

Robustes Design - das Flagellensystem von E.Coli

Ben-Fillippo Krippendorff

Zusammenfassung

Das Signaltransduktionsnetz zur Steuerung der Chemotaxis bei E.Coli zeigt alle Eigenschaften eines robusten Designs - also eine Netzwerktopologie, die auch bei Veränderungen der Proteinkonzentrationen im Netzwerk das Input-Output Verhalten beibehält. Die Robustheit gilt jedoch nur für Störungen, bei denen das relative Verhältnis der Proteinkonzentrationen erhalten bleibt (z.B. wenn alle Proteine des Signaltransduktionsnetzwerkes gleich viel überexprimiert werden). Wird dieses Verhältnis gestört, ändert sich das Input-Output Verhalten des Netzwerkes und die Fähigkeit der E.Coli Zelle zur Chemotaxis sinkt. Das Signaltransduktionsnetz der Chemotaxis in E.Coli zeigt somit wie unterschiedlich extrinsisches und intrinsisches Rauschen in der Genexpression die Funktionsweise von Signaltransduktionsnetzwerken beeinflussen können.

1 Einleitung

Mit Hilfe des Chemotaxis Signaltransduktionsnetzwerkes ist es möglich das Verhalten eines Netzwerkes bei Variation von Parametern des System zu studieren. Hierfür eignet sich das Chemotaxis System von E.coli. im Besonderen, da hier durch eine Erhöhung oder Erniedrigung der Konzentration in der Umgebung der Zelle ein extrazellulären Input in das System geschaffen werden kann, der eine Richtungsänderung und somit einen gut zu messenden Output zur Folge hat. Anschließend werden die Arbeiten von Alon et al. [1] und Kollmann et al. [2] vorgestellt. Diesen Arbeiten beschäftigen sich mit der Frage, wie sich dieses Input-Output Verhalten verändert, wenn sich die Proteinkonzentrationen im Netzwerk ändern. Um die Ergebnisse dieser beiden Arbeiten zu verstehen, werden im zweiten und dritten Teil dieser Zusammenfassung die Eigenschaften dieses Signaltransduktionsnetzwerkes vorgestellt. Anschließend wird im vierten und fünften Teil gezeigt, welche Erkenntnisse durch Störung dieses Systems gewonnen werden können.

2 Chemotaxis bei E.coli

Die Chemotaxis von E.Coli beruht auf einem relativ einfachen Verhalten. Normalerweise bewegt sich die Zelle indem sich 5 bis 8 Flagellen während ihrer Rotation verbinden und zusammen die Zelle vorwärts treiben. Sobald die Zelle einen Anstieg der Konzentration eines für sie positiven Stoffes (*attractant*) bzw. die Verminderung der Konzentration eines für sie schädlichen Stoffes (*repellent*)

in der aktuellen Bewegungsrichtung registriert, erniedrigt sich die Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel. Ein Richtungswechsel wird durch eine Veränderung der Drehung der Flagellen verursacht. Anstatt der normalen Rotationsrichtung im Uhrzeigersinn drehen sich ein oder mehrere Flagellen gegen den Uhrzeigersinn. Dies erzeugt ein Taumeln und die Zelle ändert ihr räumliche Ausrichtung. Diese Rotationsänderung einer Flagelle wird durch die phosphorylierte Form des Protein *CheY* ($CheY+p$) erzeugt, das an die Flagelle bindet. Eine höhere Konzentration von $CheY+p$ führt somit zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Richtungsänderung. Die Konzentration von $CheY+p$ wird durch die zwei Enzyme *CheA* und *CheZ* reguliert. Während *CheZ* $CheY+p$ dephosphoryliert, phosphoryliert *CheA* *CheY*. Die Kinase *CheA* ist an einen Rezeptor gebunden und kann in einem aktiven und einem inaktiven Zustand vorliegen. Eine Bindung eines *attractant* erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass *CheA* in einem inaktiven Zustand vorliegt und erniedrigt die Wahrscheinlichkeit, dass $CheY+p$ ein Taumeln auslösen kann (siehe *Abbildung 1*).

