promotor bindet und damit die Expression der Enzymgene dauerhaft ermöglicht.

d) Befindet sich neben Laktose gleichzeitig Glucose im Medium, entfällt das Hungersignal cAMP und das Kolibakterium verspeist neben seiner Lieblingsnahrung Glukose nur noch wenig Laktose.

Insgesamt sehen wir hier also zwei Schaltproteine am Werk: Den Repressor als »Aus-Schalter« und das CAP-Protein als »Ein-Schalter« der Enzymgene.

Die Transkription eines Gens A wird also beeinflusst durch die Aktivität anderer Gene, die ihrerseits mit den von ihnen produzierten Proteinen als sogenannte Transkriptionsfaktoren das Geschehen mitbestimmen. Da sich die Gene gegenseitig beeinflussen, entsteht ein ganzes Netz mit Verbindungen von Genen - das Genregulations-Netz. Pro-

teine können bei Genen die Transkription aktivieren oder hemmen; dies sind einfache Einflussmöglichkeiten, es gibt allerdings auch komplexere, die Kombinationen von Transkriptionsfaktoren enthalten. Beispielsweise wird das Gen A aktiviert, wenn der Faktor Nr.1 vorhanden und der weitere Faktor Nr.2 nicht vorhanden ist.

Durch Experimente kann man die gegenseitigen Beeinflussungen von Genen und Proteinen herausfinden und so Verbindungspläne, die elektrischen Schaltplänen ähneln, aufstellen. Trotzdem ist es noch extrem schwierig, zu sagen ob ein Protein als Transkriptionsfaktor wirkt, und wenn ja wo und wie es den Transkriptionsprozess steuert. Der Traum eines jeden Systembiologen ist, den gesamten Schaltplan der Steuerung einer Zelle in Händen zu halten, doch davon sind wir leider noch sehr weit entfernt: Zu groß ist unser Unwissen über alle biochemischen Details der Zelle. Allerdings, und davon werden wir bei unseren Experimenten profitieren, sind einige biologische Gen-Netze vollständig bekannt: Nicht für eine gesamte Zelle, jedoch für einige sehr gut bekannte Unterprozesse einer Zelle: Die Steuerung der Zellvermehrung etwa, die eine zentrale Rolle bei der Brot- und Bierherstellung spielt. Ein solches Netz werden wir mit unseren Genbausteinen simulieren.

Modelle und Simulationen

Was haben diese Steuerungsvorgänge in der lebenden Zelle mit Elektronik zu tun? Auf den ersten Blick nicht viel. Möchte man jedoch die biochemischen Rege-lungsvorgänge simulieren, ist es ein Weg, das Ganze mit elektronischen Bausteinen zu modellieren. »Schaltbilder« genetischer Netze können damit einfach direkt aufgebaut werden, und man lernt sofort etwas über ihre Dynamik, ohne gleich die in der Forschung üb-lichen aufwendigen Computersimulationen der Exper-ten bemühen zu müssen.

Sie werden sagen, ja kann denn da überhaupt etwas Sinnvolles herauskommen? So ganz ohne ernsthafte Mathematik wie die echten Forscher sie verwenden, stattdessen mit so einem Spielzeugbaukasten? Wie wir bei den unten beschriebenen Versuchen sehen werden: Es kann!

Zwei Eigenschaften biologischer Regulationsnetze hel-fen uns dabei: Zum einen hat die Zelle schwer mit ihrer »Hardware« zu kämpfen, oder sollten wir sagen »Wet-ware«: Stellen Sie sich bloß einmal vor, Sie sollten ein Uhrwerk aus einer glibberigen Suppe aus Molekülen bauen! Aber genau solches muss die Zelle leisten kön-

nen. Neuere Forschungen haben herausgefunden wie die Zelle das macht: Sie verknüpft ihre Verbindungen gerade so, dass diese auch mit einer ungenauen Hard-ware klarkommen [3,4]. Für uns heißt das: auch wir können bei unseren Modellen ungenau sein, es reicht also wenn sich unsere Gen-Bausteine »so ungefähr« wie ein echtes Gen benehmen, und das tun sie allemal. Was uns ebenfalls hilft, ist der Schwellencharakter che-mischer Reaktionen und der chemischen Schalter der Zellen: Die Konzentration einer bestimmten Molekül-sorten muss normalerweise erst eine bestimmte Schwelle überschreiten, ehe überhaupt etwas passiert. Solches Schwellwertverhalten ist auch in den Ingeni-eurswissenschaften gut bekannt und mit elektroni-schen Mitteln besonders leicht nachzubauen. Heraus-gekommen ist unser neuer Gen-Baustein: ein univer-sell einsetzbarer Schwellwertschalter mit mehreren Ein-gängen.

Falls Sie am Innenleben des Genbausteins interessiert sind, hier ein paar Nachbemerkenngen.

Diese Bausteine mit variabler Schwelle, die wir zur Mo-dellierung der Gene verwenden wollen, heißen allge-mein Schwellwertbausteine. Sie arbeiten genau wie die in der Digitaltechnik eingesetzten Verknüpfungs-

und Speicherbausteine mit binären Eingangs- und Aus-gangssignalen, wobei die Signale ebenfalls mit (lo-gisch) 0 und (logisch) 1 beschrieben werden. Diese bin-ären Signale werden jedoch nicht nach einer NAND - oder NOR - Funktion (sog. Boole'sche Funktionen) in den Verknüpfungsbausteinen verarbeitet, sondern ein-fach arithmetisch addiert: Eine Operationsverstärker-schaltung summiert die Eingangssignalspotenziale auf und ein Komparator vergleicht die so erhaltene arith-metische Summe mit einer eingestellten Schwelle. Ist letztere erreicht oder überschritten, gibt der Baustein 1- Potenzial ab. Wird sie nicht erreicht, führt der Aus-gang weiterhin 0 - Potenzial oder nimmt es an, wenn er vorher 1 - Potenzial abgegeben hat.

Schwellwertbausteine oder Gen-Bausteine sind au-ßerordentlich flexibel; prinzipiell kann man bei ihnen die Eingangssignale mit — nicht notwendigerweise ganzzahligen positiven — Gewichten versehen und auch die Schwelle ist zunächst beliebig einstellbar. Um aber den Überblick zu behalten, sind alle Eingangssi-gnale gleichgewichtet, nämlich mit +1, und die einstell-bare Schwelle nimmt dementsprechend auch nur ganz-zahlige Werte an. Das sind zunächst Einschränkungen, aber da wir für die Simulation der biologischen Netze



ruhig etwas ungenau sein dürfen, reicht das vollkommen und macht unsere Versuche sogar etwas einfacher.

2. Der Gen-Baustein

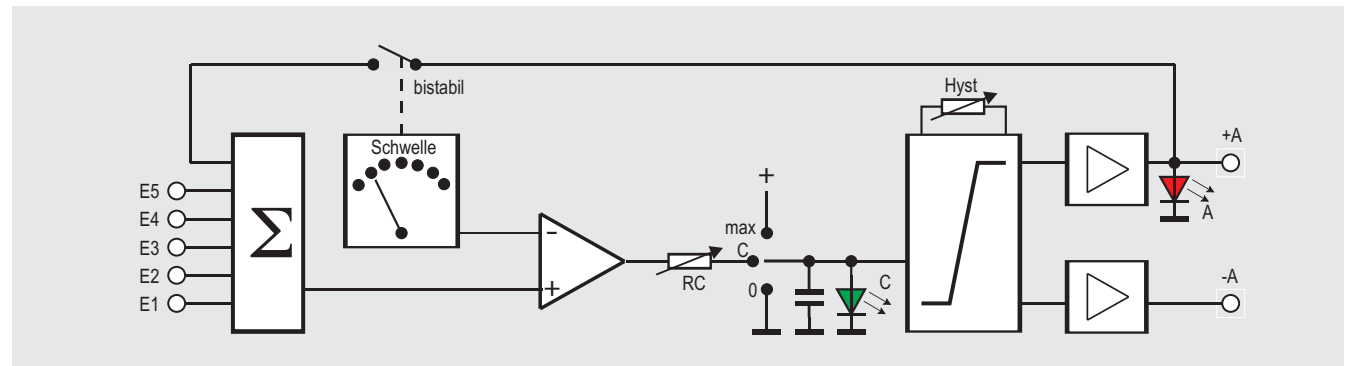
Blockschaltbild

Vor dem ersten Versuch mit dem Gen-Baustein wollen wir uns näher mit seinem Innenleben beschäftigen. Wenn Sie technische Erläuterungen nicht so sehr lieben, fangen Sie ruhig gleich mit dem Versuch 1 an! Das Verhalten des Gen-Bausteins ist intuitiv und schnell über die ersten Versuche zu erfassen. Das Technische brauchen Sie dazu nicht zu kennen. Wer es dennoch genau wissen will, biteschön:

Auf dem Blockschaltbild sind links die fünf Eingänge zu erkennen, die auf den Summierer Σ führen. Er bildet aus ihren Potenzialen unter Berücksichtigung des Vorzeichens das Summenpotenzial, welches in einem Komparator (Schaltzeichen ist das Dreieck mit + und - Eingang) mit dem Schwellenpotenzial verglichen wird. Das Schwellenpotenzial wird über einen Drehschalter im Bereich -2 bis +5 extern eingestellt.

Erreicht das Summenpotenzial nicht das gewählte Schwellenpotenzial, passiert nichts weiter.

Ist es gleich groß oder größer, beginnt die Ladung eines Kondensators über einen einstellbaren Widerstand. Die



maßgebliche Zeitkonstante RC ist ebenfalls extern im Bereich $0,25s \leq RC \leq 4s$ einstellbar. Ein Dreistellungsschalter muss dazu in der Normalstellung C stehen.

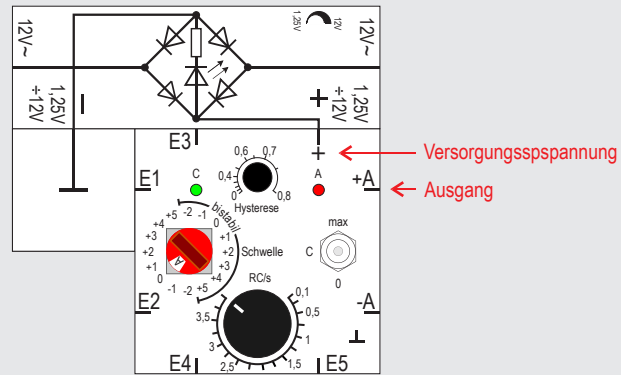
Eine grüne Leuchtdiode zeigt durch ihre Helligkeit die Höhe der Kondensatorspannung an. Überschreitet die Spannung die Anschaltsschwelle eines Schmitt-Triggers gibt dieser an seinem Ausgang $+A$ ein Gleichsignal von circa $8V$ und an seinem Ausgang $-A$ ein weiteres von $-8V$ ab. Gleichzeitig leuchtet die rote Leuchtdiode.

Stellt der Komparator zu einem späteren Zeitpunkt fest, dass das Summenpotenzial kleiner ist als das Schwellenpotenzial, weil sich beispielsweise die Eingangssignale geändert oder wir die Schwelle verändert haben, so wird der Kondensator wieder entladen; die grüne Leuchtdiode wird dabei dunkler. Die Kondensatorspannung muss jetzt allerdings erst die Abschaltsschwelle des Schmitt-Triggers unterschreiten, ehe dieser seine beiden Ausgangssignale $+A$

und $-A$ auf $0V$ abschaltet und die rote Leuchtdiode verlischt.

Die Differenz zwischen A_n - und Abschaltspannung beim Schmitt-Trigger, seine Hysterese, kann ebenfalls extern zwischen 0% und 80% (0 und $0,8$) gewählt werden, bezogen auf $9V$ (=100%) Versorgungsspannung. 0 bedeutet, dass A_n - und Abschaltsschwelle identisch sind und bei $4,5V$ liegen. Bei der Einstellung $0,8$ ist die Anschaltsschwelle bei gut $8V$ und die Abschaltsschwelle bei knapp $1V$. Mithilfe des Dreistellungsschalters lässt sich der Kondensator schlagartig auf $9V$ (Stellung max) laden oder gänzlich entladen (Stellung 0).

Die Skala beim Wahlschalter für die Komparatorschwelle ist zweigeteilt: Im »bistabilen« Bereich wird zusätzlich das Ausgangspotenzial $+A$ bei der Summenbildung (über einen internen 6. Eingang) berücksichtigt, in der anderen Skalenhälfte nicht. Wozu das gut ist, dazu später mehr.





Versuch 1

Aktivieren des Gen-Bausteins

Im ersten Versuch wollen wir den Baustein in Betrieb nehmen. Wir lassen dazu alle Eingänge E1 bis E5 frei, der Drehschalter steht auf 0 (es zählt beim Schalter die äußere Skala, nicht die im kleinen Fenster erscheinende Bezeichnung), der Kippschalter in Mittelstellung C, $RC = 4s$ und $Hyst = 0,1$. Den Stromversorgungsbaustein setzen wir so an den Baustein, dass sein + Pol an das + Symbol des Gen-Bausteins andockt (**Achtung: nicht an einen der Ausgänge +A oder -A!**). Der Minuspol der Stromversorgung wird über die Metallplatte mit dem Gen-Baustein verbunden, dafür gibt es einen sog. Massebaustein, den wir an den - Pol der Stromversorgung anschließen. Nach Anlegen der Versor-

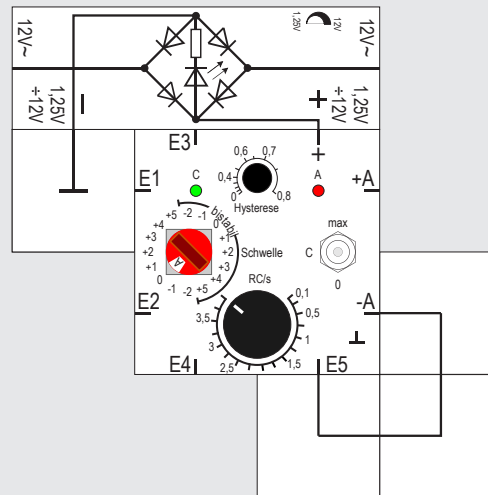
gungsspannung werden wir sehen, dass die grüne Leuchtdiode C langsam immer heller wird und nach einigen Sekunden die rote Leuchtdiode A leuchtet.

Das Verhalten des Bausteins können wir uns so vorstellen: Alle Eingangssignale sind 0, damit ist auch die intern gebildete arithmetische Summe 0. Sie erreicht die eingestellte Schwelle 0, wodurch die Aufladung des Kondensators C gestartet wird. Oder, elektronisch ausgedrückt: Sobald die Anschaltswelle des internen Schmitt-Triggers erreicht wird, leuchtet die rote Leuchtdiode, der +A Ausgang gibt eine Spannung von +8V ab und der -A Ausgang -8V. Dieser Zustand ist stabil und bleibt so bestehen, wenn weiter nichts geändert wird.

Erhöhen wir die Schwelle jedoch auf +1 mit dem roten Drehschalter, so stellt der interne Komparator fest, dass die Summe der Eingangssignale, die immer noch 0 ist, die Schwelle nicht mehr erreicht. Er schaltet um und der Kondensator C beginnt sich zu entladen, was am Dunklerwerden der grünen Leuchtdiode zu erkennen ist.

Unterschreitet die Kondensatorspannung die Abschaltswelle des Schmitt-Triggers, schaltet der Gen-Baustein seine beiden Ausgänge +A und -A auf 0V und die rote Leuchtdiode erlischt.

Durch Drehen des Schwellenschalters auf 0 können wir den Vorgang von Anfang an wiederholen.





Versuch 2

Oszillator mit Gen-Baustein

Durch ständiges Verändern der Schwelle zwischen 0 und 1 können wir es erreichen, dass der Gen-Baustein seine Ausgänge an- und abschaltet. Dieser Vorgang lässt sich allerdings auch automatisieren und wir erhalten dann einen Oszillator, der das Ganze periodisch ohne unser Zutun macht. Dazu die folgende Überlegung:

Wenn der Komparator nach gewisser Zeit der Kondensatorladung (Schwelle steht auf 0) den Schmitt-Tigger anschaltet und damit die Ausgänge aktiviert, gibt -A - 8V ab, das als -1 gezählt wird. Wenn wir also -A mit irgendeinem Eingang des Gen-Bausteins verbinden, wird dann die Schwelle 0 nicht mehr erreicht, da die Summe aller Eingangssignale -1 ist. Folglich schaltet der Komparator ab und die Kondensatorentladung beginnt.

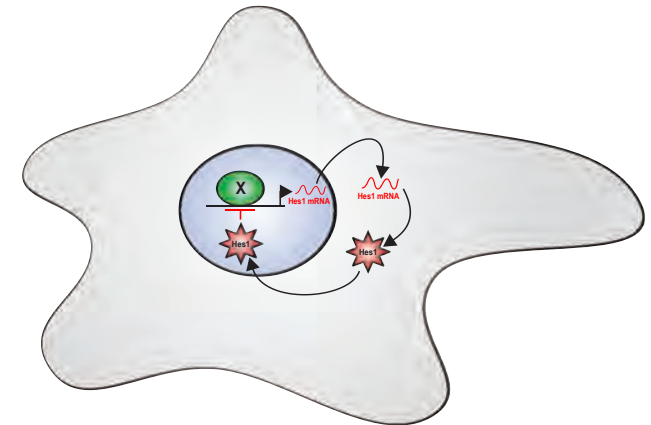
Nach Unterschreiten der Abschaltchwelle des Schmitt-Triggers werden beide Ausgänge des Gen-Bausteins auf 0 geschaltet, womit insbesondere das hemmende Signal vom -A - Ausgang entfällt.

Ohne dieses Signal ist die Summe der Eingangssignale jedoch wieder 0 und die Schwelle 0 wird erreicht, die Kondensatorladung beginnt erneut und das Spiel beginnt von Neuem. Wir haben einen Oszillator gebaut,

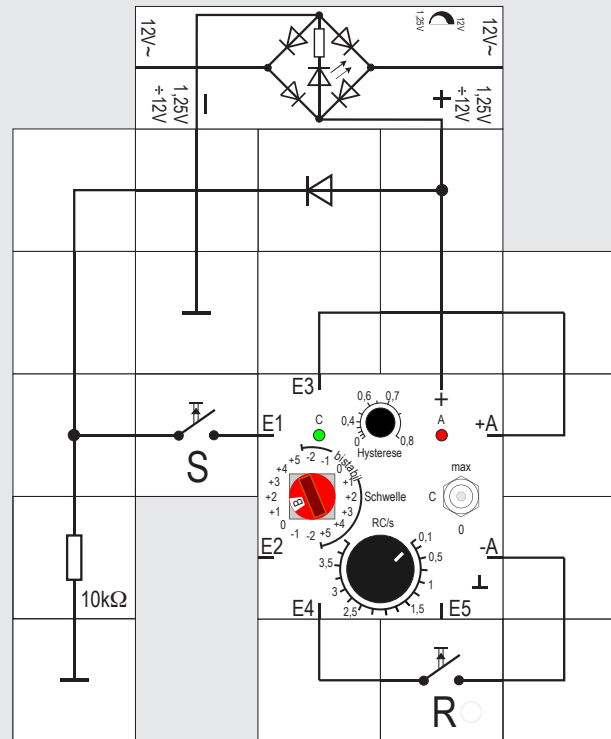
dessen Frequenz über die RC- und über die Hysterese-Einstellung gewählt werden kann.

Der Baustein bildet intern die wesentlichen Eigenschaften von Genen nach, die in der lebenden Zelle als biochemische Schalter arbeiten: Das langsame Ladeverhalten und die zeitverzögerten Schaltvorgänge (Hysterese) des Gen-Bausteins sind typisch auch für das Regelungsverhalten biologischer Gene. Das Laden des Kondensators C imitiert die langsame Synthese von Proteinen aus dem Code des dazugehörigen Gens; die Transkription und Translation brauchen dazu schon etwas Zeit, in der Natur durchaus auch einige Minuten. Die Hysterese unseres Bausteins sorgt dafür, dass zwischen An- und Abschalten immer eine gewisse Zeitverzögerung besteht. Dies simuliert die Zeitverzögerung, die zwischen genetischen Schaltvorgängen durch Signalproteine immer besteht.

Gene, die oszillieren, ähnlich wie unsere obige Blinkerschaltung, gibt es auch in der Natur. Unser körpereigenes Gefühl für den Tag / Nacht Rhythmus ist ein besonders eindrucksvolles Beispiel für die Wirkung einer genetischen Steuerung. Tatsächlich besteht unsere biologische Uhr aus einem kleinen genetischen Regelkreis, der in bestimmten Körperzellen aktiv ist und unseren Körper über Hormonsignale auf die Wach- und Schlafphasen einstimmt. Der Kern dieses Regelkreises ist eine negative Rückkopplungsschleife nach dem



Prinzip dieses Oszillators. Die Abbildung zeigt als Beispiel einen solchen biologischen Gen-Schaltkreis, hier einen prominenten 2-Stunden-Taktgeber, der bei bestimmten Entwicklungsvorgängen in einigen unserer Körperzellen aktiv ist. Ein Gen X enthält den Bauplan für ein Protein namens Hes1, das damit hergestellt wird, welches dann jedoch wiederum das Gen X blockiert und damit seine eigene Produktion behindert. Dieser Rückkopplungsprozess führt zu einer Schwingung der Protein-Konzentration. Deren Dynamik wird durch unseren Versuch dargestellt. Das An- und Abschwelen der grünen Leuchtdiode simuliert im Zeitraffer die Änderungen der Protein-Konzentration wie sie in Experimenten an zellulären Taktgebern tatsächlich beobachtet werden.





Versuch 3

Speicherzelle mit Gen-Bausteinbaustein

Wenn sich Gene als Schalter in der Zelle betätigen, so kann das nicht nur ein aktives Anschalten eines anderen Gens bedeuten, sondern durchaus auch das Ausschalten eines Gens. Bei biochemischen Regelungsvorgängen spricht man von aktivierenden bzw. inhibierenden (hemmenden) Signalen. Damit wir das realitätsnah simulieren können, müsste ein Gen-Baustein neben seinen »normalen« Eingängen noch zusätzliche Eingänge mit hemmender Wirkung haben, also z.B. durch eine negative Gewichtung -1. Dann hätten wir aber unseren Gen-Baustein sehr groß machen müssen, um genügend viele Anschlussstellen zu haben. Eine bessere Lösung ist, alle Eingänge mit +1 zu gewichten und den Baustein neben dem aktivierenden Ausgangssignals +A zusätzlich ein hemmendes -A-Signal abgeben zu lassen. Es wird dann auf alle angeschlossenen Gen-Bausteine gegeben, wo es inhibierend wirken soll, wie wir das im Versuch 2 bereits ausgenutzt haben.

Ein weiteres Beispiel soll das zeigen. Diesmal wollen wir eine Speicherzelle bauen. Wir stellen die Schwelle auf +1 und führen ein Setz-Signal S über einen Taster und eine Diode zu. Sie senkt zusammen mit dem Widerstand die 9V Batteriespannung auf die hier übliche Signalspannung von ca. 8V ab, ge-

nauso also, als würde es aus einem +A Ausgang kommen. Um den Taster nicht so lange drücken zu müssen, wählen wir $RC = 0,25s$ und eine kleine Hysterese (0,1). Betätigen wir ihn, wird die rote LED aufleuchten; leider verlischt sie bei unbetätigtem Taster gleich wieder. Die Schaltung benötigt eine Selbsthaltung. Dazu wird +A mit einem Eingang verbunden. Ist diese Verbindung vorhanden, können wir den betätigten Taster loslassen und die LED leuchtet weiter. Unserer Druck auf den Taster ist damit gespeichert. Zum Rücksetzen des Speichers verbinden wir -A über einen weiteren (R-)Taster mit einem zweiten Eingang. Betätigen wir ihn bei gesetztem Speicher, wird die Schwelle +1 durch das inhibierende Signal nicht mehr erreicht und der Speicher rückgesetzt.

Wir können also mit dem Gen-Baustein sowohl einen Oszillator (kein stabiler Zustand) als auch einen Speicher mit zwei stabilen Zuständen bauen. Dieses Schaltverhalten unseres Gen-Bausteins erinnert vielleicht manchen Leser an logische Module der Computertechnik. Unser Baustein gehört zur Gattung der Schwellwertbausteine und kann in der Tat das Verhalten etlicher logischer Gatter annehmen. Da wir das noch etwas genauer studieren wollen, hier eine kurze Vorbemerkung zur Notation von logischen Funktionen. Damit wir eine klassische logische, oder nach ihrem Erfinder Boole'sche Funktion

und eine Schwellwertfunktion immer auf den ersten Blick unterscheiden können, hat sich für letztere eine besondere Schreibweise eingebürgert, die auch wir benutzen wollen. Als Klammern wird bei diesen Funktionen, für die die normalen arithmetischen Regeln für Multiplikation und Addition gelten, die spitze Variante $\langle \rangle$ verwendet. Die Klammern schließen die Eingangssignale ein; im Anschluss an \rangle stehen als Indizes die Einschalt- und die Ausschaltsschwelle (diese unterscheiden sich um 1). [5] Die Funktion des Lectron Gen-Bausteins lässt sich z. B. wie folgt schreiben: $A = \langle E1+E2+E3+E4+E5 \rangle_{5,4}$ wenn die Schwelle auf +5 eingestellt ist, er also die Boole'sche UND - Funktion (logischer Operator \wedge) mit fünf Eingängen E1-E5 ausführt:

$$A = E1 \wedge E2 \wedge E3 \wedge E4 \wedge E5$$

Anm.: Der log. UND-Operator wird häufig weggelassen, also kürzer $A = E1E2E3E4E5$

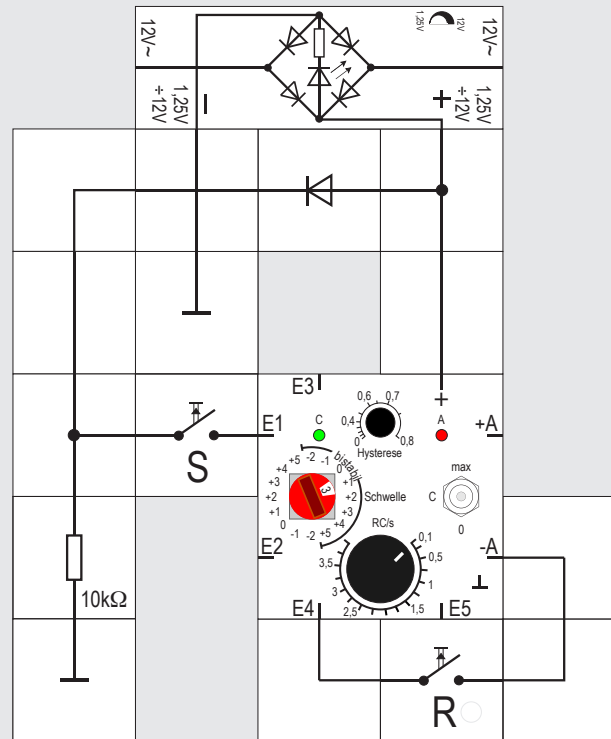
Übrigens ist $A = \langle E1+E2+E3+E4+E5 \rangle_{1,0}$ die entsprechende Boole'sche ODER - Funktion (logischer Operator \vee)

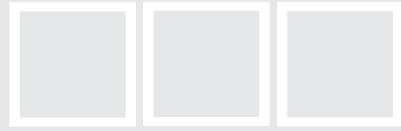
$$A = E1 \vee E2 \vee E3 \vee E4 \vee E5$$

Mit Hilfe des Schwellenschalters können wir die Funktion des Bausteins von

$$A = \langle E1+E2+E3+E4+E5 \rangle_{5,4}$$

bis $A = \langle E1+E2+E3+E4+E5 \rangle_{-2,-3}$ verändern; es gibt also auch negative Schwellen.





Versuch 4

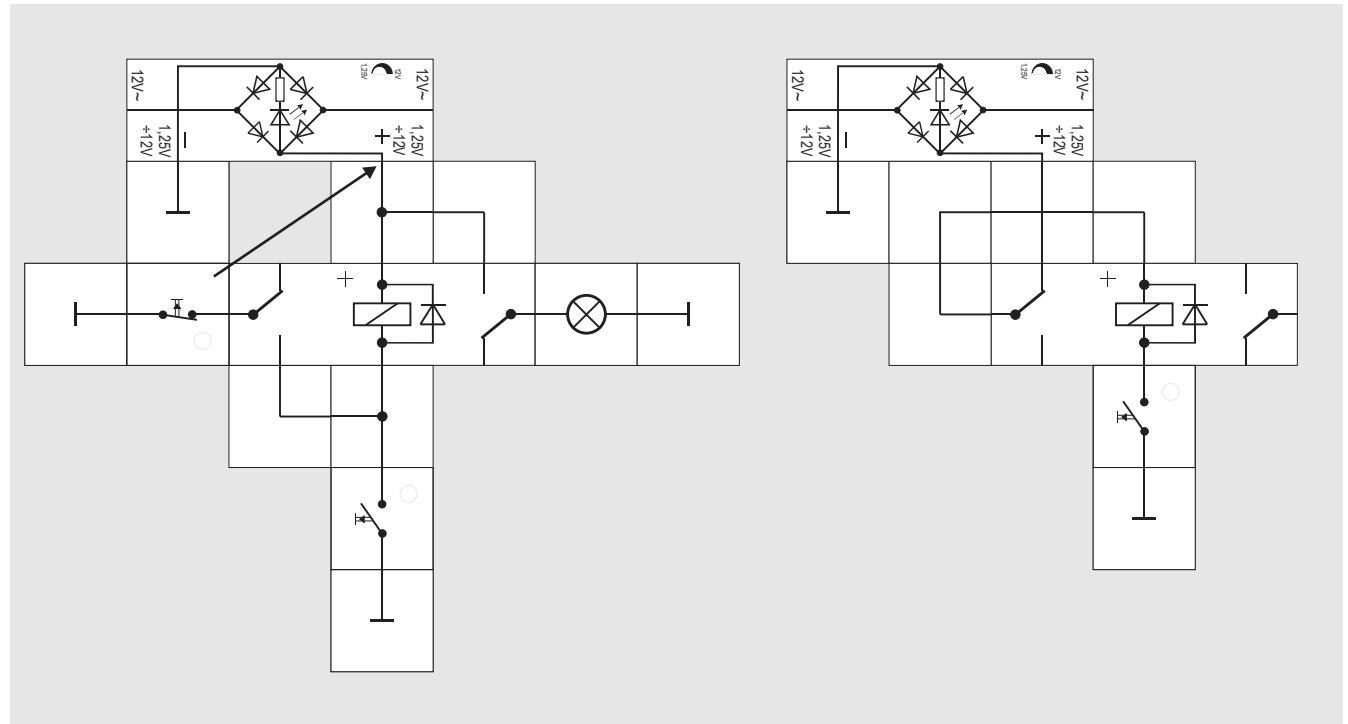
Speicherzelle mit Gen-Baustein (Bistabile Alternative)

Eine Speicherzelle aus einem Gen-Baustein lässt sich allerdings noch einfacher aufbauen:

Das Blockschaltbild auf Seite 15 zeigt, dass mit dem Schwellenschalter der Ausgang +A eines Gen-Bausteins auch intern (über einen 6. Eingang) an den Summierer geschaltet werden kann, wenn der als »bistabil« markierte Bereich des Schwellenschalters genutzt wird. Die externe Verbindung wird dann nicht benötigt und wir sparen Bausteine.

Mechanische Selbsthaltung und -unterbrechung

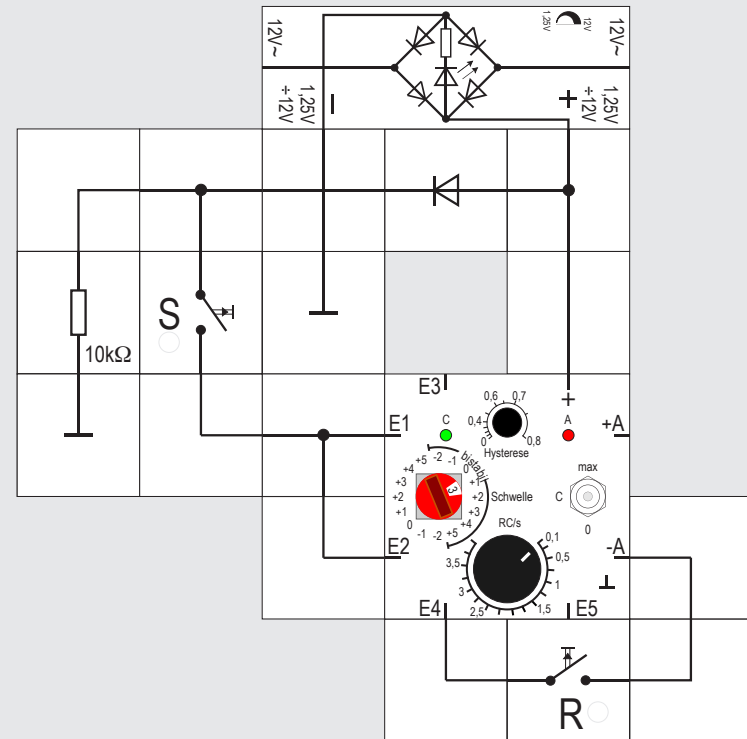
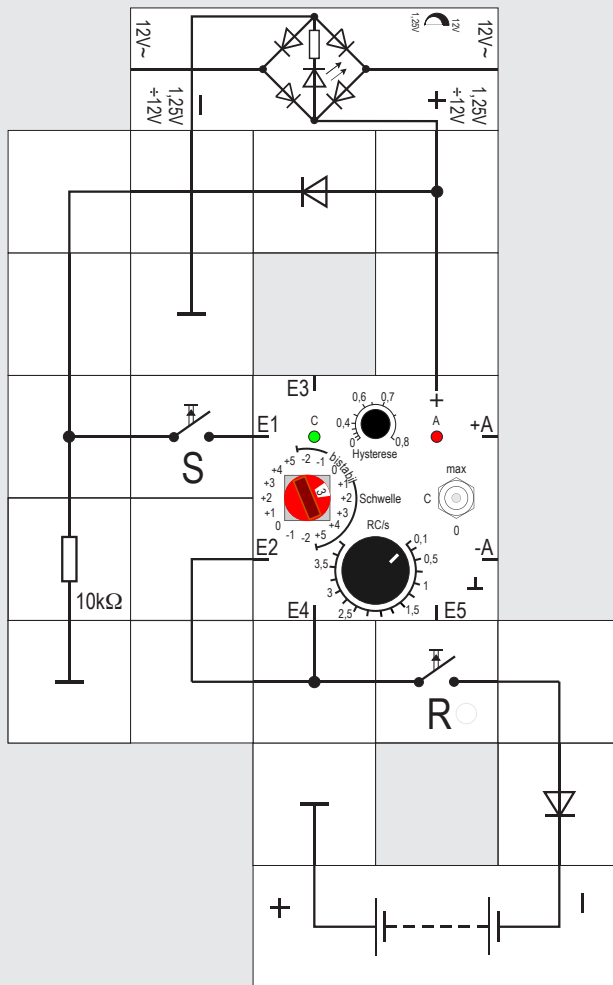
Wenn wir den Lectron Relaisbaustein besitzen oder durch Zukauf (Bestell-Nr. 2504) uns beschaffen,



können wir das mechanische Pendant zu dieser Schaltung aufbauen. Die linke Schaltung ist das Gegenstück zur Selbsthaltung in Relais-technik. Der untere Taster setzt das Relais, wobei dann das Lämpchen leuchtet; der obere (Ruhe-) Taster setzt das Relais durch Unterbrechen des Selbsthaltekreises zurück. Baute man ihn gleich nach dem Pluspol der

Batterie in die Schaltung, wäre er dominant (siehe dazu auch den nächsten Versuch).

Die rechte Schaltung zeigt einen »Oszillator« mit Relais (siehe Versuch 2). Sie heißt Wagnerscher Hammer und findet ihre Anwendung bei Summern und Haustürklingeln, wenn der Relaisanker als Klöppel gegen eine Glocke schlägt.





Versuch 5

Dominante Setz- oder Rücksetzfunktion

Die Speicherzelle hat noch eine kleine Schwäche: Es dürfen nicht beide Taster gleichzeitig bedient wer-

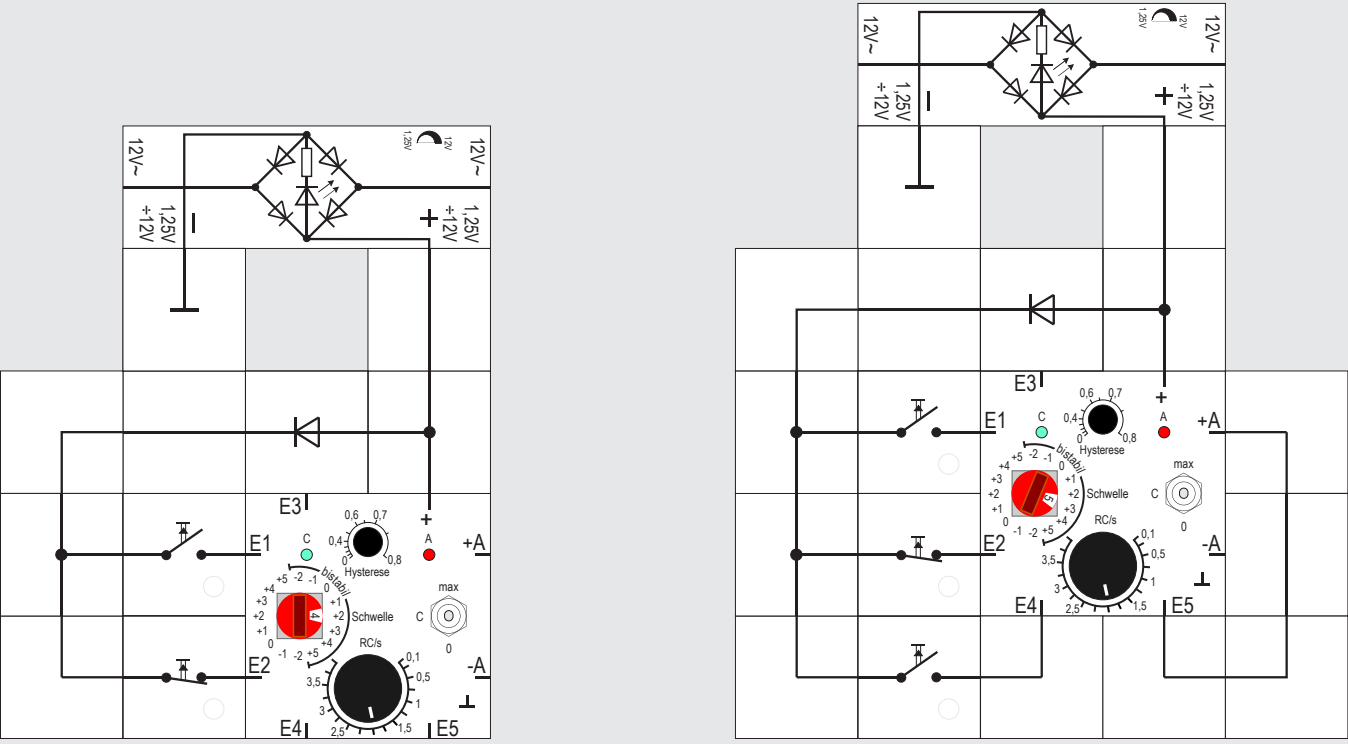
den, da das Ergebnis dann davon abhängig ist, welcher Taster zufällig eine Winzigkeit später losgelassen wird. Sie mögen uns hier für kleinlich halten, es wäre ja schließlich nur eine Winzigkeit - allerdings hätte die dann sichtbare Folgen! Tatsächlich wappnet sich die lebende Zelle in ihren Regulationsschaltungen gegen solche Eventualitäten indem sie einzelnen Genen erlaubt, in solchen Situationen ein Machtwort zu sprechen: Diese nennt man auch kanalisierende Gene.

In unserem Versuchsbeispiel heißt das, wir müssen nur vorher festlegen, welche Funktion dominant sein soll, und schon haben wir Abhilfe geschaffen: Durch Beschalten von zwei Eingängen mit einem festen $-8V$ - Signal (z. B. aus einem Batteriebaustein oder von einem $-A$ - Ausgang eines zweiten ständig aktivem Gen-Bausteins) setzt sich das R - Signal durch, wenn der untere Taster betätigt wird. Die Speicherzelle lässt sich dann nicht setzen (linke Schaltung).

Die untere Diode hebt das $-9V$ Potenzial auf ca. $-8V$ an.

Auch die gegenteilige Konfiguration ist möglich. Dafür muss das Setzsignal S mit zwei Eingängen verbunden werden. Bei betätigtem oberem (Setz-) Taster kann die Speicherzelle nicht zurückgesetzt werden.

5A





Versuch 5A

Koinzidenzspeicher

Mit einem Gen-Baustein können wir auch eine Speicherzelle aufbauen, die als Koinzidenz-Flipflop bekannt ist. Dazu wird der Ausgang +A über die bistabile Schwelleneinstellung zur Summenbildung heran gezogen. Die beiden Eingangssignale des Flipflops gewinnen wir in bekannter Weise aus der Versorgungsspannung durch Absenkung mittels einer Diode. Sie werden wieder über Taster an die Eingänge gelegt.

Nur wenn beide Signale gleichzeitig logisch 1 sind, wird auch der Gen-Baustein (Schwelle bistabil +2) aktiviert. Er hält sich in diesem Zustand durch die interne Rückführung, solange nicht beide Signale –wieder gleichzeitig – logisch 0 werden.

Wir haben deswegen einen Taster mit Arbeits- und einen mit Ruhekontakt gewählt; zweckmäßigerweise müssen wir dann nicht ständig einen Taster betätigt halten, um einen logischen Zustand zu speichern. Bei nicht betätigten Tastern ist so die Koinzidenz nicht gegeben und der Speicher speichert den letzten Zustand.

Nach diesem Prinzip können wir auch die Zahl der Eingangssignale, deren Gleichzeitigkeit geprüft und gegebenenfalls gespeichert wird, auf drei erhö-

hen (rechte Schaltung). Damit bei unbetätigten Tastern die Koinzidenz nicht mehr gegeben ist, müssen wieder beide Arten von Tastern verwendet werden. Außerdem muss der Ausgang für die Summenbildung doppelt gewichtet und die Schwelle auf bistabil +3 erhöht werden. Wir nehmen deswegen zum einen die interne Rückführung und zusätzlich noch eine externe.

Versuch 6

Realisierbare Schwellwertfunktionen

Der rote Drehschalter macht unseren Gen-Baustein zu einem wahren Multitalent, seine Schwellenfunktion kann damit eine ganze Reihe verschiedener logischer

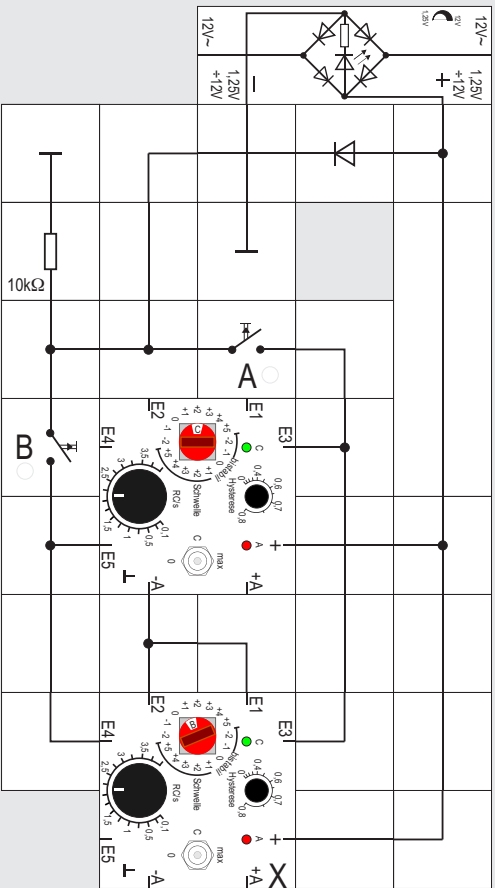
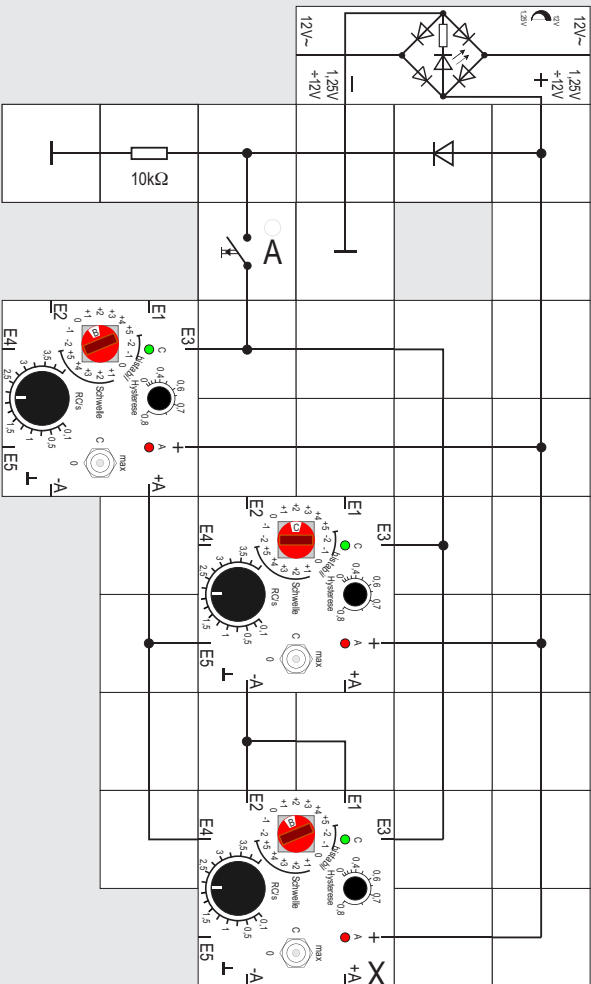
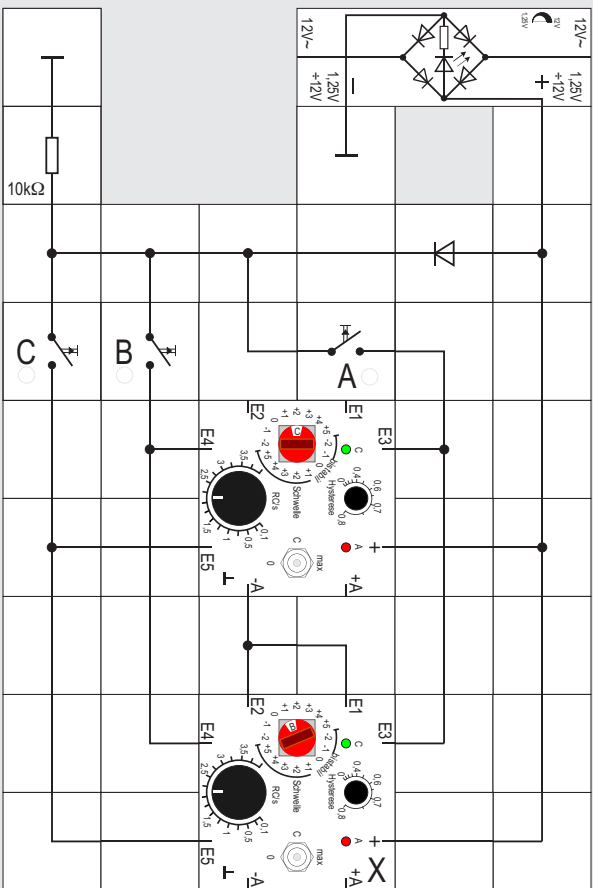
Funktionen darstellen. Lassen Sie uns dazu nochmal einen kleinen Exkurs in die Computertechnik unternehmen und unseren Baustein mit Boole'schen Schaltungen vergleichen. Die auf S. 29 stehende Tabelle zeigt in der ersten Spalte die Schwellwertfunktionen, die mit dem Lectron Baustein und Schwellen >0 realisiert werden können. Der entsprechende Boole'sche Ausdruck steht in der zweiten Spalte. Die Eingangsbezeichnungen E1 bis E5 des Gen-Bausteins wurden hier bewusst nicht verwendet, sondern die Buchstaben A bis E, da man dann besser sieht, wie die Funktion aufgebaut ist.

Es ist relativ einfach, von der Schwellwertfunktion ausgehend den entsprechenden Boole'schen Ausdruck zu schreiben. Zur Not stellt man die Wertetabelle und die sogenannte Karnaughtafel auf und geht nach den bekannten Syntheseverfahren der entsprechenden Lehrbücher vor.

Der umgekehrte Weg erfordert viel Erfahrung und zum Teil auch Intuition. Es gibt zwar Syntheseverfahren, die allerdings nicht so einfach sind, so dass wir sie hier nicht vorstellen wollen. Bei der Synthese muss zunächst geklärt werden, ob die Funktion überhaupt mit einem einzigen Schwellwertbaustein realisierbar ist. Es existieren Tabellen, in denen alle sogenannten *linear separierbaren* Funktionen mit maximal 7 Variablen aufgeführt sind [6,7]. Enthält eine Funktion zu einer

Versuch

6





Lectron

| Schwellwertfunktion | Boolesche Funktion |
|-----------------------------------|--|
| $\langle A+B+C+D+E \rangle_{1:0}$ | $A \vee B \vee C \vee D \vee E$ ODER |
| $\langle A+B+C+D+E \rangle_{2:1}$ | $A(B \vee C \vee D \vee E) \vee B(C \vee D \vee E) \vee C(D \vee E) \vee DE$ |
| $\langle A+B+C+D+E \rangle_{3:2}$ | $AB(C \vee D \vee E) \vee AC(D \vee E) \vee ADE \vee BC(D \vee E) \vee (B \vee C)DE$ = $m(A, B, C, D, E)$ Majorität |
| $\langle A+B+C+D+E \rangle_{4:3}$ | $ABC(D \vee E) \vee ABDE \vee (A \vee B)CDE$ |
| $\langle A+B+C+D+E \rangle_{5:4}$ | $ABCDE$ UND |
| $\langle 2A+B+C+D \rangle_{2:1}$ | $A \vee m(B, C, D)$ |
| $\langle A+B+C \rangle_{2:1}$ | $AB \vee AC \vee BC = m(A, B, C)$ |
| $\langle 2A+B+C \rangle_{2:1}$ | $A \vee BC$ |
| $\langle 2A+B+C+D \rangle_{3:2}$ | $A(B \vee C \vee D) \vee BCD$ |
| $\langle 2A+B+C \rangle_{3:2}$ | $A(B \vee C)$ |
| $\langle A+2B+2C \rangle_{3:2}$ | $A(B \vee C) \vee BC$ |

ihrer Variablen beispielsweise auch die komplementierte Variable, ist sie nicht linear separierbar. Als Beispiel dafür wollen wir an der in der Datenverarbeitung weit verbreitete **EXOR - Funktion** zeigen, dass sie **nicht** mit einem Schwellwertbaustein realisierbar ist. Diese »Entweder-Oder-Funktion« begegnet uns auch ständig im Alltag als sogenannte Wechselschaltung für Lampen, die von mehreren Schaltern unabhängig an- und ausgeschaltet werden sollen. Ihr Boole'scher Ausdruck ist:

$$X = A \bar{B} \vee \bar{A} B$$

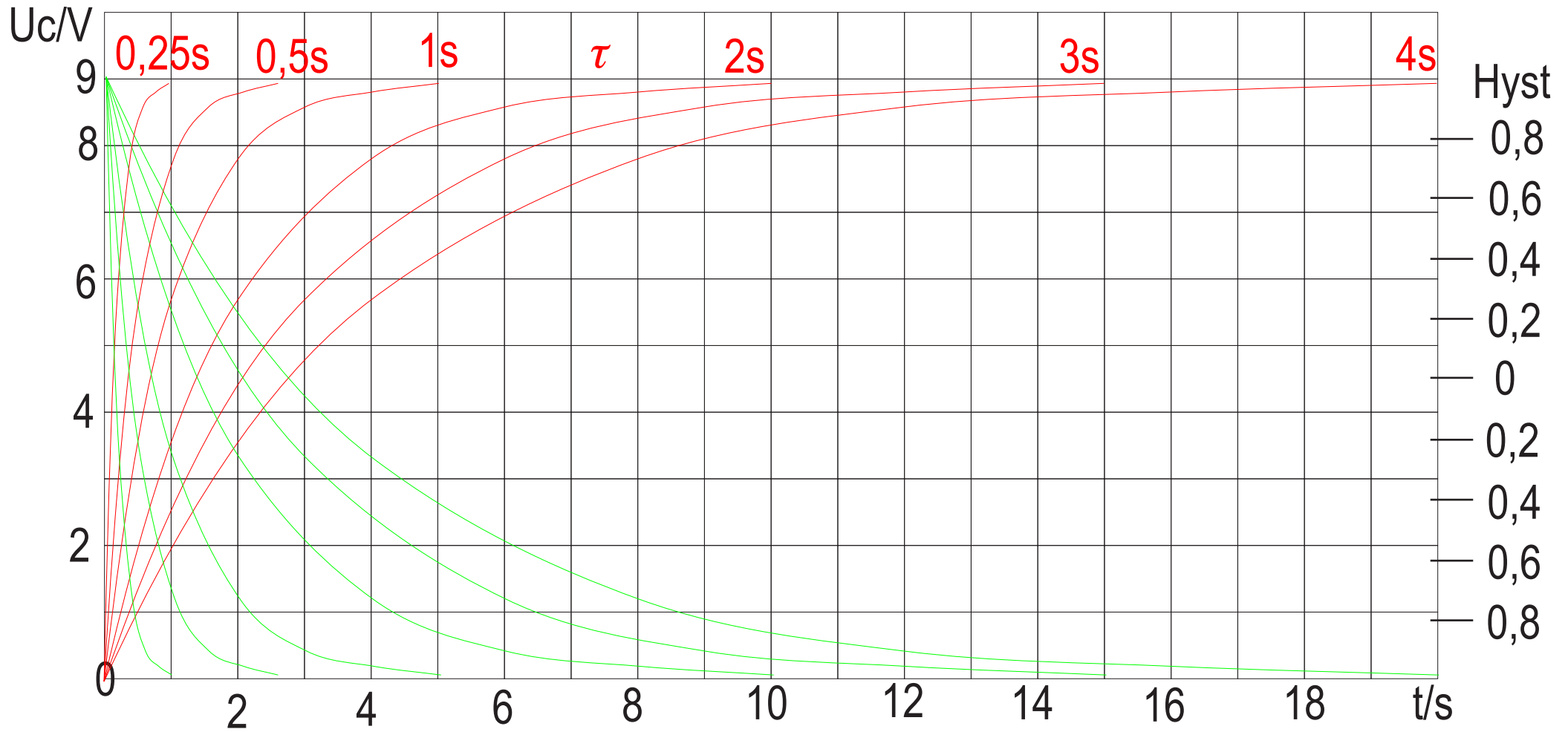
Zur ihrer Realisierung werden zwei NAND - und ein NOR - Baustein sowie zwei Inverter zur Erzeugung der Komplemente benötigt, denn beide Variable kommen sowohl original als auch mit ihrem Komplement vor. Es ist also auch in Boole'scher Logik eine recht sperrige Funktion. In Schwellwertlogik sind zwei Schwellwertbausteine erforderlich (linker Aufbau). Die Schwelle des oberen ist auf +2, die des unteren auf +1 eingestellt. Die beiden geschlossenen Schalter legen jeweils für A und B logisch 1 an die Schaltung. X wird am +A - Ausgang des unteren Bausteins abgegeben.

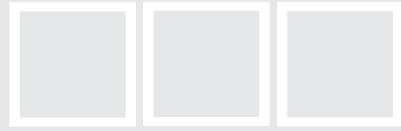
Der rechte Aufbau zeigt eine entsprechende Schaltung für drei Eingangssignale. X ist immer dann logisch 1, wenn das eine ungerade Zahl von Eingangssignalen ebenfalls ist (ungerade Parität):

$$X = A \bar{B} \bar{C} \vee \bar{A} B \bar{C} \vee \bar{A} \bar{B} C \vee A B C$$

Wir können in der linken Schaltung statt des Signals B das Signal A - jetzt allerdings verzögert - auf die Konfiguration geben, wobei die Verzögerung in einem zusätzlichen Gen-Baustein geschieht und erhalten die mittlere Schaltung. Es geschieht nun etwas Bemerkenswertes: Jedes Mal, wenn der einzig verbliebene Taster A betätigt wird, ganz gleich ob er gedrückt oder losgelassen wird, erscheint für kurze Zeit das Signal X. Seine aktive Dauer entspricht ungefähr der am zusätzlichen Baustein eingestellten Verzögerung. Die Taste muss wenigstens so lange gedrückt gehalten werden, bis X wieder inaktiv geworden ist.

Bemerkenswert an dieser Schaltung ist nun, dass sie ein biologisches Pendant hat: Man beobachtet häufig bei biologischen Vorgängen, wie nach der Aktivierung eines ersten Gens sofort ein zweites Gen ebenfalls aktiv wird, allerdings nur für kurze Zeit, da das erste Gen gleichzeitig ein drittes aktiviert, welches das zweite hemmt. Auch der umgekehrte Vorgang kommt vor. Ein hemmendes Gen gibt ein zweites frei, das dann kurzzeitig aktiv wird, bevor es durch ein drittes wieder gehemmt wird. Unsere Schaltung kombiniert beide Verhaltensweisen. Diese Strukturen heißen *feed forward loops*; wir werden später noch auf sie zurückkommen.





Versuch 7

Zeitkonstante und Hysterese

In diesem Versuch wollen wir die Funktion der zwei Einstellknöpfe auf der Oberseite des Gen-Bausteins etwas näher unter die Lupe nehmen und bauen dazu den Versuch 2 (S. 18) noch einmal auf. Bei ihm hatten wir schon gesehen, dass die innere Signalverarbeitung des Bausteins immer eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt: Das verzögerte Ausgangssignal brauchte so nur auf den Eingang zurückgekoppelt zu werden und schon hatten wir eine Blinkschaltung. Mit den beiden Knöpfen können wir die genauen Eigenschaften der inneren Signaldynamik einstellen.

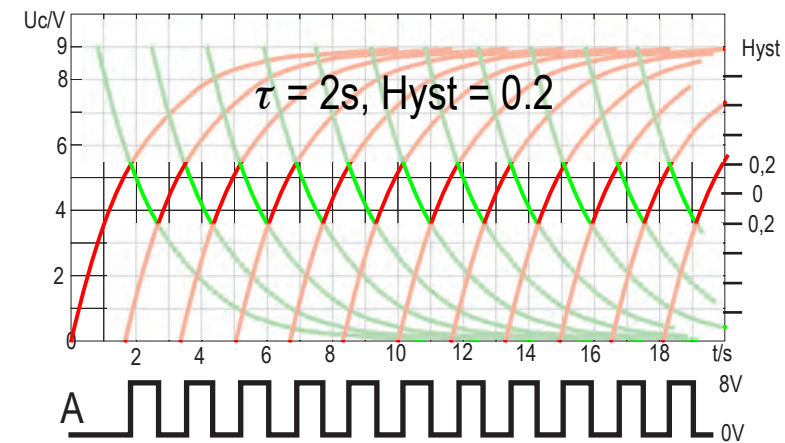
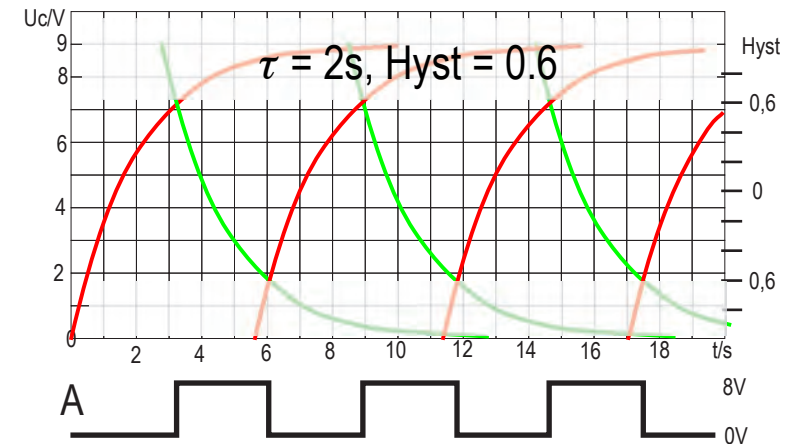
Der große Knopf »RC« bestimmt die Zeitkonstante, also die Geschwindigkeit der inneren Aufladedynamik, die die Dynamik der Proteinsynthese eines Gens in der Zelle hier durch das Aufladen eines Kondensators elektronisch nachempfiehlt und über die grüne LED sichtbar macht. Wenn beim bausteininternen Vergleich die eingestellte Schwelle von der Summe aller Eingangssignale am Baustein überschritten wird, beginnt die Ladung eines Kondensators mit der zwischen 0,25s und 4s einstellbaren Zeitkonstanten $\tau = RC$. Die Spannung am Kondensator erhöht sich mit der Zeit dabei nach der be-

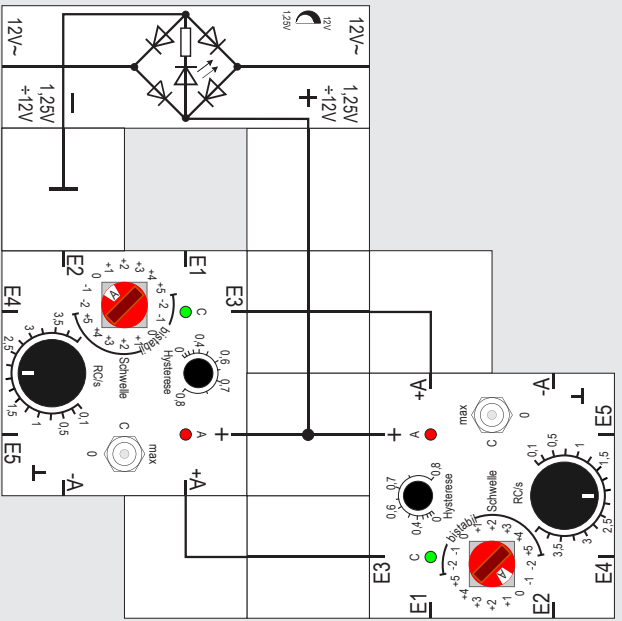
kannten Exponentialfunktion:

$$U_c(t) = 9V(1 - e^{-t/\tau})$$

Im obigen Diagramm sind die Ladekurven für einige τ - Werte angegeben. 98,2% des Endwertes sind grundsätzlich nach $t = 4\tau$ erreicht, d. h. der Kondensator ist dann praktisch auf seinen Endwert geladen. Mit dem kleinen Einstellknopf »Hysterese« können wir zusätzlich beeinflussen, wann die Proteinkonzentration wirksam werden soll. Bei Hysterese=0 schaltet der Ausgang des Gen-Bausteins immer bei halber Ladung des Kondensators an; er schaltet wieder ab, wenn die Ladung unter die halbe Ladung fällt. Häufig haben biochemische Bindungen jedoch die Eigenschaft, dass Bindungsstellen länger besetzt bleiben, auch wenn die Konzentration eines bindenden Proteins inzwischen wieder geringer ist. Dies simulieren wir mit der Hysterese. Gleichzeitig hat diese den angenehmen Nebeneffekt, daß sie quasi eine Zeitverzögerung des Gen-Bausteins erzeugt, und unser Oszillator nicht in einem irrwitzigen Tempo blinkt, sondern schön langsam und übersichtlich. Solche Zeitverzögerung hat auch die lebende Zelle: ein Genschalter braucht in der Natur häufig eine oder mehrere Minuten, um seine volle Wirkung zu entfalten.

Nun noch kurz für die Spezialisten unter uns wie das in unserem Baustein technisch funktioniert: Ab-







hängig von der zwischen 0 und 0,8 einstellbaren Hysterese schaltet der dem Kondensator folgende Schmitt-Trigger bereits ein, bevor der Kondensator ganz geladen ist und Ausgang A wird logisch 1 (8V). Ist die Hysterese = 0 gewählt, fallen Ein- und Ausschaltswelle bei 4,5V zusammen.

Bei einer >0 gewählten Hysterese geschieht das Einschalten bei höheren Spannungen als 4,5V. Sie sind seitlich am Diagramm abzulesen. Symmetrisch zu 4,5V bewegt sich die Ausschaltswelle zu kleineren Spannungswerten. Die Hysterese berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Hyst} = (U_{\text{EIN}} - U_{\text{AUS}}) / 9V$$

oder $\text{Hyst} = R / (25k\Omega + R)$

wobei $0 \leq R \leq 100k\Omega$ ist.

Wir erkennen, dass die Hystereseskala am Einstellknopf nichtlinear ist. Die Wirkung von Veränderungen der Zeitkonstanten und der Hysterese sowie deren Zusammenspiel können wir an der Oszillatorschaltung (Vers. 2, S.18 u. S.31) sehen, wenn $U_c(t)$ periodisch die Ladekurve (rot) und die Entladekurve (grün)

$$U_c(t) = 9V \cdot e^{-\tau/t}$$

durchläuft. An beiden erkennen wir, wie die Kondensatorspannung die obere und untere Schaltschwelle erreicht und den Einfluss der Hysterese-Einstellungen von 0,6 bzw. 0,2 auf die Oszillatorfrequenz.

3. Kleine Gen-Schaltkreise

Versuch 8

Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (++)

Nachdem wir die Eigenschaften und die Einstellmöglichkeiten des Gen-Bausteins kennengelernt haben, wollen wir sehen, welche Kombinationen sich ergeben, wenn wir zwei Bausteine zusammenschalten.

Wir haben bereits in Versuch 6 zum Aufbau eines EXORs zwei Bausteine benötigt; sie waren von der Signalflussrichtung lediglich hintereinander geschaltet, so dass es leicht überschaubar war, was passieren würde.

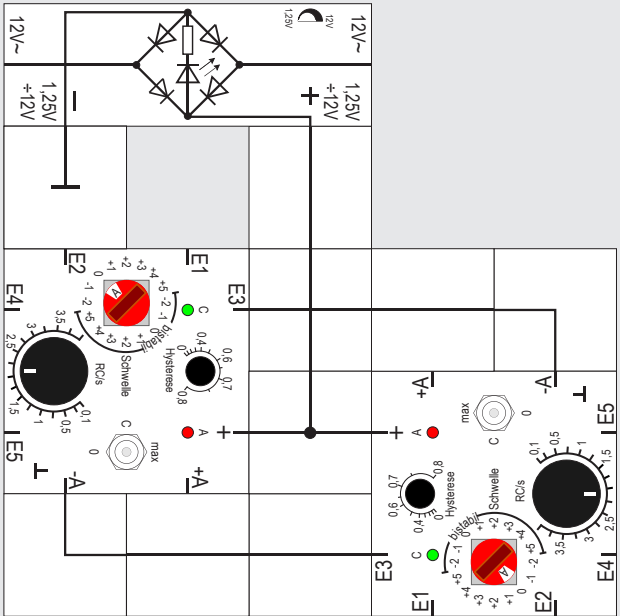
Bei der Genregulation, zu deren Modellierung diese Bausteine eingesetzt werden, kommt natürlich auch diese einfache Konfiguration vor. Viel interessantere Möglichkeiten und auch Überraschungen ergeben sich jedoch, wenn die Ausgangssignale der Bausteine sich gegenseitig beeinflussen, also Rück- und Gegenkopplungen vorhanden sind.

Wir fangen damit an, dass wir den Ausgang A eines Bausteins jeweils mit einem Eingang des anderen verbinden. Da jeweils die aktivierenden Signale verwendet werden, nennen wir die gegenseitige Kopp-

lung (++)). Die RC- und Hysterese- Einstellknöpfe sollten in der Skalenmitte stehen.

Eine Vorüberlegung zu der Schwelleneinstellung: Größere Schwellen als +1 ergeben keinen Sinn, da ein einzelnes Eingangssignal sie nicht erreichen kann; kleinere als -1 ebenfalls nicht, weil sie nicht unterschritten werden können. Im ersten Fall werden nach kurzer Zeit beide Bausteine wieder abschalten, wenn wir sie mittels des Dreistellungsschalters (kurz in Stellung »max« schalten) aktiviert hatten. Im zweiten Fall brauchen wir nach dem Anlegen der Versorgungsspannung gar nichts zu tun. Beide Schwellen sind überschritten und nach kurzer Zeit schalten beide Bausteine an und bleiben angeschaltet. Das gleiche Verhalten beobachten wir, wenn beide Schwellen auf 0 eingestellt sind. Auch wenn nur eine Schwelle 0 und die andere +1 ist, sind nach kurzer Zeit beide Bausteine eingeschaltet. Zuerst schaltet der mit Schwelle 0 an und aktiviert dann den anderen.

Stellen wir beide Schwellen auf +1 und aktivieren beide mit dem Schalter kurz auf »max«, bleiben sie auch eingeschaltet, da sie sich gegenseitig aktivieren. Sie bleiben dagegen beide ausgeschaltet, wenn wir sie aus Stellung »0« starten. Also ist insgesamt nichts Aufregendes im Verhalten der Schaltung festzustellen.





Lectron

Versuch 9

Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (--)

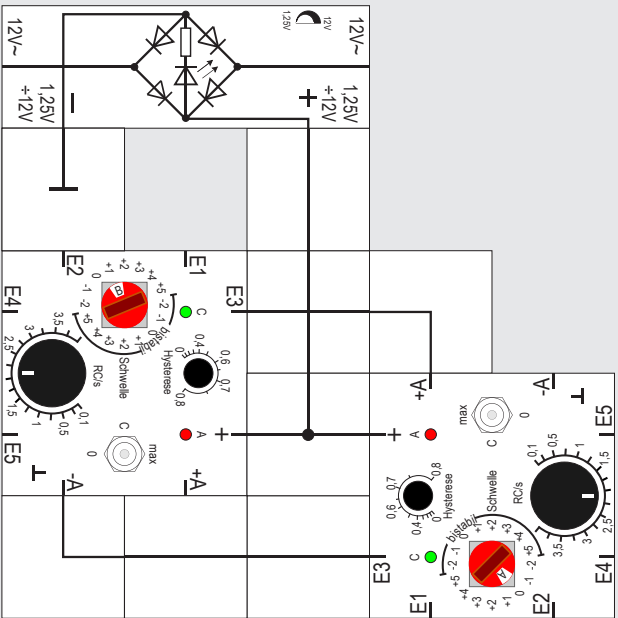
Etwas interessanter wird das Verhalten der Zusammenschaltung, wenn wir beide Schwellwertbau-

steine über ihre hemmenden Ausgänge -A koppeln (Kopplung (--)).

Beide Schwellen sollten auf 0 gestellt sein. Wir betätigen kurz beide Schalter gleichzeitig nach »0«. Da beide Schwellen erreicht werden, fängt in beiden Bausteinen die Ladung des Kondensators an und die grünen LEDs werden immer heller. Auch wenn wir uns Mühe bei der Einstellung der Zeitkonstanten RC und der Hysterese geben, werden wir es nicht schaffen, dass beide Bausteine gleichzeitig anschalten. Derjenige, der zuerst anschaltet, wird sofort über seinen hemmenden Ausgang seinen Partner nach kurzer Zeit ausschalten.

Entsprechendes passiert, wenn wir bei sonst gleicher Einstellung von beiden Schalterstellungen in »max« starten. Auch hier wird zunächst bei beiden Bausteinen der Kondensator entladen, was durch dunkler werdende grüne LEDs angezeigt wird. Aber es gibt auch jetzt einen Baustein, der das Rennen gewinnt, zuerst abschaltet und damit die Hemmung des anderen beendet. Dieser wird dann angeschaltet bleiben und seinen Partner ständig hemmen.

Auch die (--) - Kopplung der beiden Bausteine führt nach kurzer Zeit zu einem stabilen Ergebnis: Ein Baustein wird an- und der andere ausgeschaltet sein.





Versuch 10

Zwei gekoppelte Gen-Bausteine (+-)

Als dritte Möglichkeit bleibt noch die gemischte Kopplung (+ -) zu untersuchen.

Wir stellen die Schwellen beider Bausteine auf +1 und starten beide mit einer kurzen Schalterbetätigung auf »max«. Die Bausteine werden nacheinander abschalten und auch im stabilen Abschaltzustand bleiben.

Im zweiten Teilversuch ändern wir beide Schwellen auf 0. Der Start erfolgt nun von »0« aus. Wir brauchen aber auch gar nichts zu tun, die Kondensatorladung geschieht von selbst, weil bei beiden Bausteinen die Schwelle erreicht und das hemmende Signal zu Beginn noch nicht aktiv ist.

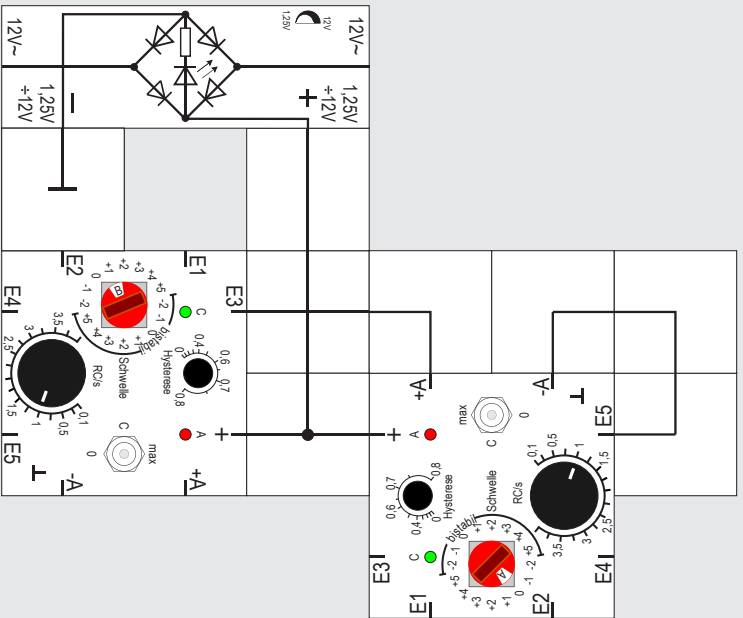
Ganz gleich, mit welcher Schalterstellung - »max« oder »0« - wir starten, es wird sich nach kurzer Zeit der stabile Zustand einstellen, dass ein Baustein, und zwar der linke im Aufbau, dessen hemmendes Signal -A angeschlossen ist, an- und der andere abgeschaltet ist.

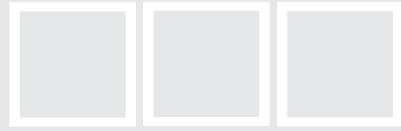
Wir starten den dritten Teilversuch damit, dass wir bei diesem linken Baustein die Schwelleneinstellung von 0 auf +1 erhöhen; als Folge wird seine grüne LED langsam dunkler: Seine Schwelle wird

nicht mehr erreicht und die Kondensatorentladung beginnt. Nach kurzer Zeit schaltet er ab. Damit entfällt das hemmende Signal auf den rechten Baustein und es wird bei diesem die Schwelle erreicht. Dadurch schaltet er nach kurzer Zeit an und aktiviert mit seinem +A - Signal wieder den linken. Wenn dieser anschaltet, wird das hemmende Signal wieder aktiv, der rechte Baustein bald darauf abgeschaltet und das Spiel beginnt von Neuem.

Wir haben also, ähnlich wie in Versuch 2, einen Oszillator aufgebaut. Diesmal nicht mit einem Baustein, sondern etwas komplizierter mit zwei Bausteinen. Wir können auch gut an den zwei roten LEDs sehen, dass die Schaltung vier Phasen kennt: beide an, eine an, beide aus und nur die andere an. Unabhängig davon, wie wir starten - mit »max« oder »0« oder gemischt - wenn beide Schalter in Stellung »C« sind, kommt auch die Oszillation zustande.

Für die Genregulation bedeutet dies, ein Gen aktiviert die Herstellung eines Proteins. Ist dessen Konzentration hoch genug, wird ein zweites Gen zur Herstellung eines anderen Proteins aktiviert, das seinerseits bei ausreichender Konzentration die Herstellung des ersten Proteins unterdrückt, womit in der Folge die Aktivierung des zweiten Gens beendet wird und die Hemmung entfällt, usw.





Lectron

Versuch 11

Zwei Master-Slave-gekoppelte Gen-Bausteine

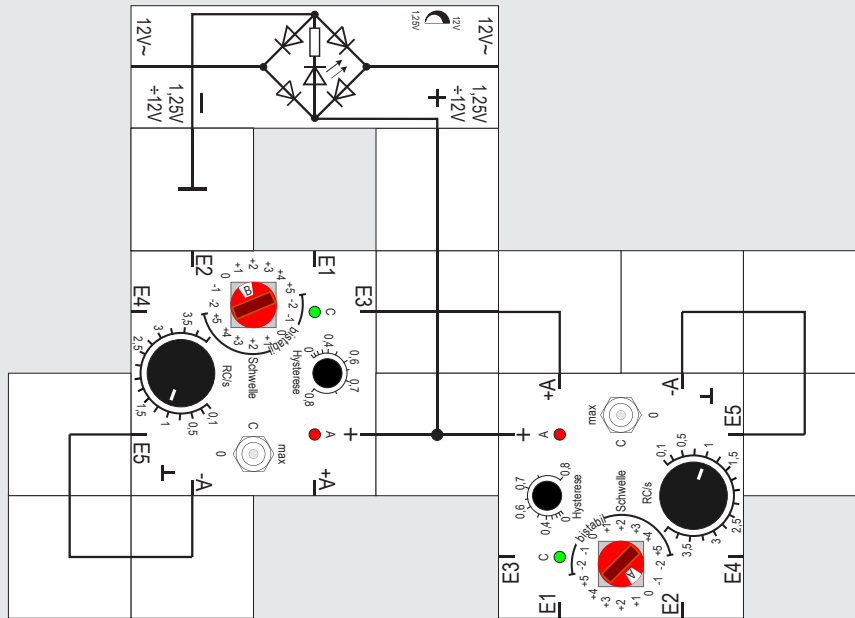
Zwei Bausteine lassen sich auch nach dem Master-Slave-Prinzip koppeln: Der rechte Baustein ist mit der Schwelle auf 0 als Oszillator geschaltet, wie wir das aus voran gegangenen Versuchen bereits ken-

nen. Er schwingt abhängig von der RC- und der Hysterese-Einstellung mit konstanter Frequenz. Beide Einstellungen sollten im mittleren Bereich liegen. Er ist der Master. Sein +A-Ausgang führt auf einen Eingang des linken Bausteins, des Slaves.

