

Regulierte Zell-Zell Variation

Özgür Demir #3802547

14. Februar 2006

Hintergrund

In der Vergangenheit gab es schon viele Experimente, die mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen, Zell-Zell Variationen in der Genexpression untersucht haben. So wurden z.B. genetisch identische Zellen auf Zell-Zell Variationen hin untersucht, indem die Korrelation der Expression von zwei unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen bestimmt wurde, die beide von dem selben Promoter gesteuert wurden. Hierbei kam man zu dem Ergebnis, dass Zell-Zell Variationen durch zwei Faktoren beeinflusst werden. Zum einem durch stochastische Fluktuationen, die bei der Expression jedes Reporter-Gens auftreten, so genanntes *intrinsisches Rauschen*. Zum anderen durch Unterschiede im Vorhandensein von zellulären Komponenten, die für die Genexpression zuständig sind (Ribosomen, Ploymerase II etc.), so genanntes *extrinsisches Rauschen*.

In dem im September 2005 in der Fachzeitschrift Nature erschienenem Paper *Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system*, von Alejandro Colman-Lerner et al., wurde speziell der *Output* des Pheromon Signalweges der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* auf Zell-Zell Variationen hin untersucht.

Abbildung 1 veranschaulicht den Signalweg. In haploiden Zellen des Paarungstyps α , leitet α -Faktor (ein vom Paarungstyp α sekretiertes Pheromon), eine G-Protein gekoppelte MAP Kaskade ein, die zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors *Ste12* führt.

Die Idee der Autoren war es, die Pheromon induzierte Expression von fluoreszierenden Proteinen zu untersuchen. Unterschiede in der optischen Signalstärke der Proteine würden dann Rückschlüsse auf die Signalübertragung und die Genexpression zulassen.

Zur Durchführung des Experimentes wurden zwei verschiedene Hefezellen mit cyan fluoreszierendem Protein (kurz CFP) und gelb fluoreszierendem Protein (kurz YFP) gezüchtet:

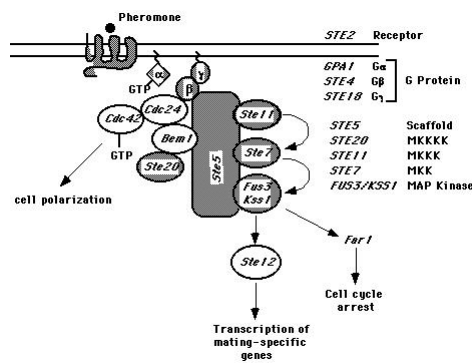


Abbildung 1: Überblick über den α -Faktor Pheromon Signalweg der Hefezelle

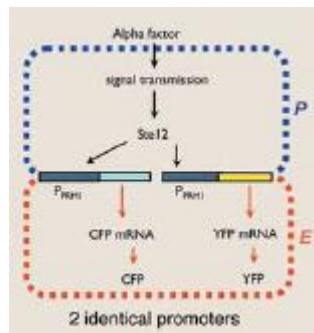


Abbildung 2: Veranschaulichung einer Hefezelle, bei der zwei Reporter-Gene durch denselben, α -Faktor abhängigen Promoter gesteuert werden.

1. YFP und CFP mit dem selben α -Faktor abhängigem Promoter (s. Abb. 2)
2. YFP mit α -Faktor abhängigem Promoter und CFP mit α -Faktor unabhängigem Promoter (s. Abb. 3)

Zur Interpretation des Experimentes wurde von den Experimentatoren ein analytisches Framework entwickelt. Hierzu wurde der komplette α -Faktor-Pheromon-Signalweg als ein aus 2 zusammenhängenden Subsystemen zusammengesetztes System betrachtet (s. Abb. 4):

1. α -Faktor-Signalweg-Subsystem
2. Genexpressions-Subsystem

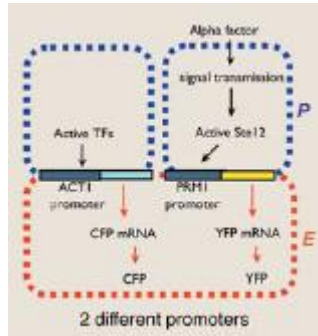


Abbildung 3: Veranschaulichung einer Hefezelle, bei der ein Reporter-Gen durch einen α -Faktor abhängig und ein weiteres durch einen α -Faktor unabhängig Promoter gesteuert werden.

