

# Karakterizacija bioloških delov

## Karakterizacija: zakaj in kako?

Biološki deli, ki so v Registru, so smiselno uporabni le, če so dobro opisani. V katalogu delov bi pričakovali, da so vsi deli testirani na enak način. Ker je standardizacija eden od temeljev sintezne biologije, morajo biti vzpostavljeni tudi standardi za določanje lastnosti posameznih tipov biokock.

Meritve naj bi dale čim bolj absolutne in medsebojno primerljive rezultate. Sicer bi bilo mogoče uporabljati tudi relativne vrednosti, če bi prej določili, kaj je ‚zlati standard‘.

Pri karakterizaciji delov je treba misliti tudi na to, da so vrednosti, ki jih je mogoče izmeriti / preračunati, včasih lahko soodvisne (npr. število transkriptov / sekundo je odvisno ne samo od promotorja, pač pa tudi od števila kopij gena), zato lahko pri meritvah istih bioloških delov v različnih kontekstih izmerimo različne vrednosti.

Če določamo vrednosti za posamezne biološke naprave z eno tehniko, ni nujno, da je vrednost, ki se zdi absolutna, enaka, kot če bi jo določali z drugo tehniko (npr. izražanje proteina z imunskim prenosom / tehniko ELISA / MS).

Na vrednosti, ki jih določamo, lahko vpliva vrsta dejavnikov (npr. temperatura gojenja, vsebnost kisika v gojišču), zato je treba ali sprejeti pravila, pod katerimi pogoji izvajamo teste, ali pa izbiro pogojev prepustiti izvajalcu, od njega pa samo zahtevamo, da jih navede.

Idealno bi bilo, da bi imeli protokole za teste, ki bi jih vsi uporabljali (*benchmark test*) vsaj kot interno kontrolo – npr. število kopij plazmida v celici seva A mora biti vedno  $n \pm y$  in če ne dobimo te vrednosti s kontrolnim sevom A, naš test ni ustrezno izveden.

## Karakterizacija promotorjev / hitrosti transkripcije

PoPS: polimeraze na sekundo ( $\approx$  TiPS: iniciacije transkripcije na sekundo)

PoPSdc: polimeraze na sekundo na kopijo DNA

PoPS predstavlja število signalov ki vstopajo v logično SB-napravo ali iz nje izstopajo. Zato je PoPS neke vrste analogni izraz jakosti toka, ki teče skozi žico na določeni točki v vezju. Pomemben je za naprave, ki temeljijo na transkripciji, ne pa nujno za druge naprave (starejši inverterji), ki temeljijo na določenih koncentracijah proteinov, ali na kinaznih napravah, ki temeljijo na fosforilacijskem stanju proteina (,posttranslacijska logika').

Med seboj lahko sestavljamo dele, ki uporabljajo signale iste vrste (npr. temeljijo na PoPSih). Obašanje takih sestavljenih naprav je možno racionalno modelirati le, če poznamo lastnosti posameznih elementov.

TiPS ni povsem ustrezen izraz, ker se izraz nanaša na iniciacijo (ta pa se dogaja samo na enem mestu), medtem ko polimeraza potuje po DNA po celotni dolžini do mesta terminacije transkripcije – npr. RNA-polimerazo, ki se premika skozi terminator, ni smiselno definirati preko frekvence iniciacije transkripcije.

Nekateri PoPS imenujejo tudi PAR (hitrost prispetja polimeraze, Polymerase Arrival Rate), hitrost prihajanja RNA-polimeraze na neki točki na DNA.

## Karakterizacija promotorjev / hitrosti transkripcije (2.)

Hitrost transkripcije je bolj splošen izraz, ki ga opredeljujemo s številom dokončanih transkriptov na enoto časa. PoPS ni povsem enakovreden izraz, ker predstavlja hitrost transkripcije na neki določeni točki na matrici.

Vir PoPSov je npr. promotor. Ta nima nekega drugega vstopnega signala in predpostavljamo, da je hitrost signalov, ki jih promotor generira, konstantna. RBS je primer prevodnika signalov – na poti preko RBS se vrednost PoPS ne spremeni. Kodirajoča zaporedja imajo lahko začetno vrednost PoPS nekoliko višjo kot so končne vrednosti (ob koncu kodirajoče regije); ta zaporedja torej predstavljajo neke vrste upornika (v elektroniki). Ponor signalov je terminator (‘ozemljitev’), ki sprejema PoPSe, jih pa ne pošilja naprej.

TIPS ni povsem ustrezen izraz, ker se izraz nanaša na iniciacijo (ta pa se dogaja samo na enem mestu), medtem ko polimeraza potuje po DNA po celotni dolžini do mesta terminacije transkripcije – npr. RNA-polimerazo, ki se premika skozi terminator, ni smiselno definirati preko frekvence iniciacije transkripcije.

Nekateri PoPS imenujejo tudi PAR (hitrost prispetja polimeraze, Polymerase Arrival Rate), hitrost prihajanja RNA-polimeraze na neki točki na DNA.

Zaenkrat ne obstaja noben direkten način merjenja PoPSov in vivo. Vseeno to enoto uporabljamo za ponazarjanje delovanja logičnih naprav, ki temeljijo na transkripciji.