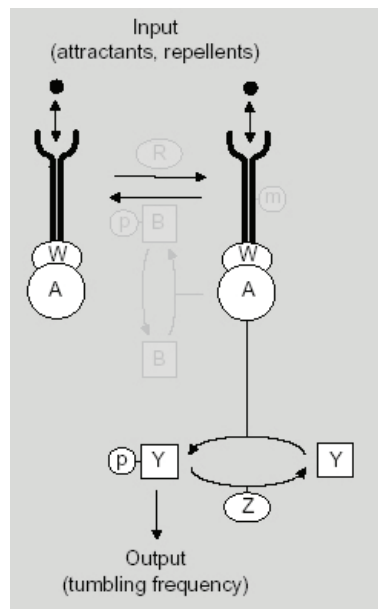


Abbildung 1: Das Chemotaxis Signaltransduktionsnetzwerk von E.Coli. Eine Bindung eines *attractant* erniedrigt die Aktivität der Kinase *CheA*. Die Konzentration von $CheY+p$ nimmt ab, da es von *CheZ* dephosphoryliert wird. Die niedrigere Konzentration von $CheY+p$ verursacht eine niedrige Wahrscheinlichkeit einer Rotation der Flagellen gegen den Uhrzeigersinn und somit für eine Richtungsänderung.

3 Adaption des Netzwerks

Anders als z.B. Hefezellen kann E.Coli einen Gradienten nicht durch einen Vergleich der Konzentrationen an verschiedenen Abschnitten der Membran bestimmen. Dazu ist ein E.Coli Zelle zu klein [3, 4].

Im zuvor beschriebenen Model beeinflusst nur die absolute Konzentration des Stoffes am Rezeptor die Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel. Ein Absolutwert der Konzentration ist jedoch für ein chemotaktisches Verhalten nicht besonders nützlich (siehe *Abbildung 2*). Eine E.Coli Zelle besitzt eine andere

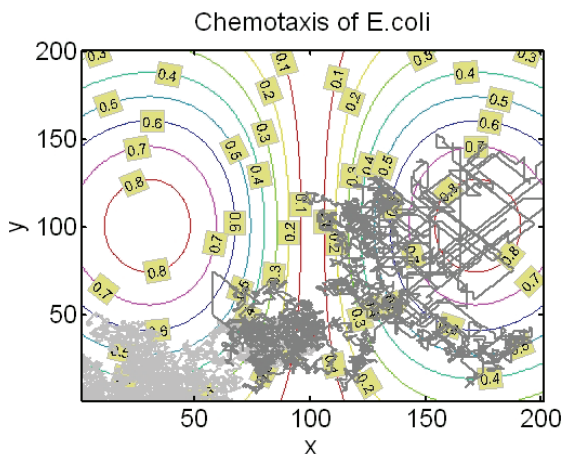


Abbildung 2: Beispiel einer simulierten Chemotaxis bei der der Absolutwert einer Konzentration und nicht ein Unterschied in der Konzentration die Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel bestimmt. Durch eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel bei niedrigen Konzentrationen als bei hohen läuft die Zelle oft in Richtung des Konzentrationsanstieges. Allerdings läuft sie auch wieder aus Bereichen mit hohen Konzentrationen hinaus. In hellgrau ist eine Zelle simuliert, die an der gleichen Stelle startet, aber die Richtung rein zufällig und nicht aufgrund der Konzentration in der Umgebung ändert. Die durchschnittliche Konzentration in der simulierten Umgebung beträgt 0.4713, die durchschnittliche Konzentration, in der sich die Zelle mit simuliertem chemotaktischem Verhalten befunden hat, beträgt 0.4024 und die Zelle mit rein zufälligem Verhalten hat sich durchschnittlich in einer Konzentration von 0.3696 befunden.

Strategie um trotz ihrer Größe einen Gradienten messen zu können. Das Signaltransduktionsnetz adaptiert auf eine konstante Konzentration eines Stoffes und reagiert dann nur noch auf Unterschiede in der Konzentration und nicht mehr auf den absoluten Wert. Nach [1] passiert dies wie folgt: Die Adaption geschieht durch eine reversible Methylierung des Rezeptors. Ein höheres Level von Methylierung erhöht die Wahrscheinlichkeit des Komplexes sich im aktiven Zustand zu befinden.

