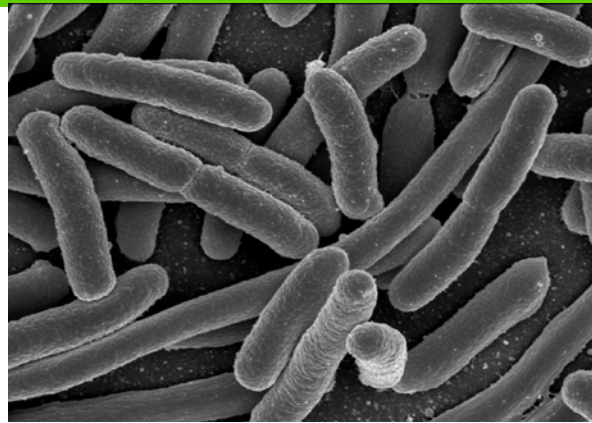
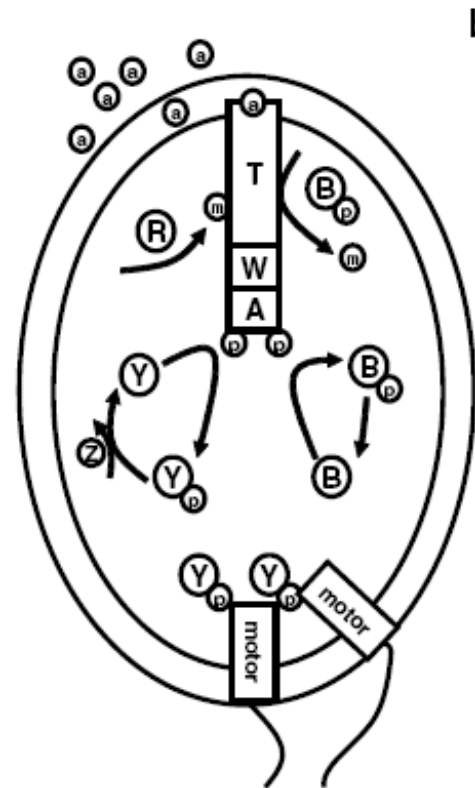
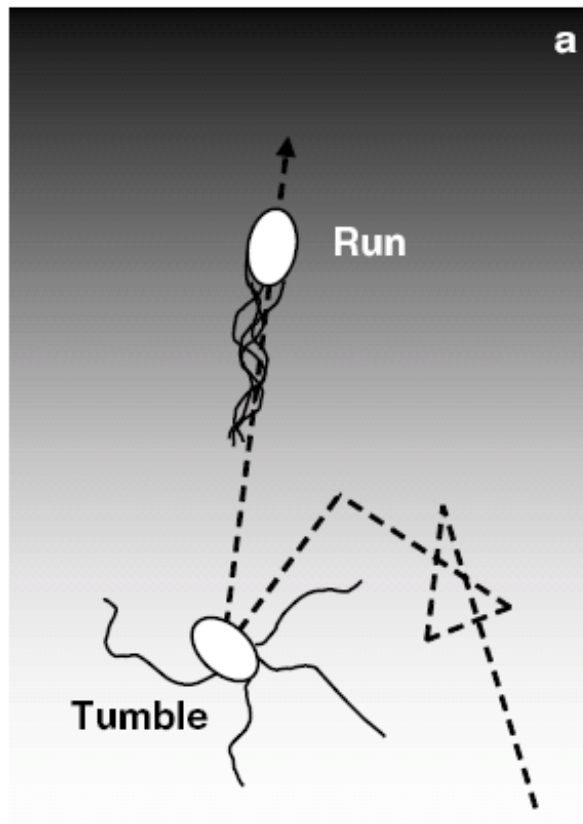


# Robustes Design – Chemotaxis bei E.coli

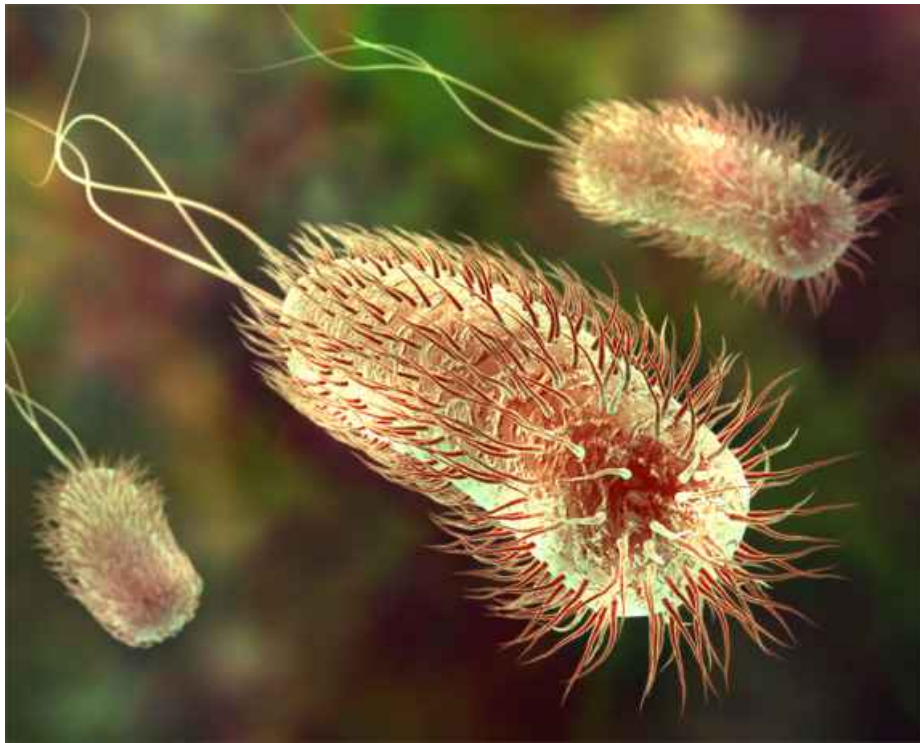


# Chemotaxis bei E.coli



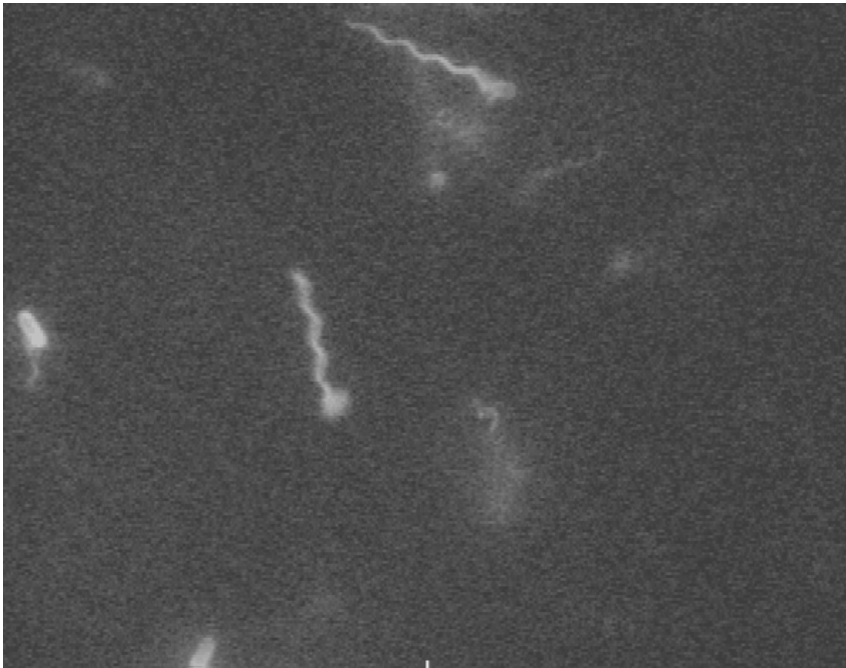
AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis", Bioinformatics (2005), 21(11), 2714-2721

# Chemotaxis bei E.coli



- E.Coli schwimmt indem es 5 bis 8 seiner Flagellen **im Uhrzeigersinn** bewegt – die Flagellen verbinden sich dann zu einem einzigen rotierenden Bündel – die Zelle **schwimmt in einer geraden Linie**
- Wenn die Rotationsrichtung eines Flagellenmotors geändert wird und jetzt **gegen den Uhrzeigersinn** rotiert bricht das Bündel auf und es wird in unterschiedliche Richtungen zu gleichen Zeit gesteuert. Dies erzeugt das *tumbling* (**taumeln**), .