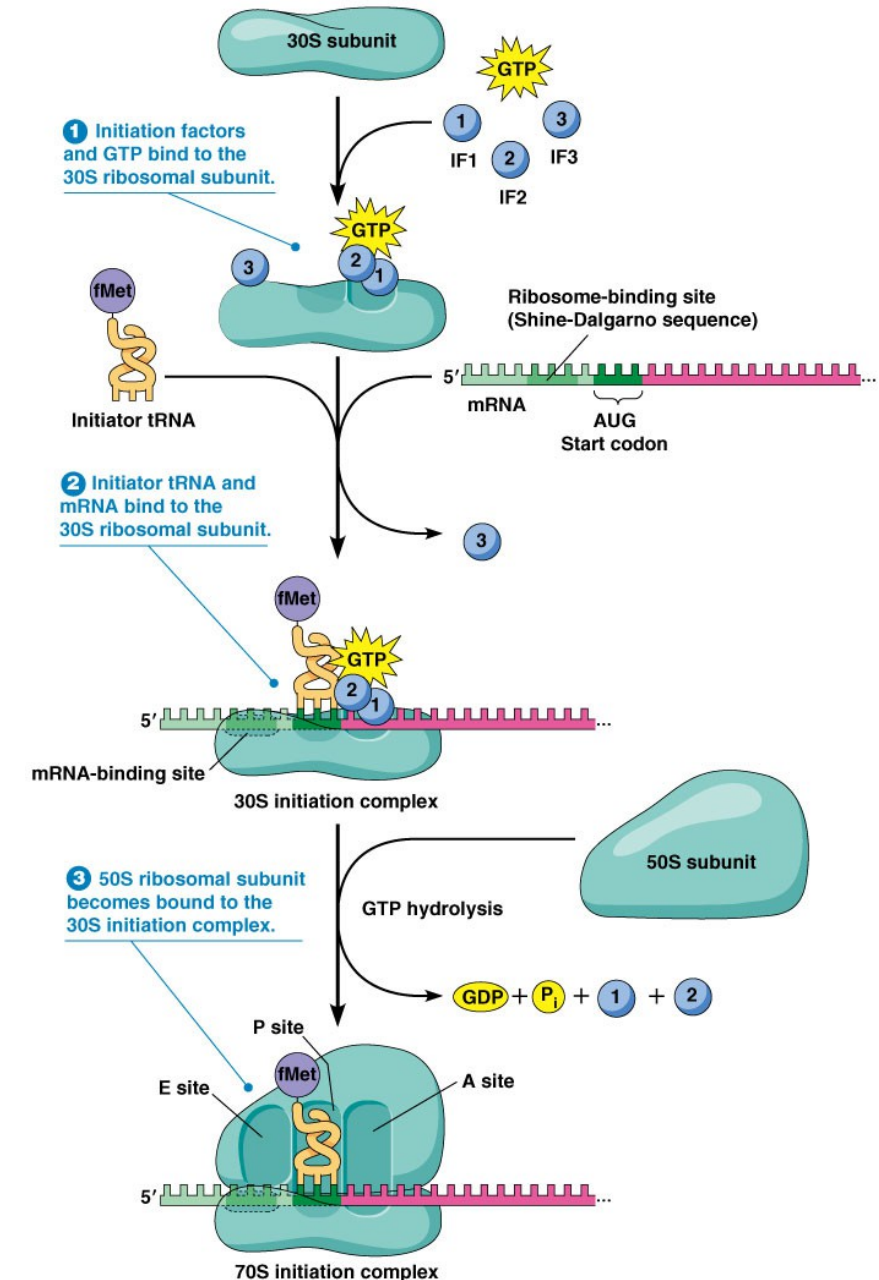
## Karakterizacija RBS / mRNA

RiPS: ribosomi na sekundo

RiPSmc: ribosomi na sekundo na kopijo mRNA

Enota pove, koliko ribosomov gre po neki mRNA, kar je odvisno od RBS, lahko pa tudi od nukleotidnega zaporedja (redki kodoni) in pogojev v celici. Test izvedemo v optimalnih rastnih pogojih za celice, v katerih izvajamo meritev oz. v pogojih ravnotežne rasti celic.

Hitrost translacije (vrednost RiPSmc) je odvisna od najpočasnejše stopnje v iniciaciji translacije oz. elongaciji. Kaže, da je kritična stopnja sproščanje  $P_i$  po hidrolizi  $GTP \rightarrow GDP + P_i$  na IF2. To definira hitrost vezave naslednje aa-tRNA (v kompleksu z EF-Tu + GTP) na mesto A v ribosomu.



## Posredni način merjenja PoPSov

Ob tem, ko sestavimo napravo za lastne potrebe, sestavimo še enako napravo, le da vstavimo regijo, ki zapisuje za fluorescirajoči protein (npr. CFP) in nato določamo fluorescenco. Vendar s tem ne moremo meriti samo hitrosti transkripcije, pač pa tudi translacije (RiPS).



Kennell D. & Riezman H., JMB 1977

- Preračunali so, koliko molekul RNA-polimeraze je hkrati vezanih na inducirani operon *lac*.
- Določili so razdaljo med ribosomi na genu *lacZ* in na geni *lacA*.
- Vrednosti so dobili na osnovi hitrosti sinteze encima LacZ (preračunano na podenote encima na celico na sekundo), iz dobljenih vrednosti konc. transkripta (hibridizacija označene mRNA s sondo), iz preračuna mase transkripta v število molekul transkripta (glede na 3'-konec) in iz hitrosti premikanja ribosomov.
- Na genu *lacZ* so določili 3,3 sekundni interval med posameznimi iniciacijami transkripcije.
- Na genu *lacZ* je hkrati 23 molekul RNA-polimeraze, na genu *lacA* pa 5-6, kar pomeni, da je razdalja med polimerazami ~135 nt.
- Ribosomi začnejo translacijo na mRNA *lacZ* na vsakih 3,2 s in si sledijo na 110 nt; v povprečju je na transkriptu za *lacZ* po 40 ribosomov.
- Vsako sekundo v celici nastane 40 molekul funkcionalnega transkripta *lacA*, na njih pa si ribosomi sledijo na vsakih 16 s (razdalja 580 nt).
- Različni transkripti imajo različne frekvence translacije.
- Transkripti na 5'-koncu policistranske mRNA so bolj stabilni od 3'-konca, kar je povezano s frekvenco vezave ribosomov.

