

# Pràctica 10

---

*Oscil·lador transcripcional*

## Introducció

La multitud de components diferents que formen part de les xarxes biològiques donen lloc a comportaments molt diferents. Una de les possibles aproximacions per poder estudiar el comportament d'aquests circuits amb més detall és construir circuits artificials, dins d'organismes senzills, amb components escollits específicament per les seves característiques. Els sistemes que en resulten s'estudien i es modelitzen amb la finalitat de poder treure'n conclusions per entendre'n el comportament i millorar el disseny de circuits en el futur. Aquesta aproximació forma part del que es coneix com biologia sintètica.

Revisarem un dels primers exemples clàssics d'aquesta aproximació conegut com a 'repressilator'.

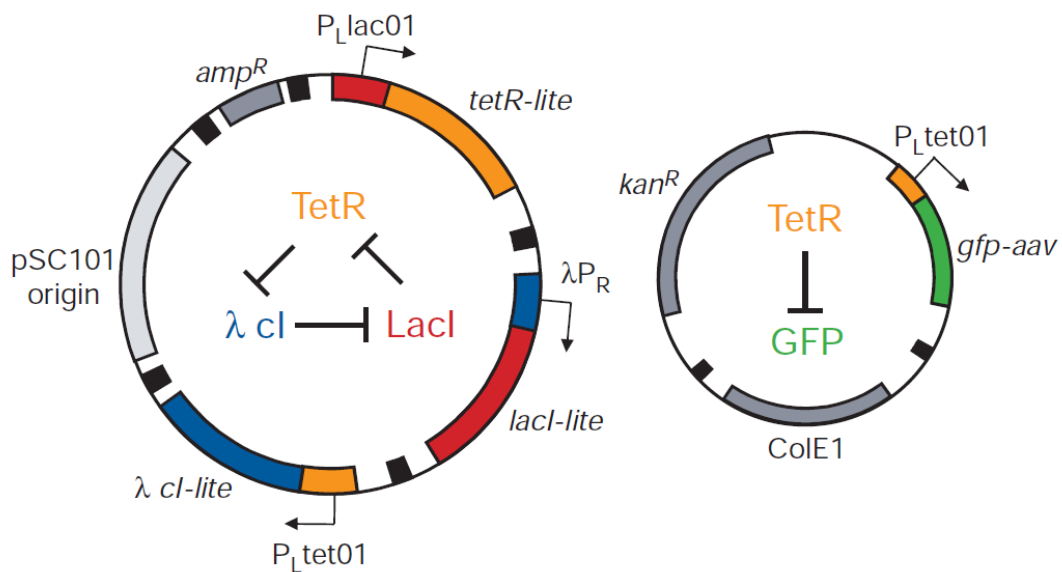


Figura 1: components de l'oscil·lador.

Aquest sistema es basa en introduir en una soca del bacteri *E. coli* un parell de plasmidis com els de la figura 1. Aquests són portadors dels gens que codifiquen els components del circuit artificial del que formen part.

El primer plasmidi del sistema codifica per 3 proteïnes de les que es coneix que actuen com a repressors de la transcripció i es diferencien principalment per la seqüència de DNA a la que s'uneixen. La primera proteïna **LacI prové d'*E. coli* i pot reprimir la transcripció del gen *tetR*** (que prové del transposó TN10, on codifica per la resistència a la tetraciclina). El repressor sintetitzat per aquest gen pot **reprimir l'expressió del gen *cl* del fag lambda ( $\lambda$ )**. La proteïna sintetitzada pel gen *cl* pot **reprimir l'expressió del gen *lacI*** el que permet tancar el cicle. El afegit 'lite' indica que s'han incorporat seqüències senyal que incrementaran la degradació del producte i per tant fer que tinguin una persistència menor.

