

Kleine genetische Netze Einfache Steuerungsprogramme Flagella Gene Network

Sabine Pilari

21. Februar 2006

Das bis heute sehr intensiv untersuchte und gut verstandene Flagella Gene Network in *Escherichia Coli* wurde von Kalir und Alon als Grundlage genommen, um seine Netzwerkdynamiken detailliert zu beschreiben. Ziel ihrer Arbeit war, einen genauen Entwurf des Netzwerkes zu erstellen, in dem Werte für die Aktivierungskoeffizienten der einzelnen Promotoren, sowie das Verhalten der Transkriptionsregulatoren enthalten sind. Die Ergebnisse sind in dem Artikel “Using a Quantitative Blueprint to Reprogram the Dynamics of the Flagella Gene Network” vorgestellt.

1 Aufbau und Funktion des Flagella Gene Network

1.1 Flagellen

Über das Flagella Gene Network wird die Synthese der Flagellen reguliert, die die Fortbewegung des *E.coli* ermöglichen. Bakterielle Flagellen sind ausgestülpte Zelloberflächenstrukturen, die durch einen Rotationsmotor angetrieben werden und sich propellerartig drehen. Damit ist es dem Bakterium möglich, sich in einer flüssigen Umgebung fortzubewegen.

Das Flagellum selbst besteht aus mehreren Komponenten. In der Bakterienmembran befindet sich der Basalkörper, der über eine Verankerung mit dem extrazellulär lokalisierten Filament verbunden ist. Des Weiteren ermöglicht ein Rotationsmotor die Drehung des Filaments. Der Rotationsmotor seinerseits wird wieder aktiviert durch ein Chemotaxissystem, das auch die Nährstoffkonzentrationen in der Umgebung misst.

Die Synthese von Flagellen ist für das *E.coli* allerdings nicht zu jeder Zeit von Interesse. Erst wenn sich das Bakterium in einer Umgebung befindet, in der nicht mehr ausreichend Nährstoffe vorhanden sind, aber noch genügend Vorräte für den Aufbau der Flagellen, wird die Synthese angeregt, um eine Fortbewegung in eine nährstoffreichere, für das Überleben günstigere Umgebung anzustreben.

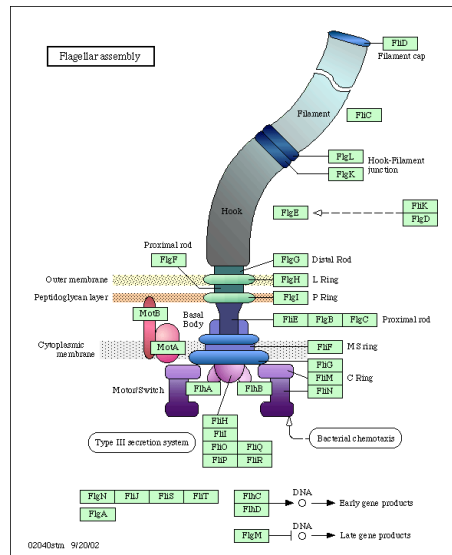


Abbildung 1: Aufbau eines Flagellums. Quelle: http://www.kegg.com/dbget-bin/www._bget?path:eco02040

1.2 Aufbau des Gesamtnetzwerkes

Im Laufe der Flagellensynthese werden als erstes Basalkörper, Rotationsmotor und Filamentanker hergestellt. Wenn diese Bestandteile vollständig und korrekt synthetisiert wurden, kommt es auch zur Herstellung des Filamentes und des Chemotaxissystems. Es gibt demzufolge also einen Checkpoint, der prüft, ob ein Weiteraufbau des Flagellums sinnvoll ist, oder ob eine fehlerhafte Assemblierung der Bestandteile stattfand. Eine falsches Zusammenbauen würde andernfalls zur Verschwendung von Ressourcen führen. Damit ist es ersichtlich, dass Gene, deren Produkte zeitig an der Flagellenbildung beteiligt sind, auch als erstes exprimiert werden sollten, die Gene, deren Produkte Bestandteile des Filaments oder Chemotaxissystems sind, jedoch vorläufig nicht. Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch tatsächlich im Aufbau des Gennetzwerkes wieder.

