

# Kleine genetische Netze: Einfache Steuerungsprogramme

Von  
Sabine Pilari  
und  
Marvin Schulz

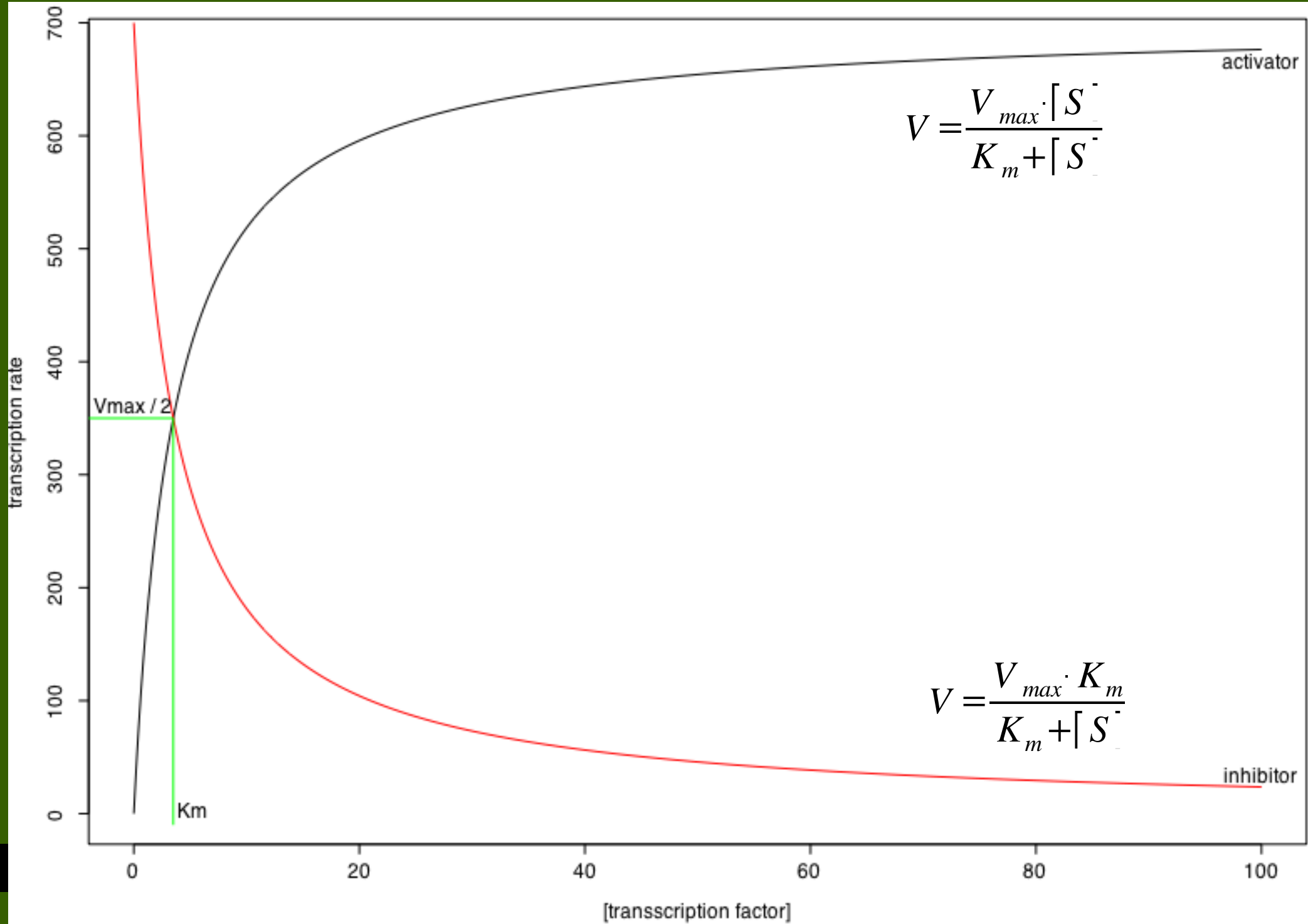
# Inhalt

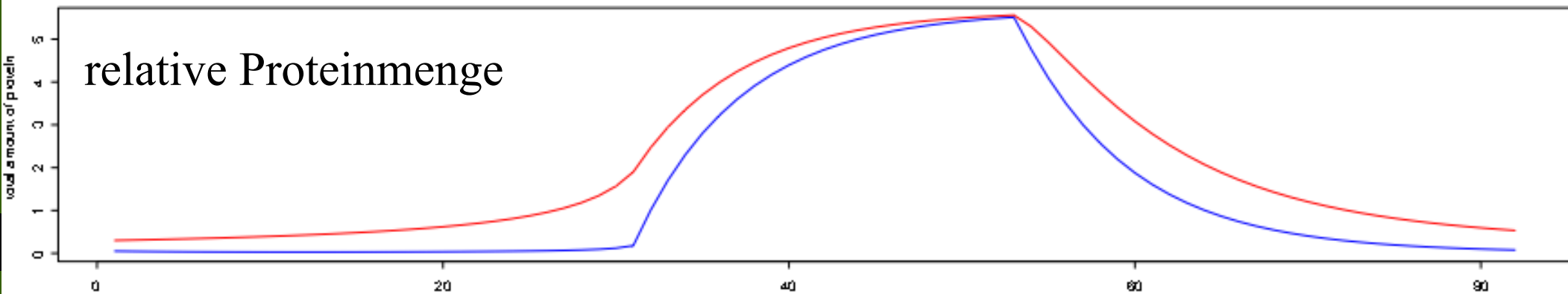
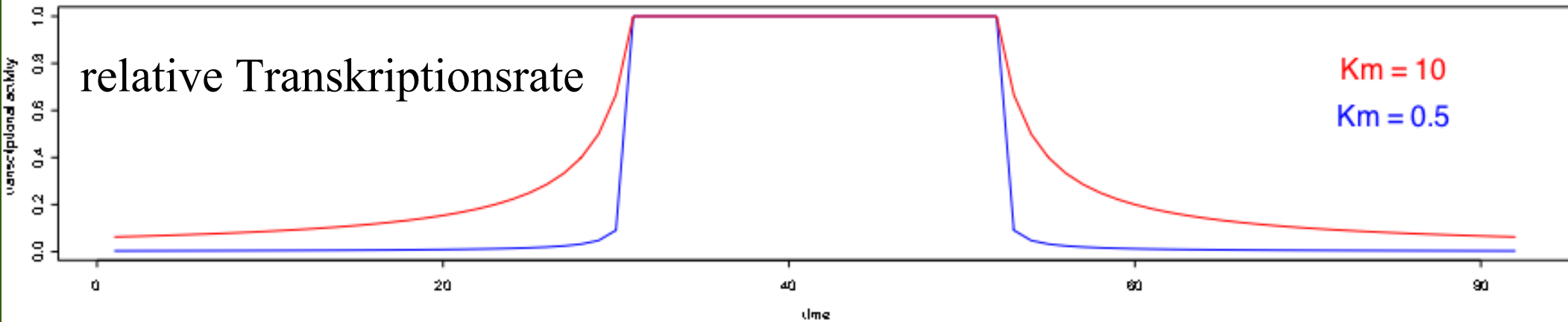
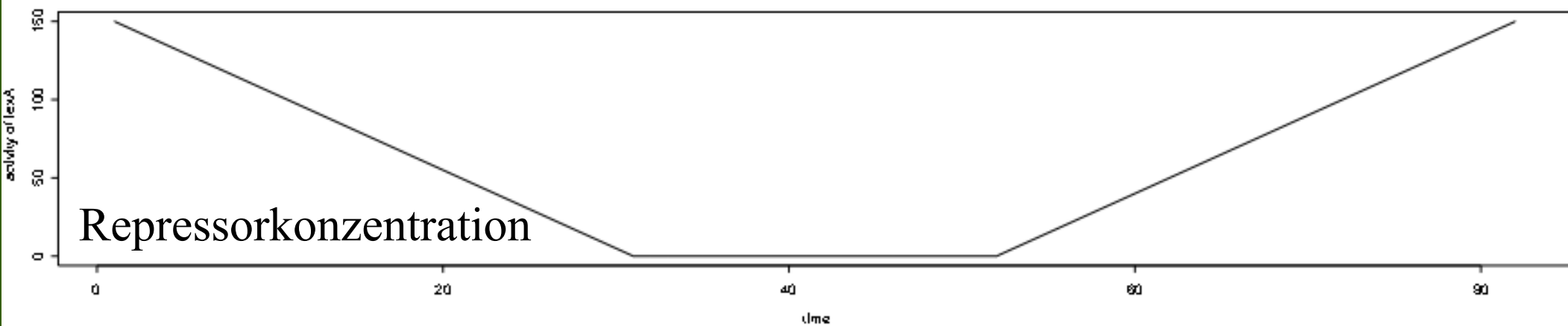
- Mathematische Grundlagen der Transkriptionskinetik
- Möglichkeiten eines Transkriptionsfaktors:  
SOS – DNA Reparatursystem in E.coli
  - Aufbau des Systems
  - Errechnete Parameter
  - Einfluss der Parameter auf das System
- Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsfaktoren:  
Flagellen-Synthese in E.coli
  - Biologischer Hintergrund
  - Mathematisches Modell