En el estudi de sistemes amb un baix nombre de components discrets s'observa que els efectes d'esdeveniments de caire aleatori esdevenen significatius en el comportament final del sistema. Per això es desenvolupen mètodes de simulació estocàstica. **El model descrit a aquesta pràctica permet veure les diferències entre les dues aproximacions, determinista i estocàstica.** Es podria dir que **el mètode estocàstic descriu millor el comportament d'un baix nombre de partícules tal com es podria observar a una cèl·lula concreta,** mentre que el mètode determinista descriu el cas d'un elevat nombre de partícules al sistema que es tindria si el volum considerat tendeix cap al infinit i on els esdeveniments aleatoris individuals tendeixen a cancel·lar-se. **El mètode estocàstic també permet observar que cèl·lules diferents poden trobar-se en estats molt diferents en un determinat instant de temps, independentment de la mitjana**

que s'observi a la població. Fet que es pot observar si al repetir la simulació no s'observen exactament els mateixos resultats. També permet observar que l'estudi de processos concrets a cèl·lules individuals pot presentar dificultats donada la influència dels esdeveniments aleatoris.

Un altre aspecte que permet veure aquest sistema fa referència als diferents tipus de comportament que pot presentar un sistema depenent del valor dels seus paràmetres (estat estacionari, transitori o dinàmic, oscil·latori,...).

A diferència dels sistemes assajats prèviament, en aquest cas interessa fer la simulació fent servir ambdós mètodes. Per això és necessari considerar un baix nombre de molècules. En aquest cas es considerarà un compartiment de volum de l'ordre del que podria tenir una cèl·lula ( $1 \mu\text{m}^3$ ) i nombres de molècules que oscil·len entre les desenes i els milers.

## La pràctica

- 1) Construeix la xarxa de la síntesi de reguladors de l'oscil·lador descrita al paper adjunt. Les equacions del model estan descrites a la 'box 1-Network design' però estan escrites en unitats reescalades (adimensionals) per fer-lo més general i disminuir el nombre de paràmetres. Es donen però els valors de diferents paràmetres en unitats sense reescalar. Per fer-ho més entenedor i similar a les pràctiques anteriors és millor agafar la versió sense reescalar. La descripció completa del model es troba a l'apèndix d'aquest guió.
  - 2) Per observar el comportament crea les següents **gràfiques**.
    - a. Una per veure l'**evolució temporal** dels nivells dels mRNA (especifica de tipus 'symbols') i un altre per veure els nivells de proteïnes (especifica de tipus 'points').
    - b. Prepara també unes gràfiques de '**pla de fase**'. Es a dir una gràfica on a un eix hi ha una variable, per exemple LacI-mRNA i a l'altre eix un altra variable per exemple LacI-Proteïna. Fes-ho per cada parella de mRNA i la seva proteïna associada.
    - c. Crea també un gràfic '**histogram**' per cada tipus de variable (els 3 mRNA (amb increment 1) i un altre per les 3 proteïnes (amb increment 10)). Els histogrames fan una gràfica de la freqüència amb que una variable agafa un determinat valor.
  - 3) En primer lloc fes una simulació temporal (time course) de 1000 minuts i 50000 intervals amb el mètode determinista. Fixat en si les oscil·lacions s'estabilitzen i si en els plans de fase es tendeix a una mateixa òrbita o a un punt.
    - a. Quins tipus de trajectòries observes al pla de fase?.
    - b. Quins valors són més freqüents als histogrames?.
    - c. Executa la tasca 'steady-state' i compara valors amb els histogrames.
    - d. Ves al apartat 'Jacobian' on hi ha la matriu Jacobiana del sistema (derivades de cada equació de balanç -files- respecte de cada variable -columnes-) i fixat amb el signe dels valors propis d'aquesta matriu (eigenvalues) que hi ha al final. Ara ves a l'apartat 'Stability'. Mira si diu si l'estat estacionari trobat és estable i més avall quants valors propis tenen parts negatives. (**un estat estable té valors negatius a la part real dels valors propis de la matriu del Jacobia**)
- Nota: Quan un sistema tendeix cap a una zona determinada del pla de fase es diu que té un 'atractor'. Si el sistema convergeix de manera oscil·latòria (una espiral al pla de fase) cap a un punt aquest s'anomena **focus**. Si en canvi convergeix a una òrbita circular al pla de fase, aquest s'anomena **cicle límit**. Si totes les trajectòries

possibles al voltant d'un punt o una òrbita convergeixen sempre al punt o la òrbita, se'ls anomena 'atractors' **estables** mentre que si les trajectòries tendeixen a allunyar-se del punt o la òrbita s'anomenen **inestables**.

