

Transient responses and adaptation to steady state in a eukaryotic gene regulation system

Christian Hoffmann

Februar 2005

Zusammenfassung

Das Verständnis der Struktur von eukaryotischen Genregulationssystemen ist wichtig für viele Bereiche der Biologie. In bisherigen Studien wurden lediglich kurzzeitige Eigenschaften untersucht, das langfristige Verhalten dieser Netze unter kontrollierten Bedingungen ist jedoch unabdingbar für das Verstehen der Dynamiken innerhalb solcher Netzwerke. In dem hier vorgestellten Paper von E. Braun und N. Brenner hat man daher die langfristigen adaptiven Verläufe in dem gut untersuchten GAL-System der Hefe *S. cerevisiae* untersucht. Als Ergebnis zeigte sich, daß die bisher beobachteten Effekte von Änderungen der Umweltbedingungen nur kurzfristig auftreten. Langfristige Beobachtungen zeigen, daß nach gewisser Zeit immer ein stabiler Zustand erreicht wird.

1 Einleitung

Groß angelegte Untersuchungen haben ergeben, daß genetische Regulationsnetzwerke sehr komplex und multifunktional sind. Daher müssen neben der eigentlichen Struktur der Netzwerke auch die adaptiven Verhaltensweisen untersucht werden.

Letzte Untersuchungen der genomweiten Streßantwort in Hefe [1] haben gezeigt, daß die Zellen nach einer spezifischen Antwort auf eine Veränderung der Umweltbedingungen ihre Genexpression auf einen neuen Steady State einstellen. Dieser stabile Zustand ist dem vorher vorhandenen stabilen Zustand ähnlich. Starke globale Änderungen in der Genexpression hingegen sind nur sehr kurzfristig.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß spezifische Zellantworten auch unter normalen Bedingungen ohne Streß aus einem kurzfristigen Anteil und einem robusteren stabilen Zustand bestehen. Die Absicht der Autoren war es daher, die adaptive Dynamik in gut untersuchten Regulationssystemen unter normalen, streßfreien Bedingungen zu erforschen.

Für solche Untersuchungen ist es essentiell, über lange Zeiträume gleichbleibende Umweltbedingungen aufrecht erhalten zu können. Zu diesem Zweck wird ein Chemostat verwendet, da es hiermit möglich ist, gleichbleibende Gegebenheiten zu schaffen.

Ganze Zellpopulationen lassen sich am besten durch die Verteilung einer Eigenschaft charakterisieren. Der simple Mittelwert ist hier weniger geeignet, da auch in klonierten Populationen Zellindividualität eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt. Um auszuschließen, daß die beobachteten Anpassungen durch genetische Veränderungen realisiert wurden, wird die Länge der einzelnen Experimente auf weniger als 50 Generationen beschränkt. In dieser Zeit sind keine genetisch basierten Anpassungen zu erwarten [2].

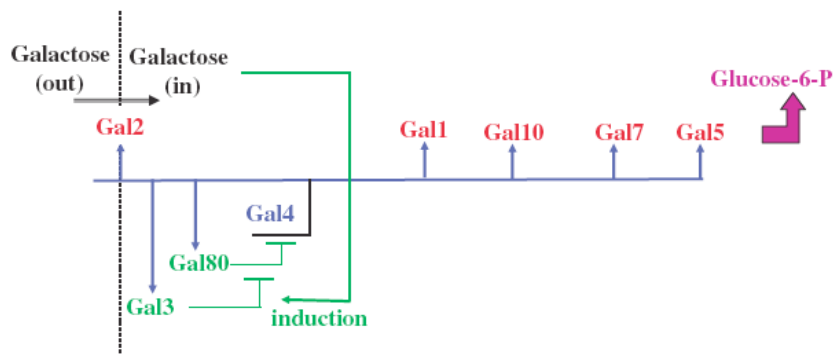


Abbildung 1: Schematische Darstellung des GAL-Netzwerks in *S. cerevisiae*

Als zu untersuchendes System wurde das gut untersuchte GAL-System in *Saccharomyces cerevisiae* gewählt, welches verantwortlich für den Galaktose-Metabolismus in Anwesenheit von Galaktose als Kohlenstoff-Quelle ist (siehe Abbildung 1). Um die Veränderungen sichtbar zu machen, wurde gfp downstream von GAL10, sowohl im Plasmid als auch im Chromosom eingesetzt. Das von GAL-Promotern exprimierte gfp ist stark korreliert mit der Aktivität der