Die Schaltschwelle des Slaves ist auf +1 gestellt; er soll ja dem Master folgen, wenn dieser ein Aktivierungssignal abgibt. Das funktioniert aber nur, wenn seine weiteren Einstellungen »passend« zu denen des Masters sind. Sind RC- und Hysterese zu groß gewählt, bleibt er ständig an- oder ständig ausgeschaltet, je nachdem, wie er mit dem Dreistellungsschalter gestartet wurde: Starten wir von »0« aus, können wir an seiner grünen LED beobachten, wie der Kondensator sich lädt, die Ladung im Mittel zunächst auch größer wird, er es aber letztlich nicht schafft, die Einschaltswelle seines Schmitt-Triggers zu erreichen, weil inzwischen der rechte Baustein wieder abgeschaltet hat.

Starten wir von »max« aus, wird der Kondensator in den Auszeiten des rechten Bausteins entladen, erreicht aber die Ausschaltswelle seines Schmitt-Triggers nicht, weil zuvor der rechte Baustein bereits wieder eingeschaltet hat.

Soll der linke dem rechten folgen, müssen seine Einstellungen also angepasst sein.





Versuch 12

Zwei einfach gekoppelte Oszillatoren

Eine sehr interessante Konfiguration entsteht, wenn wir dem Aufbau drei Winkelbausteine hinzufügen und damit den linken Baustein ebenfalls zu einem Oszillator machen.

Nach dem Hinzufügen der Bausteine trennen wir zunächst die Koppelverbindung vom +A Ausgang des rechten Bausteins zu dem Eingang des linken auf und stellen dessen Schaltschwelle ebenfalls auf 0, damit er als Oszillator arbeiten kann.

Wir versuchen, beide Oszillatoren mit der gleichen Frequenz arbeiten zu lassen, was uns allerdings nicht so recht gelingen will. Über kurz oder lang verändert sich ihre Phase zueinander, was auf einen kleinen, nicht zu vermeidenden Frequenzunterschied zurückzuführen ist.

Wir verändern deswegen die Einstellungen des linken Oszillators so, dass er es ist, welcher eine Spur schneller schwingt. Mit etwas Fingerspitzengefühl und einer genauen Beobachtung der Blinkfrequenz sollte uns das gelingen.

Wenn wir dann die Bausteine wieder koppeln, schwingt der rechte mit konstanter Frequenz weiter, während wir beim linken erkennen können, dass er beim regelmäßigen Schwingen durch die Kopplung »gestört« wird. Seine Anschaltzeiten werden zuweilen länger. Verändern wir die Schwelle des linken auf +1, geschieht etwas Bemerkenswertes: Nach einer kurzen Übergangszeit hat es der rechte Baustein geschafft, den linken zu synchronisieren. Beide schwingen mit derselben Frequenz, aber phasenverschoben.

Durch vorsichtiges Verändern der RC - Einstellung vom linken Baustein lässt sich - ohne dass die Synchronität verloren geht - die Phase verändern. Man kann nahezu Gegenphasigkeit mit leichter Überlappung der Anschaltzeiten erreichen.

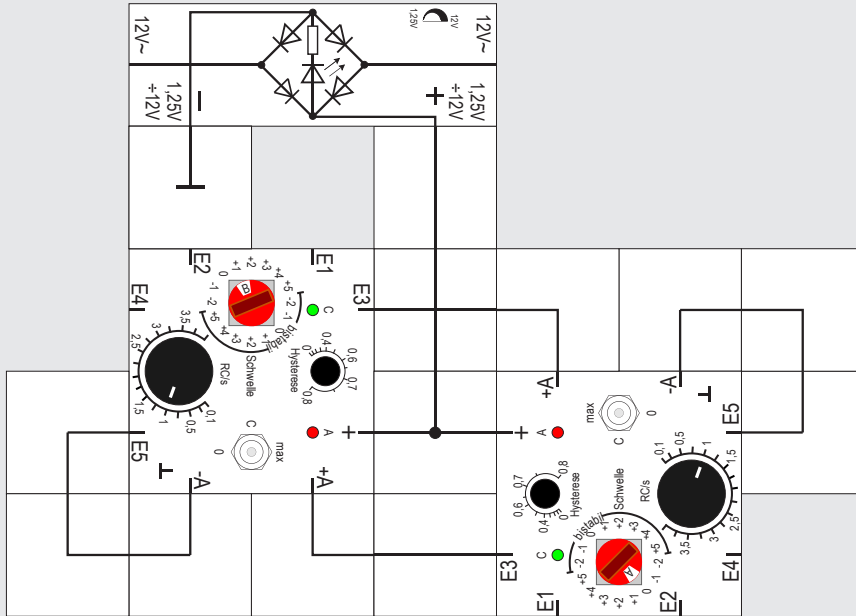
Es gibt eine Einstellung mit einer Oszillation, bei der die roten LEDs nacheinander einschalten, aber gleichzeitig verlöschen. Wenn dieser Zustand stabil ist, können wir probeweise die Schaltschwelle des linken Bausteins von +1 auf 0 schalten; dann wird sich überraschenderweise eine Invertierung einstellen: Die LEDs schalten gleichzeitig ein, aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten wieder aus. Die Frequenz beider Schwingungen ist gleich, die Tastverhältnisse sind unterschiedlich.

Wir schalten die Schaltschwelle wieder auf +1. Verkleinern wir den RC - Wert des linken Bausteins, gelingt es sogar, seine Frequenz zu verdoppeln; er schwingt trotzdem dann noch synchron.

Erhöht man dagegen den RC - Wert, gelangt man in einen Bereich, in dem die Frequenz des linken Bausteins nur halb so groß wie die des rechten.

Wir können also zwei frei gegeneinander laufende Oszillatoren mit »ähnlicher« Frequenz durch eine einzige Kopplung vom Ausgang des einen zum Eingang des anderen synchronisieren.

Sind die Frequenzeinstellungen allerdings zu unterschiedlich, schafft es bei $f_{\text{links}} < f_{\text{rechts}}$ der linke Baustein nicht mehr anzuschalten, bzw. wird er bei $f_{\text{links}} > f_{\text{rechts}}$ von rechten zum Schwingen kurz freigegeben und wieder abgeschaltet.



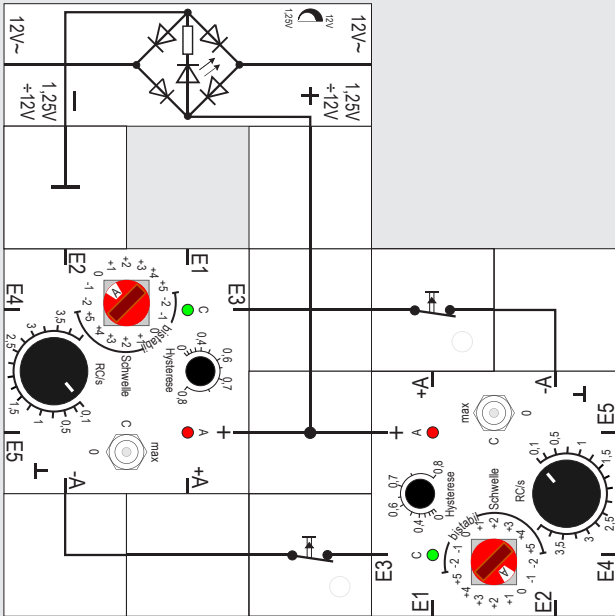


Versuch 13

Zwei gegenseitig gekoppelte Oszillatoren

Wir gehen jetzt noch einen Schritt weiter und verbinden den Ausgang des linken mit einem Eingang des rechten Bausteins. Die Schwelle des linken ist auf +1, die des rechten Bausteins auf 0 eingestellt. Wenn vorher beide Oszillatoren ganz brav mit ähnlicher Frequenz geschwungen haben, so benimmt sich unser Aufbau nach dieser kleinen Ergänzung ganz anders: Man glaubt zunächst ein kompliziertes Blinkmuster erkennen zu können (z. B. rechte LED leuchtet und linke blinkt vier Mal, rechte blinkt und das ganze wiederholt sich), doch plötzlich sieht alles wieder ganz anders aus.

Wartet man einen Augenblick, wiederholen sich anscheinend auch diese komplizierten Muster, und dann wieder doch nicht. Es ist verrückt: Obwohl die grünen LEDs eine gewisse Hilfe darstellen, ist es schwierig, vorauszusagen, wann eine rote LED an- und wann sie abschaltet. Darüber hinaus verändern winzige Veränderungen (am besten an der RC - Einstellung) das Muster.





Versuch 14

Wechselschalter

Zum Abschluss unserer Schaltkreise aus zwei Gen-Bausteinen gehen wir noch einmal auf die (- -) Kopplung des Versuchs 9 zurück. Diesmal fügen wir aber in jede Verbindungsleitung einen Taster mit Ruhekontakt ein. Die RC - Einstellung sollte bei beiden Bausteinen 0,1s und die Hysterese 0,1 sein, damit beide schnell schalten.

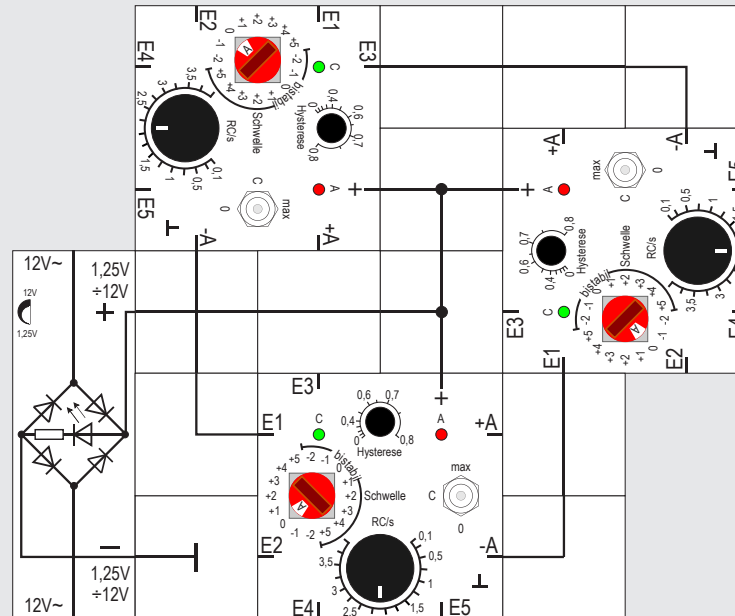
Solange wir die Taster nicht betätigen, verhält sich

die Schaltung wie die des Versuchs 9: Nach Anlegen der Versorgungsspannung schaltet ein Baustein an, der andere bleibt aus. Welcher was macht ist dem Zufall überlassen.

Betätigen wir nun kurz den Taster in der Verbindung vom -A Ausgang des Bausteins, dessen LED leuchtet, so verlöscht seine LED und die andere leuchtet. Das hemmende Signal ist aufgehoben.

Anschließend können wir das gleiche mit dem anderen Taster machen und es passiert das Entsprechende; die Ausgangssituation ist wieder hergestellt. Wir haben mit den beiden Tastern, die nicht gleichzeitig bedient werden sollten, eine Art Wechselschaltung (*engl.: toggle switch*) aufgebaut.

Dass ein solcher Wechselschalter auch in einer lebenden Zelle funktioniert, haben drei US amerikanische Forscher im Jahr 2000 auf gentechnische Weise gezeigt [8]: Sie kauften kurzerhand zwei Gene mit bekannten Proteinen und Bindungsstellen, kombinierten die gemäß dem obigen Verbindungsschema und schleusten das Ganze in ein Kolibakterium ein. Über chemische Signalstoffe konnten sie dann den Wechselschalter im Bakterium hin- und herschalten und das ganze über ein grün fluoreszierendes Protein auch noch dabei beobachten – ganz ähnlich wie wir an den leuchtenden LEDs unseres Versuchs.





Lectron

überraschend unterschiedliche Schalt-Dynamiken beobachtet. Was passiert nun wenn wir unseren 2er-Kombinationen von Gen-Bausteinen einen dritten Baustein hinzufügen? Wir werden sehen, dass hier einige neuartige Verhaltensweisen hinzukommen, die auch in der Biologie eine Bedeutung haben. Bevor wir uns also in die Welt der biologischen Gen-Netzwerke stürzen, wollen wir hier zuvor noch untersuchen, wie sich Konfigurationen von drei Gen-Bausteinen verhalten und fangen mit der Ringschaltung an. Jeweils vom -A Ausgang gibt es eine Verbindung zum Eingang des nächsten Bausteins. Alle Schwellen sind auf 0 eingestellt. Hysterese und RC - Einstellungen sind bei allen drei Bausteinen im mittleren Skalenbereich.

Nach Anlegen der Versorgungsspannung beginnt bei allen drei Bausteinen die Kondensatorladung, da auch alle drei 0 - Schwellen erreicht werden und die hemmenden Signale von den Bausteinen noch nicht abgegeben werden.

Auch wenn wir uns bemühen, werden wir es nicht schaffen, dass die drei Bausteine gleichzeitig anschalten; einer wird der erste sein. Das bedeutet, er gibt zuerst das hemmende Signal ab und hindert seinen angesteuerten Partner (Nr. 2) daran, den Kondensator weiter zu laden. Dieser kann kein hemmendes Signal abgeben, sein Kondensator entlädt

sich bereits wieder.

Als Folge davon wird die Ladung des Kondensators beim dritten Baustein weiterlaufen, bis dass er schaltet und seinerseits ein hemmendes Signal abgibt, das die Entladung des Kondensators beim Baustein Nr.1 einleitet. Nach kurzer Zeit schaltet dieser sein hemmendes Ausgangssignal für Nr. 2 ab, worauf hier die Kondensatorladung beginnt.

Es kommt eine Schwingung in Gang, die sich dadurch äußert, dass eine dunkle LED (zuweilen auch zwei überlappend) in Gegenrichtung zur Ansteuerung im Ring »kreist«.

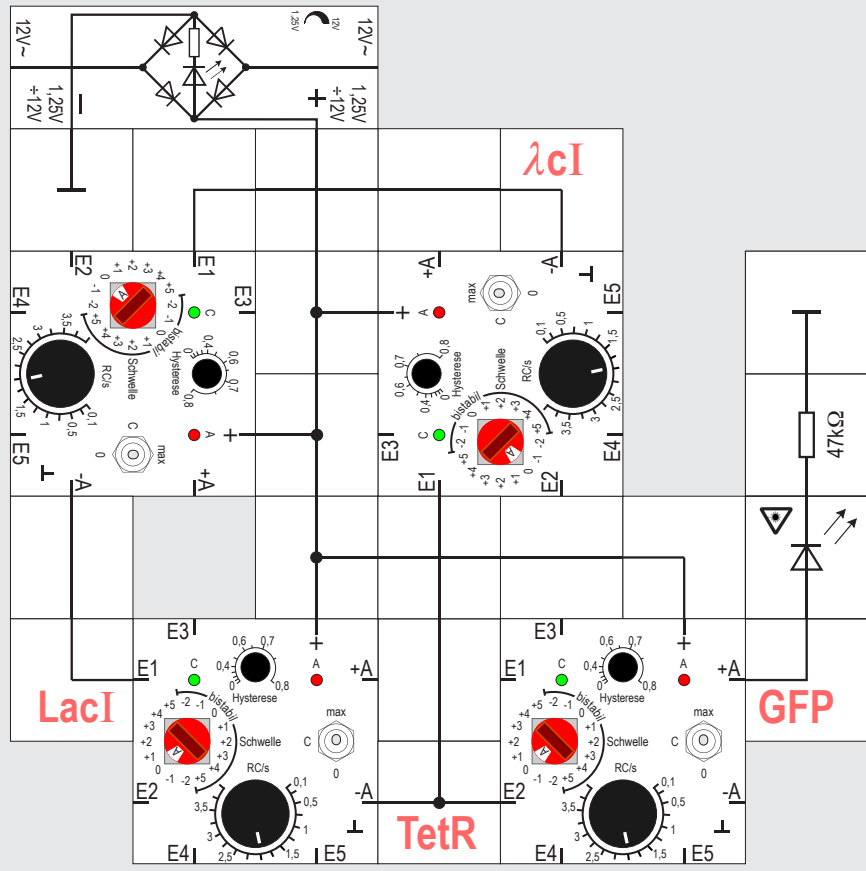
Obwohl man zu Beginn des Versuchs vielleicht geneigt ist zu glauben, die Bausteine werden sich alle gegenseitig hemmen und sich dann zur Ruhe setzen, ist dem keineswegs so.

Eine spannende Frage ist, ob ein derartiger Schaltkreis auch in einer lebenden Zelle funktionieren würde. Das haben sich die beiden Forscher Michael Elowitz und Stan Leibler auch gefragt und kurzerhand einen solchen Schaltkreis aus Genen zusammengebaut und in ein Kolibakterium eingeschleust [9]. Über fluoreszierende Proteine konnten sie tatsächlich das im Kreis umlaufende Signal beobachten und haben ihren erfolgreichen Schaltkreis »Repressilator« genannt. Wir bauen ihn im nächsten Versuch nach.

Versuch 15

Kopplung von drei Bausteinen (- - -)

Wir haben nun eine ganze Reihe von Kombinationen zweier Genbausteine untersucht und dabei

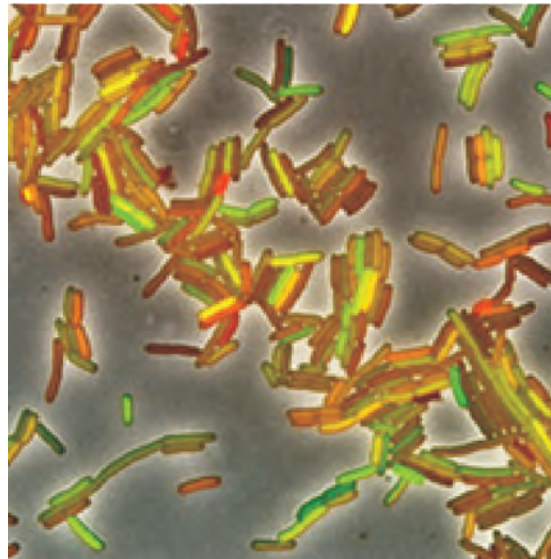




Versuch 16

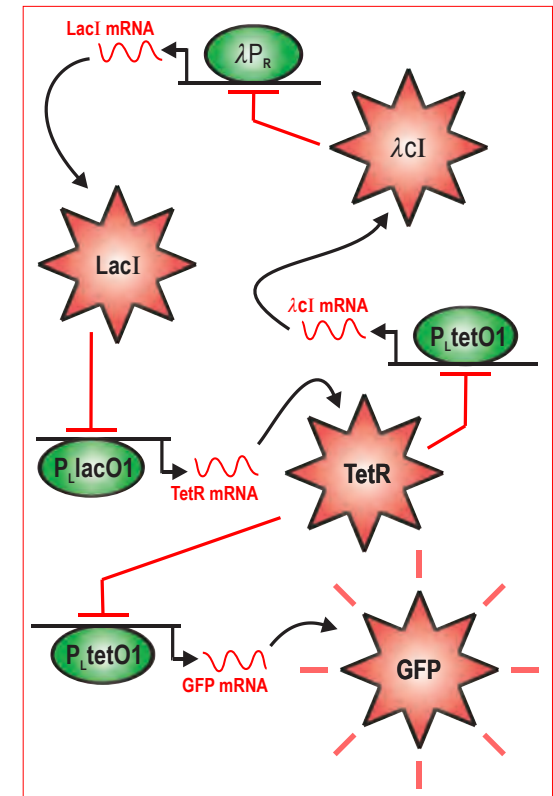
Repressilator

Der Repressilator im Kolibakterium besteht aus einem gentechnisch gebauten Ringoszillator aus drei Genen und mindestens einem weiteren Gen, das ein Signalprotein erzeugt, so dass man die Schwingung von außen beobachten kann. Der Ring besteht aus drei Genen TetR, LacI und λ CI, die sich gegenseitig im Kreis blockieren und damit eine Schwingung in Gang setzen. Dieser Schwingungserzeuger lässt dann die Bakterien über einen in der Zelle produzierten Farbstoff GFP in einem 3 Stunden-Rhythmus blinken. Die Auskopplung aus diesem »Dreierkreis« geschieht über einen weiteren Gen-Baustein. TetR unterdrückt nämlich nicht nur die Bildung von λ CI, sondern über diesen vierten Baustein auch die Bildung von GFP. Mit den Gen-Bausteinen ist dieser Regelkreis schnell aufgebaut; er simuliert die beobachtete Dynamik der wechselseitigen Genaktivitäten, die grünen Leuchtdioden C simulieren mit ihrer Helligkeit jeweils die kontinuierliche Veränderung der einzelnen Protein - Konzentrationen. Die an den vierten Gen - Baustein an-

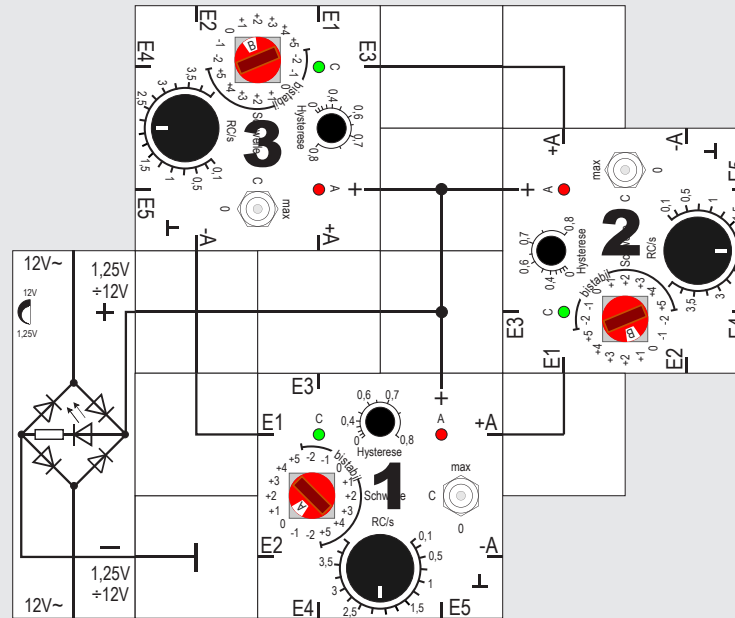


Kolibakterien

geschlossene zusätzliche LED blinkt im selben Takt wie die rote LED des Bausteins und simuliert das grün fluoreszierende Protein GFP. Die Periode dauert in unserem Nachbau allerdings nicht 3 Stunden, sondern zum Glück nur circa 30 Sekunden.



Repressilator





Versuch 17

Kopplung von drei Bausteinen (+ + -)

Wir setzen unsere Untersuchung fort und verändern die Schaltung des Versuchs 15, indem wir nur noch den unteren Baustein von einem hemmenden Signal ansteuern und die beiden anderen Verbindungen jeweils vom aktivierenden Ausgang aus beginnen. Damit wir überhaupt etwas Interessantes beobachten können, muss bei den beiden Bausteinen, die diese aktivierenden Signale empfangen, die Schwelle auf +1 verändert werden; beim dritten (unteren) Baustein bleibt sie auf 0.

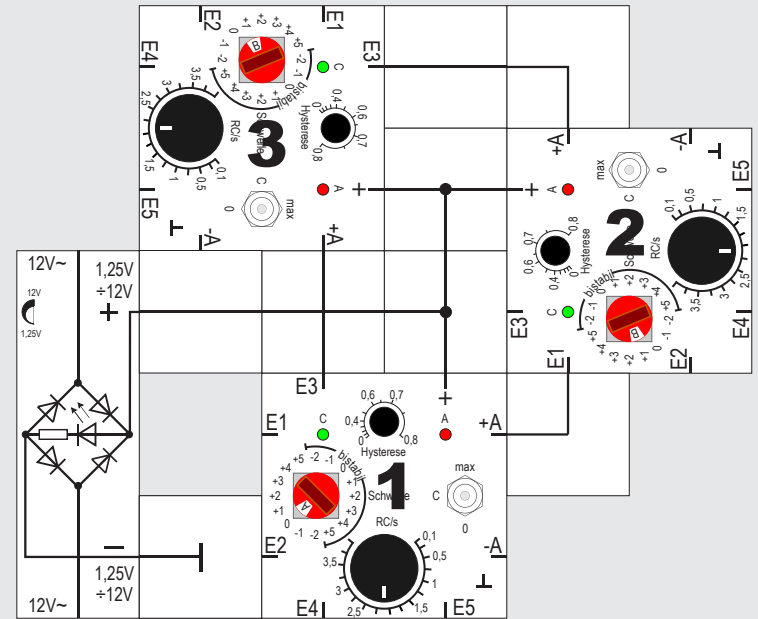
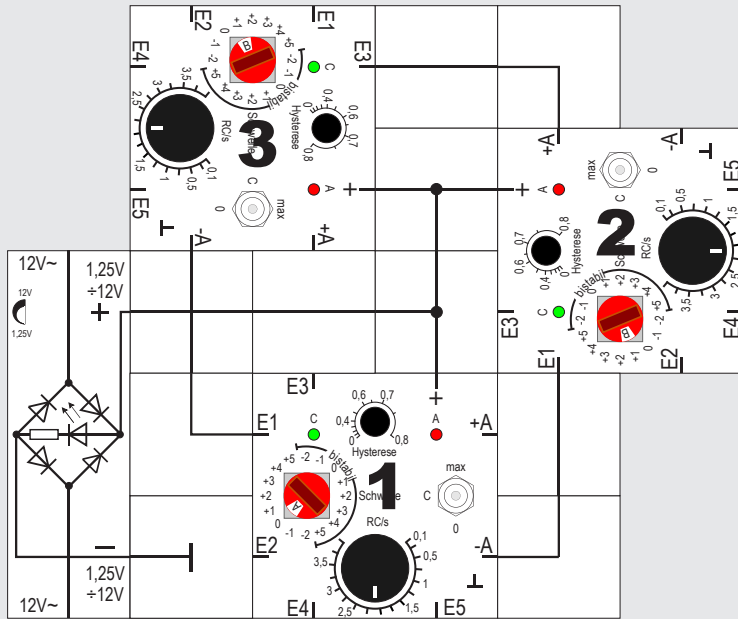
Legen wir die Versorgungsspannung an, beginnt nur bei diesem Baustein die Kondensatorladung, da

nur hier die eingestellte Schwelle 0 erreicht wird. Nach kurzer Zeit gibt dieser Baustein ein aktivierendes Signal an seinen angeschlossenen Partner Nr. 2, wodurch bei diesem auch die Kondensatorladung beginnt; seine Schwelle +1 wird erreicht.

Er wird also bald darauf anschalten und ebenfalls ein aktivierendes Signal an Baustein Nr. 1 senden, dessen Schwelle +1 auch erreicht wird. Letztlich sind alle drei Bausteine angeschaltet.

Das bedeutet aber nun, Baustein Nr. 1 gibt ein hemmendes Signal, bei Nr. 2 beginnt daraufhin die Kondensatorentladung und er schaltet in Folge ab. Nacheinander verschwinden dann auch die aktivierenden Signale für die Nachfolger und zum Schluss sind alle drei Bausteine wieder abgeschaltet. Das ist die Ausgangssituation und das Spiel beginnt von Neuem.

Diese Konfiguration zeigt also auch ein umlaufendes Muster. Sie gleicht einem bei der Datenverarbeitung vorkommenden Ringschieberegister aus drei D-Flipflops, bei dem von einer der drei Zellen der \bar{Q} - Ausgang mit dem D - Eingang der nächsten Zelle verbunden ist. Es gibt allerdings einen großen Unterschied: Alle Zellen beim Schieberegister werden zentral getaktet. Bei dem hier vorhandenen Aufbau bestimmen die Zeiteinstellungen der einzelnen Bausteine die Umlaufzeit des Musters.





Versuch 18

Kopplungen dreier Bausteine (+ - -) & (+ + +)

Wenn wir die aktivierende Kopplung des Bausteins Nr. 1 auf Baustein Nr. 2 in eine hemmende verwandeln, machen wir eine überraschende Beobachtung: Es läuft kein Muster mehr um (Aufbau links)! Je nach eingestellten Zeitbedingungen und abhängig davon, mit welchem Dreistellungsschalter wir starten, stellt sich kurzer Zeit ein stabiles LED-Bild ein, das sich nicht mehr verändert: Entweder ist Baustein Nr.1 ständig eingeschaltet oder die Bausteine Nr. 2 und Nr. 3 sind aktiv.

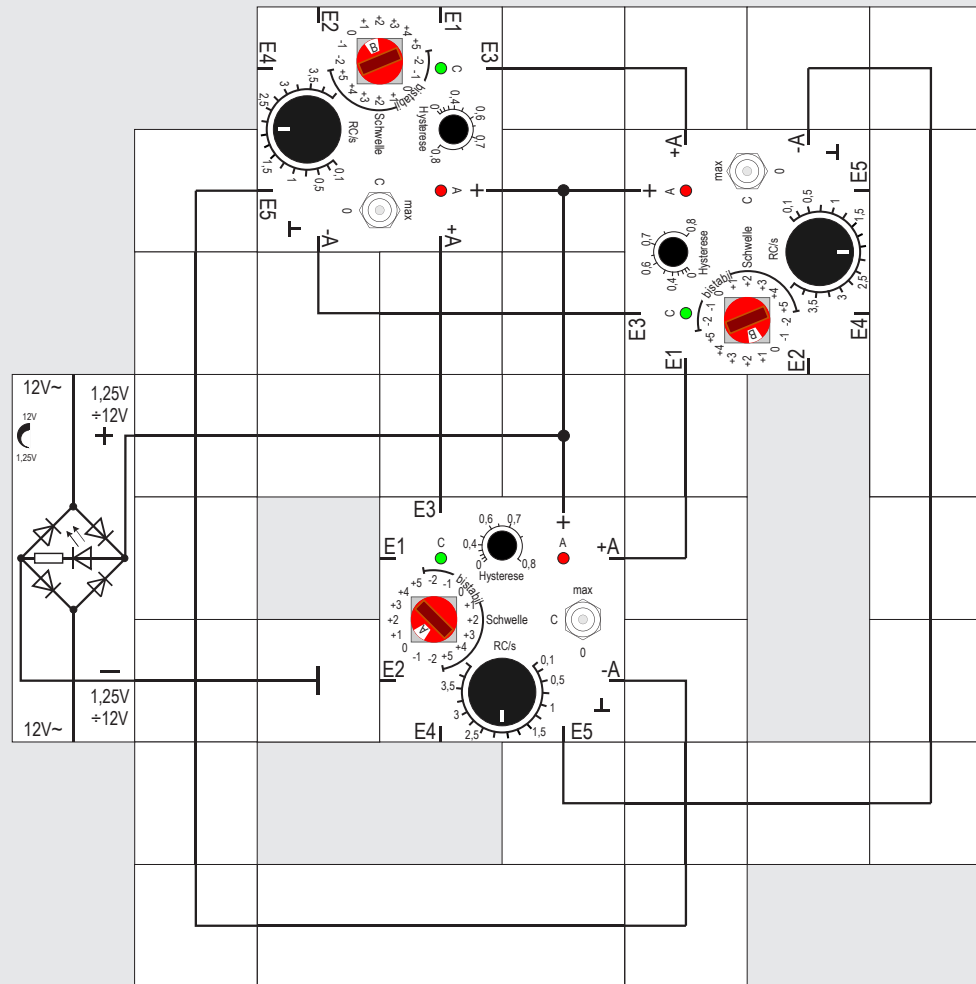
Versuchen Sie einmal mit Hilfe der Zeiteinstellungen, den Zeitpunkt für den Beginn des stabilen Zustands möglichst weit hinaus zu schieben. Bekommen Sie einen vollen Umlauf eines Signals hin?

Ebenso führt die (+ + +) Kopplung mit den Schwellen +1 bei allen drei Bausteinen auf ein stabiles Muster (rechter Aufbau). Legen wir die Versorgungsspannung an, passiert zunächst gar nichts, alle drei Bausteine bleiben ausgeschaltet, da nirgends ein aktives Signal vorhanden ist. Dieser Zustand ist stabil. Es gibt aber noch einen weiteren, der nach kurzer

Zeit angenommen wird, wenn man mit Hilfe des Dreistellungsschalters eines Bausteins (kurz auf »max« geschaltet) den Vorgang startet. Dann sieht es zunächst so aus, als wenn ein Muster umläuft, doch bald ist der zweite stabile Zustand erreicht. Alle drei Bausteine sind eingeschaltet und halten sich selbst. Trotzdem lohnt es sich auch hier, Zeiteinstellungen zu finden, die diesen zweiten Zustand möglichst lange verhindern.

Wenn wir die verschiedenen Ringschaltungen mit drei Gen-Bausteinen vergleichen (---, ++-,+--, +++) fällt noch eines auf: Eine umlaufende Schwingung bekommen wir immer dann, wenn wir eine ungerade Zahl von hemmenden (-) Verbindungen haben; wenn nicht, endet die Blinkerei immer in einem stabilen Zustand. Theoretisch weiß man, dass dies ganz allgemein auch für beliebig große Ringschaltungen gilt. Wenn Sie mögen, probieren Sie dies gerne mit ein paar mehr Genbausteinen aus!

Übrigens gilt diese Regel ganz besonders für biologische Regelkreise, denn dort hat jedes Gen seine eigene Geschwindigkeit und seine eigenen Marotten, ganz anders als in der Computertechnik, wo logische Schaltungen von einem zentralen Taktgeber den Rhythmus vorgegeben bekommen.





Versuch 19

Doppelkopplungen dreier Bausteine ($\pm \pm \pm$)

Drei Bausteine bieten eine höhere Anzahl von Kopplungsmöglichkeiten als zwei. Wir wollen die Versuche mit drei Bausteinen mit einem Aufbau fortsetzen, der identische Kopplungen vorsieht. Und zwar soll jeder Baustein im Ring seinen Nachfolger aktivieren und seinen Vorgänger hemmen. Wir erhalten dann eine Art Doppelkopplung. Alle drei Bausteine sind gleichberechtigt.

Wenn bei allen Bausteinen ungefähr gleiche Zeiten und die Schwelle +1 eingestellt sind, passiert beim Anlegen der Versorgungsspannung nichts; alle drei

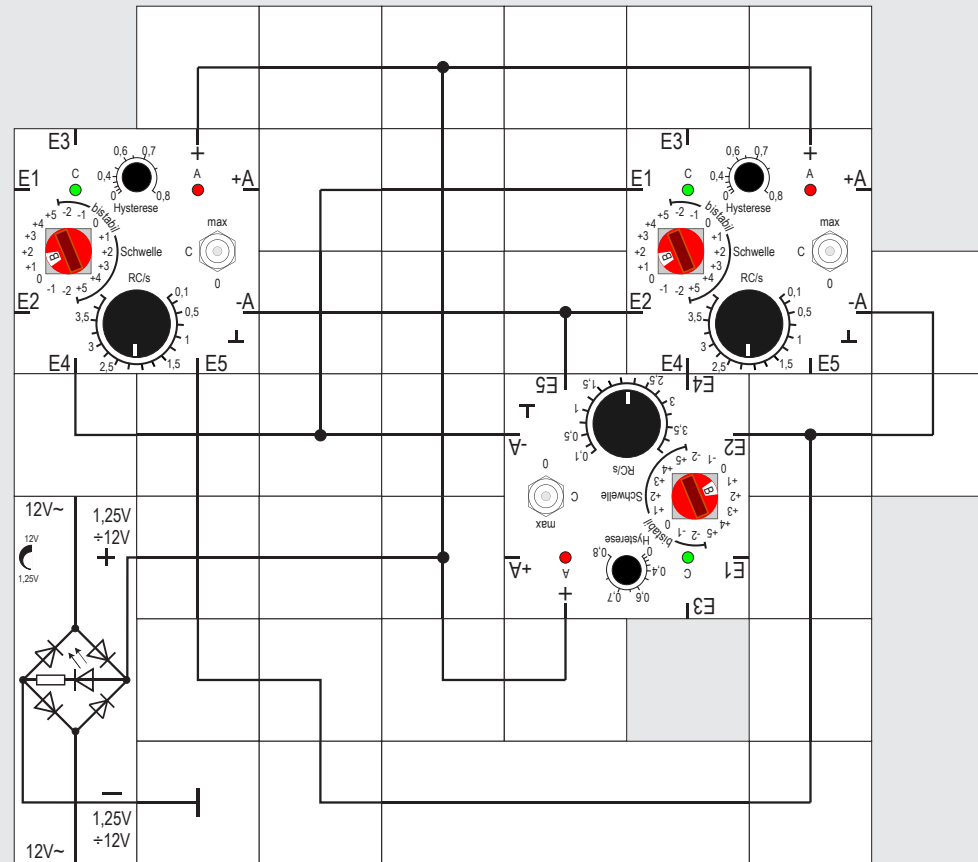
bleiben abgeschaltet. Selbst wenn wir alle drei mit den Dreistellungsschaltern anschalten und möglichst gleichzeitig auf Stellung »C« freigeben, sind sie nach kurzer Zeit abgeschaltet.

Auch wenn wir nur einen Baustein starten, kommt zunächst so etwas wie ein umlaufendes Muster zustande, das aber nach wenigen Schritten »ausstirbt«. Wir können es zwar durch vorsichtiges Feinjustieren der Zeiteinstellungen länger am Leben erhalten, dauerhaft wird es uns aber nicht gelingen.

Verändern wir dagegen bei einem der drei Bausteine die Schwelle von +1 auf 0, so schaltet dieser nach kurzer Zeit an und bald darauf auch der nächste im Uhrzeigersinn, während der erste abschaltet. Mindestens ein abgeschalteter Baustein (bisweilen sind durch Überlappung auch zwei Bausteine abgeschaltet) »durchläuft« andauernd den Ring im Gegenuhrzeigersinn.

Die Absenkung der Schwelle von +1 auf 0 bei einem weiteren Baustein mit eventueller nochmaliger Feinjustierung ändert nichts an dem Bild. Die Feinjustierung kann nötig werden, damit ein Baustein nicht ständig angeschaltet ist.

Erst wenn bei allen drei Bausteinen die Schwelle auf 0 steht, kommt die Schaltung in einen stabilen Zustand; alle drei Bausteine bleiben dauerhaft angeschaltet.





Lectron

Versuch 20

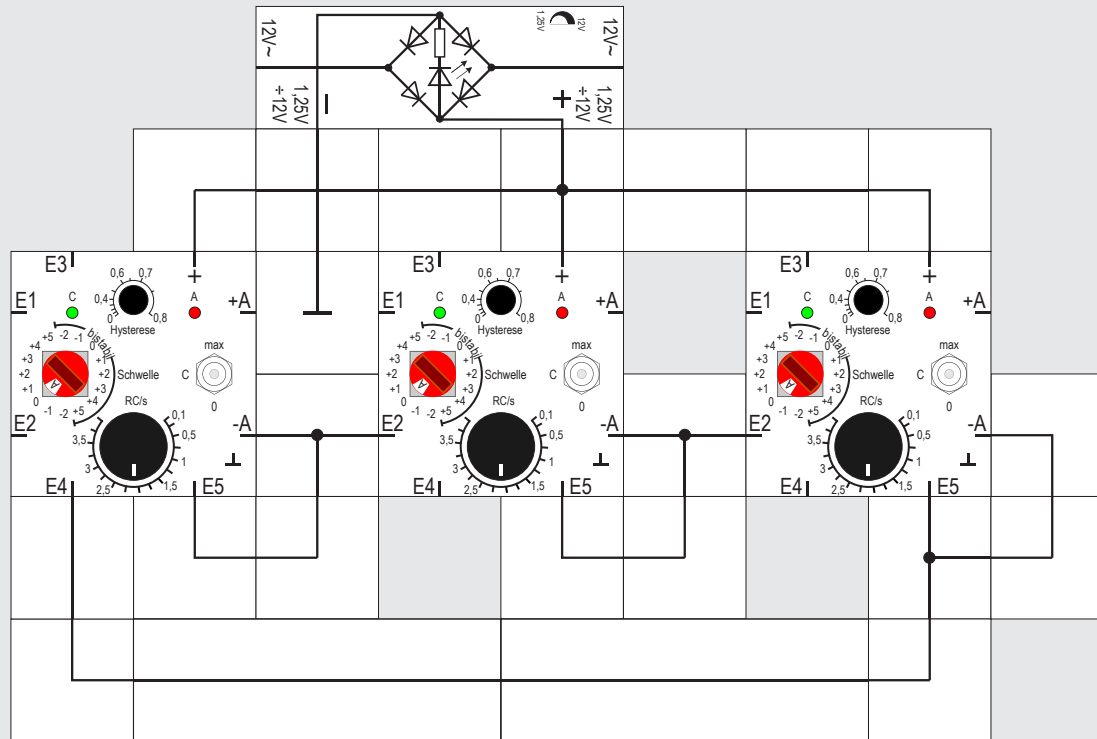
Doppelkopplungen dreier Bausteine (===)

Drei Bausteine können auch so gekoppelt werden, dass jeder seinen Vorgänger und seinen Nachfolger im Ring hemmt. Wieder sind alle Bausteine bei dieser Art hemmender Doppelkopplung gleichberechtigt. Sind bei allen Bausteinen gleiche Zeiten und die Schwelle +1 eingestellt, passiert beim Anlegen der Versorgungsspannung nichts; alle drei bleiben aus-

geschaltet, was uns nicht weiter überrascht, bei diesem Kreis von maximal griesgrämigen Nachbarn. Selbst wenn wir alle drei mit den Dreistellungsschaltern anschalten und möglichst gleichzeitig auf Stellung »C« freigeben, sind sie nach kurzer Zeit wieder abgeschaltet.

Wenn wir bei allen drei Bausteinen die Schwelle auf 0 absenken, beobachten wir nach Anlegen der Versorgungsspannung, dass bei allen die grüne LED immer heller wird, aber es nur einer schafft, auch wirklich aktiv zu werden; er schaltet dann die beiden anderen aus.

Das ist schon interessanter! Hier einigt sich der Schaltung quasi auf einen Gewinner. Und zwar immer genau einen. Wie wir weiter hinten im biologischen Teil unserer Versuche sehen werden, wird dieses Schaltmotiv in der Biologie tatsächlich fleißig benutzt: Zum Beispiel immer dann, wenn bei einer Zelle der Zelltyp festgelegt wird und durch einen genetischen Schaltkreis auch stabil festgehalten werden soll. Wir legen ja durchaus Wert darauf, dass eine Nervenzelle in unserem Gehirn auch eine Nervenzelle bleibt, und nicht plötzlich durch Zufall zu einer Muskelzelle wird. Und einen Zustand stabil festhalten, das kann der hier gebaute Schaltkreis dank seiner vielen gegenseitig hemmenden Kopplungen hervorragend.





Versuch 21

Kopplung von drei Oszillatoren

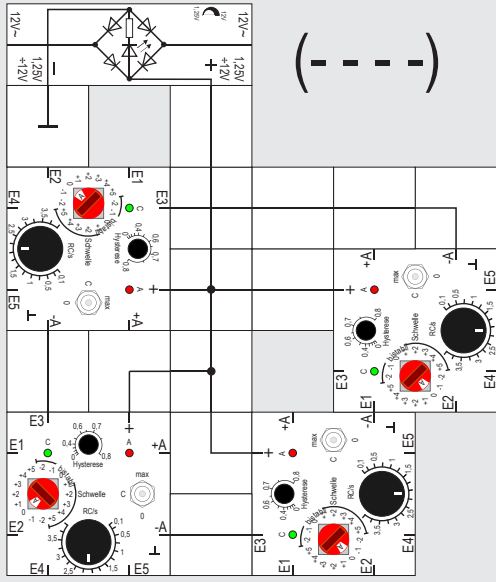
In den Versuchen 12 und 13 haben wir bereits zwei Oszillatoren auf verschiedene Weise gekoppelt und gesehen, dass sie sich (in gewissen Grenzen) synchronisieren. Bevor wir die Versorgungsspannung an den aktuellen Aufbau anlegen, drehen wir die drei T - Verbindungsbausteine um 90° so, dass die Kopplungen zwischen den Oszillatoren noch nicht wirksam sind.

Wir versuchen, die Frequenz bei allen drei Oszillatoren mit der RC- und der Hysterese - Einstellung möglichst gleich einzustellen. Wir wissen bereits, dass es uns nicht gelingen wird. Wenn wir die Schaltung längere Zeit beobachten, werden wir gut sehen, wie

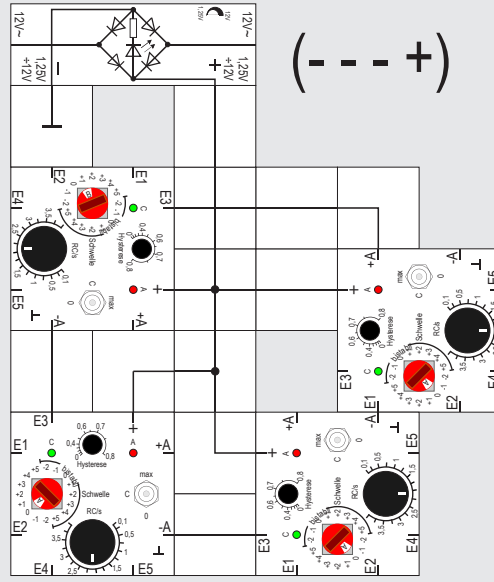
die Schwingungen in der Phase auseinander laufen, was auf unvermeidbare kleine Frequenzunterschiede der einzelnen Oszillatoren zurückzuführen ist. Wir drehen dann die T - Verbindungsbausteine wie im Aufbaubild angegeben und schauen nach ein paar Minuten wieder nach, wie das »Schwingungsbild« aussieht.

Höchstwahrscheinlich werden wir feststellen, dass alle drei Oszillatoren mit derselben Frequenz schwingen: Ein angeschalteter Baustein im Ring »kreist« und gelegentlich können (periodisch?) leichte Überlappungen zweier aktiver Bausteine (eine LED leuchtet bereits auf, bevor ihre Vorgängerin noch nicht abgeschaltet hat) vorkommen. Es hat den Anschein, als ob eine Grundschiwingung in der Anordnung vorhanden ist und eine überlagerte Schwingung versucht, die Phasenbeziehungen zu ändern. Sie wird jedoch immer wieder stabilisiert.

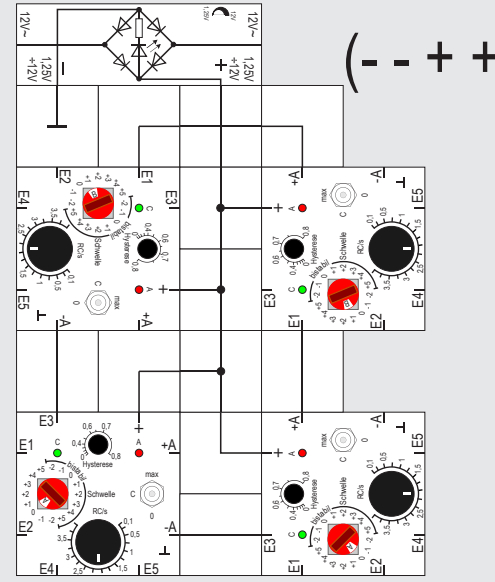
Bei diesem Versuch hängt das Schwingungsbild letztlich stark von den Einstellungen ab und wir können durch vorsichtiges Verändern der Zeitbedingungen eine Vielzahl von Möglichkeiten ausprobieren. Wir sollten aber nach jeder Veränderung der Schaltung genügend Zeit (ein paar Minuten) verstreichen lassen, ehe wir nachschauen, ob sich ein »dauerhaftes« neues Muster eingestellt hat.



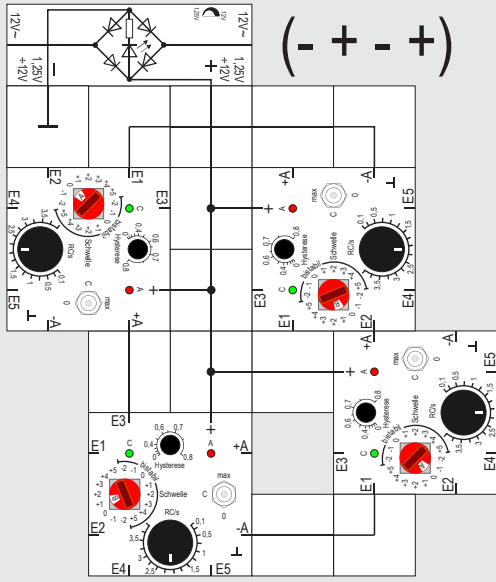
(- - - -)



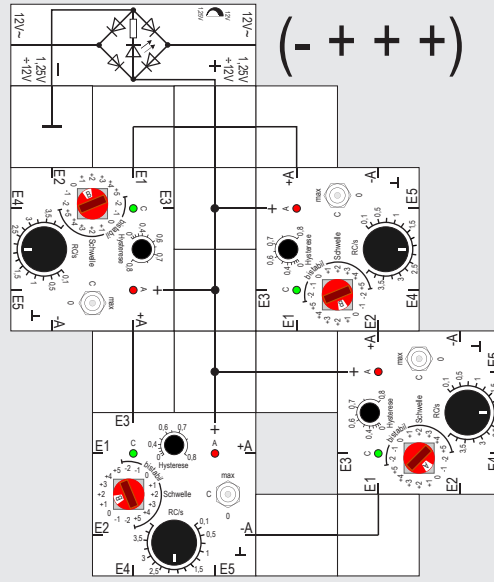
(- - - +)



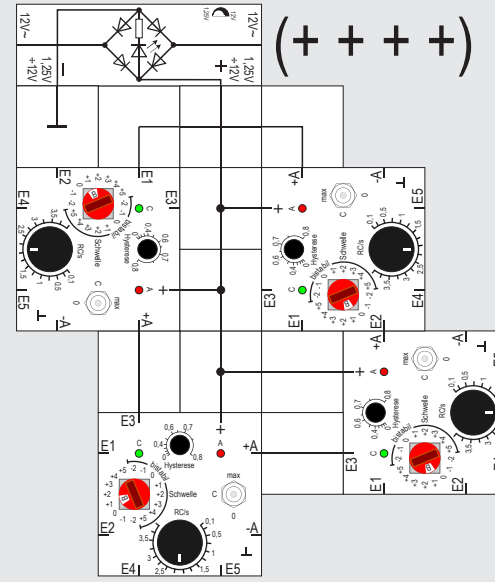
(- - + +)



(- + - +)



(- + + +)



(+ + + +)



Versuch 22

Ringschaltungen mit 4 Gen-Bausteinen

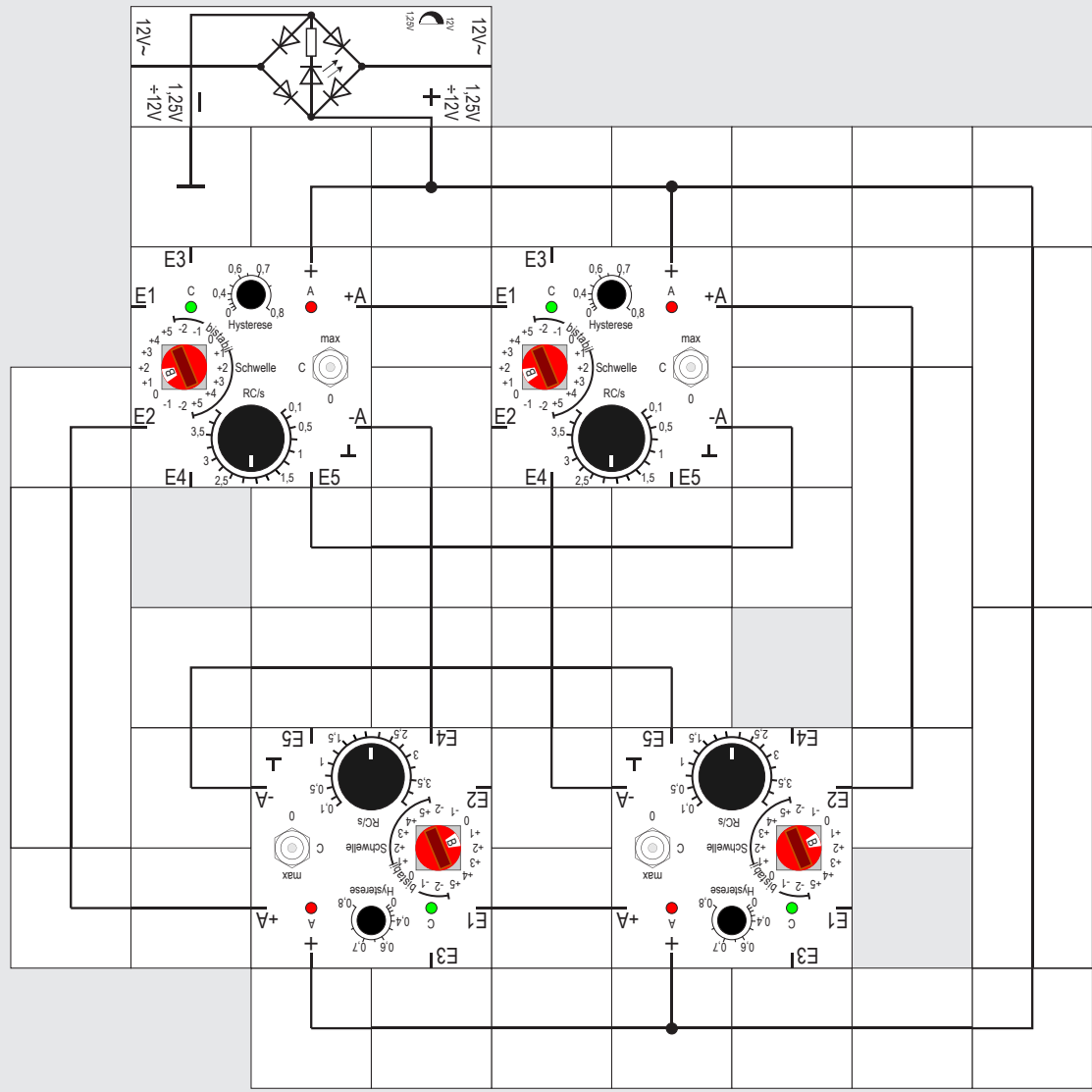
Erhöhen wir die Anzahl der Schwellwertbausteine in unserem Ringaufbau auf vier, so ergibt sich eine noch größere Kopplungsvielfalt, die mit ihrer Kurzschreibweise abgebildet ist. Bei einigen Konstellationen könnten wir bereits mit unseren Erfahrungen aus den »Dreierkonstellationen« sagen, was passieren wird, aber es gibt auch Überraschungen.

- (+++++) Diese Erweiterung des Versuchs 18 liefert zunächst ein stabiles Ergebnis, nämlich alle vier Bausteine abgeschaltet (alle Schwellen +1). Starten wir einen mit dem Dreistellungsschalter, wird es bei sorgfältiger Einstellung aller Bausteine auf gleiche Zeiten (s. V28) einige Umläufe eines Musters geben. Wir können dabei allerdings schon bemerken, dass es sich ändert: Entweder werden es immer mehr angeschaltete Bausteine, was zum zweiten stabilen Zustand (alle Bausteine angeschaltet) führt, oder es werden weniger, woraus der Anfangszustand resultiert.
- (+++-) Hier entsteht eine dauernde Oszillation, wenn bei drei Bausteinen die Schwelle auf +1 und sie beim vierten auf 0 steht. Dies ist der Baustein, der mit dem -A Ausgang seines Vorgängers verbunden ist.
- (-+-+) Zwei Bausteine haben die Schwelle auf +1; bei den beiden, die mit dem -A Ausgang ihres Vorgängers verbunden sind, ist die Schwelle 0. Es entsteht eine vorübergehende Oszillation, Eine der beiden stabilen Lagen ist erreicht, wenn ein benachbartes Paar Bausteine an- und das andere abgeschaltet hat oder umgekehrt. Die Paarbildung ist durch die Ansteuerung vorgegeben; deswegen sind es nur zwei stabile Lagen.
- (--++) Die Schwelleneinstellung muss wie vorstehend sein. Eine der beiden stabilen Lagen ist erreicht, wenn drei Bausteine angeschaltet haben und der vierte abgeschaltet ist. Bei der zweiten Lage ist es genau umgekehrt: Der bisher abgeschaltete Baustein hat an- und die anderen drei sind abgeschaltet. Wie bei den anderen Versuchen hängt das von den Zeiteinstellungen ab. Es handelt sich aber immer um dieselben drei Bausteine, die an oder aus sind; deswegen gibt es auch nur zwei stabile Zustände.
- (---+) Die Schwelle des vom +Ausgang seines Vorgängers angesteuerten Bausteins muss auf +1 stehen, die drei anderen sind auf 0. Es stellt sich eine dauernde Oszillation ein.
- (----) Vordergründig könnte man hier meinen, es ist nur eine Erweiterung des Versuchs 15 auf vier Elemente und es wird sich, wenn alle die Schwelle

0 haben, eine Oszillation einstellen; doch das ist nun gerade nicht der Fall. Selbst bei sorgfältiger Zeiteinstellung kommt die Schaltung bald zur Ruhe. Die stabile Lage ist erreicht, wenn jeder zweite Baustein angeschaltet hat. Die beiden anderen sind ausgeschaltet. Es gibt zwei stabile Zustände; welche Bausteine an- und welche dann abgeschaltet sind, hängt von den eingestellten Zeiten und den Startbedingungen ab. Allgemein kann man sagen, dass eine Oszillation nur zustande kommt, wenn eine ungerade Anzahl von Bausteinen auf diese Weise gekoppelt ist.

Neben den angegebenen Schwelleneinstellungen gibt es noch eine Vielzahl anderer. Es dürfte aber klar sein, dass es bei dieser Art Ringschaltung sinnlos ist, beispielsweise Schwellen von +2 oder größer einzustellen, die nie erreicht werden können. Gleiches gilt für -Schwellen, die nicht unterschritten werden können.

Für die Zeiteinstellungen gilt Ähnliches: Hier sind es unendlich viele Möglichkeiten. Zu »interessanten« Oszillationen, auch wenn sie nicht dauerhaft sind, kommen wir, wenn ähnliche Zeiten (s. V28) eingestellt sind. Eins aber ist sicher: Gibt es eine stabile Lage, findet die Schaltung sie über kurz oder lang auch.





Versuch 23

Ringschaltung mit 4 Gen-Bausteinen und doppelter Kopplung ($\pm\pm\pm\pm$)

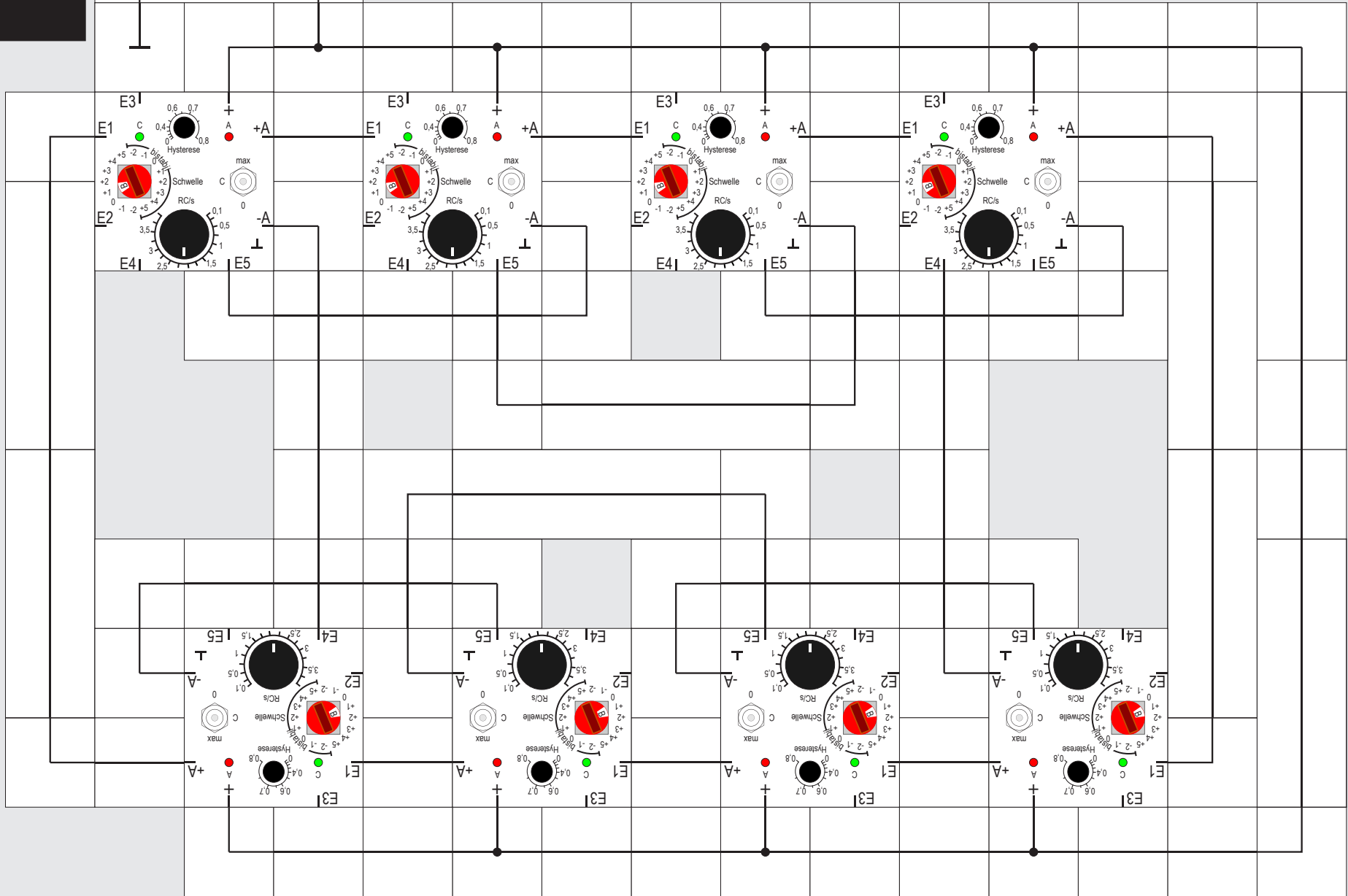
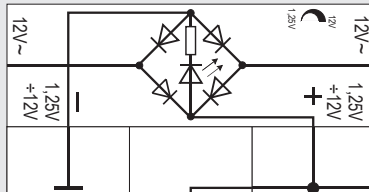
Bei einigen Versuchen Nr. 22 konnten wir vielleicht erkennen, dass sich nach einer anfänglichen Oszillation doch ein stabiler Zustand einstellte: Wir schaffen es einfach nicht, die Zeiten so genau einzustellen, dass beispielsweise ein Baustein exakt zu dem Zeitpunkt abschaltet, zu dem sein Nachfolger im Ring anschaltet. Als Folge davon wird das umlaufende Muster an angeschalteten LEDs länger oder kürzer und bald ist ein stabiler Zustand erreicht.

Wenn wir nun in gewohnter Weise vier Bausteine im Ring (++++) koppeln, aber gleichzeitig dafür sorgen, dass sich kleine Zeitdifferenzen nicht beliebig

addieren können, müsste es gelingen, eine Oszillation am Leben zu erhalten. Zu diesem Zweck sorgen wir mit dem -A Ausgang dafür, dass der Vorgänger im Ring »rechtzeitig« abgeschaltet wird. Es entsteht dann der angegebene Aufbau. Alle Bausteine sind gleichberechtigt und mit ihrer Schwelle auf +1 eingestellt. Die Zeiten sollten bei allen vier ähnlich sein. Nach Anlegen der Versorgungsspannung läuft die Schaltung nicht von selbst an, wir müssen sie mit irgendeinem Dreistellungsschalter starten. Dann entsteht eine dauerhafte im Uhrzeigersinn umlaufende Oszillation, bei der zwei LEDs benachbarter Bausteine angeschaltet und die beiden anderen ausgeschaltet sind. Unsere Überlegung war also richtig. Beim »Weiterschalten« können für den Bruchteil einer Sekunde auch drei LEDs leuchten; auch kommt es vor, dass nur eine LED an ist. Die im Gegenuhrzeigersinn gerichtete Kopplung zum Abschalten des Vorgängers stabilisiert offensichtlich die Oszillation.

Wir können jetzt sogar die Zeiteinstellung eines Bausteins in relativ großen Grenzen verändern, ohne dass die Oszillation zum Erliegen kommt. Mit diesem Trick können wir also auch in Ringschaltungen mit geradzahlig vielen hemmenden Kopplungen eine stabile Oszillation erreichen.

24





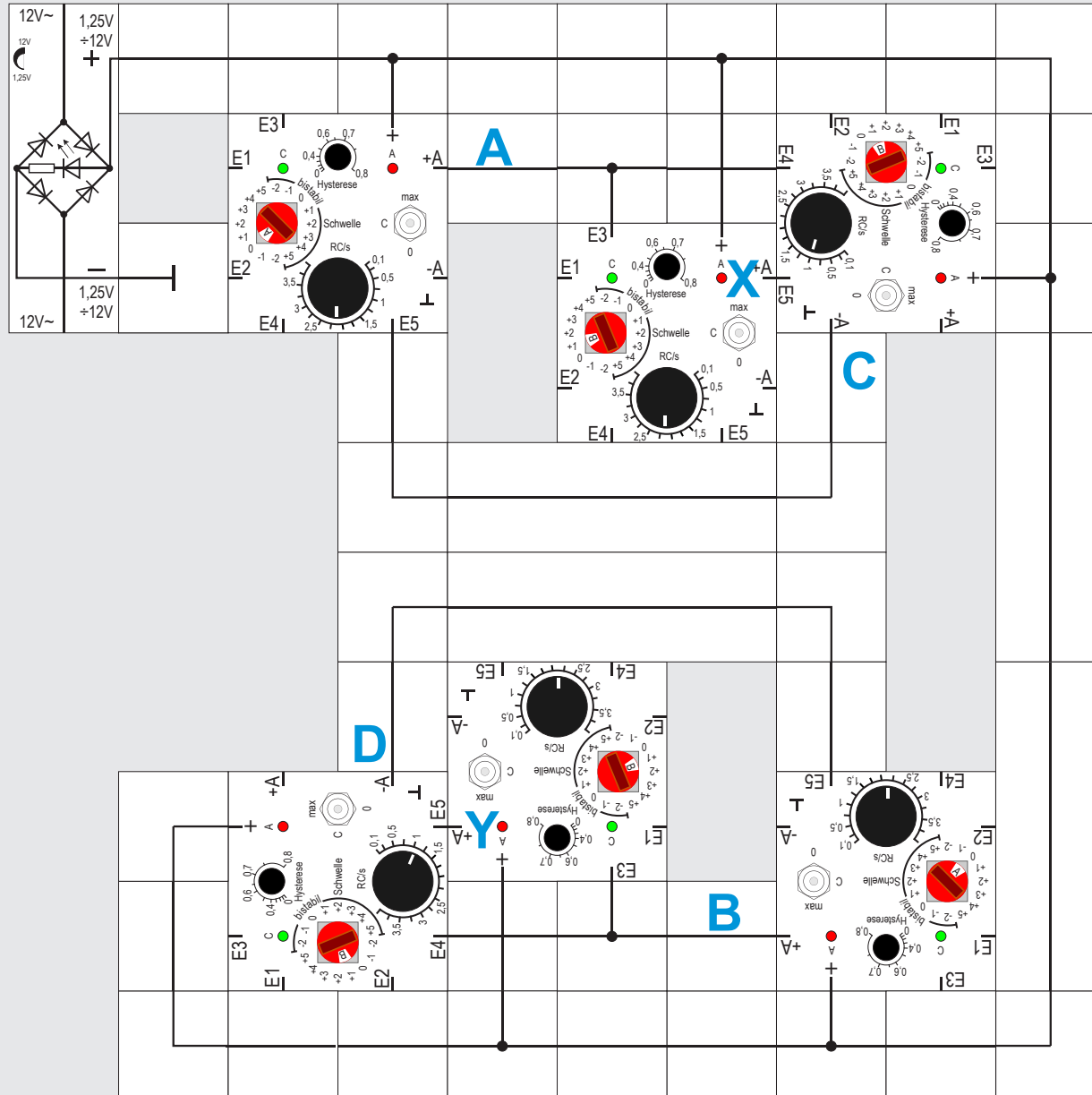
Versuch 24

Ringschaltung mit 8 Gen-Bausteinen und doppelter Kopplung

Mit dem in Versuch 23 gefundenen »Strickmuster« können wir unseren Ring erweitern auf fünf, sechs oder sieben Bausteine, ohne dass etwas wesentlich anders wird. Erst wenn wir acht Bausteine einsetzen, wird es uns mit etwas Geschick möglich sein, zu einem bereits kreisenden Muster ein weiteres zu installieren, indem wir zu einem geeigneten Zeitpunkt den Dreistellungsschalter des Bausteins, der gerade den größten Abstand zum Muster hat, kurz betätigen. Wahrscheinlich werden mehrere Startversuche nötig sein, aber bei Erfolg kreisen dann zwei identische Muster im Ring, die ihren gegenseitigen zeitlichen Abstand wahren und damit die Oszillation am Leben erhalten.

Jeweils vier Bausteine im Ring pro kreisendem Impuls reichen also aus, um den nötigen Abstand zwischen benachbarten Impulsen zu wahren.

25



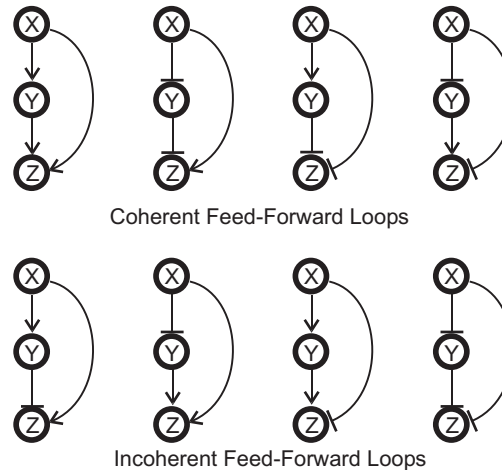
Versuch 25

Feed-forward loops

Bereits in Versuch 6 wurde erwähnt, dass man in Gen-Regulationsnetzen kleine immer wiederkehrende Strukturen findet, bei denen ein Gen X ein Gen Z direkt und parallel dazu über ein Gen Y indirekt beeinflusst. In Analogie zu musikalischen Kompositionen, bei denen kleine Themen oder Motive immer wieder auftauchen, heißen diese Strukturen in der englischen Fachsprache *Motifs* [10]. Aus ihrem häufigen Vorkommen kann man schließen, dass sie biologisch nützliche Eigenschaften besitzen, auch wenn man diese nicht gleich erkennt.

Die Beeinflussung von X auf Z über die beiden parallelen Pfade kann gleichartig oder ungleichartig sein; entsprechend nennt man die Strukturen *coherent feed-forward loops* bzw. *incoherent feed-forward loops* (s. Abbildung). Die Wirkung von letzteren erkennen wir leicht: Gen X aktiviert Gen Z sofort und hemmt es wenig später über Gen Y wieder, so dass Gen Z nur kurzzeitig aktiv ist.

Nun kommen aber die kohärenten Strukturen in Gen-Netzen weitaus häufiger vor als die inkohärenten (z. B. 85% zu 15% in dem bekannten Bakterium *Escherichia coli*) und man hat untersucht, worin ihr möglicher Nutzen besteht [11]. Wir wollen das in



einem Versuch mit Oszillatoren nachvollziehen.

Unser Versuchsaufbau besteht aus zwei identischen Oszillatoren, bei denen eine kohärente Struktur verwendet wird: Gen A aktiviert Gen C direkt und über Gen X indirekt. Ist Gen C dann aktiv, hemmt es Gen A. Wenn die Schwellen von X und C +1 sind und die Schwelle von Gen A auf 0 eingestellt ist, kommt eine Oszillation zustande. Entsprechendes gilt für den zweiten spiegelbildlich aufgebauten Oszillator mit den Genen B (Schwelle 0), Y und D (Schwelle +1). Die Hysterese ist bei allen Bausteinen auf den mittleren Wert von 0,4 eingestellt, RC von A, X, B und Y ist 2sec, von C und D 1sec.

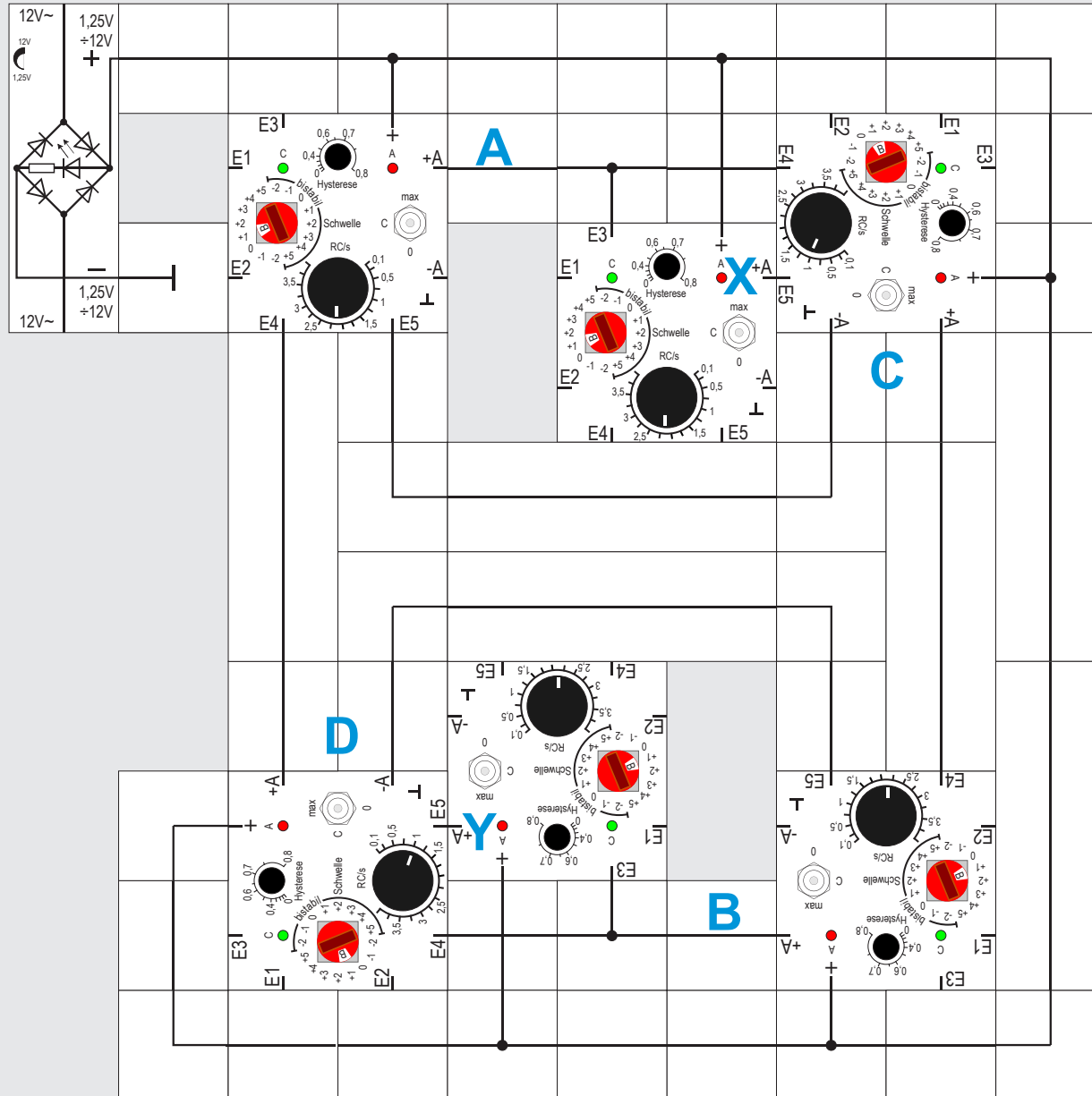
Nach Anlegen der Versorgungsspannung schwingen beide Oszillatoren mit nahezu der gleichen Frequenz unabhängig voneinander und in zufälliger Phasenlage zueinander.