- 4) Canvia el valor del coeficient de Hill ' $n$ ' a un valor de 0.5 i repeteix la simulació.
  - a. Quin tipus de comportament s'observa en cada cas?
  - b. Quins tipus de trajectòries observes al pla de fase?
  - c. Quins valors són més freqüents als histogrames?
  - d. Executa la tasca '**steady-state**' i compara valors amb els histogrames.
  - e. Compara també els signes dels valors propis del Jacobià i l'informe d'estabilitat a 'stability'. Compara-ho amb el cas anterior.
- 5) Repeteix les dues simulacions anteriors fent servir un mètode estocàstic. Per exemple el '**Adaptive SSA**' o el '**Gibson-Bruck**'. Pots provar-ne de diferents.
  - a. Quin comportament s'obté en aquest cas?
  - b. Repeteix la simulació varies vegades. S'obté el mateix resultat?
- 6) Amb el valor de ' $n=0.5$ ' i el '**Time course**' amb el mètode **estocàstic** seleccionat.
  - a. Dins la tasca '**Parameter scan**', afegeix un '**scan item**' del tipus '**repeat**' i executa 25 vegades la tasca '**Time course**'.
  - b. Executa també la tasca '**Steady state**'. Diries que els valors de l'estat estacionari podrien ser una mitjana dels valors obtinguts al punt a anterior?
  - c. (**opcional**) Executa el procediment de 'Metabolic control anàlisi'. Com interpretes els coeficients de control del flux i els del control de la concentració?
- 7) Repeteix el punt anterior però amb un valor de  $n=2$ .
  - a. Compara els núvols de punts obtinguts amb el 'Parameter scan' amb els de la simulació determinista. Diries que la simulació determinista és una mena de mitjana?
  - b. Com interpretes els valors de la tasca 'Steady state'.
  - c. (**opcional**) Com que el programa ha calculat un tipus d'estat estacionari, també pot fer la tasca 'Metabolic control anàlisi'. Ara bé no sabem si els coeficients són coherents amb el que esperem. Mira un parell de coeficients del MCA. Per exemple un de positiu i un de negatiu. Augmenta la velocitat de la reacció que hagi triat i mira si el canvi produït és el esperat segons el MCA.
- 8) Per acabar, fes un petit resum de les **diferències principals** que has observat. En concret, entre la simulació determinista i estocàstica i entre un sistema que manté un estat estacionari estable i un altre que manté un estat oscil·latori.

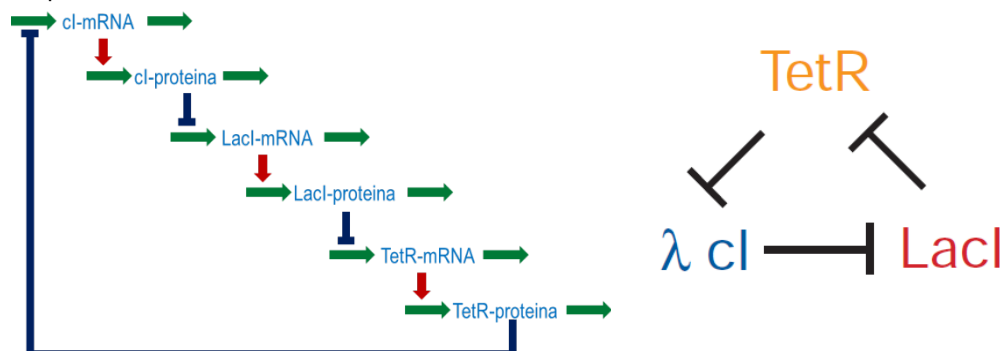
## Referències

Elowitz . B. Leibler, S. "A Synthetic Oscillatory Network of Transcriptional Regulators," Nature, 403, 2000 pp. 335–338.