entsprechenden GAL-Gene [3]. Zusätzlich zur Messung der Fluoreszenz wurde ebenfalls das mRNA-Transkriptionslevel von gfp und verschiedener GAL-Gene mit Hilfe von real-time PCR untersucht.

In früheren Untersuchungen wurde die Reaktion von Hefe auf eine Veränderung der Umweltbedingungen nur über einen relativ kurzen Zeitraum von 14 Stunden beobachtet. Innerhalb dieses Zeitraums können sich jedoch nur flüchtige Effekte zeigen. Langfristige Auswirkungen treten erst nach einer längeren Zeitspanne auf. In einer Studie zur genomweiten Streßantwort in Hefe wurde festgestellt, daß die starken Änderungen nur für kurze Zeit auftreten. Nach längerer Zeit stellt sich ein stabiler Zustand ein, der nur wenig von dem vor der Veränderung der Umweltbedingungen herrschenden abweicht.

2 Material und Methoden

Um über längere Zeiträume gleichbleibende Kulturbedingungen zu erreichen, wird für die meisten Experimente ein Chemostat [2, 4] verwendet. Dieses ermöglicht eine kontinuierliche Zufuhr neuer Nährstoffe. Auch Abfälle und überflüssige Zellen fließen einfach ab, sodaß diese die Population nicht weiter beeinflussen können.

Ein weiterer Vorteil bei Verwendung des Chemostats ist die Möglichkeit, die Wachstumsrate und die Zellanzahl getrennt von einander regeln zu können. Die Wachstumsrate wird hierbei über den Fluß der Nährstoffe durch das Medium geregelt. Die Zellanzahl wird durch die Konzentration des begrenzenden Nährstoffs gesteuert. Um möglichst gleichbleibende Bedingungen zu erreichen, wird das Medium mit Hilfe einer Photozelle überwacht, welche die optische Dichte mißt. Abhängig von der optischen Dichte kann nun die Nährstoffzufuhr automatisch geregelt werden.

Zusätzlich zum Chemostat kommt auch das Verfahren des Serial-Dilution Batch [5] zum Einsatz. Hierbei wächst eine Hefepopulation auf einem Medium und wird bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 auf ein frisches Medium übertragen. Im Gegensatz zum Chemostat bietet das Serial-Dilution Batch Verfahren daher keine Kontinuität, denn bei jedem Übertrag auf ein neues Medium ändern sich die Bedingungen. Mit einem Chemostat erhält man also für diese Untersuchungen die genaueren Resultate.

Zur Markierung der transkribierten Gene wurde das grün fluoreszierende Protein (gfp) eingesetzt [6]. Dieses aus *Aequorea victoria* bekannte Protein besitzt durch seine Serin-, Glycin- und Tyrosin-Reste die Fähigkeit zu fluoreszieren. Die Anregungsmaxima liegen bei 395nm und 475nm, das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 509nm. Für die Untersuchung wurde das gfp-Gen hinter GAL10 sowohl im Plasmid als auch im Chromosom eingebaut.

Durch die Markierung mit gfp ist es im Folgenden möglich, die Zellen mit Hilfe des fluorescence activated cell-sorting (FACS) zu sortieren. Hierzu wird die Lösung mit den Zellen durch eine Kapillare gesaugt und von einem Laser angestrahlt. Dadurch entstehen zum einen Streulicht und besonders bei den mit gfp markierten Zellen Fluoreszenzimpulse. Je nach Fluoreszenzlevel werden die Zellen von einem Computer mit einer elektrischen Ladung markiert. Durch diese Ladung können die verschiedenen Zellen in unterschiedliche Tubes einsortiert werden.