Versuch 26

Gekoppelte Oszillatoren

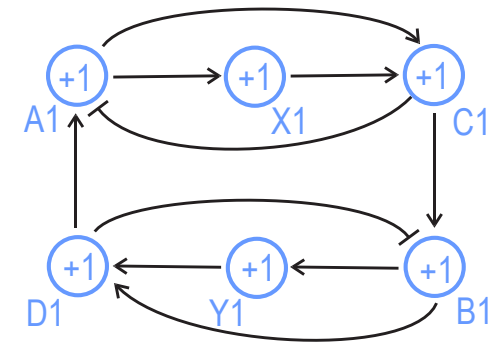
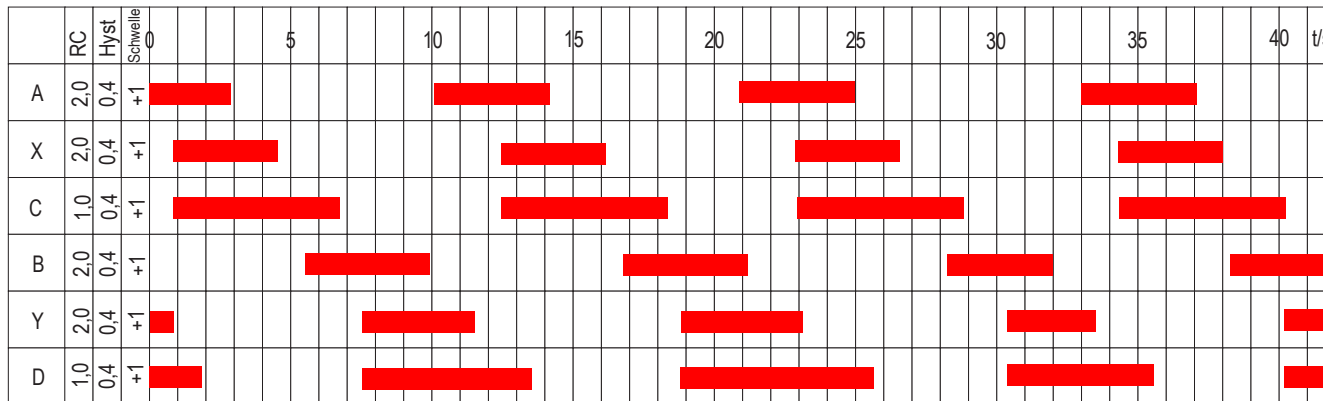
Das Verhalten beider Oszillatoren ändert sich grundlegend, wenn wir sie beide koppeln. Dazu wird der +A - Ausgang von C mit dem E4 - Eingang von B und entsprechend der +A - Ausgang von D mit dem E4 - Eingang von A verbunden. Außerdem werden die Schwellen von A und B auf +1 erhöht. Die Oszillatoren müssen nun manuell mit dem Dreistelungsschalter möglichst gegenphasig gestartet werden; es reicht, wenn bei einem der Schalter hinreichend lange auf »max« und wieder zurück auf »C« gestellt wird.

Wir stellen nach kurzer Beobachtungszeit fest, dass beide Oszillatoren jetzt synchron und in Gegenphase schwingen. Die Gegenphase kommt dadurch zustande, dass das aktive Ausgangssignal eines Oszillators auf den eigenen Schwingvorgang hemmend, auf den des Partners jedoch aktivierend wirkt. Immer wenn beispielsweise Gen C aktiv ist, ist Gen D abgeschaltet und umgekehrt (siehe Dia-





Lectron



gramm). Das »Aktivsein« läuft bei unserem Aufbau im Uhrzeigersinn herum.

Bei längerer genauerer Beobachtung bemerken wir allerdings, dass die Phasenlage der Ausgangssignale von Gen C und Gen D nicht konstant ist, sondern leicht schwankt. Es kommt beispielsweise vor, dass kurzzeitig beide roten Leuchtdioden leuchten oder beide dunkel sind, im nächsten Zyklus dann aber wieder gleichzeitig an- bzw. abschalten. Man hat den Eindruck, dass wohl auf Grund von nicht zu vermeidenden Toleranzen die beiden Signale leicht voneinander weg driften, aber stets wieder syn-

chronisiert werden.

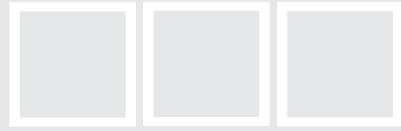
Wir gehen jetzt einen Schritt weiter und schalten die Gene X und Y manuell mit dem Schalter ab, weil uns wahrscheinlich bisher sowieso nicht recht klar geworden ist, wozu sie eigentlich gut sind. Das Abschalten geschieht am besten nacheinander, und zwar dann, wenn sie ohnehin nicht aktiv sind.

Erwartungsgemäß läuft das Aktivmuster weiter im Uhrzeigersinn herum und wir sind vielleicht geneigt, die beiden Gene für überflüssig zu halten. Merkwürdig ist nur, dass wir in vorherigen Versuchen herausgefunden hatten, eine auf diese Art

und Weise gekoppelte Ringstruktur muss eine ungerade Anzahl von Zellen haben, damit die Oszillation nicht zum Erliegen kommt. Und das stimmt auch weiterhin, denn nach einigem Warten ist es soweit: Alle Gene sind abgeschaltet und es oszilliert nichts mehr. Übertragen auf das Biologische ist es wohl doch so, dass gerade dieser Typ von *coherent feed-forward loop* entscheidend zur Stabilität der Kopplung und zur sicheren Informationsübertragung beiträgt. Es ist dann auch keine Überraschung mehr, wenn Untersuchungen zeigen, dass er der weitaus häufigste ist.

Lectron





4. Gen-Netze lebender Zellen

Zwischenbemerkung

In den bisherigen Versuchen haben wir die Eigenschaften des Gen-Bausteins kennengelernt und das Zusammenspiel von mehreren Bausteinen erforscht. »Aber wo ist denn dann die Biologie?« werden Sie vielleicht fragen. Gut, es gab hier und da einen kleinen Schaltkreis, der einmal in einem Bakterium funktioniert hat. Aber dieser LECTRON-Baukasten heißt immerhin »Gen-Regulation« und spielt dabei auf die Regulation unserer Lebensvorgänge an.

Wir wollen uns deshalb mit den folgenden Versuchen auf einen Streifzug entlang von Gen-Netzen lebender Zellen und Organismen begeben. Genauer gesagt werden wir mit unseren Bausteinen nun etwas einigermaßen Verrücktes versuchen: Wir

werden echte Regulationsnetze nachbauen, die Molekularbiologen in lebenden Zellen gefunden haben! Dass unser Nachbau auf dem Versuchstisch zum Leben erwacht, brauchen wir dabei nicht zu erwarten: Viel zu groß ist unser Unwissen über lebende Materie noch, und überhaupt gehören Fragen künstlichen Lebens in das Metier der Philosophie. Das gesamte Regulationsnetz unserer Zellen ist riesig und immer noch weitgehend unbekannt: nur sehr kleine Teile davon sind überhaupt vollständig bekannt. Solche kleinen, gut bekannten Teile der Zellsteuerung echter Zellen allerdings eignen sich hervorragend, um daran die Eigenarten der Zellsteuerung zu erkunden. Für diesen Experimentierkasten haben wir einige echte Pretiosen solcher kleinen Netze ausgewählt, die im Detail bekannt sind. Sie steuern so verschiedene Lebensphänomene wie die Zellteilung, die frühe Embryonalentwicklung eines Mehrzellers, bis hin zur Meta-

morphose von Zelltypen, nebst Differenzierung von Stammzellen und der erst kürzlich entdeckten Möglichkeit der Rückprogrammierung differenzierter Zellen in Stammzellen.

Unser erstes Beispiel wird ein Gen-Schaltkreis sein, der die Zellteilung der Bier- und Bäckerhefe steuert, eines nicht unbedeutenden Vorgangs also. Diese Steuerungsaufgabe ist komplizierter als die bisher aufgebauten Schaltungen und ist ungefähr so komplex wie das Waschprogramm einer modernen Wasch- oder Spülmaschine. Die Hefezelle muss also immerhin die Intelligenz einer Waschmaschine aufbringen, um sich zu vermehren. Nun, die Frage ob das Tun einer Zelle »intelligent« ist wollen wir hier nicht vertiefen. Wohl aber wollen wir uns die Informationsverarbeitung einer Hefezelle einmal in Aktion anschauen und bauen dazu im nun folgenden Versuch das erste Hefe-Netz aus Gen-Bausteinen auf.

Versuch 27

Simulationsmodell der Bäckerhefe

In diesem Versuch wollen wir den Teil des biochemischen Regulationsnetzes der Bäcker- oder Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nachbauen, der für die Steuerung der Zellteilung, also der Vermehrung der Hefezelle zuständig ist [12].

Hefen sind in unserer Umwelt allgegenwärtig; überall wo vergärbare, zuckerreiche Säfte frei werden, findet man auch die verschiedensten Arten von Hefe. Sie gehören zur Familie der Pilze, ihre Zellen haben einen Kern, sind also sogenannte Eukaryoten. Wegen ihres kleinen Genoms und der kleinen Zahl von Chromosomen sowie der geringen Verdopplungszeit von 90 Minuten ist die Bäckerhefe so etwas wie ein Modellorganismus für die Forscher geworden, die sich mit Molekulargenetik beschäftigen. Die Hefe war der erste Eukaryot, dessen Genom komplett im Rahmen des Genomprojekts entschlüsselt wurde.

Der Vermehrungszyklus der Bäckerhefe ist sehr gut bekannt und dient häufig als Lehrbuchbeispiel für die Zellteilung. Sein Steuerungsmechanismus ist

ebenfalls gut bekannt, es ist ein kleines Netz aus chemischen Reaktionen, das den Taktgeber für die verschiedenen Phasen der Zellteilung darstellt. Dieses biochemische Netz aus Proteinen und deren Genen lässt sich sogar mathematisch präzise modellieren, über gekoppelte Differentialgleichungen, die dann den zeitlichen Verlauf der Konzentrationen der biochemischen Mitspieler vorhersagen. In solche wissenschaftlichen Tiefen wollen wir mit unserem Modell gar nicht vordringen. Im Gegenteil machen wir uns die Beobachtung zunutze, dass die Proteinkonzentrationen meist entweder sehr groß oder nahe Null sind und die Wechsel zwischen diesen Extremen recht schnell passieren. Das klingt fast danach, als könnten wir diese Zustände als binäre Zustände, also 0 oder 1, darstellen, nicht wahr? Wenn wir uns dann noch auf die wichtigsten Proteine beschränken (und solche mit ähnlicher Dynamik zu jeweils einem Knoten zusammenfassen), landen wir bei einem Netz-Modell, das elf Proteine und die zugehörigen Gene als binäre Knoten darstellt, bei denen die Knoten jeweils zwei verschiedene Zustände, 0 oder 1, haben. Die jeweiligen Zustände eines Gens hängen von den Signalen ab, die es von

den Proteinen anderer Genen als Eingangssignale erhält. Auch hier vernachlässigen wir die Details der biochemischen Reaktionsstärke (da die Proteinkonzentrationen ja häufig in den zwei Extremzuständen sind) und unterscheiden lediglich zwischen aktivierenden Signalen (+) und hemmenden Signalen (-), die allenfalls mit kleinen ganzen Zahlen, z.B. 1 oder 2 gewichtet sind. Die Signale werden rückwirkungsfrei abgegeben, es gibt also eine definierte Signalflussrichtung; sie wird durch einen Pfeil angegeben. Das dynamische Verhalten des Netzes, also das »Blinkmuster« der Gen-Aktivitäten, ergibt sich dadurch, dass sich für jedes Gen der jeweils nächste zeitliche Zustand aus den Signalen ergibt, die es von den anderen Genen empfängt. Die dynamischen Regeln kann man etwa so zusammenfassen: Jeder Knoten S_i hat zwei verschiedene mögliche Zustände, $S_i = 0$ (deaktiv) oder $S_i = 1$ (aktiv). Wenn ein Knoten aktiv ist, kann er alle Knoten, die an ihn angeschlossen sind, beeinflussen. Die Verbindungen zu den angeschlossenen Knoten können aktivierend sein ($a_{ij} > 0$) oder hemmend ($a_{ij} < 0$). Jeder Zielknoten j summiert diese Gewichte a_{ij} vorzeichengerecht auf und reagiert seinerseits etwas verzögert mit Aktivi-



tät oder Deaktivität je nachdem, ob die Summe $\sum a_{ij}$ mindestens seine vorhandene (einstellbare) Schwelle Th_j erreicht oder darunter bleibt. Das klingt zunächst vielleicht etwas kompliziert, ist aber ganz einfach, wie ein Beispiel (Skizze dazu auf folgender Seite) zeigen soll:

Zum Zeitpunkt t erhält der Zielknoten S_5 ($j = 5$) mit der Schwelle $Th_5 = +1$, der mit den Knoten S_1 bis S_4 ($i = 1, 2, 3, 4$) verbunden ist, folgende gewichtete Eingangssignale:

$a_{15} = 0$, $a_{25} = +2$, $a_{35} = -1$, $a_{45} = +1$. Die Summe $\sum a_{i5} = 0 + 2 - 1 + 1 = 2$ ist größer als $Th_5 = +1$, der Zielknoten S_5 wird also aktiviert (oder bleibt aktiviert, wenn er es vorher bereits war) und gibt seinerseits nach der Verzögerungszeit Δt zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ ein Ausgangssignal $S_5 = 1$ ab, welches gewichtet wieder andere Knoten aktivieren oder deaktivieren kann.

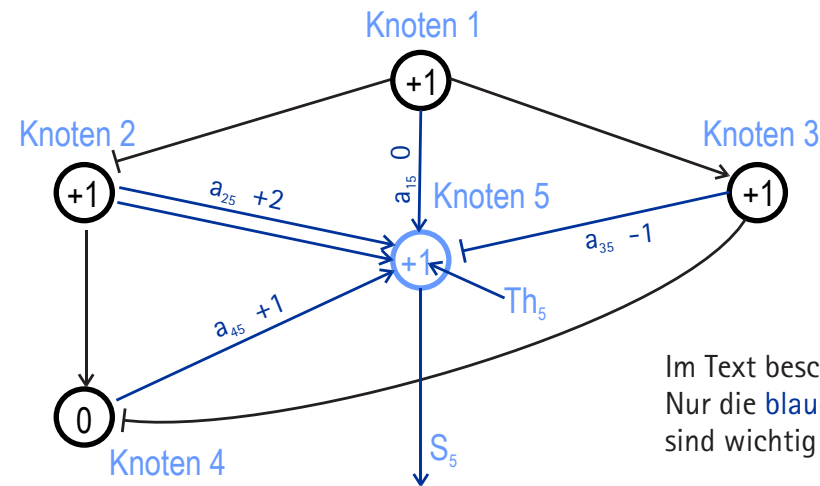
Wäre die Schwelle Th_5 nicht erreicht worden, weil beispielsweise $a_{25} = 0$ war, so wäre der Knoten S_5 zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ deaktiviert worden ($S_5 = 0$) und hätte erst einmal keine angeschlossenen Knoten beeinflussen können.

Die gegenwärtigen Zustände (Zeitpunkt t) aller Knoten, die Signale an Knoten S_5 liefern, mit ihm also verbunden sind, bestimmen somit den Zustand des Kno-

tens S_5 im nächsten Zeit-Schritt ($t + \Delta t$).

Bei den Genen kennen wir zwei verschiedene Typen, die sich in ihrem Verhalten darin unterscheiden, wenn sie kein Eingangssignal mehr bekommen, die Summe aller Eingangssignale also 0 ist. Der eine Typ gibt dann weiter das Signal ab, das er vorher abgegeben hat, während der andere nichts mehr abgibt, also inaktiv wird. Das erste Verhalten wird bei den Gen-Bausteinen über die **bistabile**, während das zweite über die normale Schwelleneinstellung berücksichtigt wird.

Man beachte weiter, dass es keinerlei zentralen Taktsignale gibt, das Verhalten des ganzen Netzes hängt von den bekannten Verbindungen aktivieren-



Im Text beschriebenes Beispiel
Nur die **blauen** Linien und Ziffern
sind wichtig

der oder hemmender Art zwischen den Genen, den eingestellten Schwellen und den gewählten Zeitverzögerungen Δt (RC und Hysterese) ab.

Unser Hefe-Modell besteht zunächst aus - wie bereits erwähnt - 11 Knoten, die rund 20 zentrale Gene des Bäckerhefen-Netztes repräsentieren. Damit ist der Kern des Gen-Regulierungsmechanismus dargestellt. Jeder Knoten ist mit anderen bestimmten Knoten verbunden und stellt so die Wirkungsmöglichkeiten der korrespondierenden Gene und Proteine dar.

In der folgenden Tabelle sind die Gene mit ihren Namen **Cln3**, **SBF**, **MBF**, usw. links und oben mit ihren Verbindungen untereinander aufgeführt.

Lectron

| zu ↓ von → | Start | Cln3 | SBF | MBF | Cln1,2 | Sic1 | Clb5,6 | Cdh1 | Clb1,2 | Mcm1 | Cdc20/14 | Swi5 | Schwelle |
|------------|-------|------|-----|-----|--------|------|--------|------|--------|------|----------|------|----------|
| Start | 0 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | -1 | 0 |
| Cln3 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| SBF | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | +1b |
| MBF | 0 | +1 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | +1b |
| Cln1,2 | 0 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| Sic1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 | -1 | 0 | -1 | 0 | +1 | +1 | +1b |
| Clb5,6 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0 | -1 | +1 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | +1b |
| Cdh1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | +1 | -1 | 0 | +1 | 0 | +1b |
| Clb1,2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 | -1 | +1 | +1 | -1 | 0 | +1b |
| Mcm1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| Cdc20/14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | +1 |
| Swi5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 | +1 | 0 | +1 |

Zwar sind bei der Zellteilung der Hefe viele hundert Gene beteiligt, für die zentrale Regulation und Steuerung sind aber nur diese elf verantwortlich. In der Tabelle ist ein zusätzliches »Gen« mit dem Namen Start eingefügt, das lediglich dazu dient, nach dem Durchlaufen der Simulation automatisch eine neue zu starten; wir brauchen sie dann nicht manuell auszulösen, sie läuft periodisch ab. In der Natur wird dieses Startsignal durch den Wachstumsprozess der Hefezelle ausgelöst, wenn die Zelle eine genügende Größe erreicht hat.

In der Tabelle bedeutet -1 in einer Spalte ein hemmendes Signal mit dem Gewicht 1, +1 ist ein aktivierendes Signal ebenfalls mit dem Gewicht 1. Andere Gewichte als +1 und -1 kommen in diesem Beispiel zunächst nicht vor. In der letzten Spalte »Schwelle« ist die für das zugehörige Gen gefundene Schwelle angegeben, die von der Summe aller empfangenen Signale erreicht werden muss, damit das Gen seinerseits aktiv wird. Bis auf das Start-Gen sind alle Schwellen +1, wobei das zusätzliche **b** bistabil bedeutet.



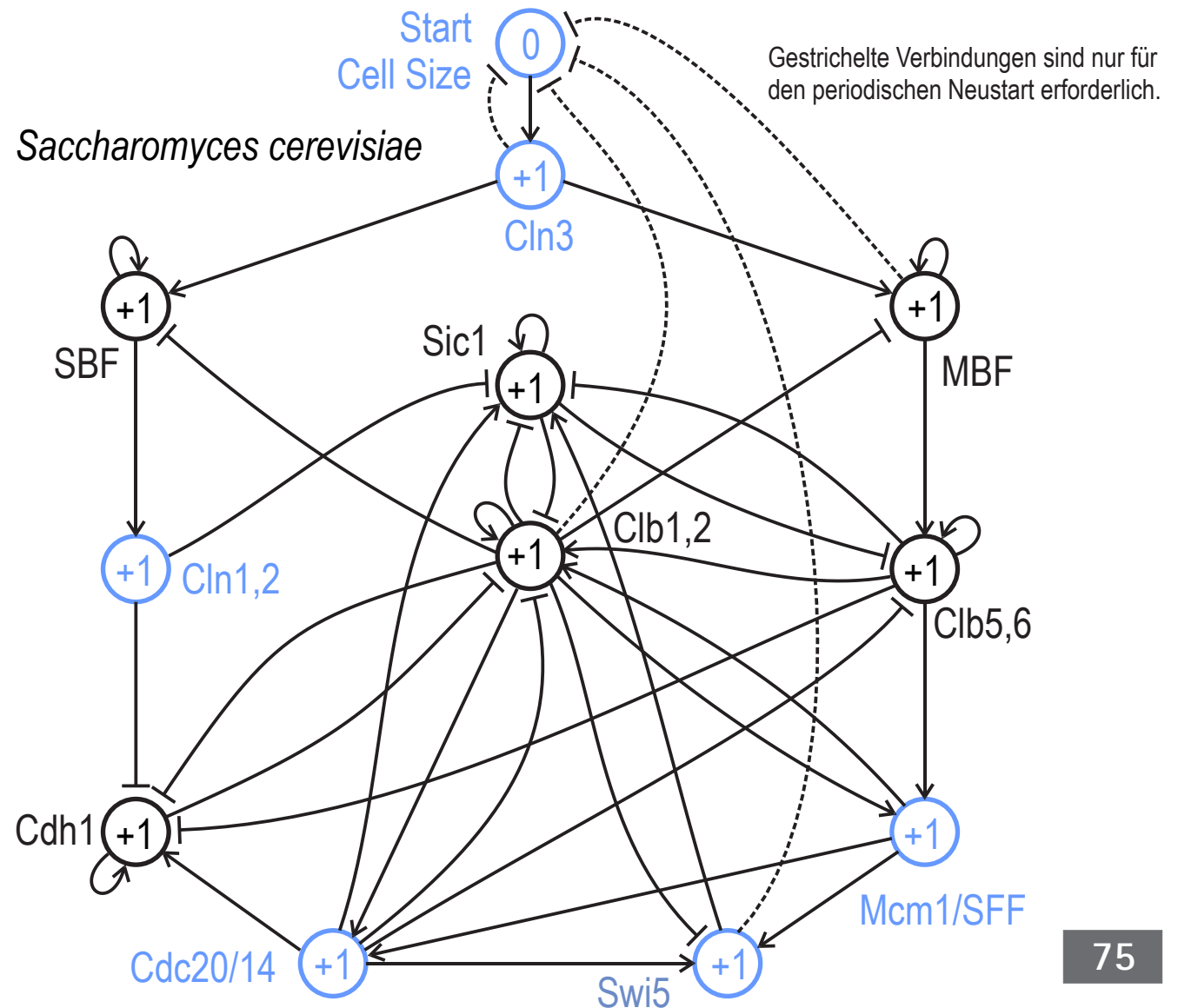
Aus der vorstehenden Tabelle erhalten wir die Verbindungsliste für den Aufbau. Damit dieser für uns leichter wird, ist sie in der nebenstehenden Abbildung erst einmal graphisch umgesetzt:

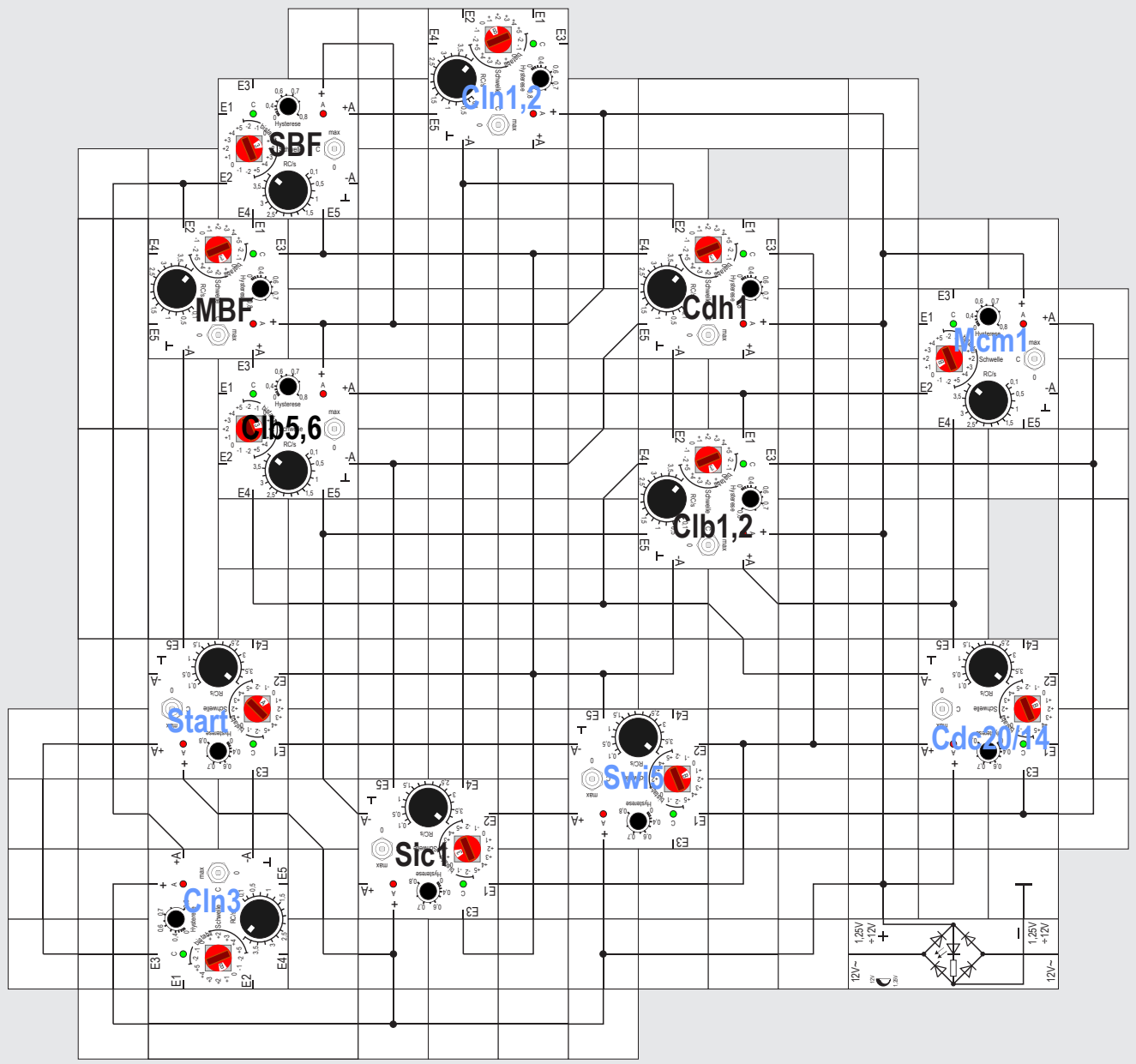
Die Kreise sind die einzelnen Gene mit ihrem Namen, die Ziffer in den Kreisen ist ihre Schwelle. Die Signalflussrichtung ist mit einem Pfeil für aktivierende Signale angegeben. Handelt es sich um ein hemmendes Signal, steht statt der Pfeilspitze ein kleiner Querbalken beim Empfänger. Bistabile Gene haben zusätzlich eine kleine Schleife und sind schwarz gezeichnet, normale haben diese nicht und sind zusätzlich blau dargestellt.

Ein Verbindungsbeispiel, letzte Zeile **Swi5** der Tabelle, geht dann so:

Swi5 hat die Schwelle +1, hat also einen blauen Kreis mit +1, erhält von **Clb1,2** ein hemmendes und von **Mcm1** und **Cdc20/14** jeweils ein aktivierendes Signal. Selbst gibt es ein hemmendes Signal an **Start** und ein aktivierendes Signal an **Sic1** ab. Beide Signale sind in der vorletzten Spalte der Tabelle mit -1 bzw. +1 unter **Swi5** aufgeführt.

Ein möglicher kompakter Aufbau mit bereits auf gleiche Verzögerungszeit (Hyst=0,8 RC = 4,5s) und korrekte Schwelle eingestellten Gen-Bausteinen ist hiervon ausgehend auf der nächsten Seite zu finden.







Lectron

Bevor wir den Netzbaustein an den Aufbau anlegen, kontrollieren wir noch einmal sorgfältig, ob auch tatsächlich alles richtig verbunden wurde. **Auf keinen Fall sollten Ausgänge +A und -A mit der Versorgungsspannung und auch untereinander verbunden sein, da sonst irreparable Schäden an den Gen-Bausteinen auftreten.** Eine Kontrolle, ob alle Kapazitätsschalter in Stellung C stehen, ist ebenfalls zweckmäßig; der gewünschte Ablauf kommt sonst wahrscheinlich nicht zustande. Und noch eine letzte Vorbemerkung: Bei großen Aufbauten wie diesem wird der Bodenmagnet des Netzteilbausteins,

der auch als Kühlkörper fungiert, recht warm (>50°C), was normal ist. Deswegen sollte er auch immer mit der Aufbauplatte in gutem Kontakt stehen, damit er die Verlustwärme an sie weiterleiten kann.

Nun aber wollen wir loslegen:

Nach Anlegen der Versorgungsspannung sollte die Simulation des (Teilungs-) Zellzyklus selbsttätig anlaufen. Und zwar geht zunächst die grüne LED des **Start** Gen-Bausteins an, kurze Zeit später dann seine rote, so dass als Folge **CIn3** aktiviert wird. Diese Folge ist auch noch leicht in dem Verbindungsplan erkennbar. Auch dass da-

nach **SBF** und **MBF** aktiviert werden, während **Start** wieder abgeschaltet wird, können wir noch erkennen. Danach wird es bereits schwierig, lediglich anhand des Verbindungsplans etwas vorherzusagen. Die nebenstehende Tabelle hilft uns allerdings weiter. Mit 1 gibt sie an, welches Gen aktiv und mit 0 welches inaktiv ist. Änderungen in den Zeitschritten sind rot markiert.

Der zusätzlich eingebaute Gen-Baustein »Start« ist ebenfalls mit aufgenommen, aber mit dünner Schrift von den anderen unterschieden.

Beim allerersten Durchlauf sind **Cdh1** und **Sic1** auch noch nicht 1, also nicht aktiv. Wir können das ändern, indem die Umschalter an den entsprechenden Bausteinen ganz kurz auf »max« und wieder zurück auf »C« geschaltet werden, brauchen es aber nicht zu tun; die Simulation kommt auch so in Gang und beim zweiten Umlauf stimmt dann alles mit der Tabelle überein.

An dieser Stelle noch der Tipp: Sollte die Simulation anders oder gar nicht durchlaufen, ist eine Fehlersuche unumgänglich. Wahrscheinlich ist die Verdrahtung dann fehlerhaft und muss sorgfältig kontrolliert werden. Ob jeder Baustein an die Versorgungsspannung angeschlossen ist, erkennen wir leicht, indem wir alle Umschalter auf »max« schalten. Alle roten Leuchtdioden müssen dann leuchten. Nicht vergessen wieder auf »C« zurückzuschalten.

Aus der Tabelle geht nicht hervor, wie lange sich ein

| Zeit | Start | CIn3 | MBF | SBF | CIn1,2 | Cdh1 | Swi5 | Cdc20/14 | Clb5,6 | Sic1 | Clb1,2 | Mcm1 | Phase |
|------|-------|------|-----|-----|--------|------|------|----------|--------|------|--------|------|-------|
| 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Start |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Start |
| 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | G1 |
| 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | G1 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | G1 |
| 5 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | S |
| 6 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | G2 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | M |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | M |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | M |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | M |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | M |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | G1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | G1 |

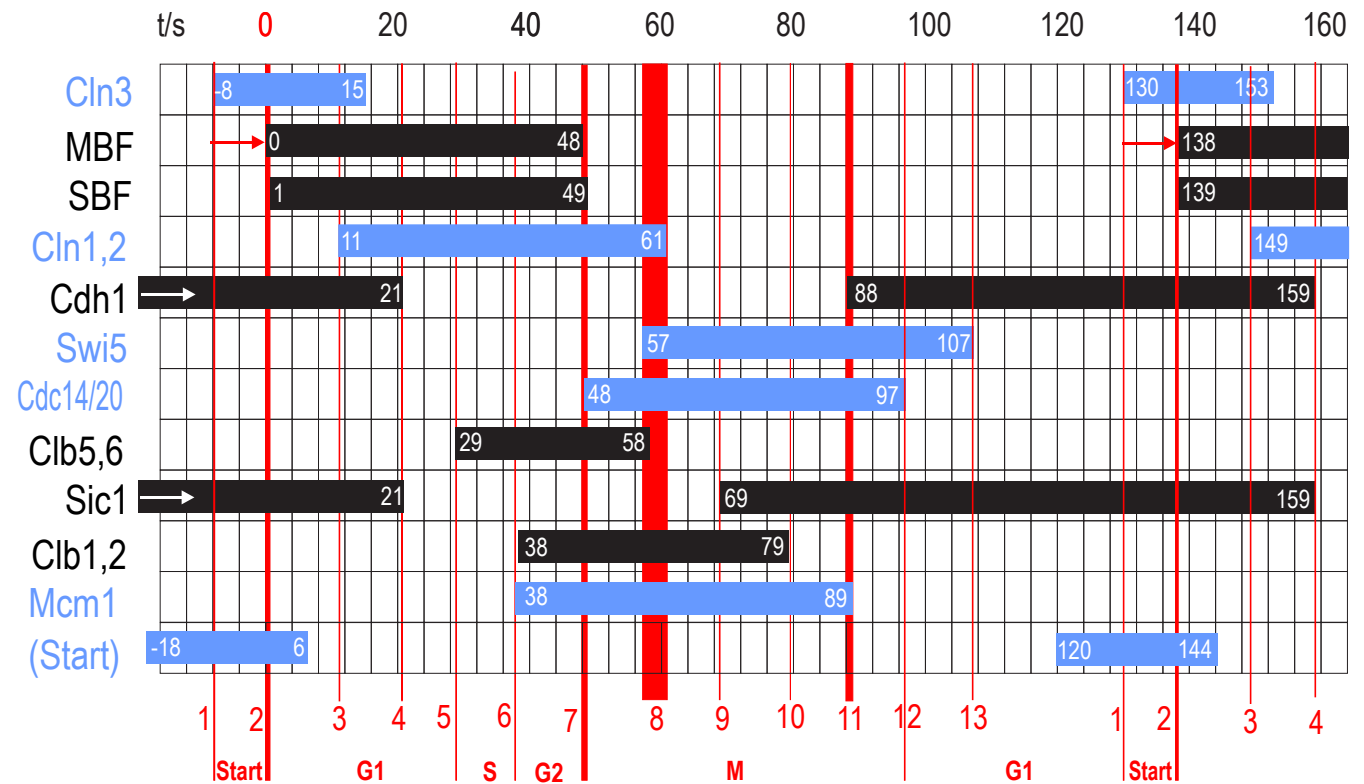
Lectron

Gen-Baustein in seiner aktiven oder passiven Phase befindet. Das bekommen wir heraus, wenn wir einen Durchlauf z.B. mit der Digitalkamera filmen und uns anschließend die Zeiten anschauen, zu denen die rote LED der jeweiligen Gen-Bausteine leuchtet. Es ergibt sich dann beispielsweise das nebenstehende Diagramm.

Das Diagramm zeigt einen möglichen zeitlichen Ablauf der Simulation, wenn periodisch gestartet wird. Wie die obere Zeitskala angibt, dauert in diesem Beispiel ein vollständiger Durchlauf 138 Sekunden. Die einzelnen Zeitschritte aus der vorstehenden Tabelle sind unten rot angegeben und mit roten senkrechten Balken voneinander getrennt. Diese Balken sind unterschiedlich dick, was daher rührt, dass bei unserer ersten RC-Einstellung der einzelnen Bausteine mehrere nicht exakt gleichzeitig ihre Aktivität ändern. Speziell bei Zeitschritt 8, wenn so etwas passiert, entsteht ein Übergangsbereich. Mit einem erneuten Feinabgleich (RC und Hysterese vorsichtig verändern) können wir versuchen, die Balken möglichst schmal zu machen.

Die letzte Spalte der vorstehenden Tabelle gibt uns die vier Phasen G1, S, G2 und M an, welche der Zellzyklus in eukaryotischen Zellen in dieser Reihenfolge durchläuft:

Die Verdopplung der DNA in der Synthese- oder S-Phase findet zeitlich getrennt von der Verteilung

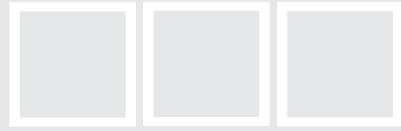


blau selbstabbauend

schwarz bistabil

alle Schwellen auf +1 (bis auf Start = 0); Hyst = 0,8 ; RC = 4,5s
Periode 138s

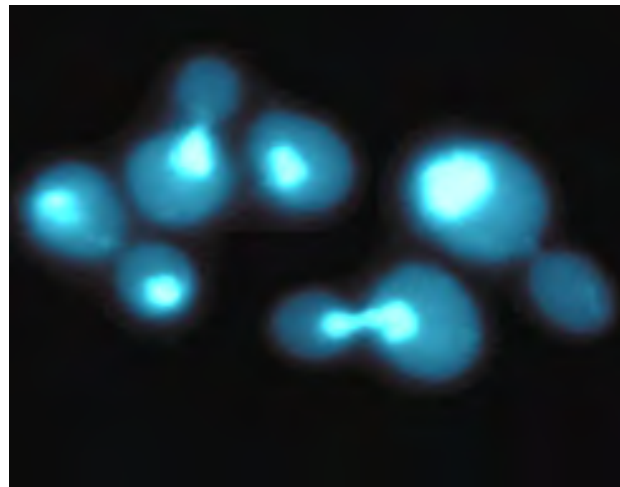
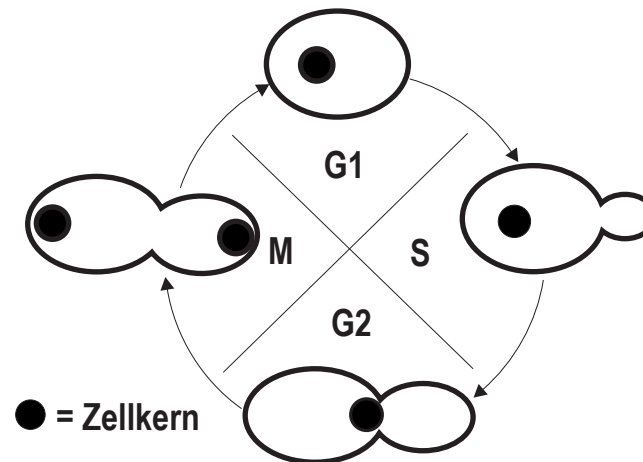
G1: Die Zelle wächst und beginnt sich zu teilen.
S: DNA wird hergestellt und die Chromosomen werden kopiert
G2: Lücken Phase
M Chromosomen werden getrennt und die Zelle teilt sich, die Prozessschritte der Mitose finden statt
Am Ende der M Phase geht die Zelle in die G1 Phase und der Zyklus ist vollendet.
G1, S, G2 bilden die sog. Zwischenphase.



auf die beiden Tochterzellen statt, die in der Mitose während der M-Phase stattfindet. Diese beiden Zellzyklus-Phasen werden durch dazwischen geschaltete Zwischenphasen oder so genannte Gap-Phasen getrennt. Die Gap-Phasen G1 und G2 ermöglichen eine Kontrolle, ob eine vorhergehende Zellzyklus-Phase auch korrekt abgeschlossen wurde und keine Schädigung der genetischen Information vorliegt. In der ersten Gap-Phase G1 entscheidet die Zelle zudem auch über den Beginn einer weiteren Zellteilung.

Dem Zeitdiagramm können wir entnehmen, welches Gen zu welcher Phase aktiv ist. Damit die Verbindung zwischen Simulation und Realität für uns deutlicher wird, ist sowohl eine Skizze als auch ein Foto der Hefezelle im jeweiligen Stadium angegeben.

Wenn die Simulation wunschgemäß abläuft und wir uns mit dem regulären Ablauf vertraut gemacht haben, können wir Veränderungen am Simulationsmodell vornehmen: Änderungen an den Zeiteinstellungen führen meistens zu längeren Übergangsbereichen, können aber auch den regulären

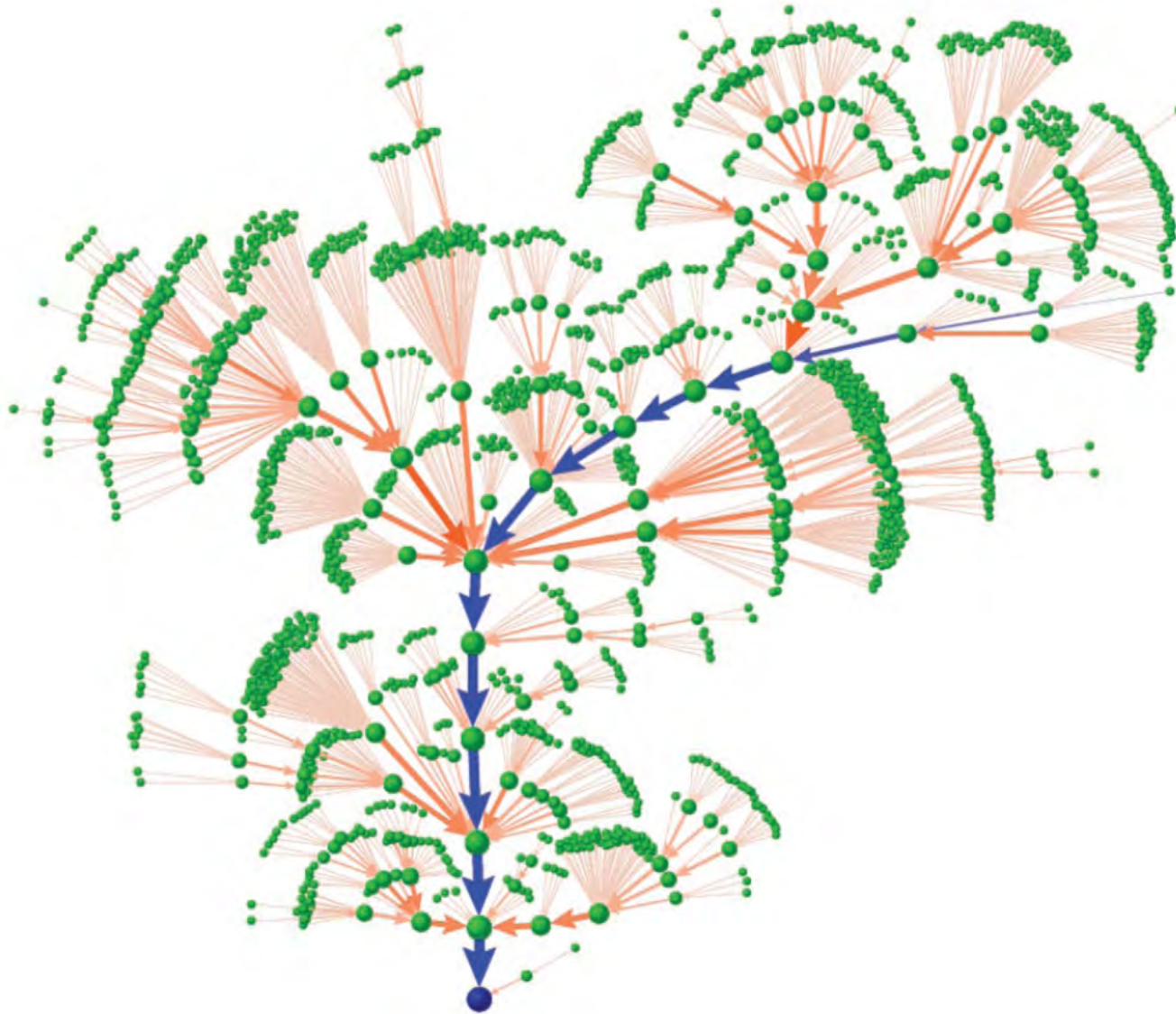


Ablauf empfindlich stören.

Wir können aber noch stärker in die Simulation eingreifen und einzelne Gene / Bausteine abschalten, in einer echten Zelle würde das einer Gen-Mutation entsprechen. Wenn wir den zugehörigen Umschalter auf »0« stellen, entspricht dies einer sogenannten Knockout-Mutante. Auf den biologischen Prozeß übertragen bedeutet dies, daß das dem jeweiligen Gen entsprechende Protein nicht mehr produziert wird. Auch das Umgekehrte ist möglich zu simulieren, nämlich die andauernde Produktion eines Proteins. Hierzu müssen wir den Umschalter an dem entsprechenden Gen-Baustein lediglich auf »max« stellen.

Derartige Mutanten und auch Mehrfach-Mutanten sind in der biologischen Forschung gut untersucht und es ist bekannt, bei welchen Mutationen eine lebensfähige Mutante entsteht und bei welchen der Teilungsprozeß zum Stillstand kommt und die Zelle sich nicht vermehren kann. In unserem Versuchsaufbau gelingt es leicht, für jedes dieser beiden Szenarien ein Beispiel zu finden.

Lectron



Der Attraktor im Simulationsmodell

Für die Simulation haben wir 11 Gen-Bausteine eingesetzt, wenn wir den Baustein für das **Start-Gen** nicht mitzählen; er kam ja nur dadurch ins Spiel, weil wir die Simulation periodisch durchlaufen lassen wollten. Wenn wir ihn stilllegen (Umschalter auf »0«), lässt sich die Simulation auch am Umschalter des **Cln3**-Bausteins manuell auslösen. Dessen Umschalter muss zum Starten dann kurzzeitig auf »max« gestellt werden. Die reguläre Simulation läuft dann einmalig durch. Wir können die Simulation aber auch mit anderen Anfangsbedingungen starten.

Da wir 11 Bausteine eingesetzt haben und jeder Baustein zwei Zustände (aktiv oder inaktiv) kennt, können wir insgesamt $2^{11} = 2048$ Zustände mit den Bausteinen unseres Aufbaus darstellen.

Beim normalen Durchlauf der Simulation kommen

lediglich 13 dieser Zustände vor, wie sie auch in der Tabelle mit den Zeitschritten angegeben sind. Stellen wir nun irgendeinen der möglichen Zustände manuell mit den entsprechenden Umschaltern an den Gen-Bausteinen ein und schalten schnell wieder alle in Stellung »C« zurück, so startet die Simulation aus dieser zufällig gewählten Anfangsstellung heraus. Täten wir dies für alle möglichen 2048 Startzustände und zeichneten den Verlauf der Folgezustände detailliert auf, so würden wir ein äußerst interessantes Ergebnis erhalten: 1764 (=86%) der Startzustände führen über Zwischenzustände zu einem der nur 13 Zustände, die beim regulären Verlauf durchlaufen werden.

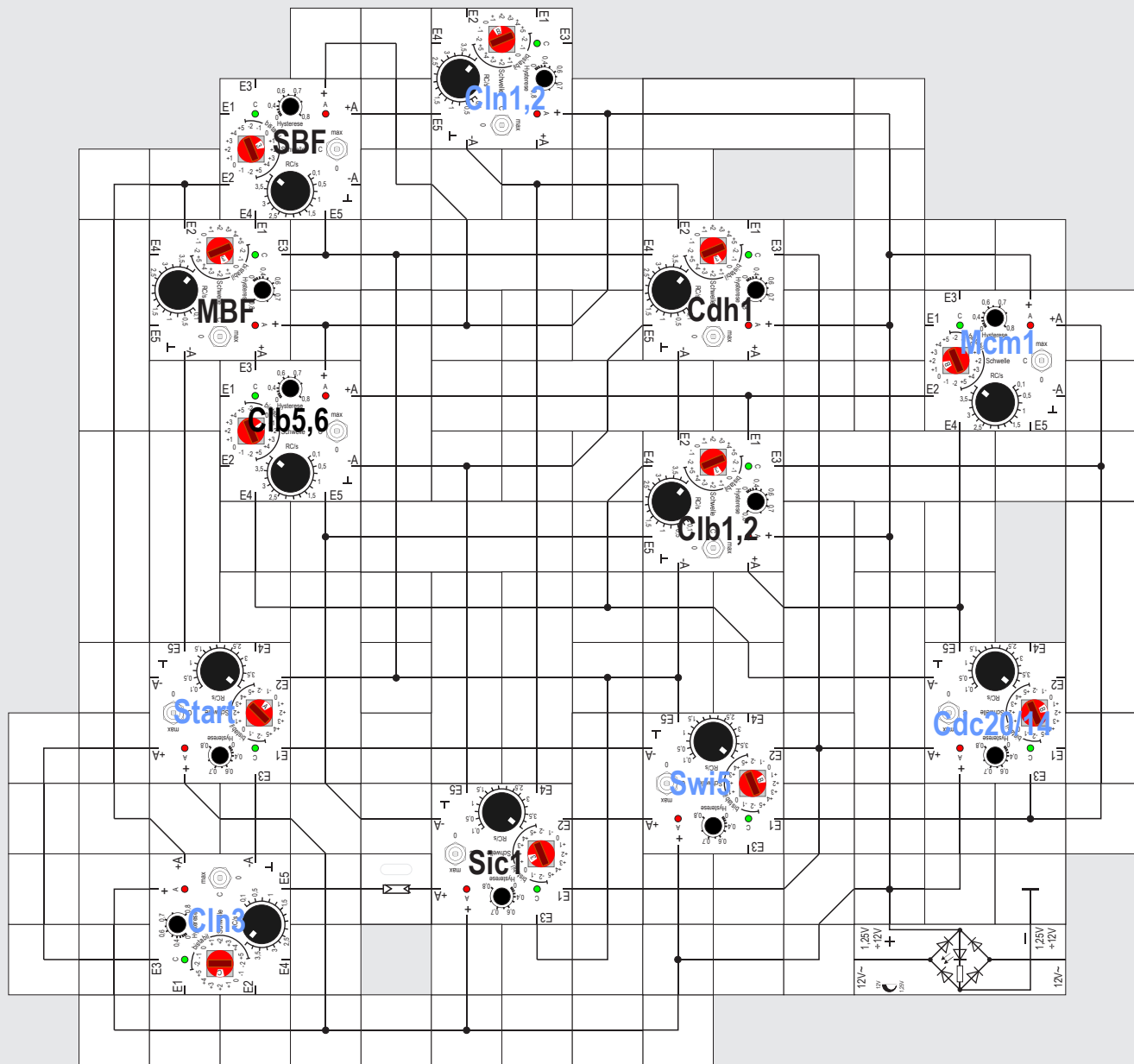
In dem obigen Bild ist dieser Ablaufbaum eindrucksvoll graphisch dargestellt. Ein Kreis steht für einen der 1764 Zustände, wobei die kleinen blauen 13 Kreise, die mit den blauen Pfeilen verbunden sind, den sogenannten Attraktor bilden. Ist der Attraktor erst einmal erreicht, wird er bis zum Ende, also bis zum G1-Zustand (blauer Punkt unten) durchlaufen. Führt man den automatischen Start wieder ein, wäre es (fast) egal, mit welchem Zustand unseres Simulationsnetzes wir starteten: Nach einem Durchlauf bewegte sich die Folge seiner Zustände auf dem Attraktor, der für die folgenden Durchläufe dann auch nicht mehr verlassen

würde. Sollte also durch eine Störung unser Netz einmal einen Zustand einnehmen, der nicht auf dem Attraktor liegt, so ist die Chance groß, dass seine Zustandsfolge dort wieder hingelangt und der nächste Zyklus wieder regulär abläuft.

Auf den biologischen Prozess bezogen bedeutet dies, dass der Teilungs-Zellzyklus der Bäckerhefe sehr robust gegen Störungen ist.

Man kann sich natürlich sofort fragen, ob das Auftreten eines derartigen starken Attraktors bei Netzen dieser Größe Zufall ist oder z.B. ein Werk der Evolution. Umfangreiche Untersuchungen an 1000 zufällig gewählten Netzen gleicher Komplexität, gleicher Verbindungszahl und gleichen Gen-Baustein-Einstellungen haben gezeigt, dass sie typischerweise kleinere Attraktoren haben. Die entsprechende Durchschnittsgröße beträgt ungefähr 40% aller Startzustände (verglichen mit 86%). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Größe des biologischen Attraktors optimiert ist, um zusätzliche dynamische Robustheit zu erhalten.

Wir beschließen unsere Betrachtungen über das Simulationsnetz der Bäckerhefe mit einer Versuchsanordnung, die den Teilungsprozess lichtabhängig macht und schauen uns dann als nächstes eine praktische Form der Feinjustierung unserer Bausteine an, bevor wir das Netz einer weiteren Hefe aufbauen.



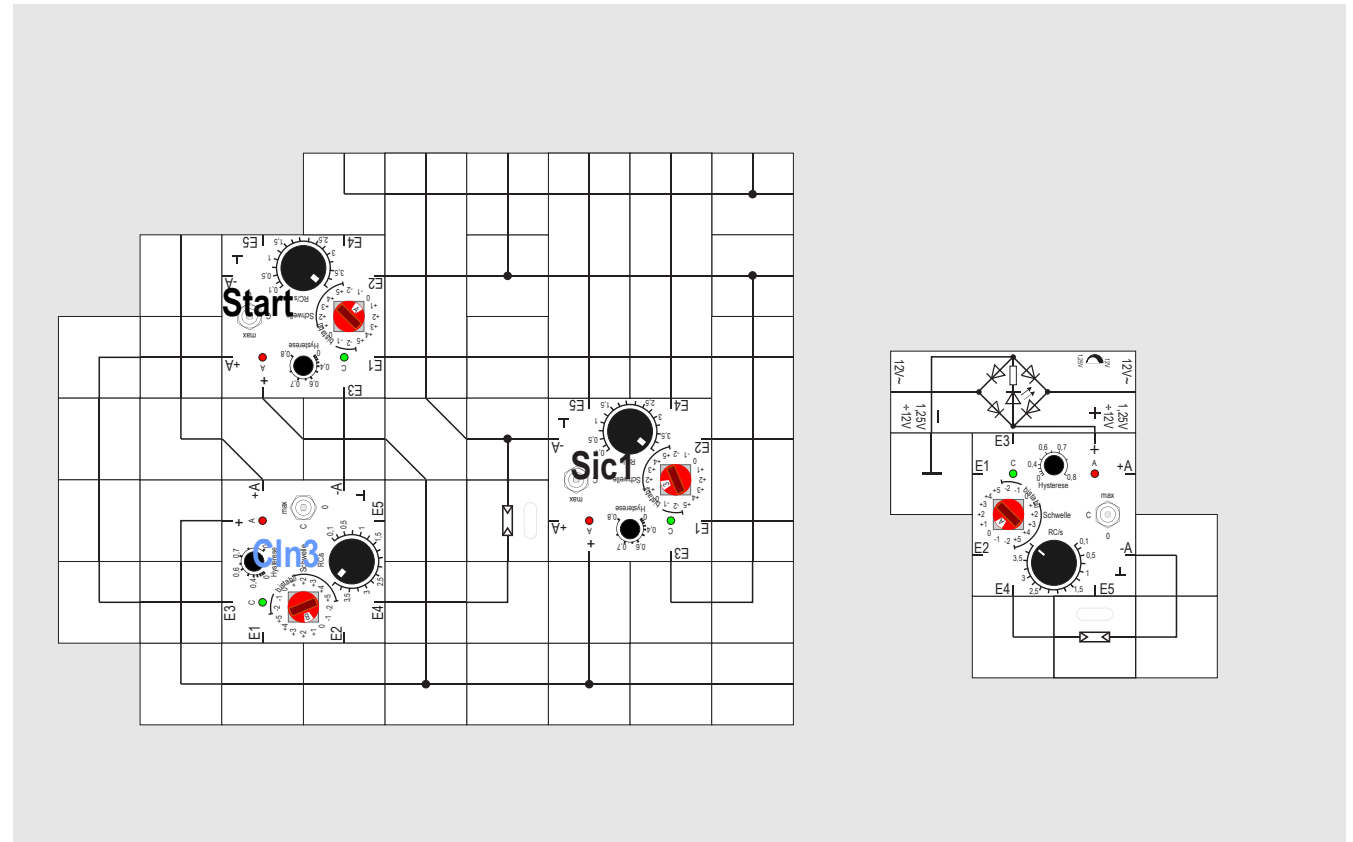


Versuch 28

Lichtabhängige Teilung bei der Bäckerhefe

Am Beispiel der Hefe wollen wir nun noch zeigen, wie wir mit einem einfachen Mittel lichtabhängige Vorgänge simulieren können. Durch Einfügen eines Fotowiderstands in den Aufbau können wir dafür sorgen, dass der periodische Neustart nur bei ausreichender Beleuchtung stattfindet. Der Fotowiderstand aus Cadmiumsulfid hat bei starker Beleuchtung einen Widerstand von circa 100Ω bis 500Ω und ist praktisch durchlässig, wenn er einen Ausgang eines Gen-Bausteins mit dem Eingang eines anderen verbindet. Abgedunkelt oder bei Dunkelheit wächst dieser Widerstand auf $10M\Omega$, was einer Unterbrechung der Leitung gleichkommt.

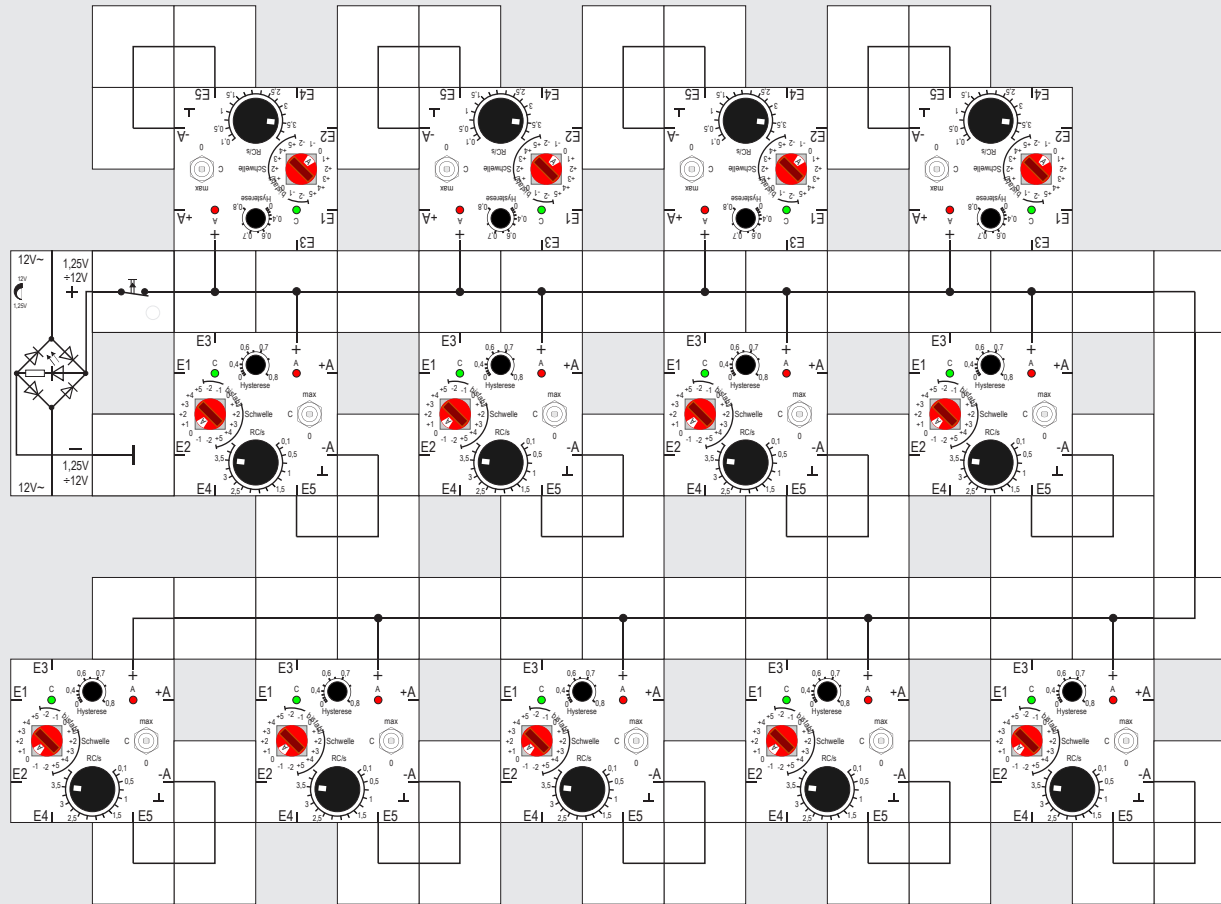
Schalten wir den +A - Ausgang von Sic1 über ihn an einen Eingang von Cln3 (Aufbau des Hefenetzes ist leicht abgeändert, damit das möglich wird) und erhöhen dessen Schwelle auf +2, so kann der Start nur erfolgen, wenn der Fotowiderstand ausreichend be-



leuchtet wird.

Der nebenstehende Ausschnitt aus dem Aufbau zeigt, dass durch eine kleine Schaltungsänderung auch das Gegenteil erreichbar ist. Jetzt startet die

Teilung nur, wenn es dunkel ist. Die Schwelle muss wieder auf +1 gestellt werden. Bei anderen Schaltungen wie dem Oszillator funktioniert das entsprechend (rechte Abbildung).





Versuch 29

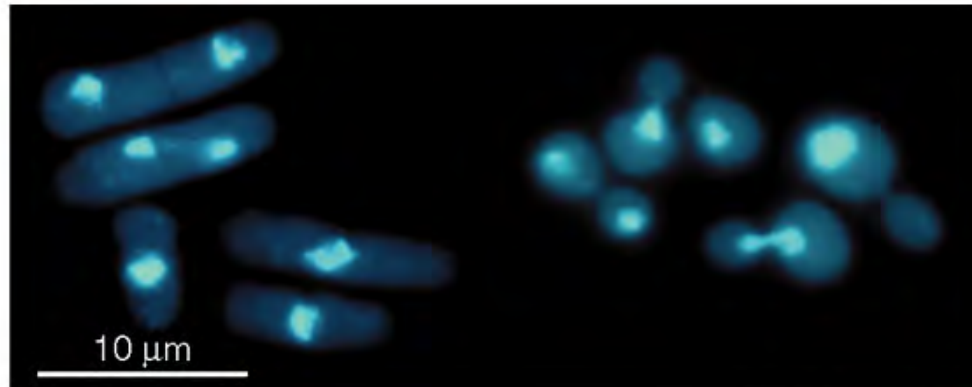
Feinabgleich der Verzögerung

Das große Hefe-Netz aus unserem letzten Versuch hat, wenn wir alles richtig aufgebaut haben, zumeist auf Anhieb die Aktivierungs- (»Blinkmuster«-) Muster der echten Hefezelle nachvollzogen – ohne große Feinjustierung! Das ist doch ganz erstaunlich, oder? Beim Aufbauplan des Simulationsmodells ist für jeden Gen-Baustein eine Grundeinstellung der Verzögerung angegeben, bei allen Bausteinen gleich. Wie sich herausgestellt hat war dies völlig ausreichend. Tatsächlich ist es eine Grundeigenschaft der biologischen Netze, die wir uns hier anschauen, dass sie sehr genügsam sind, was ihre Implementierung angeht: Sie brauchen keine Feinjustierung, im Gegenteil reicht es aus, wenn jedes Gen nur so ungefähr nachsimuliert wird. Im Grunde ist dies logisch, denn in der biochemischen Signalsuppe einer Zelle geht es ja noch weniger zimperlich zu. Und nicht zuletzt ist das Geheimnis dieses Lectron-Baukastens, daß unsere Simulationsmodelle diese Nachsicht der biologischen Schaltkreise ausnutzen.

Für manche Versuche möchte man jedoch ganz und gar identische Gen-Bausteine haben, die in ihrer Dynamik einander gleichen wie ein Ei dem anderen. Zum Beispiel, wenn wir beim unserer obigen Hefe-Simulation einen Zeitverlauf präzise aufnehmen möch-

ten, oder die asynchrone Dynamik von Schaltnetzen in Zeitlupe studieren möchten.

Nun haben die in den Gen-Bausteinen intern verwendeten Kondensatoren recht große Toleranzen (20%), so dass die Gen-Bausteine trotz gleicher Einstellung nicht genau gleichschnell arbeiten. Mit einem Feinabgleich können wir nach folgendem Rezept alle Bausteine auf den gleichen Stand bringen: Wir stellen dazu die angegebene Verzögerung und Hysterese ein und schalten alle gleichzeitig ein. Da alle Bausteine als Oszillator arbeiten, werden bei ihnen nach kurzer Zeit die roten Leuchtdioden aufleuchten, und zwar wegen der Toleranzen nacheinander. Als Referenz wählen wir einen Baustein, dessen Diode im »zeitlich mittleren« Bereich aufleuchtet und verändern vorsichtig die Zeitkonstanten (RC) der früher oder später aufleuchtenden in passender Weise. Danach schalten wir ab, warten ungefähr 10 Sekunden (Kondensatoren müssen sich entladen) und schalten wieder an. Die zeitlichen Unterschiede beim Aufleuchten der Dioden sollten jetzt kleiner oder Null geworden sein; sie können weiter verringert werden, wenn man mehrere Schwingungen der Oszillatoren zulässt, da sich die Toleranzen summieren und besser sichtbar werden. Auf diese Weise schaffen wir uns eine Grundeinstellung, bei der alle Gen-Bausteine identisch eingestellt sind.

Teilungs-
hefeBäcker-
hefe

Nature Reviews | Genetics

| zu ↓ von → | Start | SK | RUM1 | Wee1 | Ste9 | Cdc2/13 | Cdc25 | Cdc2/13* | Slp1 | PP | Schwelle |
|------------|-------|----|------|------|------|---------|-------|----------|------|----|----------|
| Start | 0 | -1 | 0 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 |
| SK | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| RUM1 | 0 | -1 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | +1 | +1b |
| Wee1 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1b |
| Ste9 | 0 | -1 | 0 | 0 | +1 | 0 | 0 | -1 | 0 | +1 | +1b |
| Cdc2/13 | 0 | 0 | -1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 |
| Cdc25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | -1 | +1b |
| Cdc2/13* | 0 | 0 | -1 | -1 | -1 | 0 | +1 | 0 | -1 | 0 | +1 |
| Slp1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0 | 0 | +1 |
| PP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | 0 | +1 |

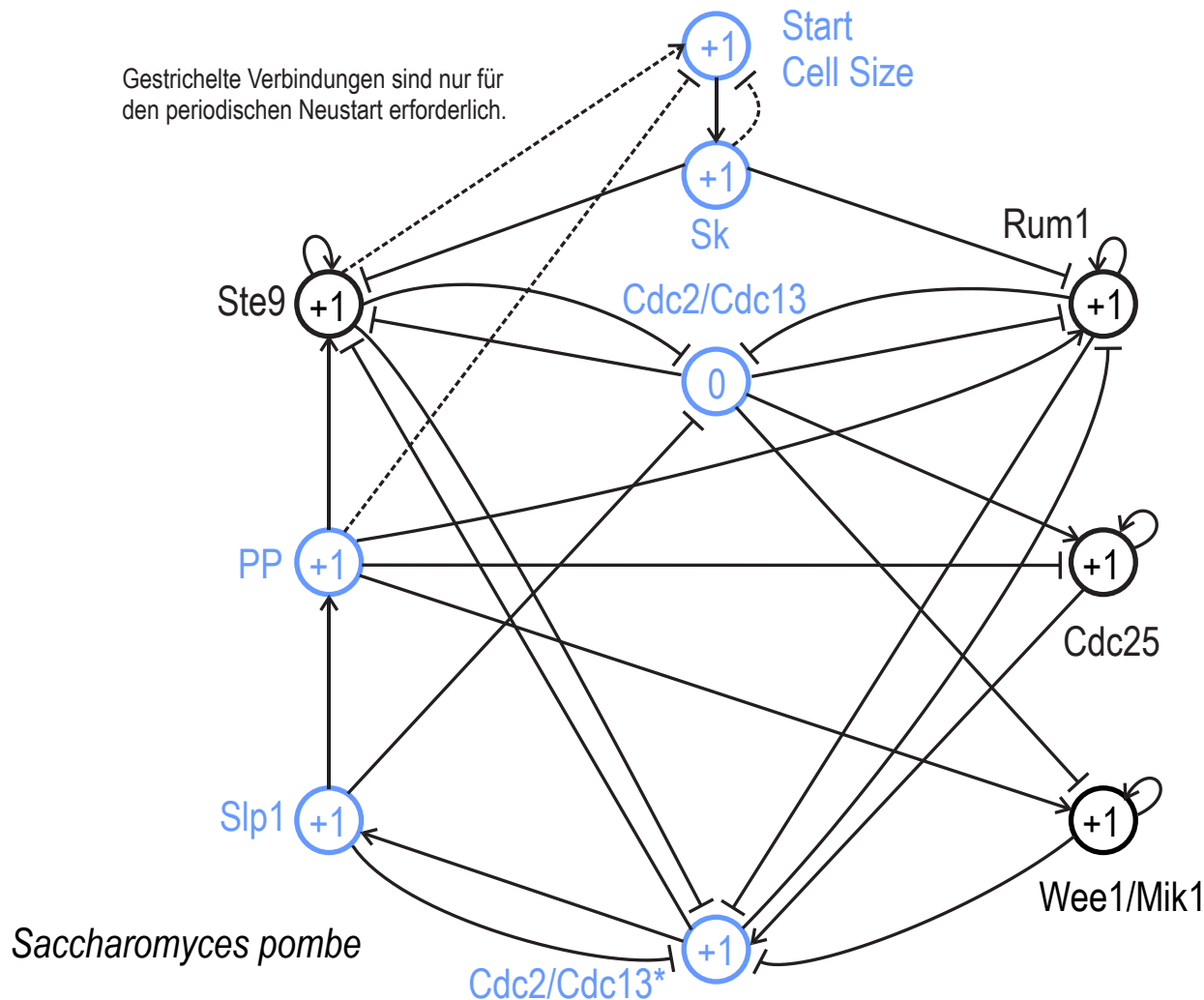
Versuch 30

Simulationsmodell der Teilungshefe

Die Teilungshefe *Saccharomyces pombe*, deren Vermehrungszyklus wir als nächstes simulieren wollen, ist eine Spalthefe (engl. *fission yeast*), d. h. ein Hefepilz, der sich nicht durch Sprossung (Knospung), sondern durch Teilung der Zelle in zwei Hälften vermehrt (siehe Abbildung) [13]. Es handelt sich um einen stäbchenförmigen einzelligen Eukaryoten, der in der Molekular- und Zellbiologie ebenfalls als Modellorganismus verwendet wird. Die Genom-DNA-Sequenz dieser Hefe wurde im Jahr 2002 veröffentlicht.

Die Tabelle zeigt, dass sie sich mit neun Gen-Bausteinen simulieren lässt. Hinzu kommt wieder ein Start-Gen Baustein, damit das Ganze periodisch ablaufen kann. Wie bei der ersten Hefe sind die Gewichte der Signale wieder nur +1 oder -1. Auch die Schwellen sind ähnlich.

Damit uns der Aufbau mit den Gen- und Verbindungsbausteinen leichter fällt, setzen wir die Matrix aus der Tabelle zunächst erst einmal wieder in eine Graphik um. Sie befindet sich auf der nächsten Seite.



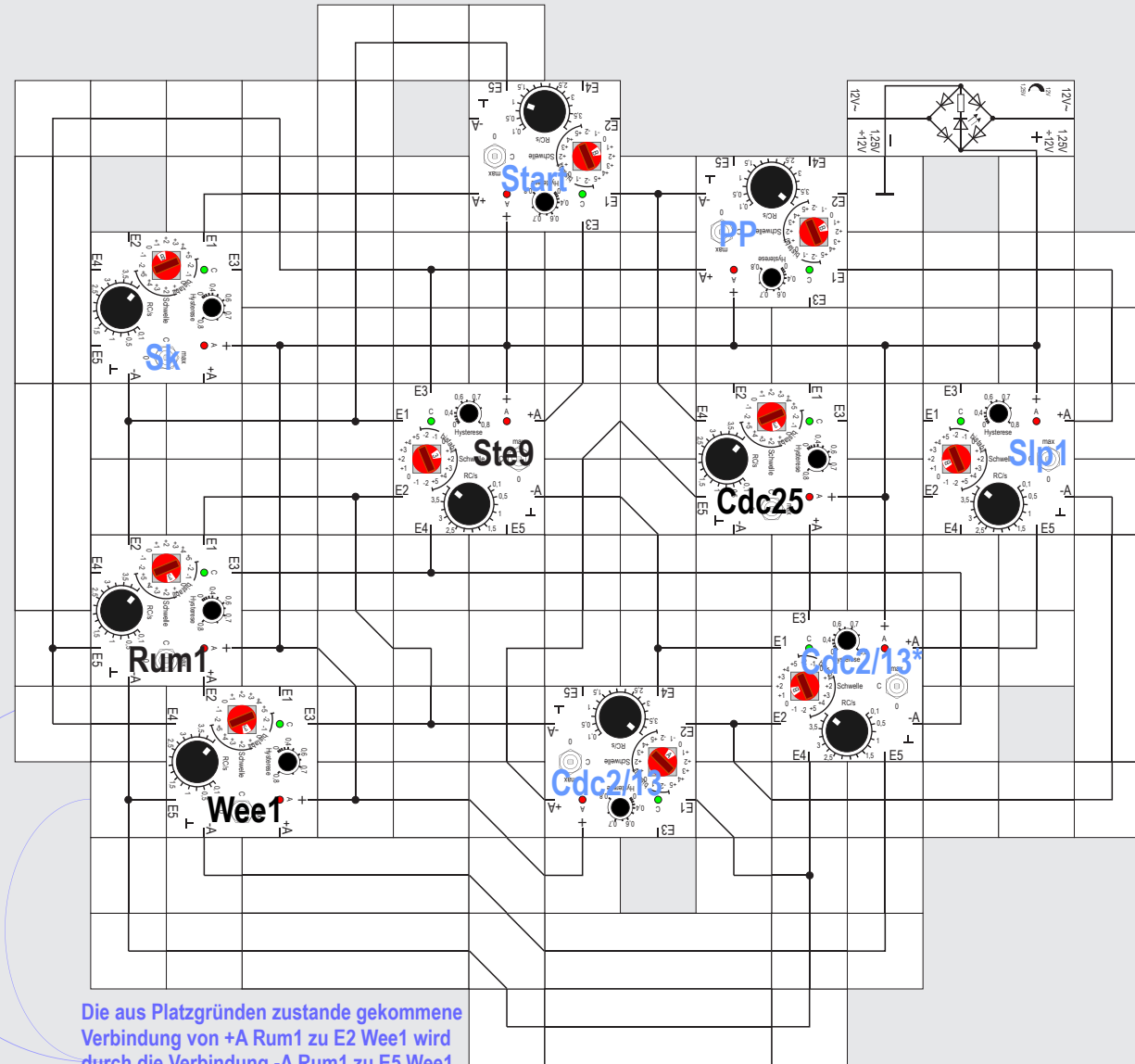
Ein aus der Verbindungsgraphik resultierender möglicher Aufbau zur Simulation ist nachfolgend abgebildet. Da wir einen Gen-Baustein weniger benötigen, ist der Aufbau ein bisschen einfacher als bei der ersten Hefe. Eine kleine Besonderheit ist im Aufbaubild noch angemerkt. Ansonsten gelten alle Kontroll- und Vorichtsmaßnahmen bei der Inbetriebnahme wie bei der ersten Hefezyklus-Simulation.

Wenn die Simulation fehlerfrei durchläuft, sollte sich die in der Tabelle angegebene Folge von Aktivitäten und Inaktivitäten der einzelnen Gene einstellen. Das Zeitdiagramm zeigt einen möglichen Durchlauf, wenn bereits auf kleine Zwischenzustände optimiert ist; die Periodendauer beträgt 87s.

Auch hier können wir wieder ziemlich sicher sein, dass Schwellenveränderungen oder ständiges Aktivieren bzw. Deaktivieren von Gen-Bausteinen ihr biologisches Pendant haben, das zu lebensfähigen oder nicht lebensfähigen Mutanten führt.

Mutationen

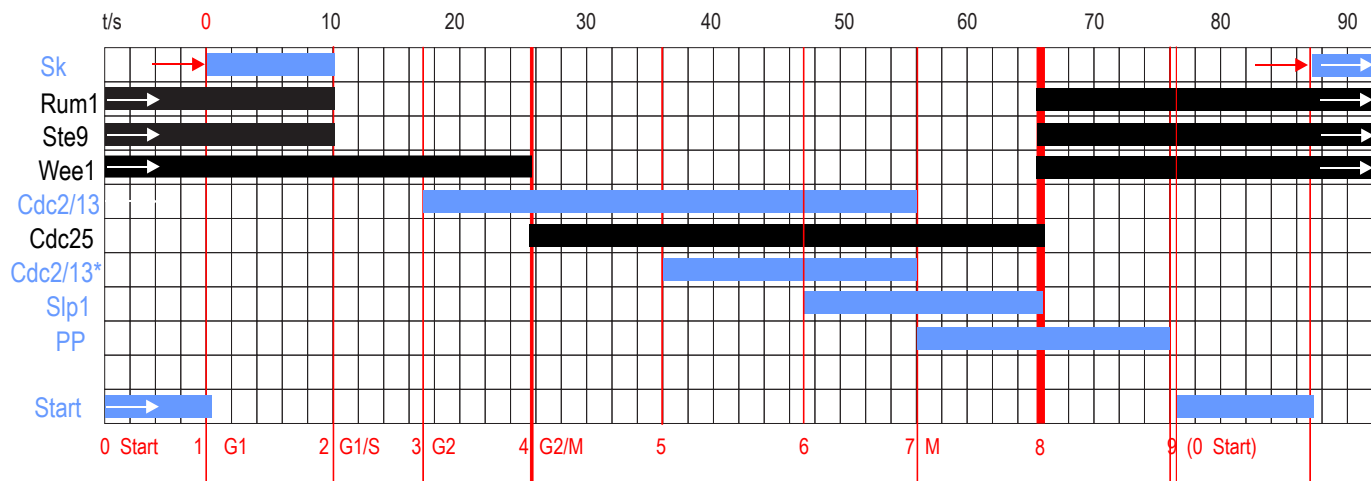
Am Beispiel der Teilungshefe wollen wir uns kurz anschauen, wie mit Hilfe der Gen-Bausteine auch Mutationen der Teilungshefe simuliert werden können [14]. Dafür deaktivieren wir im korrekt arbeitenden Bausteinmodell (das den sogenannten »Wildtyp« der



Die aus Platzgründen zustande gekommene Verbindung von +A Rum1 zu E2 Wee1 wird durch die Verbindung -A Rum1 zu E5 Wee1 kompensiert.