## APÈNDIX 1:

### Descripció de la xarxa de l'oscil·lador transcripcional

Esquema del sistema:



Les equacions del model descrites més avall es corresponen amb les del model descrit al paper de referència. Malgrat això no són idèntiques perquè les del paper es troben reescalades i adimensionals. En concret el paper ha reescalat:

- El temps està dividit pel temps mitjà de vida del mRNA:  $T = t / \text{temps\_promig}$
- La concentració de mRNA està reescalada per l'eficiència de traducció 'eff' (nombre de molècules traduïdes durant la vida mitjana del mRNA):  $m = M / \text{eff}$ .
- La concentració de proteïna repressora està reescalada per la  $K_m$ :  $p = P / K_m$ .

Els paràmetres donats al paper són:

- Transcripció amb el promotor reprimat (repressed promotor strength)  $5e-4 \text{ transcr} \cdot \text{promotor}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .
- Transcripció amb el promotor actiu (fully induced promotor strength)  $0.5 \text{ transcr} \cdot \text{promotor}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .
- Vida mitjana mRNA: 2 min.
- Vida mitjana proteïna: 10 min.
- $K_m$ : 40 monomers/cel·lula
- Coeficient de Hill: 2

A partir dels quals es poden deduir les altres quantitats.

El paper no dona els valors inicials de les variables que s'han escollit arbitràriament.

### Unitats del model:

- Temps: minuts
- Volum: femtolitres ( $10^{-15}$  litres.  $1 \mu\text{m}^3$ )
- Quantitat: # 'nombre de partícules'
- Velocitat de reacció: determinista

### Compartiments

Vcelula	1	fl
---------	---	----

## Llista d'espècies

Espècie	Valor inicial	unitats
LacI-proteïna	0	num
TetR-proteïna	0	num
cl-proteïna	0	num
LacI-mRNA	0	num
TetR-mRNA	20	num
cl-mRNA	0	num

## Paràmetres/Variables globals

Paràmetre/variable	valor	unitats
Tps_r	5e-4	transcr.promotor <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
Tps_a	0.5	transcr.promotor <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>
Pr_hl	10	min
mRNA_hl	2	min
Tr_eff	20	num/num
KM (monòmers per cèl·lula)	40	unitats · fl <sup>-1</sup>
n (coeficient de Hill)	2	unitats
A0	Tps_r·60	min <sup>-1</sup>
Adelta	(Tps_a- Tps_r)·60	min <sup>-1</sup>
mRNA_tv	$\frac{\text{mRNA\_hl}}{\ln(2)}$	min
kd_pr	$\frac{\ln(2)}{\text{Pr\_hl}}$	min <sup>-1</sup>
kd_mRNA	$\frac{\ln(2)}{\text{mRNA\_hl}}$	min <sup>-1</sup>
k_tl	$\frac{\text{Tr\_eff}}{\text{mRNA\_tv}}$	min <sup>-1</sup>
Alfa_min_tr	$\frac{\text{A0} \cdot \text{Tr\_eff} \cdot \text{Pr\_hl}}{\ln(2) \cdot \text{KM}}$	min <sup>-1</sup>
Alfa_delta_tr	$\frac{\text{Adelta} \cdot \text{Tr\_eff} \cdot \text{Pr\_hl}}{\ln(2) \cdot \text{KM}}$	min <sup>-1</sup>
beta	$\frac{\text{mRNA\_hl}}{\text{Pr\_hl}}$	adim.