3 Ergebnisse

Im ersten Versuch wurde eine Population von Hefezellen von einem Medium mit 2% Galaktose in ein Medium mit 2% Glukose als einzige Kohlenstoffquelle übertragen. Hierzu wurde die Methode des Serial-Dilution Batch angewendet. In dem Galaktose-Medium ließ man die Population bis zu einer optischen Dichte von 0,5 heranwachsen. Danach wurde die Population in ein Glukose-Medium übertragen. Sobald die optische Dichte hier über 0,5 anstieg, wurde in ein neues Glukose-Medium verdünnt. Mit Hilfe des Fluoreszenzsignals des gfp wurde die Aktivität des GAL-Netzwerks gemessen. Abbildung 2a zeigt den Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzsignale.

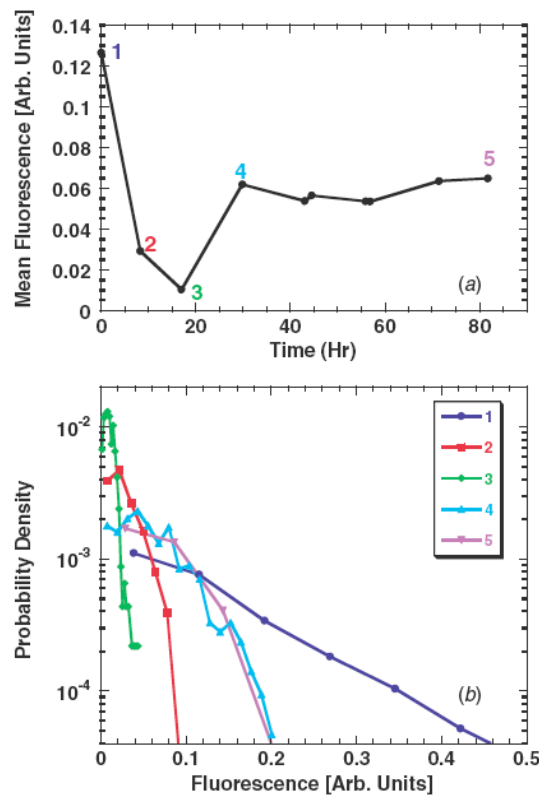


Abbildung 2: Hemmung und Entthemung durch Glukose in einem Serial-Dilution Batch Experiment

Bei $t = 0$ wurde das Medium gewechselt. Man sieht eine starke Abnahme der Aktivität innerhalb der ersten 15 Stunden bis auf das Niveau der Autofluoreszenz von Hefe. Dies entspricht den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente. Nach dieser Zeitspanne steigt die Aktivität jedoch wieder und pegelt sich ab ca. $t = 30$ auf einem neuen stabilen Zustand ein. Dies ist bemerkenswert, da diese exprimierten Gene einzig für den Galaktosestoffwechsel benötigt werden, jedoch ist keine Galaktose anwesend. Diese erneute Zunahme wird nicht durch eine Abnahme der Glukosekonzentration verursacht, da auch nach der Entthem-

mung noch 1% Glukose vorhanden sind. In einem Kontrollexperiment mit $\frac{1}{2}$ % Glukose zeigte sich ein identisches Verhalten. Der erneute Anstieg liegt demnach nicht in einem Defizit von Glukose begründet [7, 8], sondern in Unterschieden in der Transkriptionsregulation.

Abbildung 2b basiert auf denselben Daten wie 2a, jedoch wurde hier die Verteilungsdichte gegen die Fluoreszenz aufgetragen, was einem Histogramm entspricht. Diese Darstellungsform wird bevorzugt, da der Mittelwert weniger aussagekräftig ist als die Verteilung der Population. Auch hier sieht man, daß der neue stabile Zustand geringer ist als der in Galaktose erreichte Wert. Durch Rückübertragung auf Galaktose konnte jedoch wieder der ursprüngliche Wert erhalten werden.

