

Model realizacije funkcionalnosti RS-pomnilne celice v biološkem sistemu

Miha Moškon¹, Monika Ciglič², Roman Jerala², Nikolaj Zimic¹, Miha Mraz¹

¹*Laboratorij za računalniške strukture in sisteme, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenija*

²*Laboratorij za biotehnologijo, Kemijski inštitut, Hajdrihova 19, SI-1001 Ljubljana, Slovenija*

E-pošta: miha.moskon@sri.uni-lj.si

Povzetek. Realizacije računalniških struktur, ki so temeljni gradniki računalniških sistemov, so v zadnjih 80 letih temeljile na elektronskih komponentah. S problemi, ki jih prinašata nenehna miniaturizacija osnovnih enot [1] in z večjo porabo energije računalniških sistemov kot celote, se poraja vprašanje prihodnosti tovrstnega pristopa. Ena od alternativnih platform procesiranja podatkov tako postajajo tudi biološki sistemi [2]. Temelj tovrstnega procesiranja je zapis dinamike v obliki DNK-zaporedij in prisotnost specifičnih proteinov kot prožilcev te dinamike. V članku predstavimo osnovne pojme procesiranja v bioloških sistemih na zgledu modela realizacije enostavnih RS-pomnilnih celic. Za omenjeno celico postavimo bistabilni model realizacije in predstavimo simulacijske rezultate obnašanja tako v idealiziranih kot tudi v neidealiziranih razmerah. Z zgraditvijo modela so izpolnjeni pogoji za samo realizacijo celice v biološkem gostitelju eno- ali več-celične narave.

Ključne besede: genetsko regulatorno omrežje, sintetna biologija, RS-pomnilna celica, pomnjenje v bioloških sistemih, nekonvencionalno računalništvo

A model of the RS memory-cell realization in biological systems

Extended abstract. In the past eighty years computer structures that represent the basic logic primitives in the construction of computer systems have been based on electronic components. Recently, there has been a strong need noted to have them minimised and to make their response-time faster [1]. To achieve the goal, alternative information-processing platforms are being looked for. Biological systems are certainly one of the possible alternative processing platforms of the future [2]. Dynamics of these circuits is based on the presence (respectively absence) of specific proteins, i.e. transcriptional factors. By manipulating these circuits with genetic engineering (i.e. DNA modifications), their desired behaviour can be achieved. Here we present the basic concepts of these systems on the example of the RS memory-cell for which we developed a mathematical model based on Ordinary Differential Equations (ODEs). We also made a simulation model in the Matlab/Simulink environment (Figures 7 and 8). We simulate the behaviour of our circuit in ideal circumstances (Figure 9) and in those which are an approximation of a real environment (Figure 10). The promising simulation results indicating that realization in a living tissue is possible will be addressed in our future work.

Key words: genetic regulatory network, synthetic biology, RS memory-cell, memorizing in biological systems, unconventional computing

1 Uvod

Z veljavnostjo Moorovega zakona, ki napoveduje podvajanje kompleksnosti in s tem podvajanje hitrosti delovanja

mikroprocesorjev na približno vsaki dve leti [1], se velikost osnovnih sestavnih delov digitalnih struktur (tranzistorjev) iz leta v leto zmanjšuje. S takšno miniaturizacijo bodo v približno desetih letih tako velikosti tranzistorjev dosegle nanometrsko velikostno raven, v katero spadajo atomi in molekule. Ker je elektronsko pogojeno obvladovanje dinamike entitet na tej ravni težko obvladljivo zaradi vplivov šuma, kvantnih efektov itd., menimo, da bo računalniška tehnologija soočena z iskanjem alternativnih platform procesiranja.

Ena od obetajočih je procesiranje v bioloških sistemih, kjer je temeljni nosilec programiranja dinamike zaporedje DNK. Glavni del DNK-zaporedja je zapis pogojev za proženje generiranja proteinov in navodila za njihovo izdelavo (tj. seznam aminokislin, ki sestavljajo posamezen protein). Na tak način si lahko DNK zaporedje interpretiramo kot računalniški program, posamezne proteine pa po eni strani kot vhodne podatke, ki prožijo samo procesiranje, po drugi strani pa kot izhodne rezultate procesiranja [2].