Das hierarchische Netzwerk besteht aus drei Ebenen, wobei die höchste Ebene nur den Masterregulator des Netzwerkes, FlhDC, beinhaltet. Dieser wird auf Grund von Umwelteinflüssen aktiviert, genau dann, wenn die Umgebungsbedingungen für E.coli zu schlecht werden und eine Fortbewegung notwendig machen. Die mittlere Ebene besteht aus den sogenannten Klasse-2-Genen, die im Laufe der Flgellensynthese zeitiger benötigt werden. Diese Genprodukte sind Bestandteile des Basalkörpers, des Rotationsmotors und des Filamentankers. Die Gruppe der Klasse2-Genen beinhaltet außerdem den zweiten Regulator des Systems, FliA. Die unterste Ebene des Netzwerkes wird durch die Klasse3-Gene gebildet, deren Produkte am Aufbau des Filaments und des Chemotaxissystems

FlgM gebunden, so dass es nicht als Transkriptionsaktivator fungieren kann. Erst wenn die Assemblierung des Basalkörpers und der Aufbau von Rotationsmotor und Filamentanker korrekt abgeschlossen wurden, wird der Inhibitor FlgM aus der Zelle abtransportiert, da sich bei der Zusammenlagerung der Rotationsmotorproteine ein Tunnel bildet, über den FlgM aus der Zelle diffundiert. Aus diesem Grund liegt nun freies und aktives FliA vor. Damit ist der Übergangsscheckpoint in die nächste Phase der Flagellensynthese ermöglicht und die Klasse3-Genexpression kann beginnen.

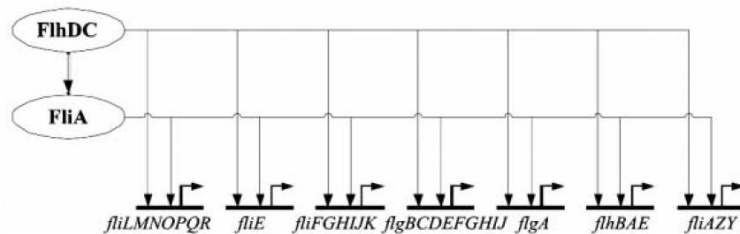


Abbildung 3: Klasse2-Genetzwerk. Quelle: “Kalir, Alon - Using a Quantitative Blueprint to Reprogram the Dynamics of the Flagella Gene Network”

Die Promotoraktivitäten der Klasse2-Gene lassen sich auf Grund der unterschiedlichen Aktivitäten der beiden Transkriptionsfaktoren FlhDC und FliA in zwei Phasen unterteilen. Anfänglich werden die Promotoren allein durch den Masterregulator FlhDC angeschaltet, der jeden einzelnen Promotor unterschiedlich stark aktiviert. In dieser ersten Phase bleiben die Promotoraktivitäten annähernd konstant. Dann beginnt, auf Grund der Aktivierung durch FlhDC, auch die Konzentration an dem Downstreamregulator FliA zu steigen. In der zweiten Phase ist der Masterregulator FlhDC dann abgeschaltet und die Promotoren der Klasse2-Gene werden alle gleich stark durch FliA aktiviert. Die einzelnen Promotoraktivitäten nähern sich einander an, da der relative Effekt dieser Aktivierung für die Gene, die in der ersten Phase nur schwach durch FlhDC aktiviert wurden, groß, für die zuvor stark aktivierten Gene eher gering ist. Durch die anfängliche Inhibition des FliA durch seinen Repressor FlgM wird der Phaseneffekt noch verstärkt, diese werden schärfer voneinander getrennt.

2 Das mathematische Modell

2.1 Promotoraktivität von flhL

Der Promotor von flhL ist derjenige, der von dem Masterregulator FlhDC am stärksten aktiviert wird. Abbildung 5 gibt die jeweils gemessene Promotoraktivität von flhL in Abhängigkeit von der FlhDC- und FliA-Aktivität wieder. Im

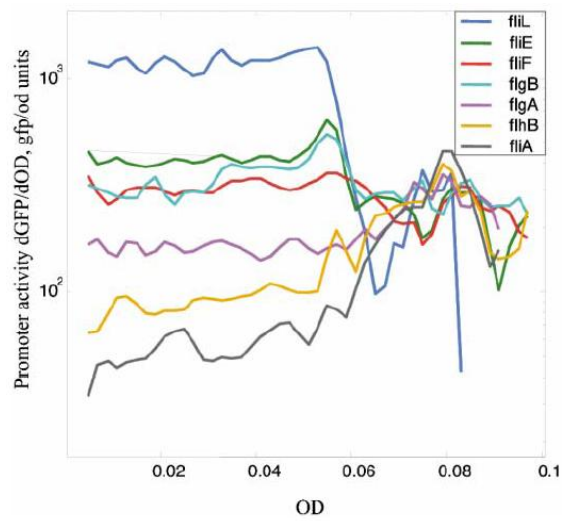


Abbildung 4: Klasse2-Promotoraktivitäten in Abhängigkeit von der Zeit. Die zwei Phasen in der Klasse2-Promotortaktivierung werden hervorgerufen durch die beiden unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren. Der Phasenübergang liegt bei ca. 0.06. Quelle: “Kalir, Alon - Using a Quantitative Blueprint to Reprogram the Dynamics of the Flagella Gene Network”

Experiment wurden die beiden Transkriptionsaktivatoren FlhDC und FliA kontrolliert an- oder ausgeschaltet, beziehungsweise unterschiedlich stark aktiviert, so dass sie wiederum unterschiedlich stark auf die Klasse2-Gene einwirken konnten. Damit war es möglich, den jeweiligen Einfluss von FlhDC oder FliA auf den Klasse2-Promotor *fliL* zu erkennen.