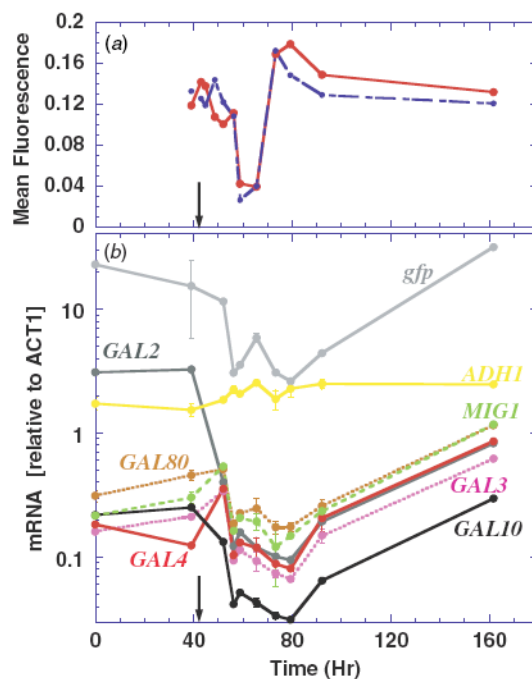


Abbildung 3: Hemmung und Entthemung durch Glukose in Chemostat Experiment

Dasselbe Experiment wurde in einem Chemostat durchgeführt, da hier über lange Zeitspannen gleichbleibende Bedingungen vorherrschen. Die Ergebnisse hiervon sind in Abbildung 3a dargestellt. Zu dem mit dem Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkt wurde die Population von einem 2%igen Galaktose- in ein 2%iges Glukosemedium übertragen. Die erhaltenen Ergebnisse sind nahezu identisch mit denen aus dem vorangegangenen Experiment.

Abbildung 3b zeigt das mRNA-Transkriptionslevel verschiedener Gene des GAL-Netzwerks, welche mit Hilfe von real-time PCR bestimmt wurden. Es ist gut zu erkennen, daß *GAL2* und *GAL10* stark beeinflusst werden. Auch *GAL4*, *GAL3* und *GAL80* zeigen ein ähnliches Verhalten wie *GAL2* und *GAL10*. Die Reaktion von *gfp* verläuft leicht zeitversetzt, läßt jedoch ebenso eine Hemmung erkennen. Diese entspricht ungefähr dem Verlauf der mRNA-Transkription.

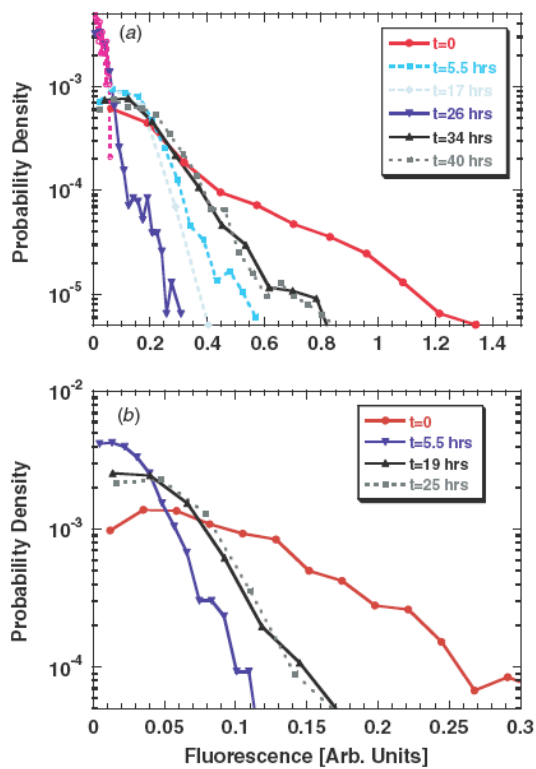


Abbildung 4: Hemmung und Enthemmung durch Glukose in Chemostat Experiment (Verteilungsdichte)

In Abbildung 4a sieht man die Ergebnisse desselben Experiments wie schon in Abbildung 3a, jedoch diesmal in Form der Verteilungsdichte. Obwohl ein anderes Verfahren als im ersten Experiment angewendet wurde, sind die Ergebnisse nahezu identisch (vgl. Abbildung 2b).