Z realizacijo pomnjenja lahko v biološke sisteme vpeljemo sekvenčno procesiranje. V pričajočem članku opisemo pristop k realizaciji modela funkcionalnosti RS-pomnilne celice v biološkem sistemu. Predstavimo vse potrebne korake za zasnova takšne strukture, saj je tudi na področju procesiranja v bioloških medijih pomembno,

da se že pred samo fizično realizacijo, ki je praviloma dolgotrajna in s tem draga, oborožimo s kopico podatkov o želenem sistemu, ki vsaj hipotetično vodijo k uspešni realizaciji.

2 Osnovni gradniki biološkega sistema

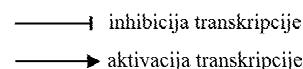
Procesiranje v bioloških sistemih lahko poteka v eni ali več gostiteljskih celicah. Brez izgube na splošnosti se bomo v naši predstavitevi omejili na hipotetično realizacijo v enoceličnem gostitelju prokariotske narave. V takšni zaključeni enoti (celici) se nahajajo naslednji pomembni gradniki, ki vplivajo na *programiranje* dinamike v njej [3]:

- **zapis DNK** je kodiran s štirimi nukleotidnimi bazami (A, G, C in T) in je poljubne dolžine; poleg kontrolnih informacij hrani osnovna navodila za generiranje proteinov;
- **kodon** je osnovni sestavni del zaporedja DNK; sestavljen je iz zaporedja poljubnih treh nukleotidnih baz (treh kodov), tako da lahko pomeni enega od $4^3 = 64$ možnih različnih zapisov; posamezni kodon bodisi definira tvorbo ene od dvajsetih mogočih ciljnih aminokislin ali pa določa t. i. *stop kodon*;
- **promotor** je del zapisa DNK, na katerega se mora vezati encim *RNK-polimeraze*; s tem je izpolnjen pogoj za proženje proizvajanja proteina v celici po *programu*, zapisanem na preostalem delu DNK-zaporedja;
- **operator** je del promotorja, na katerega se vežejo vnaprej določeni transkripcijski faktorji;
- **transkripcijski faktor** je specifičen protein, ki s svojo vezavo na operator promotorja pospešuje oziroma zavira vezavo RNK-polimeraze na promotorjski del DNK-zapisa in s tem neposredno odloča o intenzivnosti tvorbe izhodnega proteina.

Samo dinamiko v celici, ki se manifestira v obliki tvorbe novih proteinov, delimo na fazi *transkripcije* in *translacije*. Tvorba proteinov se sprozi ob vezavi RNK-polimeraze na promotor DNK-zapisa ob prisotnosti oziroma odsotnosti specifičnih transkripcijskih faktorjev. Po vezavi na promotor RNK-polimeraza potuje vzdolž dvojne vijačnice DNK in shranjen genetski zapis prepisuje v mRNK (*sporočilno RNA*). Proses prepisovanja DNK-zapisa v mRNK-zapis imenujemo transkripcija. Proses transkripcije se ustavi ob stop kodonu. Po procesu transkripcije se na novo nastalo molekulo mRNK vežejo *ribosomi* (natančneje na t. i. *mesto vezave ribosoma - RBS*), s čimer se začne prevajanje mRNK-zapisa v zaporedje aminokislin, ki tvorijo ciljni protein. Ta proces imenujemo translacija.

Intenzivnosti generiranja določenega proteina lahko spremljamo tako, da vzporedno z njim proizvajamo še proteine zaznavne z danes dosegljivimi tehnologijami (npr. zeleni fluorescirajoči protein ali t. i. *GFP*).

Transkripcijske faktorje glede na njihov učinek delimo na *aktivatorje*, ki vezavo RNK-polimeraze pospešujejo (aktivirajo, inducirajo), in *represorje*, ki vezavo zavirajo (represirajo, inhibirajo). Prvi z vezavo na operator večajo frekvenco transkripcij mRNK oziroma sam proces transkripcije sploh omogočijo, drugi pa proces transkripcije zavirajo. Vplive transkripcijskih faktorjev lahko grafično ponazorimo z notacijo, predstavljeno na sliki 1. Ker je razgradnja mRNK-molekul v večini primerov izjemno hitra, lahko intenzivnost generiranja specifičnega proteina enačimo kar s frekvenco izvedenih transkripcij.