Lectron

| Zeit | Start | Sk | Rum1 | Ste9 | Wee1 | Cdc2/13 | Cdc25 | Cdc2/13* | Slp1 | PP | Phase |
|------|-------|----|------|------|------|---------|-------|----------|------|----|-------|
| 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Start |
| 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | G1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | G1/S |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | G2 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | G2 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | G2/M |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | G2/M |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | M |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | M |
| 9 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | G1 |



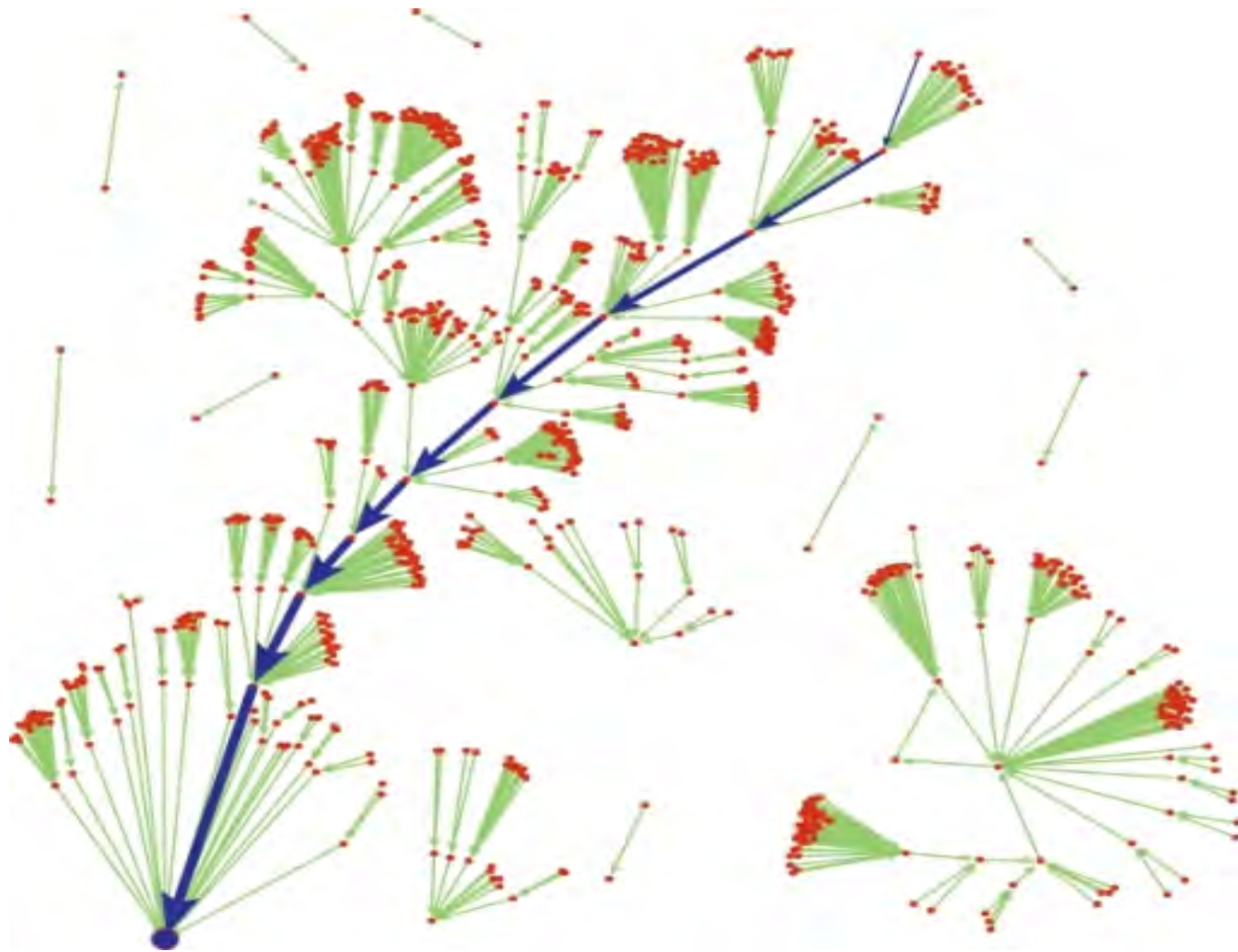
blau selbstabbauend schwarz bistabil alle Schwellen auf +1, außer Cdc2/13 (0) Hyst = 0,8; RC \approx 4,5s, außer Start (0,1s) Periode 87s

Teilungshefe darstellt) einzelne Gene, indem wir den Schalter des jeweiligen Gen-Bausteins auf 0 setzen und den Kreislauf erneut starten. Die spannende Frage ist, ob eine Mutante weiterhin eine lebens- und vor allem vermehrungsfähige Zelle ist, oder ob der Zellzyklus in einem Zustand steckenbleibt (einem Fixpunkt).

Lassen Sie uns dazu einige Mutanten näher anschauen. Deaktiviert man *Wee1*, so scheint der Zellzyklus noch ohne große Probleme abzulaufen. Man erkennt dieselben Vorgänge wie ohne Mutation, so dass dieses System lebensfähig ist. Echte Mutanten der Teilungshefe, die durch einen »Knockout« des *Wee1* Gens erzeugt werden, folgen dieser Vorhersage unseres einfachen Modells: Sie teilen sich und sind lebensfähig!

Wenn wir nun gleich drei Gene *Ste9*, *Rum1* und *Wee1* deaktivieren, so findet zwischen den restlichen Genen (außer *SK* und dem *Start*) eine Oszillation statt, so dass kein Fixpunkt erreicht wird. Dies ist gleichbedeutend mit einem ständigen Aufhalten in der M-Phase, die Zelle teilt sich also ohne dabei die anderen Phasen zu durchlaufen, in denen die Zellen wachsen und die Replikation der DNA stattfindet. Die Mutation bildet also krankhaftes Gewebe und ist damit nicht lebensfähig. In der Tat teilt sich die echte Teilungshefe mit diesem Dreier-Knockout nicht.

Lectron





Werden in einem Doppel-Knockout **Wee1** und **Cdc25** gleichzeitig deaktiviert, bildet sich schnell ein Fixpunkt aus, in dem nur **Cdc2/13** aktiv ist. Da **Cdc2/13*** nicht aktiviert wird, kann die M-Phase nicht starten, das System bleibt also in der G2-Phase. Dies bedeutet, es wächst stetig, ohne sich zu teilen. Auch diese Mutation ist nicht lebensfähig. Gleiches geschieht wenn nur **Cdc25** deaktiviert ist. Dies läßt darauf schließen, dass **Cdc25** das wichtige Gen ist, um die M-Phase zu starten. Dies stimmt auch mit der Wechselwirkungsmatrix überein, da **Cdc25** das für die M-Phase wichtige Gen **Cdc2/13*** aktiviert. Auch wenn man **Cdc2/13** deaktiviert, bildet sich schnell ein Fixpunkt aus, bei dem nur **Wee1** aktiviert ist, da **Cdc2/13** **Cdc25** aktivieren soll, sodaß die M-Phase gestartet werden kann. Dies geschieht nicht, das System ist also ebenfalls nicht lebensfähig. Deaktiviert man nun **Ste9**, so findet der Zellzyklus einmal statt, dann bildet sich ein Fixpunkt aus, wo nur **Rum1** und **Wee1** aktiv sind. Da **Ste9** in unserem Modell jedoch für die Reaktivierung des **Triggers** sorgt, kann der Zellzyklus ohne äußere Einwirkung kein weiteres mal gestartet werden. Dementsprechend bleibt das Modell in der G1-Phase stecken. Dennoch ist die Mutation lebensfähig, da sie einen kompletten Zyklus durchlaufen hat und in der echten

Zelle das Start-Signal durch das Zellwachstum erfolgt. Experimentell ist auch die echte **Ste9** Knockout Mutante vermehrungsfähig.

Wird nur **Rum1** deaktiviert, so findet eine Oszillation zwischen allen Genen außer dem **Start**, **Ste9** und **SK** statt. Theoretisch sollte ein Zellzyklus, in dem nur **Rum1** deaktiviert ist, ohne große Probleme ablaufen, und in der Tat passiert genau das in der echten **Rum1** Mutante.

Zuletzt wird noch **SIP** deaktiviert. Es bildet sich ein Fixpunkt aus, bei dem **Cdc2/13**, **Cdc2/13*** und **Cdc25** aktiv sind. **SIP** ist für die Aktivierung von **PP** zuständig, welches wiederum **Wee1**, **RUM1** und **Ste9** aktiviert, also den generellen stationären Zustand herstellt. Ohne dieses Gen kann die G1 Phase nicht wieder erreicht werden, das System ist also nicht lebensfähig. Auch dies stimmt mit der Natur überein.

Diese Mutationen zeigen, dass die Eingriffe in bestimmte Teile des Netzes mehr oder minder große Auswirkungen auf den Zell-Zyklus haben, die wir mit unserem Modell nachvollziehen können. Und damit sogar vorhersagen können, ob eine bestimmte Mutante der Hefe lebensfähig ist oder nicht. Erstaunlich was unser kleiner Baukasten kann, nicht wahr?

Attraktor der Teilungshefe

Genau wie bei der Bäckerhefe gibt es auch wieder einen graphisch eindrucksvollen Attraktor. Er ist oben abgebildet und umfasst, da das Start-Gen mit berücksichtigt wurde, $2^{10} = 1024$ Zustände, die dieses Mal alle abgebildet sind. Gut zu erkennen und durch blaue Pfeile verbunden sind die wenigen Zustände, die regulär durchlaufen werden und auch in der Tabelle wiederzufinden sind. Der Attraktor ist nicht ganz so dominant wie der der Bäckerhefe. Nur 73% der möglichen Zustände führen zu demselben Endzustand des Zellzyklus' hin.

Versuch 31

Simulationsmodell der Ackerschmalwand

„Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) wird auch Schotenkresse oder Gänserauke genannt und ist eine Pflanzenart in der Familie der Kreuzblütler“. So können wir es bei Wikipedia nachlesen. „Sie ist eine unscheinbare, niedrige, einjährige, krautige Pflanze, die Wuchshöhen von bis 30 Zentimetern erreicht. Die Grundblätter sind rosettig und ihr Stengel ist rund. Die Blätter am Grund sind meist gezähnt, die Stengelblätter dagegen meist ganzrandig. Sie blüht weiß und die Hauptblütezeit ist von April bis Mai. Die Blüten werden zwei bis vier Millimeter groß. Die Pflanze besitzt zudem Schotenfrüchte, die 10 bis 20 Millimeter lang werden können. Sie wurzelt bis 40 Zentimeter tief“.

Wir wollen uns mit dieser Pflanze beschäftigen und die Entwicklung ihrer Blüten simulieren. Warum ausgerechnet diese Pflanze? Nun, sie wurde bereits in den 1940er Jahren als Modellorganismus in der Genetik etabliert. und ist inzwischen zur »Zimmerpflanze« der Molekulargenetiker geworden. Durch einen kurzen Generationszyklus eignet sie sich gut für Mutationsexperimente. Wohl keine andere Pflanze ist heute genetisch so gut studiert wie *Arabidopsis Thaliana*. Die Entwicklung ihrer verschiedenen Blütenblätter wird durch das Zusammenspiel einiger weni-

ger Gene reguliert. Wir wollen zur Simulation ein Modell verwenden, das ABC-Modell heißt [15]. In diesem Modell gibt es die drei Gruppen A, B und C. Der Einfachheit halber besteht die A-Gruppe nur aus dem Gen **AP1**. Gewöhnlich gehört auch **AP2** dazu; aber es ist nicht so wichtig und wir betrachten es deswegen nicht.

Zur B-Gruppe gehören die Gene **AP3** und **PI**. Die letzte Gruppe, C besteht nur aus dem Gen **AG**. Die Gruppen A und C hemmen sich gegenseitig in ihrer Aktivität; so ist C aktiviert wenn A nicht vorhanden ist und umgekehrt.

Die Gene in A und C und beide der Gruppe B bestimmen den Lauf der Blütenentwicklung. Für die Simulation gehen wir von einem Modell aus, das *Luis Mendoza* und *Elena R. Alvarez-Buylla* aus Mexiko 1998 publiziert haben.

1. Durch die Aktivität der A Gene wachsen Kelchblätter.
2. Wenn später die B Gene aktiviert werden, sorgt die Kombination beider Gruppen für den Aufbau von Blütenblättern.
3. Wenn C aktiv ist, wird A unterdrückt. Deswegen können B und C dann Staubblätter aufbauen.
4. B wird deaktiviert und C ist verantwortlich für die Entwicklung der Fruchtblätter.

Das veröffentlichte Modell, mit dem wir die Simula-

tion durchführen wollen, muss noch an unsere Gegebenheiten angepasst werden, da es einige Eigenschaften hat, die sich so ohne weiteres nicht umsetzen lassen. Unsere Gen-Bausteine haben nur fünf Eingänge, **LFY** und **AG** brauchen aber sechs Eingangssignale, **PI** und **AP3** sieben und **AP3** sogar acht. Die noch anzupassende Matrix aller Gene und ihrer Verbindungen untereinander ist nebenstehend in der gewohnten Weise abgebildet.

Mit ein paar Überlegungen wird es uns gelingen, die Matrix so zu verändern, dass unsere Bausteine nicht überfordert sind.

1. Um **TFL1** abzuschalten, braucht **LFY** kein -2 Signal zu liefern, ein -1 Signal tut es auch. **TFL1** wird aktiviert, wenn auch das Gen **EMF1** aktiv wird. Wenn sogar **LFY** ein Signal von nur -1 (statt -2) bietet, wird **TFL1** nicht aktiviert. Dies passiert unabhängig von **EMF1**. Wir können so einen Eingang einsparen.

2. Das Gen **LFY** braucht ein Signal von +4, kann aber höchstens eins von +3 (+2 von **AP1** und +1 von **CAL**) bekommen. Das fehlende Signal erzeugen wir von Hand, indem wir den Umschalter beim Gen-Baustein auf »max« stellen. Nach dem Zurückschalten auf »C« schaltet sich **LFY** dann kurz danach ab.

3. Die Schwelle von **AP1** ist 0. Von den Gen-



Bausteinen EMF1 und AG erhält es je ein -1 Signal (in Summe also -2). Damit es angeschaltet werden kann, reicht ein +2 Signal von LFY, das normalerweise ein +5 Signal liefert.

4. CAL bekommt von LFY nur ein +1 Signal, statt eins mit +2. Wir senken weiter seine Schwelle von +2 auf +1 ab, dann passt es wieder.

5. Eigentlich erhält AG sechs Eingangssignale, also eins zu viel. TFL1 und AP1 schalten jeweils allein mit ihren -2 Signalen AG ab. Wir bilden aus beiden Signalen die ODER Verknüpfung mit einem Gen-Baustein (OR), der dann das -2 Signal an AG abgibt, wenn seine Eingangssignale AP1=1 oder TFL1=1 (oder beide =1) sind.

6. Schließlich ist es möglich, die Eingangssignale, welche AP3 und PI aktivieren, in ihrer Stärke zu reduzieren, ohne dass sich etwas Grundlegendes ändert. Es sind die beiden Signale, die mit +3 und +4 von LFY geliefert werden. Sie werden auf +2 herab gesetzt.

UFO gibt eigentlich ein +2 Signal an AP3 ab; ein +1 Signal tut es auch und schließlich wird das -2 Ausgangssignal von SUP an AP3 von -2 auf -1 geändert. Leider mussten wir für die ODER Verknüpfung einen Gen-Baustein spendieren, so dass uns jetzt beim Simulationsaufbau einer fehlt. Wir brauchen 13 Stück, aber einige Gene beeinflussen die Dynamik

| zu ↓ von → | EMF1 | TFL1 | LFY | AP1 | CAL | LUG | UFO | BFU | AG | AP3 | PI | SUP | Schwelle |
|------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|----------|
| EFM1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| TFL1 | +1 | 0 | -2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| LFY | -2 | -1 | 0 | +2 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +4 |
| AP1 | -1 | 0 | +5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CAL | 0 | 0 | +2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +2 |
| LUG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| UFO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| BFU | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | +2 |
| AG | 0 | -2 | +1 | -2 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AP3 | 0 | 0 | +3 | 0 | 0 | 0 | +2 | +1 | 0 | 0 | 0 | -2 | +1 |
| PI | 0 | 0 | +4 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 |
| SUP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |

nicht so stark, so dass wir sie einfach weglassen können. Es sind dies LFY und UFO. Wir haben uns für UFO entschieden und lassen es weg.

Wir wollen aber nicht verschweigen, dass es auch möglich ist, die ODER Verknüpfung aus Punkt 5 nicht mit einem Gen-Baustein, sondern mit zwei Schottky-Dioden zu realisieren. Der Baustein wäre dann wieder frei. Wir werden später wieder darauf zurückkommen, ohne allerdings UFO einzubauen.

Das sollte auch nur von denjenigen nachgebaut werden, die sich in Elektrotechnik auskennen. Ein Verpolen der Dioden lässt die Ausgänge der beiden Gen-Bausteine nämlich in unzulässiger Weise gegeneinander arbeiten, was zu ihrer Zerstörung führen kann.

Die modifizierte Matrix für die Simulation der Blüten-Entwicklung (Morphogenese) von *Arabidopsis thaliana* sieht dann wie oben abgebildet aus. Ände-

Lectron

rungen sind in rot eingetragen. Auf der nächsten Seite ist das daraus abgeleitete Verbindungsschema abgebildet; es hilft uns in gewohnter Weise, den Aufbau fehlerfrei zu bewerkstelligen.

Ein möglicher kompakter Aufbau für die Simulation der Blüten-Entwicklung von der Ackerschmalwand ist vorstehend abgebildet. Es ist erlaubt, unbenutzte Eingänge von Gen-Bausteinen (anders als ihre Ausgänge) miteinander zu verbinden, ohne dass ihre Funktion beeinträchtigt wird; deswegen dürfen die Bausteine **CAL** und **SUB** auch unmittelbar benachbart sein.

Die Simulation der Blüten-Entwicklung besteht aus sechs mehr oder weniger unabhängigen Schritten, die dann selbstständig ablaufen. Die einzelnen Schritte sind:

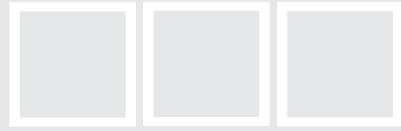
1. Aktivierung des Gens in Gruppe A (**AP1**).
2. Aktivierung der Gene in Gruppe B (**AP3** und **PI**).
3. Abschalten vom Gen **AP1** in A.
4. Aktivierung des Gens in Gruppe C (**AG**).
5. Abschalten der Gene **AP3** und **PI** in B.
6. Abschalten des Gens **AG** in C.

Wir gehen nun folgendermaßen vor:

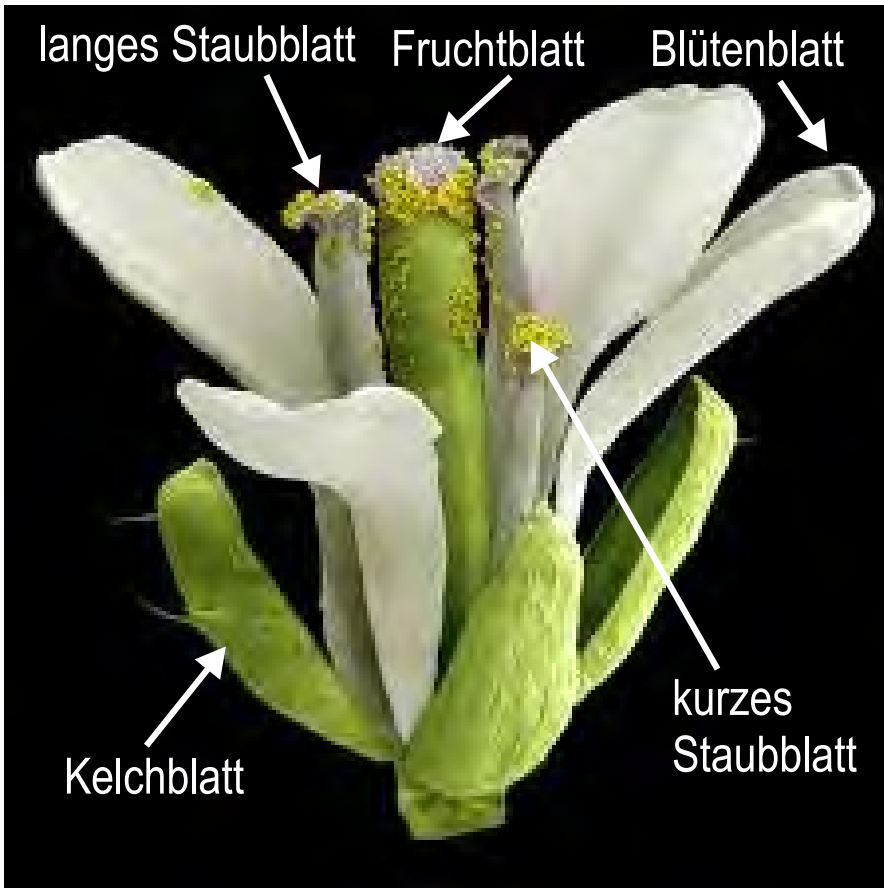
| zu ↓ von → | EMF1 | TFL1 | LFY | AP1 | CAL | LUG | UFO | BFU | AG | AP3 | PI | SUP | Schwelle |
|------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|----|-----|----------|
| EMF1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| TFL1 | +1 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| LFY | -2 | -1 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +3 |
| AP1 | -1 | 0 | +2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CAL | 0 | 0 | +1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| LUG | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| UFO | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |
| BFU | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | +2 |
| AG | 0 | -2 | +1 | -2 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AP3 | 0 | 0 | +2 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 |
| PI | 0 | 0 | +2 | 0 | 0 | 0 | +1 | +1 | 0 | 0 | 0 | -1 | +1 |
| SUP | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +1 |

Zu Beginn der Blüten-Entwicklung aktivieren wir das Gen **EMF1**, indem wir bei seinem Baustein den Kippschalter auf »max« stellen. Dadurch wird in A Gen **AP1** abgeschaltet. Gleichzeitig aktiviert **EMF1**

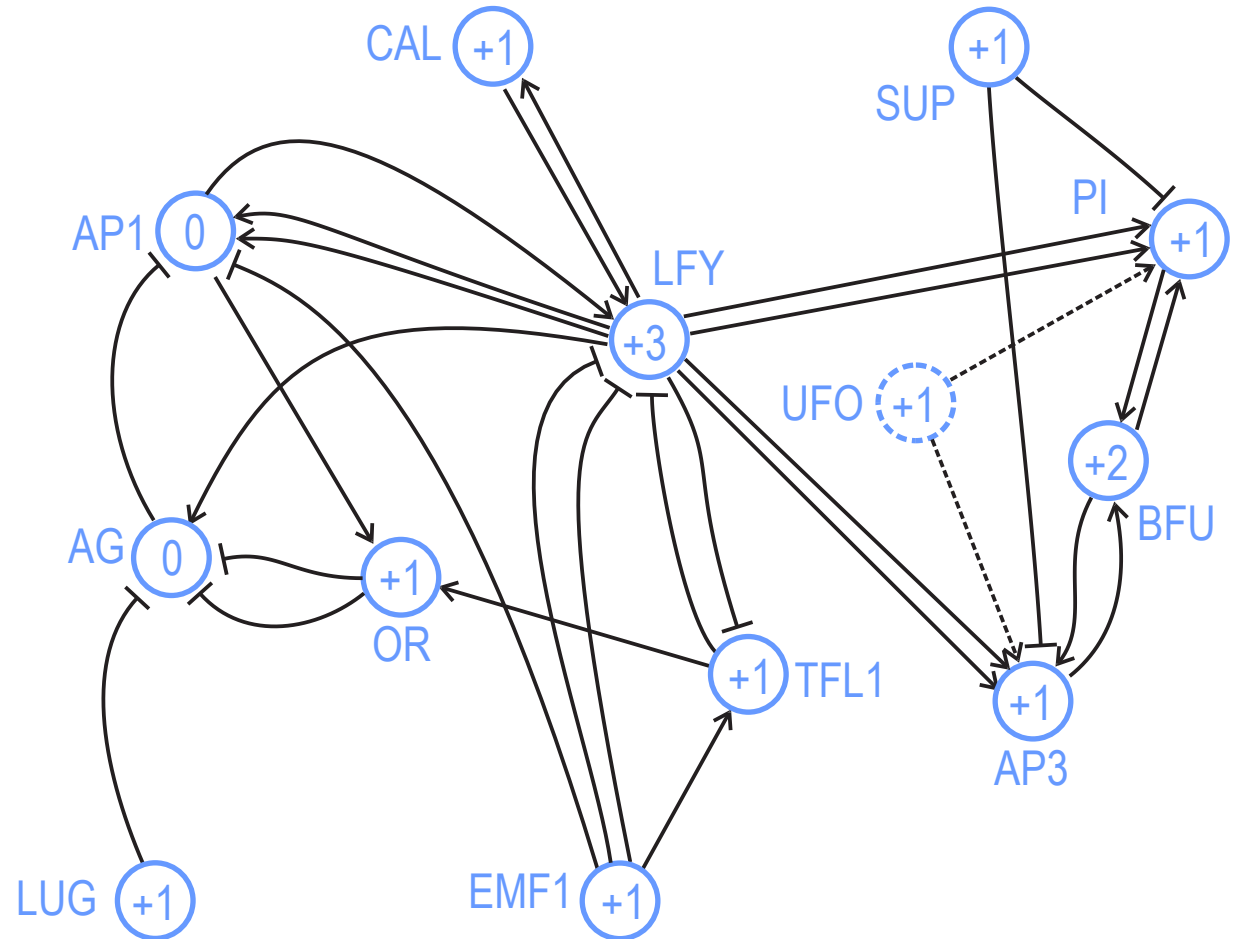
aber auch **TFL1**, welches seinerseits "Gen" **OR** anschaltet, wodurch das Gen **AG** in Gruppe C abgeschaltet wird.

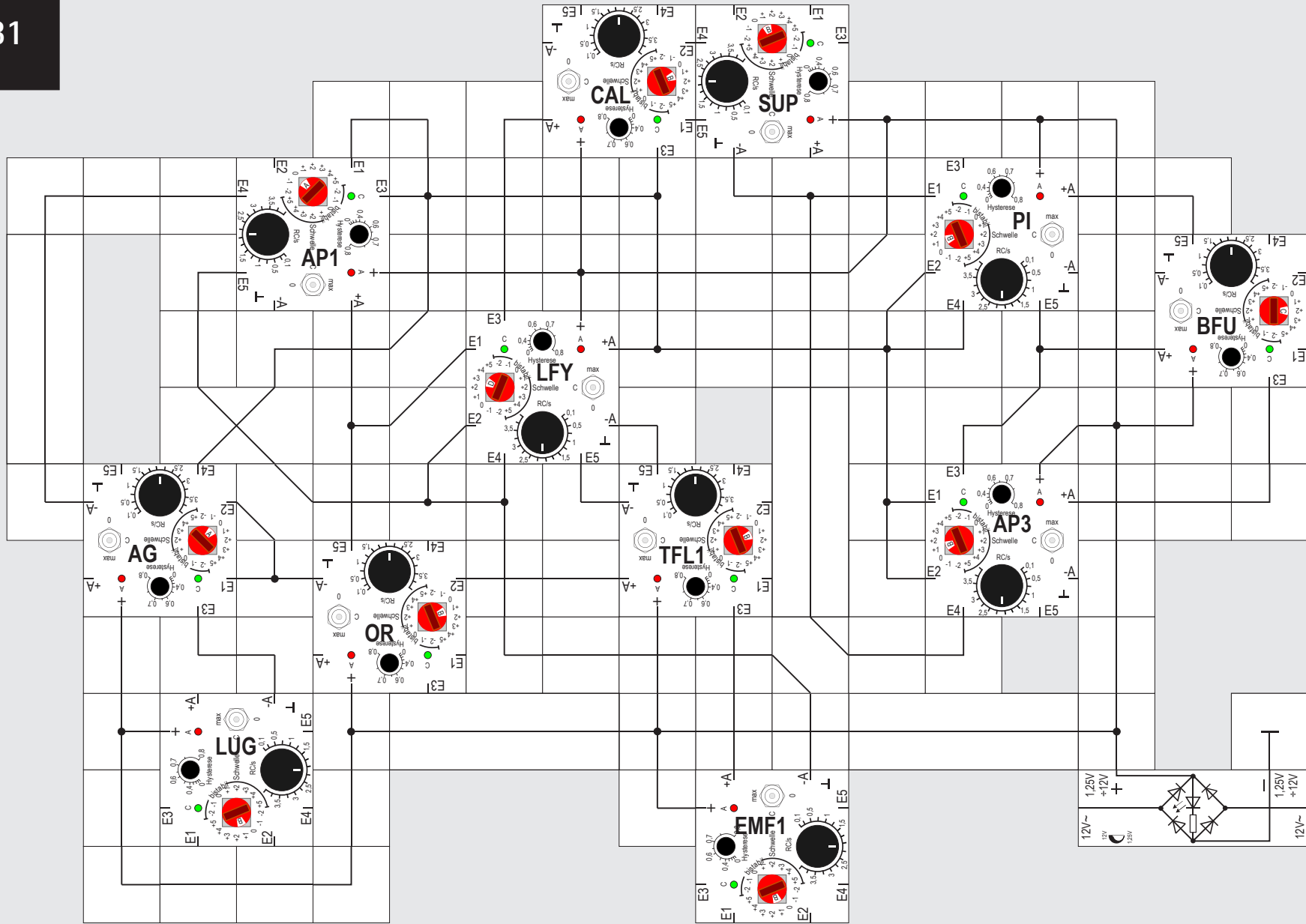


Lectron



Arabidopsis thaliana







Aktivierung vom Gen AP1 in Gruppe A

Zuerst muss der Kippschalter beim Gen-Baustein LUG auf »max« gestellt werden, damit das Gen AG der Gruppe C abgeschaltet wird; es würde sonst AP1 ständig blockieren. Um AP1 anzuschalten, müssen wir EMF1 manuell mit dem Schalter abschalten. Als Folge davon werden TFL1 und OR ebenfalls deaktiviert. Weil EMF1 das Gen AP1 in A nun nicht mehr blockiert, beginnt seine Aktivierung. Es sei noch einmal daran erinnert, dass der Einfachheit halber AP1 für eine Reihe von Genen in Gruppe A steht. AP1 aktiviert OR, welches dann AG weiter hemmt. Das passiert ganz langsam, weil die Verzögerungszeit RC

auf Werte größer 1,5s eingestellt ist. LUG kann später beliebig eingestellt werden, weil OR nun AG abgeschaltet hält. Die Gene in A (AP1) sind nun aktiv und die Kelchblätter werden entwickelt. Die Tabelle zeigt noch einmal die Folge.

| t | EMF1 | TFL1 | AP1 | LUG | AG | OR |
|---|------|------|-----|-----|----|----|
| 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 1 | - | 0 | 1 |

Aktivierung der Gene in Gruppe B

In derselben Weise zeigt die nächste Tabelle die dynamische Entwicklung der Gene in Gruppe B

| t | LFY | PI | AP3 | BFU | |
|---|-----|----|-----|-----|---|
| 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | LFY muss von Hand aktiviert werden. AP3 und PI sind noch deaktiviert. |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | LFY aktiviert beide Gene AP3 und PI in Gruppe B. |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | Beide zusammen schalten BFU an. |
| 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | LFY kann abgeschaltet werden, weil BFU die beiden Gene aktiv hält. |

Zusammen mit den Genen in Gruppe A bauen nun die aktivierten Gene in Gruppe B die Blütenblätter auf.

Abschalten der Gene in Gruppe A

Wenn die Gene in Gruppe A abgeschaltet werden, können sie nicht mehr das Gen **AG** in Gruppe C hemmen. Die Tabelle zeigt die Folge. In diesem Fall ist es ganz einfach **AP1** (Gruppe A) abzuschalten.

| t | EMF1 | TFL1 | OR | AP1 | |
|---|------|------|----|-----|--|
| 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | Dies ist noch der Anfangszustand: AP1 und OR sind an-, EMF1 ist ausgeschaltet |
| 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | EMF1 wird manuell eingeschaltet. |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | TFL1 wird durch EMF1 aktiviert. |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | TFL1 lässt OR aktiv und führt zur Hemmung der Gene in Gruppe A. |

Aktivieren des Gens in Gruppe C

Die Gene in Gruppe A sind nun abgeschaltet. Normalerweise könnte die Gruppe C nicht länger gehemmt werden. Aber in diesem Fall muss **EMF1** wieder abgeschaltet werden, dann werden auch **TFL1** und später **OR** deaktiviert. Obwohl **AP1** (Gruppe A) nicht mehr länger gehemmt wird, kann es **OR** nicht schnell genug aktivieren, so dass dieser Block die Gene der C-Gruppe nicht hemmt. Das passiert, weil die RC-Zeit am **AP1** Gen-Baustein (Gruppe A) größer eingestellt ist als die der anderen Bausteine. **AG** (Gruppe C) wird aktiviert wegen seiner Schwelle auf 0 und dem fehlenden Signal vom **LUG** Gen-Baustein. Wenn **AG** aktiv ist, hat **AP1** keine Chance mehr angeschaltet zu bleiben und **OR** ein hemmendes Signal anzubieten. **AG** bleibt aktiv.

Die Tabelle zeigt die Folge. Die Gene der Gruppen C (**AG**) und B (**AP3**, **PI**) bauen nun die Staubblätter auf.

| t | EMF1 | TFL1 | OR | AP1 | AG | |
|---|------|------|----|-----|----|--|
| 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | EMF1 wird ausgeschaltet |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | Dadurch wird auch TFL1 abgeschaltet |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Als Folge davon erhält OR kein Eingangssignal mehr |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | Schließlich aktiviert sich C (AG) selbst und schaltet A (AP1) ab |



Abschalten der Gene in Gruppe B

Um die Gene **AP3** und **PI** (Gruppe B) abzuschalten, ist es nötig **SUP** manuell zu aktivieren. Das schaltet sie dann beide aus. Dann können beide Gene dem Gen **BFU** keine aktivierenden Signale mehr anbieten und **BFU** selbst kann als Folge davon **AP3** und **PI** nicht mehr aktivieren. Am Ende kann **SUP** willkürlich gesetzt werden.

| t | SUP | PI | AP3 | BFU | |
|---|-----|----|-----|-----|---|
| 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | Zunächst sind AP3 und PI (Gruppe B) sowie BFU aktiv |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | SUP wird manuell angeschaltet. |
| 2 | 1 | 0 | 0 | 1 | BFU schaltet AP3 und PI ab (Gruppe B). |
| 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | BFU bekommt keine aktivierenden Signale mehr und schaltet ab. |
| 4 | - | 0 | 0 | 0 | SUP kann nun wieder abgestellt werden. AP3 und PI werden nicht mehr aktiviert. |

Weil nun die Gene **AP3** und **PI** fehlen, fängt **AG** (Gruppe C) an, Fruchtblätter zu entwickeln.

Abschalten des Gens in Gruppe C

Um die Blütenentwicklung zu beenden, muss **AG** (Gruppe C) abgeschaltet werden. Danach kann sich die Folge selbsttätig wiederholen. Das manuelle Anschalten von **EMF1** führt zur Aktivierung von **TFL1** und **OR**. Letzteres schaltet **AG** (Gruppe C) ab. Am Ende sind alle Gene, die die Blütenentwicklung beeinflussen, abgeschaltet.

| t | EMF1 | TFL1 | OR | AG | |
|---|------|------|----|----|--|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | AG (Gruppe C) ist das einzige aktive Gen. |
| 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | EMF1 wird manuell eingeschaltet. |
| 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | TFL1 wird durch EMF1 aktiviert. |
| 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | TFL1 lässt OR aktiv werden. |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 0 | OR schaltet AG (Gruppe C) ab. |

Wegen der beschränkten Zahl der Eingänge der Gen-Bausteine läuft leider der ganze Vorgang nicht automatisch ab.

Lectron





Exkurs: Automatischer Ablauf der Blütensequenz

Es ist natürlich nicht gerade elegant, wenn zum Ablauf der Simulation ständig Schalter manuell bedient werden müssen, damit sie fortschreitet. In der echten Blüte sorgen während der Blütenentstehung externe Signale dafür, dass der nächste Schritt angestoßen wird, sobald der letzte Schritt ordnungsgemäß ausgeführt wurde. Diese Signale müssen wir in unserem Modell von Hand mit den Schaltern simulieren.

Eine andere Möglichkeit wäre, diese externen Signale aus dem jeweils letzten Zustand des Netzes künstlich zu generieren, so ähnlich wie wir es beim Hefe-Netz mit dem Start-Baustein gemacht haben, um das vollendete Zellwachstum zu simulieren, die dort den nächsten Zyklus startet. Wir wollen in einem kleinen Exkurs mit den folgenden Versuchen einen solchen automatischen Ablauf realisieren.

Wer sich eher für die biologienahe Modellierung in-

teressiert kann diesen Teil ruhig überspringen, und mit dem Versuch zum nächsten biologischen Beispiel weitermachen, dem Netz der Reismehlkäferlarve in Versuch 39.

Wer diesen Exkurs verfolgen möchte wird etwas über die Dynamik autonomer dynamischer Netze lernen und am Ende mit einem ästhetisch blinkenden Arabidopsis-Netz belohnt. Dazu werden allerdings zusätzliche logische Verknüpfungen nötig sein, für die wir uns ein wenig in die Elektrotechnik begeben, um diese mit Dioden und Widerständen zu simulieren.

Versuch 32

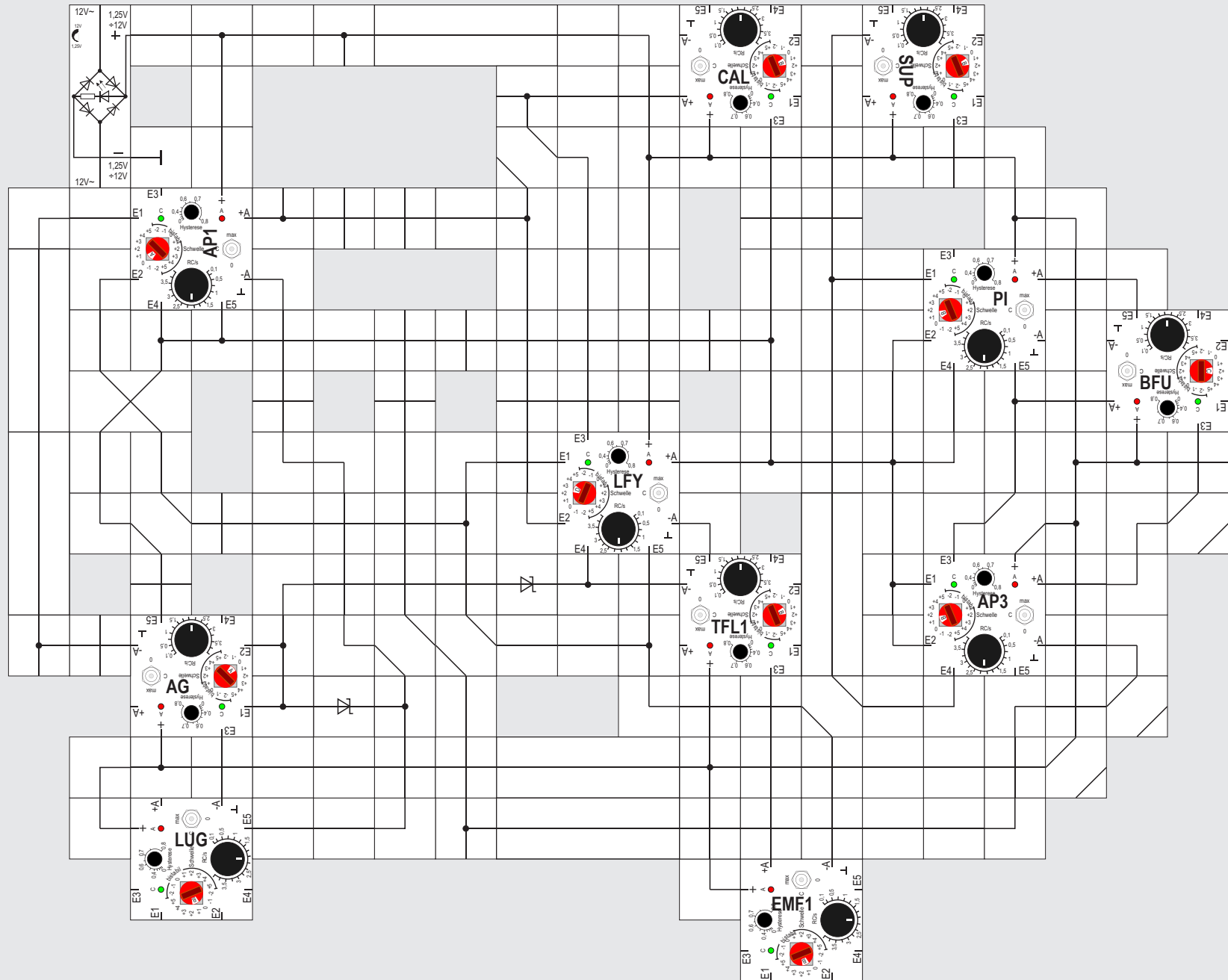
Signalverknüpfung mit Dioden

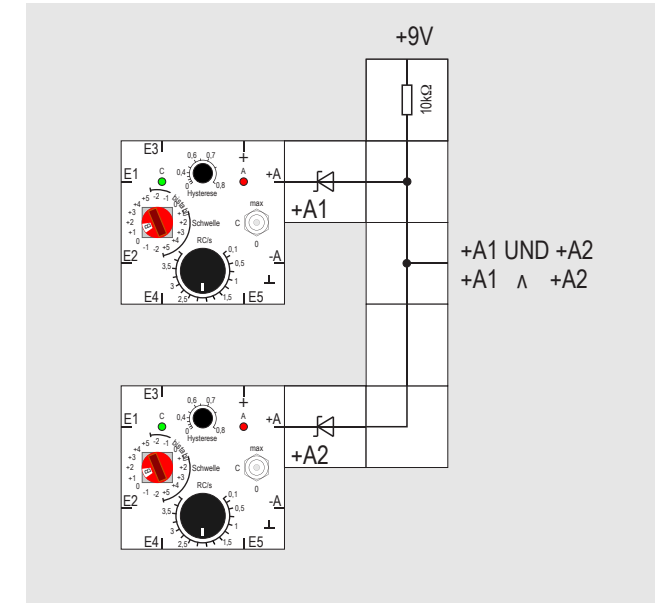
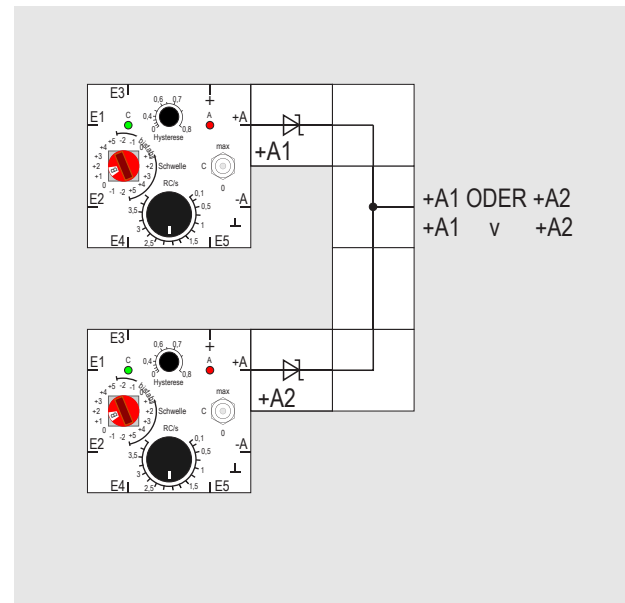
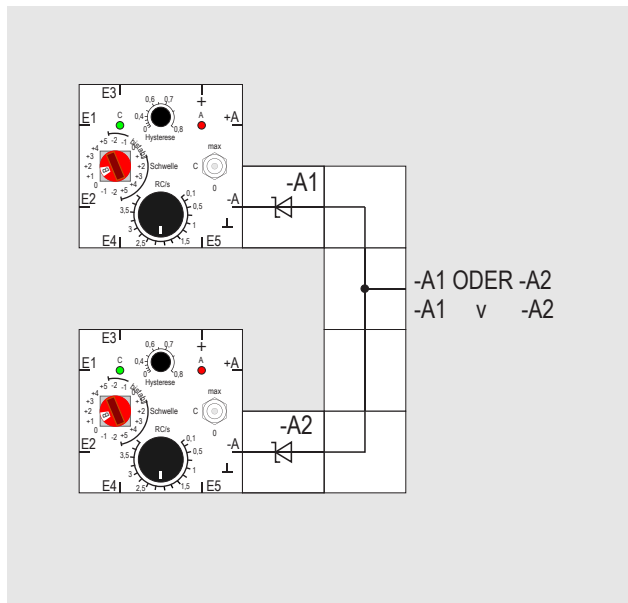
Dazu bauen wir die Schaltung neu auf. (siehe nächste Seite). Der Aufbau sieht zunächst ein wenig löchrig aus, aber wir werden die Löcher stopfen.

Zunächst ersetzen wir den Gen-Baustein **OR**, der lediglich zwei Signale verknüpft durch eine Dioden ODER-Verknüpfung, wie sie in der Digitaltechnik gang und gäbe ist (übernächste Seite, linke Abb.). Wir erhalten den oben angegebenen Aufbau und bekommen einen Gen-Baustein für eine weitere Verwendung frei. Als Dioden eignen sich am besten

Schottky - Dioden wegen ihrer kleinen Flussspannung. Wir finden bei einer Überprüfung, dass sich die geänderte Schaltung genauso verhält wie die bisherige.

Nun zur Funktion der Dioden ODER-Verknüpfung. Wir möchten dass, wenn **mindestens** eins der -A Signale von **AP1 ODER TFL1** aktiv ist, also -8V abgibt, **AG** ein hemmendes Signal mit Gewicht -2 bekommt. Schalten wir die Dioden so wie angegeben, setzt sich ein negatives Ausgangspotenzial der beiden beteiligten Gen-Bausteine über seine jeweilige Diode durch. Das möglicherweise auf 0V liegende Ausgangspotenzial des anderen Bausteins stört nicht. Die andere Diode sperrt und entkoppelt somit die beiden Ausgänge. Das so gewonnene Signal muss auf zwei Eingänge des **AG**-Bausteins gegeben werden, da sein Gewicht -2 betragen soll. Diese Schaltung kann auf weitere Signale erweitert und verwendet werden, wenn ein Empfänger-Baustein nicht genügend Eingänge hat. Vorher ist allerdings eine genaue Betrachtung erforderlich: Ideal ist es, wenn die zu verknüpfenden Signale zu unterschiedlichen Zeiten aktiv sind; sie benutzen dann lediglich einen Eingang gemeinsam. Sind sie gleichzeitig aktiv, werden sie in ihrem Gewicht herabgesetzt und man muss prüfen, ob eine Veränderung der Schwelle das kompensieren kann.



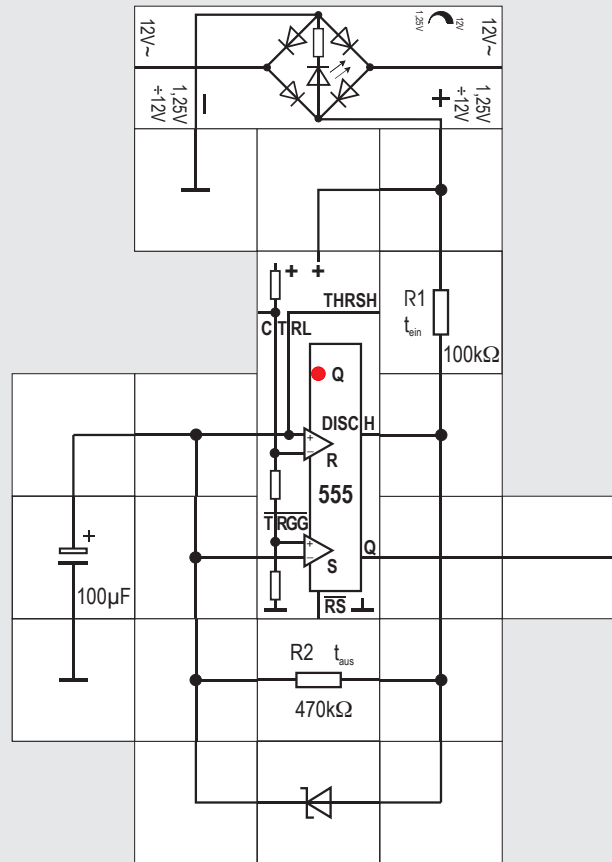


Möchte man zwei oder mehrere +A Signale mit einer ODER-Verknüpfung verarbeiten, so müssen die Dioden-Bausteine um 180° gedreht werden. (Mittl. Abb.) Es setzt sich dann immer das hohe Potential (8V) durch, ohne dass ein möglicherweise auf 0V liegendes Ausgangspotenzial davon beeinflusst wird. Ein bisschen aufwendiger wird es, wenn wir zwei (oder noch mehrere) +A Signale nach einer UND-Verknüpfung verarbeiten wollen. Es wird ein

Widerstand benötigt und für jedes Signal eine Diode (rechte Abb.). Die Schaltung funktioniert wie folgt: Nur wenn alle beteiligten Ausgangssignale aktiv sind (8V), soll das Verknüpfungssignal ebenfalls ungefähr 8V sein, solange mindestens ein Ausgang auf 0V liegt, bestimmt er das Verknüpfungssignal. Sind alle beteiligten Signale aktiv (8V), sperren alle Dioden; der angeschlossene Baustein bekommt jetzt sein hohes Potenzial über den Widerstand, der deswe-

gen nicht zu groß sein darf, da sein Wert sich zu den 100kΩ Eingangswiderstand addiert. Er darf allerdings auch nicht zu klein sein, da sonst der Querstrom, den ein auf 0V liegender Ausgang aufnehmen muss, zu groß wird. 5,6kΩ oder 10kΩ sind ein guter Wert. Die UND-Verknüpfung von -A Signalen erfordert bei wieder um 180° gedrehten Dioden einen Widerstand gegen -8V, die meistens nicht zur Verfügung stehen und aufwendig erzeugt werden müssten.

33





Versuche 33 & 34

Taktgeber mit Timer Baustein

Beim Simulieren der Entwicklung verschiedener Blätter von *Arabidopsis thaliana* fällt uns ziemlich schnell auf, dass der Schalter am **EMF1** Gen-Baustein sehr häufig manuell betätigt werden muss, und zwar fast immer, wenn eine neue Blattentwicklung beginnen soll. Das wollen wir jetzt ändern und automatisch machen lassen.

Der freie **OR** Gen-Baustein könnte als Oszillator geschaltet werden, wie wir das bereits kennen. Er würde uns ein Signal generieren, das ein Tastverhältnis t_{ein}/T von circa 0,5 besitzt, ganz gleich, wie wir seine RC - Einstellung wählen. Das ist für diesen Zweck nicht optimal. Besser wäre es, wir hätten ein Signal, welches nur kurzzeitig »ein« ist und lange Zeit »aus«, also eins mit einem kleineren Tastverhältnis von 0,1 oder noch kleiner.

Für diese Zwecke gibt es nun im LECTRON Baustein Spektrum den bestens dafür geeigneten Timer-Baustein 555.

Bei dem Versuchsaufbau mit diesem Baustein sind die Werte von Kondensator und Widerstand - also

dem zeitbestimmenden RC-Glied - zunächst mit $R1=R2 = 10k\Omega$ und $C = 100\mu F$ so gewählt worden, dass wir nach Anlegen der Versorgungsspannung am Blinken der Leuchtdiode das Arbeiten der Schaltung sofort erkennen können. An ihrem Ausgang Q gibt sie ein Rechtecksignal ab.

Für die elektrotechnisch Interessierten wollen wir noch kurz erklären, wie das zustandekommt: Im Einschalt Augenblick ist der Kondensator leer und damit das Signal $\overline{\text{TRGG}} = U_L$. Der »untere« als Komparator geschaltete Operationsverstärker erzeugt deswegen ein Setzsignal für das Flipflop, Q gibt U_H - Potenzial ab und die LED leuchtet. DISCH ist hochohmig. Der Kondensator lädt sich nach einer e - Funktion über R1 und die Schottky - Diode, welche R2 überbrückt, langsam auf.

Hat seine Spannung 2/3 der Versorgungsspannung erreicht, erzeugt der »obere« Komparator ein Rücksetzsignal für das Flipflop. Damit wird $Q = U_L$, die LED verlischt und ein interner MOSFET leitet. DISCH hat demzufolge nahezu Massepotential und der Kondensator entlädt sich über R2.

Unterschreitet die Kondensatorspannung 1/3 der Versorgungsspannung, wird der untere Komparator aktiv und schaltet mit seinem Setzsignal den Ausgang Q auf U_H - Potenzial; die LED leuchtet, DISCH wird wieder hochohmig und das Spiel beginnt von Neuem.

Bis auf ihr erstmaliges Hochlaufen nach Anlegen der Versorgungsspannung bewegt sich die Kondensatorspannung in der Folge zwischen 2/3 und 1/3 der Versorgungsspannung und die angeschlossenen Komparatoren erzeugen abwechselnd Rücksetz- und Setzsignale. Das Flipflop gibt deswegen ein rechteckförmiges Signal mit dem Tastverhältnis t_{ein}/T von ungefähr 0,5 ab. Bei den gewählten Bauteilwerten ist $T = 1,4s$.

Die Diode ist wichtig: Ohne sie könnte ein Tastverhältnis von nahezu 0,5 nicht erreicht werden, da sich der Kondensator dann über R1 + R2 laden, sich aber nur über R2 entladen würde.

Allgemein (ohne Diode) betragen die Anschaltzeit t_{ein} und die Abschaltzeit t_{ab} :

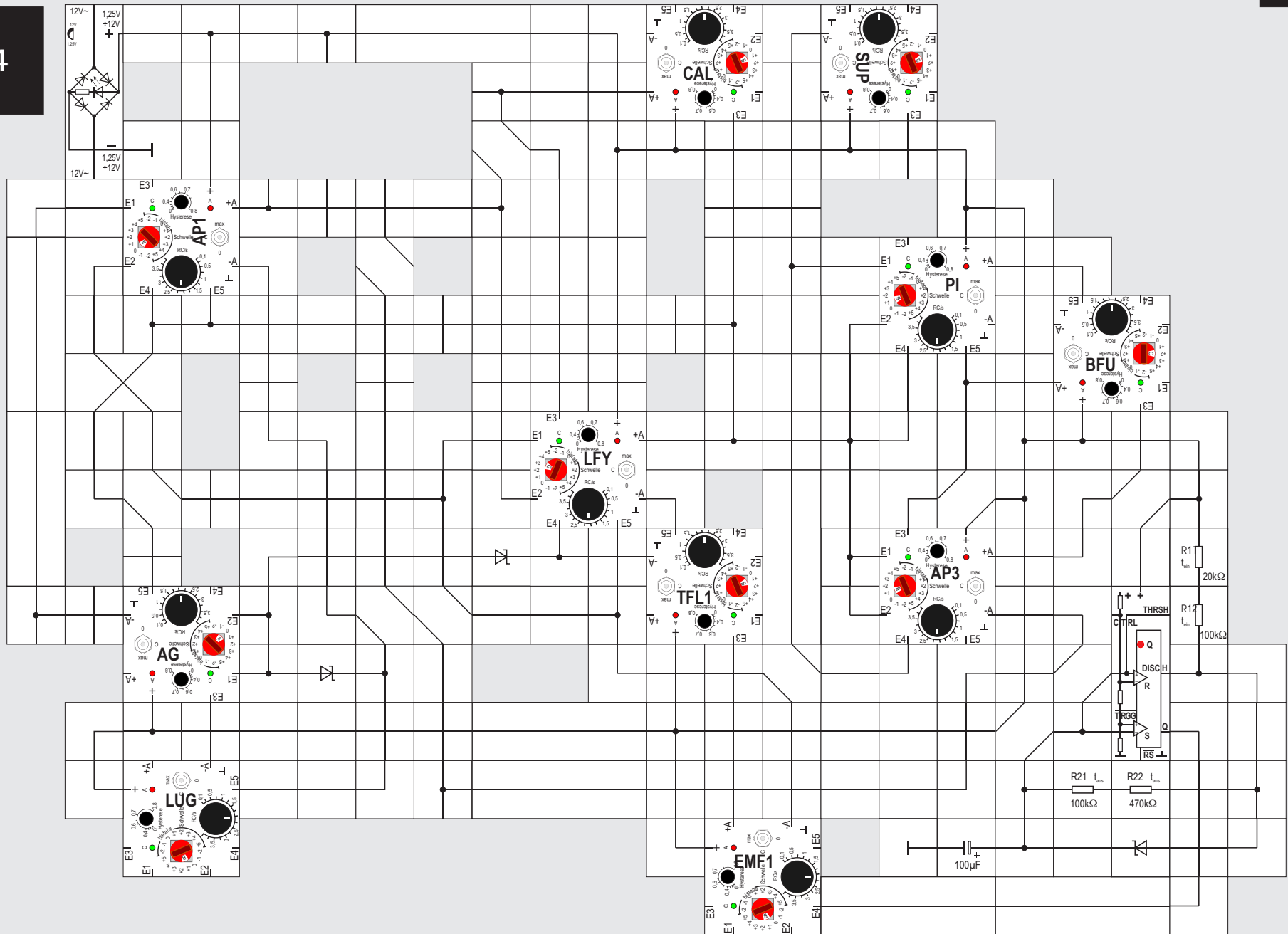
$$t_{\text{ein}} = 0,69 \cdot (R1 + R2) \cdot C$$
$$t_{\text{aus}} = 0,69 \cdot R2 \cdot C$$

Mit Diode ist R2 in der ersten Formel gleich Null zu setzen.

Zum Ansteuern unseres Simulationsnetzes und speziell zum Ansteuern von **EMF1** erhöhen wir die Werte auf $R1 = (100+20)k\Omega$, $R2 = (470+100)k\Omega$ und $C = 100\mu F$, benötigen also Platz für jeweils einen weiteren Widerstand zum Variieren der Zeit.

Dann haben wir genug Zeit, die folgenden Schalter zu betätigen. Wir erhalten dann den auf der nächsten Seite abgebildeten Aufbau (Versuch 34).

34





Versuch 35

LUG automatisch schalten

Als nächstes überlegen wir, wie wir die Betätigung des Schalters vom **LUG** Gen-Baustein einsparen und den Baustein automatisch anschalten können. **LUG** schaltet von selbst an, wenn die Schwelle um 1 auf 0 erniedrigt wird.

Das Abschalten kann passieren, wenn **AP1** aktiv wird. Wir verbinden also **-A** von **AG** mit einem Eingang von **LUG**. Wenn später im Ablauf der Simulation **AP1** nicht mehr aktiv ist, würde **LUG** zur Unzeit neu starten. Das verhindern wir durch eine zusätzliche Hemmung mit dem **-A** Signal von **AP3**. Der veränderte Schaltungsaufbau ist auf der nächsten Seite abgebildet. Wir vergewissern uns, dass alles wie gewünscht abläuft.

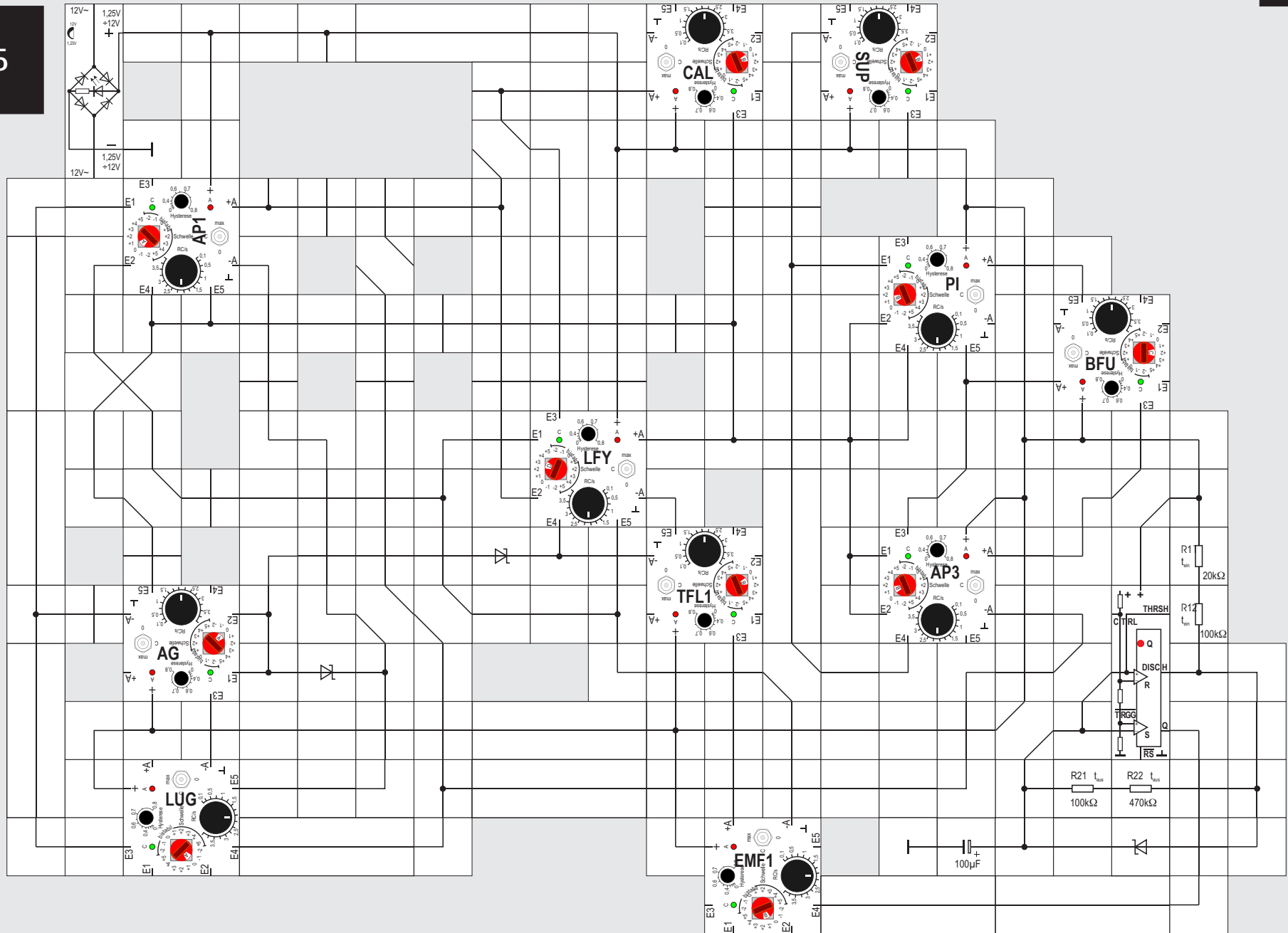
Versuch 36

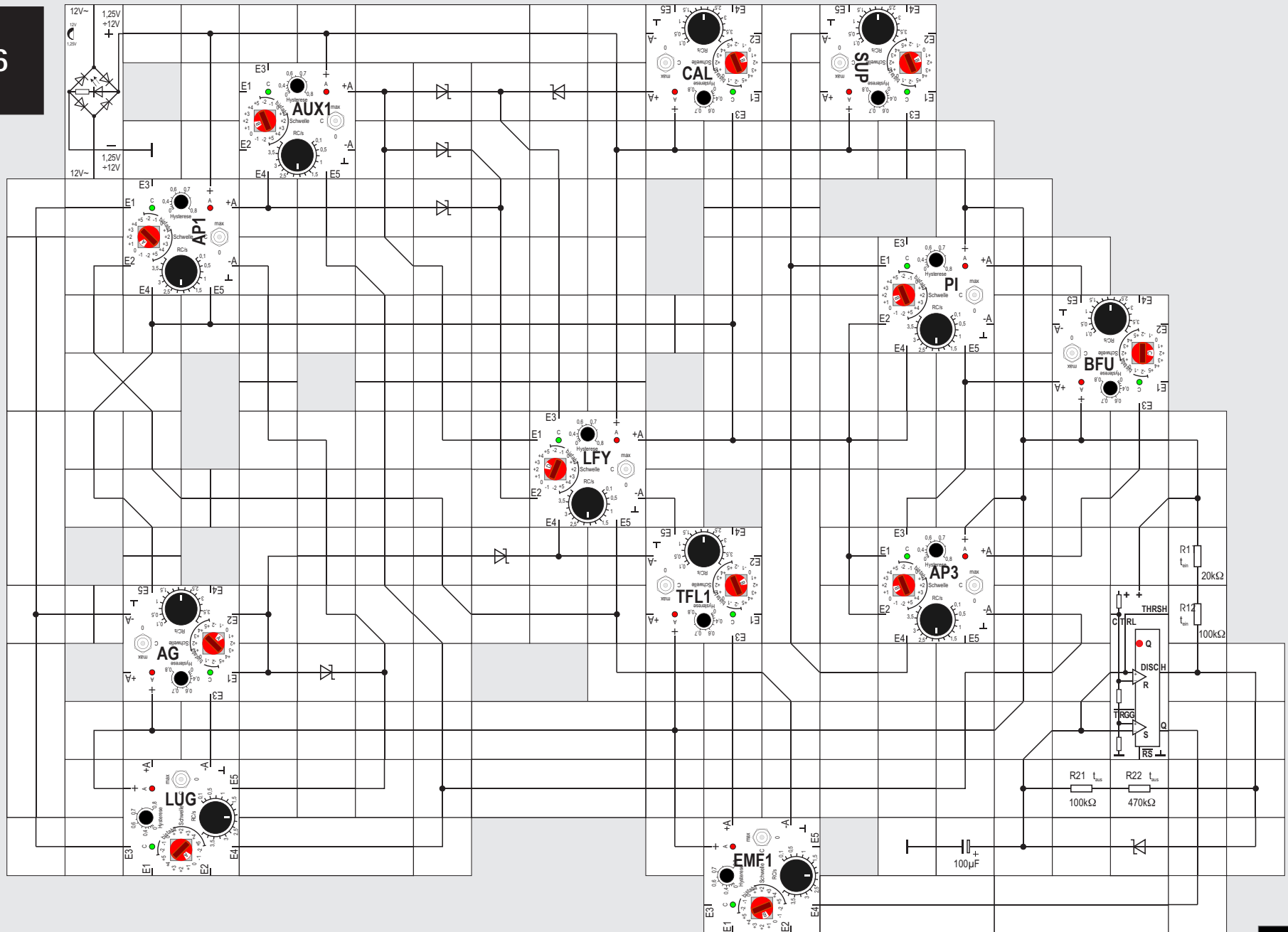
LFY automatisch schalten

Die folgende Veränderung wird etwas umfangreicher. Wir werden die Betätigung des Schalters von **LFY** automatisieren. Dazu dient uns der **OR** Gen-Baustein, den wir jetzt als Hilfsgen einsetzen und **AUX1** nennen. Vorher stellen wir aber durch einen Versuch fest, dass das Gewicht des **EMF1**-Signals an **LFY** nur **-1** (statt **-2**) zu sein braucht. Durch Umverdrahtung bekommen wir einen Eingang am **LFY** - Baustein frei.

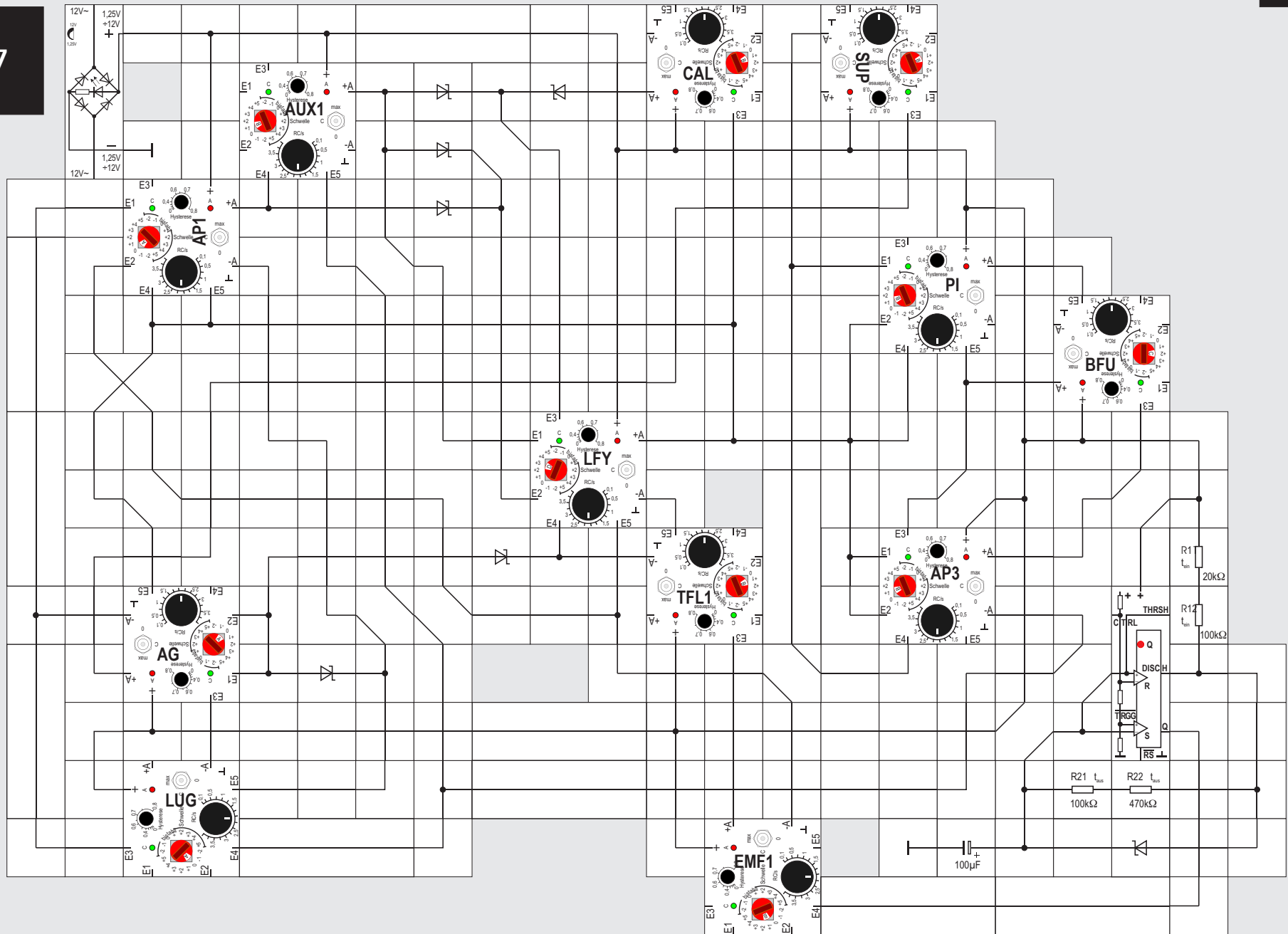
Das manuelle Anschalten überwindet die am Baustein **LFY** eingestellte Schwelle von **+3**. Ein automatisch vom **AUX1**-Baustein generiertes Signal muss also dreifach auf den **LFY** - Baustein geführt werden. Einmal bringen wir es direkt auf den freigewordenen Eingang und die beiden anderen Male verknüpfen wir es jeweils mit den **+A** Signalen von **AP1** und **CAL** in einer **ODER**-Verknüpfung. Den dafür erforderlichen Platz in der Schaltung gibt es bereits. Den **AUX1**- Baustein starten wir mit dem **+A** Signal von **AP1**. Nach der eingestellten Verzögerungszeit wird er aktiv und startet dann **LFY**.

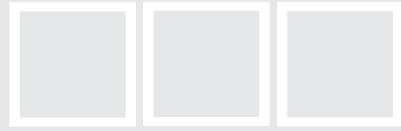
35





37





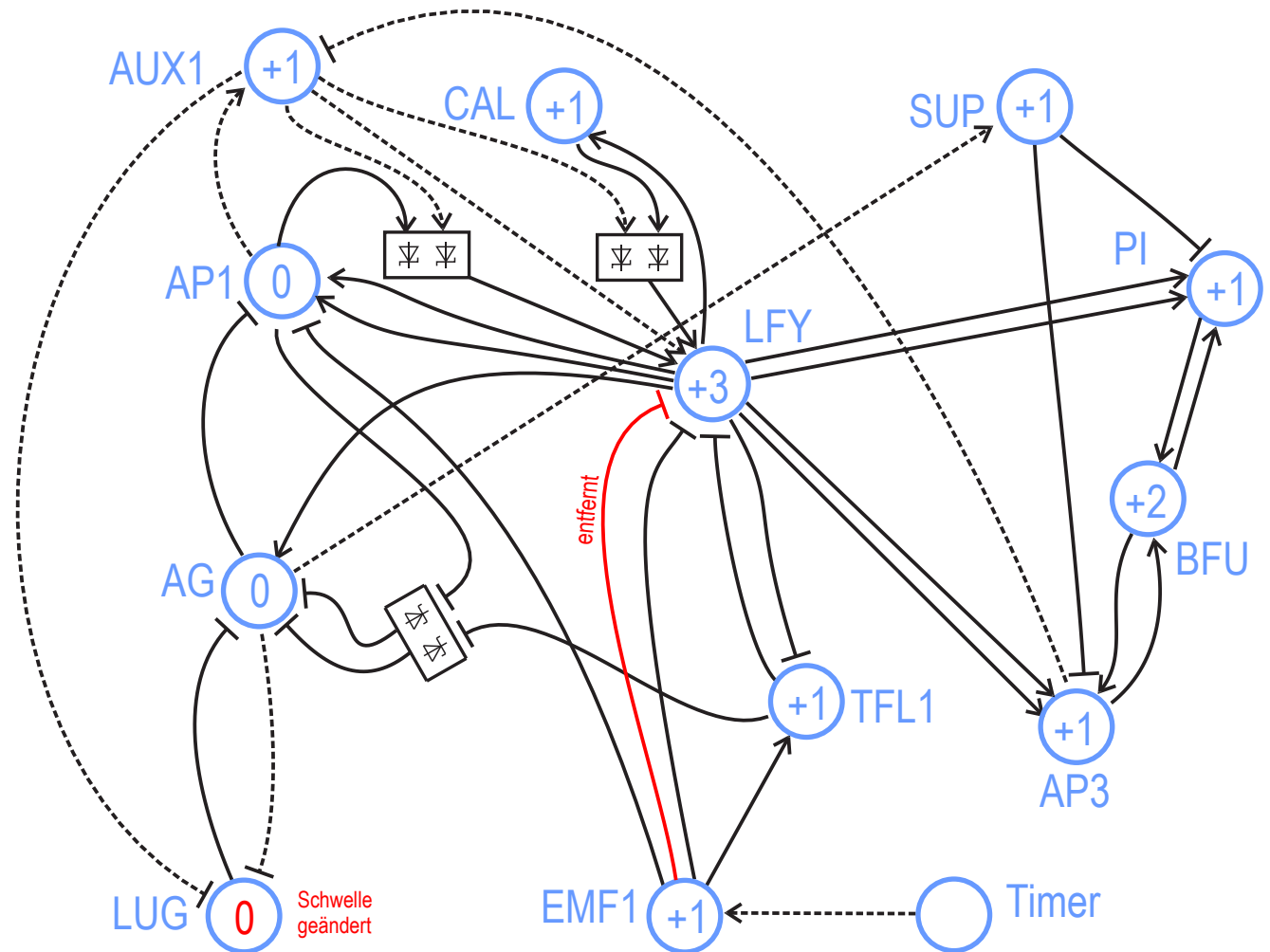
Versuch 37

SUP automatisch schalten

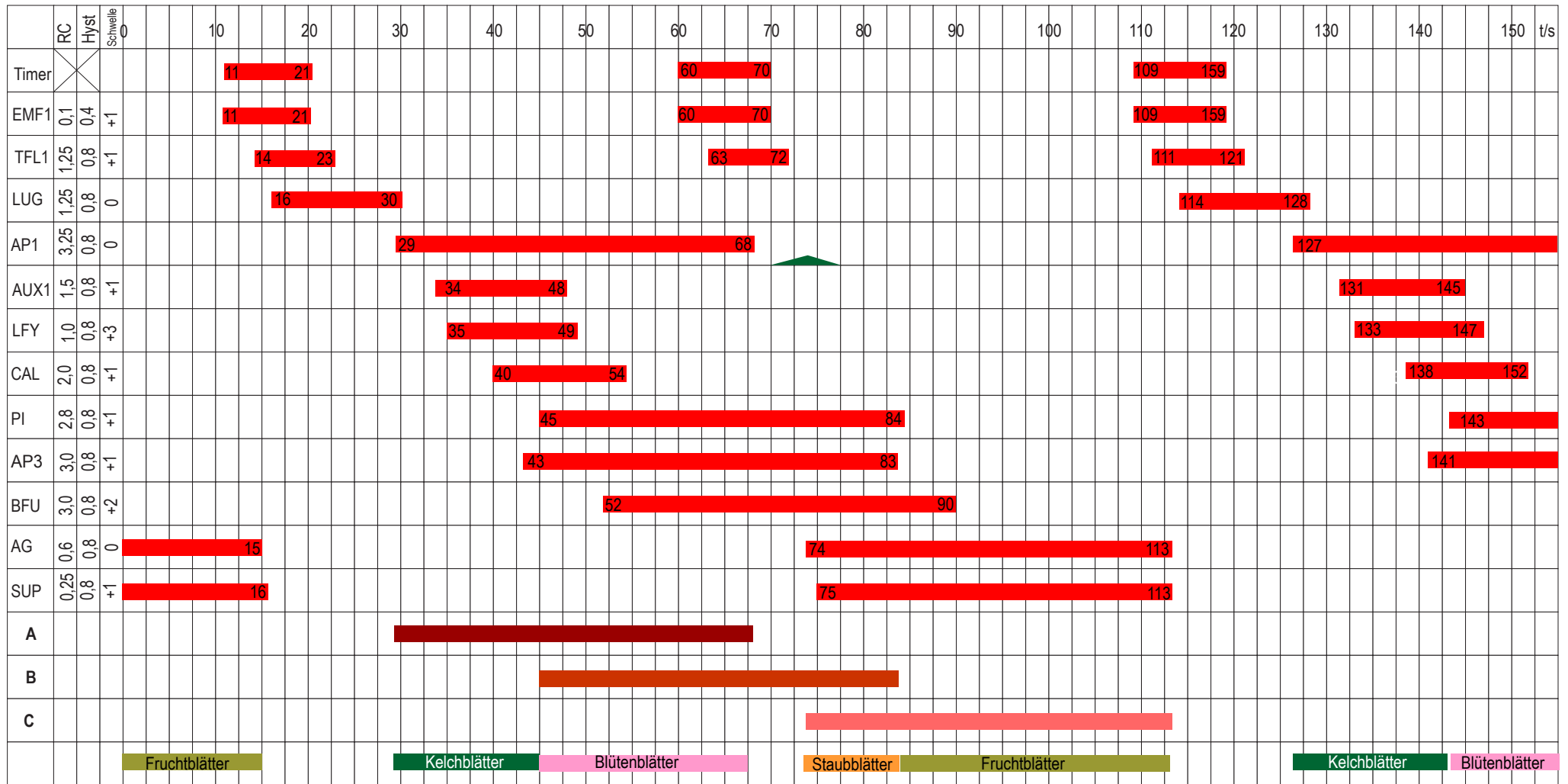
Zum Schluss müssen wir noch das Schalten am SUP Schalter ersetzen. Dafür geeignet ist das +A Signal des AG Gen-Bausteins. Wenn es aktiv ist, aktiviert es auch den SUP Gen-Baustein, woraufhin dieser PI und AP3 und dann BFU abschaltet. Beim nächsten Erscheinen eines Taktes vom 555 Timer Baustein wird EMF1 aktiv, schaltet (über TFL1) AG und damit SUP ab und der Zyklus beginnt aufs Neue.