Ein anderer Hefestamm in einem phosphatlimitierten Chemostat zeigt das in Abbildung 4b abgebildete Verhalten. Die Werte sind beinahe identisch zu Abbildung 4a. Die absoluten Werte sind geringer, da der im phosphatlimitierten Chemostat mögliche Stoffwechsel schwächer ist.

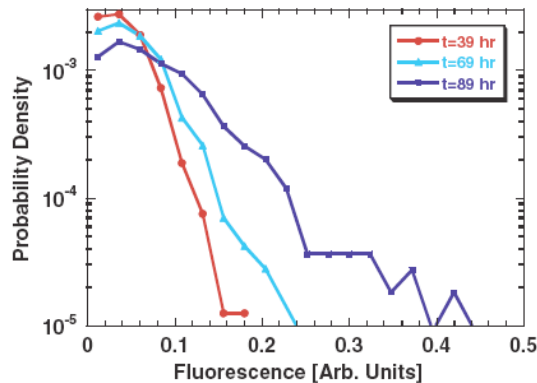


Abbildung 5: Enthemmung in 2%igem Glukosemedium

Um die Auswirkungen des Mediums zu untersuchen, in dem die Zellen heranwachsen, hat man die Zellen von Anfang an in Glukose aufwachsen lassen (Abbildung 5). Diese Zellen kamen niemals in Kontakt mit Galaktose, im Gegensatz zu den Zellen der vorangegangenen Experimente, in denen die Hefezellen vor dem Wechsel in Glukose in einem Galaktosemedium waren. Auch bei diesen Zellen, die nur mit Glukose in Kontakt kommen, ist eine Hemmung und Entthemmung zu beobachten. Diese verlaufen jedoch langsamer als beim Wechsel von Galaktose in Glukose. Hierdurch wird klar, daß die Zellen ein Gedächtnis besitzen. Eine frühere Aussetzung zu Galaktose beschleunigt die Entthemmung und Anpassung an neue Umweltbedingungen.

Eine überraschende Erkenntnis ergab sich bei dem Versuch, die Zellen langfristig in einem Galaktosemedium zu belassen. Bisher wurde angenommen, daß hierbei die Genexpression auf einem konstant hohen Niveau liegen würde. Es zeigte sich jedoch, daß nur vorübergehend eine sehr starke Expression vorherrscht. Nach einiger Zeit ist ein spontaner Übergang zu einem stabilen Zustand zu erkennen (Abbildung 6a). In mehreren Experimenten wurde dasselbe Verhalten festgestellt, es konnte aber kein genauer Zeitpunkt festgestellt werden, an dem der Übergang stattfindet. Ein Übergang von der niedrigeren zur hohen Expression konnte nicht beobachtet werden. Abbildung 6b zeigt das gleiche Experiment in einem Stickstoff-limitierten Chemostat. Bei einer Population, die sich konstant in einem 2%igem Galaktosemedium aufhält, ist ein Übergang von der hohen zur niedrigeren Genexpression zu beobachten. Wechselt man nun das Medium zu $\frac{1}{2}$ % Galaktose, so steigt die Genexpression wieder auf das ursprüngliche Niveau an. Diese Vorgänge gehen schnell vonstatten und sind reversibel. Daher können Genmutationen hierfür nicht verantwortlich sein.