# Einfache Modellierung eines Transkriptionsnetzes

Annahmen:

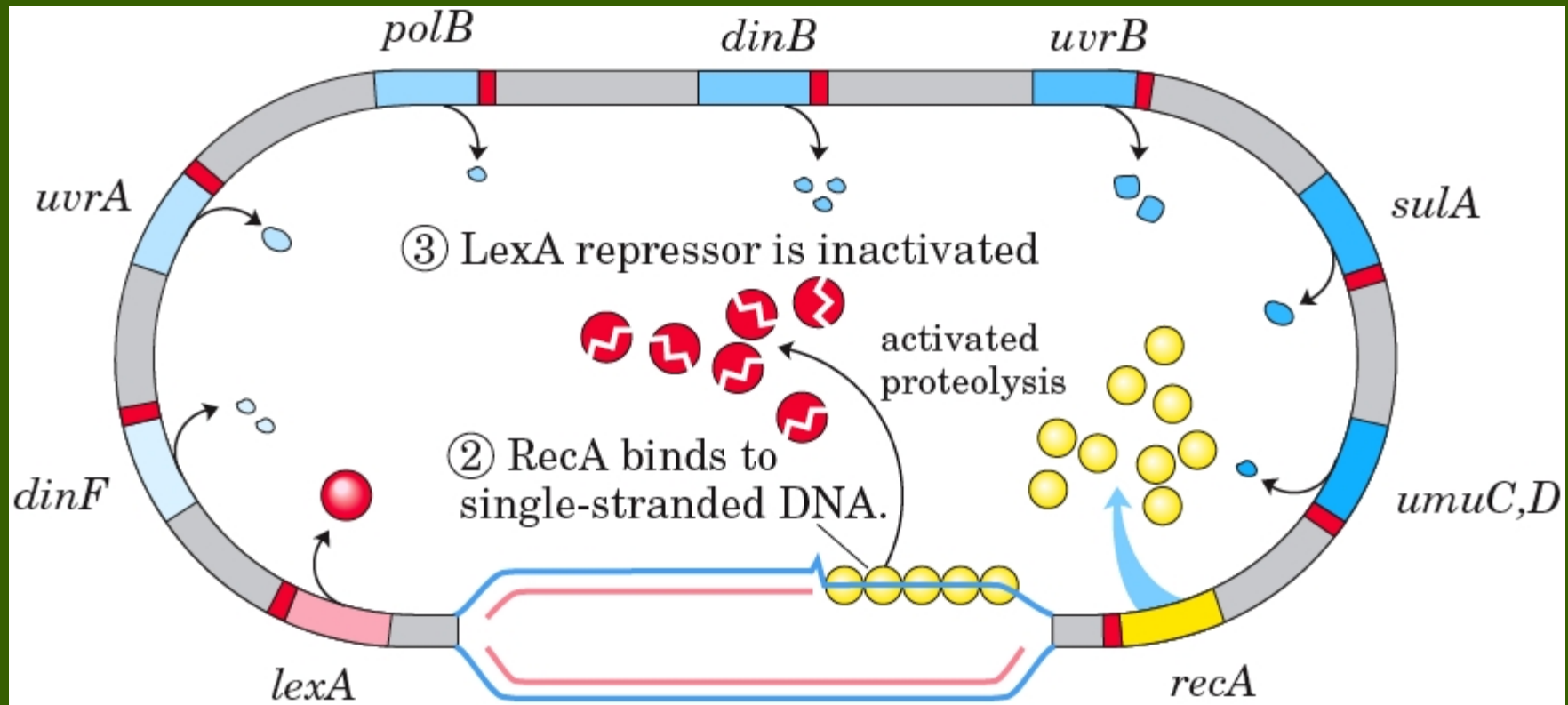
- Proteinmenge hängt nur von der Transkriptionsrate ab
- Transkriptionsrate hängt nur von der Menge gebundenem Transkriptionsfaktor ab
- TF wirken nicht kooperativ  
→ Bindungskinetik hat Michaelis-Menten Form