Es dürfte klar sein, dass die Timer-Frequenz passen muss zum übrigen Ablauf, der wiederum von der Dauer der einzelnen RC-Zeiten an den Gen-Bausteinen abhängt. Falls irgendetwas nicht ganz passt, können wir es durch Verändern der RC - Einstellungen korrigieren. Speziell der zeitbestimmende Elektrolytkondensator hat mit 20% eine relativ große Toleranz, so dass die im Aufbau angegebenen Widerstandswerte leicht anders sein können.

Bevor wir ein Zeitdiagramm aller Signale angeben soll zunächst noch einmal eine Übersicht mit den zusätzlichen (gestrichelten) Verbindungen gezeigt werden, wie sie in der Schaltung realisiert sind, damit die Simulation periodisch läuft.



Lectron





Zeitdiagramm Simulation Ackerschmalwand

Im Diagramm sehen wir, wie die einzelnen Gen-Bausteine gesteuert vom Timer nacheinander schalten. Es ist gut zu erkennen, wie zunächst das Timer - Signal **EMF1** aktiviert und sich das Schalten der übrigen Gen- Bausteine anschließt. Die Periode des Timers beträgt 49s. Rein rechnerisch ist sie

$$t_{\text{ein}} = 0,69 \cdot 100\mu\text{F} \cdot 120\text{k}\Omega = 8,2\text{s}$$

$$t_{\text{aus}} = 0,69 \cdot 100\mu\text{F} \cdot 570\text{k}\Omega = 39,3\text{s}$$

$$T = 47,5\text{s}$$

Wir haben also eine gute Übereinstimmung.

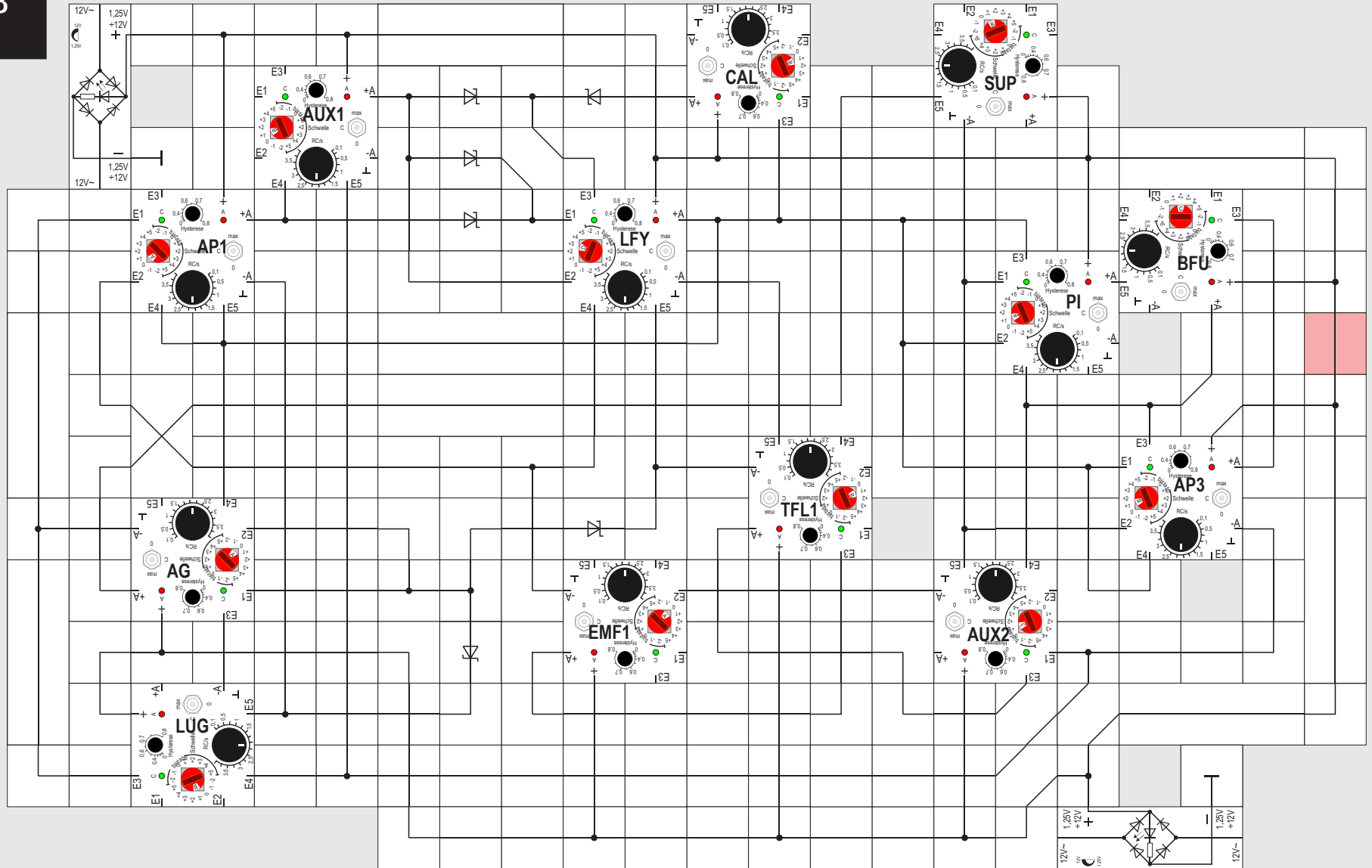
In der zweiten Diagrammspalte sind die Circa-RC-Werte der einzelnen Bausteine und in der dritten die Hystereseeinstellungen angegeben. Sie sind mehr oder weniger zufällig gewählt und recht unkritisch, sind also nur als Anhaltswerte zu sehen. Wir können sie vorsichtig verändern und sehen, was sich dann im zeitlichen Verlauf der Simulation ändert. Eine Optimierung ist sicherlich noch möglich.

AG sollte gegenüber **AP1** möglichst kleiner eingestellt werden. Beim Durchlauf können wir nämlich an der grünen LED beobachten, dass der Kondensator von **AP1** sich zu laden beginnt, es zum (unzeitigen) Anschalten von **AP1** aber doch nicht ganz

reicht, weil **AG** noch rechtzeitig aktiv wird und **AP1** hemmt. Im Diagramm ist die kritische Stelle grün eingezeichnet. Weiter ist dem Diagramm zu entnehmen, dass zu einem kompletten Durchlauf der Simulation zwei Timer - Perioden erforderlich sind. Aber das wussten wir vorher schon, mussten wir doch **EMF1** für einen Durchlauf manuell zweimal anschalten.

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Timer - Periode und - grob gesagt - der Summe der einzelnen Aktivzeiten der Gen-Bausteine. Erstere darf nicht zu klein gewählt werden, sonst kommt die Simulation außer Tritt. Der Timer bekommt ja keine Rückmeldung darüber, wie weit sich die Folge der Schaltvorgänge bereits durch die Schaltung gearbeitet hat, sondern gibt stur sein Ausgangssignal aus und nimmt uns lediglich das manuelle Schalten ab.

Obwohl das sehr schön ist, können wir uns fragen, ob es nicht auch noch möglich ist, die Schaltung sich selbst starten zu lassen und auf den Timer ganz zu verzichten. Wenn es uns gelingt, bei sonst unveränderter Schaltung, die ja zu unserer Zufriedenheit läuft, an **EMF1** ein Signal zu generieren, das zeitlich ähnlich dem jetzigen ist, sollte der Rest der Schaltung ungestört - auch wie bisher - durchlaufen.





Versuch 38

Simulation Ackerschmalwand ohne Timer

Wir unterbrechen die Ansteuerleitung vom Timer zum **EMF1** Baustein und überlegen, wie wir den letzteren aktivieren können. Am einfachsten ist es, seine Schwelle auf 0 herunter zu setzen, dann wird er ohne Ansteuerung aktiv. Das klappt ohne weiteres.

Anschließend muss er nach circa 10s abgeschaltet werden und wir benötigen ein Signal aus der restlichen Schaltung, das das leistet. Es bieten sich die -A Signale von **TFL** und **LUG** an. Leider dauern sie nicht lange genug, so dass **EMF1** dann schnell wieder aktiv wird. Mit **AG** und **SUP** funktioniert es aus dem gleichen Grund nicht.

Es bleibt uns leider nichts weiter übrig, als einen weiteren (den 13.) Gen-Baustein - **AUX2** - einzusetzen. Diesen Baustein lassen wir von **TFL1** aktivieren und mit seinem -A Signal **EMF1** abschalten. Damit er in der Abschaltfolge **EMF1** - **TFL1** - **AUX2** nicht selbst auch abgeschaltet wird und **EMF1** wieder freigibt, stellen wir seine Schwelle auf +1 bipolar ein; ohne Ansteuerung bleibt er dann aktiv und hemmt **EMF1**.

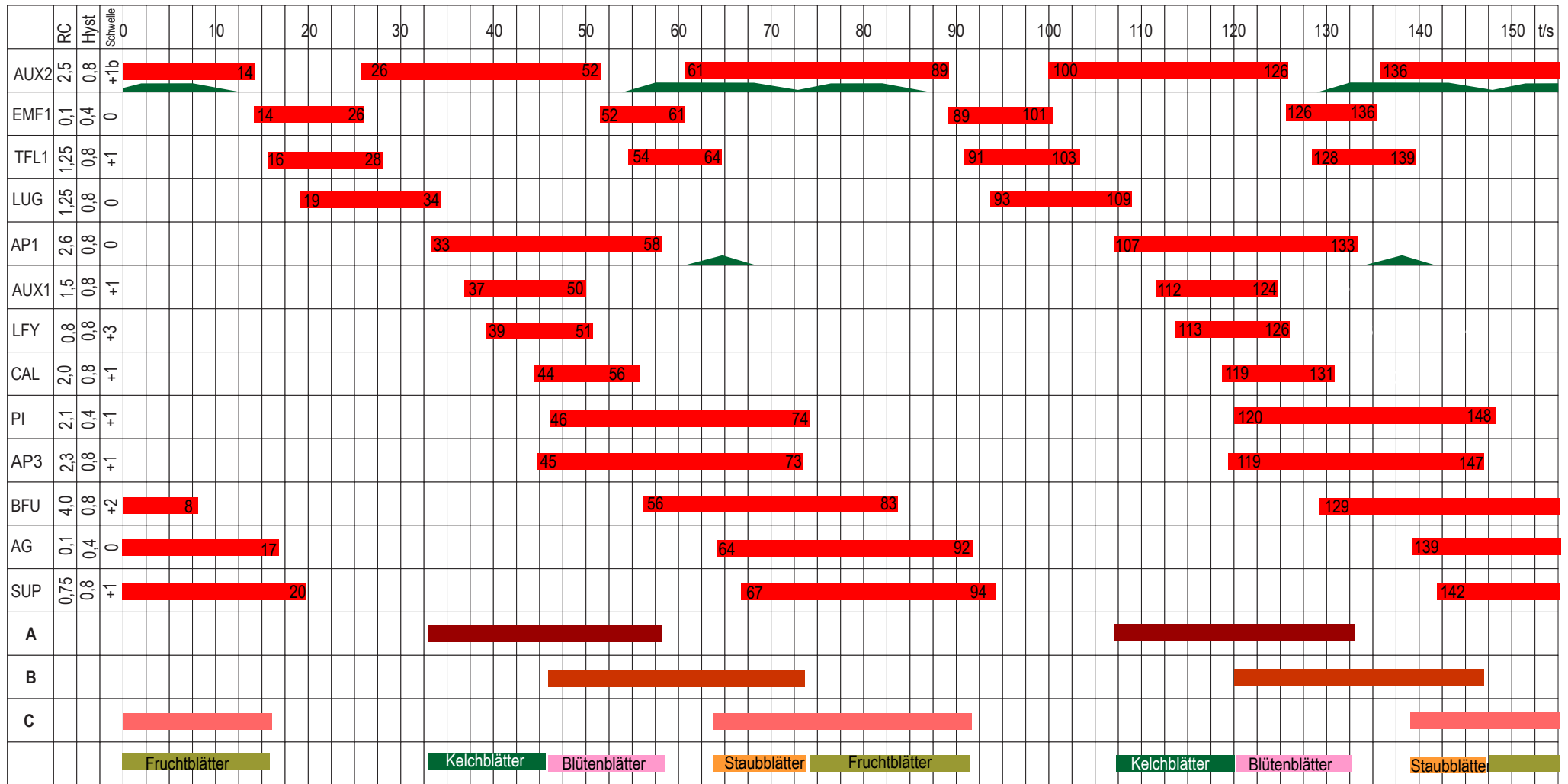
Da ein voller Simulationszyklus zweimal ein aktives

EMF1 Signal benötigt, müssen wir nach einem -A Signal Ausschau halten, das **AUX2** abschaltet und als Folge davon **EMF1** ein zweites Mal an. Ein Blick in das Zeitdiagramm zeigt uns, dass **AP3** diese Aufgabe übernehmen kann. Es schaltet also **AUX2** aus und damit **EMF1** an. Die zweite Hälfte des Zyklus kann somit beginnen.

Damit er ordnungsgemäß abläuft, muss nach kurzer Zeit **EMF1** über ein aktives **AUX2** Signal wieder abgeschaltet werden. Das erneute Aktivieren von letzterem übernimmt +A von **BFU**. Wenn **BFU** und **AP3** deaktiviert sind, kann schließlich -A vom **SUP** Gen-Baustein **AUX2** abschalten, womit **EMF1** wieder aktiv wird und ein neuer Zyklus beginnen kann.

Das Heranführen der Signale aus dem Schaltungsaufbau zum **AUX2** Gen-Baustein erfordert im rechten Teil des Aufbaus einige Umbauarbeiten. Das ergänzte Verbindungsdiagramm wird uns beim Aufbau eine Hilfe sein. Da wir jetzt 13 Gen-Bausteine versorgen müssen, ist der Netzbaustein an der Grenze seiner Leistungsfähigkeit. Bei Überhitzung kann er schon mal (reversibel) abschalten. In der Schaltung ist deswegen der Anschluss eines zweiten vorgesehen; beide teilen sich dann die Versorgung. Ehe er eingesetzt wird, muss unbedingt die rosa Verbindung aufgetrennt werden.

Lectron



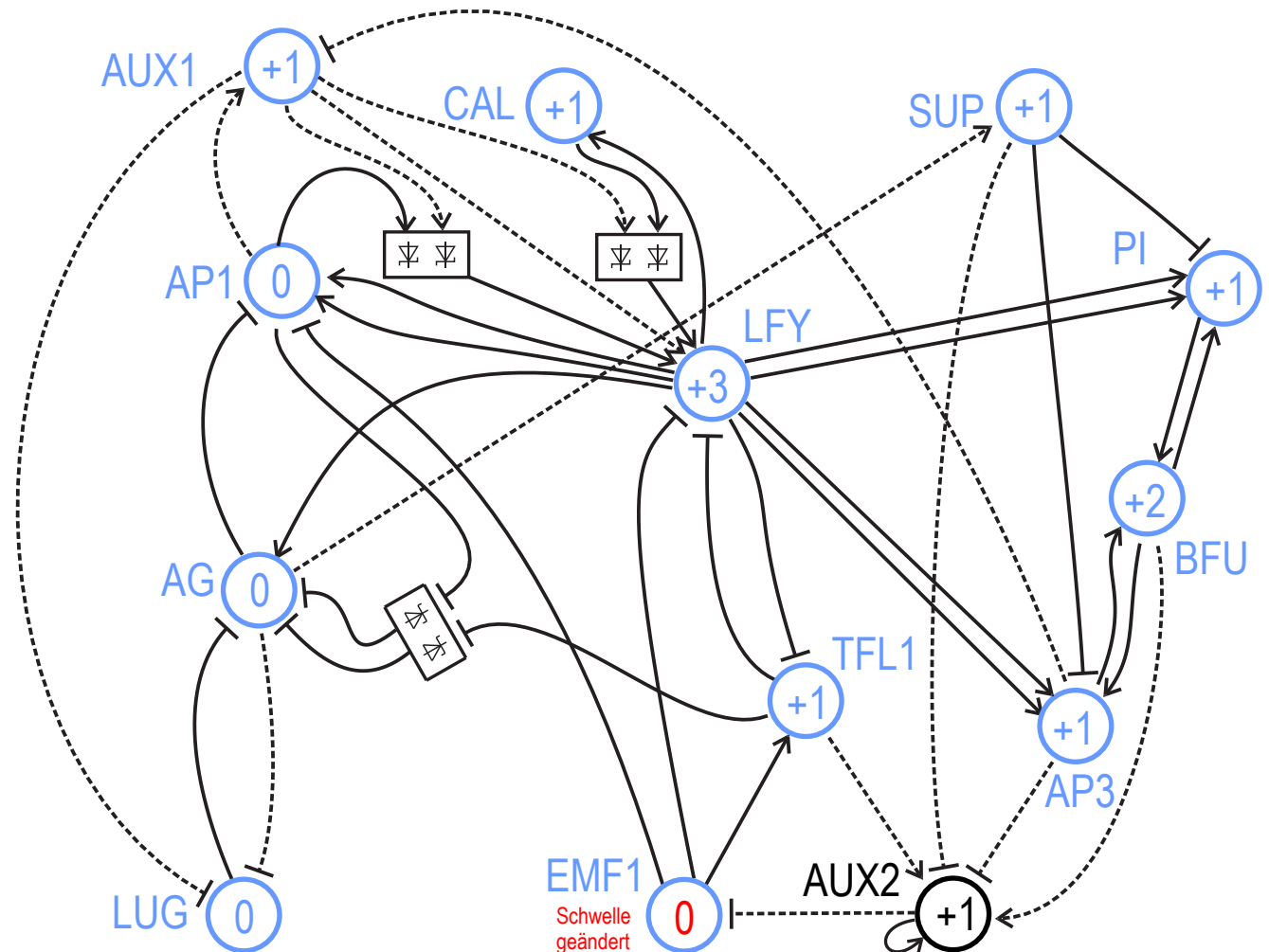


Lectron

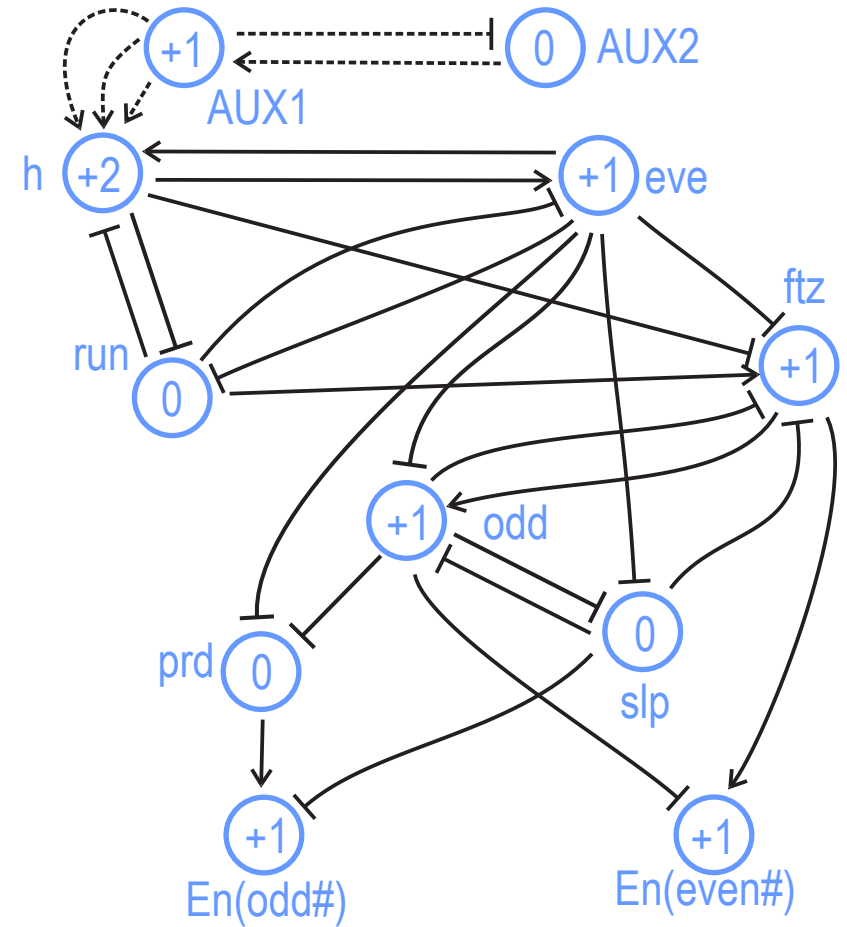
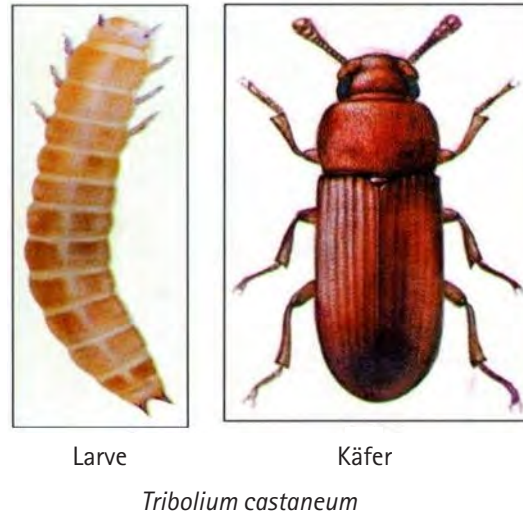
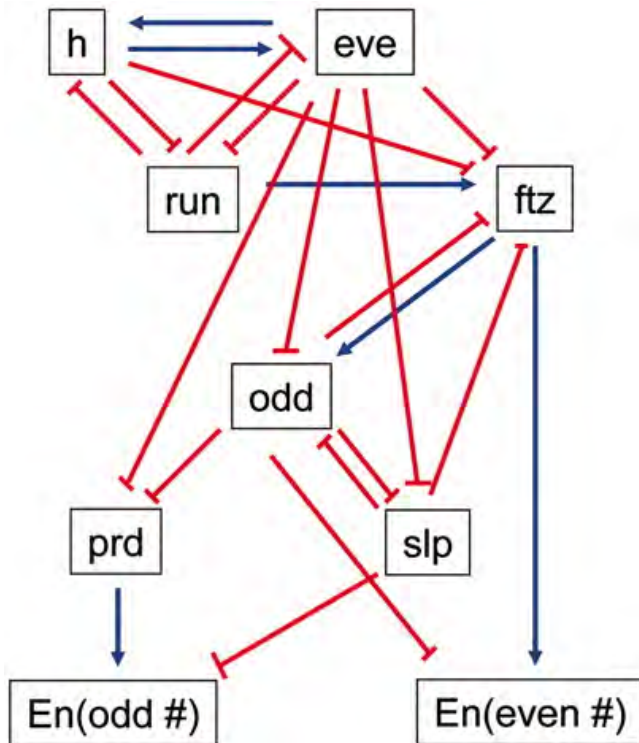
Das oben stehende Zeitdiagramm (Achtung, geänderte Einstellungen!) zeigt uns im Einzelnen, wie die Schaltvorgänge zyklisch ablaufen. Es fällt auf, dass die Periode im Vergleich zum Aufbau mit Timer kleiner geworden ist. Im Umkehrschluss bedeutet das, wir hätten beim Timer eine kürzere Periode einstellen können. Auch sind die beiden EMF1 Signale, die ja in einem Simulationszyklus auftreten, nicht exakt gleich lang.

Neben der kritischen Zeiteinstellung von AP1 und AG, die erhalten geblieben ist, tritt eine zweite beim AUX2 Baustein auf. An seiner grünen Leuchtdiode können wir erkennen, dass ab Sekunde 68 der Kondensator sich entlädt, weil zwei Signale SUP und AP3 hemmend auf AUX2 einwirken. AP3 schaltet gerade noch rechtzeitig ab, so dass AUX2 nicht zwischen durch abschaltet. Hier können die Zeiten vorsichtig verändert werden, um das Ganze zu optimieren. Die Schaltung selbst kennt keinen stabilen Zustand, sie ist im Grunde ein komplizierter Oszillator, der einige wenige der möglichen 2^{13} Zustände zyklisch durchläuft.

Verglichen mit dem Hefeaufbau brauchen wir relativ viele zusätzliche (gestrichelte) Beeinflussungsverbindungen. Ein Zyklus benötigt zwei »Anstöße«, deren Startbedingungen sich kaum unterscheiden, deren Unterschiede sich die Schaltung aber merken muss.



Lectron



aus: C.P. Choe et al., A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germ insect *Tribolium castaneum*, PNAS 103 (2006) 6560.
<http://www.pnas.org/content/103/17/6560.full>



Versuch 39

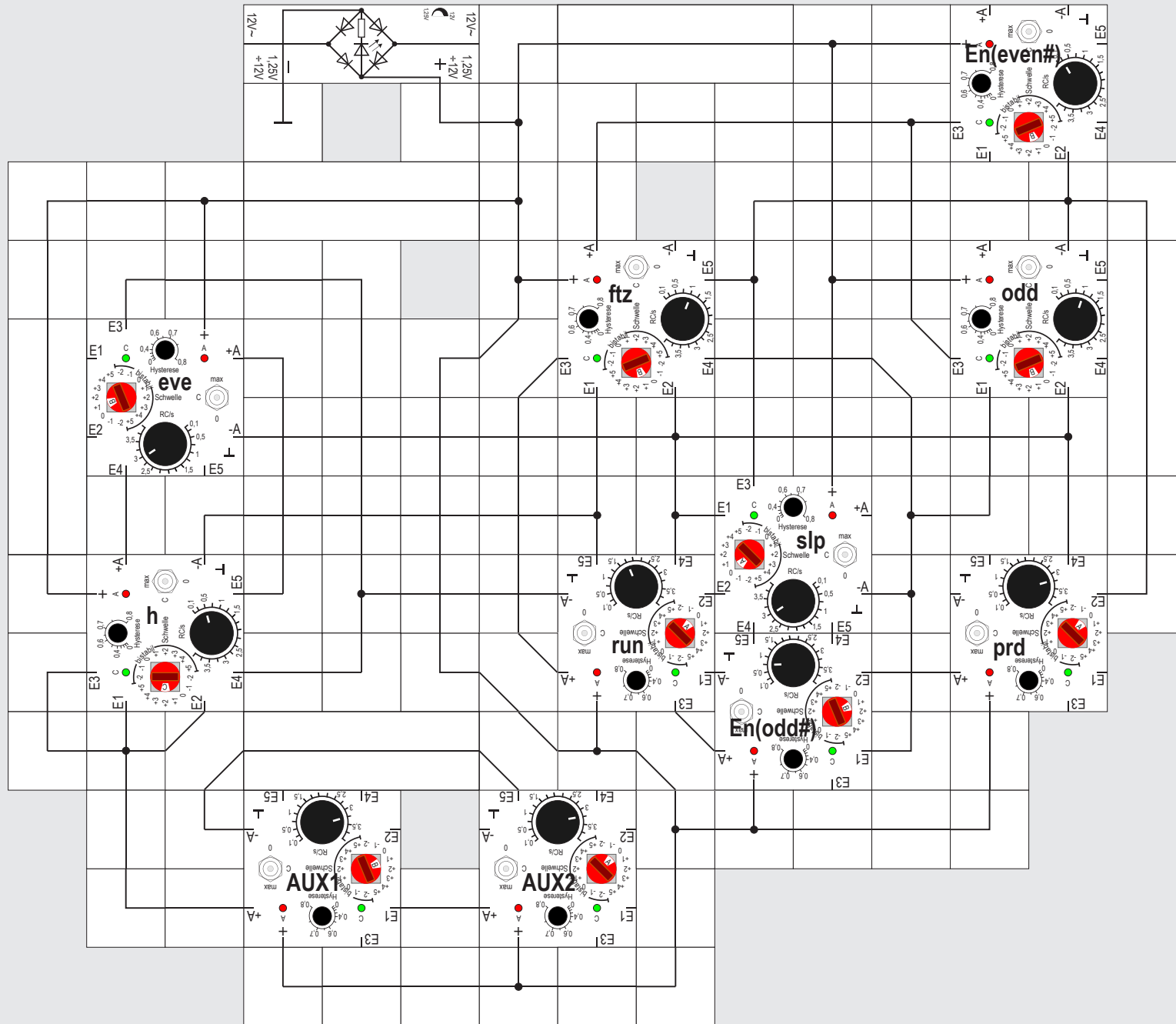
Simulation der Segmententwicklung bei der Reismehlkäferlarve

Nun wenden wir uns einem Beispiel aus der Entwicklungsbiologie zu, denn das Zusammenspiel der Zellen während der Entwicklung eines mehrzelligen Lebewesens wird häufig durch rhythmische Taktgeber in den Zellen gesteuert. Ein solcher Taktgeber, der bei der Segmentierung von Insektenembryos mitwirkt, ist das folgende Beispiel, das wir noch gut aufbauen können [16]. Es benötigt neun Gen-Bausteine und beschreibt, wie bei der Larvenentwicklung des Rotbraunen Reismehlkäfers (*Tribolium castaneum*) paarweise Segmente entstehen. "Der Käfer ist ein Vorratsschädling; unter optimalen Lebensbedingungen kann es schnell zu hohen Populationsdichten und starken Schäden an gelagerten Lebensmitteln kommen. Befallen werden Getreidearten und deren Erzeugnisse sowie Erbsen, Bohnen, Sämereien, Rosinen, Kakao, Sonnenblumenkerne, Erdnüsse usw." So finden wir es im Online-Lexikon. Und weiter "*Tribolium castaneum* ist dabei, sich zu einem wichtigen genetischen Modellsystem zu ent-

wickeln. Er ist seit dem 24. März 2008 der erste Käfer, dessen Erbgut sequenziert wurde; sein Genom umfasst 16.000 Gene davon einige hundert, die in *Drosophila* nicht gefunden wurden. Die Wissenschaft erhofft sich vom Modellsystem Mehlkäfer Erkenntnisse über die Embryonalentwicklung, die Metamorphose, die Evolution der Körpervielfalt und die Kontrolle von Schädlingen".

Bei der Analyse des untersuchten Gen-Netztes dieses prominenten Käfers, bei dem weder Gewichte der Eingangssignale noch Schwellenwerte der Gen-Bausteine angegeben sind, fällt uns zunächst ins Auge, dass die beiden Gene *h* und *eve* ++ gekoppelt sind. Das bedeutet, sie sind nach kurzer Zeit entweder beide an- oder beide abgeschaltet. Sind sie aktiv, so hemmen sie alle Gene im mittleren Bereich des Netztes. Von diesen Genen erhalten weder *run* noch *slp* noch *prd* aktivierende Signale anderer Gene. Damit sie überhaupt aktiv werden können, dürfen ihre Schwellen maximal auf 0 gestellt sein. Die beiden unteren Gene *En(odd#)* und *En(even#)* geben keine Signale ab, sie sind letztendlich für die Entwicklung eines Larvensegments mit ungerader bzw. gerader Ordnungsnummer verantwortlich. Wir können erwarten, dass sie bei der Simulation abwechselnd aktiv werden.

Wir möchten – wie auch bei den vorangegangenen Simulationen – das Ganze periodisch ablaufen lassen, auch wenn es sich so in Wirklichkeit nicht abspielt. Schließlich kann die Larve nicht ständig Segmente aufbauen. Am einfachsten ist es deswegen, wir bauen zusätzlich einen externen Taktgeber an das Netz, der *h* und *eve* periodisch an- und abschaltet, von selbst tun sie es ja nicht. Da wir dieses Mal noch Gen-Bausteine übrig haben, nehmen wir eine Oszillatorschaltung mit zwei Bausteinen *AUX1* und *AUX2* und können dann die An- und Auszeiten getrennt einstellen. Auf der folgenden Seite ist ein möglicher kompakter Aufbau abgebildet. Da unbenutzte Eingänge verschiedener Gen-Bausteine miteinander verbunden werden dürfen, sind *run*, *slp* und *En(odd#)* eng benachbart. Die ungewollte Verbindung -A von *En(odd#)* zu E1 von *run* wird durch die Verbindung +A *En(odd#)* zu E3 *run* kompensiert. Der Einfachheit halber werden die Schwellen von *eve*, *ftz*, *odd*, *En(odd#)*, *En(even#)* und *AUX1* erst einmal auf +1 gestellt. Damit der Oszillator schwingt, muss die *AUX2* Schwelle auf 0 sein. Der externe Takt kann nur wirksam schalten, wenn er mit Gewicht 3 auf *h* einwirkt, dessen Schwelle dann auf +2 gestellt sein muss. Das detaillierte Verbindungsnetz ist oben dargestellt.

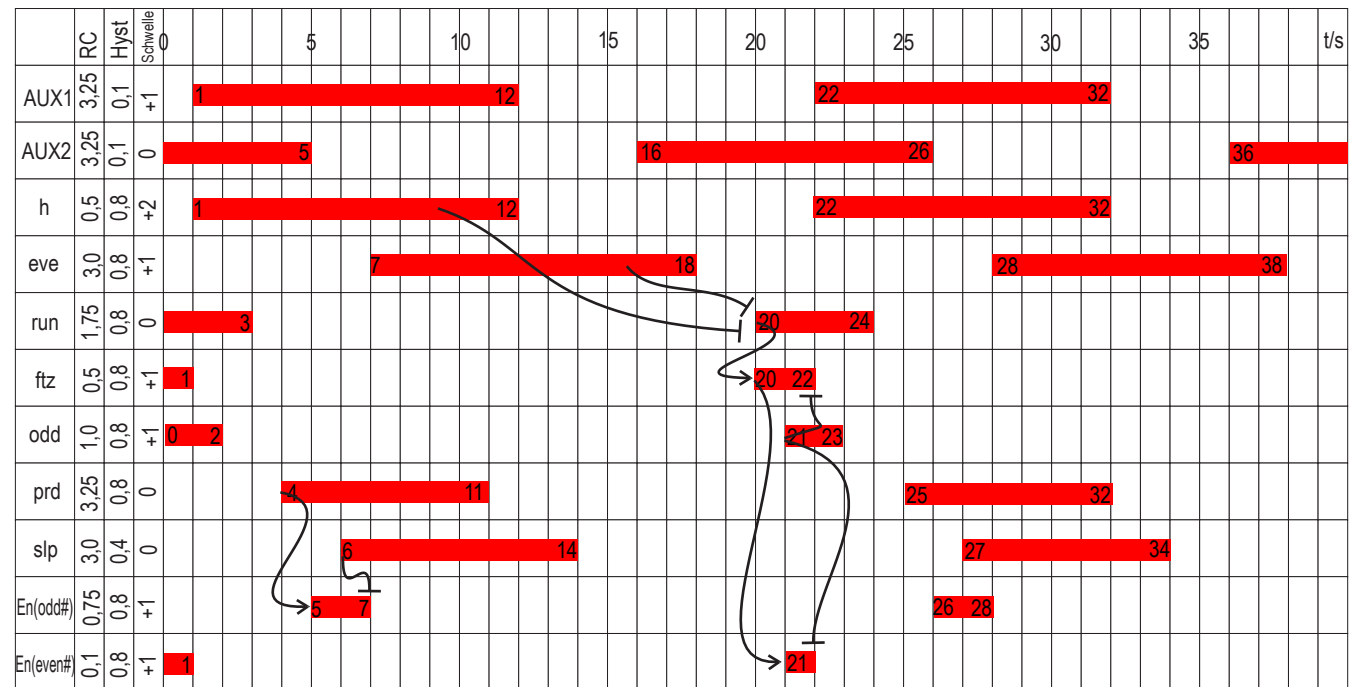




Lectron

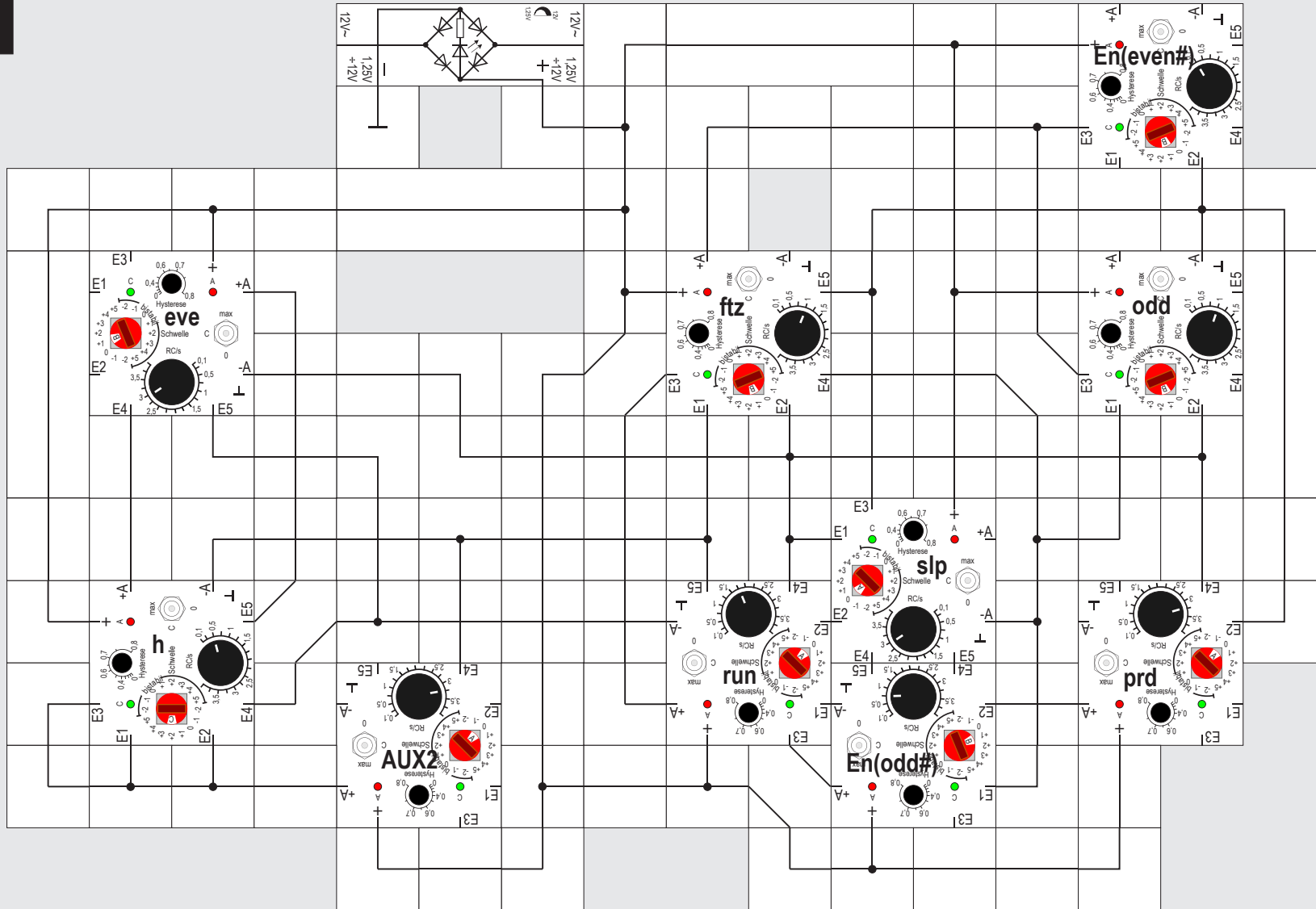
Wenn der Aufbau fertig und überprüft worden ist, hat man - selbst wenn die Schwellen nach den Anfangsbetrachtungen festgelegt sind - eine unüberschaubare Anzahl von Möglichkeiten, die Zeitkonstanten und Hysterese - Werte an den einzelnen Bausteinen einzustellen. Damit das nicht ganz planlos vonstatten geht, ist ein Ablaufdiagramm angegeben, bei dem es bereits gelungen ist, **En(odd#)** und **En(even#)** wenn auch nur kurzzeitig nacheinander aktiv werden zu lassen. Das beweist zumindest, unsere Schwelleneinstellung kann so ganz falsch nicht gewesen sein.

Die seitlich im Diagramm angegebenen RC- und Hysterese - Einstellungen sind allerdings nur Anhaltswerte. Wir können nicht erwarten, dass bei dieser Einstellung genau dieser Zeitablauf der Signale herauskommt. Es zeigt sich nämlich, dass bei diesem Netz viel Geduld und Fingerspitzengefühl nötig sind, damit der gewünschte Ablauf zustande kommt. Wegen der relativ starken Vernetzung ändert sich selbst beim vorsichtigen Ändern einer Zeitkonstanten - mehrere gleichzeitig sollten sowieso nicht geändert werden - häufig an ganz anderen Stellen im Netz etwas, womit man nicht gerechnet hatte. Als zusätzliche Einstellhilfe sind im Diagramm noch die wesentlichen Abhängigkeiten der Signale untereinander angegeben. Beispielsweise



wird **En(odd#)** von **prd** eingeschaltet und von **slp** wieder ausgeschaltet. Ähnliches gilt für **En(even#)**: **ftz** schaltet es ein, **odd** schaltet es aus. Da **AUX1** und **h** immer gleichzeitig schalten, kön-

nen wir **AUX1** aus dem Aufbau herausnehmen und den Oszillator mit **h** und **AUX2** realisieren. Wir erhalten dann den auf der nächsten Seite abgebildeten einfacheren Aufbau.

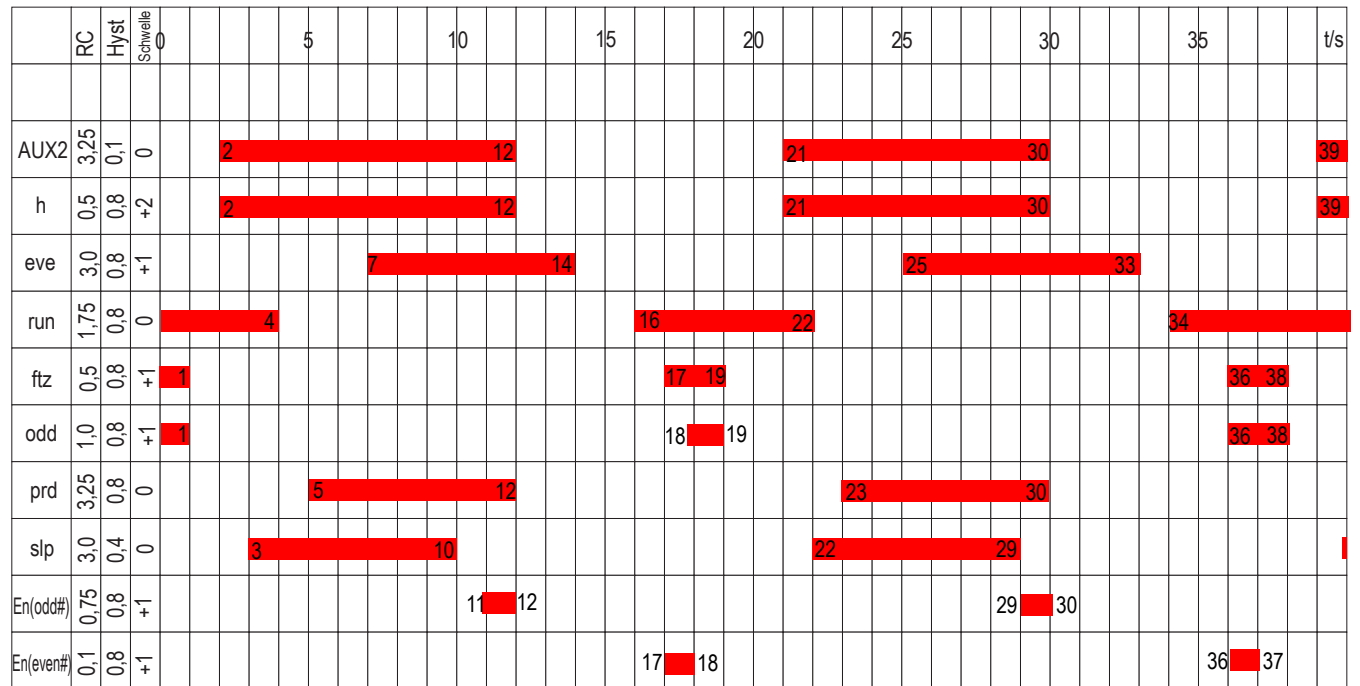




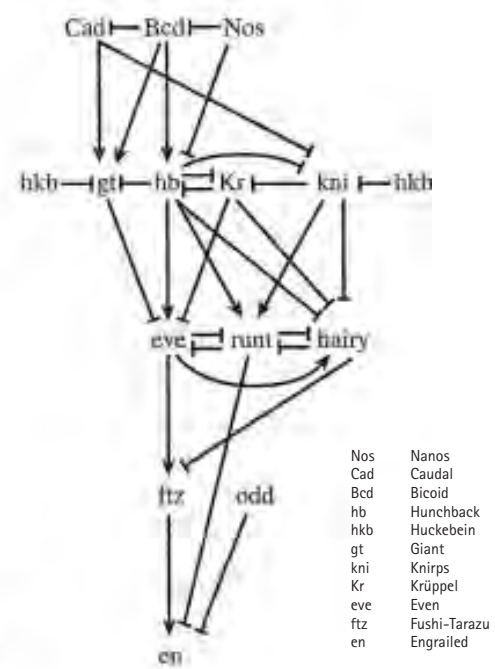
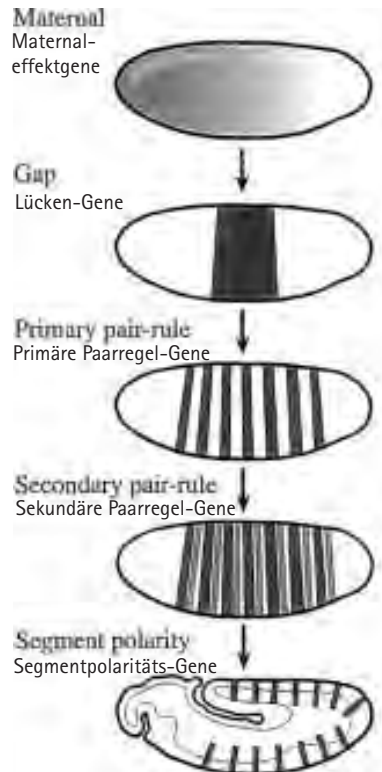
Versuch 39A

Segmententwicklung bei der Reismehlkäferlarve Alternativer Aufbau

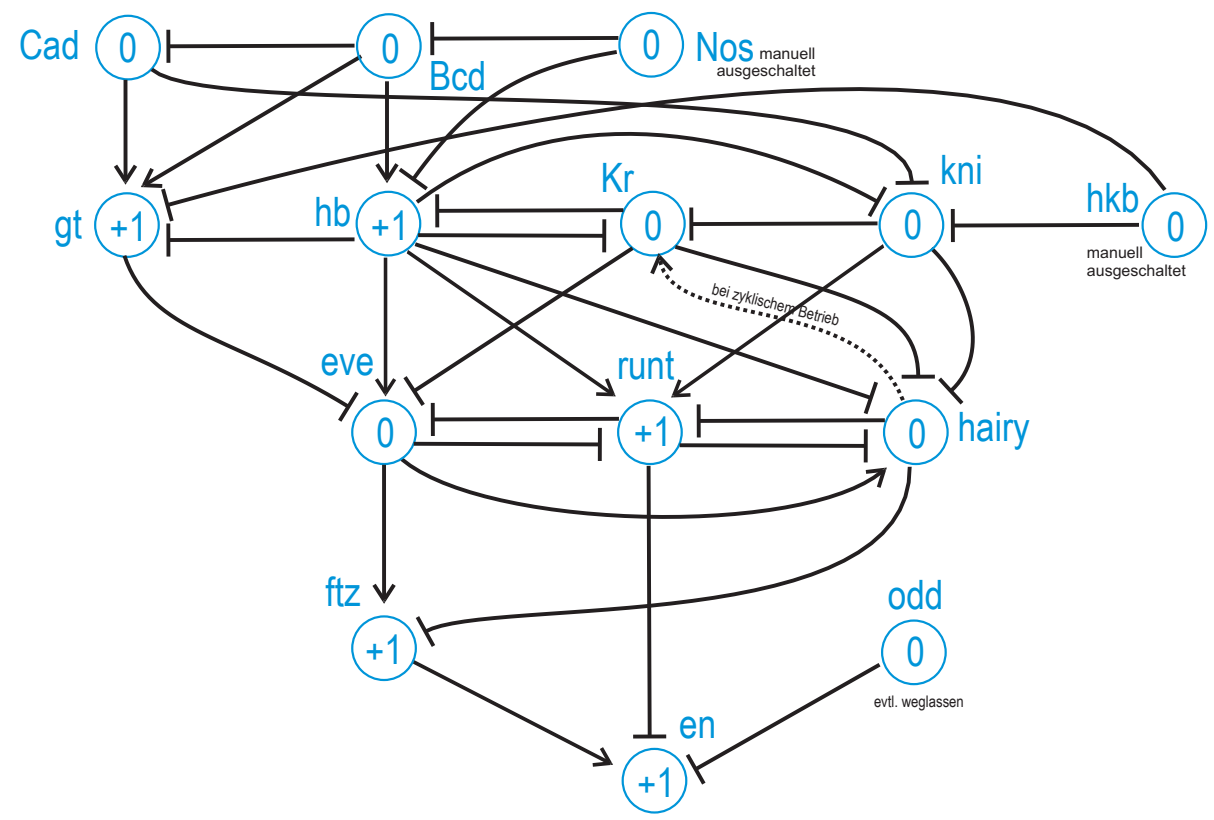
Auch bei diesem Aufbau müssen wir wieder mit Geduld und Fingerspitzengefühl beim erneuten Einstellen von RC und Hysterese vorgehen, um ein Zeitdiagramm wie das abgebildete zu erhalten. Die seitlich angegebenen Einstellwerte sind wieder nur als Anhaltswerte zu betrachten; wir nehmen sie als Voreinstellung und versuchen durch vorsichtiges Verändern immer nur einzelner Einstellungen eines Gen-Bausteins bessere Ergebnisse zu erhalten. Wir werden erstaunt sein, was es bei unseren Versuchen den Durchlauf zu optimieren für merkwürdige Signalfolgen gibt. Insofern ist dieses mehr oder weniger zufällig gewählte Beispiel eines Gen-Netzes aus der Entwicklungsbiologie vielleicht doch schon zu kompliziert, um es sofort zu durchschauen.



Lectron



Nos Nanos
 Cad Caudal
 Bcd Bicoid
 hb Hunchback
 hkb Hucklebein
 gt Giant
 kni Krüppel
 Kr Krüppel
 eve Even
 ftz Fushi-Tarazu
 en Engrailed



Sean B. Carroll, Jennifer K. Grenier, and Scott D. Weatherbee (2001)
 From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal
 Design, Blackwell Publishing:Cambridge, MA, p. 59, fig. 3.5



Versuch 40

Simulation der Segmententwicklung bei der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Nach dem Beispiel der exotischen Maiskäferlarve wollen wir ein Regulationsnetz der Larve eines kleinen wohlbekanntesten Insekts, nämlich der Frucht- oder Taufliege *Drosophila melanogaster* [17], unter die Lupe nehmen.

Das fertige etwa 3mm große Insekt ist vor allem dadurch bekannt, dass es auf verdorbenem Obst in Schwärmen vorkommt. Allerdings ist es seit fast einem Jahrhundert auch das Modelllebewesen für Entwicklungsbiologen und Genetiker. Sie klärten an ihm die grundlegenden genetischen Steuerungsmechanismen in der Embryonalentwicklung auf.

Warum ausgerechnet diese Fruchtfliege?

Es liegt vor allem an ihrer kurzen Generationszeit von weniger als zwei Wochen und an ihrer einfachen und billigen Haltung; selbst wenn für Versuche große Mengen an Fliegen benötigt werden, ist das kein Problem. Mittlerweile gibt es für sehr viele der rund 14.000 Gene in *Drosophila* Mutanten und erste Versionen ihres Genoms sind seit dem Jahr 2000 bekannt.

Drosophila besitzt vier Chromosomenpaare, das gesamte Genom ist etwa 165 Millionen Basen groß und enthält rund 14.000 Gene. Zum Vergleich: der Mensch hat etwa 3,4 Milliarden Basen und 20.000 Gene, die Hefe lediglich 5.800 Gene in 13,5 Millionen Basen.

Drosophila melanogaster ist mittlerweile so bekannt, dass ein Biologieunterricht, in dem sie nicht erwähnt wird, kaum vorstellbar ist. So wurden an ihr im Bereich der Genetik die Regeln der Vererbung aufgeklärt oder die Erkenntnisse gewonnen, dass Gene für Proteine kodieren.

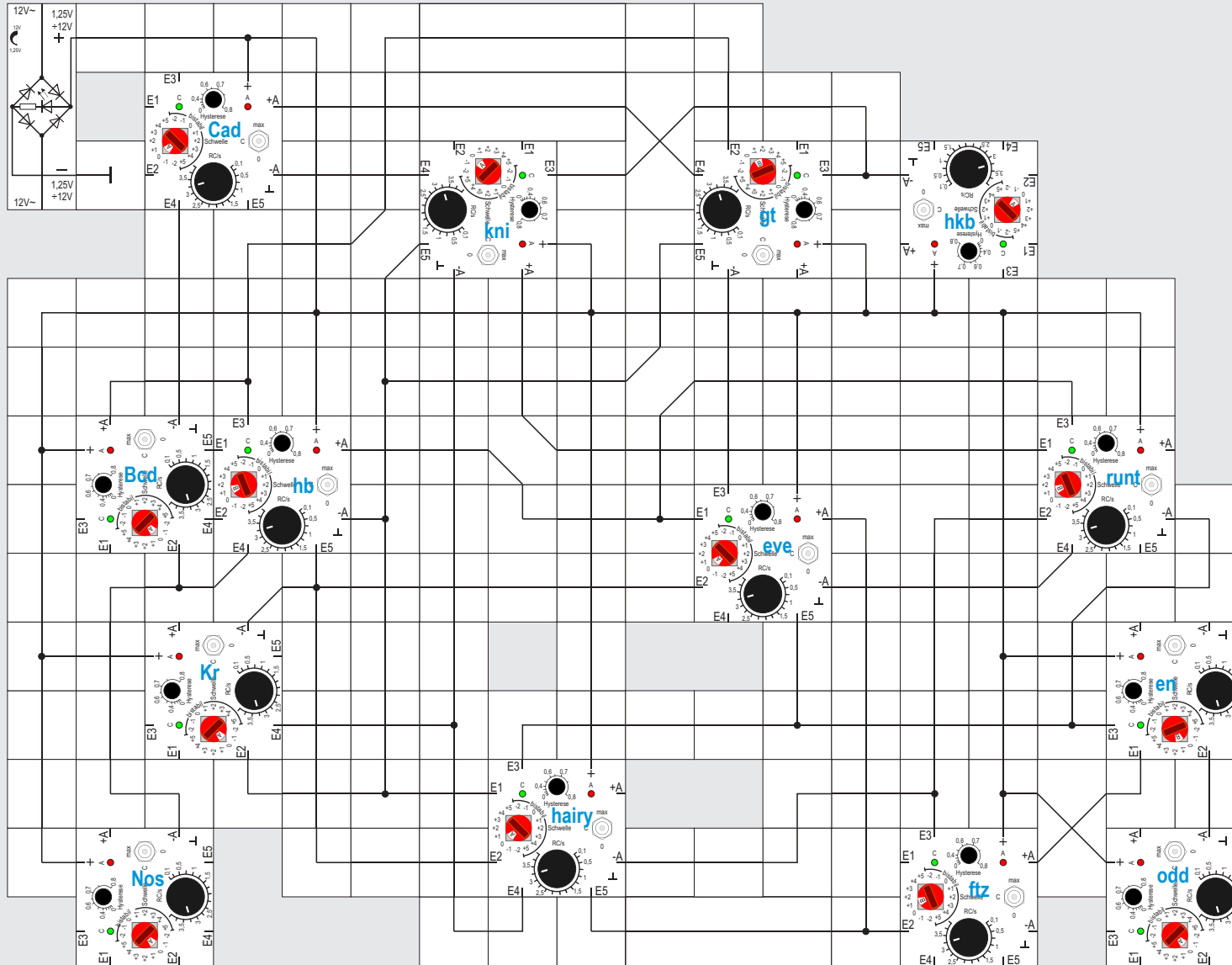
Bei ihr kann sehr genau untersucht werden, wie aus einem einfachen befruchteten Ei über die Embryonal- und Organentwicklung ein komplexer Organismus entsteht. Damit beschäftigt sich auch das gefundene Regulationsnetz.

In der Abbildung sehen wir links im linken Bild die Strukturen wie sie beim Embryo der *Drosophila* Gen-gesteuert zeitlich und räumlich beobachtet werden und rechts das gefundene Gen-Regulationsnetz, das diese Struktur bewirkt.

Insgesamt sind 14 Gene (einige kennen wir bereits) dafür verantwortlich, die auf fünf Hierarchiestufen nacheinander aktiv werden. Da wir nur 13 Gen-Bausteine haben, müssen wir überlegen, welches wir weglassen, wenn wir keinen zukaufen wollen.

Ein kurzer Blick auf das Gen-Netz zeigt, dass es drei Gene **Nos**, **hkb** (aus Gründen der Übersichtlichkeit wohl doppelt gezeichnet) und **odd** gibt, die keine Eingangssignale bekommen und nur hemmende Ausgangssignale abgeben. Damit überhaupt etwas Beobachtbares in Gang kommt, müssen die entsprechenden Gen-Bausteine nach Anlegen der Versorgungsspannung selbsttätig aktiv werden, dürfen also höchstens die Schwelle 0 haben. Sind sie dann aktiv, greifen sie hemmend in das Geschehen ein und es passiert dann nichts mehr. Am übersichtlichsten ist es, **odd** wegzulassen. Ist **odd** aktiv, wird lediglich **en** gehemmt. Auch **hkb** und **Nos** sollten zunächst manuell abgeschaltet werden (Kippschalter auf 0) oder - besser noch - gar keine Versorgungsspannung bekommen. Da die betreffenden Bausteine an den Ecken des Aufbaus liegen, lässt sich das leicht bewerkstelligen. Der bei so vielen zu versorgenden Gen-Bausteinen an der Grenze seiner thermischen Leistungsfähigkeit arbeitende Netzbau-stein wird dann nicht ganz so warm.

Bei diesem Netz sind zwar die aktivierenden und hemmenden Signale angegeben; was fehlt, sind wieder die Schwellen. Sie sollten grundsätzlich erst einmal niedrig eingestellt sein, damit ansteuernde Signale sie erreichen können und dann als Folge der Gen-Baustein aktiv wird.





Für **Bcd**, der jetzt in der Hierarchie oberste Baustein ohne Eingangssignal, bietet sich die Schwelle 0 an, damit er selbsttätig aktiv werden kann. Das Gleiche gilt für **Cad**, er benötigt darüber hinaus noch einen gegenüber **Bcd** kleineren RC-Wert, damit er wenigstens kurzzeitig aktiv wird, bevor **Bcd** ihn hemmt. Auf der nächsten Stufe können **gt** und **hb** als Schwelle +1 bekommen, da sie aktivierende Signale erhalten. **Kr** und **kni** dagegen werden nur mit hemmenden Signalen angesteuert, hier ist Schwelle 0 wieder angebracht.

Bei dem manuell zu schaltenden **Nos**-Baustein ist es genauso unwichtig wie beim eine Stufe tiefer angeordneten **hkb**-Baustein, welche Schwelle eingestellt ist, da sie allenfalls manuell betätigt werden. **eve** und **hairy** werden von überwiegend hemmenden Signalen angesteuert, deswegen wählen wir Schwelle 0, bei **runt** könnte die Schwelle +1 erreicht werden. Bleiben schließlich noch **ftz** und **en** übrig. Hier probieren wir zunächst mit Schwelle +1, ob noch eine Aktivierung stattfindet.

Ein möglicher platzsparender Aufbau mit allen 14 Gen-Bausteinen ist oben abgebildet; nach Bedarf können - wie erwähnt - **Nos**, **hkb** und **odd** stillgelegt oder ganz weggelassen werden.

Betrachten wir die wechselseitigen Beziehungen des

Netzes näher, fällt uns wahrscheinlich auf, dass es einige Gen-Paare gibt, die sich als Wechselschalter (siehe Versuche Nr. 9 und 14) gegenseitig hemmen. Solche Paare sind **hb** \leftrightarrow **Kr**, **eve** \leftrightarrow **runt**, **runt** \leftrightarrow **hairy** und in indirekter Weise (über **Kr**) **hb** \leftrightarrow **kni**. Dass ein Gen wie **runt** in mehr als einer Wechselbeziehung auftaucht, die Wechselschalter also koppelt, macht es uns nicht gerade leicht zu erkennen, wie der Vorgang ablaufen wird.

Legen wir Versorgungsspannung an das Netz, wie es auf vorheriger Seite abgebildet ist (**Nos**, **hkb** und **odd** deaktiviert), so ist es schon erstaunlich, wie sich das Netz bei den angegebenen Schwellen und bei den mehr oder weniger zufälligen RC- und Hysterese-Einstellungen verhält. Alle Gen-Bausteine werden in der Folge zeitweise aktiv, bis nach knapp 40 Sekunden vier (**Bcd**, **hb**, **eve** und **hairy**) dauernd angeschaltet bleiben. Das Ablaufdiagramm mit Angaben für Schwellen- und Hysterese- sowie RC-Einstellungen ist auf folgender Seite zu finden.

Schalten wir hingegen die Versorgungsspannung ein und lassen den **Nos**-Schalter auf C und seine Schwelle auf 0, so erhalten wir einen kürzeren Durchlauf, bei dem **hb** gar nicht aktiviert wird und zum Schluss **Cad**, **gt** und **Kr** aktiv bleiben.

Steht anfangs der **hkb**-Schalter auf C (Schwelle auf

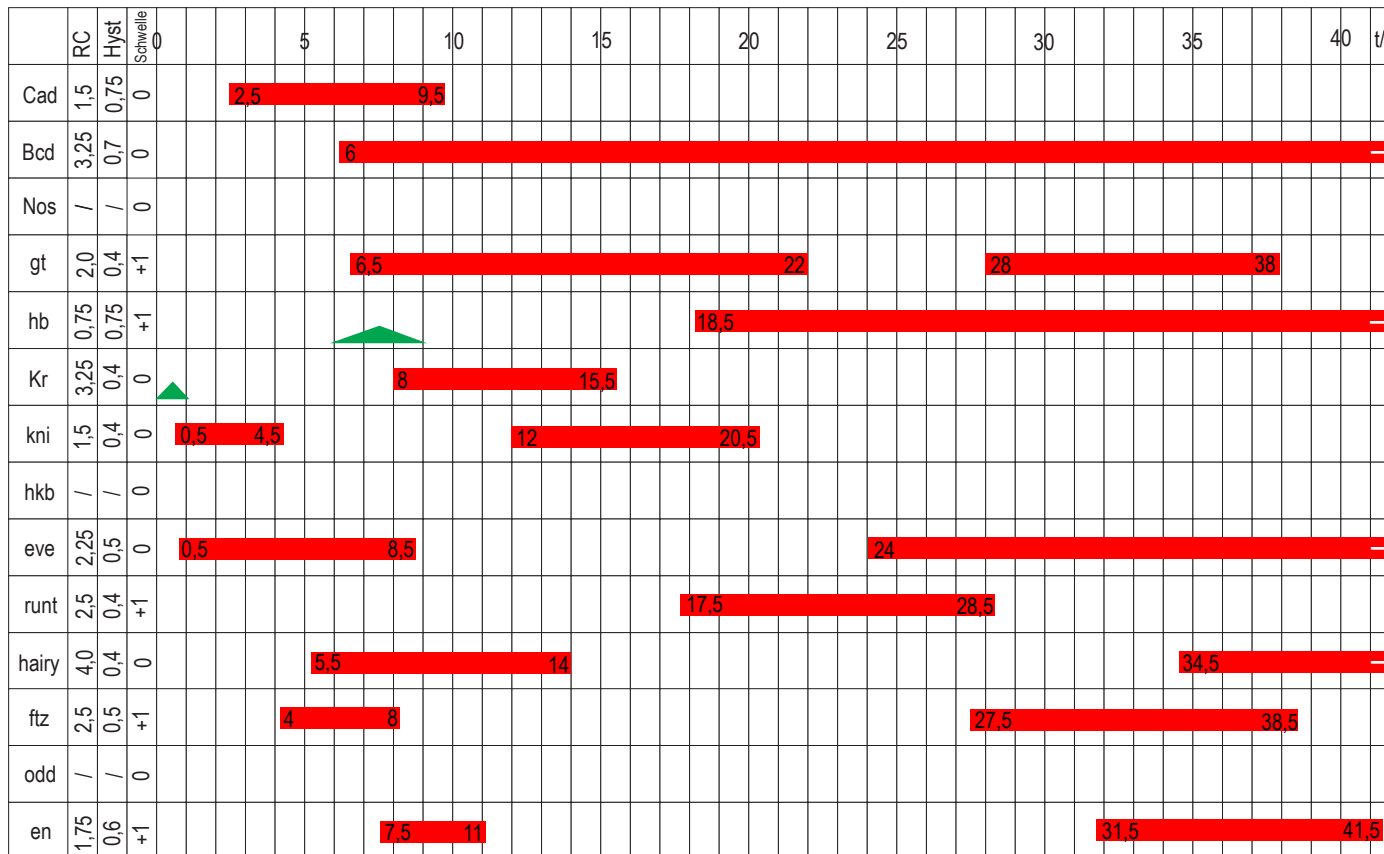
0), gibt es wiederum einen kürzeren, aber anderen Durchlauf, bei dem **runt** nicht aktiv wird und schließlich **Bcd** und **Kr** aktiv bleiben.

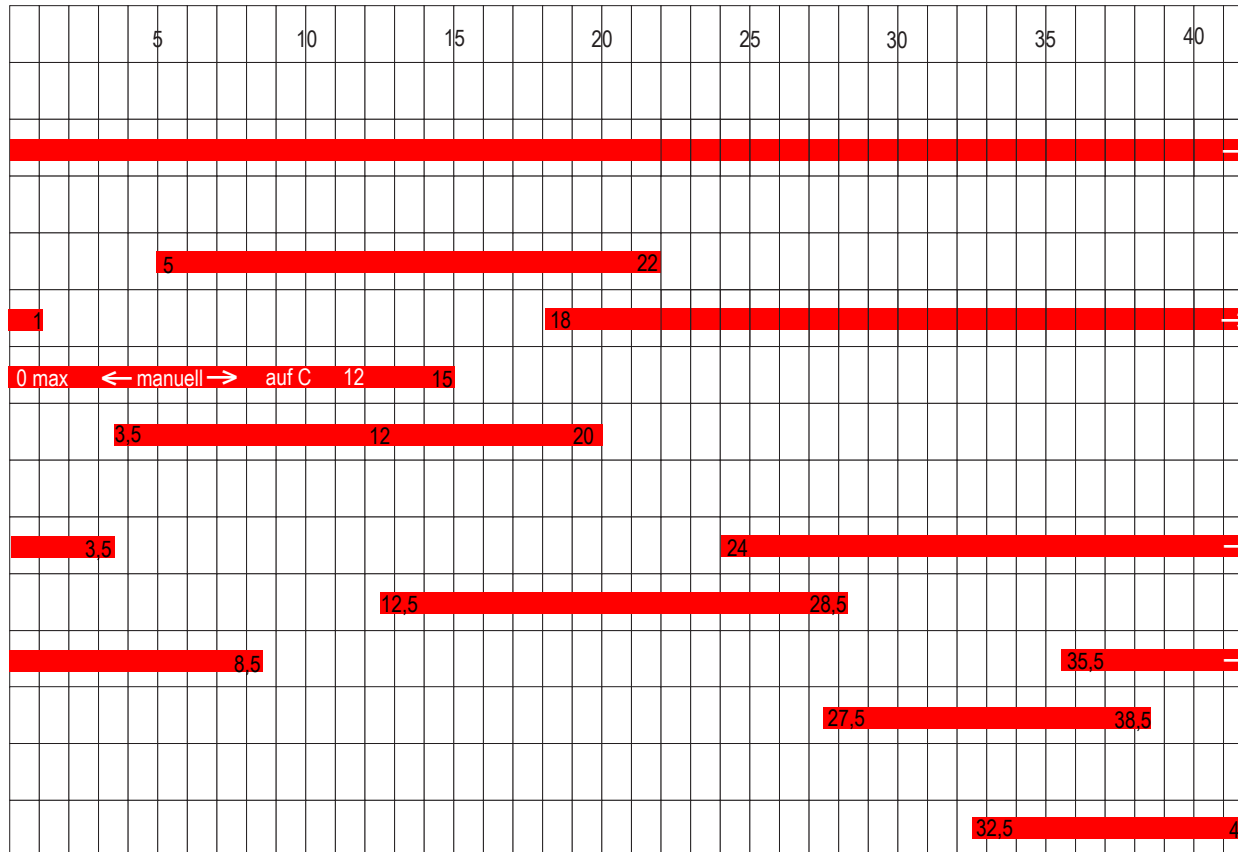
Die Kombination aus beiden (**Nos**- und **hkb**-Schalter auf C) führt dazu, dass weder **hb** noch **runt** überhaupt aktiv werden, aber **Cad** und **Kr** letztlich aktiv sind.

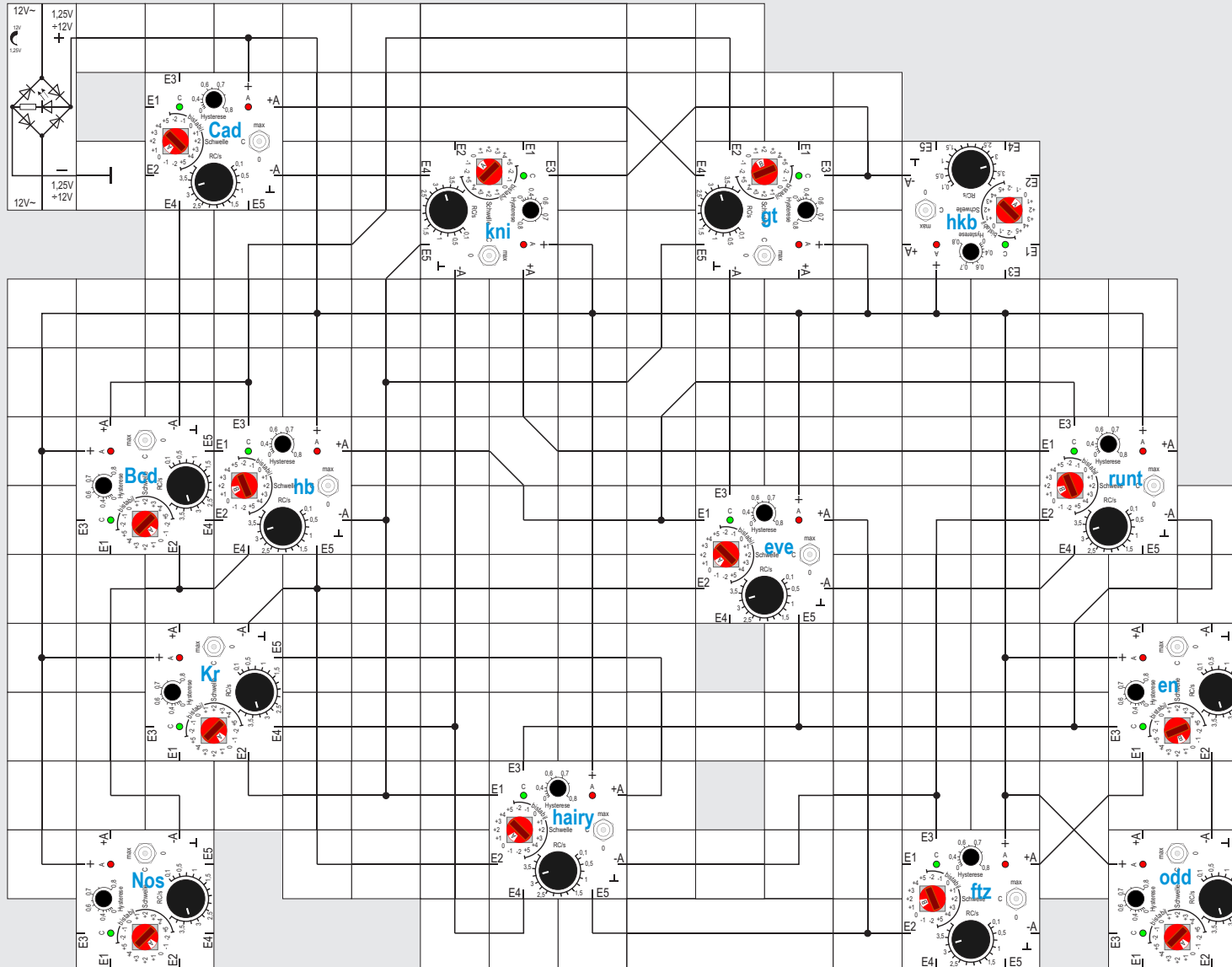
Kehren wir zum ersten Durchlauf zurück, bei dem **Nos** und **hkb** abgeschaltet waren, dann ist ja nach knapp 40 Sekunden der Endzustand erreicht. Schalten wir jetzt den **Kr**-Schalter manuell auf max und nach circa 12 Sekunden auf C, so beginnt ein neuer Durchlauf, dessen Zeitdiagramm ebenfalls angegeben ist. Es ähnelt dem ersten, wenngleich auch Unterschiede zu erkennen sind; der stabile Zustand ist nach gut 40 Sekunden mit **Bcd**, **hb**, **eve** und **hairy** aktiv wiederum erreicht.

Der Start braucht nicht manuell mit dem **Kr**-Schalter vorgenommen zu werden, der **hairy** - Baustein kann das mit seinem +A Signal auch automatisch besorgen: Wir verbinden den Ausgang mit einem Eingang des **Kr**-Bausteins (s. weiteres Aufbaubild S.130) und können nun das Ganze zyklisch laufen lassen. Betont werden muss aber wieder, dass diese Verbindung in der Realität nicht vorhanden ist, sondern nur für Show-Effekte eingeführt wurde.