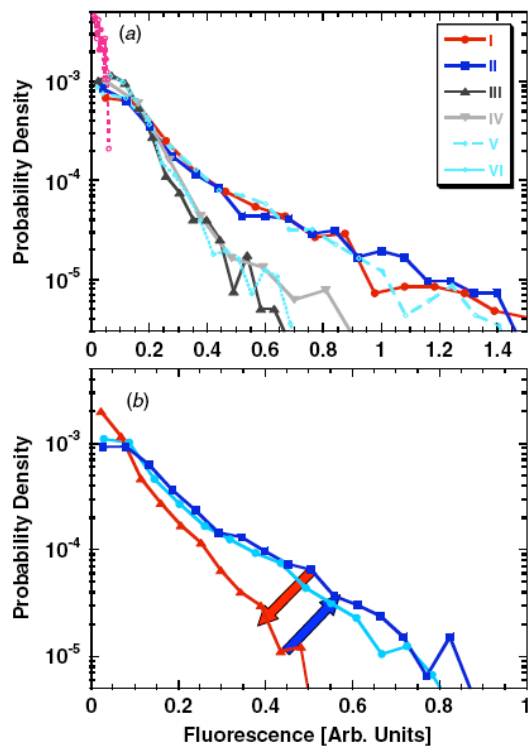


Abbildung 6: Spontaner Übergang in galaktosereichem Medium und der umgekehrte Übergang unter galaktosebegrenzten Bedingungen

Sowohl bei einem Wechsel von Galaktose zu Glukose als auch bei konstantem Aufenthalt in einem Galaktosemedium wird ein identischer stabiler Zustand angenommen (rot bzw. blau in Abbildung 7). Im Galaktosemedium ist die anfängliche Genexpression höher (rot gestrichelt), erreicht jedoch nach kurzer Zeit den stabilen Zustand (roter Pfeil). Auch beim Wechsel von Galaktose zu Glukose wird nach kurzfristiger Hemmung (blau gestrichelt) der stabile Zustand erreicht (blauer Pfeil). Der stabile Zustand scheint daher unabhängig von der Kohlenstoffquelle zu sein.

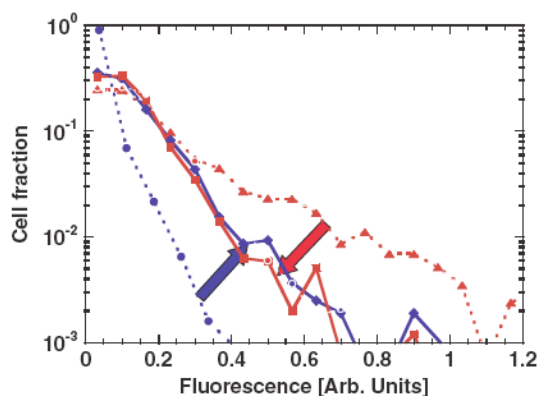


Abbildung 7: Zusammenfassung der Übergänge in einen robusten stabilen Zustand

4 Fazit

Bisher wurde angenommen, daß das GAL-System in Hefe zwischen einem aktiveren Zustand bei Anwesenheit von Galaktose und einem weniger aktiven Zustand bei Anwesenheit von Glukose wechselt. Braun und Brenner haben mit ihren längerfristigen Untersuchungen gezeigt, daß diese Beobachtungen nur kurzfristig zutreffen. Über längere Zeiträume nimmt die Genexpression unabhängig von der anwesenden Kohlenstoffquelle einen stabilen Zustand an. Ermöglicht wurden diese Erkenntnisse durch eine längere Beobachtung der Genexpression unter gleichbleibenden Bedingungen. Letztere wurden durch den Einsatz des Chemostat erreicht, welches im Gegensatz zum sonst verwendeten Serial-Dilution Batch Verfahren konstante Bedingungen auch über sehr lange Zeiträume zuläßt.

Literatur

- [1] A.P. Gasch et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 11:4241–57, 2000.
- [2] C. Paquin and J. Adams. Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature*, 302(495), 1983.
- [3] S.R. Biggar and G.R. Crabtree. Cell signaling can direct either binary or graded transcriptional responses. *EMBO J.*, 20:3167, 2001.
- [4] A. Novick and L. Szilard. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 36:708, 1950.
- [5] R.E. Lenski and M. Travisano. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91:6808, 1994.
- [6] R. Helm, A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien. Improved green fluorescence. *Nature*, 373:663, 1995.
- [7] C.J. Brown, K.M. Todd, and R.F. Rosenzweig. Multiple duplications of yeast hexose transport genes in response to selection in a glucose-limited environment. *Mol. Biol. Evol.*, 15:931, 1998.
- [8] T.L. Ferea, D. Botstein, P.O. Brown, and R.F. Rosenzweig. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96:9721, 1999.