On:

- ln(2), el logaritme neperià de 2 a COPASI s'escriu log(2).
- Tps\_r: Fortalesa del promotor reprimat (promoter strength repressed. transcripts/segon)
- Tps\_a: Fortalesa del promotor induït completament (promoter strength fully induced. transcripts/segon)
- A0: mínim transcripts/min
- Adelta: transcripts/min
- Pr\_hl: vida mitja d'una proteïna.
- mRNA\_hl: vida mitjana d'un mRNA.

- Tr\_eff: eficiència mitjana de traducció (proteïnes per transcript).
- mRNA\_hl: vida mitjana d'un mRNA (temps a reduir-se a la meitat)
- mRNA\_tv: temps de vida d'un mRNA (mitjana)
- alfa\_min\_tr: nombre de còpies de proteïna produïdes quan el repressor es en presència de quantitats saturants de repressor (promoter leakiness).
- alfa\_delta\_tr: valor que sumat a alfa\_min\_tr dona el màxim nombre de còpies de proteïna produïdes en absència de repressor.
- Beta: relació entre la velocitat de degradació del mRNA i les proteïnes (només per comprovar).

### Transcripció de cl

(->cl-mRNA)

Transcripció del codi de la proteïna repressora cl. Regulat pel repressor TetR.

Cinètica:

$$v = \frac{a\_min\_tr + a\_delta\_tr \cdot \frac{KM^n}{KM^n + (Prep \cdot Vcelula)^n}}{Vcelula}$$

On Prep és la concentració de proteïna repressora (TetR-proteïna).

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
a_min_tr	global A0	min <sup>-1</sup>
a_delta_tr	global Adelta	min <sup>-1</sup>
KM (monòmers per cèl·lula)	global KM	unitats · fl <sup>-1</sup>
n (coeficient de Hill)	global n	unitats

### Transcripció de LacI

(-> LacI-mRNA)

Transcripció del codi de la proteïna repressora LacI. Regulat pel repressor cl.

Cinètica:

$$v = \frac{a\_min\_tr + a\_delta\_tr \cdot \frac{KM^n}{KM^n + (Prep \cdot Vcelula)^n}}{Vcelula}$$

On Prep és la concentració de proteïna repressora (cl-proteïna).

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
a_min_tr	global A0	min <sup>-1</sup>
a_delta_tr	global Adelta	min <sup>-1</sup>
KM (monòmers per cèl·lula)	global KM	unitats · fl <sup>-1</sup>
n (coeficient de Hill)	global n	unitats

**Transcripció de TetR**

(-&gt; TetR-mRNA)

Transcripció del codi de la proteïna repressora TetR. Regulat pel repressor LacI.

Cinètica:

$$v = \frac{a_{\text{min\_tr}} + a_{\text{delta\_tr}} \cdot \frac{KM^n}{KM^n + (\text{Prep} \cdot V_{\text{celula}})^n}}{V_{\text{celula}}}$$

On Prep és la concentració de proteïna repressora (LacI-proteïna).

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
a_min_tr	global A0	min <sup>-1</sup>
a_delta_tr	global Adelta	min <sup>-1</sup>
KM (monòmers per cèl·lula)	global KM	unitats · fl <sup>-1</sup>
n (coeficient de Hill)	global n	unitats

**Traducció de cI**

(-&gt; cI-proteïna)

Traducció del codi de la proteïna repressora cI a partir del seu mRNA.

Cinètica:

$$v = k \cdot cI\_mRNA$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
k	global k_tl	min <sup>-1</sup>

**Traducció de LacI**

(-&gt; LacI-proteïna)

Traducció del codi de la proteïna repressora LacI a partir del seu mRNA.

Cinètica:

$$v = k \cdot LacI\_mRNA$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
k	global k_tl	min <sup>-1</sup>

**Traducció de TetR**

(-&gt; TetR-proteïna)

Traducció del codi de la proteïna repressora TetR a partir del seu mRNA.