Slika 1. Grafična predstavitev vpliva represorja in aktivatorja
Figure 1. Graphical presentation of the influence of different transcriptional factors

Z vidika snovalca klasičnih logičnih digitalnih struktur bi lahko predhodno navedene gradnike razdelili na vhodne, procesne in izhodne enote po naslednjem načelu

- **vhodni segment:** prisotnost oziroma odsotnost proteina s funkcijo transkripcijskega faktorja,
- **decizijijski segment:** zapis DNK (*program*), ki vsebuje navodila za tvorbo ciljnega izhodnega proteina,
- **izhodni segment:** novogenerirani protein, ki ima lahko tudi funkcijo transkripcijskega faktorja, ni pa to nujno.

Druge faktorje, ki vplivajo na frekvenco transkripcij (npr. prisotnost RNK-polimeraze) zagotovimo že z umeščitvijo molekule DNK v ustrezno okolje.

3 Koraki za efektivno postavitev želenega biološkega sistema

Postavitev želenega biološkega sistema naj bi potekala v korakih, ki zagotavljajo optimalno izvedbo. Ti so [4]:

- postavitev modela želene logične prevajalne funkcije, kot smo je vajeni pri klasičnem načrtovanju logičnih struktur,
- prenos modela logične prevajalne funkcije na model biološkega sistema,
- modeliranje odzivnosti biološkega sistema na podlagi numeričnih atributov hipotetične realizacije,
- fizična realizacija biološkega sistema in njegovo testiranje.

R	S	$D^1 q$	$D^1 \bar{q}$
0	0	q	\bar{q}
0	1	1	0
1	0	0	1
1	1	X	X

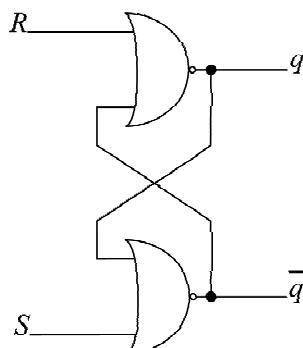
Tabela 1. Prevajalna funkcija RS-pomnilne celice
Table 1. Lookup table of the RS memory-cell

V našem prispevku se omejimo na predstavitev prvih treh korakov.

4 Model realizacije RS-pomnilne celice v biološkem sistemu

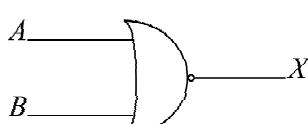
4.1 Model želene logične prevajalne funkcije

Na sliki 2 je prikazana logična shema RS-pomnilne celice [5]. Ima dva vhoda in dva izhoda. Vhod RESET (R) v aktivnem stanju (logična vrednost 1) postavi izhod (q) na logično vrednost 0, vhod SET (S) v aktivnem stanju pa postavi izhod (q) na logično vrednost 1. Če ni aktivен noben od vhodov, se stanje izhodov ohranja, kar je zagotovljeno s povratno vezavo. Prehajanje med stanji na podlagi obeh aktivnih vhodov ni definirano. Delovanje pomnilne celice RS ponazarja prevajalna funkcija v tabeli 1.



Slika 2. Logična shema RS-pomnilne celice
Figure 2. Logical outline of the RS memory-cell

Kot je razvidno iz slike 2, lahko celico RS realiziramo na podlagi para logičnih dvovahodnih vrat NOR. Logično shemo vrat NOR prikazuje slika 3, njihovo prevajalno funkcijo pa tabela 2.