Ein sich im aktiven Zustand befindender Komplex, erzeugt durch *CheB* eine verstärkte Demethylierung und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass sich der Komplex im inaktiven Zustand befindet. Somit gibt kann das System auf die Konzentration eines Stoffes adaptieren: Wenn sich in der Umgebung der Zelle eine hohe Konzentration eines Stoffes befindet, ist die Wahrscheinlichkeit für einen aktiven Rezeptor-*CheA* Komplex niedrig. Dies bedeutet, dass wenig *CheY+P* produziert wird und dies wiederum bedeutet, dass wenig taumeln, also eine Richtungsänderung ausgelöst wird. Da jedoch *CheA* nicht sehr aktiv ist, findet kaum *CheB* Phosphorylierung statt. Dies bedeutet, dass verstärkt ei-

ne Methylierung des Rezeptors stattfindet, was die Wahrscheinlichkeit für ein aktives *CheA* und somit für einen Richtungswechsel erhöht. Dieser Prozess ist in *Abbildung 3* dargestellt. In [1, 2] wird jedoch auch darauf hingewiesen, dass auch andere Prozesse hinter einer Adaption stecken können, da auch Netzwerke mit eingeschränkter Fähigkeit zur Methylierung Adaption zeigen. Die folgende

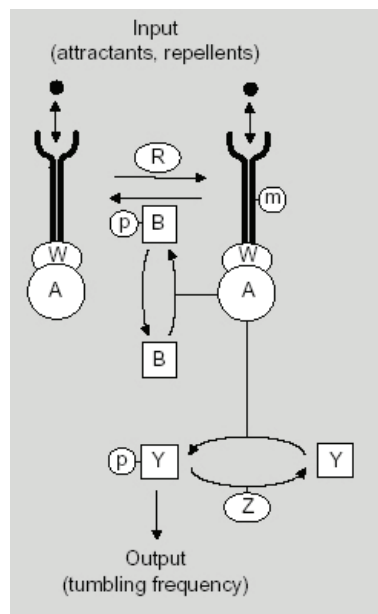


Abbildung 3: Signaltransduktionsnetzwerk mit der Fähigkeit zu Adaption auf eine Konzentration eines Stoffes in der Umgebung einer E.Coli Zelle. Die Fähigkeit zur Adaption ist nach [1] auf eine reversible Methylierung des Rezeptor-*CheA* Komplexes zurückzuführen (siehe Text).

Abbildung 4 aus [1] zeigt, wie sich die Richtungsänderungsfrequenz bei Zugabe eines *attractant* zunächst verringert, dann aber wieder auf den alten Steady-state zurückfindet.

In *Abbildung 5* zeigt, dass in einer Simulation eine E.Coli Zelle, die auf die absolute Konzentration adaptiert besser ein Maximum in der Konzentrationslandschaft findet.

E.Coli misst somit Änderungen der Konzentration über die Zeit, indem es die aktuelle Konzentration mit einer zuvor gemessenen vergleicht. Diese Fähigkeit macht es möglich, dass Netzwerk von E.coli bereits auf 10 nM Aspartat (10 Moleküle pro Volumen einer E.Coli Zelle) mit einer Änderung der Richtungswechselfrequenz reagiert. So erzeugt z.B. eine Veränderung der Rezeptorbelegung um 0.2% eine 23 prozentige Änderung bei der Rotation der Flagellen. Das Registrieren eines zeitlichen Gradienten anstatt eines räumlichen mit Hilfe von Adaption ist auch bei anderen Bakterien zu finden.