Lectron

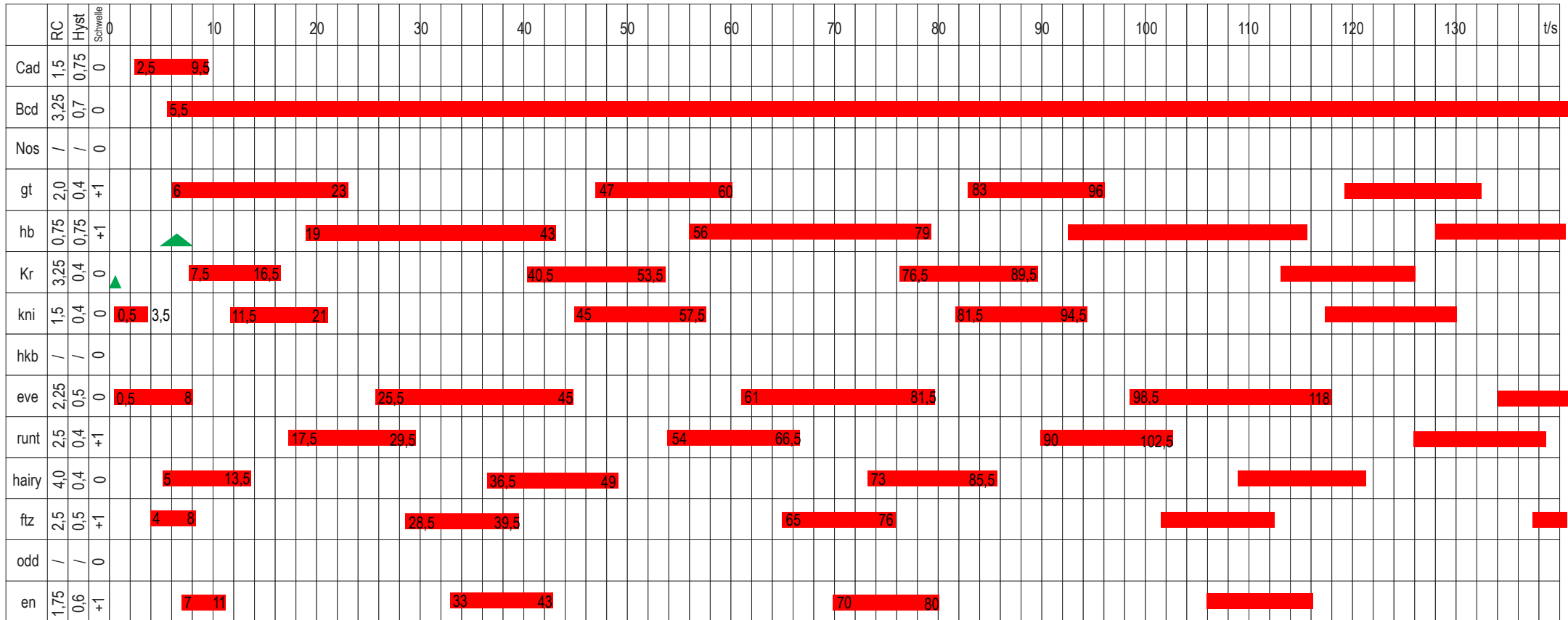




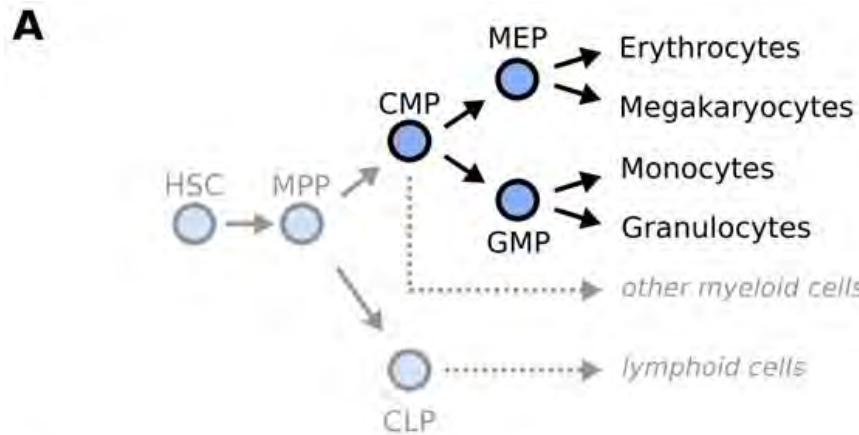




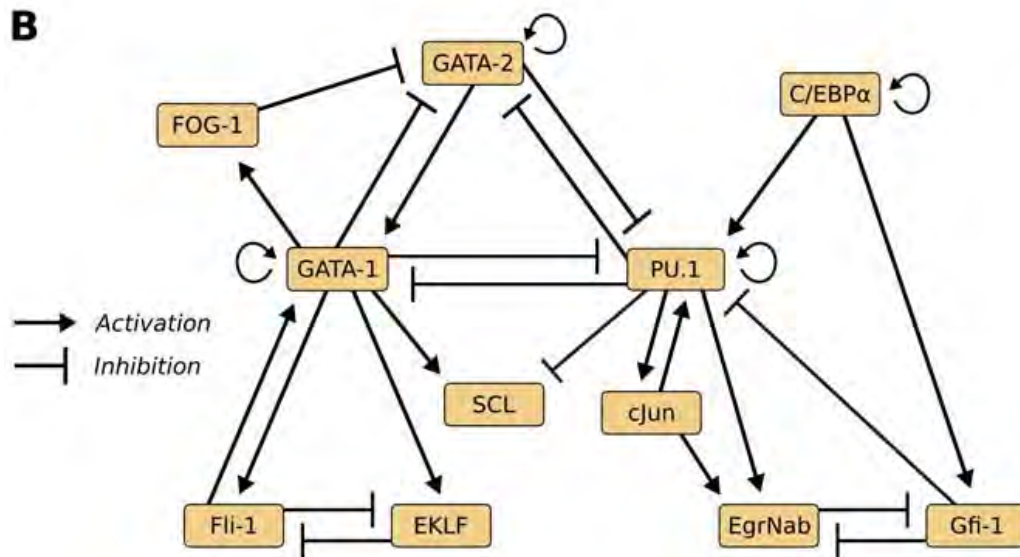
Lectron



Lectron



aus: J. Krumsiek, C. Marr, T. Schroeder, F.J. Theis, Hierarchical Differentiation of Myeloid Progenitors Is Encoded in the Transcription Factor Network, PLoS ONE 6 (2011) e22649.



| Factor | Boolean update rule |
|----------------|--|
| GATA-2 | $GATA-2 \wedge (\overline{GATA-1} \wedge \overline{FOG-1}) \wedge \overline{PU.1}$ |
| GATA-1 | $(GATA-1 \vee GATA-2 \vee Fli-1) \wedge \overline{PU.1}$ |
| FOG-1 | $GATA-1$ |
| EKLF | $GATA-1 \wedge \overline{Fli-1}$ |
| Fli-1 | $GATA-1 \wedge \overline{EKLF}$ |
| SCL | $GATA-1 \wedge \overline{PU.1}$ |
| C/EBP α | $C/EBP\alpha \wedge (\overline{GATA-1} \wedge \overline{FOG-1} \wedge \overline{SCL})$ |
| PU.1 | $(C/EBP\alpha \vee PU.1) \wedge (\overline{GATA-1} \vee \overline{GATA-2})$ |
| cJun | $PU.1 \wedge \overline{Gfi-1}$ |
| EgrNab | $(PU.1 \wedge cJun) \wedge \overline{Gfi-1}$ |
| Gfi-1 | $C/EBP\alpha \wedge \overline{EgrNab}$ |



Versuch 41

Simulation der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen

Unser nächstes Beispiel beschäftigt sich mit einer Simulation aus dem Bereich der Stammzellforschung, genauer: mit den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen HSC [18]. Sie kommen hauptsächlich im Knochenmark vor und werden auch Blutstammzellen genannt.

Sie sind der Ausgangspunkt für die gesamte Zellneubildung des Blutes und des Abwehrsystems (Hämatopoese).

Aus dem Diagramm für das Regulationsnetz geht hervor, dass aus den Stammzellen HSB vier verschiedene Endprodukte durch unterschiedliches Aktivieren oder Hemmen von elf beteiligten Genen gebildet werden können.

Erythrozyten sind nichts anderes als die roten Blutkörperchen, die häufigsten Zellen im Blut von Wirbeltieren. Sie dienen dem Transport von Sauerstoff und sind in der Mitte eingedellte Scheiben ohne Zellkern.

Megakaryozyten gehören zu den blutbildenden Zellen im Knochenmark und sind Vorläuferzellen der Thrombozyten (Blutplättchen), die für die Blutgerinnung zuständig sind.

Monozyten sind im Blut zirkulierende Zellen des Im-

munsystems und sorgen für die Zerstörung körperfremder Strukturen. Die Monozyten sind besonders große weiße Blutkörperchen (Leukozyten).

Granulozyten sind kleine weiße Blutkörperchen. Sie machen den Großteil aller Leukozyten aus und können die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern. Ihre Funktion liegt vor allem in der unspezifischen Abwehr von Bakterien, Parasiten und Pilzen. Einige sind dabei in der Lage, Krankheitserreger in sich aufzunehmen und zu zerstören. Daher werden sie zu den »Fresszellen« gezählt.

Die Steuerung der Differenzierung der verschiedenen Blutzelltypen aus einem Vorläuferzelltyp, dem Blutstammzelltyp HSC, wird ebenfalls wie schon die Zellteilung und die embryonale Musterbildung durch ein biochemisches Steuerungsnetz kontrolliert. Die Zellregulation dieser Prozesse ist besonders für die Krebsforschung interessant, da Fehlsteuerungen der Zelle Ursachen für Krankheiten sein können, das hier betrachtete Beispiel hängt mit der Entstehung von Leukämie zusammen.

Nehmen wir also das Regulationsnetz aus der hier ausgewählten Publikation und gehe wir in gewohnter Weise von dem Diagramm aus und versuchen einen Aufbau, so stehen wir wieder vor dem Problem, dass wir zunächst weder die an den Gen-Bausteinen einzustellenden Schwellen noch die Gewichte der Signale

kennen. Zum Glück hilft uns der Text hier weiter. Wir finden die oben abgebildete Tabelle, in der für jedes Gen die logische Verknüpfung seiner Eingangssignale zum folgenden Zeitschritt angegeben ist. Leider ist das in Boole'schen Ausdrücken geschehen, die zwar eindeutig, so ohne weiteres aber nicht auf die Einstellungen unserer Gen-Bausteine übertragbar sind. Sie müssen zuvor in Schwellwertlogik umgerechnet werden. Bei der Gelegenheit stellen wir fest, dass das angegebene Diagramm nur eine grobe Übersichtsdarstellung von aktivierenden und hemmenden Signalen ist.

Ein Boole'scher Ausdruck wie $SCL = GATA1 \wedge \overline{PU.1}$ ist unschwer als UND-Verknüpfung der beiden Signale GATA1 und dem inversen PU.1 zu erkennen. und führt zu der Schwellwertdarstellung (siehe Vers.6, S.27):

$$SCL = \langle GATA1 + \overline{PU.1} \rangle_{2,1}$$

$\overline{PU.1}$, das benötigte Inverse von PU.1, gibt es nun leider nicht in unserem System. Hier hilft uns die wichtige in beiden Welten stets geltende Beziehung weiter:

$$PU.1 \vee \overline{PU.1} = 1$$

$$PU.1 + \overline{PU.1} = 1$$

Die ODER-Funktion aus einer Variablen und ihrem Komplement (ihrem Inversen) ergibt immer 1.

Umgestellt $\overline{PU.1} = 1 - PU.1$ und in den Schwellwertausdruck ersetzt erhalten wir:

$$SCL = \langle GATA1 + 1 - PU.1 \rangle_{2,1}$$

Nun wird im Ausdruck und in der Schwelle die Kon-

Lectron

Umformung der booleschen Ausdrücke in Schwellwertausdrücke

$$\begin{aligned} \text{GATA2} & := \text{GATA2} \wedge (\overline{\text{GATA}} \wedge \overline{\text{FOG1}}) \wedge \overline{\text{PU.1}} \\ & := \text{GATA2} \wedge (\overline{\text{GATA1}} \vee \overline{\text{FOG1}}) \wedge \overline{\text{PU.1}} \\ & := \langle 2\text{GATA2} + 2\text{PU.1} + \text{GATA1} + \text{FOG1} \rangle_{s_4} \\ & := \langle 2\text{GATA2} + 2(1 - \text{PU.1}) + (1 - \text{GATA1}) + (1 - \text{FOG1}) \rangle_{s_4} \\ & := \langle 2\text{GATA2} + 2 - 2\text{PU.1} + 1 - \text{GATA1} + 1 - \text{FOG1} \rangle_{s_4} \\ & := \langle 2\text{GATA2} - 2\text{PU.1} - \text{GATA1} - \text{FOG1} + 4 \rangle_{s_4} \\ & := \langle 2\text{GATA2} - 2\text{PU.1} - \text{GATA1} - \text{FOG1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{GATA1} & := (\text{GATA1} ? \text{GATA2} ? \text{Fli1}) \wedge \overline{\text{PU.1}} \\ & := \langle \text{GATA1} + \text{GATA2} + \text{Fli1} + 3\overline{\text{PU.1}} \rangle_{s_3} \\ & := \langle \text{GATA1} + \text{GATA2} + \text{Fli1} + 3(1 - \text{PU.1}) \rangle_{s_3} \\ & := \langle \text{GATA1} + \text{GATA2} + \text{Fli1} + 3 - 3\text{PU.1} \rangle_{s_3} \\ & := \langle \text{GATA1} + \text{GATA2} + \text{Fli1} - 3\text{PU.1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{FOG1} & := \text{GATA1} \quad (\text{Umformung wie SCL}) \\ & := \langle \text{GATA1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{EKFL} & := \text{GATA1} \wedge \overline{\text{Fli1}} \quad (\text{Umformung wie SCL}) \\ & := \langle \text{GATA1} - \text{Fli1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Fli1} & := \text{GATA1} \wedge \overline{\text{EKFL}} \quad (\text{Umformung wie SCL}) \\ & := \langle \text{GATA1} - \text{EKFL} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{SCL} & := \text{GATA1} \wedge \overline{\text{PU.1}} \quad (\text{Umformung siehe Text}) \\ & := \langle \text{GATA1} - \text{PU.1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

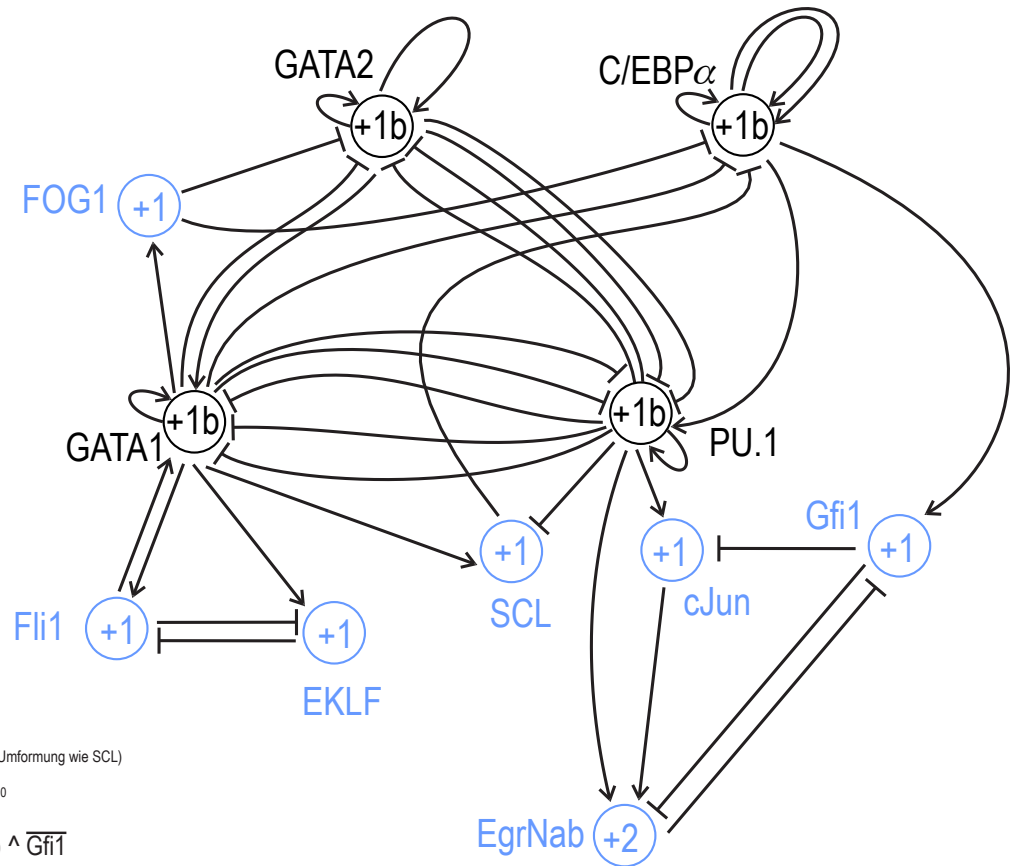
$$\begin{aligned} \text{C/EBP}\alpha & := \text{C/EBP}\alpha \wedge (\overline{\text{GATA1}} \wedge \overline{\text{FOG1}} \wedge \overline{\text{SCL}}) \quad (\text{Umformung siehe Text}) \\ & := \langle 3\text{C/EBP}\alpha - \text{GATA1} - \text{FOG1} - \text{SCL} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{PU.1} & := (\text{C/EBP}\alpha ? \text{PU.1}) \cdot (\overline{\text{GATA1}} ? \text{GATA2}) \\ & := (\text{C/EBP}\alpha \vee \text{PU.1}) \wedge (\overline{\text{GATA1}} \wedge \overline{\text{GATA2}}) \\ & := \langle \text{C/EBP}\alpha + \text{PU.1} + 2\overline{\text{GATA1}} + 2\overline{\text{GATA2}} \rangle_{s_4} \\ & := \langle \text{C/EBP}\alpha + \text{PU.1} + 2(1 - \text{GATA1}) + 2(1 - \text{GATA2}) \rangle_{s_4} \\ & := \langle \text{C/EBP}\alpha + \text{PU.1} - 2\text{GATA1} - 2\text{GATA2} + 4 \rangle_{s_4} \\ & := \langle \text{C/EBP}\alpha + \text{PU.1} - 2\text{GATA1} - 2\text{GATA2} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{cJun} & := \text{PU.1} \wedge \overline{\text{Gfi1}} \quad (\text{Umformung wie SCL}) \\ & := \langle \text{PU.1} - \text{Gfi1} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{EgrNab} & := (\text{PU.1} \wedge \text{cJun}) \wedge \overline{\text{Gfi1}} \\ & := \langle \text{PU.1} + \text{cJun} + \overline{\text{Gfi1}} \rangle_{s_2} \\ & := \langle \text{PU.1} + \text{cJun} + (1 - \text{Gfi1}) \rangle_{s_2} \\ & := \langle \text{PU.1} + \text{cJun} - \text{Gfi1} \rangle_{2,1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Gfi1} & := \text{C/EBP}\alpha \wedge \overline{\text{EgrNab}} \quad (\text{Umformung wie SCL}) \\ & := \langle \text{C/EBP}\alpha - \text{EgrNab} \rangle_{1,0} \end{aligned}$$





stante 1 abgezogen; es ergibt sich letztlich der für uns realisierbare Ausdruck:

$$SCL = \langle GATA1 - PU.1 \rangle_{1,0}$$

SCL wird also nur aktiv, wenn GATA1 aktiv und PU.1 inaktiv ist.

Zur Übung noch eine kompliziertere Umformung aus der Tabelle:

$$C/EBP\alpha = C/EBP\alpha \wedge (\overline{GATA1} \wedge \overline{FOG1} \wedge \overline{SCL})$$

Wir formen zunächst den Boole'schen Ausdruck um:

$$C/EBP\alpha = C/EBP\alpha \wedge (\overline{GATA1} \vee \overline{FOG1} \vee \overline{SCL})$$

»Wichtigstes« Signal ist hier C/EBP α , es erhält den Faktor 3 und der Schwellwertausdruck für die UND-Verknüpfung von C/EBP α und dem Klammerausdruck mit der ODER-Verknüpfung der drei Signale wird dann C/EBP $\alpha = \langle 3C/EBP\alpha + \overline{GATA1} + \overline{FOG1} + \overline{SCL} \rangle_{4,3}$. Die Schwelle muss auf +4 gesetzt werden, denn C/EBP α darf im nächsten Zeitschritt nur aktiv werden, wenn wenigstens außer ihm selbst eins der drei invertierten Signale ebenfalls aktiv ist. Nun müssen noch, wie im ersten Beispiel die drei nicht zur Verfügung stehenden inversen Signale ersetzt werden: $\overline{GATA1} = 1 - GATA1$ usw.

$$C/EBP\alpha = \langle 3C/EBP\alpha - GATA1 - FOG1 - SCL + 3 \rangle_{4,3}$$

Vermindern der Konstanten 3 im Ausdruck und in der Schwelle ergibt schließlich:

$$C/EBP\alpha = \langle 3C/EBP\alpha - GATA1 - FOG1 - SCL \rangle_{1,0}$$

Alle anderen Signale der im Artikel angegebenen Tabelle werden auf die gleiche Weise in Schwellwertausdrücke umgerechnet. Die Ergebnisse sind oben links zusammen in der Abbildung zusammen mit den booleschen Ausgangsgleichungen aufgelistet. Eine Prüfung ergibt, dass unsere Gen-Bausteine glücklicherweise genügend Eingänge haben, um ihnen alle benötigten Signale zuführen zu können. Gerade beim letzten Umrechnungsbeispiel muss das Ausgangssignal C/EBP α dreifach wieder auf die Eingänge desselben Bausteins gegeben werden. Hier können wir gut die bistabile Funktion des Bausteins ausnutzen, so dass das Signal extern nur zweimal über die Eingänge zugeführt werden muss und für die drei restlichen Signale noch Eingänge zur Verfügung stehen.

Das Verbindungsdiagramm mit allen Gen-Bausteinen und ihren Schwellen ist ebenfalls oben abgebildet. Einen möglichen kompakten Aufbau finden wir auf der nächsten Seite.

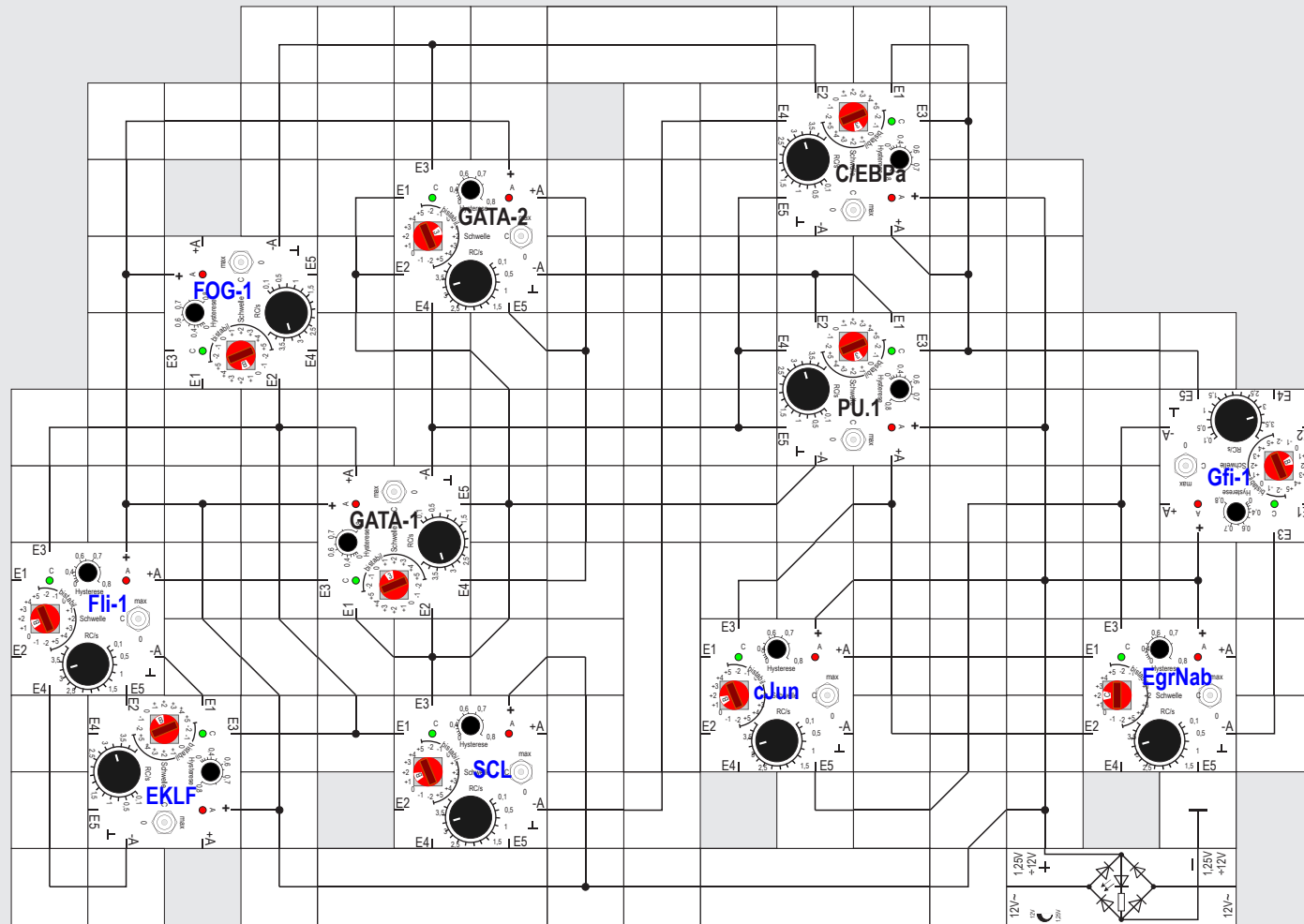
Bereits im groben Übersichtsdiagramm ist leicht zu erkennen, dass es bei den Genen Paare von Gegenspielern gibt: So kann entweder nur PU.1 oder GATA1 aktiv sein, da sie sich gegenseitig hemmen. Gleiches gilt für PU.1 und GATA2, Gfi1 und EgrNab sowie EKLF und Fli1.

Bevor wir an den Aufbau den Netzbaustein anlegen, überprüfen wir, ob nicht versehentlich die Versorgungsspannung mit einem der Ausgänge verbunden wurde oder Ausgänge direkt aufeinander arbeiten. RC und Hysterese sind bei allen Bausteinen auf Mittelstellung eingestellt.

Nach dem Anlegen der Versorgungsspannung passiert zunächst nichts. Bei diesem Modell ist es ähnlich wie bei dem der Ackerschmalwand, wir müssen manuell starten. Die beiden Modelle ähneln sich übrigens auch in anderer Hinsicht: Bei der Ackerschmalwand wurden durch die Aktivitäten verschiedener Gene vier verschiedene Blättertypen erzeugt, bei diesem Modell entstehen vier verschiedene Blutzellen (siehe Abbildung auf der übernächsten Seite).

Wir starten am besten, indem wir den Kippschalter vom C/EBP α - Gen kurzzeitig von C auf max und wieder zurück schalten. In der Folge werden zusätzlich PU.1 und Gfi1 aktiv und bleiben es auch. Wir befinden uns also im rechten Zweig des Diagramms, es werden Granulozyten produziert.

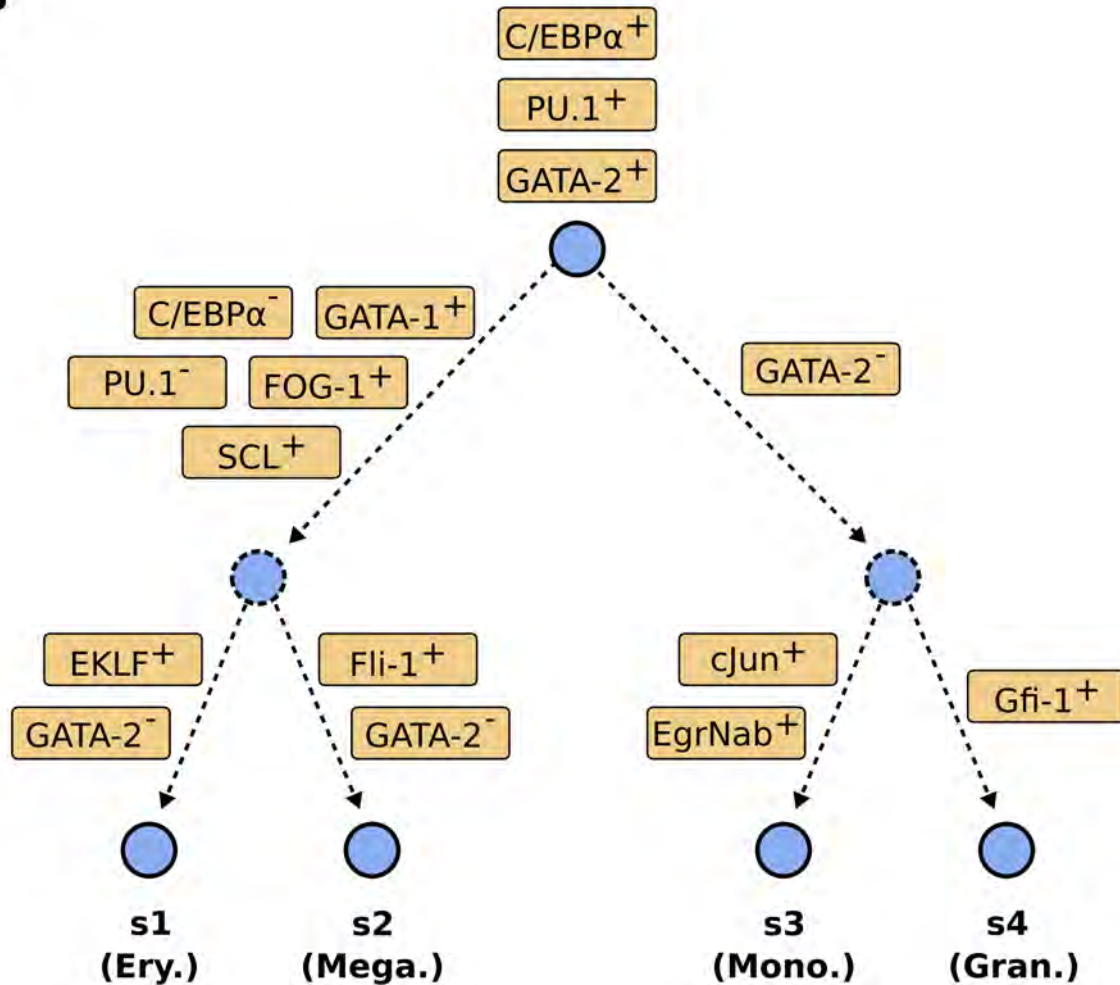
Aktivieren wir dann EgrNab mit dem entsprechenden Kippschalter (etwas länger auf max, bevor wieder auf C zurückgeschaltet wird), wird Gfi1 inaktiv; dafür bleiben EgrNab und zusätzlich cJun aktiv. Es werden jetzt Monozyten hergestellt.





Lectron

B



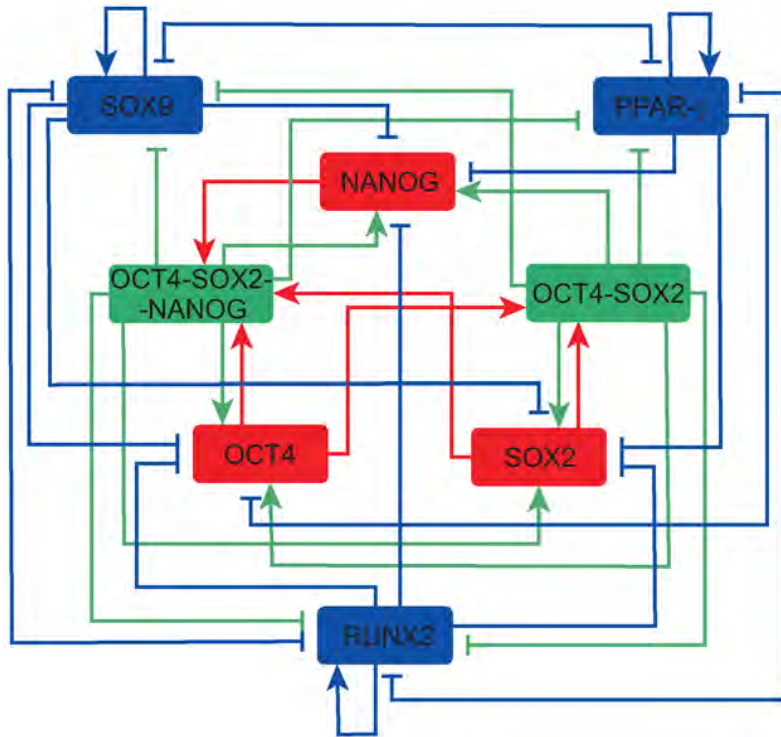
Um in die beiden anderen Zweige des Diagramms zu gelangen, aktivieren wir **GATA2** manuell (kurz von *C* auf *max* und wieder zurück schalten).

Wir können beobachten, wie zunächst **PU.1** inaktiv wird; es folgen **cJun** und **EgrNab**. Gleichzeitig werden **GATA1**, **SCL**, **FOG1**, **EKFL**, **Fli1** (und kurzzeitig auch **Gfi1** wieder) aktiviert. **SCL** schaltet letztlich **C/EBPα** und damit auch **Gfi1** ab. Auch **GATA2** bleibt nicht mehr aktiv.

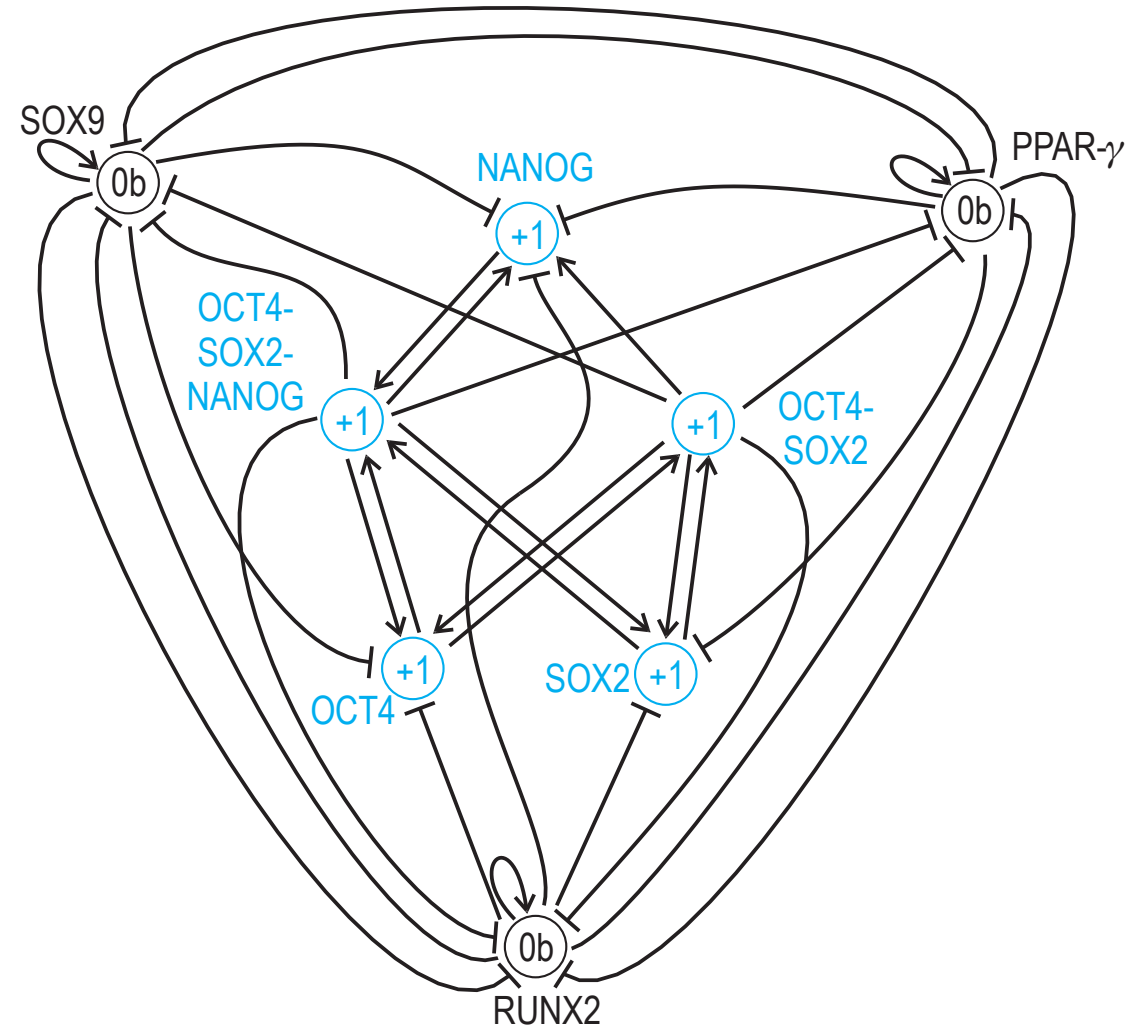
Da **EKLF** und **Fli1** Gegenspieler sind, hängt es von der genauen Einstellung der Zeitkonstanten und der Hysterese ab, welcher von beiden Bausteinen zuerst aktiv wird und den jeweils anderen hemmt. Ist es **Fli1**, werden *Megakaryozyten* produziert, bei aktivem **EKLF** sind es *Erythrozyten*. Eine manuelle Umschaltung zwischen beiden geschieht dadurch, dass wir den jeweils aktiven Baustein kurzzeitig aus- oder den inaktiven kurzzeitig anschalten.

Der ursprüngliche Anfangszustand mit allen inaktiven Genen stellt sich am besten ein, wenn **GATA1** kurzzeitig manuell deaktiviert wird. Es gehen dann alle Gene in der linken Aufbauhälfte in den inaktiven Zustand.

Lectron



aus: B.D. MacArthur, C.P. Please, R.O.C. Oreffo,
Stochasticity and the Molecular Mechanisms of Induced
Pluripotency. PLoS ONE 3 (2008) e3086.





Versuch 42

Differenzierung bei Stammzellen

Beschließen wollen wir unsere Simulationen biologischer Gen-Regulationsnetze mit einem Versuchsaufbau zu einem hochaktuellen Thema, nämlich der Differenzierung von Stammzellen.

Stammzellen haben die Fähigkeit, sich in Zellkulturen beliebig oft zu teilen und sich dann zu spezialisierten Zellen weiterzuentwickeln. An der Entwicklung des menschlichen Embryos kann man dies gut erklären:

Wenn ein Spermium eine Eizelle befruchtet hat, entsteht zunächst eine einzige Zelle, welche das Potenzial hat, einen vollständigen Organismus zu bilden. Diese befruchtete Eizelle ist *totipotent*, ihr Potential ist total, aus ihr können alle anderen Zellen entstehen. Diese Zelle teilt sich in den folgenden Stunden in mehrere identische Zellen, die ebenfalls totipotent sind. Einzelnen in eine Gebärmutter implantiert würde sich aus jeder einzelnen Zelle ein Fetus entwickeln. Eineiige Zwillinge, die ja genetisch identisch sind, entstehen auf diese Weise. Nach etwa vier Tagen setzt bei diesen Zellen eine Spezialisierung ein, es bildet sich eine hohle (äußere) Zellmasse, die eine Ansammlung von Zellen an einer Stelle im Inneren (den *Blastozyten*) aufweist.

Diese innere Zellmasse wird sich in der Folge zu ver-

schiedenen Körpergeweben der Feten ausbilden, während aus der äußeren Zellmasse Strukturen – beispielsweise die Plazenta – zur Versorgung des Feten gebildet werden.

Die innere Zellmasse kann sich zwar in jede erdenkliche Körperzelle weiterdifferenzieren, sie ist aber nicht mehr in der Lage, einen Organismus zu bilden, da sie keine Plazenta mehr bilden kann. Ihr Potenzial ist also nicht mehr total, sondern nur noch *pluripotent*. Eine Differenzierung zu allen Zelltypen des menschlichen Körpers ist zwar noch möglich, aber eben nicht mehr zu Typen, die der Versorgung dienen.

Die pluripotenten Stammzellen spezialisieren sich weiter zu Stammzellen, aus denen sich ganz bestimmte Zelllinien weiterentwickeln können, die eine spezifische Funktion haben. So entwickeln sich z.B. Blutstammzellen in rote und weiße Blutkörperchen sowie Thrombozyten weiter, wie wir das im vorherigen Versuchsaufbau gesehen haben. Diese noch mehr spezialisierten Stammzellen heißen *multipotent*.

Es dürfte klar sein, dass für den medizinischen Fortschritt das Verständnis der Abläufe von Zellteilung und Differenzierung in bestimmte Gewebe bei den Stammzellen von größtem Interesse ist.

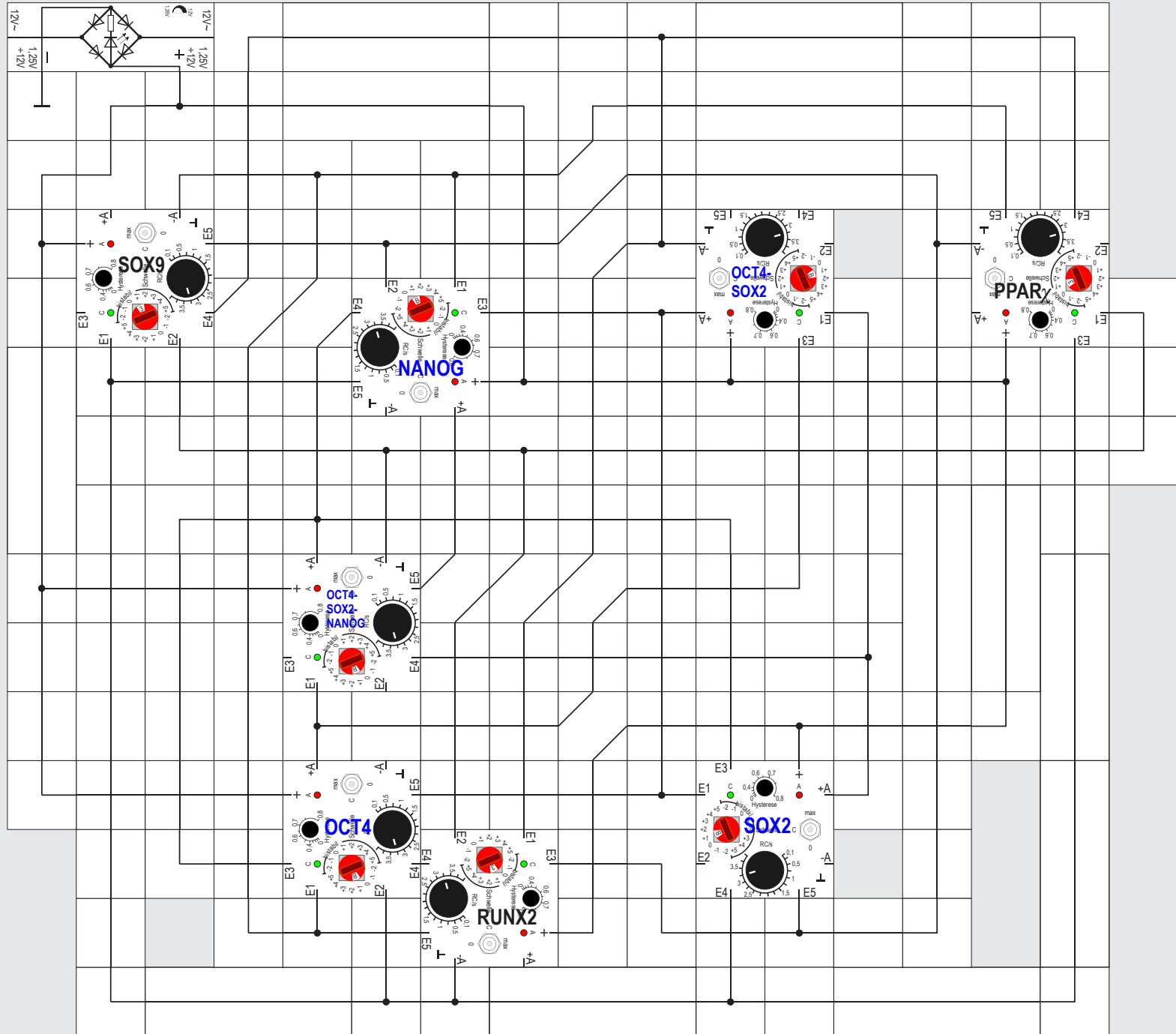
Im Zentrum der Forschung stehen dabei die Faktoren, welche entscheiden wann und wie gewisse Gene aktiviert oder gehemmt werden. Die Hoffnung dabei ist,

dass man Krankheiten, die auf Fehlfunktionen der Gen-Regulation basieren, wie z.B. die Krebsentstehung, besser verstehen kann.

Ein weiterer Aspekt ist, dass man aus pluripotenten Stammzellen für Zelltherapien Zellgewebe erzeugen kann, um geschwächte oder zerstörte Organe neu zu entwickeln und zu ersetzen.

Das für unseren Versuchsaufbau gewählte Gen-Regulationsnetz ist für die Differenzierung in *Entoderm*, *Ektoderm* und *Mesoderm* – also für das innere, äußere und mittlere Keimblatt – zuständig; es zeigt, wie aus dem pluripotenten Blastozyten-Zellhaufen durch die Steuerung von drei Genen OCT4, NANOG und SOX2 (in der Abbildung rot unterlegt) die Differenzierung bewerkstelligt wird [19].

Diese drei Gene aktivieren sich mittelbar über zwei weitere grün dargestellte Gene gegenseitig und bilden mit ihnen den inneren Kern des Netzes. Sie hemmen dagegen ebenfalls über die beiden »grünen« Gene die blau unterlegten drei »äußeren« Gene SOX9, PPAR- γ und RUNX2. Letztere hemmen jeweils die beiden anderen und die drei Gene des Kerns OCT4, NANOG und SOX2 direkt. Die gegenseitige Hemmung von SOX9, PPAR- γ und RUNX2 ist anders als wir sie bereits beim Repressilator kennengelernt haben. Dort hemmte ein Gen von den drei beteiligten immer nur das folgende, so dass ein Oszillieren zustande kam. Hier hemmt ein





Gen jedes andere; ist es selbst erst einmal aktiv, lässt es nicht mehr zu, dass andere aktiv werden. Wir haben diesen Netztyp in Versuch 20 bereits in Reinkultur kennengelernt. Die direkte gegenseitige Hemmung ist also sehr stark. So soll es auch sein, wenn es um die Stabilisierung eines Zelltyps geht! Genau dies ist der Grund, warum die verschiedenen Zellen unseres Körpers ihre Identität lebenslang beibehalten können. Neuere Forschungen zeigen recht spektakulär, daß sich ausdifferenzierte Zellen mit einem Trick doch rückprogrammieren lassen! Im Labor wird dabei ein kleiner Cocktail aus wenigen Proteinen in die Zelle geschleust, die sich daraufhin in kurzer Zeit in eine pluripotente Stammzelle verwandelt. Dies wurde bislang immer für unmöglich gehalten und so haben John B. Gurdon and Shinya Yamanaka den Medizinnobelpreis des Jahres 2012 für die Entdeckung erhalten, dass sich ausdifferenzierte Zellen in einen pluripotenten Zustand zurückprogrammieren lassen. Inzwischen ist es sogar gelungen, aus einer gewöhnlichen Hautzelle einer Maus durch Rückprogrammierung eine Stammzelle und daraus einen Klon dieser Maus herzustellen! Aber nun zurück zu unserem Beispiel, das wir zunächst nachbauen wollen.

Leider sind bei der Darstellung des Regulationsnetzes wieder die Schwellen nicht angegeben. Eine kurze Überlegung zeigt jedoch, dass sie für den Kern höch-

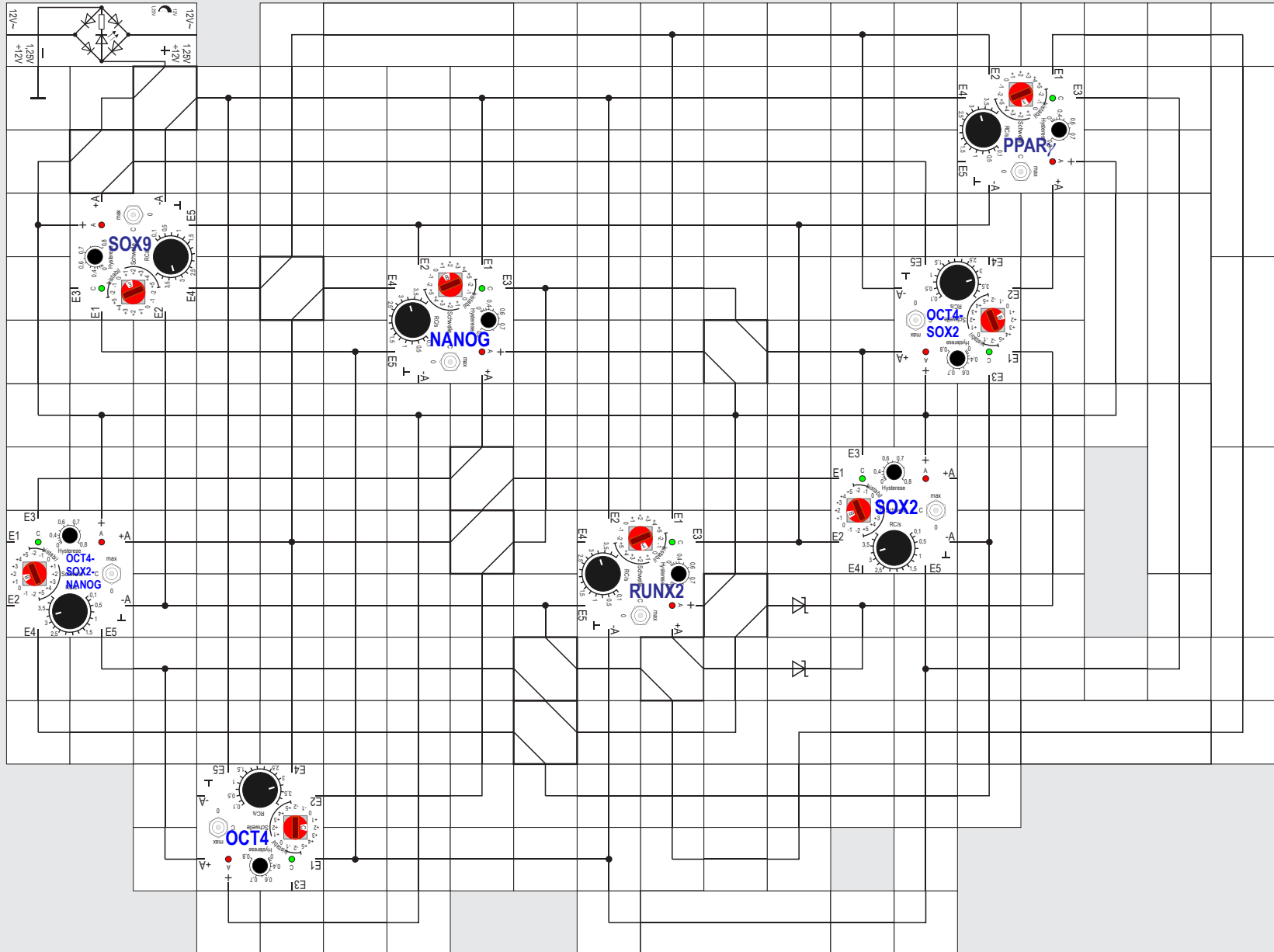
stens +1 und für die äußeren drei maximal 0 (bistabil oder nicht ist gleichgültig) sein können, wenn wir möchten, dass bei Anlegen der Versorgungsspannung an unserem Modell überhaupt etwas in Gang kommt. Erhöhen wir die Schwellen der drei äußeren Gene auf +1, würde alles inaktiv bleiben und man könnte lediglich eins der drei mit dem Schalter manuell aktivieren, wodurch die jeweils beiden anderen unterdrückt bleiben. Selbst manuell könnten sie nicht mehr aktiviert werden. Auf das biologische Geschehen übertragen bedeutet dies: Ist erst einmal festgelegt, welches Keimblatt, inneres, äußeres oder mittleres, die Zelle aufbauen soll, kann sie nicht mehr umprogrammiert werden. Auf Seite 138 finden wir links das Gen-Netz, wie es in der Originalarbeit abgebildet ist und rechts daneben den gewohnten Verbindungsplan mit Angabe der Schwellen.

Für SOX9, PPAR- γ und RUNX2 sind die Schwellen auf 0 gestellt. Aus diesem Bild ergibt sich ein möglicher Aufbau, der auf der vorherigen Seite wiedergegeben ist. Die RC-Zeitkonstanten sind bei den genannten drei Gen-Bausteinen auf gleiche Werte eingestellt, so dass nach Anlegen der Versorgungsspannung zunächst ohne manuelles Zutun maximal alle drei aktiviert werden. Dies bleibt aber nicht so: Abhängig von den Toleranzen bleibt ein Gen von den dreien aktiv und hemmt die möglicherweise kurz aktiv gewordenen beiden an-

deren Gene. Mehr passiert nicht.

Erst durch manuelles Aktivieren eines der anderen Gene (vorzugsweise OCT4-SOX2 oder OCT4-SOX2-NANOG) kann das aktivierte äußere Gen deaktiviert und nacheinander alle inneren Gene aktiviert werden. Dies entspricht in der biologischen Realität einer weiteren Differenzierung, die sich nicht rückgängig machen lässt. Die gegenseitige Aktivierung dieser nun angeschalteten Gene ist so stark, dass sie sich nur entweder durch manuelles Aktivieren **aller drei** äußeren Gene oder durch manuelles Deaktivieren von OCT4-SOX2 und OCT4-SOX2-NANOG wieder abschalten lässt. Schalten wir bei den äußeren Genen dann alle Schalter auf C zurück, bleibt wieder - wie zu Anfang - nur eins von ihnen aktiv.

Wenn unser Modell nun mit den aktivierten inneren Genen ausdifferenzierte Zellen darstellt, wie steht es nun mit den nobelpreisgekrönten induzierten pluripotenten Stammzellen iPS? Lassen Sie uns überlegen, wie man diese Differenzierungsdynamik wieder rückgängig machen könnte. Die Rückprogrammierung von Zellen im Labor nutzt in der Tat die zentralen Proteine wie OCT4, SOX2 und NANOG oder verwandte Proteine in ihren Cocktails. Welche Kombinationen am besten funktionieren ist Gegenstand dieses sehr aktiven Forschungsgebiets der induzierten pluripotenten Stammzellen.



Lassen Sie uns nun am Schluss für den Show-Effekt noch einen Aufbau anfügen, mit dem Differenzierung mit der Rückdifferenzierung automatisch im Wechsel abläuft.

Durch Probieren am Modell findet man heraus, dass die inneren Gen-Bausteine mit einem aktivierenden Signal (Gewicht 1) über einen der drei freien Eingänge von OCT4-SOX2 aktiviert werden können. Dies ermöglicht ein elegantes automatisches Hin- und Herschalten zwischen aktiven inneren und aktiven äußeren Genen. Es muss aber betont werden, dass dies gerade im Vorbild nicht vorkommt, weil sonst die Entwicklung des Organismus nicht ordnungsgemäß ablaufen kann.

Anschalten lässt sich OCT4-SOX2 und damit in der Folge das gesamte innere Netz mit einem aktivierenden +A Signal entweder von SOX9, PPAR- γ oder RUNX2; eins dieser drei Gene ist ja aktiv und der Baustein OCT4-SOX2 hat auch noch drei unbenutzte Eingänge. (Eine ODER-Verknüpfung wäre bei zu geringer Anzahl freier Eingänge allerdings auch möglich). Ist das innere Netz aktiv, wird das anschaltende äußere Gen deaktiviert.

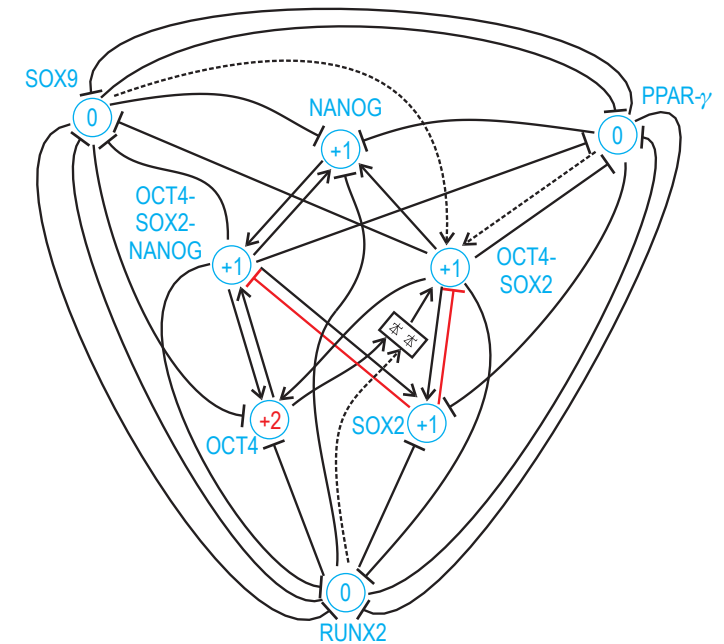
Zurückschalten, d.h. Abschalten des inneren Netzes geht am besten dadurch, dass wir an SOX2 einen großen RC-Wert einstellen; SOX2 wird deswegen als letztes Gen aktiv und sein hemmendes -A Signal kann auf

OCT4-SOX2-NANOG und OCT4-SOX2 gegeben alle inneren Gene deaktivieren, wodurch wieder mindestens eins der äußeren Gene aktiv wird. Wir müssen hier allerdings schon sehr massiv eingreifen: Das hemmende SOX2-Signal muss mit Gewicht 2 auf die beiden Gen-Bausteine gegeben werden, damit es überhaupt wirksam werden kann.

Vereinfachungen im Versuchsaufbau ergeben sich dadurch, dass zunächst SOX2 sowohl OCT4-SOX2 als auch OCT4-SOX2-NANOG mit aktivierendem Signal (Gewicht 1) ansteuert, jetzt aber jeweils ein hemmendes Signal mit Gewicht 2 hinzukommt, so dass in Summe ein deaktivierendes Signal mit Gewicht 1 übrig bleibt. Außerdem muss die Schwelle von OCT4 auf +2 erhöht werden.

Der so veränderte Verbindungsplan ist nebenstehend abgebildet. Auf der vorherigen Seite ist ein möglicher Versuchsaufbau angegeben, bei dem aus Aufwandsgründen die beiden +A Signale von RUNX2 und OKT4 mit Dioden ODER-verknüpft sind.

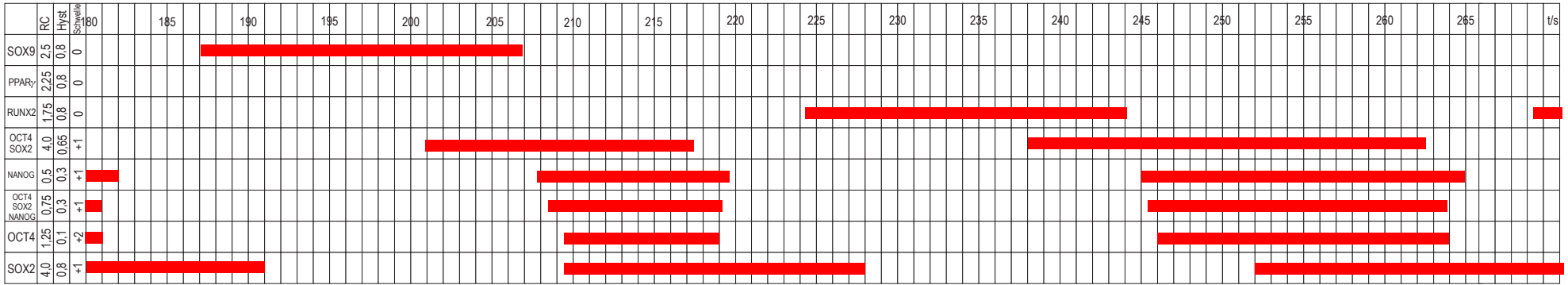
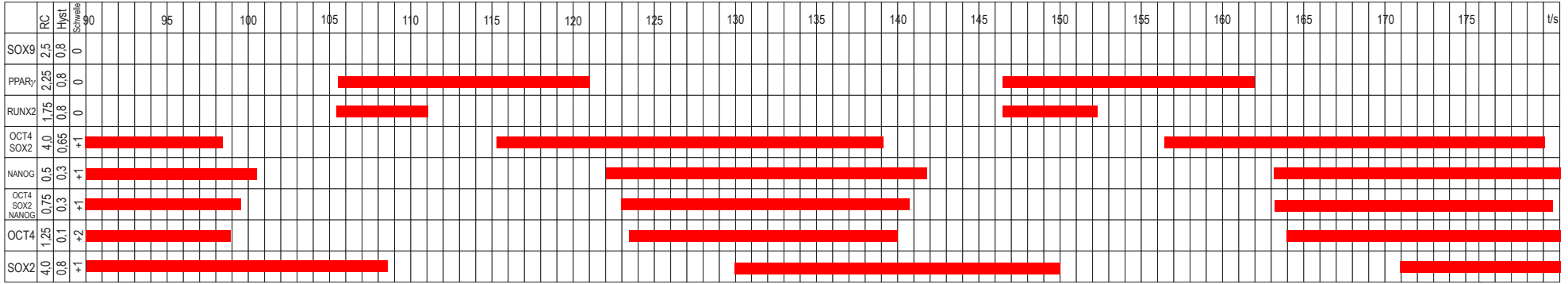
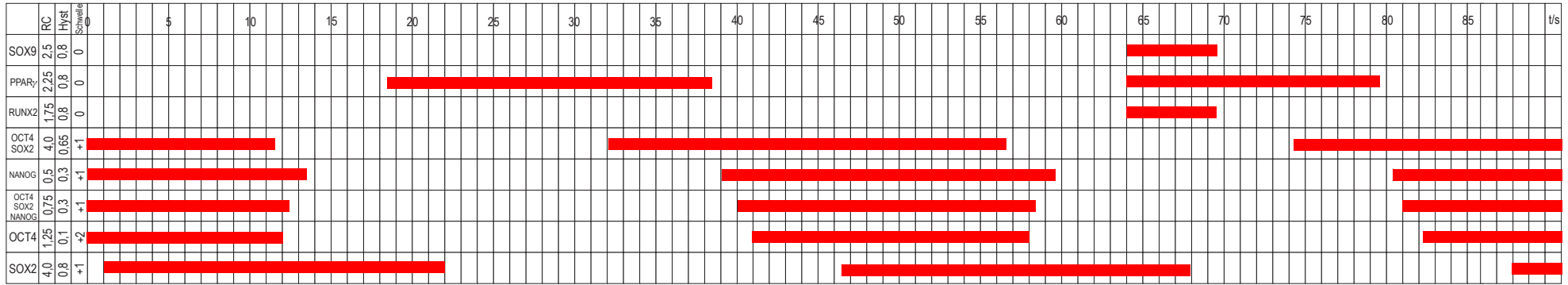
Die folgende Seite zeigt einen zeitlichen Ablauf, wie er bei dem Versuchsaufbau vorkommt. Es sind in 270 Sekunden knapp sieben Durchläufe abgebildet, wobei jeder Durchlauf je nachdem, welche äußeren Gene aktiv wurden, 41 bis 45 Sekunden dauert. Interessant ist dabei, dass nicht nur ein äußeres Gen aktiv ist, sondern auch zwei oder sogar alle drei vorübergehend an-



geschaltet sind, bevor sich dann eins durchsetzt und die Aktivität der beiden anderen unterdrückt.

In dem dann folgenden Bild, das 104 aufeinander folgende Durchläufe zeigt, erkennen wir, dass dies – wahrscheinlich aufgrund von unvermeidlichen Toleranzen – meistens PPAR- γ ist (durch roten Kreis angezeigt), sich gelegentlich aber auch SOX9 oder RUNX2 durchsetzt. Die rosa Kreise zeigen an, welche Gene zunächst auch aktiviert sind, bevor eins, nämlich das rote, dominiert. Ein periodisches Muster ist dabei nicht zu erkennen.

Lectron





| SOX9 | RUNX2 | PPAR- γ |
|------|-------|----------------|
| ● | | |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |

| SOX9 | RUNX2 | PPAR- γ |
|------|-------|----------------|
| ● | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | | ● |
| | | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | | |
| | ● | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| | ● | |
| ● | ● | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |

| SOX9 | RUNX2 | PPAR- γ |
|------|-------|----------------|
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | | ● |
| ● | | ● |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |

| SOX9 | RUNX2 | PPAR- γ |
|------|-------|----------------|
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| | ● | ● |
| ● | | ● |
| ● | | |
| ● | ● | |
| ● | | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | ● | ● |
| ● | | |
| ● | ● | ● |
| ● | | |

Erstaunlich, oder? Bisher hatten wir es mit sehr zuverlässigen Netzen zu tun, wie etwa beim Zellzyklus, wo ein periodisches Blinkmuster uhrwerksartig durchläuft. In der Entwicklungsbiologie dagegen gibt es kurz die Situationen, wo der Zufall eine Rolle spielt. Bevor eine Zelle sich ausdifferenziert und damit ihre endgültige Identität gefunden hat, spielen Signale von außen oft eine Rolle, was aus einer Stammzelle wird. Z.B. die Signale von Zellen in der Umgebung im Innern eines Mehrzellers. Oder eben der Zufall, wenn mehrere Zelltypen gleichzeitig gebraucht werden. Unser für Demonstrationszwecke blinkendes Netz gibt uns hier einen Vorgeschmack vom Effekt des Zufalls in der Zelldifferenzierung und kratzt gleichzeitig die Oberfläche der Phänomene der Chaostheorie.

Eigene Versuche

Hier sind wir am Ende unseres kurzen Ausflugs entlang biologischer Regulations-Netze gelangt. Nun sind Sie gefragt! Wer weitere Simulationen zu biologischen Gen-Regulationsnetzen durchführen möchte, aber keine Vorlagen hat, für den ist es nicht die schlechteste Idee, einfach mal im Internet zu suchen. Unter dem Stichwort »Gene regulatory networks« oder ähnlichem bei einer Suchmaschine unserer Wahl werden wir schnell fündig. Wenn wir gleich unter »Bilder« suchen, finden wir schnell gleich mehrere Beispiele von Regulationsnetzen und sehen mit einem Blick, ob sich von der Komplexität der gefundenen Netze für uns ein Aufbau lohnt. Manche sind zu komplex, so dass uns Bausteine und Platz fehlen werden, manche zu einfach.

Machen Sie mit?

Die Frage ist: Wie geht es nun weiter? Sie haben den LECTRON Gen-Baustein jetzt von allen Seiten kennengelernt; Sie wissen, wie er funktioniert und wie –

vor allem – verschiedene Aufgaben mit Schaltungen aus mehreren Gen-Bausteinen gelöst werden können. Sie sind jetzt ein Experte. Ganz bestimmt werden Sie jetzt selbst neue Schaltnetze ausprobieren.

Vielleicht sind ganz andere Netze möglich: Kann man mit unserem Baustein auch Neuronen-Netze simulieren? Oder Spiele oder logische Knobeleyen? Ihrer Phantasie sind keine Grenzen gesetzt! Wollen Sie uns dann mitteilen, was Sie sich ausgedacht haben? Machen sie ein Photo mit dem Handy und schicken uns das mit einer kurzen Erklärung an:

bornholdt@itp.uni-bremen.de

Vielleicht können wir es in eine neue Auflage dieses Anleitungsbuches mit hineinnehmen?

Natürlich muss sich LECTRON vorbehalten, welche der eingesandten Programme hier veröffentlicht werden. Aber jeder, dessen Programm abgedruckt wird, erhält dafür einen Band der neuen, erweiterten Auflage des LECTRON Experimentierbuches kostenlos zugesandt.

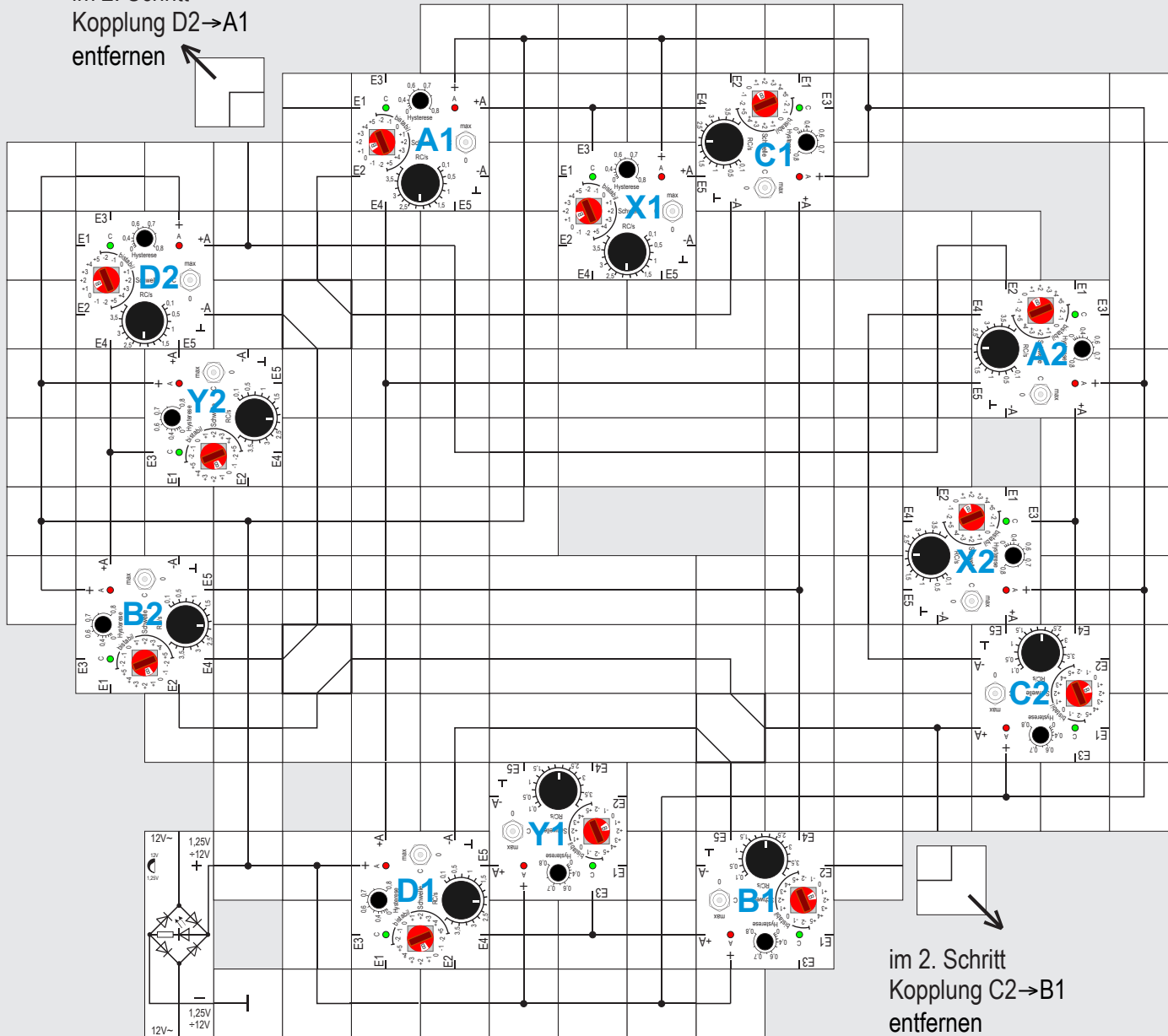


Lectron



43

im 2. Schritt
Kopplung D2→A1
entfernen



im 2. Schritt
Kopplung C2→B1
entfernen



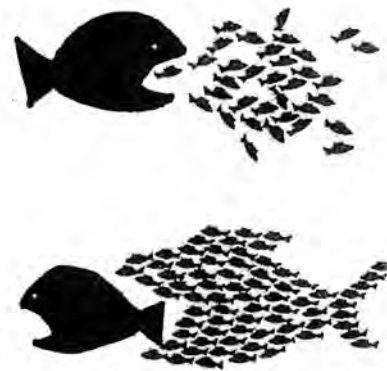
5. Schwarmverhalten von Mikroben

Nachdem wir in den letzten Versuche eine ganze Reihe von Beispielen der Gen-Regulation lebender Zellen und Organismen kennengelernt haben, wollen wir nun im letzten biologischen Teil dieses Baukastens unseren Horizont etwas weiten und den Blick auf ökologische Phänomene, jenseits einzelner Lebewesen richten. Ein besonders interessantes dynamisches Phänomen von Organismengemeinschaften ist die Schwarmbildung, oder ganz allgemein das koordinierte Verhalten einer Gruppe von Lebewesen zur Erlangung eines gemeinsamen Vorteils. Wir wollen dies an einfachen Modellen für die Schwarmbildung oder Koordination von Mikroben kennenlernen.

Versuch 43

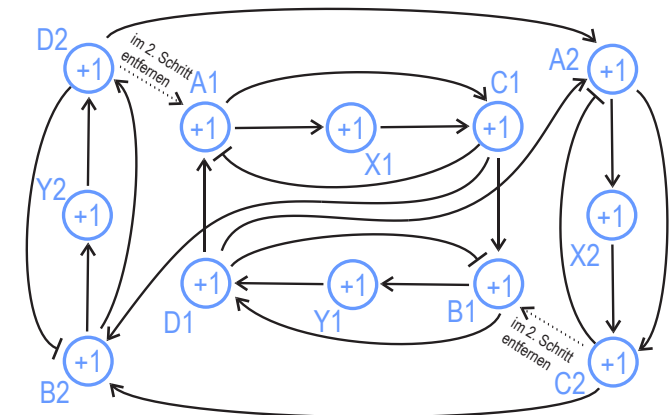
Schwarmbildung

Schwärme treten nicht nur bei Fischen und Vögeln auf, sondern sind auch bei kleineren Lebewesen, wie Bakterien, zu beobachten. Offensichtlich haben sie gegenüber einer nicht geordneten Vielzahl von Individuen Überlebensvorteile beispielsweise gegenüber Fressfeinden, die durch das synchrone Verhalten einer großen Anzahl Beutetiere irritiert werden. In der Abbildung aus [11] ist das sehr treffend dargestellt. Häufig kommt es auch zur Schwarmbildung, wenn sich die Umweltbedingungen verschlechtern,

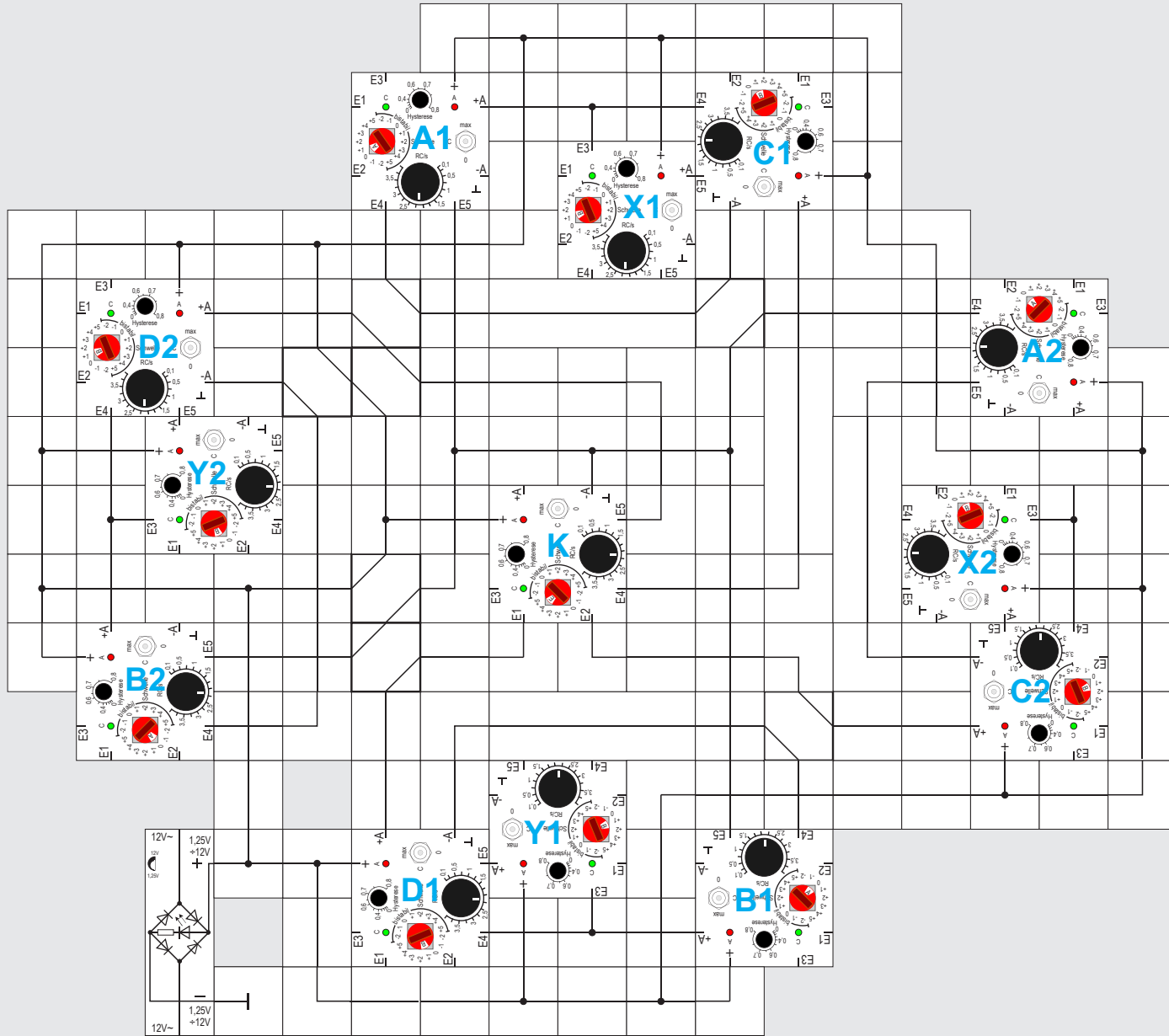


so dass sich viele Individuen zusammentun und der Verbund durch Ausdifferenzierung spezieller Substrukturen seine Überlebenschancen erhöhen kann. Damit so etwas geordnet passiert, ist ein Informationsaustausch zwischen den Individuen unerlässlich und wir können erwarten, dass dies bereits auf der Ebene der Genregulation angelegt sein muss.