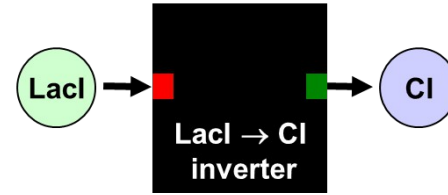
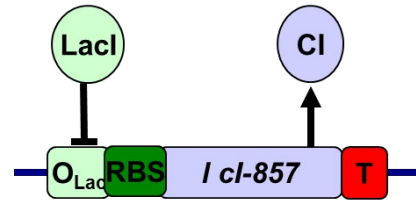
Preračunane vrednosti, izražene v RiPS:

LacZ: 0,3 proteina / mRNA . s

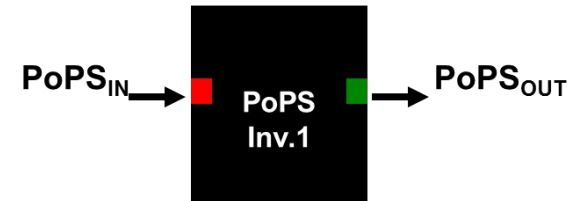
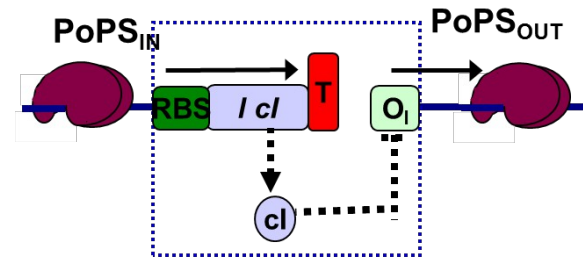
LacA: 0,06 proteina / mRNA . S

0,039-0,55 proteina /mRNA . s - določeno z biokockami (Conboy & Braff / Endy Lab: Soup to Nuts project)

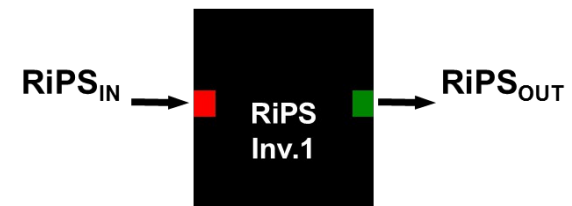
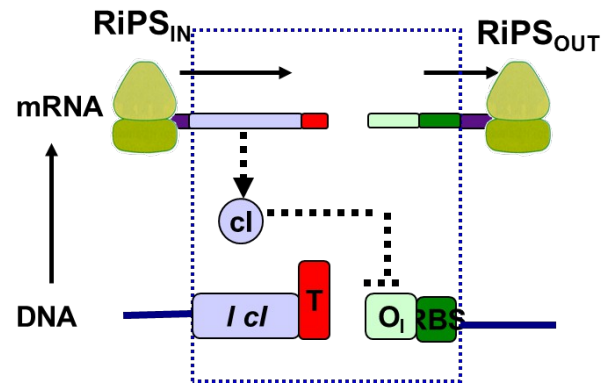
## Protein Concentration