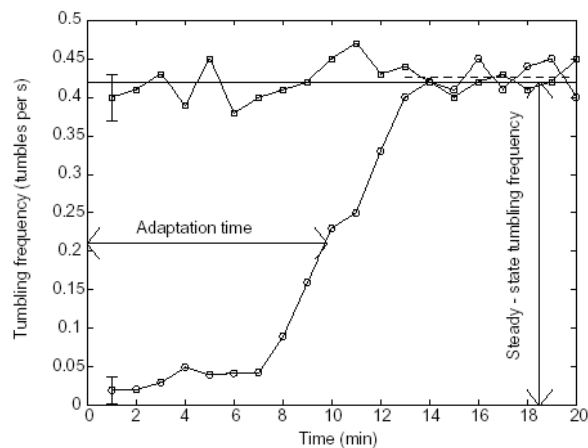


Figure 1 Tumbling frequency as a function of time for wild-type (RP437) cells. Circles: cells stimulated at time $t = 0$ by mixing with saturating attractant (1 mM L-aspartate). Squares: unstimulated cells (mock-mixed with chemotaxis buffer). Tumbling frequency was determined using computerized video tracking³⁴. Each point represents data from 10 s motion of 100–400 cells. The adaptation time was defined as the time where the tumbling frequency of stimulated cells rises to halfway between its earliest measured value and its steady-state value. Precision of adaptation was defined as the ratio between the steady-state tumbling frequency of unstimulated cells (full horizontal line) and stimulated cells (dashed horizontal line).

Abbildung 4: Bei Erhöhung der Konzentration eines *attractant* erniedrigt sich für eine gewisse Zeit die Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel der Zelle. Anschließend adaptiert das System jedoch auf den alten Steady-State. Dabei kann die *Adaption time* (Zeit in der die tumbling Frequenz einer stimulierten Zelle auf die Hälfte zwischen der frühesten Messung und dem Steady-State angewachsen ist) und die Präzision der Adaption (Quotient zwischen dem Steady-State in stimulierten und in unstimulierten Zellen) gemessen werden.

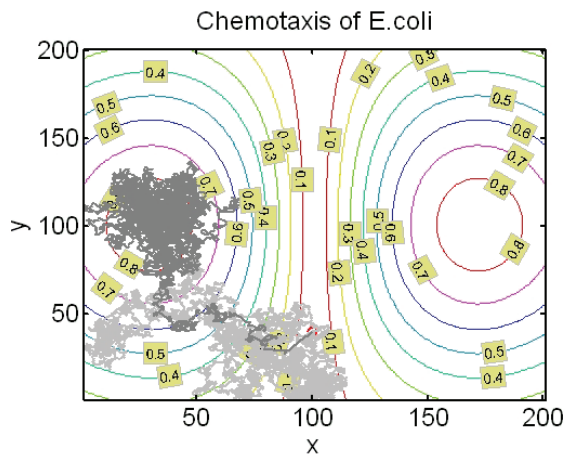


Abbildung 5: Beispiel einer simulierten Chemotaxis bei der der Unterschied in der Konzentration die Wahrscheinlichkeit für einen Richtungswechsel bestimmt. Die durchschnittliche Konzentration in der simulierten Umgebung beträgt 0.4713, die durchschnittliche Konzentration, in der sich die Zelle mit simuliertem chemotaxischem Verhalten befunden hat, beträgt 0.8025 und die Zelle mit rein zufälligem Verhalten hat sich durchschnittlich in einer Konzentration von 0.3203 befunden.

4 Robustheit des Netzwerkes

Signaltransduktionsnetzwerke unterliegt im allgemeinen Variationen der biochemischen Parameter, wie z.B. Variationen in der Proteinkonzentration. Somit stellt sich die Frage, wie robust das Netzwerk bei Variation der Proteinkonzentrationen reagiert und inwiefern die Eigenschaften des Netzwerkes (Zeit bis zur Adaption, Präzision der Adaption und die Steady-State Richtungsänderungsfrequenz) erhalten bleiben. Sollte dies der Fall sein, so ist die Frage, welche Eigenschaften des Netzwerkes es so robust machen. Alon et al. [1] hat aus diesem Grund die Proteine des Netzwerkes über- und unterexprimiert. Es zeigt sich, dass die Zeitspanne bis zur Adaption mit zunehmender Überexprimierung vom Enzym *CheR* steigt, während die Steady-State Richtungsänderungsfrequenz fällt. Die Präzision der Adaption bleibt auch bei einer 50 fachen Überexprimierung gleich (siehe *Abbildung 6*). Auch bei anderen getesteten Proteinen des Netzwerkes zeigt sich, dass die Präzision der Adaption robust und die Steady-State Richtungsänderungsfrequenz sowie die Zeit bis zur Adaption nicht robust gegen Variation der Proteinkonzentration sind. Alon et al.[1] ziehen daraus den Schluss, dass die exakte Adaption wichtig für die Fähigkeit zur Chemotaxis ist, während eine exakte Zeit bis zur Adaption oder eine präzise Steady-State Richtungsänderungsfrequenz eine sekundäre Wichtigkeit für den Prozess besitzen.