# SOS – DNA Reparatursystem



**TABLE 25-6** Genes Induced as Part of the SOS Response in *E. coli*

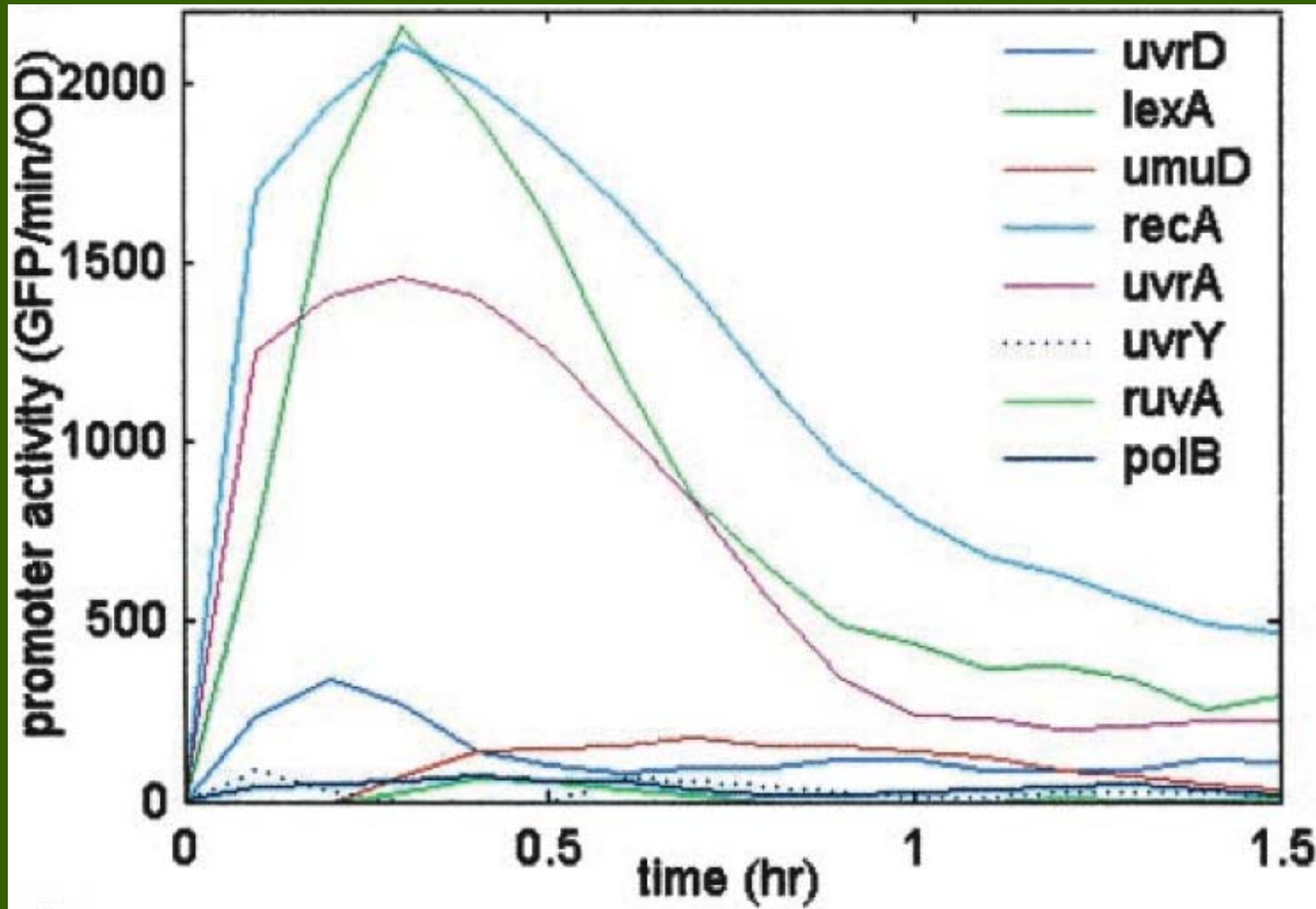
<i>Gene name</i>	<i>Protein encoded and/or role in DNA repair</i>
<b>Genes of known function</b>	
<i>polB (dinA)</i>	Encodes polymerization subunit of DNA polymerase II, required for replication restart in recombinational DNA repair
<i>uvrA</i> }	Encode ABC excinuclease subunits UvrA and UvrB
<i>uvrB</i> }	
<i>umuC</i> }	Encode DNA polymerase V
<i>umuD</i> }	
<i>sulA</i>	Encodes protein that inhibits cell division, possibly to allow time for DNA repair
<i>recA</i>	Encodes RecA protein, required for error-prone repair and recombinational repair
<i>dinB</i>	Encodes DNA polymerase IV
<b>Genes involved in DNA metabolism, but role in DNA repair unknown</b>	
<i>ssb</i>	Encodes single-stranded DNA-binding protein (SSB)
<i>uvrD</i>	Encodes DNA helicase II (DNA-unwinding protein)
<i>himA</i>	Encodes subunit of integration host factor (IHF), involved in site-specific recombination, replication, transposition, regulation of gene expression
<i>recN</i>	Required for recombinational repair
<b>Genes of unknown function</b>	
<i>dinD</i>	
<i>dinF</i>	