# Chemotaxis bei E.coli

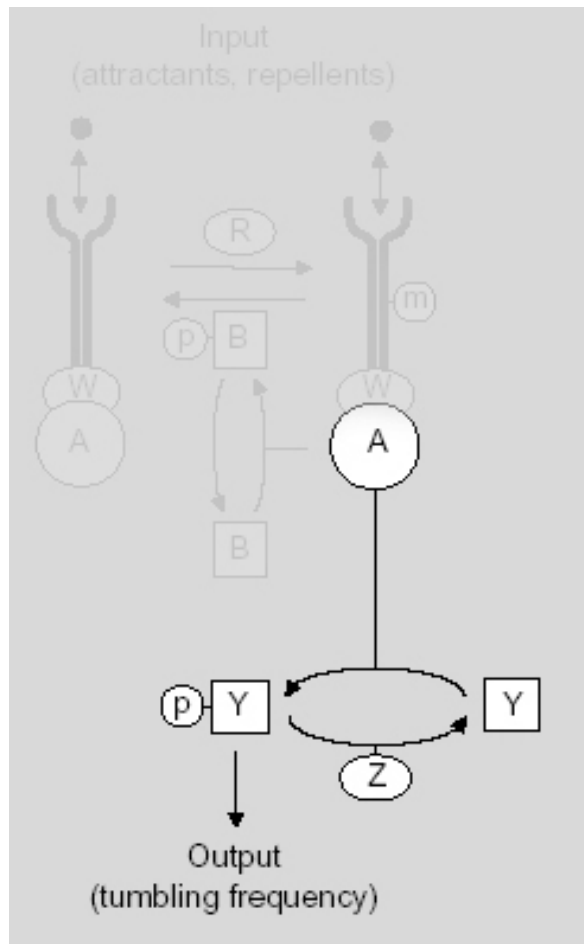


Turner, L., Ryu, W.S., and Berg, H.C. "Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments." *J. Bacteriol.* 182, 2793-2801 (2000).



AgentCell: a digital single-cell assay for bacterial chemotaxis", *Bioinformatics* (2005), 21(11), 2714-2721

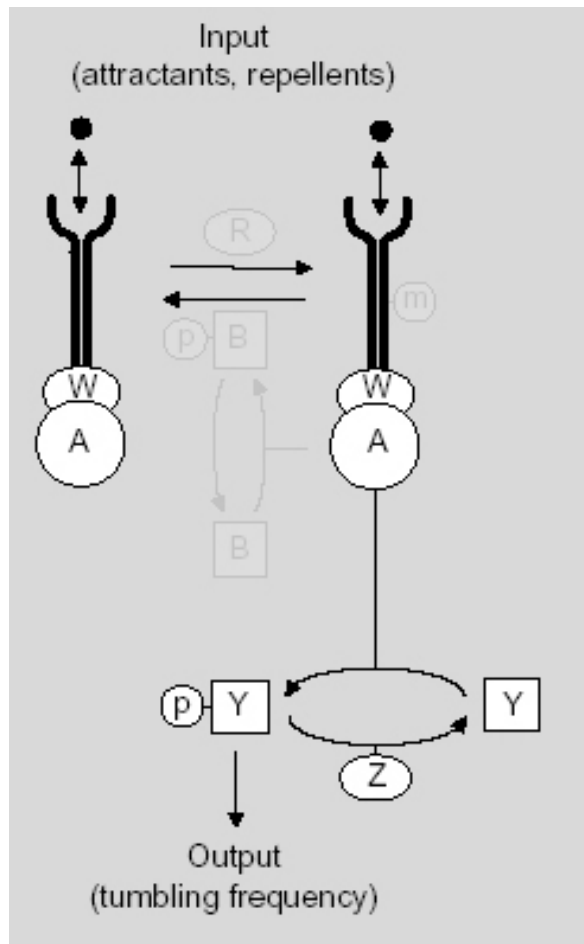
# Chemotaxis System in E.coli



- Phosphorylierte Form von **CheY** (Y) bindet an den Flagellenmotor und **erzeugt das tumbling (taumeln)**, also einen Richtungswechsel
- Dephosphorylierung von CheY durch CheZ (Z)
- Phosphorylierung durch Aktivität der Kinase CheA (A)