Slika 3. Logična shema NOR-logičnih vrat
Figure 3. Logical outline of NOR gate

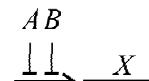
A	B	X
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

Tabela 2. Prevajalna funkcija NOR-logičnih vrat
Table 2. Lookup table of the NOR gate

4.2 Prenos modela prevajalne funkcije na model biološkega sistema

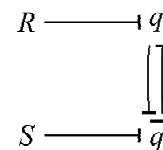
Model sistema bo temeljil na biološki realizaciji logičnih vrat NOR. Slednja začnemo snovati pri vhodih (A, B), za kar uporabimo par transkripcijskih faktorjev. Če se po vzoru [6] omejimo na uporabo transkripcijskih faktorjev represorske narave, bi glede na prevajalno funkcijo iz tabele 2 lahko posamezna vrata NOR realizirali z *operatorjem*, ki bi prožil postopek transkripcije le ob odsotnosti obeh transkripcijskih faktorjev. Ob prisotnosti vsaj enega od dveh represorjev (A in/ali B) bi se tako postopek transkripcije ustavil.

Model biološkega sistema za realizacijo NOR-logičnih vrat je predstavljen na sliki 4. Pri tem \rightarrow pomeni promotorski del DNK, X navodilo za izdelavo proteina X (zaporedje kodirajočega proteina), par (A, B) pomeni represorska proteinska vhoda (signala), X pa izhodni protein (signal), ki se generira le ob odsotnosti obeh vhodnih proteinov. Notacija je povzeta po [6].



Slika 4. Model biološkega sistema posameznih NOR-vrat
Figure 4. Model of a biological system of an NOR logical gate

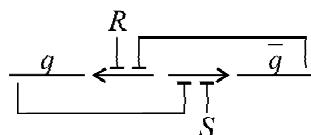
Ob tako pridobljenih hipotetično delujočih bioloških vratih NOR sestavimo tudi model celotne RS-celice, predstavljen na sliki 5.



Slika 5. Model biološkega sistema celotne RS-celice
Figure 5. Model of a biological system of an RS cell

Kot pri navadni RS-celici, aktivacija vhoda RESET (prisotnost represorskega proteina z oznako R) povzroči deaktivacijo izhodnega signala (ustavi proces transkripcije izhodnega proteina q). Prisotnost vhoda SET (prisotnost represorskega proteina z oznako S) povzroči deaktivacijo komplementa izhodnega signala (\bar{q}) in posledično aktivacijo izhodnega signala. Proteina q in \bar{q} se med-

sebojno represirata, kar nam omogoča ohranjanje stanja RS-celice ob odsotnosti obeh vhodnih signalov. Protein q torej nastopa kot represor proteina \bar{q} , \bar{q} pa kot represor proteina q . Natančnejši prikaz modela sistema biološke celice RS prikazuje slika 6. Pri tem so oznake skladne z notacijo, uporabljenou v prejšnjih razdelkih.



Slika 6. Razširjeni model biološkega sistema celotne RS-celice
Figure 6. Extended model of a biological system of an RS cell

4.3 Modeliranje odzivnosti biološkega sistema

Delovanje biološke RS-celice smo modelirali z uporabo determinističnega modela, ki določa koncentracije posameznih proteinov v posameznem trenutku z uporabo diferencialnih enačb (angl. *ordinary differential equations* - ODE), natančneje s t. i. *Hillovimi funkcijami* [7]. Koncentracijo proteina q v danem trenutku lahko izrazimo z izrazom (1), kjer β_0 določa puščanje vrat (*leakiness*), β maksimalno stopnjo transkripcije proteina, R koncentracijo proteina, ki določa vhod RESET, \bar{q} koncentracijo proteina \bar{q} , K koeficient represiranja (pri K enotah represorskega proteina je transkripcija pol manjša od maksimalne), n koeficient kooperativnosti, ki nam pove, koliko enot vhodnega proteina se mora hkrati vezati na operator, ter δ intenzivnost degradacije proteina. Pri tem je puščanje vrat določeno s koncentracijo proteina, ki se generira ne glede na prisotnost oziroma odsotnost transkripcijskih faktorjev.

$$\frac{dq}{dt} = \beta_0 + \frac{\beta}{1 + (\frac{R+\bar{q}}{K})^n} - \delta q. \quad (1)$$

Koncentracijo proteina \bar{q} lahko zapišemo z izrazom (2), kjer posamezni koeficienti igrajo enake vloge kot pri prvi enačbi, S pa pomeni koncentracijo proteina, ki določa vhod SET.

$$\frac{d\bar{q}}{dt} = \beta_0 + \frac{\beta}{1 + (\frac{S+q}{K})^n} - \delta \bar{q}. \quad (2)$$