**TABLE 25-6** Genes Induced as Part of the SOS Response in *E. coli*

<i>Gene name</i>	<i>Protein encoded and/or role in DNA repair</i>
<b>Genes of known function</b>	
<i>polB (dinA)</i>	Encodes polymerization subunit of DNA polymerase II, required for replication restart in recombinational DNA repair
<i>uvrA</i> }	Encode ABC excinuclease subunits UvrA and UvrB
<i>uvrB</i> }	
<i>umuC</i> }	Encode DNA polymerase V
<i>umuD</i> }	
<i>sulA</i>	Encodes protein that inhibits cell division, possibly to allow time for DNA repair
<i>recA</i>	Encodes RecA protein, required for error-prone repair and recombinational repair
<i>dinB</i>	Encodes DNA polymerase IV
<b>Genes involved in DNA metabolism, but role in DNA repair unknown</b>	
<i>ssb</i>	Encodes single-stranded DNA-binding protein (SSB)
<i>uvrD</i>	Encodes DNA helicase II (DNA-unwinding protein)
<i>himA</i>	Encodes subunit of integration host factor (IHF), involved in site-specific recombination, replication, transposition, regulation of gene expression
<i>recN</i>	Required for recombinational repair
<b>Genes of unknown function</b>	
<i>dinD</i>	
<i>dinF</i>	

# Aktivität der einzelnen Promotoren



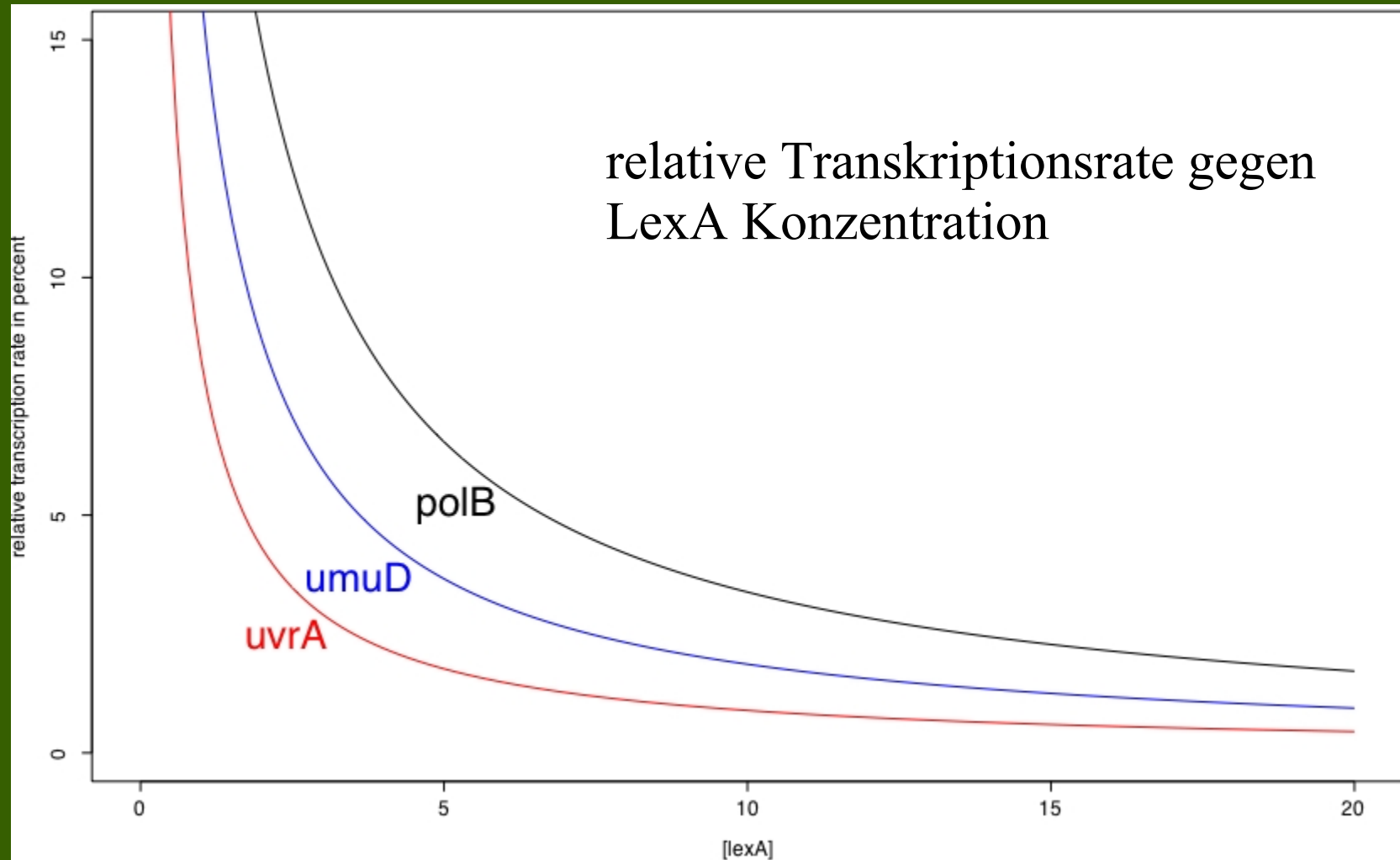
# Errechnete kinetische Parameter

Table 1. The effective kinetic parameters for the SOS system ( $\pm$ SD)