## Polymerase Per Second=**PoPS**



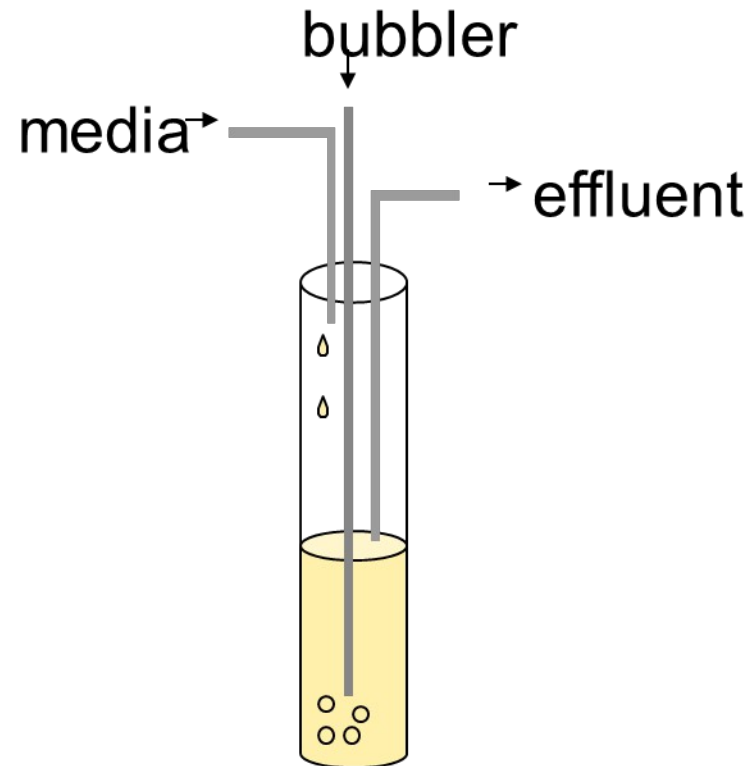
## Ribosome Per Second=**RiPS**





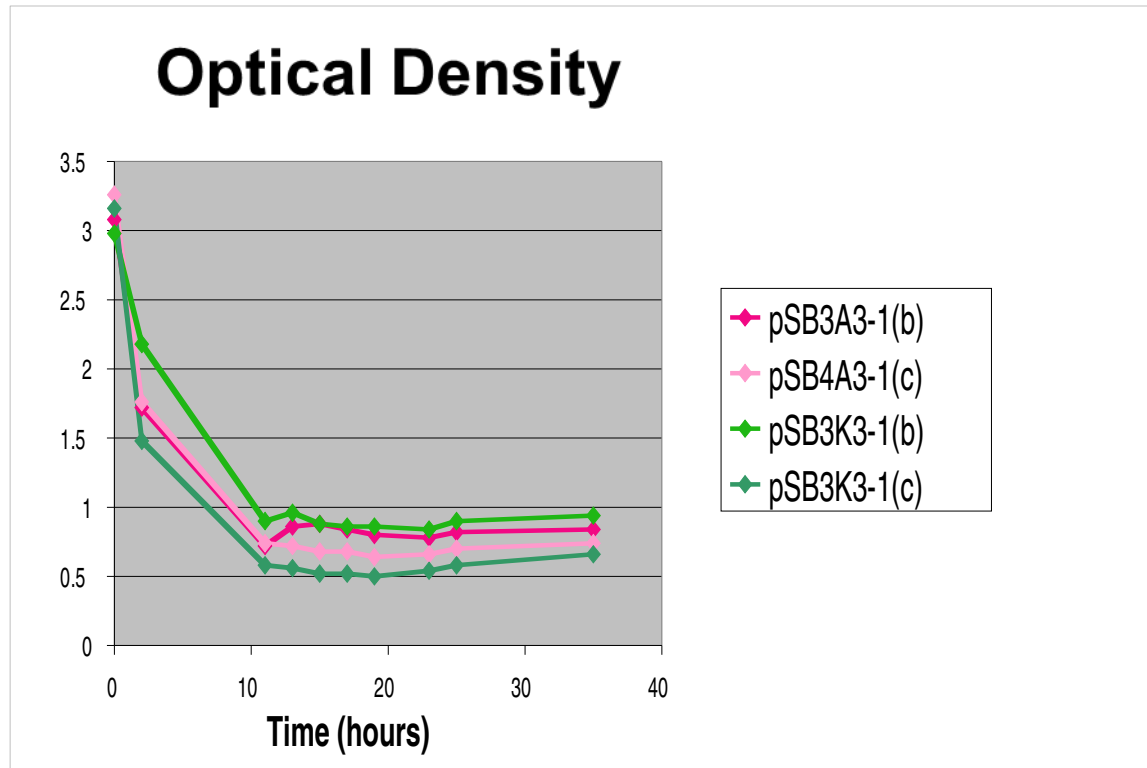
## Establishing standard conditions

- Growth Conditions: Steady state continuous culture in a six-chamber chemostat (20 mL/chamber) Dilution rate =  $0.75 \text{ hr}^{-1}$ , doubling time  $\sim 56$  minutes. Temperature:  $37^\circ \text{C}$
- Strain: *E. coli* MC4100
- Media: M9 minimal media supplemented with 0.4% glycerol, 0.1% casamino acids, 1% thiamine hydrochloride



## Validation of steady-state

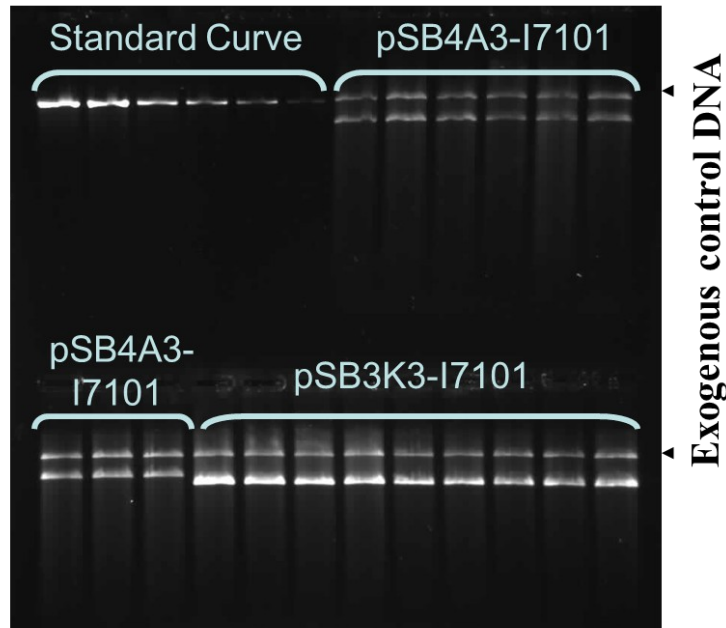
Cultures containing GFP expression devices I7100 and I7101, grown in chemostat under standard operating conditions exhibit stable cell density and GFP fluorescence. This allows us to assume a constant dilution rate ( $\mu$ ) and protein level ( $dP/dt = 0$ ) when modeling this system.