Po pregledu relevantne literaturе [8,9] smo za predhodno navedene parametre izbrali vrednosti

$$\beta_0 = 0.2 \frac{\mu M}{min}, \quad (3)$$

$$\beta_1 = 4 \frac{\mu M}{min}, \quad (4)$$

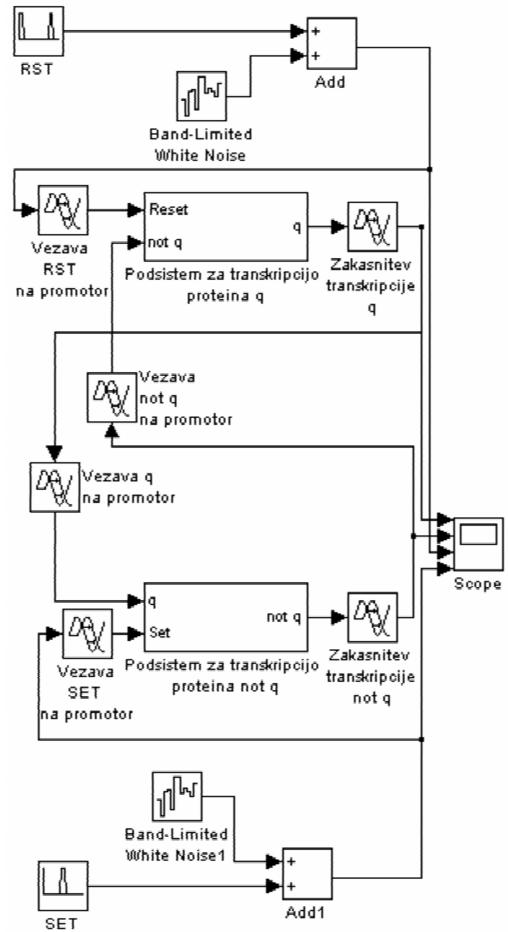
$$K = 1 \mu M, \quad (5)$$

$$n = 3, \quad (6)$$

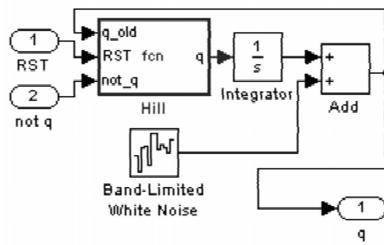
$$\delta = 1 min^{-1}, \quad (7)$$

kjer M pomeni enoto $\frac{mol}{L}$.

Glede na enostavnost diferencialnih enačb smo računski model postavili v okolju Matlab/Simulink (slika 7), pri čemer sta gradniki *RST* in *SET* generatorja vhodnih signalov. Vsakemu je dodan 10-odstotni šum z gradnikom tipa *Band Limited White Noise*. Modeliranje zakasnitev pri vezavi specifičnih proteinov na promotorske regije in zakasnitev pri transkripciji specifičnih proteinov je bilo implementirano s pomočjo gradnika *Transport Delay*. Podsistemi, namenjeni modeliranju samega procesa transkripcije proteina q , je predstavljen na sliki 8. Pri tem gradnik *Hill* vsebuje Hillovo funkcijo transkripcije proteina q (glej enačbo 1), ki jo je treba še integrirati (gradnik *Integrator*). Rezultatu transkripcije, prav tako kot vhodom, dodajamo šum. Modeliranje transkripcije proteina \bar{q} je analogno modeliranju transkripcije proteina q .



Slika 7. Model sistema, postavljen v okolju Matlab/Simulink
Figure 7. Matlab/Simulink model of a biological system

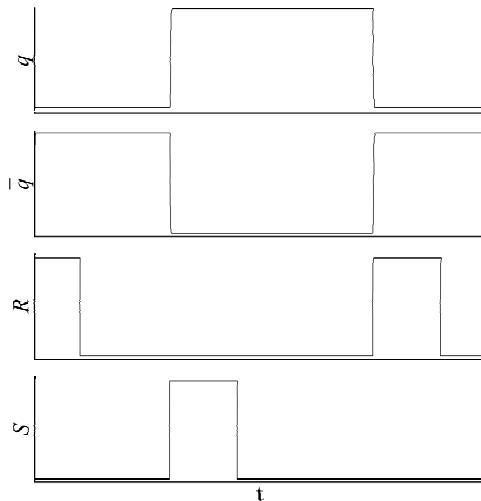


Slika 8. Podsistem za modeliranje transkripcije proteina q , postavljen v okolju Matlab/Simulink