Unser Ausgangspunkt sind dabei gekoppelte Oszillatoren wie wir sie schon in Versuch 26 aufgebaut haben. Wir bauen uns also ein zweites Paar Oszillatoren auf und versuchen eine geeignete Kopplung zu finden (s. Abb.). Die Überlegung dazu ist, dass wenn ein Gen ein Protein herstellt, dieses ja nicht nur auf die eigene Struktur Einfluss hat, sondern bestimmt auch andere gleichartige Strukturen der Umgebung beeinflusst. Wir verbinden also die Aus-



gänge unseres ersten Pairs mit den Eingängen des zweiten und umgekehrt: $C1 \rightarrow B2$, $D1 \rightarrow A2$, $C2 \rightarrow B1$ und $D2 \rightarrow A1$. Nach Anlegen der Versorgungsspannung müssen wir wieder manuell starten, stellen jedoch nach kurzer Zeit fest, dass alle Gene aktiv sind und nicht mehr oszillieren. Erhöhung der Schwellen bei den Eingangsbausteinen auf +2 führt zum gegenteiligen Ergebnis: Das Oszillieren stirbt aus. Koppeln wir jedoch etwas schwächer, nämlich nur $C1 \rightarrow B2$ und $D1 \rightarrow A2$ (zwei Winkelbausteine im Aufbau entfernen), erhalten wir das gewünschte Verhalten. Beide Paare oszillieren synchron, wobei $C1$ und $C2$ in Phase und nahezu gegenphasig zu $D1$ und $D2$ sind. Es ist wiederum - wie schon im Versuch 26 - ein gewisses Driften zu beobachten, das aber immer wieder kompensiert wird.



Versuch 44

Quorum Sensing

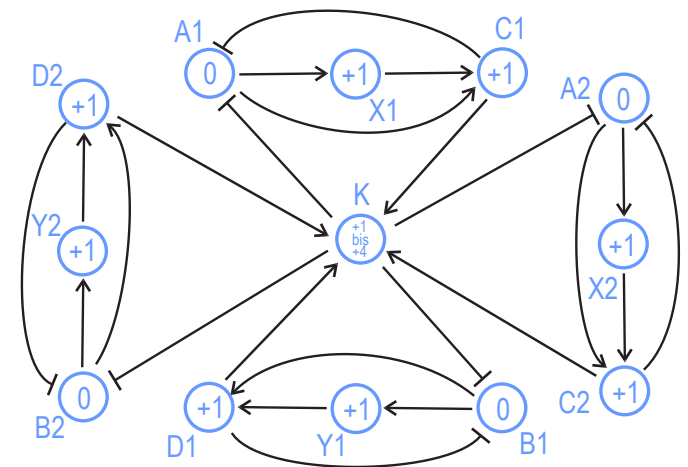
Ein eindrucksvolleres Bild einer Schwarmbildung erhalten wir, wenn wir in unserem Versuchsaufbau die Gegenphasigkeit in der synchronen Oszillation beseitigen. Dazu kehren wir zur Ausgangsstruktur unseres Oszillators zurück und bauen vier Stück davon auf. Wir versuchen, die Frequenz aller vier gleich groß einzustellen. Wenn Versorgungsspannung an den Aufbau (zunächst ohne Baustein K oder K manuell ausgeschaltet) gelegt worden ist, sollten sie also möglichst lange gleichphasig, aber unabhängig voneinander schwingen. Wir wissen allerdings aus vorangegangenen Versuchen, dass sie auf Dauer voneinander wegdriften werden.

Die Kopplung, die das verhindert und die wir nun einführen wollen, beruht auf der Beobachtung in der belebten Natur, dass eine aktive Struktur – hier unser Oszillator – einen sog. Botenstoff (*Autoinducer*) erzeugt, welcher nicht nur auf ihn selbst, sondern durch Diffusion auch auf andere gleichartige Strukturen in der unmittelbaren Umgebung zurückwirkt. Da dasselbe auch für die anderen Strukturen gilt, beeinflussen sie sich gegenseitig. Wenn eine gewisse Konzentration des Stoffes im gemeinsamen Fluidum erreicht wurde, werden dann Gene aktiviert, die den

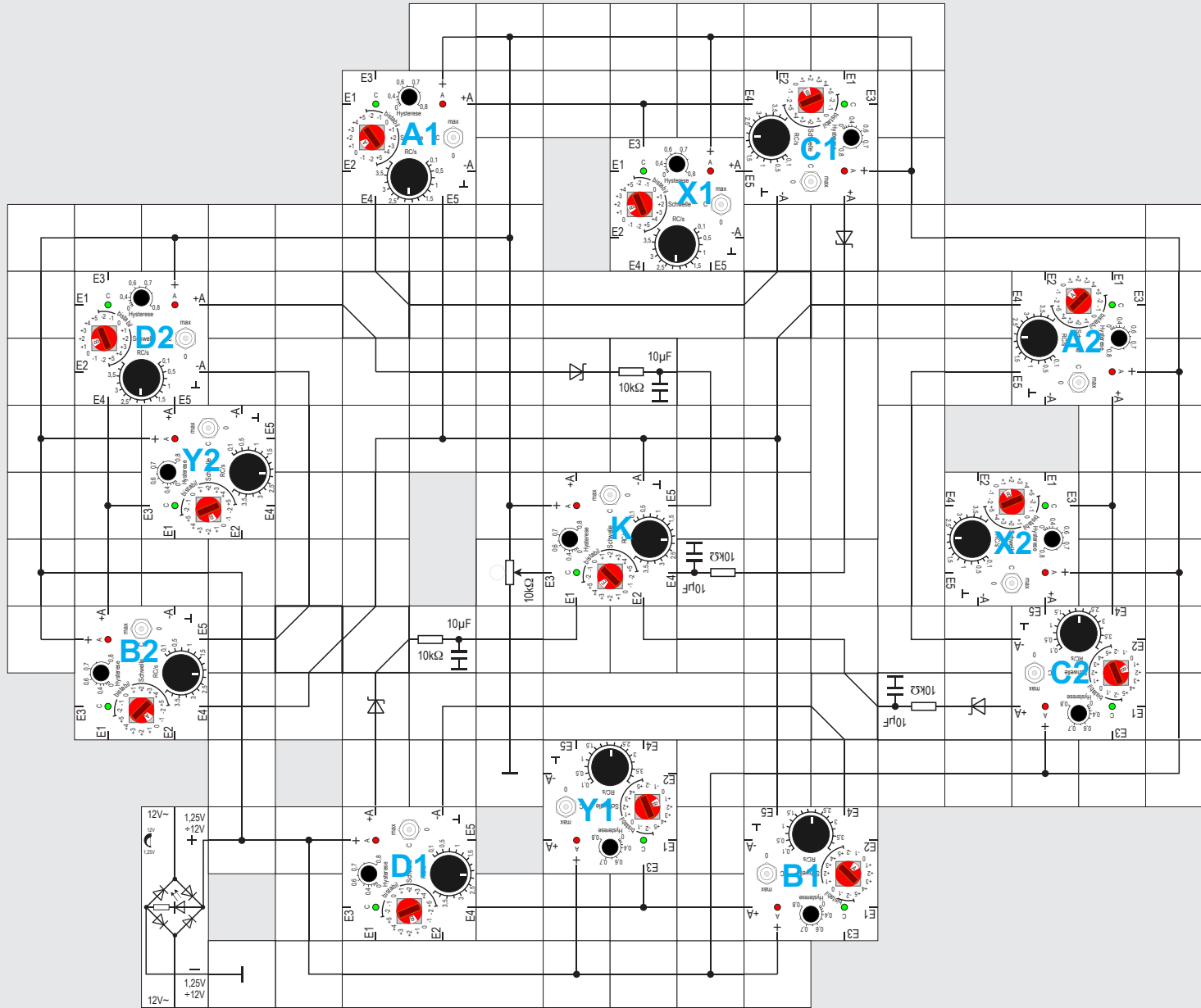
Autoinducer produzieren, so dass eine Rückkopplung einsetzt. Ein bekanntes Beispiel bei Bakterien ist das für die *Biolumineszenz* verantwortliche Enzym *Luciferase*.

Für die Modellierung des Fluidums eignet sich unser Schwellwertbaustein vorzüglich, enthält er doch einen Summierer und einen Komparator. Der zusätzliche Baustein K, der das umgebende Fluidum repräsentiert, bekommt dazu von jedem Oszillator das Ausgangssignal +A; er summiert sie auf und wir können durch Schwellen-, Hysterese- und RC-Einstellung bestimmen, wann er aktiv auf die vier Oszillatoren einwirken soll. In unserem Modell geschieht das hemmend: Die aktive Phase der Bausteine A1, A2, B1 und B2 wird durch das -A Ausgangssignal von K gegebenenfalls verkürzt. Diese der Synchronisation dienende Fähigkeit wird u.a. bei Einzellern, wie *Escherichia coli* beobachtet und *quorum sensing* genannt. Sie ermöglicht es den Zellen, bestimmte Gene nur dann zu aktivieren um Prozesse zu koordinieren, die ineffizient wären, wenn sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt würden.

Wenn wir bei dem K Baustein zunächst den Schalter manuell auf »0« stellen, schwingen alle Oszillatoren unabhängig voneinander und driften phasenmäßig auseinander. Über die Schwellen- und die Zeiteinstellung von K können wir auswählen, wie stark die



gegenseitige Kopplung sein soll (Schalter dann auf »C«): Kleine Zeiten und niedrige Schwelle +1 führen schnell zur Synchronisation; bei Schwelle +4 und mittleren Zeiten dauert es gefühlt »eine Ewigkeit«, bis alle im Gleichtakt schwingen. Es müssen ja zufällig alle vier Signale für eine ausreichend lange Zeit aktiv sein, damit der Baustein ein Synchronisierungssignal generieren kann. An der immer stärker leuchtenden grünen LED von K können wir förmlich sein Bemühen sehen, Synchronität herzustellen. Sind seine eingestellten Zeiten größer als die Oszillatorzeiten, kann er es allerdings nicht schaffen.





Versuch 45

Verbessertes Modell I für Quorum Sensing

Der vorherige Versuch zeigt sehr schön, wie eine Synchronisation zustande kommt, ohne dass ein zentraler Taktgeber eingreift. Das korrigierende Signal wird aus den Ausgangssignalen der vier gleichberechtigten Oszillatoren gewonnen. Der zentrale Baustein K kommt nur deswegen zum Einsatz, weil er die benötigten Schaltungsteile Summierer und Komparator enthält. Je nach Aktivität der vier Oszillatoren bildet der Summierer die Ausgangssignale 0, +1, +2, +3, oder +4, die dann im Komparator mit der von uns gewählten Schwelle verglichen werden und zu weiteren Aktivitäten führen oder auch nicht. Es gibt also fünf mögliche Stufen der Konzentration im Fluidum und als korrigierendes Signal nur ein binäres »vorhanden« oder »nicht vorhanden«, dessen zeitliche Dauer von der zufälligen aktiven Übereinstimmung der vier Signale abhängt.

Wen es stört, dass diese Stufen so in der Natur nicht vorkommen, kann das Modell verfeinern, indem er

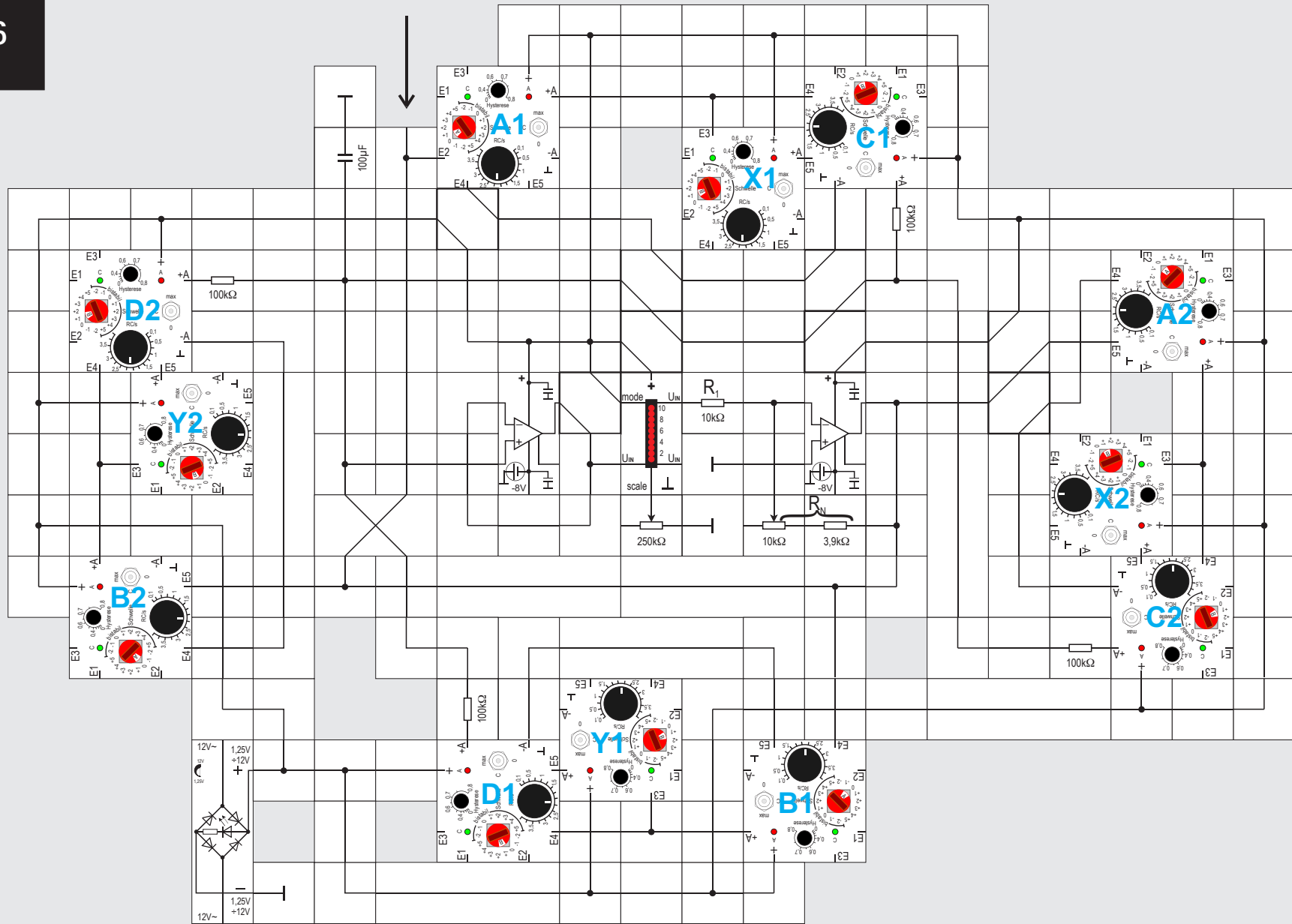
die vier Ausgangssignale der Oszillatoren auf dem Weg zum zentralen Schwellwertbaustein K mit Hilfe von jeweils einem RC-Glied ($10\text{k}\Omega/10\mu\text{F}$) etwas »abgerundet«. Diese Bausteine werden statt einer geraden Verbindung in den Aufbau eingefügt. Hinzu kommen noch vier Dioden. Sie sorgen dafür, dass sich der Kondensator zwar über den $10\text{k}\Omega$ Widerstand lädt, seine Entladung aber nur über den jeweiligen internen $100\text{k}\Omega$ Eingangswiderstand des Schwellwertbausteins passieren kann. Die Entladung wird dadurch entsprechend langsamer und die Chance, dass alle vier Signale eine Zeit lang aktiv sind, größer.

Außerdem können wir dem noch freien fünften Eingang des Schwellwertbausteins eine mit dem Potentiometer kontinuierlich einstellbare Spannung zuführen, so dass durch diese Vorspannung letztlich die Schwelle indirekt ebenfalls kontinuierlich einstellbar ist. Wir können also erwarten, dass die Synchronisation schneller vonstatten geht.

Trotzdem liefert der Schwellwertbaustein immer noch ein binäres Synchronisiersignal, was so nicht unbedingt der Konzentrationsveränderung im biologischen Vorbild entspricht.

Der nächste Aufbau zeigt uns, wie auch das noch verbessert werden kann. Wir benötigen dazu die RC-Bausteine nicht mehr, sondern setzen dann Operationsverstärker ein.

46





Versuch 46

Verbessertes Modell II für Quorum Sensing

Eine weitere Verfeinerung des Modells erreichen wir, indem wir auf den Schwellwertbaustein K ganz verzichten und statt dessen die Konzentration kontinuierlich ansteigen lassen. Dazu werden alle vier Oszillatorausgangssignale über jeweils einen eigenen $100\text{k}\Omega$ Widerstand auf einen gemeinsamen $100\mu\text{F}$ Kondensator gegeben, der sich abhängig von den Ausgangspotentialen langsam nach den bekannten e-Funktionen lädt oder entlädt. Die (kontinuierliche steigende oder fallende) Kondensatorspannung stellt also ein Maß für die Konzentration im gemeinsamen Fluidum dar.

Diese Spannung wird in einem als *Elektrometer* geschalteten Operationsverstärker nicht-invertierend verstärkt (»Verstärkung« v ist allerdings nur 1) und über eine Leuchtbandanzeige angezeigt. Pro aktivem Oszillatorausgangssignal leuchten zwei LEDs im Leuchtband, maximal können also acht angehen, wenn zunächst der $250\text{k}\Omega$ Potentiometer Baustein samt Massebaustein weggelassen werden. Der Operationsverstärker ist als *Impedanzwandler* nötig. Zur Erklärung hier nur so viel: Wir möchten, dass sich der Kondensator nur über die $100\text{k}\Omega$ Widerstände lädt

und entlädt und seine Spannung nicht über die relativ niederohmigen Widerstände des zweiten angeschlossenen Operationsverstärkers beeinflusst wird; das genau erreichen wir mit dem als Elektrometer arbeitenden Operationsverstärker. Funktion und Eigenschaften von Operationsverstärkern und Anzeigebaustein sind für Interessierte im Kasten auf den nächsten Seiten erklärt.

Der zweite Operationsverstärker verstärkt invertierend mit $v = -RN/R1$, damit ein hemmendes negatives Signal zustande kommt.

Am $10\text{k}\Omega$ Potentiometer können wir seine Verstärkung im Bereich $-1,39 \leq v \leq -0,39$ einstellen. Sein Ausgangssignal stellt ein Abbild der Kondensatorspannung dar, ist also ebenfalls kontinuierlich ohne Sprünge; es wird auf die vier Oszillatoren gegeben, wobei jeder für sich den Vergleich vornimmt.

Nach Anlegen der Versorgungsspannung schalten wir bei den vier Bausteinen C1, C2, D1 und D2 den Dreistellungsschalter auf »max«. Alle Oszillatoren geben nun ein Ausgangssignal ab und der Kondensator lädt sich auf seinen maximalen Wert auf. Es werden acht LEDs auf der Leuchtbandanzeige leuchten. Wer hier den vollen Bereich mit 10 LEDs nutzen möchte, verwendet das $250\text{k}\Omega$ Potentiometer und stellt es entsprechend ein.

Am $10\text{k}\Omega$ Potentiometer lässt sich – wie gesagt –

die Verstärkung des zweiten Operationsverstärkers einstellen. Ist der Einstellknopf im Uhrzeigersinn an den Anschlag gedreht, beträgt R_N zusammen mit dem Festwiderstand $13,9\text{k}\Omega$, so dass wir eine Verstärkung erhalten von

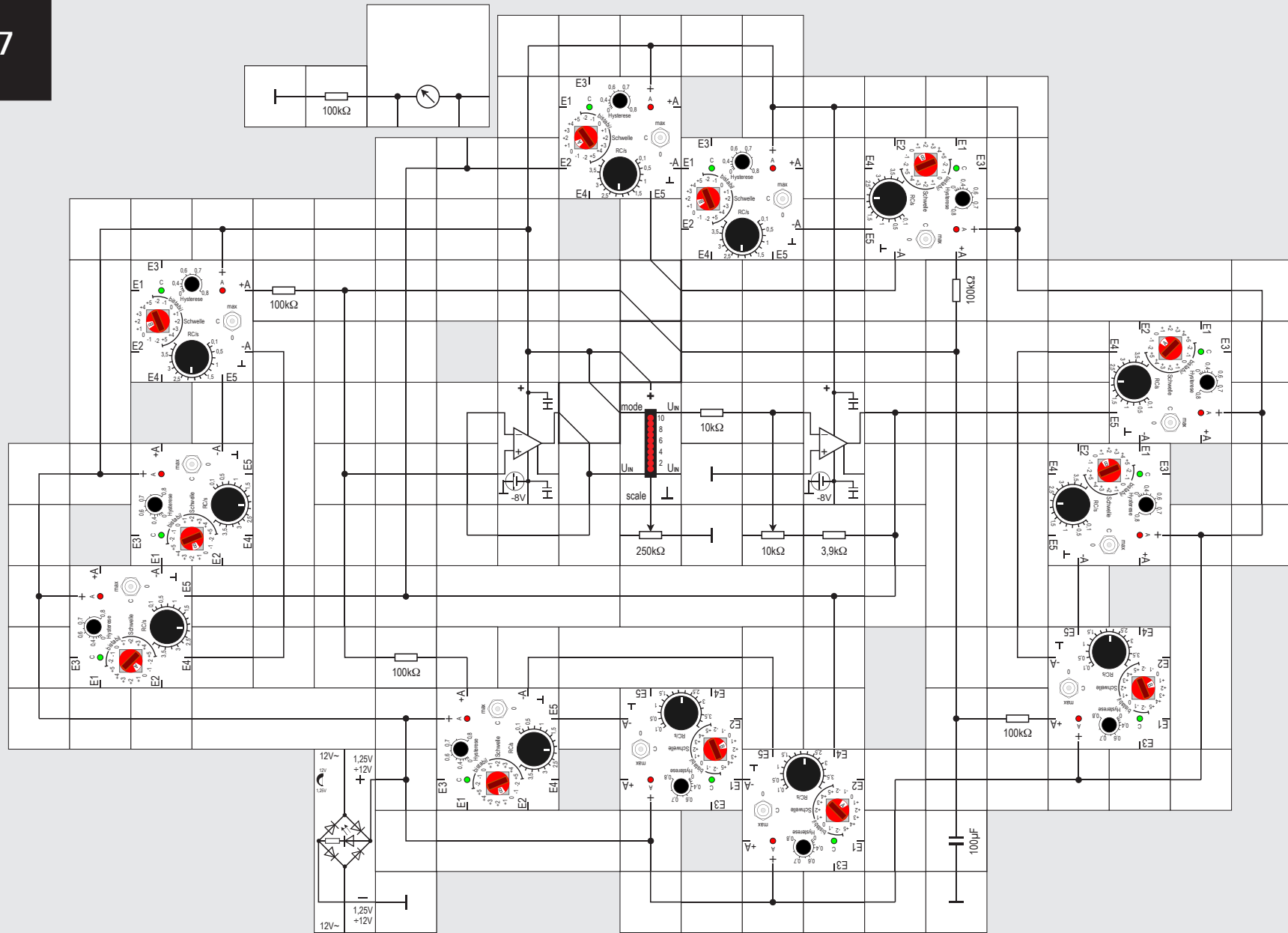
$$v = -13,9\text{k}\Omega / 10\text{k}\Omega = -1,39$$

Am Anschlag in Gegenrichtung ist nur der Festwiderstand maßgeblich und wir erhalten

$$v = -3,9\text{k}\Omega / 10\text{k}\Omega = -0,39$$

Geben wir mit dieser letzten Einstellung die vier Oszillatoren frei, indem wir ihre Schalter zeitlich nacheinander von »max« auf »C« stellen, so sind die Oszillatoren keineswegs synchron und werden es wohl auch nicht werden. Das korrigierende Signal ist einfach zu niedrig in der Amplitude, als dass es etwas bewirken könnte. Der Pfeil im Versuchsaufbau kennzeichnet die Stelle, an der wir mit einem externen Messinstrument, z. B. dem LECTRON Messinstrument in Reihe mit einem $100\text{k}\Omega$ Vorwiderstand, die (negative) Korrekturspannung anzeigen können.

Ganz anders ist es, wenn der Einstellknopf im Uhrzeigersinn am Anschlag steht: Jetzt hat das Signal eine ausreichende Amplitude und die Synchronisation stellt sich erheblich schneller ein als bei unserem vorherigen Aufbau. Es braucht nämlich keine Schwelle mehr in dem zentralen Baustein erreicht zu werden, ehe überhaupt ein korrigierendes Signal





Versuch 47 & 48

Repressilator und Quorum Sensing

Die Versuche zum Quorum Sensing sind nun nicht auf Oszillatoren, welche nach dem Feed-forward loop Prinzip funktionieren, beschränkt. In [20,21] wird beschrieben, wie mehrere der uns aus Versuch Nr. 16 bekannten Repressilatoren ebenfalls gekoppelt werden können. Das obige Bild zeigt uns den gleich verbesserten Aufbau mit Operationsverstärkern und LED-Anzeige. Der gemeinsame 100 μ F Kondensator, dessen Spannung für die Konzentration des Autoinducers steht, ist jetzt nach rechts unten gewandert. Bei Bedarf kann wieder die (negative) Amplitude des Synchronisiersignals mit einem externen Spannungsmesser oder dem LECTRON Messinstrument (nicht im Experimentierkasten enthalten) angezeigt werden.

Der Vollständigkeit halber ist auch noch ein entsprechender Aufbau mit dem zusätzlichen Schwellwertbaustein K (kleines Bild V48 auf der folgenden Seite) angegeben.

Für das Synchronisierverhalten dieser Versuche gilt das Gleiche wie für die entsprechenden Versuche mit den anderen Oszillatoren.

erzeugt wird, sondern das Signal ist stets mehr oder weniger vorhanden und kann deswegen auch bereits eher wirksam werden. Zwischeneinstellungen am 10k Ω Potentiometer erlauben es uns festzustellen, wann die Synchronisation nicht mehr funktioniert.

Entfernen wir kurzzeitig die Masseverbindung am Kondensator, haben wir wieder ähnliche Verhältnisse wie beim ersten Versuchsaufbau; der Kondensator ist unwirksam. Das Anzeigenband zeigt dann nur fünf verschiedenen Möglichkeiten mit dem Unterschied, dass diesmal nicht aufsummiert, sondern durch die Spannungsteilung 0%, 25%, 50%, 75% oder 100% der Amplitude eines Ausgangssignals erreicht werden.

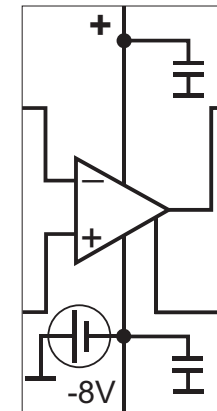
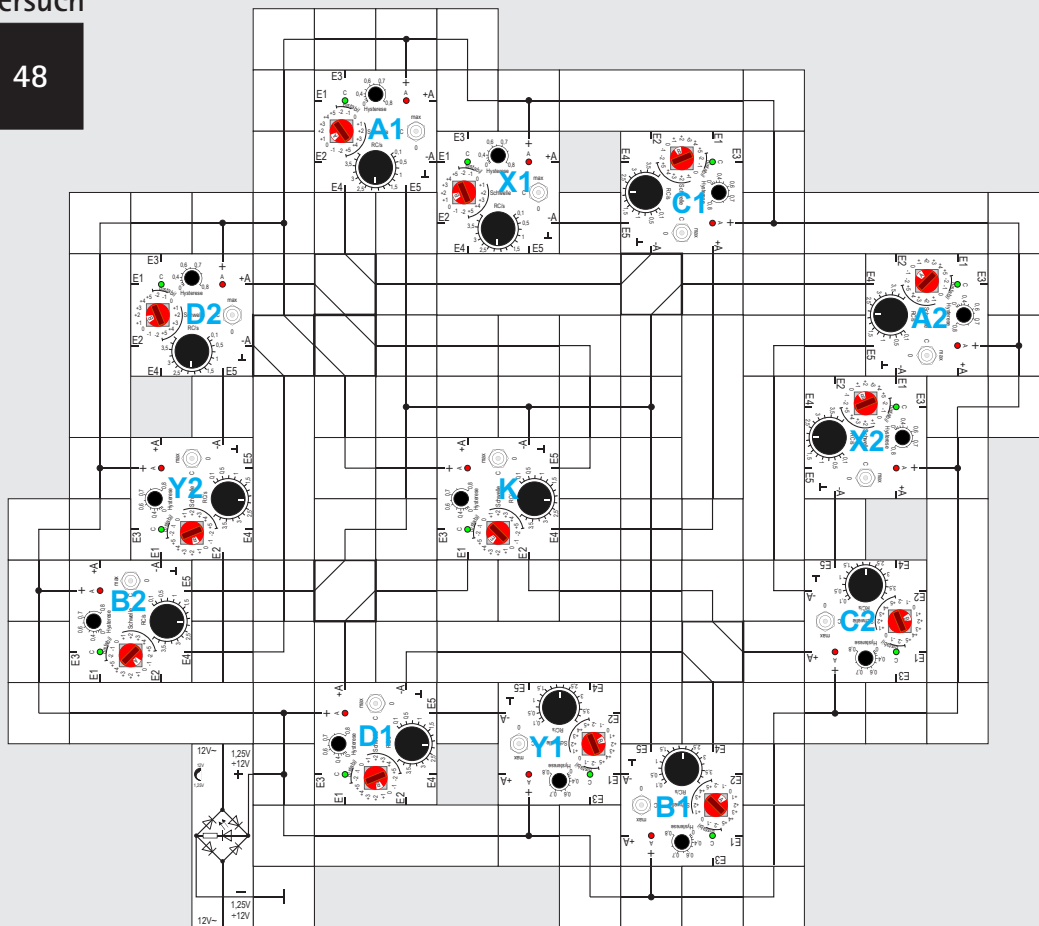
Wer sich für Elektrotechnik interessiert und Näheres über die neu eingesetzten Bausteine Operationsverstärker, mit denen übrigens auch in [18] ausgiebig modelliert wird, und LED-Anzeige erfahren möchte, kann das auf den nächsten Seiten im Kasten nachlesen. Es schadet aber auch nichts, wenn man die Einzelheiten ihrer Funktion nicht kennt.

Die dann folgenden Versuche im letzten Kapitel dieses Anleitungsbuches zeigen, wie vielseitig der LECTRON Schwellwertbaustein ist und dass sich mit ihm natürlich auch typische Digitalschaltungen wie Zähler und Schieberegister aufbauen lassen.

Lectron

Versuch

48

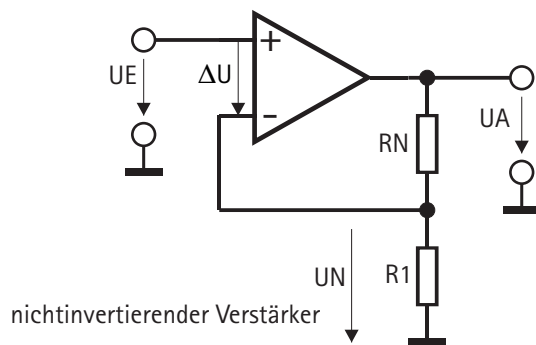
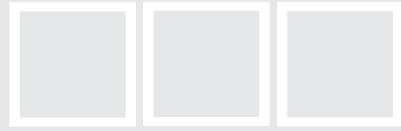


Der Operationsverstärker (was man über ihn wissen sollte)

Operationsverstärker (OpAmp) sind die am häufigsten in der Elektronik verwendeten Bausteine.

Der LECTRON Operationsverstärkerbaustein enthält einen OpAmp, der als integrierte Schaltung ausgeführt ist (CA 3140). Die beiden linken Anschlüsse sind seine beiden Eingänge, oben der invertierende (-), unten der nicht invertierende (+). Der Ausgang des Verstärkers (Spitze des Dreiecks) liegt am rechten oberen Anschluss.

Operationsverstärker benötigen in der Regel zwei Versorgungsspannungen, eine positive und eine negative, damit sie auch negative Eingangsspannungen verarbeiten können. Beim LECTRON - Operationsverstärker braucht nur die positive an der oberen Schmalseite angelegt zu werden; die negative erzeugt er sich intern selbst mit Hilfe einer Ladungspumpe (wird zwei Seiten weiter beschrieben). Diese Spannung (-8V)



wird an der unteren Schmalseite für gewisse Anwendungen abgegeben; für unseren Versuch wird sie ebenso wenig benötigt wie auch der untere rechte Anschluss. Beide sollten ungeschaltet bleiben.

Der Operationsverstärker ist ein Differenzverstärker, der die Potentialdifferenz $\Delta U = (U_+ - U_-)$ zwischen seinen beiden Eingängen, die mit + und - bezeichnet sind, verstärkt. Diese verstärkte Spannung steht am Ausgang (im Schaltbild der Anschluss an der Spitze des Dreiecks) zu Verfügung. Es spielt beispielsweise dabei keine Rolle, ob $U_+ = 5,1V$ und $U_- = 5,0V$ ist, oder ob $U_+ = 4,6V$ und $U_- = 4,5V$ ist; verstärkt wird immer nur $\Delta U = 0,1V$.

Der mit + bezeichnete Eingang ist der »nicht-invertierende«

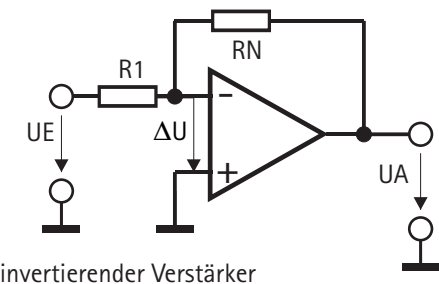
Eingang, mit - wird der »invertierende« Eingang bezeichnet. Nicht-invertierend bedeutet, dass bei konstanter U_- Spannung eine steigende Spannung an diesem Eingang auch die Ausgangsspannung steigen lässt. Invertierend bedeutet, dass die Ausgangsspannung sinkt, wenn bei konstanter U_+ Spannung die Eingangsspannung an diesem Eingang steigt. Der Operationsverstärker führt also letztlich die mathematische Operation

$$U_{\text{ausgang}} = [U_{(+ \text{ Eingang})} - U_{(- \text{ Eingang})}] \times \text{Verstärkungsfaktor}$$

durch: er zieht die Spannung am invertierenden Eingang von der am nichtinvertierenden Eingang ab und multipliziert dann das Ergebnis mit dem Verstärkungsfaktor.

Moderne Operationsverstärker besitzen extrem hohe Eingangswiderstände im $T\Omega$ - Bereich. $1T\Omega$ sind $10^{12}\Omega$, d. h. es fließen praktisch keine Eingangsströme in das Bauteil. Auch der Verstärkungsfaktor des ungeschalteten Operationsverstärkers, die »Leerlaufverstärkung« ist mit typischen Werten von 10^4 bis 10^5 sehr hoch. Das bedeutet nun nicht, dass bei $\Delta U = 1V$ der Verstärker eine Ausgangsspannung $U_A = 10^4V$ abgibt, U_A kann natürlich nur Werte annehmen, die durch die beiden Versorgungsspannungen vorgegeben sind, wobei schaltungsbedingt die positive Versorgungsspannung meistens gar nicht erreicht wird. Beim LECTRON Baustein, der mit $9V$ versorgt wird, ist beispielsweise $-8V \leq U_A \leq 7,5V$.

Ein ungeschalteter Operationsverstärker eignet sich als sogenannter **Komparator** dazu, die beiden Eingangsspannungen U_+ und U_- miteinander zu vergleichen. Ist $U_+ > U_-$, so wird sein Ausgang in der positiven Sättigung sein und beispielsweise $+7,5V$ abgeben;



bei $U_- > U_+$ ist $U_A = -8V$.

Der Operationsverstärker wäre sicher nicht ein so verbreitetes Bauteil geworden, wenn man ihn nur als Komparator einsetzen würde. In vorstehenden Versuch haben wir bereits seine Eigenschaft, an den Eingängen extrem hochohmig zu sein, ausgenutzt. Er arbeitete dort als sog. *Elektrometerverstärker* im nicht-invertierenden Betrieb.

Die Beschaltung zeichnet sich dadurch aus, dass es lediglich ein Eingangssignal U_E am + Eingang gibt und der - Eingang über einen Spannungsteiler mit dem Ausgang verbunden ist (s. linke Abbildung). Die Arbeitsweise eines solchermaßen »gezähmten« Operationsverstärkers ist wie folgt:

Legt man an seinen + Eingang eine positive Eingangsspannung U_E an, würde ohne R_N eine Eingangsspannungsdifferenz $\Delta U = U_E$ auftreten und U_A auf hohe positive Werte ansteigen. Über R_N ge-

langt jedoch ein Teil der Ausgangsspannung auf den Minus-Eingang und verkleinert ΔU ; es liegt also eine Gegenkopplung vor. Geht man von einer endlichen Ausgangsspannung U_A aus, so wird $\Delta U = U_A / v$. Da die Leerlaufverstärkung v bei einem Operationsverstärker riesengroß ist, wird praktisch $\Delta U = 0$. Es stellt sich also eine solche Ausgangsspannung ein, dass $U_N = U_E$ wird.

Weil bei einem idealen Operationsverstärker kein Eingangsstrom fließt, ist der aus R_N und R_1 gebildete Spannungsteiler unbelastet. Daraus folgt:

$$U_N = U_A R_1 / (R_1 + R_N)$$

$$U_A = U_N (1 + R_N / R_1)$$

$$U_A = U_E (1 + R_N / R_1)$$

Die Spannungsverstärkung $V = U_A / U_E$ ergibt sich zu:

$$V = 1 + R_N / R_1$$

Für $R_N = 0$ und $R_1 = \infty$ ergibt sich mit $V = 1$ lediglich die Impedanzwandlung wie im vorher gegangenen Versuch.

Der große Vorteil dieser Schaltung ist neben Ihrer Hochohmigkeit am Eingang, dass ihre Verstärkung unabhängig von der Leerlaufverstärkung und anderen Toleranz behafteten Schaltungsteilen des Verstärkers nur vom extern wählbaren Widerstandsverhältnis R_N/R_1 abhängt.

Neben dieser Beschaltung gibt es noch eine weitere Möglichkeit, den Verstärker gegenzukoppeln und somit zu »zähmen«. Die Gegenkopplung muss vom Ausgang natürlich zum invertierenden - Eingang führen, andernfalls ergäbe sich eine Mitkopplung (s. rechte Abbildung auf vorhergehender Seite). Das Eingangssignal wird am Fußpunkt des Spannungsteilers angeschlossen. Es entsteht die Schaltung eines **invertierenden Verstärkers**: Legt man gedanklich eine positive Eingangsspannung an, die über R_1 auf den invertierenden Eingang gelangt, wird die Ausgangsspannung negativ. Sie geht wegen der hohen Leerlaufverstärkung so weit nach Minus, bis $\Delta U = 0$ ist.

Man spricht daher von einer *virtuellen* Masse am - Eingang. Wendet man dort die Knotenregel an (Summe aller Ströme gleich Null), ergibt sich:

$$U_E / R_1 + U_A / R_N = 0$$

oder nach U_A aufgelöst

$$U_A = -U_E \cdot R_N / R_1$$

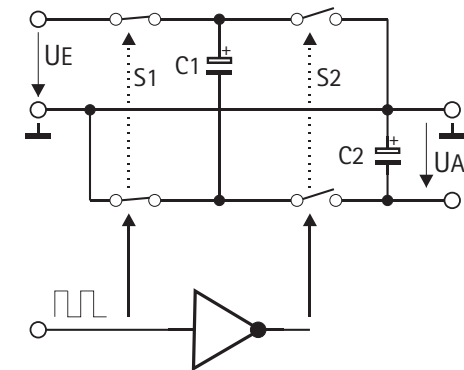
Auch hier hängt die Verstärkung nur vom Verhältnis R_N/R_1 ab, der Eingangswiderstand ist allerdings nicht so extrem hoch wie beim Elektrometerverstärker, sondern ergibt sich aus der Größe der verwendeten Widerstände. Durch die Wahl der Widerstände kann die Verstärkung kleiner als Eins gemacht werden, was beim nicht-invertierenden OpAmp nicht möglich ist.

Beiden gegengekoppelten Schaltungen ist eins gemeinsam:

Der Operationsverstärker versucht stets, eine ihm aufgezwungene Differenzspannung ΔU so schnell er kann, auf Null zu bringen.

Diese Regel ist bei der Schaltungsanalyse recht hilfreich.

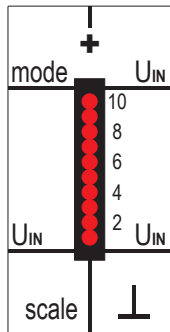
Beide Grundschaltungen lassen sich auf mehrere Eingänge erweitern und es ergeben sich dann Addierer, wie es beim GenBaustein vorkommt, oder auch Subtrahierer.



Die Ladungspumpe

Im LECTRON Operationsverstärkerbaustein wird die negative Hilfsspannung mit einer Ladungspumpe erzeugt. Man lädt dazu einen Kondensator C_1 auf die positive Versorgungsspannung auf und schaltet ihn mit (elektronischen) Schaltern S_1 und S_2 , die gegenphasig von einem frei schwingenden Oszillator gesteuert werden, umgepolt an C_2 . Nach wenigen Schaltzyklen ist $U_A = -U_E$.

Durch proportional zum Laststrom auftretende Spannungsabfälle an den elektronischen Schaltern und Umladeverluste an den Kondensatoren erreicht U_A betragsmäßig nicht ganz U_E , sondern typisch nur 1V weniger. Die Verluste lassen sich durch große Kapazitäten und hohe Schaltfrequenzen klein halten.



| $U_{\text{Messbereich}}/V$ | R_{scale}/Ω |
|----------------------------|---------------------------|
| 7,5 | ∞ |
| 6 | 33k |
| 5 | 15k |
| 4 | 7,5k |
| 3 | 3,9k |
| 2 | 1,4k |
| 1,5 | 430 |
| 1,25 | 0 |

R_{scale} zwischen scale und Masse

Der LED – Anzeige Baustein

Der LECTRON LED-Anzeige Baustein wurde als preisgünstige Alternative zu einem Oszilloskop entwickelt. Natürlich kann er es nicht ersetzen, er zeigt uns schnelle Signaländerungen aber besser als ein Messinstrument an.

Der Baustein enthält dazu eine Band – Anzeige aus 10 LEDs, die von 1 bis 10 nummeriert sind. Je höher die an U_{IN} liegende Spannung ist, desto mehr LEDs leuchten.

Der Messbereich (»Vollausschlag«, alle 10 LEDs leuchten) wird über einen Widerstand an $scale$ gegen Masse eingestellt. Die Tabelle zeigt für einige gängige Messbereiche, welche Widerstände zu nehmen sind. Bei unbeschaltetem $scale$ – Eingang ist $R_{\text{scale}} = \infty$ und die zehnte LED leuchtet, wenn mindestens 7,5V an U_{IN} liegen.

Wählt man beispielsweise $R_{\text{scale}} = 3,9k\Omega$, passiert das gleiche bereits bei 3V. Wer selbst rechnen möchte: Die Beziehung zwischen $U_{\text{Messbereich}}$ und R_{scale} ist

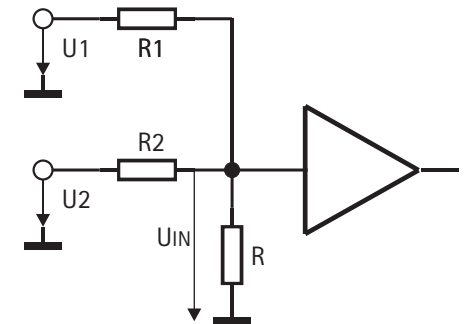
$$U_{\text{Messbereich}} = 1,25V \cdot [1 + 5 \cdot R_{\text{scale}} / (10k\Omega + R_{\text{scale}})]$$

Kommt es uns auf den eigentlichen Wert gar nicht so genau an, ist ein $10k\Omega/250k\Omega$ Potentiometer oder der $10k\Omega$ Regelwiderstand empfehlenswert. Wir können den Messbereich dann passend stufenlos einstellen.

Der Baustein besitzt mit **mode** einen weiteren Steuereingang. Bleibt er unbeschaltet, so leuchtet immer nur eine LED als **Punktanzeige**. Verbinden wir ihn mit der Versorgungsspannung, erhalten wir ein **Leuchtband**.

Der U_{IN} – Eingang ist durch den Einsatz eines internen Operationsverstärkers sehr hochohmig, so dass der Eingangsstrom (maximal 100nA) die Potenzialverhältnisse in unseren Schaltungen kaum beeinflussen wird. Wir können also auch Spannungen, falls sie denn hoch genug sind, aus hochohmigen Quellen direkt anzeigen. Möchte man nur die Wechselspannungsanteile anzeigen, empfiehlt sich eine Ansteuerung über ein RC-Glied ($47nF/100k\Omega$).

Der Baustein zeigt allerdings nur positive Spannungen an. Zur



Anzeige von negativen Spannungen oder Spannungsverläufen mit negativen Anteilen gibt es die Möglichkeit, über einen »summierenden Spannungsteiler« das interessierende Signal in den positiven Bereich zu verschieben, indem ihm ein konstanter positiver Betrag hinzu addiert wird. Wegen der Hochohmigkeit des Eingangs können für den Spannungsteiler ebenfalls hochohmige Widerstände verwendet werden. Die drei galvanisch verbundenen U_{IN} – Eingänge helfen Bausteine beim Aufbau des Spannungsteilers zu sparen.

Die Summe aller Ströme im Knotenpunkt ist gleich Null:

$$(U1 - U_{\text{IN}})/R1 + (U2 - U_{\text{IN}})/R2 = U_{\text{IN}}/R$$

nach U_{IN} umgestellt ergibt sich der etwas komplizierte Ausdruck

$$U_{\text{IN}} = (U1 \cdot R/R1 + U2 \cdot R/R2) / (1 + R/R1 + R/R2)$$

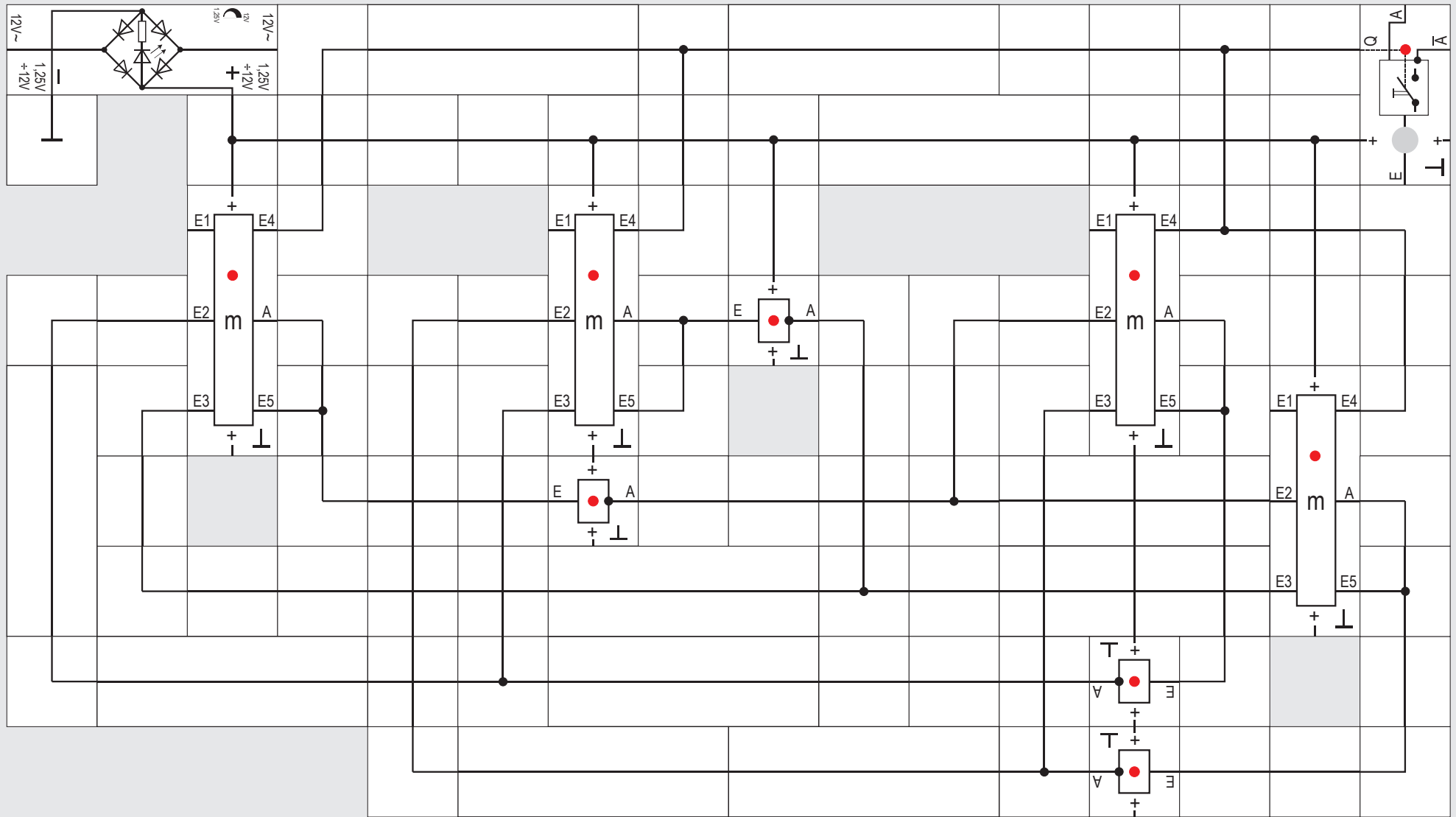
mit $R1 = R2$ wird er einfacher:

$$U_{\text{IN}} = (U1 + U2) / (2 + R1/R)$$

Wir können auch R ganz weglassen: $R = \infty$

$$U_{\text{IN}} = (U1 + U2) / 2$$

49





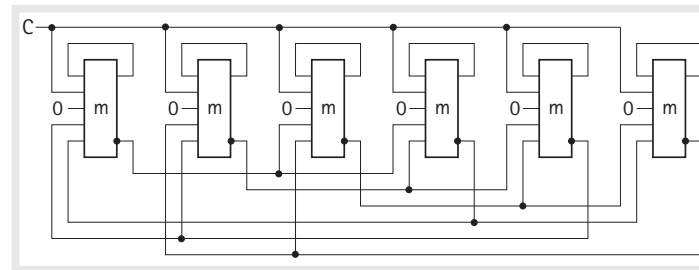
4. Digitaltechnik mit dem Gen-Baustein

Sicher ist Ihnen aufgefallen, dass die bisher aufgebauten Schaltkreise aus Gen-Bausteinen manchmal schon etwas nach Computerschaltkreisen der Digitaltechnik aussehen. Wer das interessant findet, dem möchten wir nicht unsere weiteren Spielereien zu diesem Thema vorenthalten. Es lassen sich nämlich weitere veritable Grundschaltungen der Computertechnik mit dem Gen-Baustein aufbauen. Zwar kommen die folgenden Schaltungen unseres Wissens nicht in biologischen Gen-Netzen vor; aber faszinierend ist es schon, dass Gen-Bausteine auch zählen können, oder?

Versuch 49

Zähler mit 5-Eingangs-Majoritätsbausteinen

Im Repertoire der LECTRON Bausteine gibt es ein digitaltechnisches Geschwister des Gen-Bausteins, den Majoritätsbaustein mit 5 Eingängen, den wir zum Vergleich kurz vorstellen wollen: Die Eingänge erhalten ein logisches 0 oder 1 Signal, und welches Signal in der Mehrheit ist, wird zum Ausgang durchgeschaltet. Im Anleitungsbuch des Kastens »Schwellwert- & Majoritätslogik« ist mit solchen Bausteinen ein Zähler aufgebaut und es ist eine interessante Frage, ob das auch mit dem Gen-Baustein möglich ist. Bevor wir das ausprobieren,



hier aber zunächst die Versuchsbeschreibung aus dem Schwesterbaukasten. Der Zähler hat die Struktur eines Rings, wie wir das schon aus vorangegangenen Versuchen kennen. Sein Zählvolumen ist gleich der Anzahl seiner Zellen N ; ein Ringzähler ist nicht so aufwandsarm wie ein normaler Zähler.

Das Aufbaumuster gilt für Zähler mit einer geraden Anzahl N von Zählstufen, wobei $N \geq 4$ sein muss, [22]. Ein Eingang eines jeden Bausteins ist fest an 0 gelegt. Der jeweils zweite Eingang liegt am zentralen Taktsignal C und der Ausgang A jedes Bausteins wird auf den dritten Eingang des gleichen Bausteins rückgekoppelt. Die beiden noch freien Eingänge jedes Bausteins werden von den invertierten Ausgängen \bar{A}_i vorangehender Stufen angesteuert. Dafür gilt die folgende Verbindungsregel: Der invertierte Ausgang \bar{A}_k der k -ten Stufe, wobei $1 \leq k \leq N$ ist, wird auf einen Eingang des Bausteins $k+n$ und auf einen des Bausteins $k+n+1$ gelegt. Dabei ist $n = (N/2) - 1$. Ist kein nachfolgender Baustein mehr da,

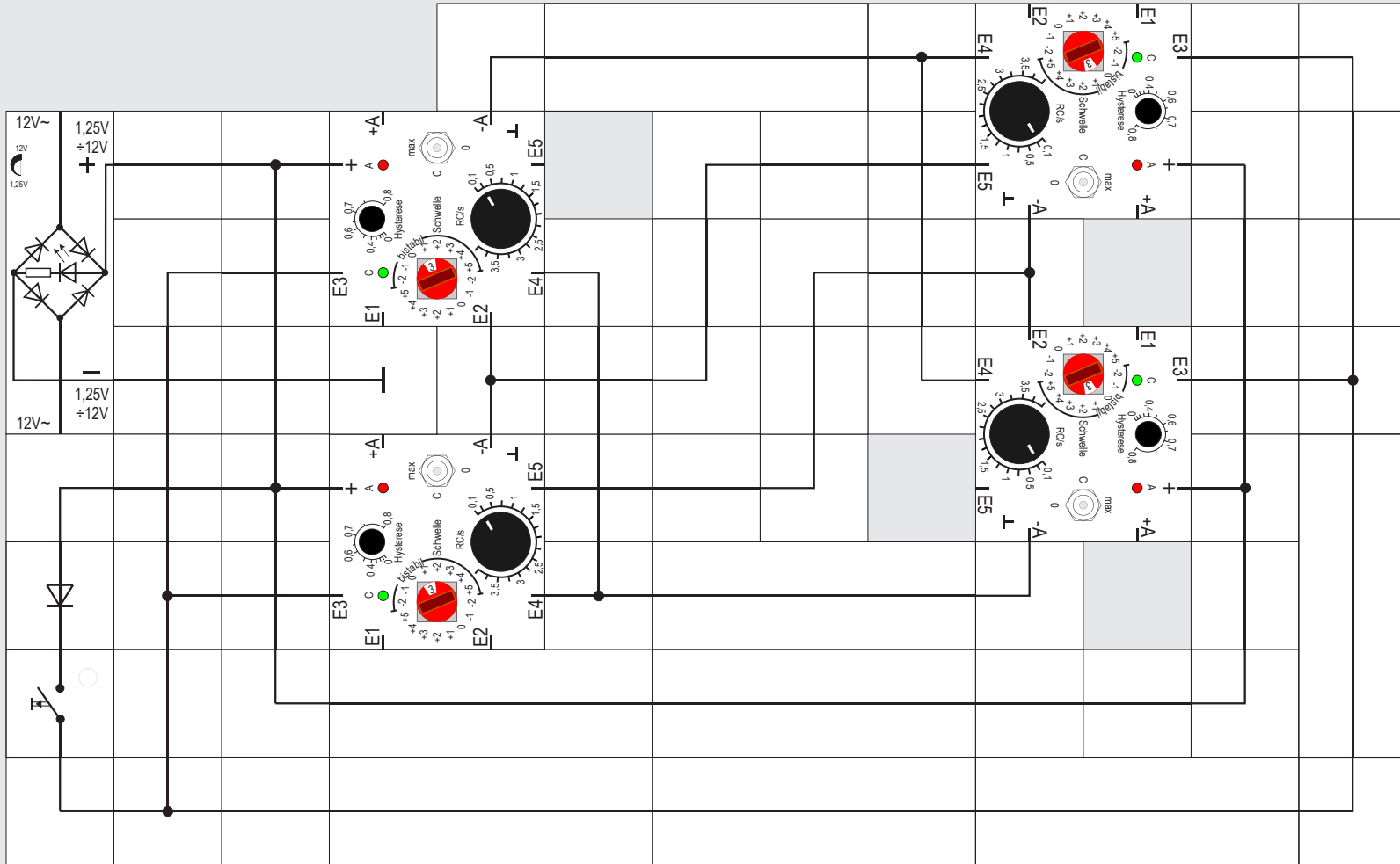
fängt man wieder von »vorn« an. Die Anordnung ist als Ring verdrahtet. Die Regel klingt komplizierter als sie ist. Das Beispiel zeigt einen Zähler, der bis sechs zählt.

Für $N = 6$ ist $n = 6/2 - 1 = 2$. Der invertierte Ausgang der ($k = 1$)-ten, also ersten, Stufe \bar{A}_1 wird auf je einen Eingang der dritten und vierten Stufe gelegt, usw. (siehe Abb.).

Mit vier 5-Eingangs-Majoritätsbausteinen können wir also einen Viererzähler aufbauen. Der zu invertierende Ausgang des ersten Bausteins wird, da $n = 1$ ist, auf den nächsten und den übernächsten gegeben, usw.

Wenn $C = 0$ ist, geben n benachbarte Stufen eine 1 ab; bei $C = 1$ kommt eine weitere hinzu und bei erneutem $C = 0$ wird eine bisher 1 abgebende Stufe 0, so dass die n Einsen eine Stufe weiter gerückt sind.

Wir müssen den Zähler nicht unbedingt aufbauen, zumal uns einige Bausteine (4x Inverter 2450, 4x Majoritätsbaustein 2452) fehlen. Es reicht, seine Funktion zu verstehen, da wir ihn in eine Schaltung mit Gen-Bausteinen übersetzen wollen.





Versuch 50

Zähler mit 4 Gen-Bausteinen

Unser Gen-Baustein mit fünf/sechs Eingängen beinhaltet die Majoritätsfunktion mit 5 Eingangsvariablen (siehe Versuch 6). Es muss also möglich sein, den Aufbau des Versuchs 49 in einen mit Gen-Bausteinen abzuwandeln. Dazu sehen wir uns einen einzelnen Baustein mit seinen Verbindungen zu seinen Nachbarn an und »übersetzen« sie in Schwellwertlogik.

- Die Schwelle eines Majoritätsbausteins für 5 Eingangsvariable liegt bei $5/2 = 2,5$. Drei logisch gleiche Variable bestimmen den Ausgangszustand. Die gleiche Funktion liefert der Gen-Baustein, wenn wir seine Schwelle auf +3 einstellen.
- Ein Eingang beim Majoritätsbaustein ist fest mit

0 beschaltet. Beim Gen-Baustein lassen wir ihn einfach unbeschaltet.

- Der zweite Eingang ist mit dem Ausgang A desselben Bausteins verbunden. Wir stellen dazu beim Gen-Baustein die Schwelle +3 im bistabilen Bereich ein und sparen durch die bausteininterne Selbsthaltung die externe Verdrahtung (siehe Versuch 4).
- Schwieriger wird es mit den beiden restlichen Eingangssignalen, die jeweils von den \bar{A} - Ausgängen zweier anderer Bausteine stammen. \bar{A} - Ausgänge haben wir beim Schwellwertbaustein nicht, sondern nur -A - Ausgänge, was ein Unterschied ist. Die Tabelle macht das deutlich.

| | logisch0 | logisch1 |
|-----------|----------|----------|
| +A | 0V | +8V |
| \bar{A} | +8V | 0V |
| -A | 0V | -8V |

Wenn wir keinen Inverter besitzen oder einsetzen wollen, hilft uns wieder die grundlegende Beziehung weiter, die ein Bindeglied zwischen Boole'scher Logik und Schwellwertlogik darstellt:

$$A + \bar{A} = 1 \text{ oder } \bar{\bar{A}} = 1 - A$$

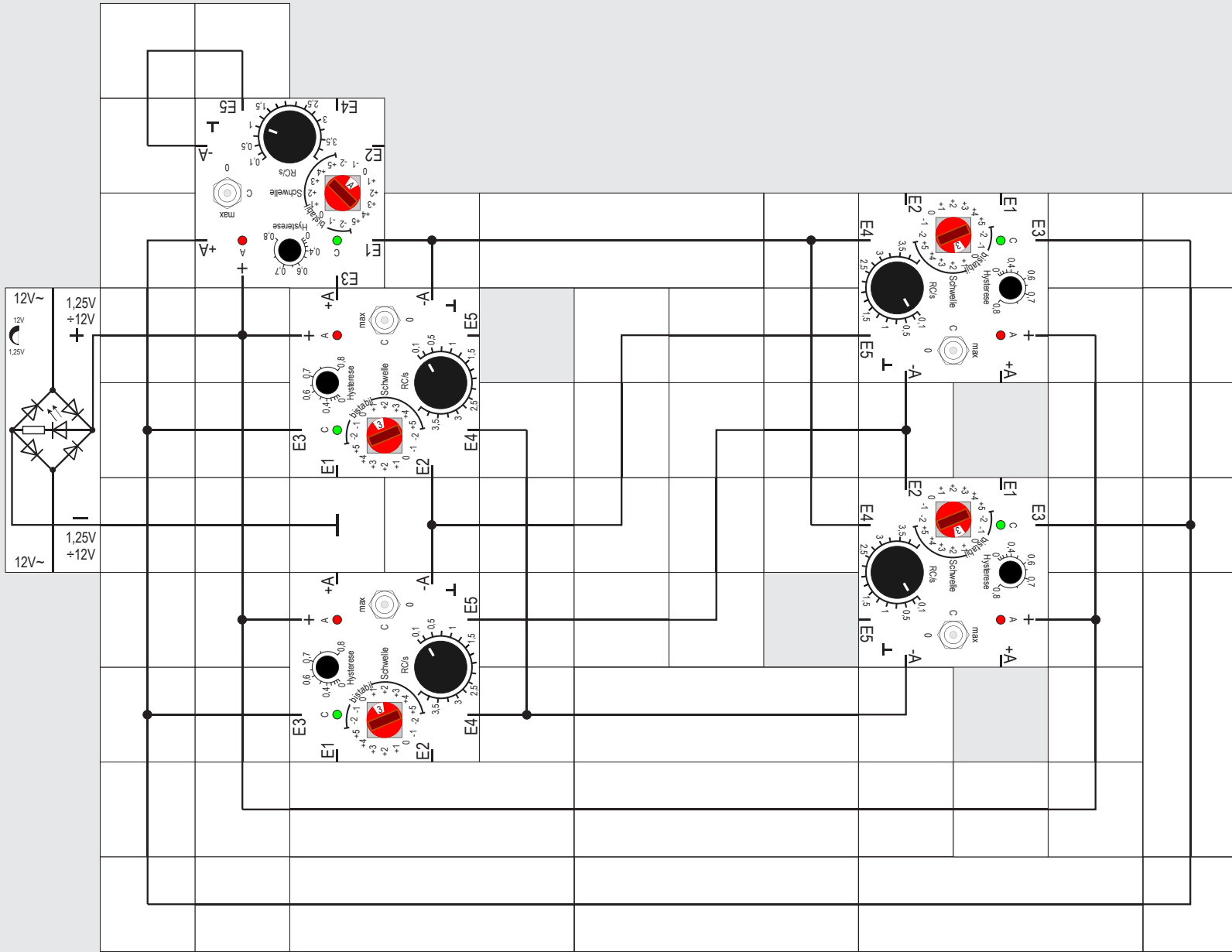
Wir können uns \bar{A} erzeugen, wenn wir einen Eingang des Gen-Bausteins fest an logisch 1 (+8V) legen und einen zweiten mit -A, das glücklicherweise vorhanden ist, verbinden. Die beiden logi-

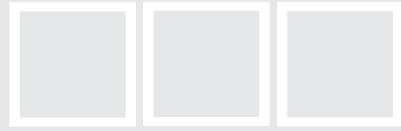
schen 1en müssten wir uns mit einer Dioden - Widerstands - Kombination aus der Versorgungsspannung erzeugen. Das ist aber gar nicht nötig, weil wir sie sofort eliminieren können, wenn wir gleichzeitig die Schwelle um 2 absenken.

Den zentralen Takt erzeugen wir mit dem Taster aus der um eine Diodenstrecke abgesenkten Versorgungsspannung. Der Taster braucht nicht entprellt zu werden, da wir ihn ohnehin immer etwas länger im gedrückten Zustand halten müssen.

Wir wählen als Zeitkonstante $RC = 0,1s$ und als Hysterese 0,1 bei allen Bausteinen. Legen wir die Versorgungsspannung an, wird sich nichts weiter tun. Erst wenn wir den Taster betätigen, werden zwei benachbarte Zellen angeschaltet. Welche das sind, unterliegt dem Zufall. Lassen wir den Taster los, bleibt eine (die im Gegenuhrzeigersinn vorne liegende) angeschaltet.

Bei erneuter Tasterbetätigung schaltet die nächste Zelle im Gegenuhrzeigersinn an; wir müssen den Taster so lange betätigt halten, bis das passiert ist. Es sind dann zwei Zellen angeschaltet, von denen die bisher aktive abschaltet, wenn wir den Taster anschließend loslassen. Auf diese Weise können wir die jeweils aktive Zelle um eine Stelle im Gegenuhrzeigersinn weiterschieben.



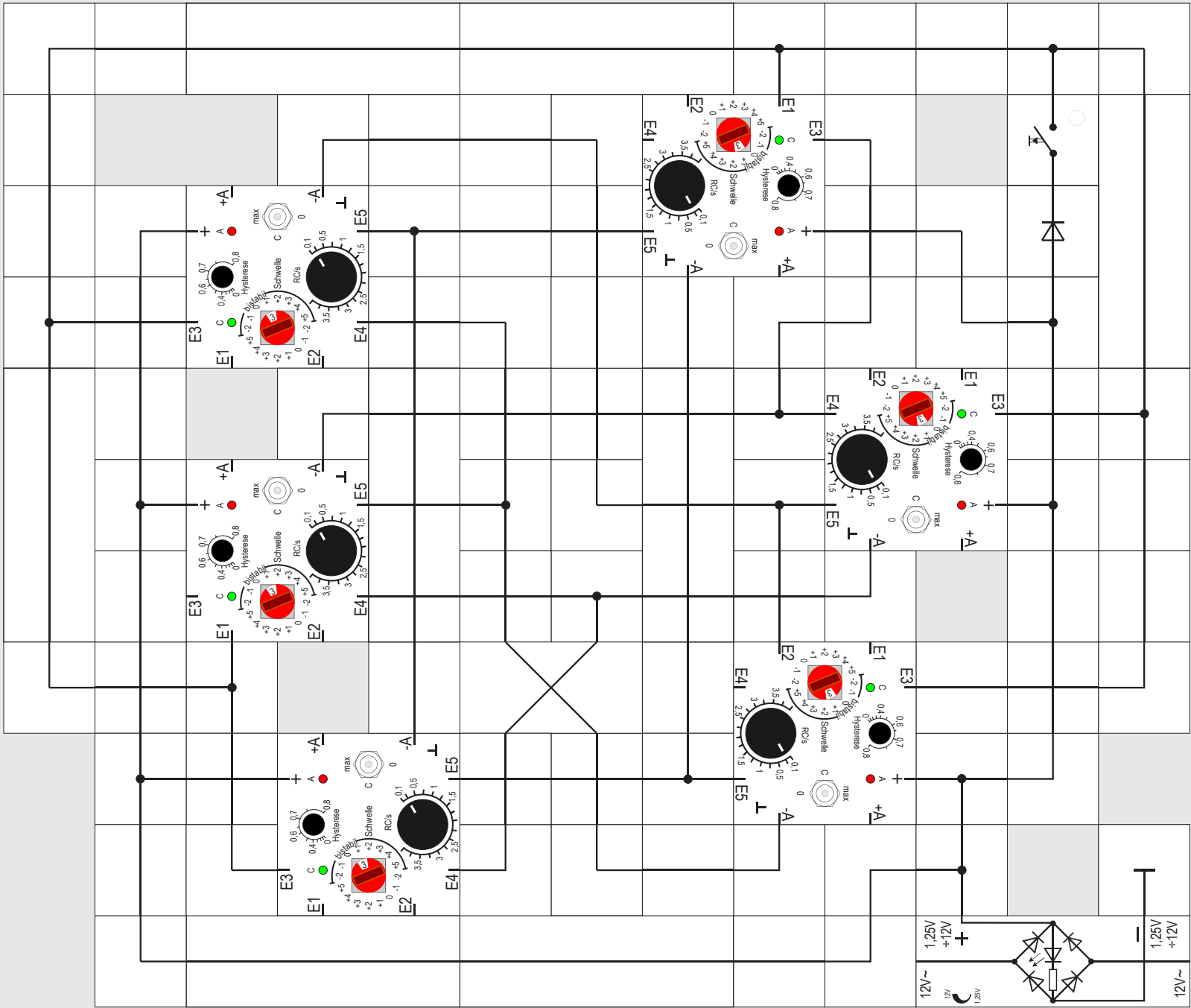


Versuch 51

Zähler mit 4 Gen-Bausteinen (Alternative)

Wenn wir einen weiteren Gen-Baustein spendieren, der als Oszillator geschaltet ist, können wir auf die Takterzeugung von Hand verzichten: Die Schaltung funktioniert genauso wie die im vorangegangenen Versuch. Den Taster haben wir durch den bekannten Oszillator ersetzt. Aus Platzgründen ist der Eingang E3 leider mit dem +A - Ausgang einer Zelle verbunden, was natürlich die Oszillation zum Stillstand bringen würde. Wir können das beim Oszillatorbaustein leicht kompensieren, indem wir auch den -A - Ausgang derselben Zelle mit einem weiteren Eingang (E1) verbinden.

Eine weitere Regel kann auch manchmal nützlich sein: Unbenutzte Eingänge können unbeschaltet bleiben, darüber hinaus können unbenutzte Eingänge verschiedener Gen-Bausteine auch elektrisch miteinander verbunden sein, wenn das aus Platzgründen erforderlich sein sollte. Es kommt dadurch zu keinen unerwünschten Verkopplungen.



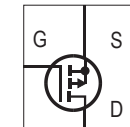


Versuch 52

Zähler mit 6 Gen-Bausteinen

Abschließend zu den Zählern zeigen wir noch den Aufbau für sechs Gen-Bausteine. Es ist eine Variante, bei der der Takt manuell mit dem Taster erzeugt wird.

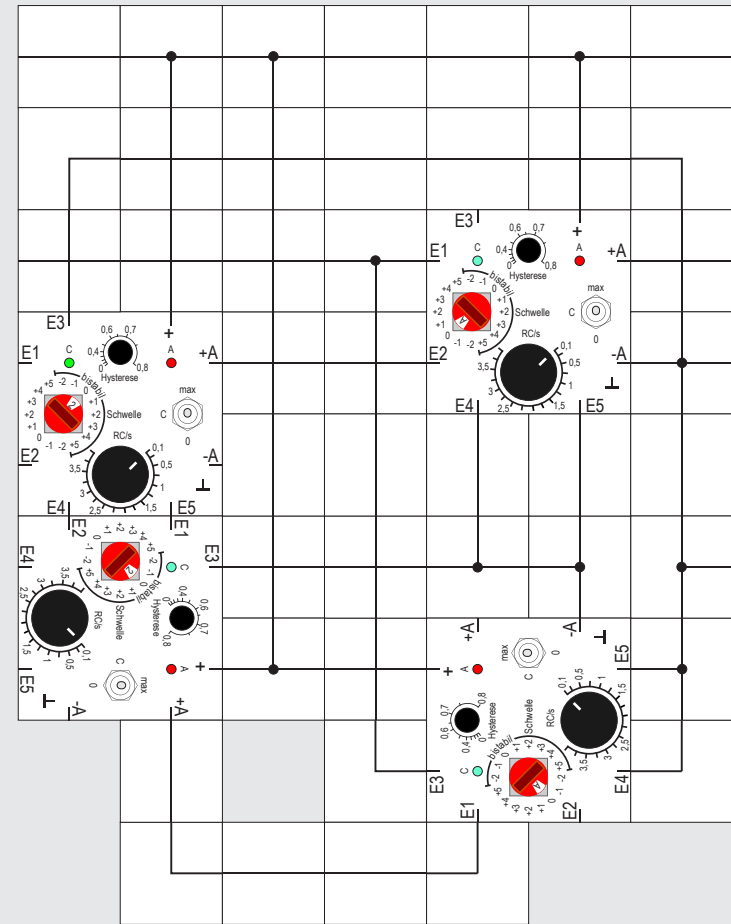
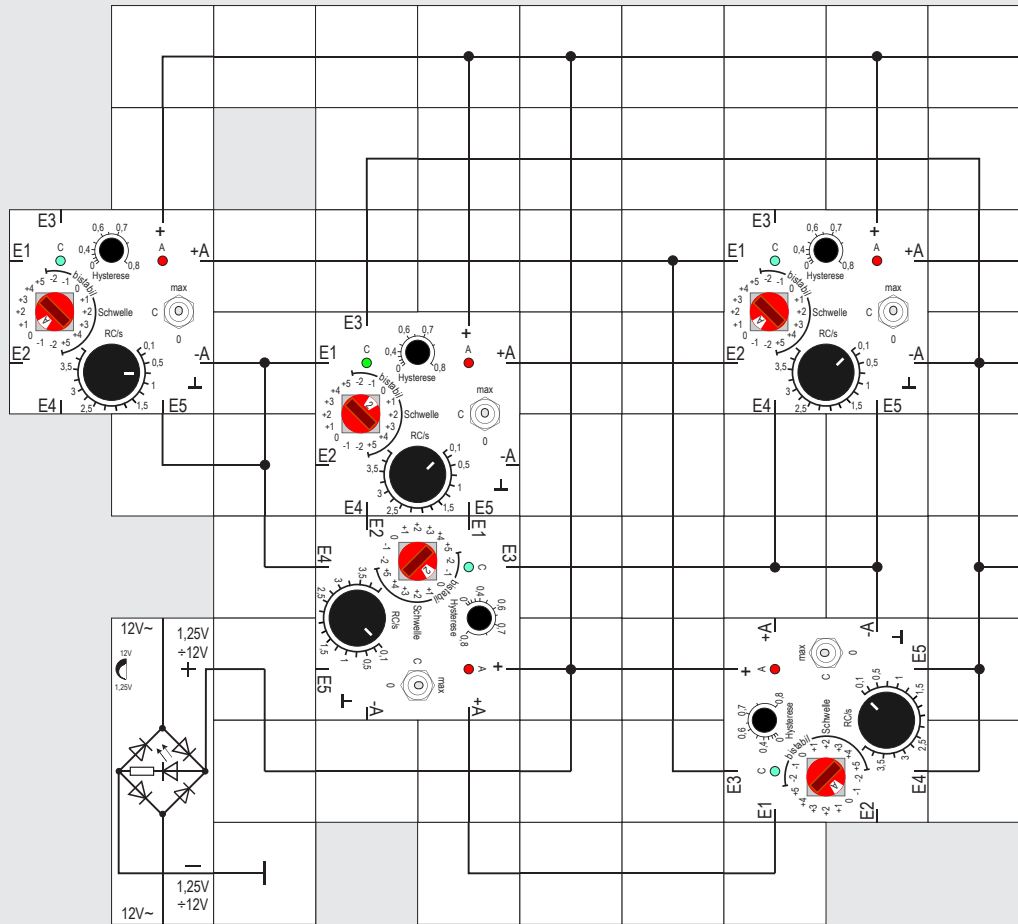
Für an Elektronik Interessierte



Der MOSFET

Im übernächsten Versuch werden wir den Takt ebenfalls manuell mit dem Taster erzeugen. Da wir gleichzeitig den invertierten Takt benötigen, müssen wir uns überlegen, wie das zu bewerkstelligen ist.

Aus einem Signal das invertierte zu gewinnen, geht recht einfach mit einem so genannten MOSFET (engl. *metal oxide semiconductor field-effect transistor*). Das ist ein Transistor mit den drei Anschlüssen Source S, Gate G und Drain D. Das Gate ist von den beiden anderen Anschlüssen isoliert und zwar sehr hochohmig im Teraohm - Bereich. Der in den Versuchen eingesetzte p-Kanal MOSFET bildet zwischen Source und Drain einen gut leitenden Kanal aus, wenn das Gate-Potenzial mindestens circa 2V unter dem Source - Potential liegt. Er sperrt dagegen, wenn das Gate-Potenzial gleich dem Source - Potential ist. Der Transistor verhält sich also wie ein Schalter zwischen Source und Drain, der mit dem Gate - Potenzial gesteuert, also geschlossen und geöffnet, werden kann.





Versuch 52A

Teilerstufe

Zum Zählen brauchen wir nicht unbedingt Ringstrukturen aufzubauen, wie wir das in den vorangegangenen Versuchen getan haben. Wenn es uns gelingt, eine Teilerstufe aufzubauen, die taktgesteuert diesen Takt durch zwei teilt und das heruntergeteilte Signal an ihren Ausgängen abgibt, haben wir bereits das Grundelement für einen Binärzähler.

Aus der Schwellwertlogik [5] sind Schaltungen für die verschiedenen Flipflops der Digitaltechnik bekannt. Für einen asynchronen Zähler können wir das T-Flipflop (T von *engl. toggle*) nehmen und seine Schaltung in eine »übersetzen«, die mit unseren Gen-Bausteinen realisierbar ist.

Das T-Flipflop arbeitet taktgesteuert nach dem Master-Slave-Prinzip: Mit der negativen Flanke des Taktes wird der logische Zustand des -A -Ausgangs vom Slave, der gleichzeitig der invertierte Ausgang der Teilerstufe ist, in den Master übernommen und mit der positiven Flanke des Taktes anschließend in den Slave geschoben. Der Slave gibt dann den invertierten Zustand an seinen Ausgängen ab. Letzt-

lich wird dadurch die Frequenz des Taktsignals durch zwei geteilt.