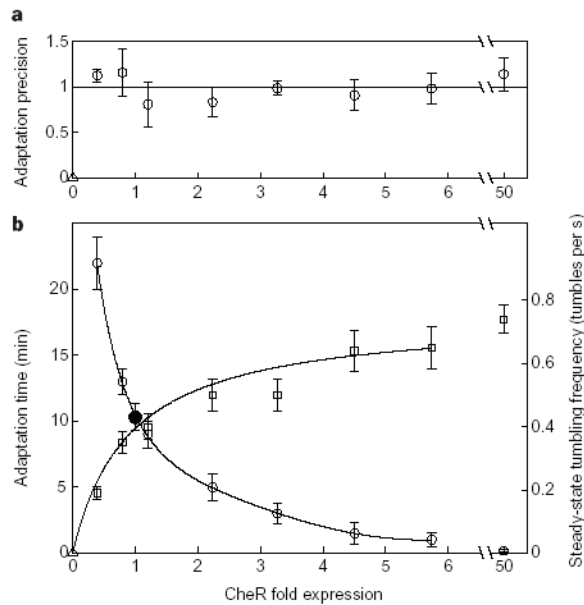


Figure 2 Chemotaxis behaviour of cells with varying intracellular concentration of the protein CheR. CheR was expressed from the plasmid pUA4 with varying levels of IPTG induction in a strain deleted for *cheR* (RP4968). **a**, Precision of adaptation, defined as the ratio between the steady-state tumbling frequency of unstimulated cells and cells stimulated with 1 mM L-aspartate. A precision of 1.0 corresponds to exact adaptation. Cells lacking CheR (RP4968 with the control vector pHSG575, triangle) did not respond to attractants, but showed a persistent response of about 0.6 tumbles per s to repellent (50 mM L-leucine). **b**, Average steady-state tumbling frequency of unstimulated cells (open squares, right scale), and average adaptation time to a step-like stimulation with 1 mM L-aspartate (open circles, left scale). Solid circle, wild-type strain (RP437 + pHSG575). Triangle, tumbling frequency of RP4968 + pHSG575. Lines are guides to the eye. Relative CheR expression was measured by immunoblots. 'Wild-type' CheR concentration was defined as the induction level where the adaptation time was equal to that of RP437 + pHSG575. Immunoblots also showed that the level of other chemotaxis proteins (CheB and CheY) did not vary measurably with CheR expression. Errors in relative CheR level are estimated to be under 30%. Mean and standard deviation of triplicate experiments are shown.

Abbildung 6: Bei Überexpression von Proteinen im Netzwerk verändern sich die Steady-State Richtungsänderungsfrequenz sowie die Zeitspanne bis zur Adaption jedoch nicht die Präzision der Adaption. Die Präzision der Adaption ist als die Abweichung der Steady-State Richtungsänderungsfrequenz von adaptierten stimulierten Zellen und unstimulierten Zellen definiert.

5 Variation in der Genexpression

Nachdem Alon et al. [1] die gegen eine Variation der Proteinkonzentration robusten Eigenschaften des Systems identifiziert hatten, blieb die Frage, welche Komponenten des Netzwerkes diesen Effekt verursachen.