Cinètica:

$$v = k \cdot TetR\_mRNA$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
k	global k_tl	min <sup>-1</sup>



### Degradació de la proteïna *cl*

(*cl*-proteïna →)

Degradació i/o dilució per creixement de la proteïna repressora *cl*.

Cinètica:

$$v = kd \cdot cI\_proteïna$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kd	global kd_pr	min <sup>-1</sup>

### Degradació de la proteïna *LacI*

(*LacI*-proteïna →)

Degradació i/o dilució per creixement de la proteïna repressora *LacI*.

Cinètica:

$$v = kd \cdot LacI\_proteïna$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kd	global kd_pr	min <sup>-1</sup>

### Degradació de la proteïna *TetR*

(*TetR*-proteïna →)

Degradació i/o dilució per creixement de la proteïna repressora *LacI*.

Cinètica:

$$v = kd \cdot TetR\_proteïna$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kd	global kd_pr	min <sup>-1</sup>

### Degradació del mRNA de *cl*

(*cl*-mRNA →)

Degradació i/o dilució per creixement del mRNA de la proteïna repressora *cl*.

Cinètica:

$$v = kd \cdot cI\_mRNA$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kd	global kd_mRNA	min <sup>-1</sup>

### Degradació del mRNA de *LacI*

(*LacI* -mRNA →)

Degradació i/o dilució per creixement del mRNA de la proteïna repressora *LacI*.

Cinètica:

$$v = kd \cdot LacI\_mRNA$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
kd	global kd_mRNA	min <sup>-1</sup>

## Degradació del mRNA de TetR

(TetR-mRNA →)

Degradació i/o dilució per creixement del mRNA de la proteïna repressora TetR.

Cinètica:

$$v = k_d \cdot \text{TetR\_mRNA}$$

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
$k_d$	global $k_d$ _ mRNA	$\text{min}^{-1}$

## Constants de temps

$$\int \frac{dx}{ax+b} = \frac{1}{a} \ln(ax+b)$$

Desaparició d'un component proporcional a la quantitat que n'hi ha

$$\frac{d(N)}{dt} = -k_d \cdot N$$

$$\int_{N_{t(0)=0}}^{N_{t(f)}} \frac{1}{N} dN = -k_d \cdot \int_{t=0}^t dt$$

$$[\ln(N)]_{N_0=0}^N = -k_d (t - t_0) = -k_d t$$

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k_d t$$

$$\frac{N}{N_0} = e^{-k_d t}$$

$$N = N_0 \cdot e^{-k_d t} \quad \text{tau } \tau = \frac{1}{k_d} \quad \begin{array}{l} \text{Lifetime: Temps de} \\ \text{vida mitja} \\ \text{Mitjana de temps} \\ \text{que una partícula} \\ \text{existeix} \end{array}$$

Temps de reducció a la meitat (half life)