Die beiden Ausgangssignale der Teilerstufe werden als Taktsignale für die nächste Teilerstufe genommen, usw., so dass ein Binärzähler entsteht.

Für eine Teilerstufe benötigen wir vier Gen-Bausteine, zwei für den Master und zwei für den Slave. Da wir mit den Gen-Bausteinen arbeiten, die ja keine Flanken auswerten können, sondern Potenzialsommen mit Schwellen vergleichen, brauchen wir auch zwei zueinander komplementäre Takte. Es dürfte klar sein, dass ein Taktsignal nicht einmal die Potenzialsomme über die Schwelle heben und ein andermal unter die Schwelle bringen kann.

Beide Takte, T und -T, gewinnen wir aus dem linken Gen-Baustein, der als Oszillator arbeitet. Sein Ausgangssignal -A = -T steuert den Master, sein +A = T-Signal den Slave. Zum Speichern beim Master nutzen wir die bistabile Funktion der Gen-Bausteine; die Schwelle ist 0.

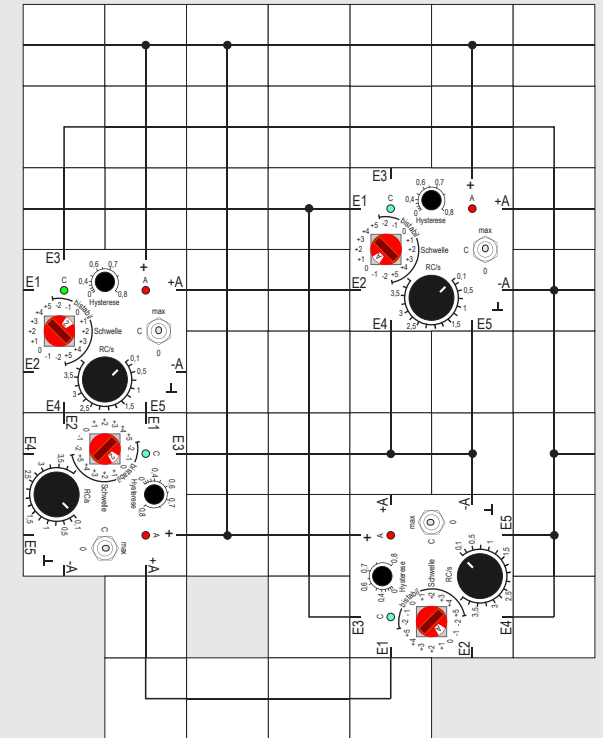
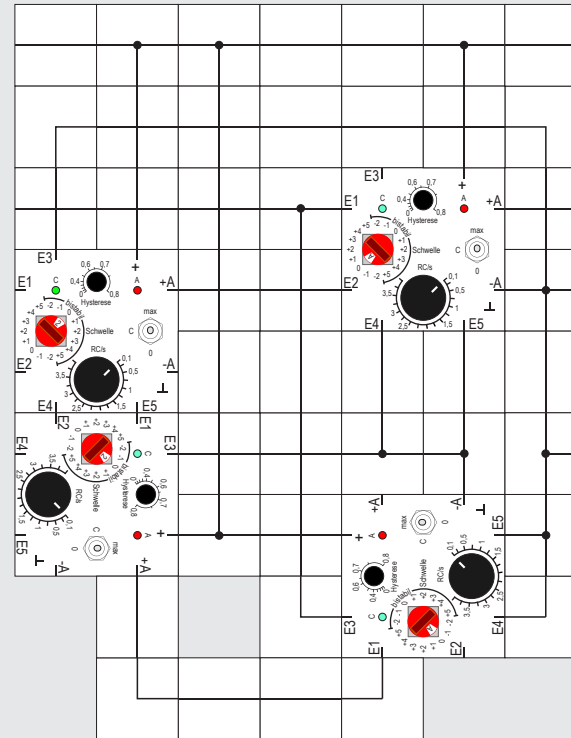
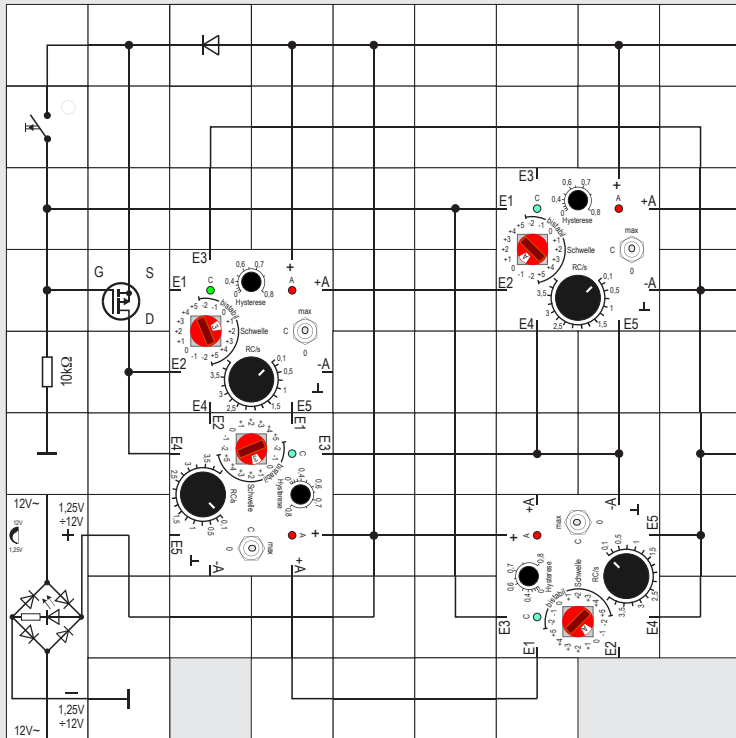
Die -A -Ausgänge des Slaves führen einerseits auf die Eingänge des Masters, andererseits zum Selbsthalten auf zwei Eingänge des jeweils anderen Gen-Bausteins im Master. Die »Kreuzkopplung« bei den Gen-Bausteinen des Slaves geht zweifach in die zu bildende Summe ein, die jeweils mit der Schwelle 0 verglichen wird.

Die Oszillatorfrequenz des linken Gen-Bausteins stellen wir mit $RC = 0,5s$ bis $1s$ bei der Hysterese von 0,1 so ein, dass wir gut verfolgen können, was passiert. Die RC - Einstellung der anderen vier Gen-Bausteine ist 0,1s und die der Hysterese 0.

Nach Anlegen der Versorgungsspannung sehen wir, dass bei dunkler roter LED des Oszillators ein Gen-Baustein des Masters aktiviert ist und der andere nicht. Leuchtet anschließend die rote LED des Oszillators wird dieser logische Zustand vom Slave übernommen, die LEDs beider Master Gen-Bausteine sind dann dunkel. Nach Verlöschen der Oszillator-LED leuchtet die LED vom anderen Master Gen-Baustein und auch dieser logische Zustand wird vom Slave übernommen, wenn die LED des Oszillators wieder angeht.

Sollten die Vorgänge zu schnell für uns ablaufen, können wir die Oszillatorfrequenz kleiner stellen oder sogar mit dem Dreistellungsschalter zwischen »max« und »0« manuell takten. Die Frequenz sollte andererseits aber nicht zu hoch eingestellt werden, damit die Teilerstufe noch folgen kann.

Mit den Ausgangssignalen Q0 und -Q0 als Takt können wir eine weitere Teilerstufe aus vier Gen-Bausteinen ansteuern und dann bereits von 0 bis 3 zählen, die ursprüngliche Taktfrequenz also durch vier teilen.





Versuch 52B

Erweiterung der Teilerstufe

Der aufgebaute Zähler lässt sich auf diese Weise leicht erweitern. Grenzen sind uns eigentlich nur durch den vorhandenen Platz auf der Aufbauplatte und durch die Anzahl der vorhandenen Bausteine gesetzt. Wir wollen nun noch zeigen, wie wir Takt-signale von Hand mit einem Taster erzeugen können.

Es gibt allerdings dabei zunächst noch ein zu lösendes Problem: Wir haben bisher einen Takt T benutzt, der zwischen den Potenzialen $0V$ und $8V$ wechselte und einen Takt $-T$, der gleichzeitig zwischen $0V$ und $-8V$ wechselte. Damit wir uns letzteren erzeugen können, benötigten wir eine Spannungsquelle mit $-8V$, die wir nicht haben.

Wir können uns leicht mit dem Taster den Takt T er-

zeugen und ihn mit Hilfe einer MOSFET - Transistor-schaltung invertieren: Bei offenem Taster liegt der Gateanschluss G des p-Kanal MOSFETs über den Widerstand an Massepotenzial. Dadurch ist der Transistor gut leitend und es fließt ein Strom von der Versorgungsspannung über die Diode zur Spannungsabsenkung um $0,7V$ in die Eingänge $E2$ und $E4$ der Master Gen-Bausteine. Wir haben allerdings nur \bar{T} und nicht $-T$. Wenn wir uns an die grundlegende Beziehung

$$T + \bar{T} = 1$$

aus Versuch 50 erinnern, so erhalten wir durch Umstellen daraus

$$-T = \bar{T} - 1$$

Das bedeutet, statt des erforderlichen $-T$ - Signals können wir auch das \bar{T} - Signal verwenden, müssen aber überall dort, wo es auf einen Eingang eines Gen-Bausteins führt, ein zusätzliches konstantes -1 ($= -8V$) - Signal auf einen weiteren Eingang geben. Es sieht zunächst so aus, als wenn uns das nicht weiterhilft, denn die Minusspannung ist ohne einen weiteren Batteriebaustein auch nicht verfügbar. Ein konstantes Minus-Signal können wir allerdings eliminieren, indem wir gedanklich ein konstantes $+1$ - Signal addieren und zur Kompensation die Schwelle um $+1$ anheben. In der Summe sind die beiden konstanten Signale nun konstant 0 und brau-

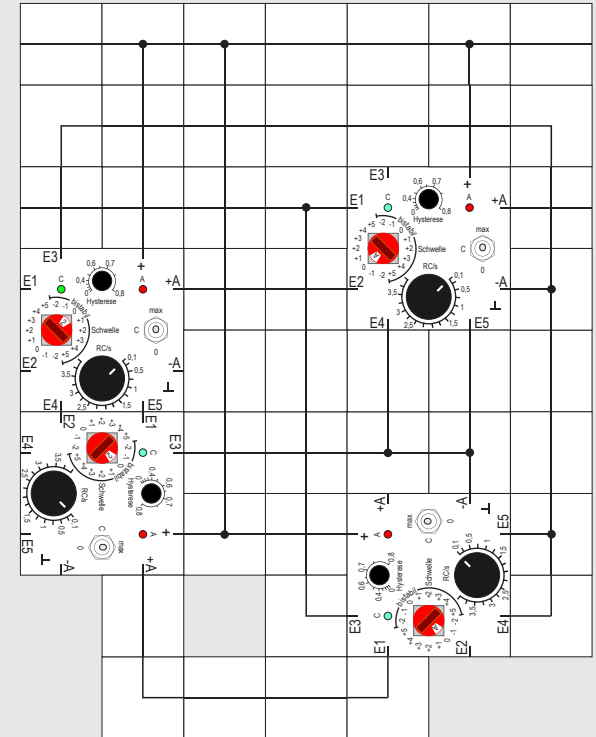
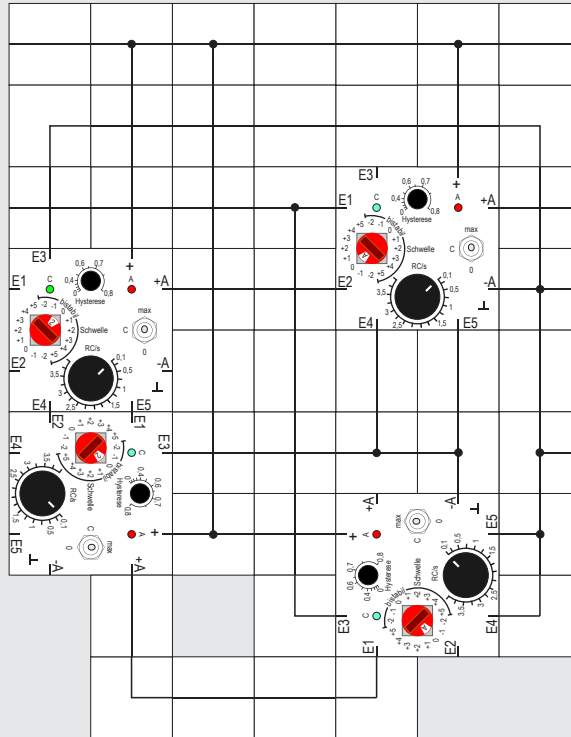
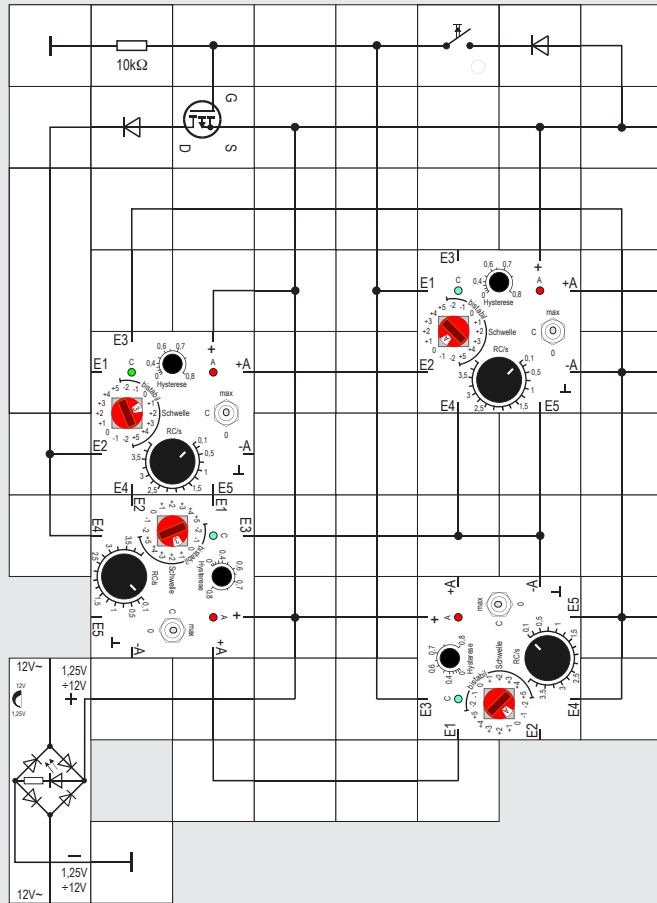
chen nicht weiter beachtet zu werden. Lediglich die Schwelle muss von bistabil 0 auf bistabil $+1$ erhöht werden, und zwar nur bei der ersten Teilerstufe, die das \bar{T} - Signal erhält. Bei den weiteren Stufen ist das nicht nötig, weil die Gen-Bausteine intern das $-A$ ($-Q$) - Signal erzeugen können.

Der Taster muss so lange betätigt werden, bis die Stufen geschaltet haben, darf also nicht zu schnell wieder losgelassen werden.

Beim Aufbau der Stufen ist ausgenutzt worden, dass unbenutzte Eingänge von verschiedenen Gen-Bausteinen miteinander Kontakt haben dürfen; die interne Schaltung ist gegen diese scheinbaren Verkopplungen immun.

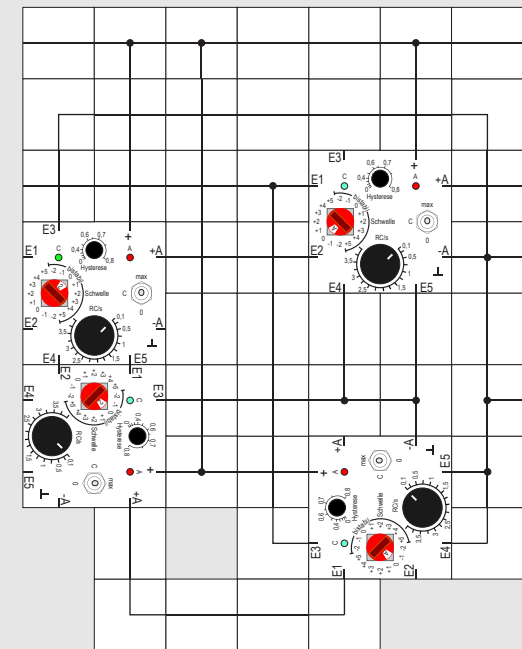
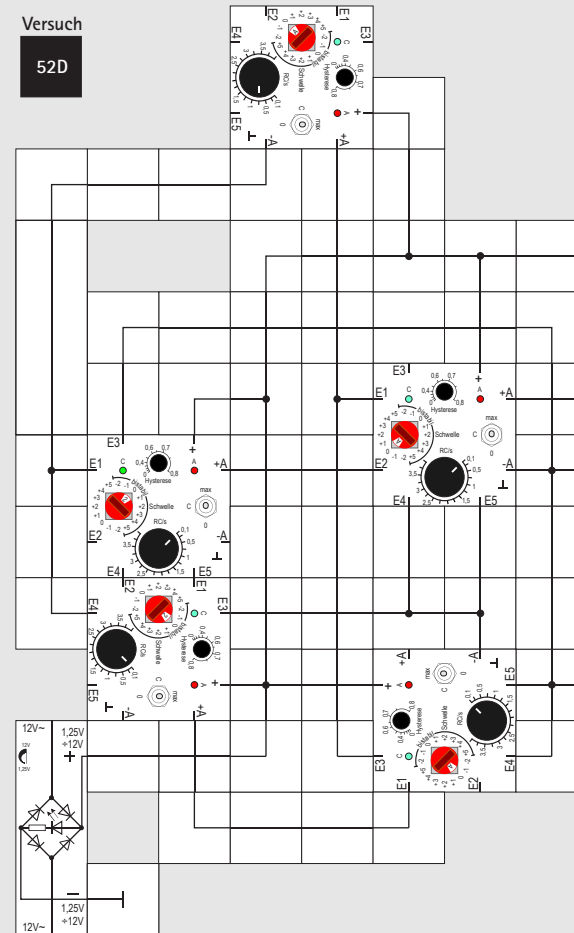
Es kann sein, dass die Schaltung mit drei Stufen etwas über die Aufbauplatte hinausragt. Da die rechte Spalte Verbindungsbausteine keinen Masseanschluss aufweist, dürfte es elektrisch noch funktionieren, wenn diese Bausteine nicht mehr vollständig auf der Platte sind. Wichtig ist, dass in der Spalte ganz links der Masseanschluss des Widerstandes Kontakt zur Aufbauplatte hat.

Durch Betätigen des Tasters können wir verfolgen, wie die Schaltung von 0 bis 7 zählt. Die (binäre) Anzeige des Zählerstandes ist jeweils an der LED der rechten unteren (Slave-) Stufe ablesbar.





Versuch
52D



Versuche 52C & 52D

Teilerstufe (Alternative Aufbauten)

Das obere Aufbaubild zeigt eine Anordnung mit manueller Takterzeugung, die auf die Aufbauplatte ohne Überhang passt.

Durch Einsatz des 13. Gen-Bausteins können wir den Takt wieder mit einem Oszillator erzeugen. Die nebenstehende Abbildung zeigt einen möglichen Aufbau. Es darf nicht vergessen werden, die Schwellen der beiden linken Gen-Bausteine wieder auf bistabil 0 einzustellen.

Da das Netzteil mit der Speisung von 13 Gen-Bausteinen an der Grenze seiner Leistungsfähigkeit arbeitet, wird sein als Kühlkörper fungierender Bodenmagnet bei längerem Betrieb der Schaltung recht heiß ($>50^{\circ}\text{C}$). Eine interne Leistungsüberwachung schützt den Spannungsregler vor Zerstörung und schaltet gegebenenfalls reversibel ab. Der Bodenmagnet sollte immer guten Kontakt zur kühlenden Bodenplatte haben.

July 29, 1969

K. R. KAPLAN

3,458,734

SHIFT REGISTERS EMPLOYING THRESHOLD GATES

Filed Jan. 31, 1967

Fig. 1.

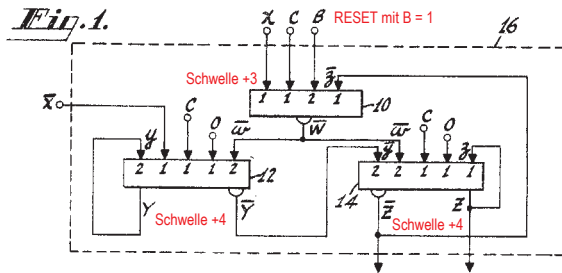


Fig. 2.

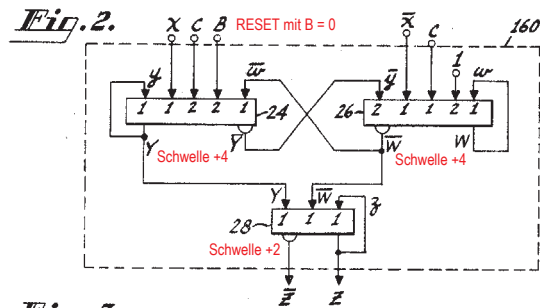
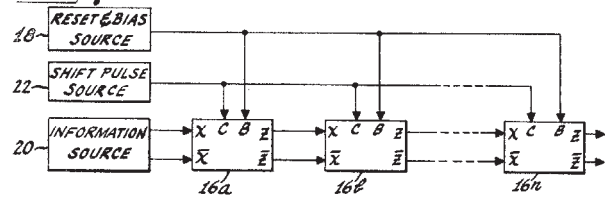
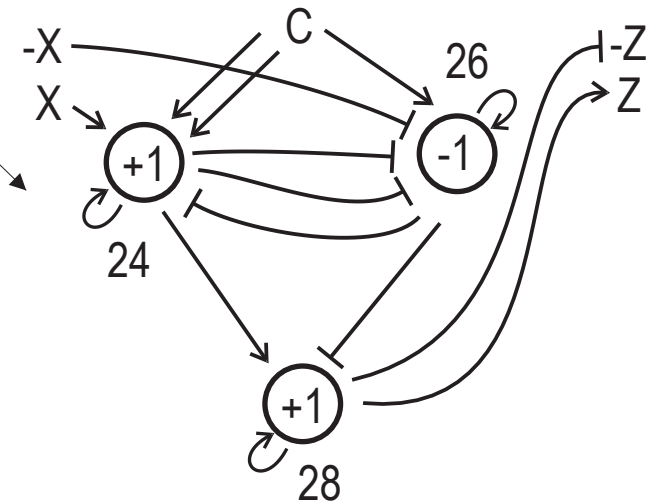
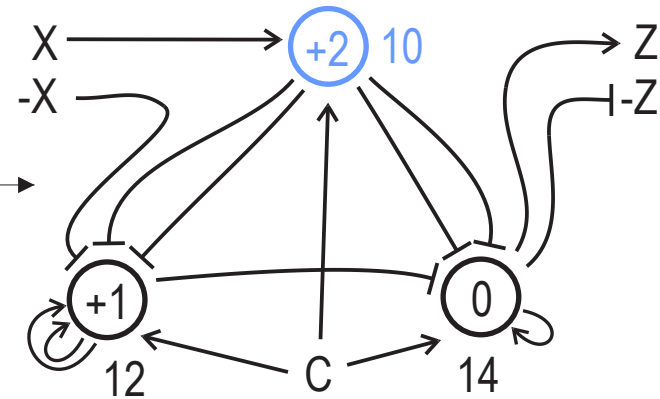


Fig. 3.



Inventor:
KENNETH R. KAPLAN
By Samuel Cohen
Attorney





Versuch 53

Schieberegister

Abschließen wollen wir die digitalen Experimente mit einer Schaltung, die neben den bisher behandelten Zählstufen eine ebenso wichtige Rolle in der Schaltungstechnik spielt, nämlich dem Schieberegister. Wir haben anfangs bereits Schaltungen mit Gen-Bausteinen kennengelernt, bei denen eine »1« im Ring geschoben wurde. Ein Schieberegister – selbst in einfacher Bauart – macht nun etwas mehr. Wir können ein binäres Muster und nicht nur eine einzige »1« von Zelle zu Zelle taktgesteuert weiterschieben. Verbinden wir wie bisher den Ausgang des Registers mit seinem Eingang, so haben wir wieder das bekannte Ringschieberegister.

Mit unseren bisherigen Kenntnissen erwarten wir, dass zum Aufbau einer Speicherzelle mindestens zwei »über Kreuz gekoppelte« Schwellwertbausteine nötig sind.

Bauen wir das Register mit Schwellwertbausteinen auf, welche Signale – also auch das Taktsignal – ja stets summieren, so müssen wir ein generelles Problem lösen: Wird der Schiebetakt aktiv, darf der Inhalt einer Zelle immer nur eine Zelle weitergeschoben werden. Da alle Zellen aber gleichzeitig

mit dem zentral erzeugten Schiebetakt zur Aufnahme des Inhalts ihrer Vorgängerin veranlasst werden, passiert es sehr leicht, dass nicht nur der alte Inhalt der Vorgängerzelle, sondern sofort anschließend gleich der neue übernommen wird. Da die Vorgängerzelle sich genauso verhält, kreist das gespeicherte Binärmuster im Extremfall im Ring herum, solange der zentrale Schiebetakt sein aktives Potenzial hat. Das hat natürlich mit einem geordneten Schieben nichts mehr zu tun.

Abhilfe schafft hier ein Zwischenspeicher, der ebenfalls wieder aus zwei Schwellwertbausteinen besteht und der mit einem weiteren (Übernahme-) Takt »auf Lücke« zum ersten betrieben wird. Eine Speicherzelle wird also aus vier Schwellwertbausteinen bestehen und mit zwei Takten betrieben, was nicht gerade aufwandsarm ist.

Nun gibt es zum Glück findige Köpfe, die zeigen, dass es auch einfacher mit drei Bausteinen und einem einzigen Takt funktioniert. Das US-Patent Nr.3458734 aus dem Jahr 1969 gibt gleich zwei Lösungen an, die wir mit unserem Schwellwertbaustein realisieren können. (s. Abb.) [23]. Beide sind mit Schwellwertbausteinen der Firma RCA aufgebaut, die drei Eingänge mit dem Gewicht 1 und zwei Eingänge mit dem Gewicht 2 besitzen [5].

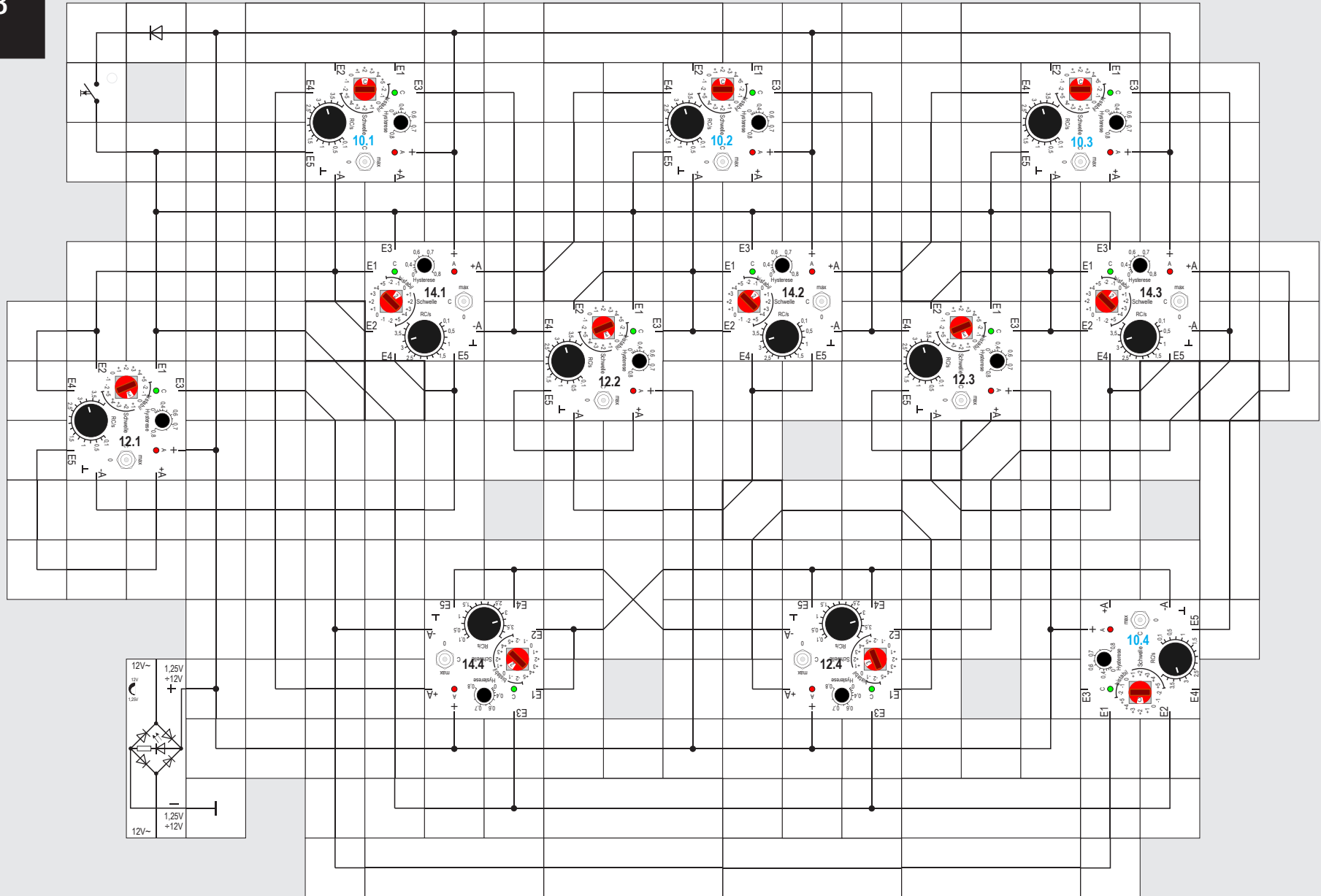
Fig.1 zeigt die erste Realisierung; der obere Bau-

stein hat die Schwelle +3, die beiden unteren haben die Schwelle +4. X und sein Komplement \bar{X} sind die Eingänge der Schieberegisterzelle, Z und \bar{Z} ihre Ausgänge. Der zentrale Takt ist C und das gemeinsame Rücksetzsignal ist B.

Im Schiebetrieb ist $B = 0$; mit $B = 1$ sollen laut dazu gehöriger Beschreibung alle Zellen gelöscht werden. Es stellt sich allerdings heraus, dass alle Zellen mit $B = 1$ gesetzt werden. Wir verzichten deswegen auf diese wenig sinnvolle Funktion, müssen allerdings – wie schon gewohnt – etwas umrechnen, da unsere Bausteine nicht die Komplemente \bar{X}, \bar{Y} und \bar{Z} , sondern $-X, -Y$ sowie $-Z$ liefern.

Wir greifen auf die Gleichung $X + \bar{X} = 1$ zurück und erhalten $\bar{X} = 1 - X$, entsprechendes für \bar{Y} und \bar{Z} . Überall, wo das Komplement einer Variablen benötigt wird, nehmen wir die vorhandene negative Variable und ein konstantes »1« -Signal. Letzteres fällt sofort weg, wenn gleichzeitig die Schwelle des Bausteins um 1 erniedrigt wird. Konstante 0-Signale werden ohne weiteres weggelassen, so auch das B-Signal, das im Schiebetrieb 0 ist.

Rückführungen des Ausgangs auf den Eingang desselben Bausteins können wir zumindest mit dem Gewicht +1 mit der bistabilen Funktion realisieren und sparen so einen Eingang. Beim linken unteren Baustein muss Y wegen des Gewichts +2 also nur





Lectron

| CLOCK | 10.1 | 12.1 | 14.1 | 10.2 | 12.2 | 14.2 | 10.3 | 12.3 | 14.3 | 10.4 | 12.4 | 14.4 | Bemerkung |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| | | | | | | | | | | | | | Vier 1en im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Keine 1 im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Eine 1 im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Zwei »benachbarte« 1en im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Drei 1en im Schieberegister |

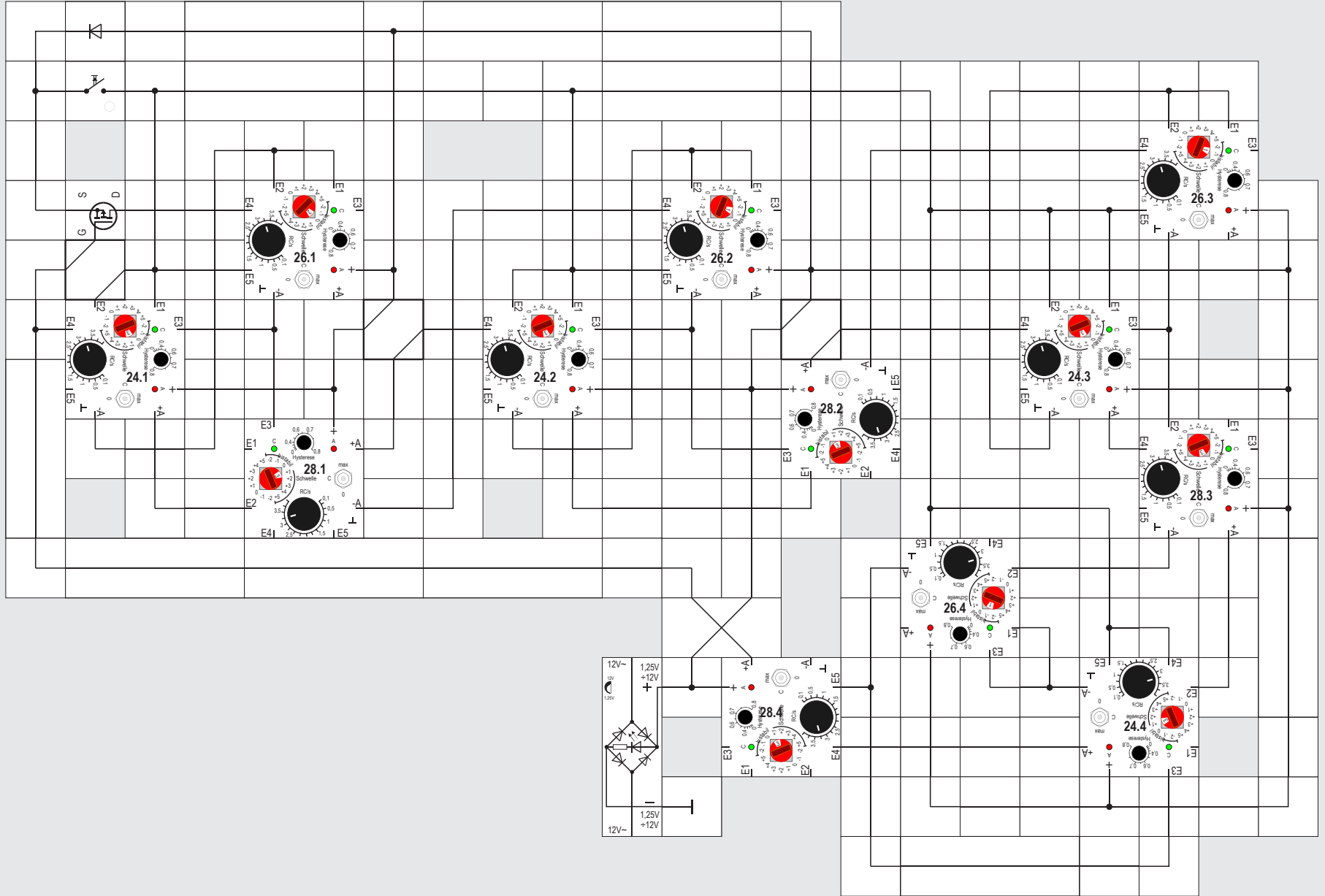
| CLOCK | 24.1 | 26.1 | 28.1 | 24.2 | 26.2 | 28.2 | 24.3 | 26.3 | 28.3 | 24.4 | 26.4 | 28.4 | Bemerkung |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| | | | | | | | | | | | | | Keine 1 im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Eine 1 im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Zwei »benachbarte« 1en im Schieberegister |
| | | | | | | | | | | | | | Zwei »benachbarte« 1en im Schieberegister |

Erklärungen zum obigen Ablaufdiagramm der alternativen Version des Schieberegisters auf Seite 89

noch einmal extern auf einen Eingang gegeben werden. Wenn wir umgerechnet haben, erhalten wir für eine Schieberegisterzelle die rechts oben abgebildete Schaltung mit den veränderten Signalen und Schwellen. Den zentralen Schiebepuls C erzeugen wir uns manuell mit einem Taster. Die Diode dient in gewöhn-

ter Weise zur Spannungsabsenkung. Das Aufbaubild zeigt ein Ringschieberegister mit vier Zellen, wobei Nummer 14.n die Zelle ist, die den eigentlichen Inhalt der Stufe (rot) enthält, 10.n und 12.n sind Zwischenspeicherzellen, die sicherstellen, dass ein Zelleninhalt (rosa) bei aktivem Taktsignal C = 1 nur eine Zelle weitergeschoben wird. Nach Anlegen der Versor-

gungsspannung sind vier 1en im Register. Manuell ändern lässt sich der Registerinhalt am besten über den Dreistellungsschaltung des Y - Registers 12.n. Dieses Register ist bei C = 0 immer komplementär zum Z - Register 14.n. Das linke Diagramm zeigt, wie die möglichen Schieberegisterinhalte taktgesteuert weitergeschoben werden.



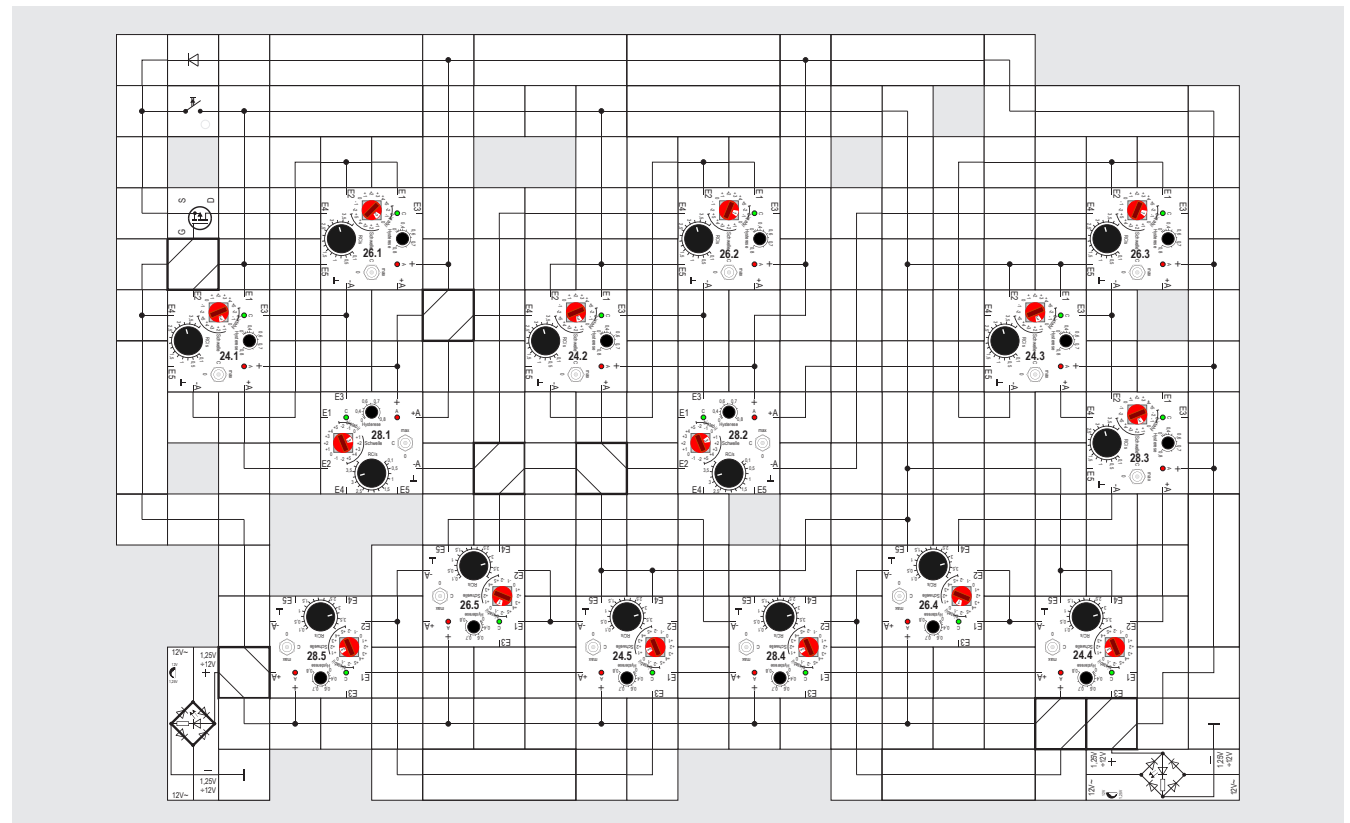


Versuch 54

Schieberegister, alternative Version

Fig. 2 (S.176) zeigt eine einfachere alternative Version einer Zelle. Hier muss das B - Signal beim Schieben gleich 1 sein, mit B = 0 wird das Register komplett zurückgesetzt. Wir müssen auf diese Funktion verzichten, da unsere Schwellwertbausteine nicht genügend Eingänge besitzen. B wird also durch zwei konstante »1« - Signale ersetzt, die wegfallen, wenn gleichzeitig die Schwelle des linken oberen Bausteins 24.n um 2 erniedrigt wird.

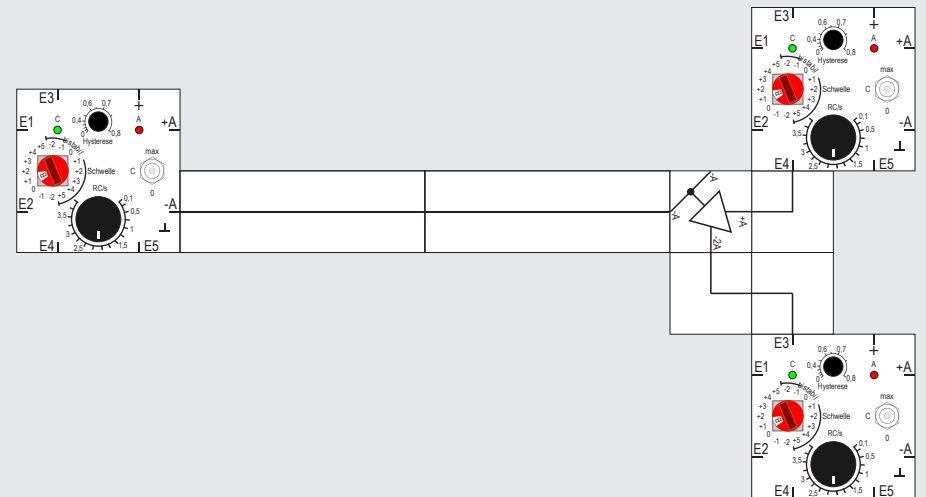
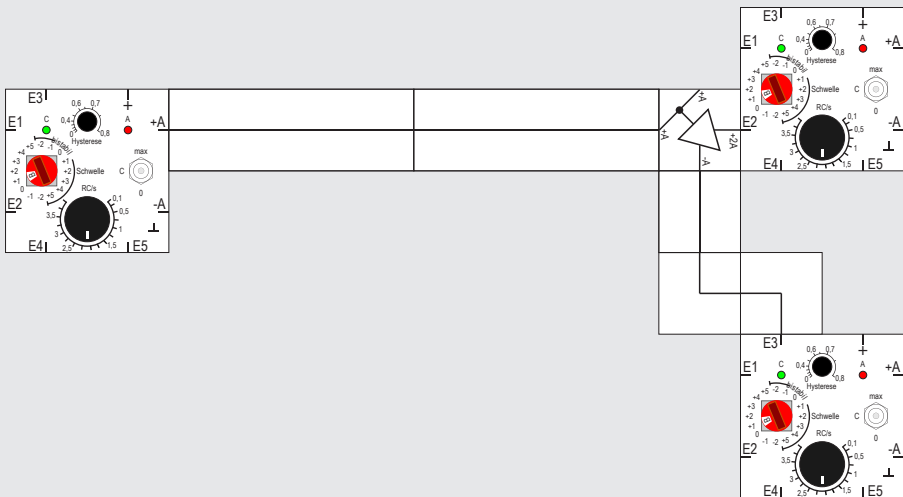
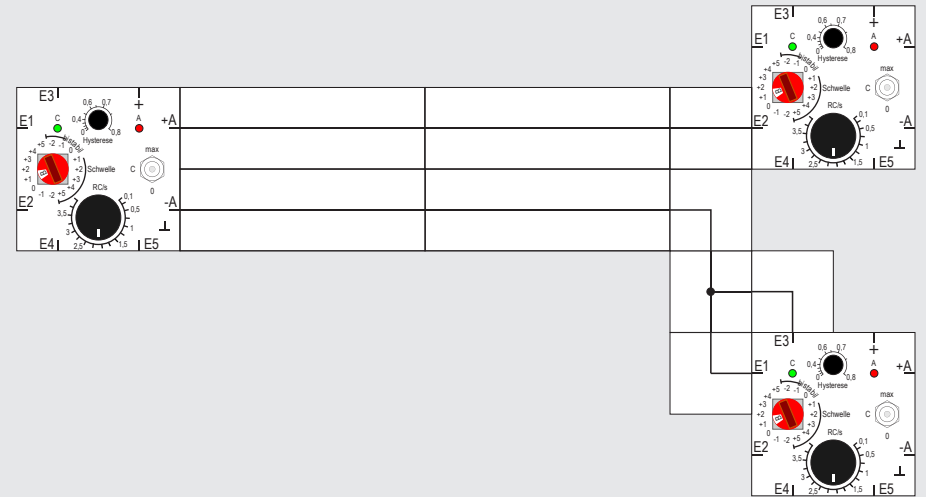
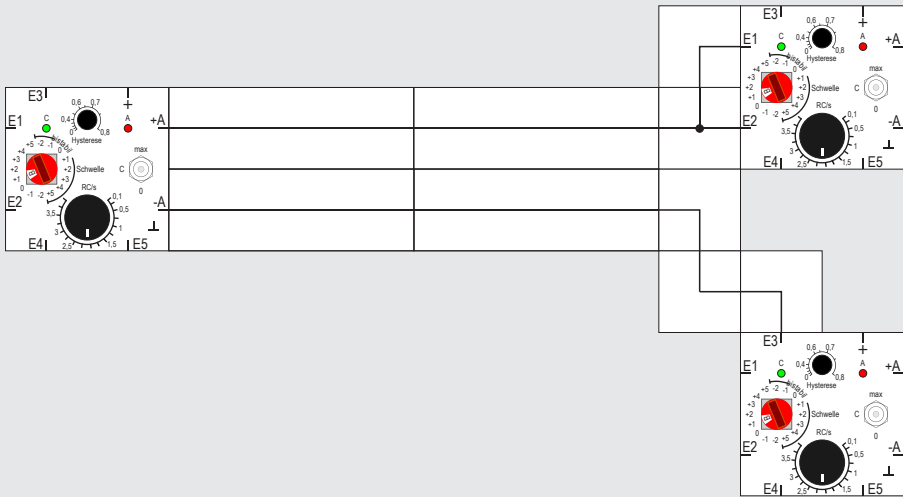
Die beiden oberen Bausteine haben in der Ursprungsdarstellung eine Schwelle von +4, der untere hat eine von +2. Eine entsprechende Umrechnung wie bei der ersten Schaltung führt zu der Zellenstruktur auf S.176, rechts unten; sie lässt sich gut mit unseren Schwellwertbausteinen aufbauen. Allerdings müssen wir beim Aufbau wieder mit einem Trick arbeiten: Uns fehlt eine Gasse, um das erforderliche \bar{Z}_4 -Signal vom Baustein 28.4 auf den Eingang des Bausteins 26.1 zu bringen. Wir erzeugen uns mit einem Inverter aus Z_4 das Komplement \bar{Z}_4 und heben zum Ausgleich die Schwelle von 26.1 um 1 an. In gewohnter Weise zeigt das rechte Diagramm auf S.179, wie verschiedene Inhalte taktgesteuert durch das Ringschieberegister wandern.



Die Bausteine 26.n und 28.n haben bei nicht betätigtem Taster (C = 0) komplementäre Inhalte zueinander. Bei C = 1 sind alle 24.n Zellen gesetzt (Y= 1).

Die Aufbauplatte bietet noch genügend Platz zum

Aufbau einer fünften Stufe. Wer durch Zukauf von Bausteinen ein solches Schieberegister aufbauen möchte, findet hier eine mögliche Bausteinanordnung. Es empfiehlt sich allerdings, ein weiteres Netzgerät einzusetzen.





Nützliche Ergänzungsbausteine

Bei einigen Versuchsaufbauten sowohl im biologischen als auch im digitalen Teil des vorliegenden Experimentierkastens sind wir an Grenzen gestoßen, die wir nur mit Tricks überwinden konnten: Sei es, dass die Anzahl der Eingänge vom Gen-Baustein nicht ausreichte, oder sei es, dass die erforderlichen vielen Verbindungsbausteine auf der DIN A2 Aufbauplatte keinen Platz mehr fanden. Im ersten Fall konnten wir durch zusätzliche Überlegungen Gewich-tungen verändern oder Signale mit Hilfe von Dioden verknüpfen und so zu einer Lösung gelangen. Bei Platzproblemen hat es dage-gen geholfen, dass wir manchmal das benötigte zusätzliche inver-tierte Signal mit Hilfe eines MOSFETs erst an »Ort und Stelle« er-zeugten und so Verbindungsbausteine und damit Platz sparten.

Mit zwei eigens nachträglich für den Gen-Baukasten entwickel-ten kleinen Bausteinen können beide Probleme meistens elegan-ter gelöst werden. Und zwar kommt in ihnen die auf Seite 160 vor-gestellte Ladungspumpe zur Anwendung.

Wir haben gesehen, dass es eine Ladungspumpe vermag, aus einer positiven Eingangsspannung eine nahezu gleichgroße negative Ausgangsspannung zu erzeugen und dies umso besser, je kleiner der abzugebende Strom ist. Dies ist aber genau bei unseren Ver-suchsaufbauten der Fall. Wenn ein Gen-Baustein ein +A und ein -A Signal an verschiedene andere Gen-Bausteine abgeben soll, so haben wir bisher von seinen entsprechenden niederohmigen Aus-gängen die beiden Signale auf getrennten Wegen zu den empfan-genden Bausteinen geführt, die durch ihre 100kΩ Eingangswider-stände nur relativ kleine Eingangsströme benötigen. Liegen die empfangenden Bausteine beim Versuchsaufbau auch noch be-nachbart, muss praktisch das Signal invertiert und nicht invertiert parallel über die Aufbauplatte mit entsprechenden Verbindungs-bausteinen geführt werden. Mit Hilfe des neuen »Converters« (Be-

stell-Nr. 2490) funktioniert das nun platzsparender. Wir führen nur das +A Signal über die Aufbauplatte zu seinem Empfänger-baustein und lassen es dort an passender Stelle für den anderen Empfänger invertieren. Je länger die Verbindungsleitung zwischen dem Sender und den Empfängern ist, desto mehr Verbindungs-bausteine - und damit Platz - sparen wir.

Es kommt aber noch besser. Bei der Ladungspumpe wird - wie be-schrieben - ein rechteckförmiges Signal zum Schalten der elektro-nischen Schalter (MOSFETs) benötigt, das ein frei schwingender Oszillator erzeugt. Dieses Signal kann nun zusätzlich dafür ausge-nutzt werden, in einer sogenannten Villard-Schaltung auch die doppelte Spannung zu generieren, also aus +A auch +2A zu ma-chen. Genau genommen gibt sie die doppelte Spannung minus zwei Diodenflussspannungen ab; die Differenz beträgt bei den ein-gesetzten Schottky-Dioden und den relativ kleinen Strömen circa 0,4V, was nicht weiter stören sollte; typisch also statt $2 \times 8V = 16V$ nur 15,6V. Wenn ein Signal mit dem Gewicht 2 benötigt wird, bele-gen wir jetzt nicht mehr zwei Eingänge am empfangenden Gen-Baustein, sondern können das verdoppelte Signal auf einen Ein-gang geben und bekommen den anderen frei (siehe linkes Bei-spiel-Paar in der Abbildung). Der Eingang heißt beim Converter-baustein vielleicht ungewohnterweise +A; das soll aber daran erin-nern, dass er nur mit einem +A Ausgang eines Gen-Bausteins (oder der Versorgungsspannung) verbunden werden darf. Zudem ist er auf zwei Kontaktplättchen herausgeführt, was die Flexibili-tät des Bausteins erhöht.

Schön wäre es natürlich auch, wir hätten so eine Konvertierung und Verdopplung ebenfalls für hemmende Signale, also für -A. Das würde unsere Flexibilität beim Schaltungsaufbau weiter ver-größern. Und auch dieser Wunsch kann erfüllt werden mit dem Minusconverter (Bestell-Nr. 2491). Für seine Entwicklung ist fol-gende Überlegung hilfreich. Der Converter 2490 arbeitet mit

einem niederohmigen Signal +A eines Gen-Bausteins als positi-ves Versorgungspotenzial gegen Masse und erzeugt daraus die Po-tenziale -A und +2A (auf Masse bezogen). Gibt man nun der in-ternen Schaltung Massepotenzial als positives Versorgungspo-tenzial und -A als bisheriges Massepotenzial, so »merkt« die Schaltung nichts davon, sie arbeitet weiterhin mit der bisherigen Potenzialdifferenz als Versorgungsspannung, für uns extern aber in einem Potenzialbereich, der circa 8V tiefer liegt. Die beiden Aus-gangssignale weisen natürlich auch diese Absenkung auf.

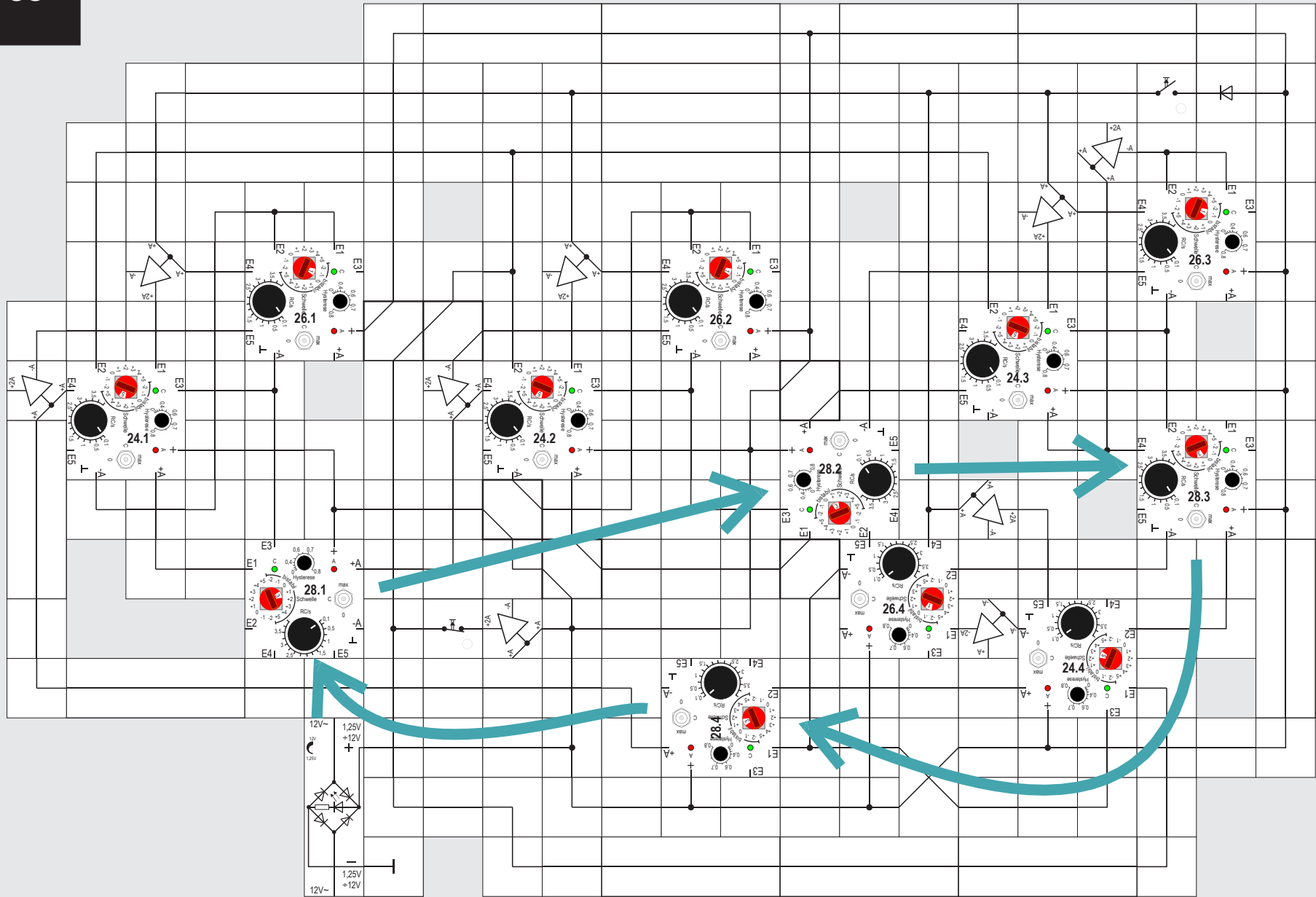
Statt +2A - $2U_f$ erhalten wir +A - $2U_f$ und statt -A können wir an dem entsprechenden Kontakt -2A abgreifen, also genau das, was wir haben wollten.

Der Minusconverter ist entsprechend verdrahtet und sollte nicht mit dem Converter verwechselt werden. Der Eingang -A ist eben-falls auf zwei Kontakte herausgeführt und darf nur mit einem -A Signal eines Gen-Bausteins verbunden werden. Das rechte Bei-spiel-Paar in der Abbildung zeigt, was an Verbindungsbausteinen eingespart wird.

Beim Aufbau einer Schaltung müssen wir sorgsam darauf achten, diese beiden Bausteine nicht miteinander zu verwechseln und immer richtig anzuschließen, da sie sich äußerlich sehr ähneln.

Wir haben darauf verzichtet, alle großen Gen-Netze mit diesen neuen Bausteinen noch einmal aufzubauen, um die Baustein- und Platzersparnisse zu zeigen. Beispielhaft zeigt die folgende Seite den Aufbau des Schieberegisters aus Versuch Nr. 54, bei dem aus Mangel an Signaleingängen auf die kollektive Rücksetz-funktion verzichtet werden musste.

Wir sind sicher, dass spätestens dann, wenn ein neues Netz auf-gebaut wird und die Grenzen erreicht werden, die Converter zum Einsatz kommen.





Versuch 55

Schieberegister mit Rücksetzfunktion

In Versuch Nr. 54 mussten wir beim Aufbau des Schieberegisters bereits zu einem Trick greifen, um die Ausgangssignale der vierten Zelle wieder auf die erste zu führen und so ein Ringschieberegister zu erhalten; es fehlte schlicht eine senkrechte Gasse auf der Aufbauplatte. Außerdem verzichteten wir von vornherein auf die kollektive Rücksetzfunktion für das Schieberegister, weil die Gen-Bausteine nicht genügend Eingänge besitzen. Mit Hilfe der Converter-Bausteine wollen wir nun versuchen, die invertierende MOSFET-Stufe zu ersetzen und die Rücksetzfunktion zu installieren.

Fangen wir mit der MOSFET-Stufe an, die das +A -Signal vom Baustein 28.4 für den Baustein 26.1 in \bar{A} -Eingangssignal wandelt. Eigentlich benötigt der Baustein ein -A-Signal, durch eine Schwellenanpassung ließ sich das jedoch kompensieren. Verwenden wir statt des MOSFETs einen Converter, so wird weiterhin das +A-Signal vom Baustein 28.4 auf E5 des Bausteins 24.1 gegeben, gleichzeitig haben wir nun auch das vom Converter erzeugte -A-Signal für Baustein 26.1, Eingang E4. Beim Baustein 26.1 muss nun die Schwelle, wie bei allen 26.n Bausteinen, auf -1b gestellt werden. Das war relativ einfach.

Das kollektive Rücksetzsignal (in der Patentanmeldung mit B bezeichnet) wird mit Gewicht 2 an allen 24.n Bausteinen benötigt. Bei allen diesen Bausteinen sind allerdings alle Eingänge belegt. Wir müssen also zunächst jeweils einen Eingang an diesen Bausteinen frei bekommen. Das gelingt, indem wir das vom Taster kommende Schiebetaktsignal (in der Anmeldung mit C bezeichnet) von einem Converter verdoppeln lassen und dann auf nur jeweils einen Eingang der 24.n Bausteine führen. Da das Signal C zusätzlich mit Gewicht 1 für jeden 26.n Baustein benötigt wird, lassen wir das in der Nähe jedes 24.n Bausteins machen und benötigen deswegen vier Converter. Prinzipiell wäre es auch möglich, das gewünschte verdoppelte Signal mit nur einem Converter zentral zu erzeugen und dann zu den vier 24.n Bausteinen zu führen; das hätte aber weitere Gassen erfordert, für die bereits jetzt schon kein Platz mehr da ist. Wir kommen aber auf die zentrale Erzeugung noch einmal zurück. An jedem 24.n Baustein haben wir nun einen Eingang frei bekommen, an den das Rücksetzsignal mit Gewicht 2 gelegt werden muss.

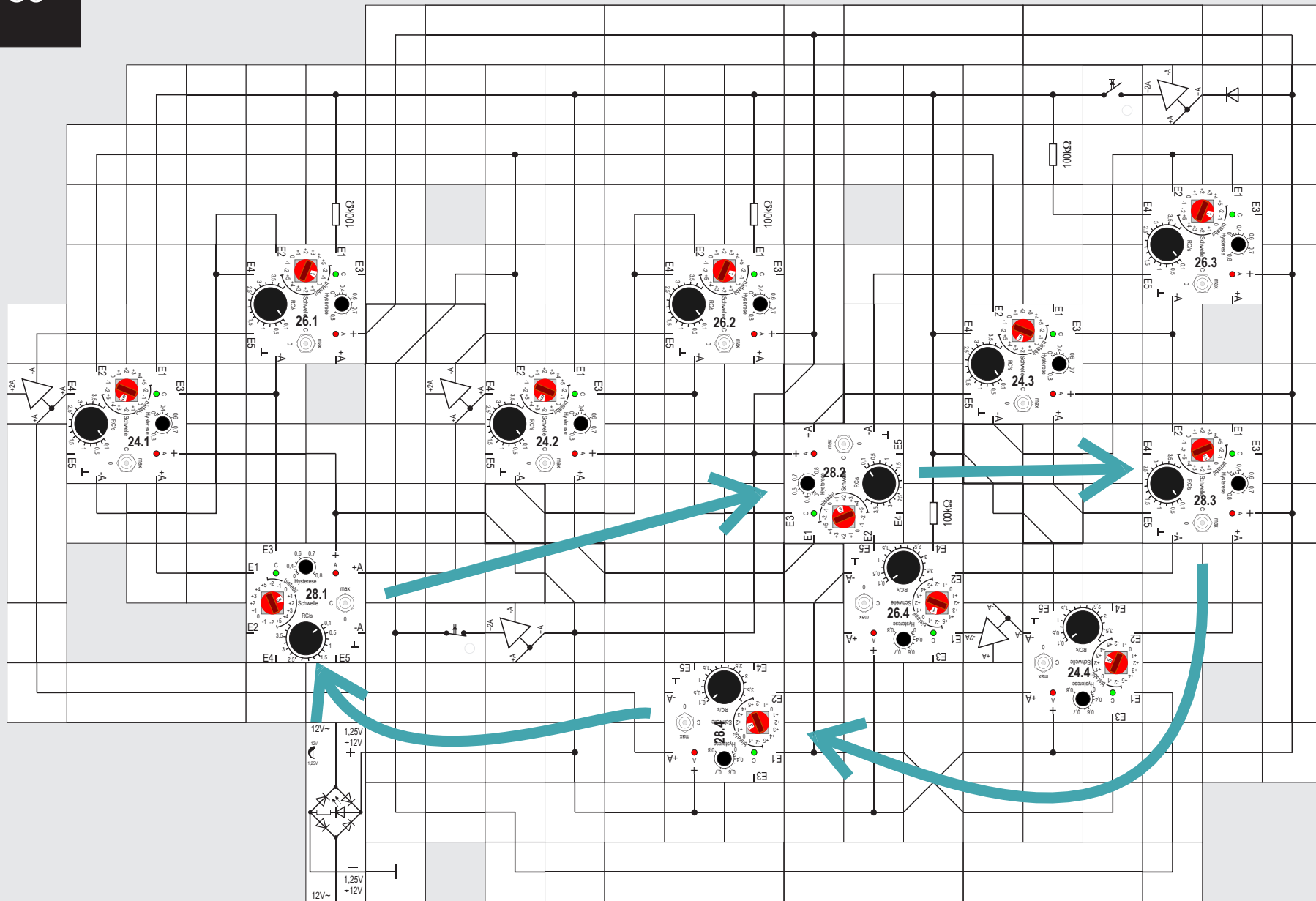
Das Rücksetzsignal B wird laut Anmeldung mit $B=0$ aktiv. Weil wir es bisher nicht anwendeten, konnten wir es gedanklich konstant gleich 1, also inaktiv, setzen und durch eine Schwellenanpassung anschließend einfach weglassen. Ähnliches machen wir nun wieder. Wir erzeugen das inaktive verdoppelte Rücksetzsignal mit einem Converter zentral aus der Versorgungsspannung und führen es auf den jeweils frei gewordenen Eingang jedes 24.n Bausteins. Damit es bei $B=1$ auch inaktiv bleibt, muss bei allen Bausteinen die

Schwelle um 2, also von +1b auf +3b, höher gestellt werden. Das aktive Rücksetzen $B=0$ mit Taster erreichen wir, indem wir einen Taster mit Ruhekontakt verwenden. Betätigen wir ihn, so »fehlen« allen vier 24.n Bausteinen zum Erreichen der Schwelle die verdoppelten Rücksetzsignale und die Zellen werden auf Null gesetzt.

Auch die Zuführung des zentral erzeugten Rücksetzsignals benötigt auf der Aufbauplatte (zunächst nicht vorhandene) Gassen. Zum Glück haben wir noch freien Platz im linken unteren Teil der Platte, so dass es durch eine neue »schlankere« Anordnung der drei Bausteine von Zelle 4 und deren Verschieben in den freien Raum gelingt, die nötigen Gassen zu erhalten. Es müssen dazu noch weitere Converter eingesetzt werden. So benötigen wir einen, der aus dem +A-Signal von 28.1 ein -A-Signal für 26.2 und einen weiteren, der aus dem +A-Signal von 24.3 das doppelt benötigte -A-Signal für 26.3 erzeugt. Auch ein Minusconverter kommt zum Einsatz. Das -A-Signal von 24.4 kann so platzsparend doppelt auf 26.4 geführt werden.

Die zusätzlichen blauen Pfeile dienen zur Verdeutlichung, welche Zellen des Ringschieberegisters die eigentlichen logischen Inhalte speichern (nämlich die 28.n Bausteine). Gleichzeitig geben sie an, wie die Zelleninhalte bei Tastendruck weiter geschoben werden.

Alle Gen-Bausteine sind mit $Hyst = 0$ und $RC = 0,1s$ auf möglichst schnelle Verarbeitung eingestellt. Trotzdem sollte die Taste zur Erzeugung eines Schiebeimpulses mindestens circa eine halbe Sekunde gedrückt gehalten werden, damit die Inhalte sicher übernommen werden.

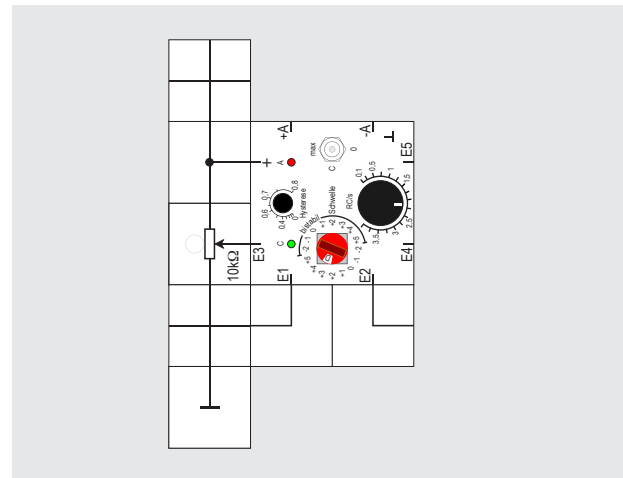


Versuch 56

Schieberegister mit Rücksetzfunktion 2. Version

Für alle, die nicht so viele Converter einsetzen möchten, gibt es schließlich noch eine bereits angekündigte Lösung: Das Taktsignal C wird zentral erzeugt, mit einem Converter verdoppelt und an alle vier 24.n Bausteine gelegt. Da es alle vier 26.n Bausteine mit einfachem Gewicht ebenfalls benötigen, führen wir es ihnen jeweils über einen 100kΩ Widerstand zu. Dieser bewirkt zusammen mit dem bausteininternen 100kΩ Widerstand eine Halbierung des Eingangsstroms und macht auf diese Weise die Verdopplung wieder rückgängig. Im Versuchsaufbau sparen wir so eine Gasse, die wir für die Vernetzung der Versorgungsspannung gut gebrauchen können.

Die Beispiele zeigen, wie es durch den Einsatz der beiden Converter-Bausteine gelingen kann, zusätzliche Funktionen im Versuchsaufbau unterzubringen, die sonst aus Platzmangel oder Mangel an Signaleingängen nicht möglich gewesen wären.



Nicht ganzzahlige Schwellen

Auf eine bisher nur in Versuch 45 genutzte Eigenschaft der Gen-Bausteine soll zum Schluss noch einmal ausdrücklich hingewiesen werden. Die Schwelle lässt sich zunächst nur im Bereich von -2 bis +5 als ganze Zahl einstellen. Hat man jedoch am Baustein einen freien Eingang, so kann man diesen mit dem Mittelabgriff eines 10kΩ Potentiometers verbinden, das zwischen Versorgungsspannung und Masse angeschlossen ist. Mit dem Potentiometer lässt sich jede Zwischenspannung einstellen und so kann indirekt die Schwelle durch diese Vorspannung auch nicht ganzzahlige Werte annehmen.

Ist beispielsweise das Poti in Mittelstellung, gibt es an den angeschlossenen Eingang eine Spannung von circa 4V, was schwellenmäßig +½ entspricht. Zum Erreichen einer eingestellten Schwelle von z. B. +3 brauchen die restlichen Signale in der Summe dann nur noch +2½ zu erreichen, damit der Baustein aktiv wird.

...und weil hier noch ein bisschen Platz ist, gibt es als Dreingabe und zur Übung noch die Herleitung der beiden EXOR-Schaltungen (Seite 28, links und rechts) aus ihren Boole'schen Ausdrücken; zunächst fielen sie ja nur vom Himmel. Zuerst für zwei Variable.

Es ist

$$X = A\bar{B} \vee \bar{A}B$$

mit $\bar{A} = 1 - A$ und $\bar{B} = 1 - B$:

$$X = A(1-B) \vee (1-A)B$$

$$X = (A-AB) \vee (B-AB)$$

$$X = A \vee B \vee (-2)AB$$

$$X = \langle A + B - 2 \langle A + B \rangle_{2,1} \rangle_{1,0}$$

Das war kinderleicht. Und nun das Ganze mit drei Variablen, schon etwas komplizierter:

$$X = A\bar{B}\bar{C} \vee \bar{A}B\bar{C} \vee \bar{A}\bar{B}C \vee ABC$$

mit $\bar{A} = (1 - A)$; $\bar{B} = (1 - B)$ und $\bar{C} = (1 - C)$

$$X = [A(1-B)(1-C)] \vee [(1-A)B(1-C)] \vee [(1-A)(1-B)C] \vee [ABC]$$

$$X = \underset{=1}{[A(1-B)(1-C)]} \vee \underset{=1}{[B(1-A)(1-C)]} \vee \underset{=1}{[C(1-A)(1-B)]} \vee [ABC]$$

$$X = A \vee B \vee C \vee (-2)(AB \vee AC \vee BC) \vee ABC$$

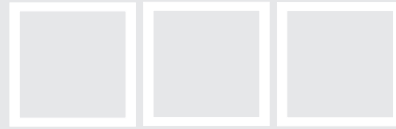
$$X = A(1 \vee BC) \vee B \vee C \vee (-2)(AB \vee AC \vee BC)$$

Majoritätsfunktion s. S.28

$$X = A \vee B \vee C \vee (-2)(AB \vee AC \vee BC)$$

$$X = \langle A + B + C - 2 \langle A + B + C \rangle_{2,1} \rangle_{1,0}$$

Mit $C = 0$ erhalten wir das gleiche Ergebnis wie für ein EXOR mit zwei Variablen.



- [1] E. Schrödinger: Was ist Leben? (1989) Piper Verlag, München. ISBN 978-3-492-21134-5. Titel der englischen Originalausgabe: What is Life? (1944) Cambridge University Press, Cambridge.
- [2] L. Jaenicke, B. Alberts, et al., Molekularbiologie der Zelle, (2013) Wiley-VCH, Berlin.
- [3] S. Bornholdt, Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations, *J. Roy. Soc. Interface* 5 (2008) S85-S94.
- [4] S. Braunewell and S. Bornholdt, Superstability of the yeast cell-cycle dynamics: Ensuring causality in the presence of biochemical stochasticity, *J. Theor. Biol.* 245 (2007) 638-643.
- [5] S.L. Hurst, Schwellwertlogik (1974) Hüthig Verlag, Heidelberg. ISBN 3-7785-0293-X.
- [6] M.L. Dertouzos, Threshold Logic: A Synthesis Approach (1965) The M.I.T. Press, Cambridge, MA, USA.
- [7] R.O. Winder, Threshold Functions through $n = 7$, No. SR-7. RCA LABS PRINCETON NJ, 1964.
- [8] T.S. Gardner, C.R. Cantor, J.J. Collins: Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. *Nature* 403 (2000) 339-342.
- [9] M. Elowitz and S. Leibler, A Synthetic Oscillatory Network of Transcriptional Regulators, *Nature*, 403 (2000) 335. Siehe auch: <http://en.wikipedia.org/wiki/Repressilator>
- [10] S.S. Shen-Orr, R. Milo, S. Mangan, U. Alon. Network Motifs in the Transcriptional Regulation Network of *Escherichia coli*. *Nature Genetics* 31 (2002) 64-68.
- [11] T. Danino, O. Mondragón-Palomino, L. Tsimring, J. Hasty. A Synchronized Quorum of Genetic Clocks. *Nature* 463 (2010) 326. Siehe auch: http://2013.igem.org/Team:KU_Leuven/Project/Oscillator/Design
- [12] F. Li, T. Long, Y. Lu, Q. Ouyang, C. Tang. The Yeast Cell-Cycle Network Is Robustly Designed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 4781.
- [13] M.I. Davidich and S. Bornholdt, Boolean Network Model Predicts Cell Cycle Sequence of Fission Yeast *PLoS ONE* 3 (2008) e1672.
- [14] M.I. Davidich and S. Bornholdt, Boolean Network Model Predicts Knockout Mutant Phenotypes of Fission Yeast *PLoS ONE* 8 (2013) e71786.
- [15] L. Mendoza, D. Thieffry, E.R. Alvarez-Buyalla, Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis, *Bioinformatics*, 15 (1999) 593.
- [16] C.P. Choe et al., A pair-rule gene circuit defines segments sequentially in the short-germ insect *Tribolium castaneum*, *PNAS* 103 (2006) 6560. <http://www.pnas.org/content/103/17/6560.full>
- [17] S.B. Carroll, J.K. Grenier, and S.D. Weatherbee, From DNA to Diversity: Molecular Genetics and the Evolution of Animal Design, Blackwell Publishing: Cambridge, MA (2001) p. 59, fig. 3.5
- [18] J. Krumsiek, C. Marr, T. Schroeder, F.J. Theis, Hierarchical Differentiation of Myeloid Progenitors Is Encoded in the Transcription Factor Network, *PLoS ONE* 6 (2011) e22649.
- [19] B.D. MacArthur, C.P. Please, R.O.C. Oreffo, Stochasticity and the Molecular Mechanisms of Induced Pluripotency. *PLoS ONE* 3 (2008) e3086.
- [20] J. Garcia-Ojalvo, M.B. Elowitz, S.H. Strogatz, Modeling a synthetic multicellular clock: Repressilators coupled by quorum sensing, *PNAS* 101 (2004) 10955.
- [21] E.H. Hellen, S.K. Dana, B. Zhurov, and E. Volkov, Electronic Implementation of a Repressilator with Quorum Sensing Feedback, *PLoS ONE* 8 (2013) e62997.
- [22] P. Misiurewicz, Comment on: Counting with Majority-Logic Networks, *IEEE Transactions on Electronic Computers* 14 (1965) 262.
- [23] K.R. Kaplan, Shift Registers Employing Threshold Gates (1969) US-Patent Nr. 3458734.



Genregulation

Versuche mit dem Lectron Experimentierkasten

© 2015 Bornholdt, Kopperschmidt

ISBN 978-3-00-051404-3

Herausgeber

Reha Werkstatt Oberrad

Lectron 2015

Buchrainstr. 18

60599 Frankfurt

Tel.: +49 (0)69 90 50 12 82

Fax: +49 (0)69 90 50 12 83

Email: lectron@frankfurter-verein.de

www.lectron.de