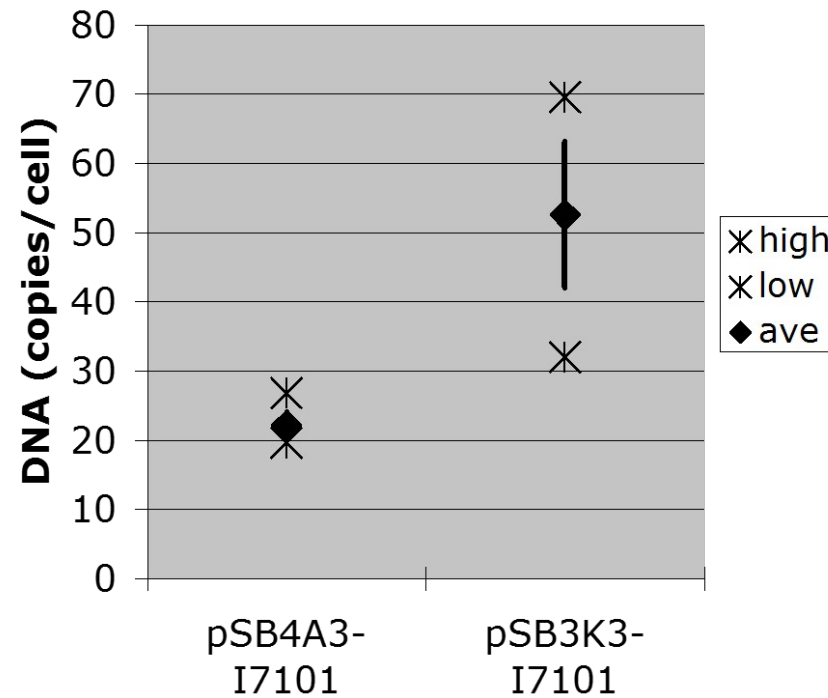
## Fluorescence

# DNA Per Cell Quantification

Method: Image quantification of SybrGold- stained, linearized plasmid DNA



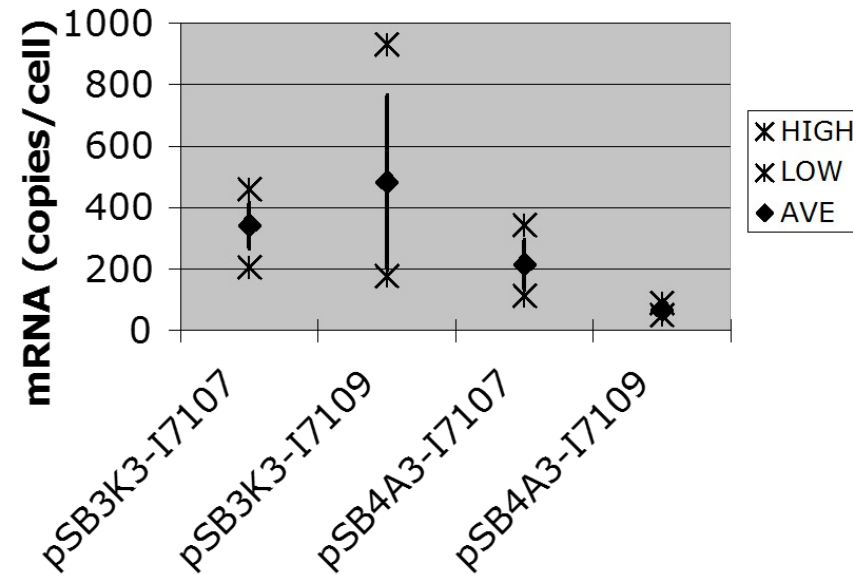
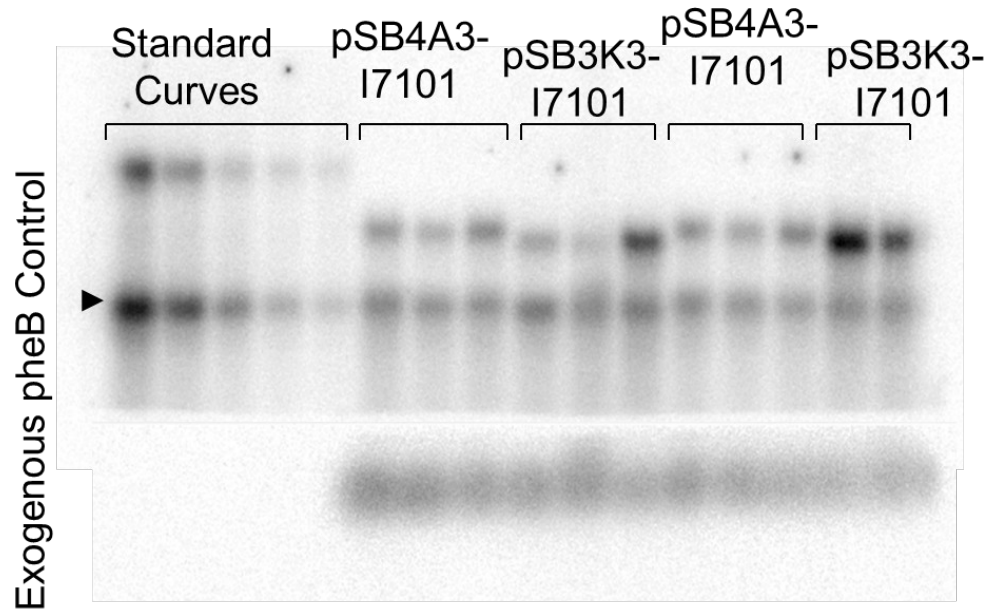
Steady State Plasmid Copy Number  
(Error bars indicate SD; N=18)



# *mRNA Per Cell Quantification*

Method: Quantitative Northern Blot  
And Real-time RT-PCR.