**Fazit: Höhere Aktivität von CheA führt zu mehr tumbling**

# Chemotaxis System in E.coli

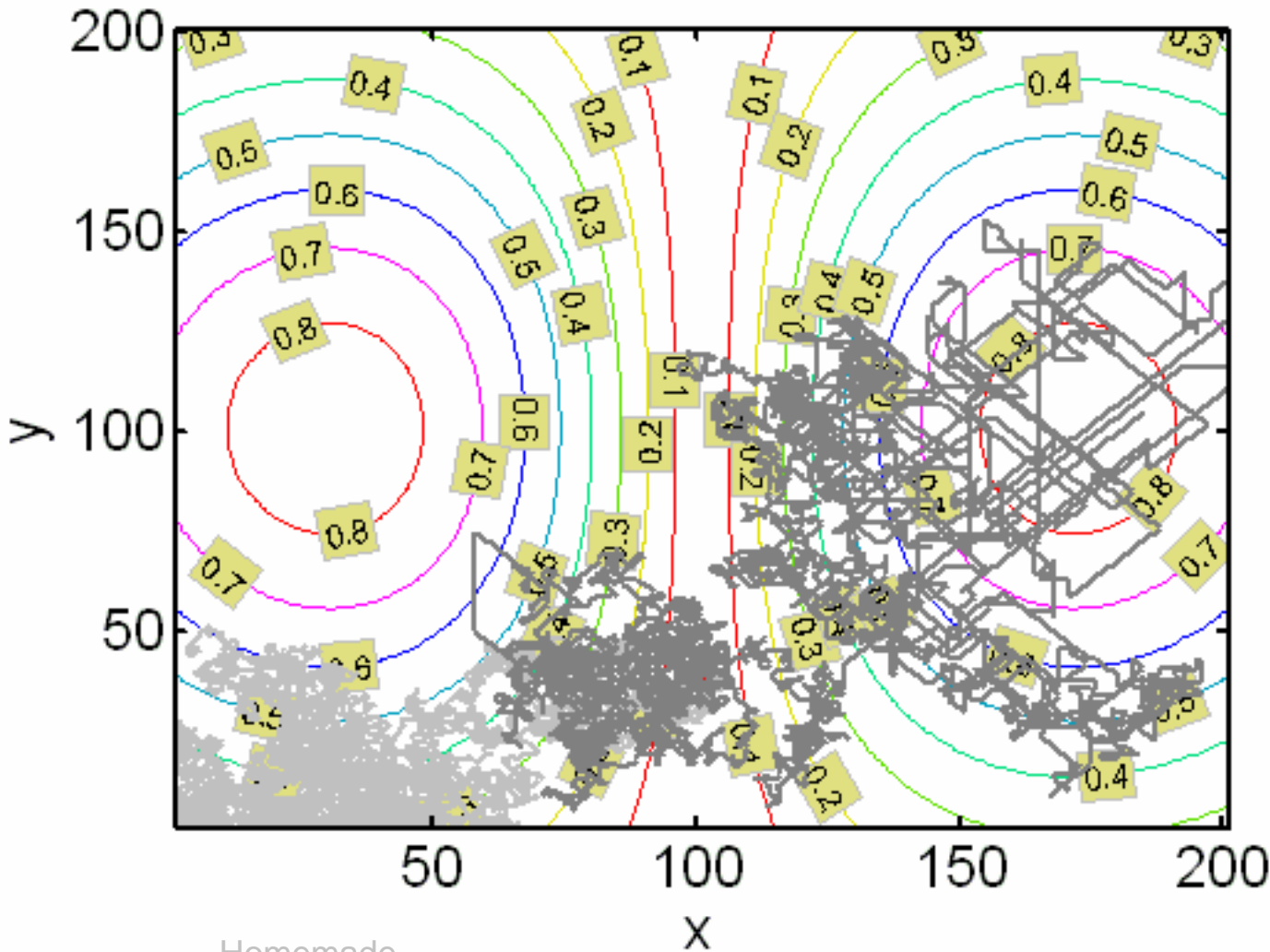


- Kinase CheA ist zusammen mit CheW an den Rezeptor gebunden
- Komplex kann in einer **aktiven Form** vorliegen (Kinase CheA aktiv) oder in einer **inaktiven** (Kinase CheA inaktiv).
- Bindung eines Liganden an den Rezeptor **erniedrigt** die Wahrscheinlichkeit das der Komplex in der aktiven Form vorliegt

**Fazit: Ligandenbindung führt zu weniger aktiven CheA und dies führt zu weniger CheY+p und dies führt zu weniger *tumbling***

# Chemotaxis System in E.coli

Chemotaxis of E.coli



Homemade

Average concentration for chemotaxis:

0.4024

Average concentration without chemotaxis:

0.3696

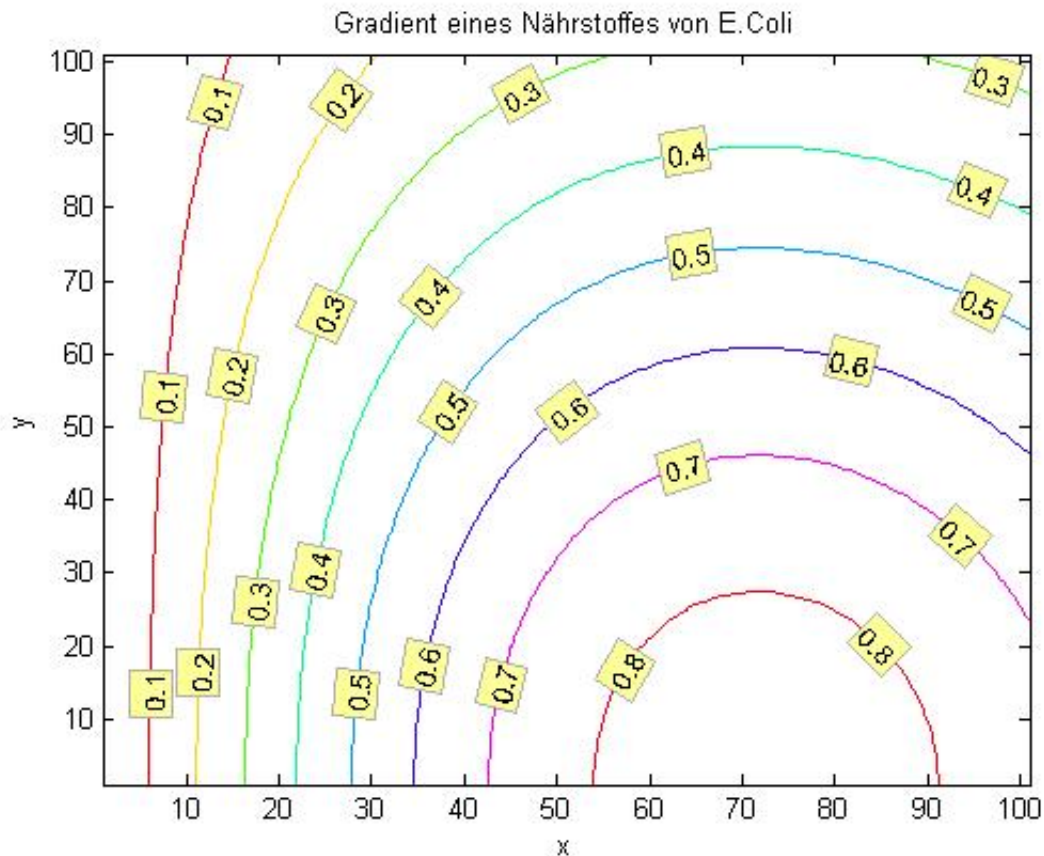
Average concentration in environment

0.4713

Concentration at start:

0.0138

# Adaption

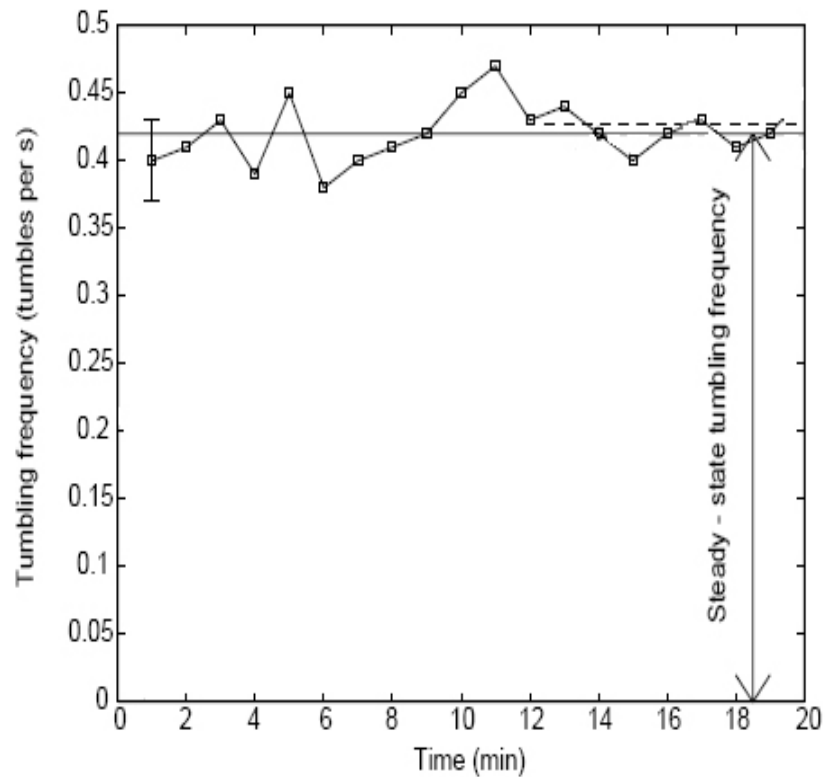


Homemade

- E.coli kann genauso gut einen Gradienten von 0.1 zu 0.3 erkennen, wie einen von 0.6 zu 0.8.
- Dazu muss **steady-state tumbling Frequenz** bei 0.1 und 0.6 **gleich sein**.
- E.coli **adaptiert** auf eine bestimmte Substratkonzentration
- E.Coli erkennt nicht die absolute Konzentration, sondern eine Änderung dieser.