Gene	$K_m$	$V_{max}$	$E$	Function
<u><i>uvrA</i></u>	<u><math>0.09 \pm 0.04</math></u>	$2,800 \pm 300$	0.14	Nucleotide excision repair
<i>lexA</i>	$0.15 \pm 0.08$	$2,200 \pm 100$	0.10	Transcriptional repressor
<i>recA</i>	$0.16 \pm 0.07$	$3,300 \pm 200$	0.12	Mediates LexA autocleavage, blocks replication forks
<u><i>umuD</i></u>	<u><math>0.19 \pm 0.1</math></u>	$330 \pm 30$	0.21	Mutagenesis repair
<u><i>polB</i></u>	<u><math>0.35 \pm 0.15</math></u>	$70 \pm 10$	0.31	Trans-lesion DNA synthesis, replication fork recovery
<i>ruvA</i>	$0.37 \pm 0.1$	$30 \pm 2$	0.22	Double-strand break repair
<i>uvrD</i>	$0.65 \pm 0.3$	$170 \pm 20$	0.20	Nucleotide excision repair, recombinational repair
<i>uvrY</i>	$0.51 \pm 0.25$	$300 \pm 200$	0.45	SOS operon of unknown function, additional roles in two-component signaling
<i>lacZ</i>	—	—	1.53	Unrelated to SOS system

$E$  is the mean error for the promoter activity prediction (see *Methods*).