Das α -Faktor-Signalweg-Subsystem beinhaltet alle Schritte, die zur Aktivierung der Transkription führen. Input des Subsystems ist eine Menge an α -Faktor. Der Output hängt von der Anzahl Transkriptionsfaktoren ab, die nach einer bestimmten Zeit an die DNA binden.

Für eine individuelle Zelle i , wurde der Signalweg-Output definiert als $P_i \Delta T$, wobei P_i der gemittelte Output pro Zeiteinheit ist. P_i setzt sich zusammen aus dem Erwartungswert des Output L_i und den stochastischen Fluktuationen λ_i die in P auftreten. Daher gilt:

$$P_i = L_i + \lambda_i$$

Das Genexpressions-Subsystem hingegen beinhaltet alle Schritte von der Transkriptions-Initiation bis zur Akkumulation der exprimierten Proteine. Für eine individuelle Zelle i , ist der Genexpressions-Output definiert als E_i . E_i setzt sich zusammen aus dem Erwartungswert von E_i , G_i und den stochastischen Fluktuationen γ_i , die in E_i auftreten. Daher gilt:

$$E_i = G_i + \gamma_i$$

In jedem Subsystem wurde dabei zwischen 2 Quellen der Variation unterschieden. Zum einen waren dies die stochastischen Fluktuationen, zum anderen die Zell-Zell Unterschiede in der sogenannten „Kapazität“.

Stochastische Fluktuationen entstehen durch spontane Unterschiede im Auftreten und Timing von diskreten, chemischen Reaktionen.

Die „Kapazität“ einer Zelle hängt hingegen von der Anzahl, Lokalisation und Aktivität der Proteine ab, die

$$\eta^2(y) = \eta^2(L) + \eta^2(\lambda) + \eta^2(\gamma) + \eta^2(G) + 2p(L, G)\eta(L)\eta(G)$$

- $\eta^2(L)$ = Variation der pathway power
- $\eta^2(\lambda)$ = Übertragungs - Rauschen
- $\eta^2(G)$ = Variation der Expressions- Kapazität
- $\eta^2(\gamma)$ = Expressions- Rauschen intrinsisches - Rauschen
- $p(L,G)$ = Korrelationskoeffizient zwischen L und G

Wäre man nach den oben getroffenen Annahmen der Autoren in der Lage, in der Zeit zurück zu gehen, um ein und dieselbe Zelle mehrmals zu stimulieren (d.h. es herrscht immer derselbe Ausgangsstatus), so würde der gemittelte System-Output dem Erwartungswert des Output entsprechen. Dieser wäre abhängig von der Signalweg- und Expressions-Kapazität und jeglicher Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen würde durch die oben genannten zufälligen stochastischen Fluktuationen hervorgerufen werden.

Dasselbe Experiment auf eine andere Zelle angewandt, könnte einen anderen Mittelwert bzw. Erwartungswert des Outputs ergeben. Dies wäre dann ein Indiz für Zell-Zell Unterschiede in den Kapazitäten der beiden Subsysteme.

Versuche mit den konstruierten Hefezellen des Typs I (CFP und YFP gesteuert durch den gleichen α -Faktor abhängigen Promoter) würden Rückschlüsse auf das Expressions-Rauschen zulassen, da beide Gene vom demselben Signalweg angesteuert werden und somit die gleiche Menge an Transkriptionsfaktoren an die Promotoren binden kann.

Versuche mit den konstruierten Hefezellen des Typs II (CFP / YFP gesteuert durch unterschiedliche Promoter) würden Rückschlüsse auf das Expressions- Rauschen plus dem Übertragungs - Rauschen zulassen, da in diesem Fall beide Gene durch unterschiedliche Signalwege gesteuert werden.

Ergebnisse

Zur Durchführung des Experimentes wurden die konstruierten Hefezellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von α -Faktor stimuliert und anschließend in gewissen Zeitabständen die Fluoreszenz gemessen.

Hierbei traten große Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen beim Gesamt - Output auf. Die Oberen 5% zeigten einen ca. 4-fach höheren Output als die unteren 5% (s. Abb. 5).