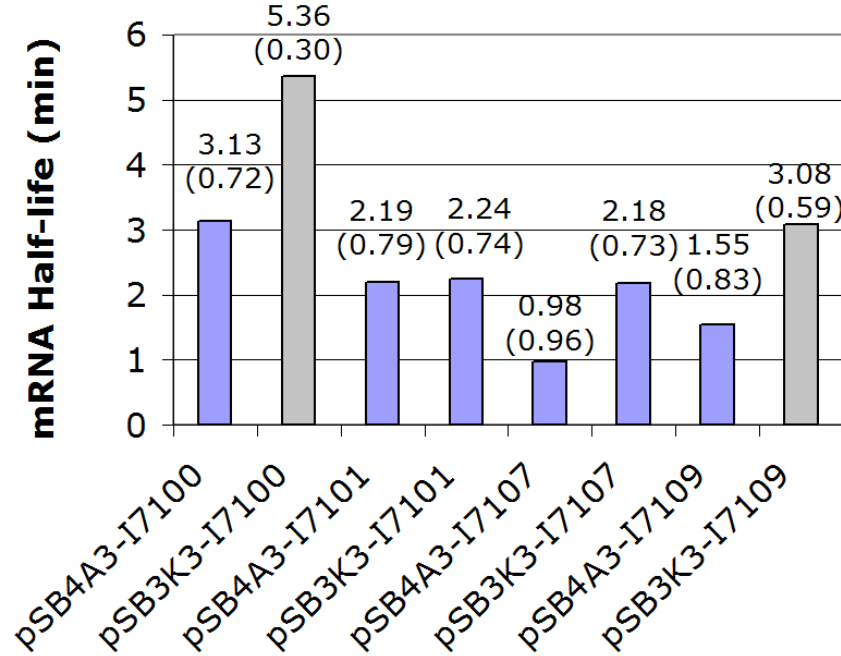
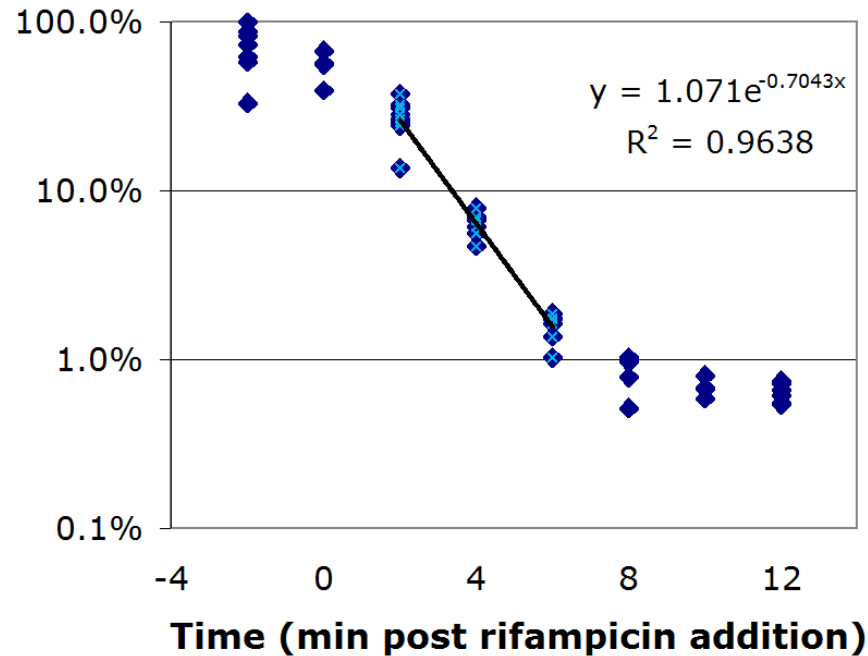
Steady State mRNA Levels  
(Error bars indicate SD)



# *mRNA Half-life Measurement*

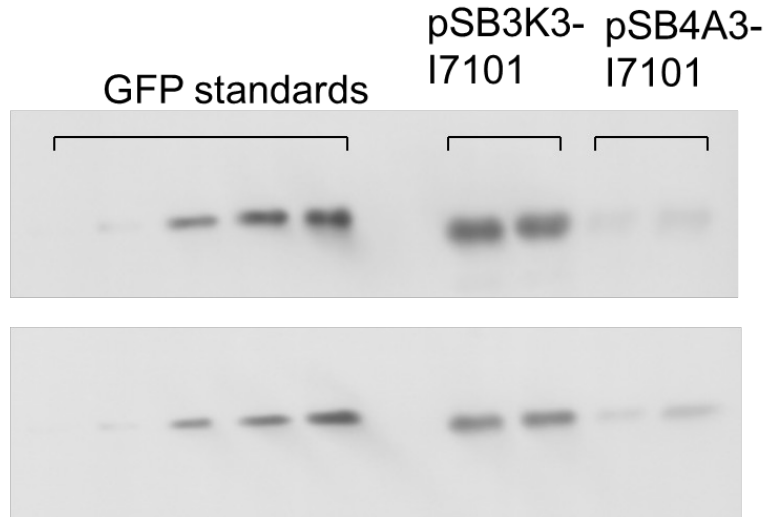
Method: Transcription arrest with Rifampicin. Real-time RT-PCR.

mRNA Half-life  
(R<sup>2</sup> value)