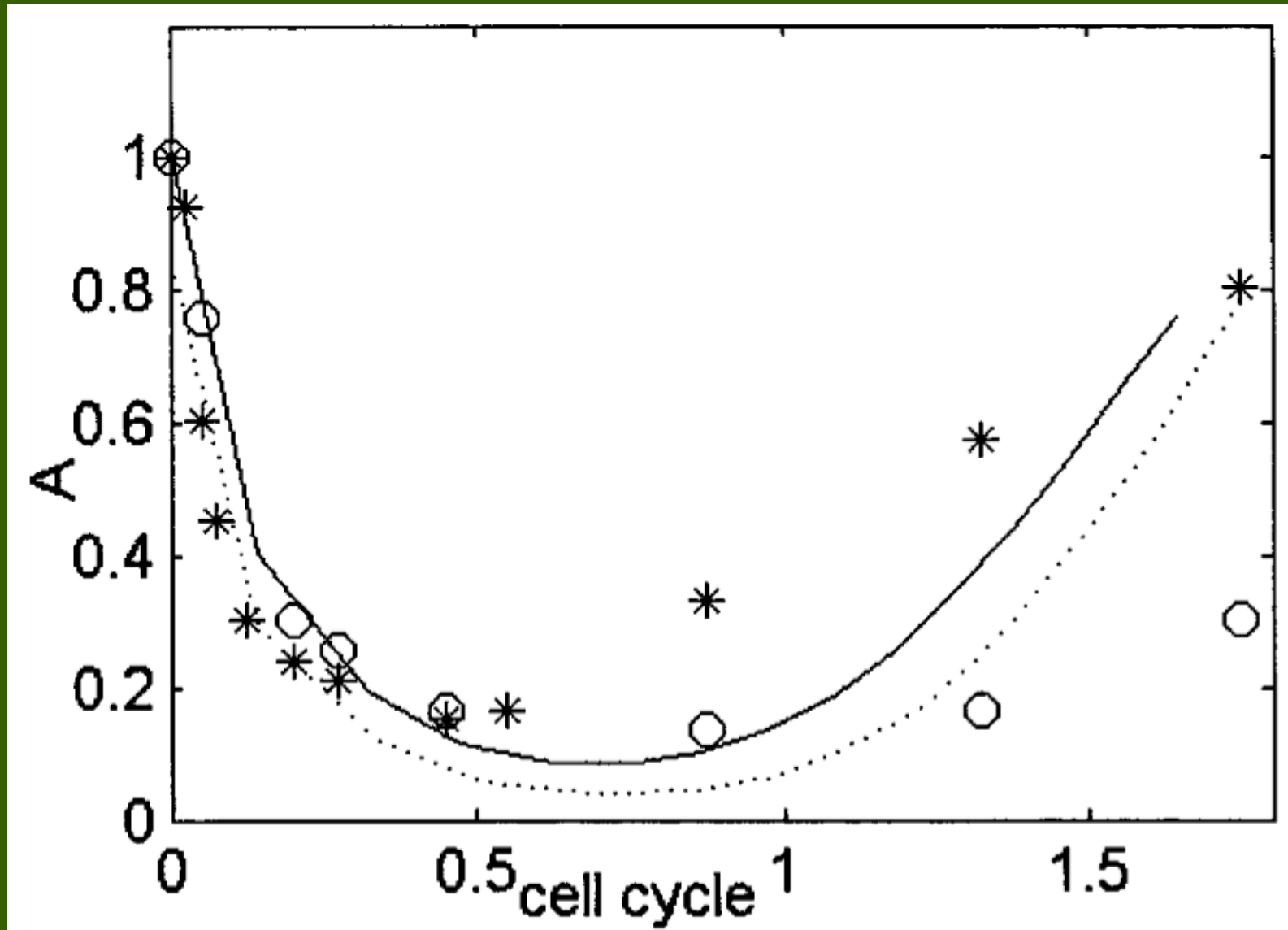
# Transkriptionsdynamik



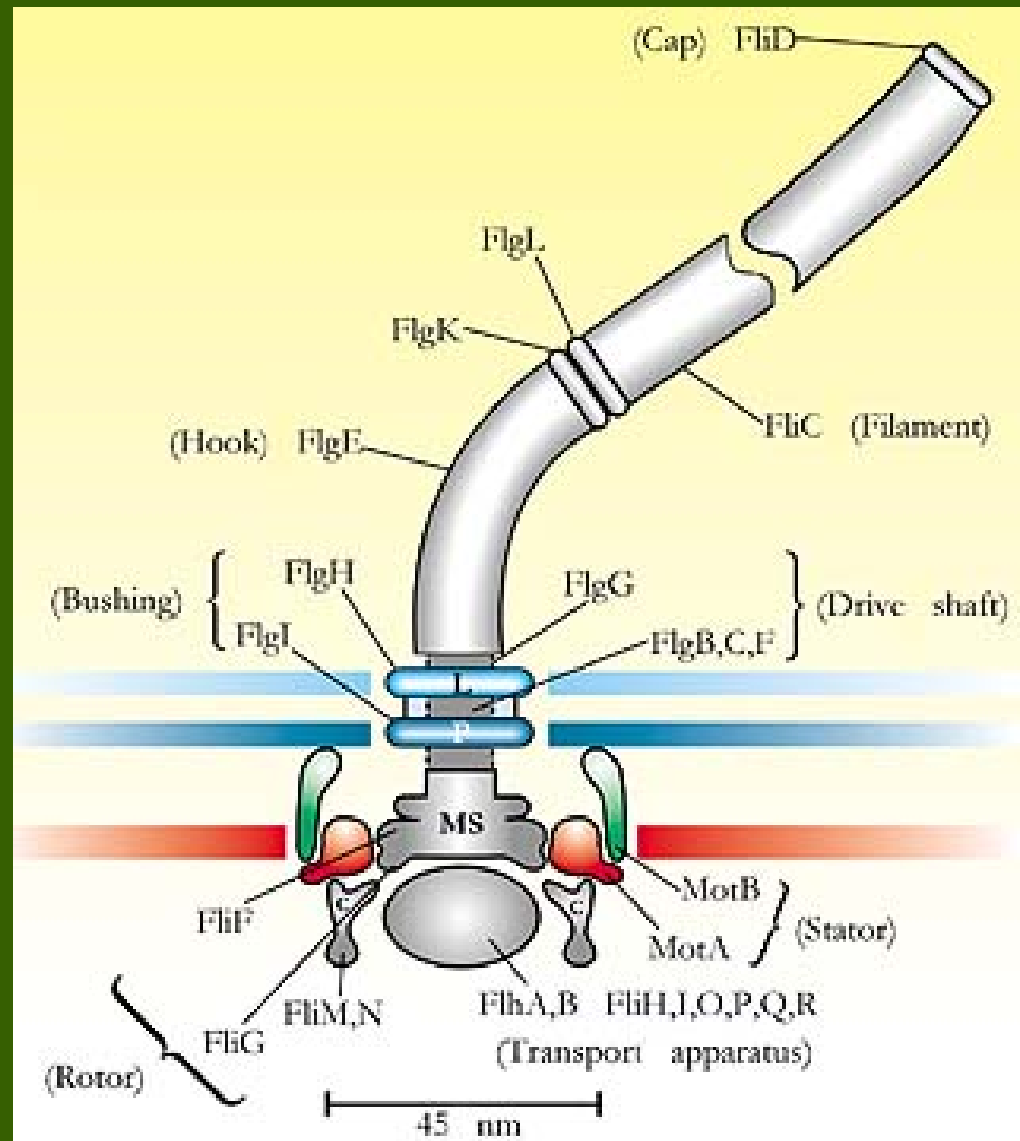
# Gesamtdynamik des Netzwerkes

- UV-Licht verursacht viele Schäden in der DNA
- Replikationsgabeln stoßen binnen Sekunden auf Schäden