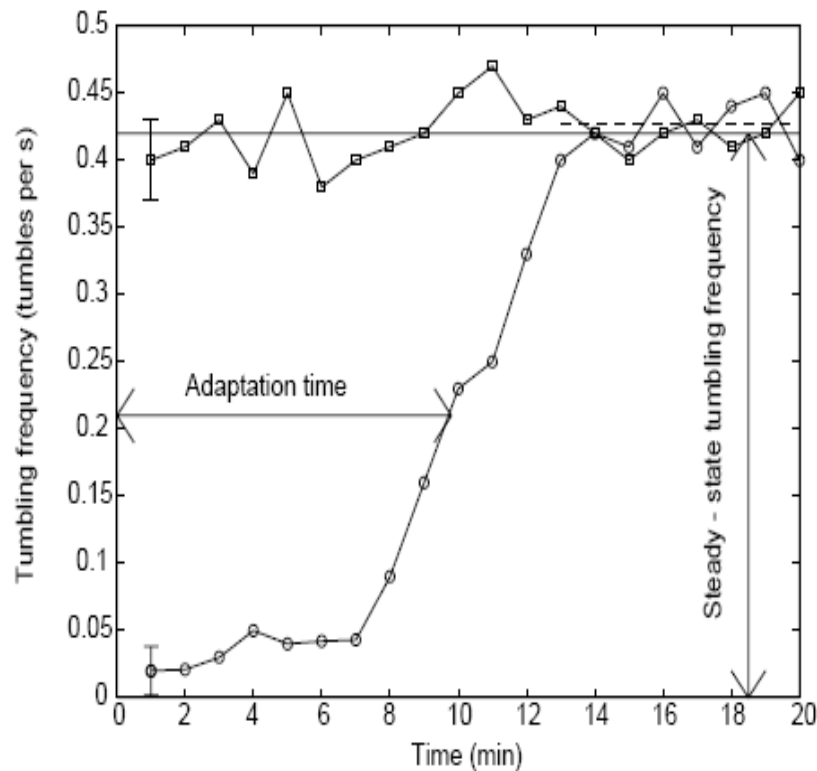


# Adaption



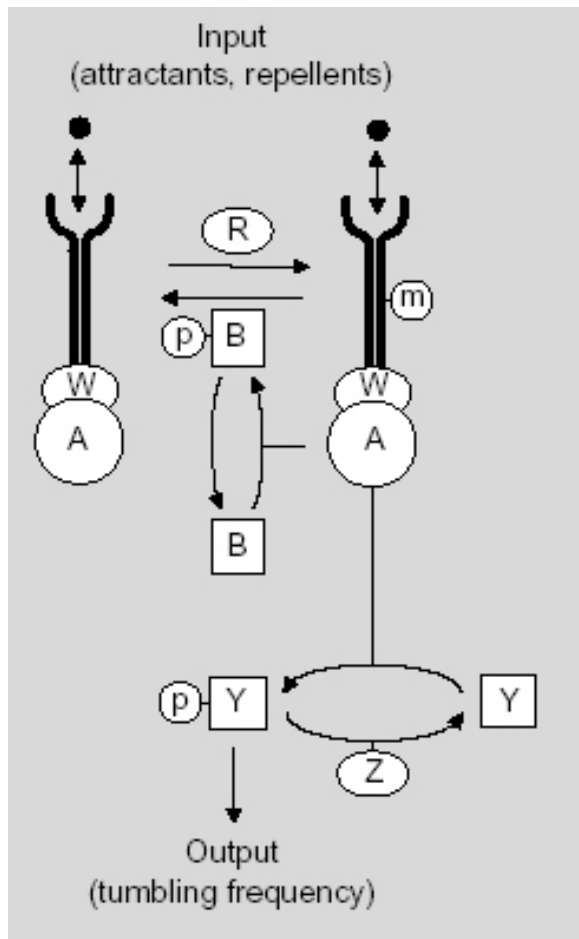
Alon et al. Robustness in bacterial chemotaxis  
Nature, 1999 Vol 397

# Adaption



- **Adaption time** = Zeit in der die *tumbling* Frequenz einer stimulierten Zelle auf die Hälfte zwischen der frühesten Messung und dem *steady-state* angewachsen ist
- **Präzision der Adaption** = Quotient zwischen dem *steady-state* in stimulierten und in unstimulierten Zellen

# Adaption



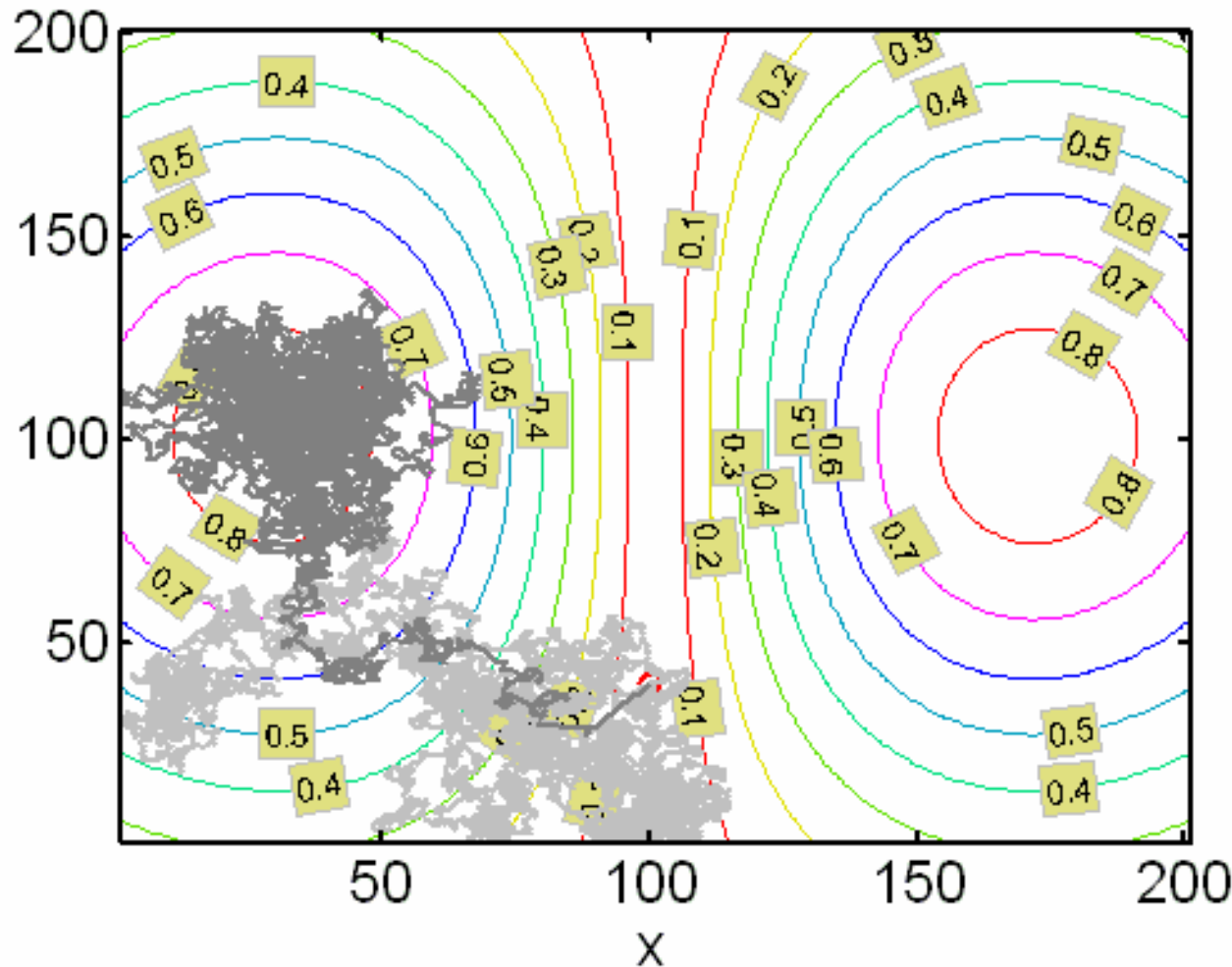
- Rezeptor kann reversibel methyliert werden
- Ein **höheres Level** von Methylierung erhöht die Wahrscheinlichkeit des **Komplexes im aktiven Zustand** zu sein
- Dies kann den **Effekt des Liganden ausgleichen**

## Fazit:

Umso aktiver CheA ist (mehr *tumbling*) umso empfindlicher wird das System auf Ligandenbindung