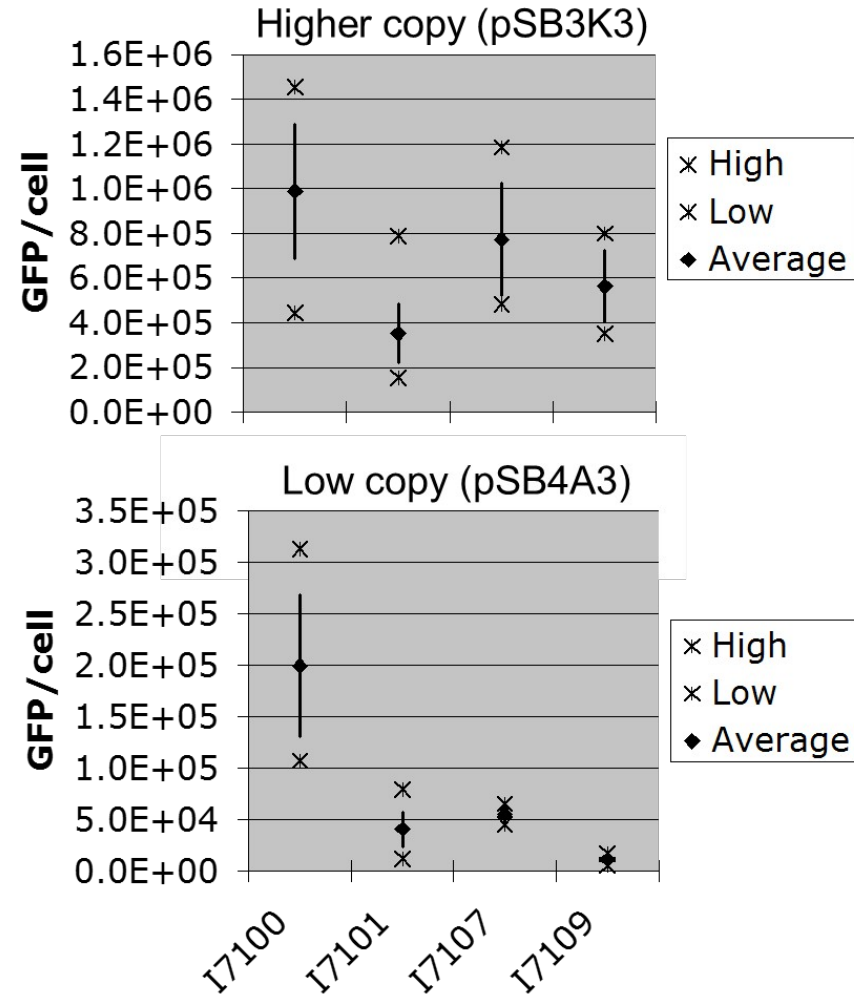


# Protein Per Cell Quantification

Method: Quantitative Western Blot



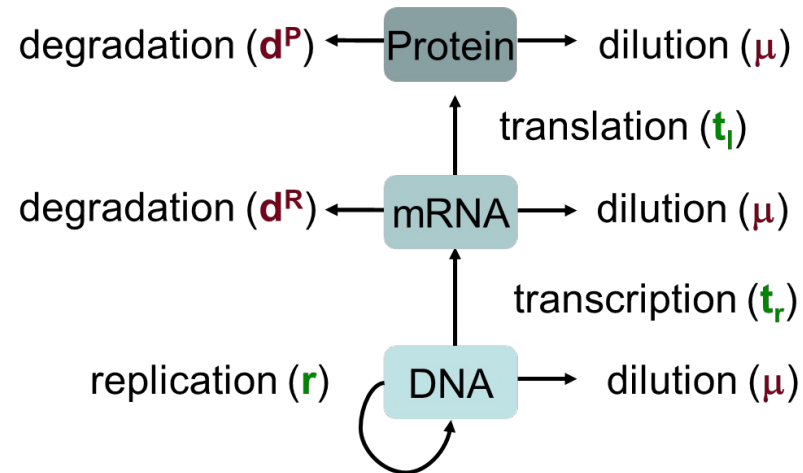
Steady State Protein Levels  
(Error bars indicate SD)



# Protein Generator Model

ODE model of gene expression suggests that RiPS and PoPS can be determined for a simple protein generator from measurements of

- 1) per cell DNA, mRNA, and protein levels
- 2) mRNA and protein degradation rates
- 3) steady state growth rate



## Rate Equations:

$$dP/dt = t_t R - \mu P - d^P P$$

$$dR/dt = t_r D - \mu R - d^R R$$

$$dD/dt = rD - \mu D$$

## Steady State:

$$dP/dt = 0, t_t = (\mu P + d^P P)/R$$

$$dR/dt = 0, t_r = (\mu R + d^R R)/D$$

$$dD/dt = 0, rD = \mu D$$

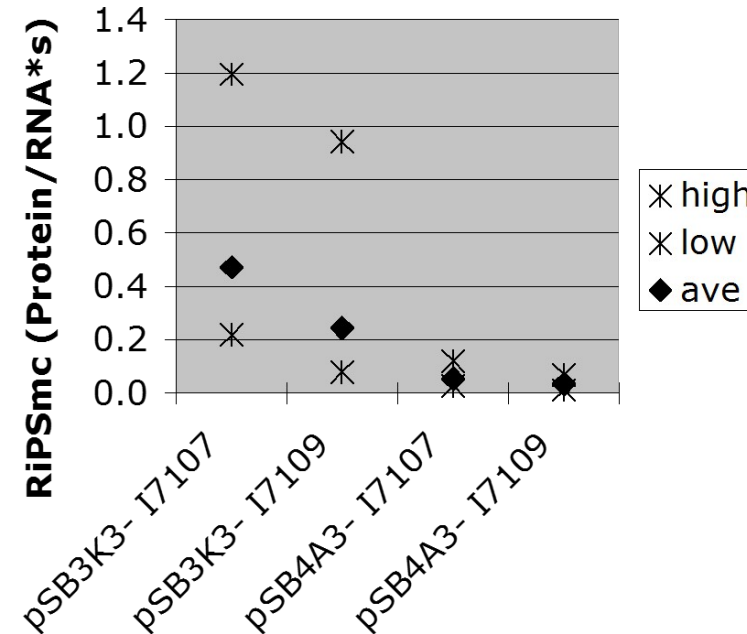
$t_t = \text{RiPS per mRNA copy}$

$t_r = \text{PoPS per DNA copy}$

# Estimating PoPS and RiPS

$dR/dt = 0$ ,  $t_r = (\mu R + d^R R)/D$   
 $t_r = \text{PoPS per DNA copy}$

$dP/dt = 0$ ,  $t_i = (\mu P + d^P P)/R$   
 $t_i = \text{RiPS per mRNA copy}$



PoPS and RiPS estimates are consistent with qualitative predictions for devices on a low copy plasmid. When expressed from a higher copy plasmid, device behavior is not as predicted.