Figure 8. Matlab/Simulink subsystem used in modeling the transcription process of protein q

4.3.1 Simulacijski rezultati v idealnem okolju

Idejalno simulacijsko okolje so razmere, pri katerih je hipotetično mogoč hipen vnos ustreznih koncentracij transkripcijskih faktorjev. Simulacija dinamike je prikazana na sliki 9. Pri tem je os x simulacijski čas ene ure, osi y pa po vrsti koncentracije izhodnega proteina q , izhodnega proteina \bar{q} ter koncentracije vhodnih proteinov R in S .



Slika 9. Simulacijski rezultati dinamike generiranja izhodnega proteina q oziroma \bar{q} v odvisnosti od koncentracije vhodnih represorjev

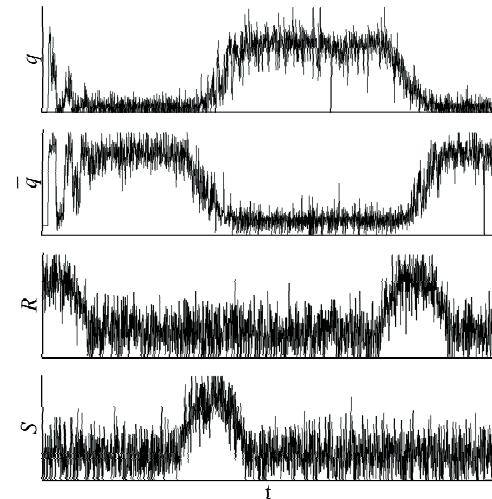
Figure 9. Simulation results indicating the dependence of output protein q (respectively \bar{q}) on the input repressor concentration

Na začetku simulacije smo aktivirali vhod R (RESET) in deaktivirali vhod S (SET). Kombinacija je represirala generiranje proteina q . Zaradi odsotnosti represorskih proteinov q in S je bilo izražanje proteina \bar{q} maksimalno. Čez nekaj časa smo v simulaciji vhodni protein R odstranili, kar je povzročilo ohranjanje stanja. Represorski protein \bar{q} je preprečeval izražanje (tvorbo) proteina q . Represorska proteina, ki vplivata na izražanje proteina \bar{q} , nista bila prisotna, zato je bilo izražanje le-tega še vedno maksimalno. Aktivacija vhodnega proteina S je vodila v represiranje izražanja proteina \bar{q} . Njegova transkripcija se je ustavila. Po določenem času se je protein \bar{q} razgradil do

koncentracije, ki je bila premajhna za represiranje transkripcije proteina q , kar je vodilo v njegovo maksimalno izražanje. Stanje se je po odstranitvi vhodnega proteina S ohranjalo, saj je bila v danem trenutku koncentracija proteina q tako velika, da je represirala izražanje proteina \bar{q} .

4.3.2 Simulacijski rezultati v realnem neidealnem okolju

Realno neidealno simulacijsko okolje so razmere, pri katerih je vnos ustreznih koncentracij transkripcijskih faktorjev časovno pogojen v obliki rastoče ali padajoče funkcije koncentracije, poleg tega pa transkripcija proteina in njegova vezava na promotorska področja nista hipni, kot je bilo predpostavljeno pri idealizirani simulaciji. Koncentracijo vhodnih proteinov smo zato predstavili s funkcijama, ki postopoma prehajata iz aktivnega v neaktivno stanje in nasprotno, poleg tega pa smo v simulacijo vplejali časovne zakasnitve in šum. Rezultati simulacije v realnem neidealnem okolju so predstavljeni na sliki 10, iz njih je razvidno pravilno delovanje obravnavanega vezja. Pri tem pomeni os x simulacijski čas ene ure, osi y pa koncentracije izhodnega proteina q , njegovega komplementa \bar{q} ter koncentracije vhodnih proteinov R in S .