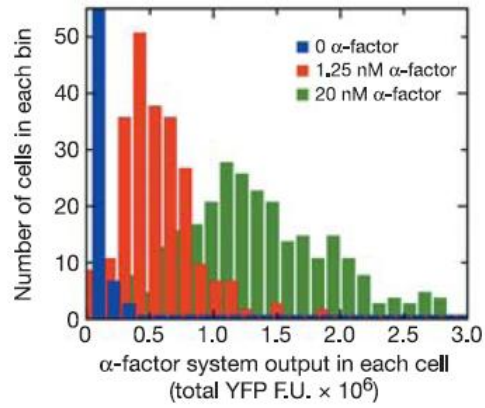


Abbildung 5: Verteilung des Gesamt-Output bei unterschiedlichen α -Faktor Konzentrationen.

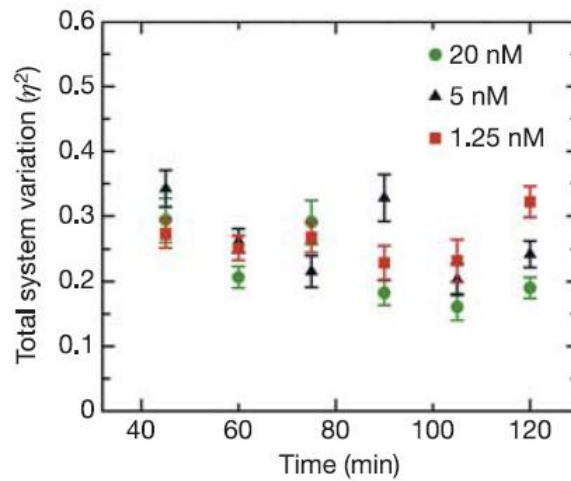


Abbildung 6: Variation des Gesamt-Output über die Zeit, für unterschiedlichen α -Faktor Konzentrationen.

Die Variation des Gesamt-Output hingegen, blieb über die Zeit der Stimulation relativ konstant (s. Abb. refvariation).

Aus beiden Beobachtungen folgerten die Experimentatoren, dass der Großteil der Variation, auf Zell - Zell Unterschieden beruht, die schon vor dem Experiment vorhanden waren.

Um die Auswirkungen des Zellzyklus zu untersuchen, wurde in den konstruierten Zellen die Cyclin abhängige Kinase Cdc 28, welche für den Start der Zellteilung zuständig ist, durch eine gentechnisch manipulierte Variante, dem (*Cdc-28-as2*)²¹ ersetzt. (*Cdc-28-as2*)²¹ ist sensitiv für den Inhibitor „1-NM-PPI“, d.h. durch die Zugabe von „1-NM-PPI“ kann der Zellzyklus im G2/M Übergang gestoppt werden.

Mit „1-NM-PPI“ stimulierte Zellen zeigten eine um 45% gesunkene Variation des Gesamt-Output für Gene mit einem α -Faktor abhängigen Promoter. In Hefe-Zellen des Typs II, in denen das Cyan fluoreszierende Protein CFP durch einen α -Faktor unabhängigen Promoter gesteuert wurden, wurde die CFP Variation jedoch nicht beeinflusst. Hieraus folgerten die Autoren, dass der Zellzyklus nur das Signalweg - Subsystem beeinflusst, aber nicht das Expressions-Subsystem.

Die Experimentatoren beobachteten interessanterweise, dass bei hohen α - Faktor Konzentrationen der Signalweg-Output weniger variierte als bei niedrigen Konzentrationen. Die Variation des Gesamt-Output hingegen blieb gleich, obwohl man erwarten würde, dass sie sich mit der erhöhten Variation des Signalweges summiert. Diese Beobachtung erklärten sich die Autoren mit einer negativen Korrelation zwischen der Signalweg- Kapazität (G) und Expressions-Kapazität (L). Somit sind Zellen trotz großer Unterschiede in der Expressions-Kapazität in der Lage, präzise auf eine Pheromon Stimulation zu antworten.

Zusammenfassung

In dem besprochenem Paper wurde gezeigt, dass der Grossteil der Variation zwischen den Zellen auf Unterschiede in den sog. Signalweg- und Expressions-Kapazitäten zurück zu führen ist. Nur wenig Variation wird durch zufällige, chemische Fluktuationen während der Gentranskription und -translation hervorgerufen.

Zudem wurde gezeigt, dass die Signalweg- und Expressions- Kapazität miteinander negativ korrelieren. Dies führt, trotz großer Unterschiede in der Expressionskapazität, zu einer präziseren Antwort einer Zelle auf eine Pheromon-Stimulation.