In den Arbeiten von Kollmann et al. [2] zeigt sich, dass zwischen verschiedenen Zellen starke Variationen in der Genexpression von *CheY* und *CheZ* aufgrund von Fluktuationen in der transkriptionalen Aktivität (extrinsisches Rauschen) zu beobachten sind. Da diese Art des Rauschens einen Einfluss auf alle Promotoren hat, bleiben aber die Verhältnisse der Proteinkonzentrationen erhalten (abhängige Variation). Dagegen sind nur schwache unabhängige Variationen aufgrund von stochastischen Effekten bei der Transkription und Translation (intrinsisches Rauschen) zu beobachten.

Kollmann et al. gehen anschließend der Frage nach, ob eine abhängige Variation der Genexpression die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis beeinflusst, also ob nur Zellen, dessen absolute Proteinkonzentrationen in einem bestimmten Bereich liegen, zur Chemotaxis fähig sind. Es zeigt sich, dass auch eine starke Überexpression aller Proteine (bis 6.6 fach) nur einen kleinen Effekt auf die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis hat (siehe *Abbildung 7*).

Zudem weisen Kollmann et al. darauf hin, dass die Konzentration des *CheY+p* höchstens 1/3 über dem optimalen Wert liegen darf, damit die E.Coli Zelle nicht kontinuierlich schwimmt oder taumelt. Somit scheint sich auch bei einer solchen starken Überexpression die Konzentration von *CheY+p* im Arbeitsbereich des Flagellenmotors zu bewegen. Das Netzwerk muss demnach die Fähigkeit be-

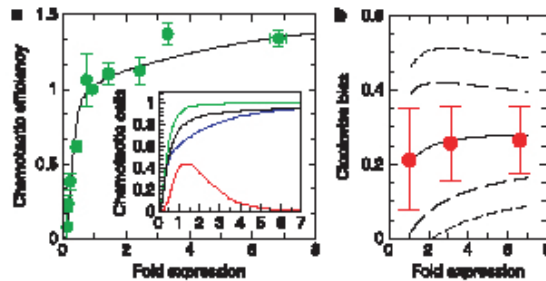


Figure 3 | Effect of the total concentration of signalling proteins on chemotaxis. a, Chemotaxis efficiency of *figM* (VS102) cells, expressing varying levels of FigM from a plasmid, determined in a swarm assay and normalized to the value of wild-type (RP437) cells. The relative mean expression of chemotaxis proteins at each FigM level was measured as in Fig. 2a, using the LL1 strain as a reporter. The solid line is a guide to the eye, and error bars indicate standard errors. Inset: simulated fraction of fully chemotactic cells for topologies in Fig. 1a (red line), b (blue line), c (black line) and d (green line). b, Clockwise motor bias as a function of expression of chemotaxis proteins. Each point represents a mean of 20–30 cells. Error bars indicate standard deviations and illustrate intercellular variation. The solid line shows the clockwise bias calculated from the mathematical model of Fig. 1c under gene expression noise estimated from Fig. 2. The calculated standard deviation is depicted for the topology in Fig. 1c, assuming a steepness of the motor response curve with a Hill coefficient of five¹⁰ (thick dashed lines) or ten¹⁰ (thin dashed lines).

Abbildung 7: Fähigkeit von E.Coli Zellen zur Chemotaxis bei Überexpression der Proteine des Chemotaxis-Signaltransduktionsnetzwerkes und Effekt einer solchen Überexpression auf die Rotation des Flagellenmotors.

sitzen die Konzentration von *CheY+P* in einem bestimmten Bereich zu halten, auch wenn die anderen Proteine des Signaltransduktionsweges vielfach überexprimiert sind. Kollmann et al. haben aus diesem Grund verschiedene theoretisch Netzwerktopologien auf diese Fähigkeit untersucht. Die untersuchten Topologien sind in *Abbildung 8* aufgeführt. In *Abbildung 9* ist gezeigt, in welchem Maß