$$\frac{1}{2} N_0 = N_0 \cdot e^{-k_d t_d}$$

$$N_0 = 2 \cdot N_0 \cdot e^{-k_d t_d}$$

$$\frac{N_0}{2 \cdot N_0} = e^{-k_d t_d} =$$

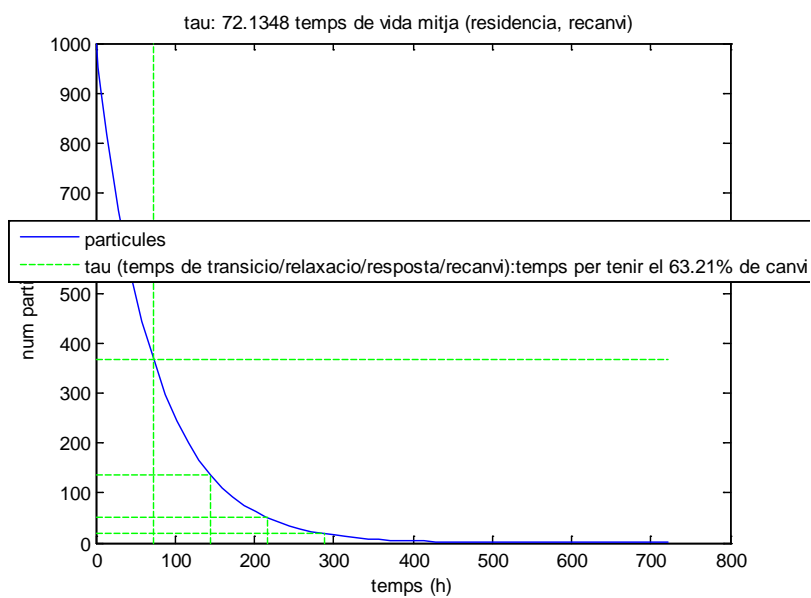
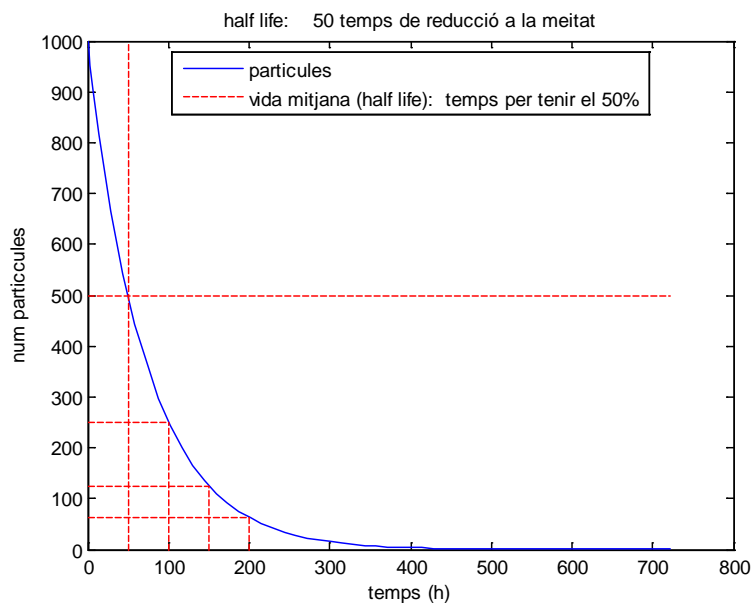
$$\frac{1}{2} = e^{-k_d t_d}$$

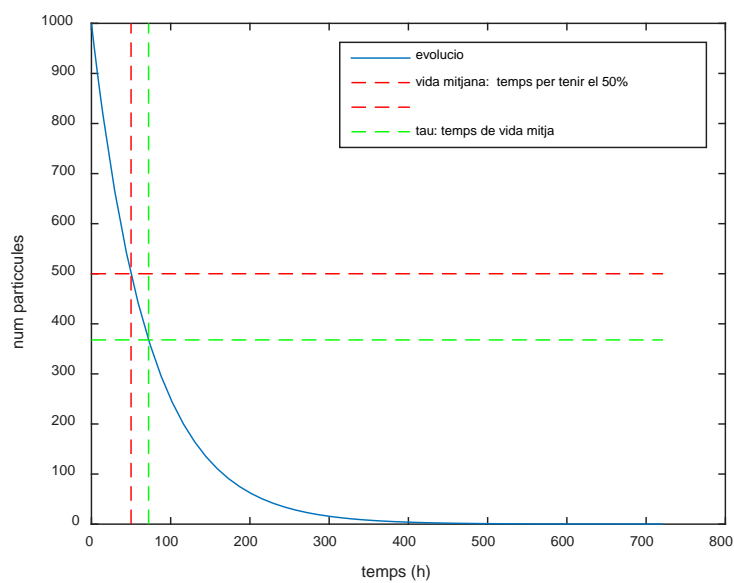
$$\ln\left(\frac{1}{2}\right) = -k_d t_d$$

$$\ln(1) - \ln(2) = -k_d t_d$$

$$0 - \ln(2) = -k_d t_d$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{k_d}$$





-----