# Adaption

Chemotaxis of E.coli



Average concentration for chemotaxis:  
0.8025

Average concentration without chemotaxis:  
0.3203

Average concentration in environment  
0.4713

Concentration at start:  
0.0138

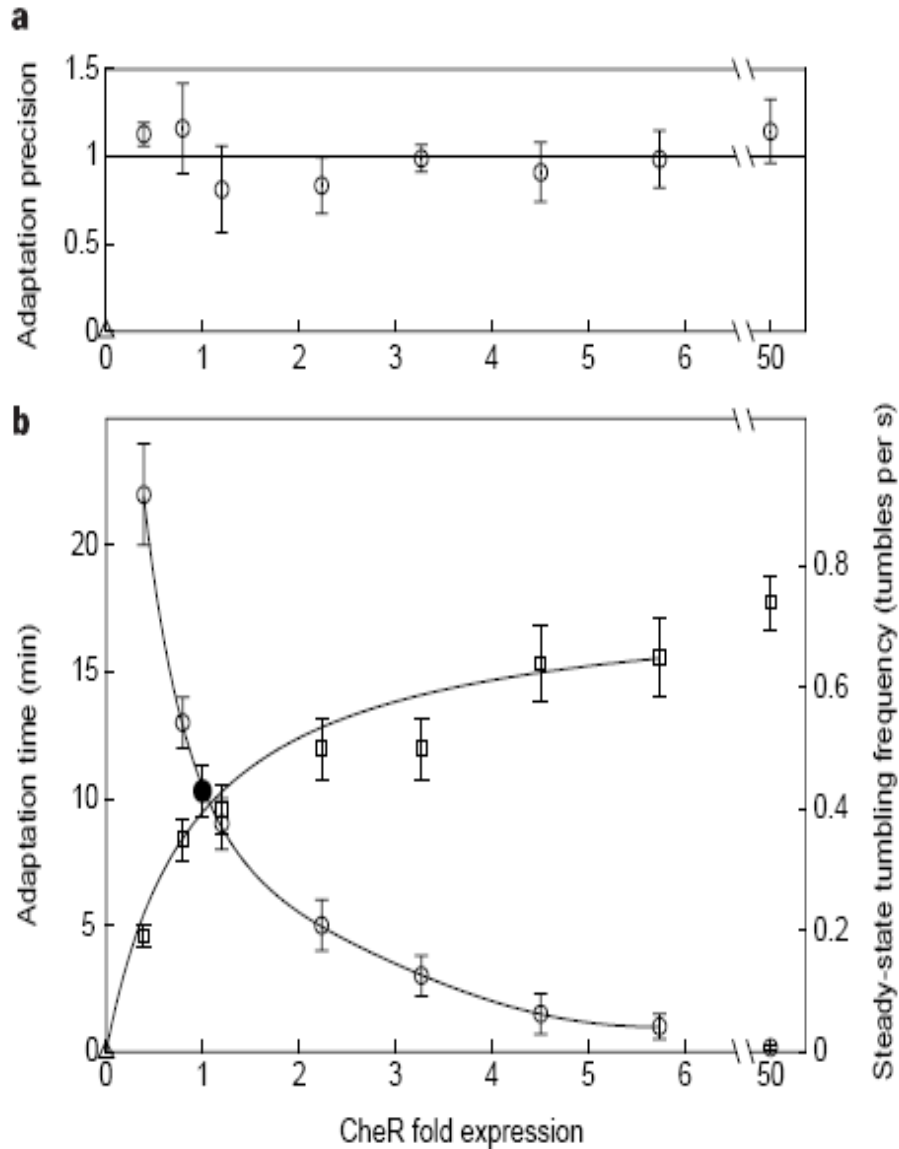
# Adaption

- E.coli reagiert bereits auf 10 nM Aspartat (10 Moleküle pro Volumen einer E.Coli Zelle)
- Eine Veränderung der Rezeptorbelegung um 0.2% erzeugt 23% Änderung in der Rotation der Flagellen

# Robustheit

- Signaltransduktionsnetzwerk unterliegt Variationen der biochemischen Parameter (Proteinkonzentrationen)
- Wie robust ist das Netzwerk bei Variation der Proteinkonzentrationen?
- Bleiben die Eigenschaften des Netzwerkes (*Adaption time, Adaption precision, stady-state tumbling frequency*) erhalten?
- Welche Eigenschaft des Netzwerkes macht es robust?

# Robustheit



Überexpressieren von CheR führt zu:

- *Adaption time*



- *Stady-state tumbling frequency*



- *Adaption precision*



# Robustheit

**Table 1 Effect of variation in chemotaxis protein levels on behaviour**

Protein varied	Fold expression	Strain background	Steady-state tumbling frequency (s <sup>-1</sup> )	Adaptation time (min)	Precision of adaptation
Wild type	1.0	Wild type (RP437)	0.44 ± 0.03	10 ± 1	0.98 ± 0.05
CheB*	0.4 ± 0.1	ΔcheB (RP4972)	0.66 ± 0.05	7 ± 1	0.98 ± 0.12
CheB*	12 ± 3	ΔcheB (RP4972)	0.14 ± 0.02	15 ± 1	1.09 ± 0.11
CheBct	~1	ΔcheB (RP4972)	0.74 ± 0.06	9 ± 2	0.90 ± 0.13
CheY‡	0.2 ± 0.1	ΔcheY,Z (RP5231)	0.24 ± 0.04	11 ± 3	1.04 ± 0.08
CheZ	0	ΔcheZ (RP1616)	1.6 ± 0.1	10 ± 2	1.1 ± 0.14
Tar, Tap, CheR,B,Y,Z§	5 ± 2¶	Wild-type (RP437)	0.30 ± 0.06	3 ± 1	1.04 ± 0.07

Cells were stimulated with 1 mM L-aspartate. Behavioural results are mean and standard deviation of triplicate experiments. Fold expression is relative to RP437, shown as mean and standard deviation of four independent immunoblot determinations using affinity-purified polyclonal antibodies.

\* Plasmid pUA3.

† Plasmid pME304 (ref. 21).

‡ Plasmid pLC576 (ref. 14).

§ Plasmid pCR73 (ref. 18).

|| CheBc fold expression estimated against wild-type CheB in RP437.

¶ Determined using antibodies against CheR and CheB.

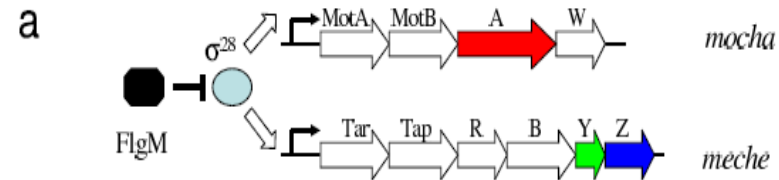
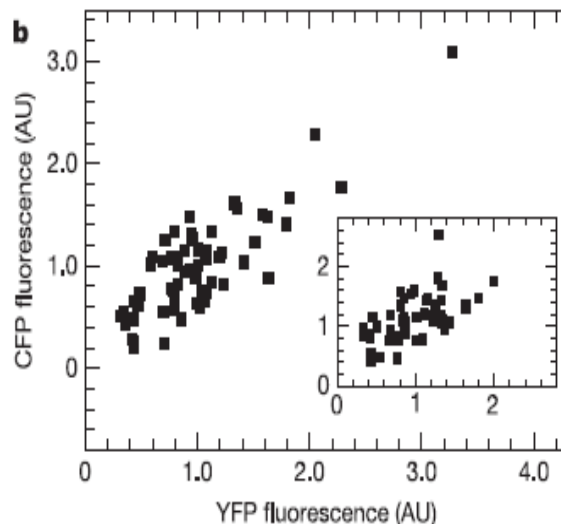
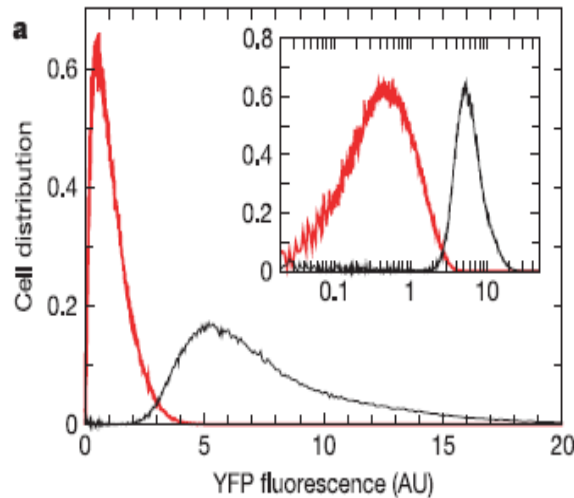
Alon et al. Robustness in bacterial chemotaxis  
Nature, 1999 Vol 397

*Adaption precision* ist robust gegen vielfältige Proteinkonzentrationsvariationen während *stady-state tumbling frequency* und *adaption time* nicht robust sind.