Note: PoPS estimates assume DNA copy number unchanged between constructs. RiPS estimates assume  $d^P \ll \mu$  for GFP in this system



# What could affect these parameters?

- Host cell type
  - Growth medium
    - Oxygen
    - Carbon
    - Nitrogen
    - Light
  - Growth phase of cells
  - Metabolic state of cells
  - Total “load” on cells
- 
- How do we control growth to minimise these variations? Use of fermentors.



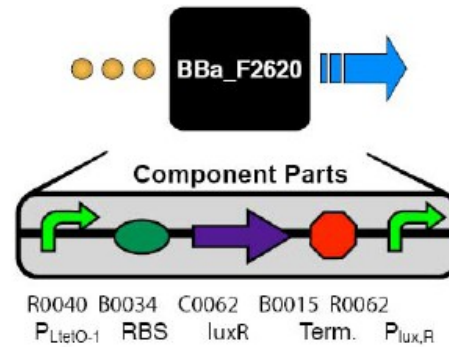
# Input/output functions of a device

## BBa\_F2620

3OC<sub>6</sub>HSL → PoPS Receiver

### Mechanism & Function

A transcription factor (LuxR) that is active in the presence of a cell-cell signaling molecule (3OC<sub>6</sub>HSL) is controlled by a regulated operator (P<sub>LtetO-1</sub>). Device input is 3OC<sub>6</sub>HSL. Device output is PoPS from a LuxR-regulated operator. If used in a cell containing TetR then a second input such as aTc can be used to produce a Boolean AND function.



- Input – AHL
- Need to connect PluxR to reporter (eg GFP) to provide measurable output of protein production
- Convert from GFP protein molecules produced per cell to PoPS
- Output – PoPS gives mRNA production

# Design and Characterization of a Three-terminal Transcriptional Device Through Polymerase Per Second

Prasanna Amur Varadarajan and Domitilla Del Vecchio\*, *Member, IEEE*

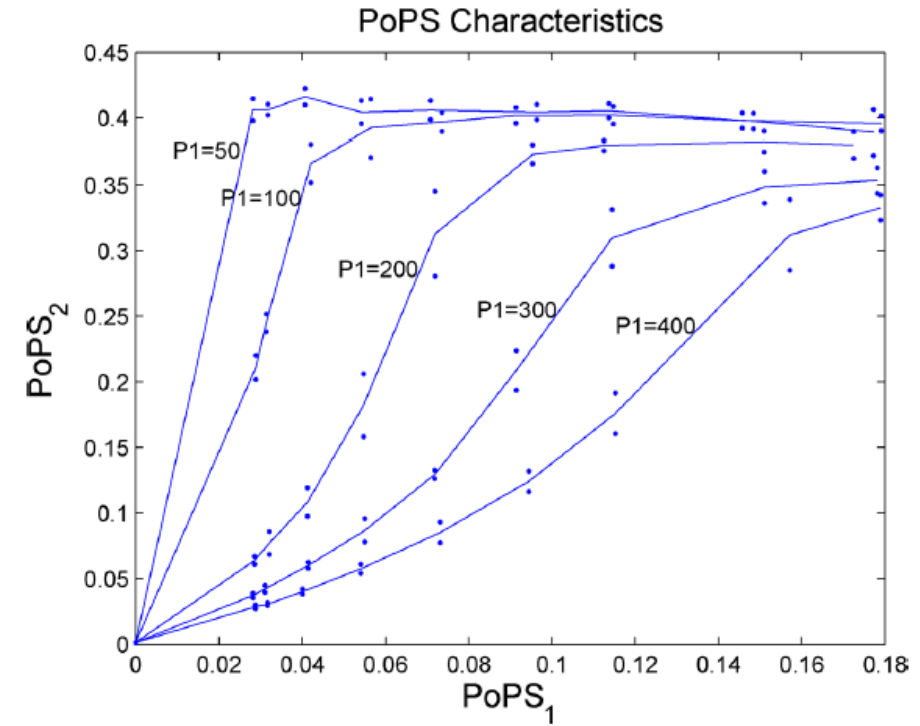
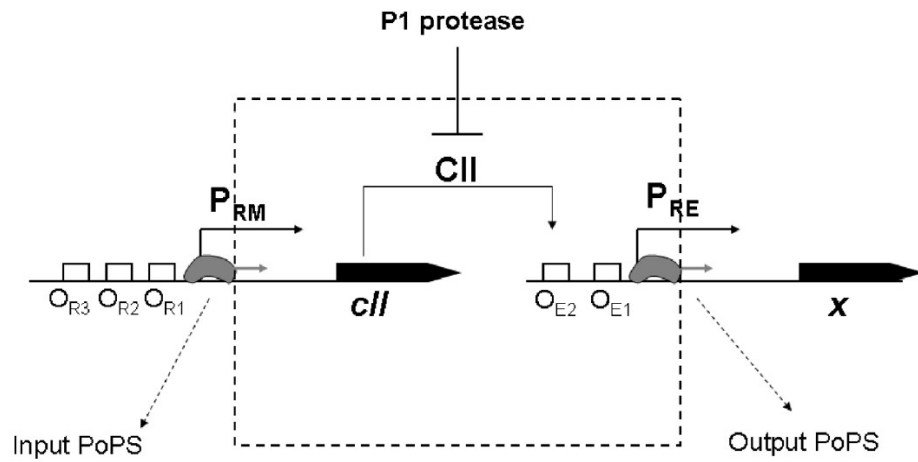


Fig. 4. PoPS Characteristics of the transcriptional device as the amounts of P1 are changed. The solid lines denote the sample mean over ten data samples, while the dots denote the standard deviation.