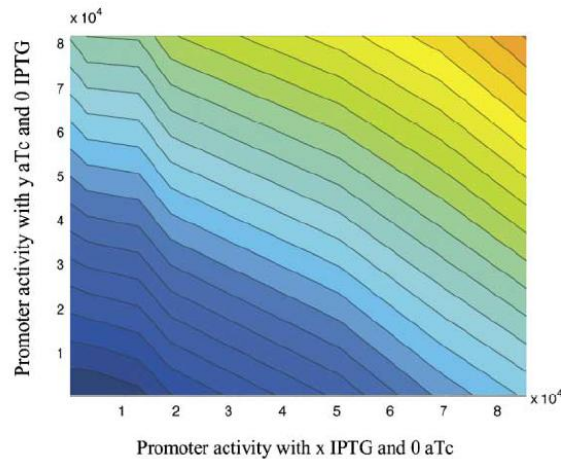


Abbildung 5: Promotoraktivität von *fliL* in Abhängigkeit von der Aktivierung durch FlhDC (x-Achse) und FliA (y-Achse). Quelle: “Kalir, Alon - Using a Quantitative Blueprint to Reprogramm the Dynamics of the Flagella Gene Network”

Aus dem Experiment wurde ersichtlich, dass beide Transkriptionsfaktoren unabhängig und ohne Anwesenheit des anderen die Klasse2-Gene aktivieren können. Hierbei handelt es sich also um eine ODER-Verschaltung. Da sich die expressionssteigernden Effekte von FlhDC und FliA aufsummieren, lässt sich die Promotoraktivität in Abhängigkeit von den Faktoren am besten durch eine bilineare Funktion ausdrücken. Weil sich diese Effekte nicht bis ins Unendliche steigern lassen, kann dieses Verhalten ab einer bestimmten FlhDC- beziehungsweise FliA-Aktivität nicht mehr beibehalten werden. Allerdings ist für das mathematische Modell nur der bilineare, biologisch relevante Teil der Funktion von Interesse. In Abbildung 5 ist diese bilineare Funktion für den physiologischen Bereich dargestellt.

2.2 Herleitung

Im Experiment wurden n Messungen der Aktivitäten der i Promotoren durchgeführt. Auf Grund der n Messungen, erhalten wir ein n -dimensionales Koordinatensystem, in dem jede Messung einer Achse entspricht und die Promotoraktivitäten als Vektoren dargestellt sind. Die mittels Singulärwertzerlegung erhal-

tenen ersten zwei Hauptkomponenten spannen eine Ebene des n-dimensionalen Raumes auf, die 97% der Varianz in den Promotoraktivitäten erklärt. Da die Aktivitäten aller Promotoren in dieser Ebene liegen, wurde angenommen, dass auch die Aktivitäten von FlhDC und FliA in ihr repräsentiert sind. Des Weiteren ist man davon ausgegangen, dass diese Transkriptionsfaktoren die beiden einzigen Regulatoren des Systems sind und alle anderen Promotoraktivitäten von ihnen abhängen. Um nun die genaue Lage der Vektoren von FlhDC und FliA zu erhalten, werden diese als Linearkombination von den Basisvektoren der Hauptkomponentenebene dargestellt. Die Basisvektoren werden im Folgenden mit A und B bezeichnet. Man erhält also zwei Gleichungen der Form $X(t) = aA + bB$ und $Y(t) = cA + dB$, wobei $X(t)$ das Aktivitätsprofil von FlhDC und $Y(t)$ das Aktivitätsprofil von FliA in Abhängigkeit von der Zeit t sind. Um diese beiden Gleichungen mit den vier Unbekannten a, b, c und d lösen zu können, wurden folgende vier Annahmen gemacht. Die maximalen Aktivitäten von FlhDC und FliA sind gleich eins, zum Zeitpunkt $t = 0$ ist die Aktivität von FlhDC maximal, also eins, und die Aktivität von FliA gleich null. Somit ist auch modelliert, dass die FlhDC-Aktivität immer der FliA-Aktivität vorangeht und dass FliA von FlhDC aktiviert wird. Mit den erhaltenen Werten für a, b, c und d lassen sich nun alle anderen Promotoraktivitäten als Linearkombination von $X(t)$ (FlhDC) und $Y(t)$ (FliA) darstellen. Das daraus resultierende mathematische Modell für die Promotoraktivitäten der Klasse2-Gene sieht folgendermaßen aus:

$$P_i(t) = \beta_i \cdot X(t) + \beta'_i \cdot Y(t)$$

Dabei beschreibt $P_i(t)$ die Aktivität des i-ten Promotors in Abhängigkeit von der Zeit t und β_i beziehungsweise β'_i beschreiben die Aktivierungskoeffizienten bezüglich des i-ten Promotors, die sich aus den Aktivitäten von FlhDC beziehungsweise FliA ergeben.

2.3 Geschätzte Parameter

Mit Hilfe des vorgestellten mathematischen Modells wurden Werte für β_i und β'_i geschätzt. In Abbildung 6 ist das Klasse2-Genetzwerk mit den geschätzten Parametern dargestellt. Zu erkennen ist, dass sich die β_i -, im Gegensatz zu den β'_i -Werten, deutlich voneinander unterscheiden. Der Grund dafür ist die unterschiedlich starke Aktivierung der Klasse2-Promotoren durch den Masterregulator FlhDC. Wie zu erwarten, hat der von FlhDC am stärksten aktivierte Promotor auch den größten β -Wert. Da der Downstreamregulator FliA alle Klasse2-Promotoren etwa gleich stark aktiviert, weichen demzufolge auch die β'_i -Werte nur wenig voneinander ab.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Das Flagella Gene Network ist ein Beispiel für ein Netzwerk, das durch das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Auffällig ist, dass

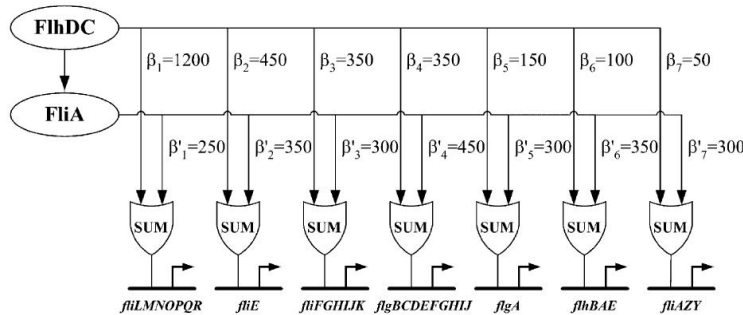


Abbildung 6: Klasse2-Gennetzwerk mit den geschätzten β_i und β'_i sowie SUM-Gates zur Veranschaulichung des additiven Effekts in der Promotoraktivierung. Quelle: “Kalir, Alon - Using a Quantitative Blueprint to Reprogramm the Dynamics of the Flagella Gene Network”

eine Hierarchie in der Aktivierung der Promoter durch eine unterschiedlich starke Bindung eines Regulators erreicht wird, und somit die Transkription bestimmter Gene genau an den Bedarf der Zelle angepasst wird. Außerdem kann durch das Zusammenspiel zweier Transkriptionsfaktoren ein sich selbst regulierendes Phasensystem entstehen, welches einen Checkpoint für die weitere Synthese von Proteinen realisiert und somit einer möglichen Verschwendung von Ressourcen entgegenwirkt.

Detaillierte Ablaufpläne, die den Aufbau eines Netzwerkes beschreiben, so wie das für das Flagella Gene Network in E.coli der Fall ist, können dazu genutzt werden, Dynamiken, die im Netzwerk vorherrschen, zu beschreiben und zu verstehen. Außerdem können generell Rückschlüsse auf die Funktionsweise anderer Netzwerke gezogen werden, wenn ein grundlegendes Verständnis für den Aufbau und die Dynamik genetischer Netzwerke existiert. Damit kann der Ansatz zur detailgetreuen Beschreibung auch relevant sein für das Testen möglicher Auswirkungen von Medikamenten oder überhaupt für die Wirkstofffindung.

4 Quellen

- Kalir, Alon: Using a Quantitative Blueprint to Reprogramm the Dynamics of the Flagella Gene Network
- Kalir: Ordering Genes in a Flagella Pathway by Analysis of Expression Kinetics from Living Bacteria
- Berg: E. coli, a self-replicating object only a thousandth of a millimeter in size, can swim 35 diameters a second, taste simple chemicals in its environment, and decide whether life is getting better or worse. <http://www.aip.org/pt/jan00/berg.htm>

- Kanehisa, Goto, Hattori, Aoki-Kinoshita, Itoh, Kawashima, Katayama, Araki, Hirakawa: From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. <http://www.genome.jp/kegg>