Auch Zellen bei denen CheB nicht auf CheA reagiert zeigen Adaption.

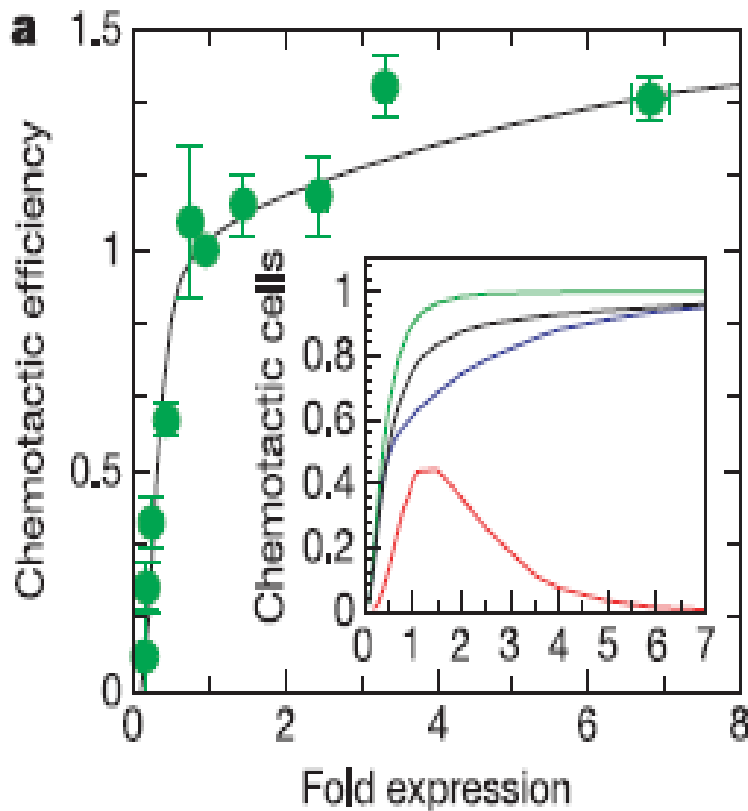


# Variation der Genexpression



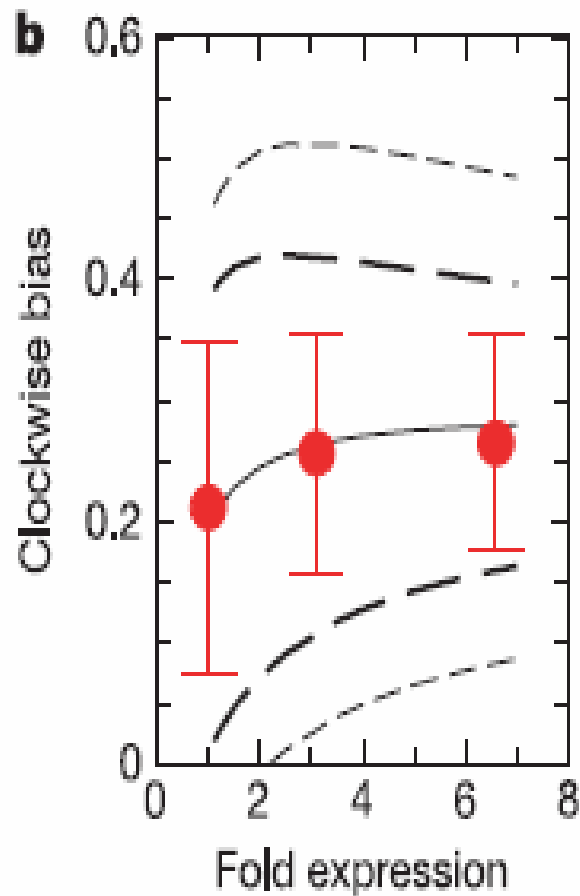
- **Starke abhängige Variationen** in der Genexpression von CheY und CheZ aufgrund von Fluktuationen in der transkriptionalen Aktivität (extrinsisches Rauschen)
- **Kleinere unabhängige Variationen** aufgrund von stochastischen Effekten bei der Transkription und Translation (intrinsisches Rauschen)

# Effekt der Variation



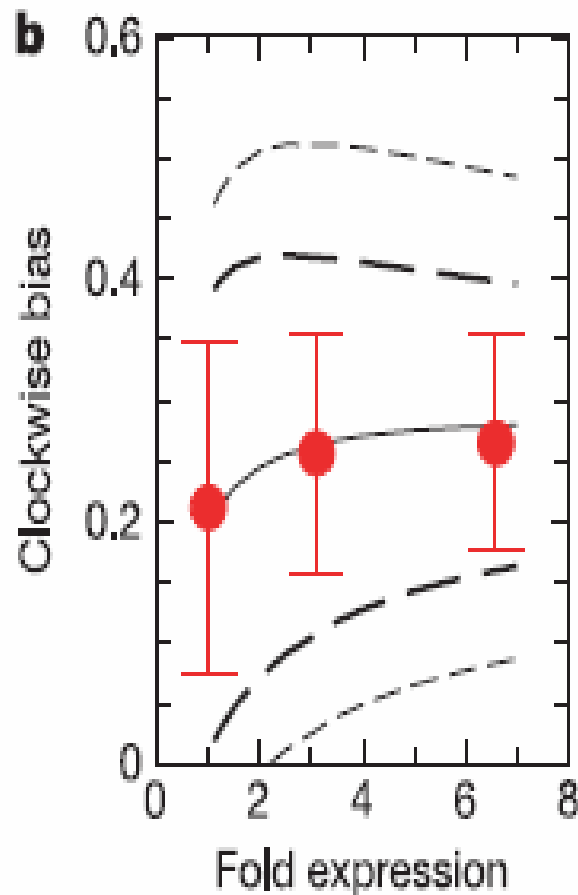
- **Starke Überexpression** aller Proteine (bis 6.6 fach) hatte nur einen **kleinen Effekt** auf die Fähigkeit der Zellen zur Chemotaxis
- Auch bei einer solchen starken Überexpression scheint die **Konzentration von CheY+p im Arbeitsbereich des Flagellenmotors** zu sein.

# Effekt der Variation



- Durchschnittliche Zeit, die der Flagellenmotor sich im Uhrzeigersinn dreht ist von der Überexpression nahezu unbeeinflusst.