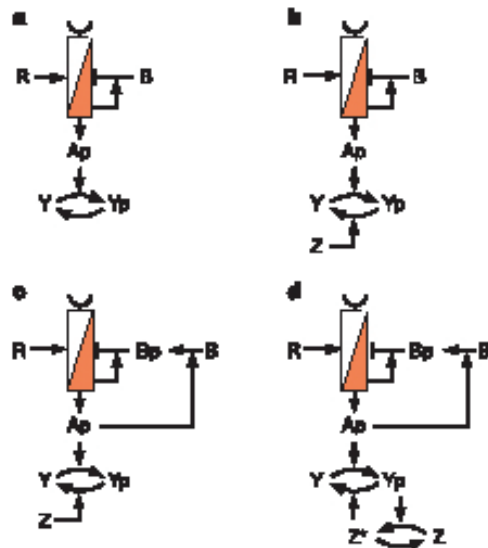


Figure 1 | Four possible network topologies of bacterial chemotaxis showing precise adaptation. Links between proteins indicate activations (arrows) or repressions (bar ends). The receptor can either be in an active state (red) or an inactive state (white). The proteins involved are denoted, for example, by $A = \text{CheA}$, and their phosphorylated forms by $Ap = \text{CheA-P}$. **a**, Minimal model as proposed in ref. 3. **b**, Same as model **a** but with a phosphatase *CheZ* substituting auto-dephosphorylation of *CheY-P* in topology **a**. **c**, Same as model **b** but only the phosphorylated form of *CheB* can form a complex with active receptors. This topology represents the experimentally established network of *E. coli*. **d**, Same as topology **c** but with an active form (Z^*) of the *CheY* phosphatase^{27,28}.

Abbildung 8: Verschiedene mögliche Signaltransduktionsnetzwerke des Chemotaxisystems von *E. coli*. Die Topologie c) entspricht der bekannten Topologie.

es den verschiedenen Topologien möglich ist trotz einer Variation der Proteinkonzentrationen chemotaktisches Verhalten zu betreiben. Anscheinend können die Topologien b) bis d) eine abhängige Variation (extrinsisch) gut kompensieren; eine unabhängige Variation (intrinsisch) hingegen nur im kleinen Maße. Die Topologien c) und d) besitzen als einzigen Vorteil zu b), dass sie das Rauschen mit Hilfe zusätzlicher Feedbackschleifen besser verhindern. Die Topologie c) entspricht der bekannten Topologie des Chemotaxis-Signaltransduktionsnetzwerkes bei *E. coli*. Das experimentell bekannte Chemotaxis Netzwerk von *E. coli* scheint somit eine hohe Robustheit gegen physiologische Variationen bereit zu stellen. Der Effekt einer unabhängigen Variation kann jedoch von Netzwerk nur abgeschwächt werden.

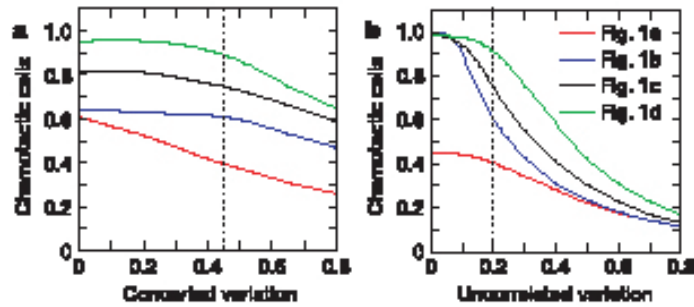


Figure 4 | Simulated fraction of chemotactic cells as a function of gene expression noise. Topologies are marked as in Fig. 3. The native level of gene expression noise is indicated by dotted lines. **a**, Concerted variations ranging up to twofold of the wild-type strength with uncorrelated variations kept at the wild-type value, $\eta_{in} = 0.2$. **b**, Same as **a** but with varying strength of uncorrelated variations and with concerted variations fixed to the wild-type value, $\eta_{ex} = 0.44$.

Abbildung 9: Anteil der Zellen die fähig sind bei bestimmten Variationen der Proteinkonzentrationen Chemotaxis zu betreiben. Dabei wird zwischen der abhängigen Variation (extrinsisches Rauschen) und der unabhängigen Variation (intrinsisches Rauschen) unterschieden.

6 Genexpression in Eukaryonten

Auch in Eukaryonten scheint extrinsisches Rauschen in hohem Maße zur Genexpression dazuzugehören, wohingegen intrinsisches Rauschen nur sehr viel schwächer stattfindet. So wurde in [5] gezeigt, dass auch in Hefe ähnliche Variationen in der Genexpression zu beobachten sind. In *Abbildung 10* sind die Ergebnisse dieses Experimentes vorgestellt.