Slika 10. Simulacijski rezultati dinamike generiranja izhodnega proteina q oziroma \bar{q} v odvisnosti od koncentracije vhodnih represorjev v realnem neidealnem okolju

Figure 10. Simulation results indicating dependence of output protein q (respectively \bar{q}) on the input repressor concentration in an unideal environment

5 Sklep

V pričajočem prispevku smo prikazali osnovne korake za alternativni pristop snovanja procesno pomnilnih struktur v bioloških sistemih. Sami rezultati zaslove in modela so obetajoči in so hipotetično dobra podlaga za prehod na

zadnjo fazo same fizične izvedbe v gojenih celičnih strukturah. Počasnost obravnavanega vezja je na prvi pogled ovira pri postavljanju procesno zahtevnejših platform, po drugi strani pa je to zgorj kompromis ob veliki stopnji paralelnosti, ki nam zagotavlja visoko zmogljivost tovrstnih sistemov. Avtorji pričajočega članka smo v fazi priprave same realizacije, ki bo izvedena na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Predvidevamo, da bo fizična realizacija uspešna, s čimer bomo tudi v praksi potrdili našo hipotezo o možnosti realizacije procesnih primitivov v bioloških sistemih.

6 Zahvala

Pričajoča raziskava je bila izvedena v okviru znanstvenoraziskovalnega programa *Vseprisotno računalništvo* (P2-0359), ki ga financira Agencija za raziskave in razvoj Republike Slovenije.

7 Literatura

- [1] G.E. Moore, Cramming more components onto integrated circuits, *Electronics*, vol.38, pp. 114–117, 1965.
- [2] N. Ramakrishnan, U. S. Bhalla, J. J. Tyson, Computing with proteins, *Computer*, vol. 42, pp. 47–56, 2009.
- [3] B. R. Glick, J. Pasternack, *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 3rd Edition. ASM Press, Washington, 2003.
- [4] B. Cvetković, *Analiza možnosti realizacije primitivnih računalniških struktur na osnovi DNK gradnikov*, diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko, Ljubljana, 2008.
- [5] Z. Kohavi, *Switching and Finite Automata Theory*. McGraw-Hill, Tata, 1978.
- [6] T. S. Gardner, C. R. Cantor, J. J. Collins, Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*, *Nature*, vol. 403, pp. 339–342, 2000.
- [7] U. Alon, *An Introduction to Systems Biology*, Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, 2007.
- [8] H. Kobayashi, M. Kacur, M. Araki, K. Chung, T. S. Gardner, C. R. Cantor, J. J. Collins, Programmable cells: Interfacing natural and engineered gene networks, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, pp. 8414–8419, 2004.
- [9] T. Tian, K. Burrage, Stochastic models for regulatory networks of the genetic toggle switch, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, pp. 8372–8377, 2006.

Miha Moškon je asistent na Fakulteti za računalništvo in informatiko v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja s področjem alternativnih procesnih metod in struktur prihodnosti. Je Prešernov nagrajenec Fakultete za računalništvo in informatiko iz leta 2006.

Monika Ciglič je mlada raziskovalka na Kemijskem inštitutu. Raziskovalno se ukvarja z mikrobiologijo in imunologijo. Že dvakrat je bila članica zmagovalne ekipe na mednarodnem tekmovanju iGEM (International Genetically Engineered Machine

Competition), in sicer leta 2006 kot študentka in leta 2008 kot mentorica.

Roman Jerala je vodja Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Raziskovalno se ukvarja z medicinsko pomembnimi procesi, predvsem z imunskim odzivom na bakterijske infekcije. Poleg tega predava Bioinformatiko na Univerzi v Ljubljani in je med trenutno najuspešnejšimi znanstveniki v Sloveniji.

Nikolaj Zimic je redni profesor na Fakulteti za računalništvo in informatiko v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja s področjem alternativnih procesnih metod in struktur prihodnosti.

Miha Mraz je izredni profesor na Fakulteti za računalništvo in informatiko v Ljubljani. Raziskovalno se ukvarja s področjem alternativnih procesnih metod in struktur prihodnosti.