# Effekt der Variation

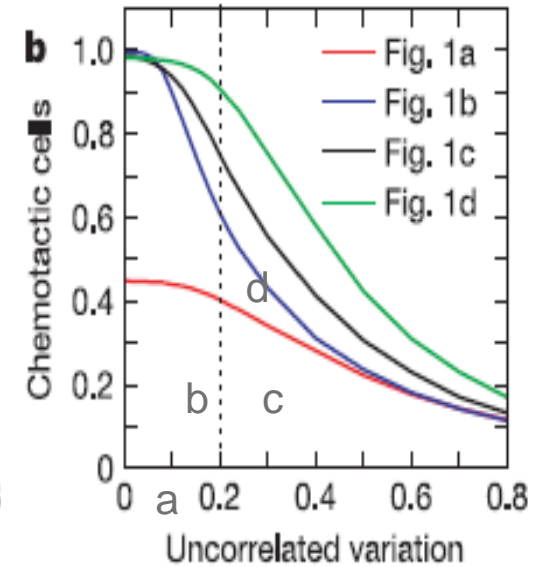
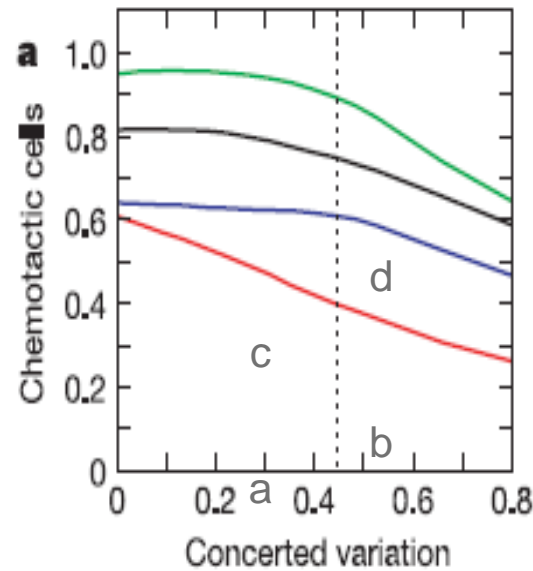
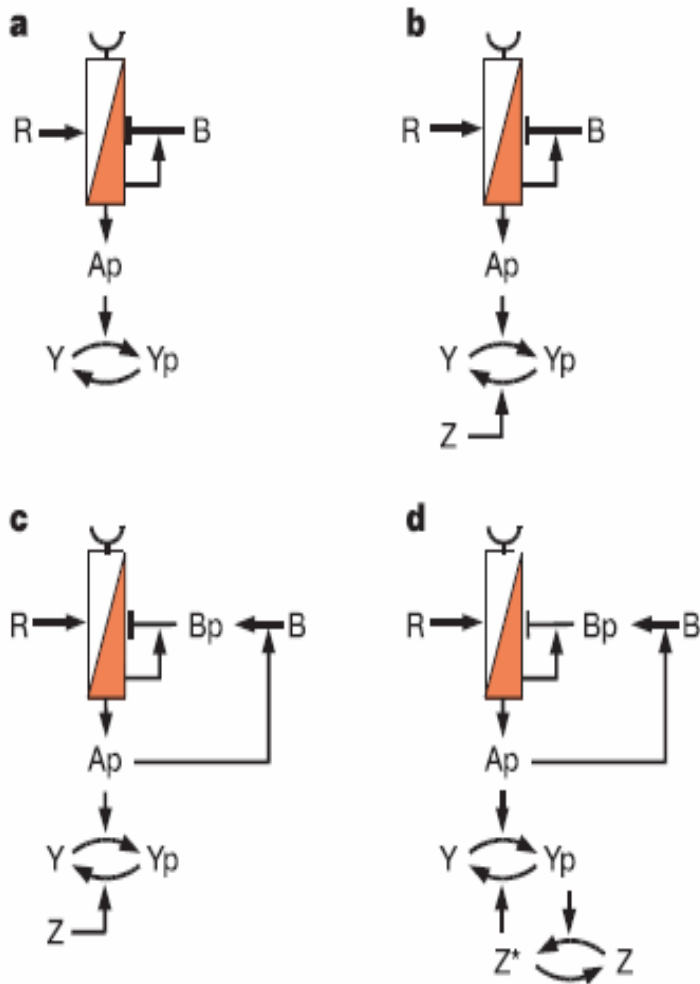


- Zeit, die der Flagellenmotor sich im Uhrzeigersinn dreht ist von der Überexpression nahezu unbeeinflusst.

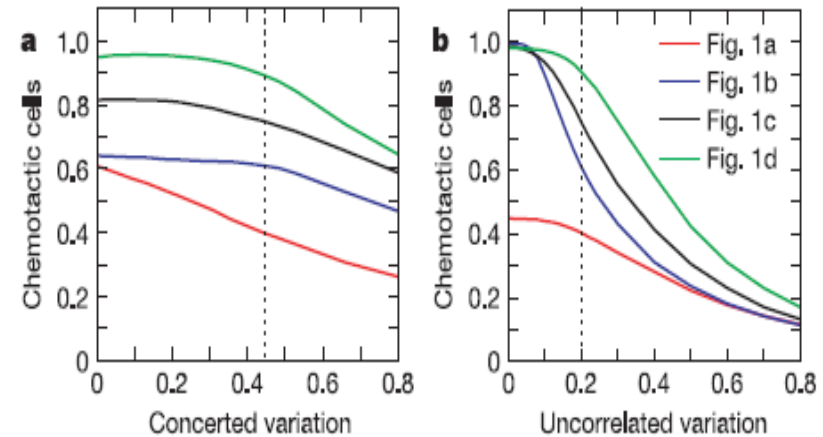
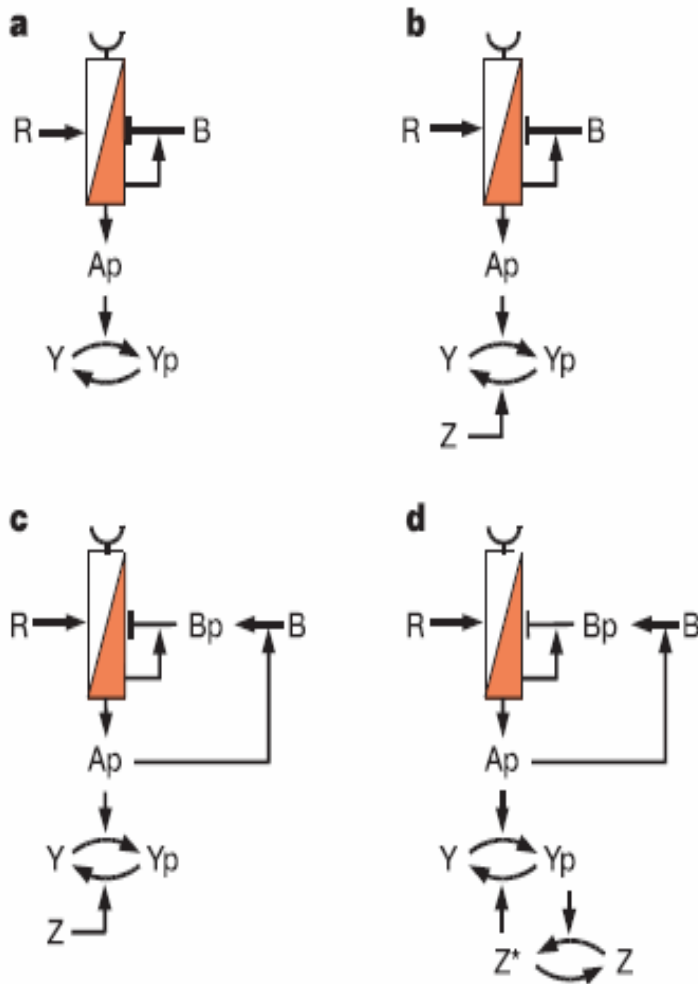


- Konzentration CheY +p darf höchstens 1/3 über dem optimalen Wert liegen, damit die E.Coli Zelle nicht kontinuierlich schwimmt oder *tumbelt*.