Der *Scatter Plot* in der Mitte der *Abbildung 10* zeigt, dass ein starkes extrinsisches aber nur ein schwaches intrinsisches Rauschen in Hefezellen zu beobachten ist. Somit scheint auch in Eukaryonten extrinsisches Rauschen in hohem Maße zur Genexpression dazuzugehören, wohingegen intrinsisches Rauschen vermieden wird. Das Chemotaxis Netzwerk gibt einen ersten Hinweis darauf, dass es für ein Netzwerk möglich ist mit extrinsischer Variation in der Genexpression umzugehen, ohne dass die Fähigkeit zu einer genauen Quantifizierung verloren geht.

Literatur

- [1] U Alon, M G Surette, N Barkai, and S Leibler. Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature*, 397(6715):168–71, 1999.
- [2] Markus Kollmann, Linda Lovdok, Kilian Bartholome, Jens Timmer, and Victor Sourjik. Design principles of a bacterial signalling network. *Nature*, 438(7067):504–7, 2005.

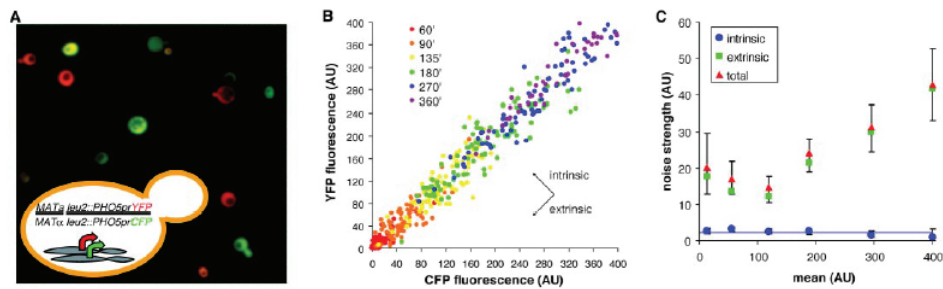


Fig. 1. Separation of intrinsic and extrinsic noise for the *PHO5* promoter. (A) A false-color overlay of YFP (red) and CFP (green) fluorescence micrographs from a diploid yeast strain that expresses YFP and CFP from identical promoters at homologous loci, as diagrammed in the inset. (B) Scatter plots showing CFP and YFP values for each cell (solid circles) during a time course of *PHO5* induction by phosphate starvation. Populations from different time points (in minutes) are indicated with different colors. Extrinsic noise is manifested as scatter along the diagonal and intrinsic noise as scatter perpendicular to the diagonal. AU, arbitrary units of fluorescence. (C) Total, extrinsic, and intrinsic noise strength as functions of population mean for (B). The solid line represents expectations for a single stochastic process, and error bars represent bootstrap values (6).

Abbildung 10: Dipolide Hefe Zellen wurden dazu gebracht, sowohl das *Green-fluorescent protein* (GFP), als auch das *Cyan-fluorescent protein* (CFP) zu produzieren. Gesteuert wurde die Produktion bei beiden durch den gleichen Promotor und die Gene lagen im gleichen Locus auf homologen Chromosomen. Somit kann zwischen extrinsischem Rauschen (unterschiedlich viel Fluoreszenz zwischen den Zellen jedoch gleiches Verhältnis von cyan und grün in einer Zelle) und intrinsischem Rauschen (unterschiedlich viel Fluoreszenz zwischen den Zellen und variables Verhältnis von cyan und grün in einer Zelle) unterschieden werden.

- [3] H C Berg and E M Purcell. Physics of chemoreception. *Biophys J*, 20(2):193–219, 1977.
- [4] D B Dusenbery. Spatial sensing of stimulus gradients can be superior to temporal sensing for free-swimming bacteria. *Biophys J*, 74(5):2272–7, 1998.
- [5] Jonathan M Raser and Erin K O’Shea. Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science*, 304(5678):1811–4, 2004.