# Unterdrückung der Variabilität



# Unterdrückung der Variabilität



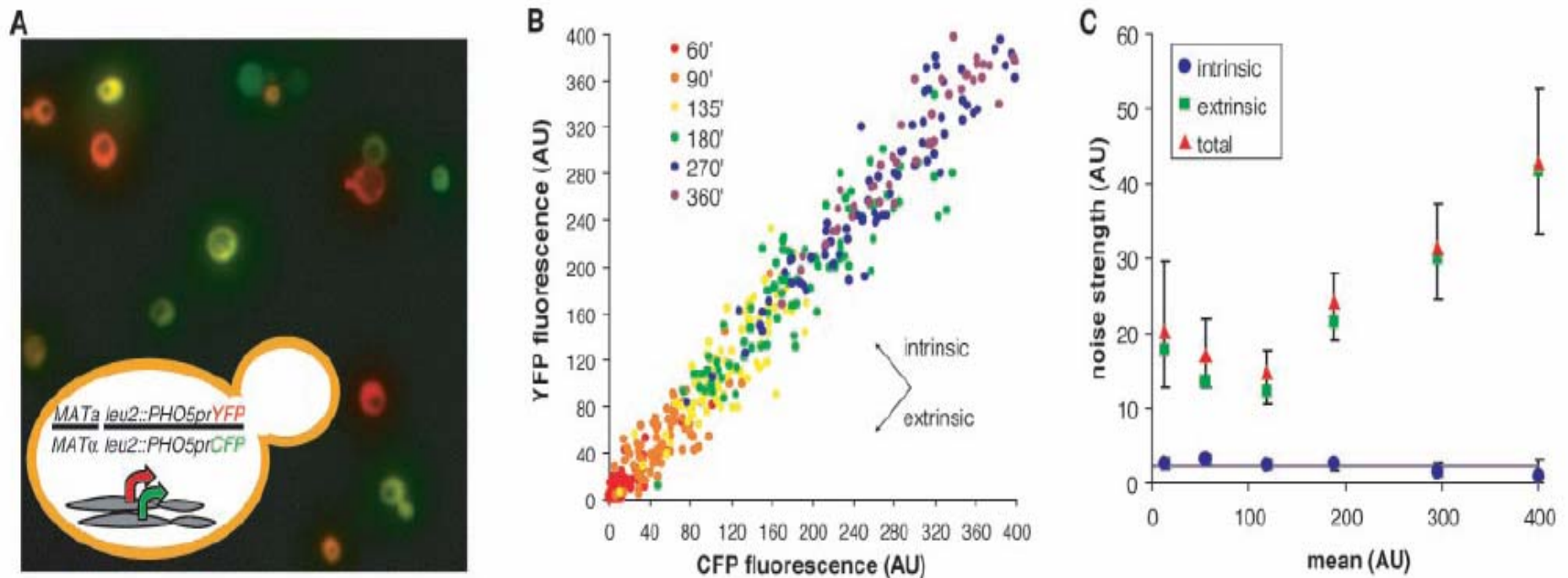
Topologien b bis d können eine abhängige Variation (extrinsisch) gut kompensieren – eine unabhängige Variation (intrinsisch) hingegen nur im kleinen Maße

c) und d) verhindern nur das Rauschen mit Hilfe zusätzlicher Feedbackschleifen besser als b)

# Genexpression in Eukaryoten

Auch in Eukaryoten scheint **extrinsisches Rauschen** in **hohem Maße** zur Genexpression dazuzugehören, wohingegen **intrinsches Rauschen** verhindert wird.

# Gene expression in Eukaryotes

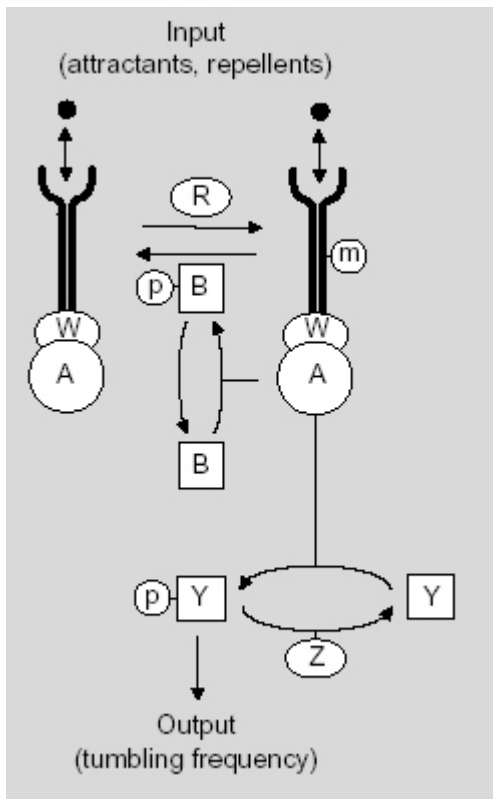


**Fig. 1.** Separation of intrinsic and extrinsic noise for the *PHO5* promoter. (A) A false-color overlay of YFP (red) and CFP (green) fluorescence micrographs from a diploid yeast strain that expresses YFP and CFP from identical promoters at homologous loci, as diagrammed in the inset. (B) Scatter 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).



# Fazit



Der Chemotaxis Signaltransduktionsweg in E.Coli zeigt, dass ein solches Netzwerk mit **extrinscher Variation in der Genexpression** umgehen kann, ohne dass die Fähigkeit zu genauen Quantifizierung verloren geht.

# Danke für die Aufmerksamkeit!

Raser, J. M. & O'Shea, E. K. Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* 304, 1811--1814 (2004).

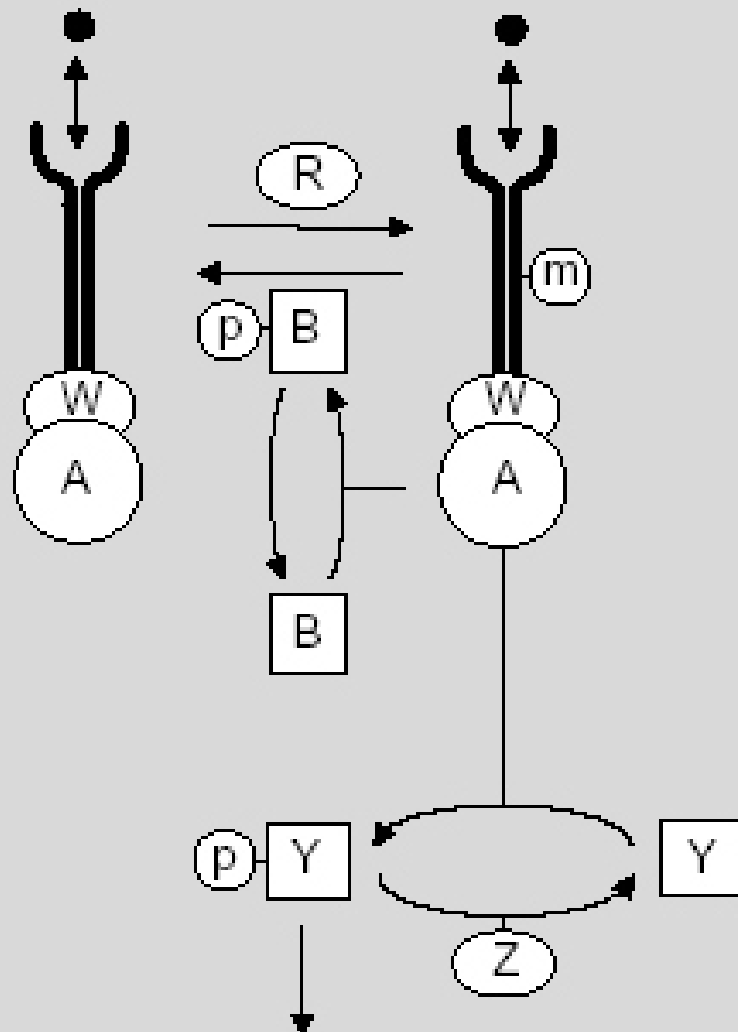
Kollmann et al., *Nature* Vol 428, 2005, p 504-507

Alon et al. Robustness in bacterial chemotaxis  
*Nature*, 1999 Vol 397

AgentCell: a digital single-cell assay for  
bacterial chemotaxis", *Bioinformatics*  
(2005), 21(11), 2714-2721

Turner, L., Ryu, W.S., and Berg, H.C. "Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments." *J. Bacteriol.* 182, 2793-2801 (2000).

Input  
(attractants, repellents)



Output  
(tumbling frequency)