  - schnelle RecA Aktivierung
  - schnelle LexA Inaktivierung

# Konzentration von LexA nach UV-Bestrahlung



# Konstruktion von Flagellen



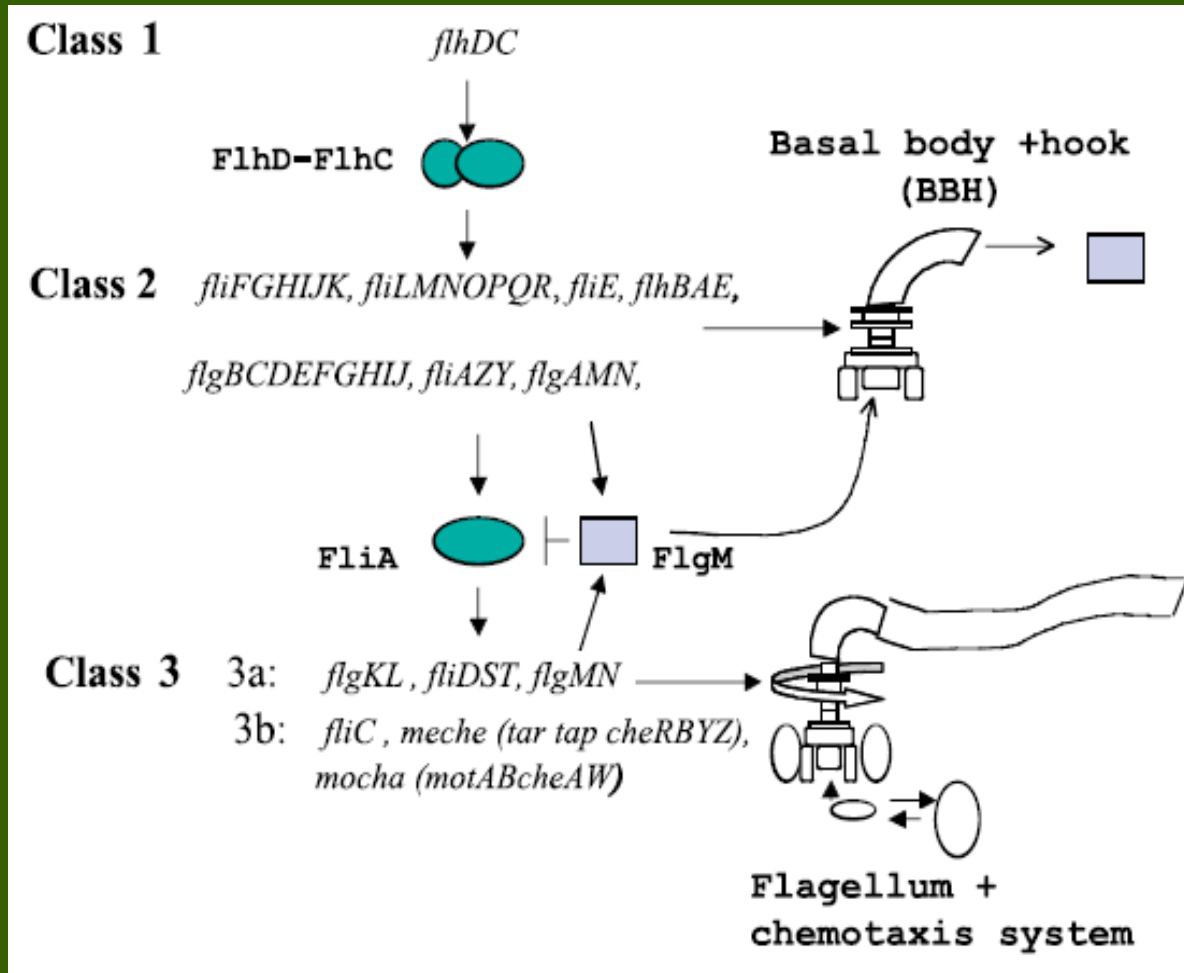
## Quelle:

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>

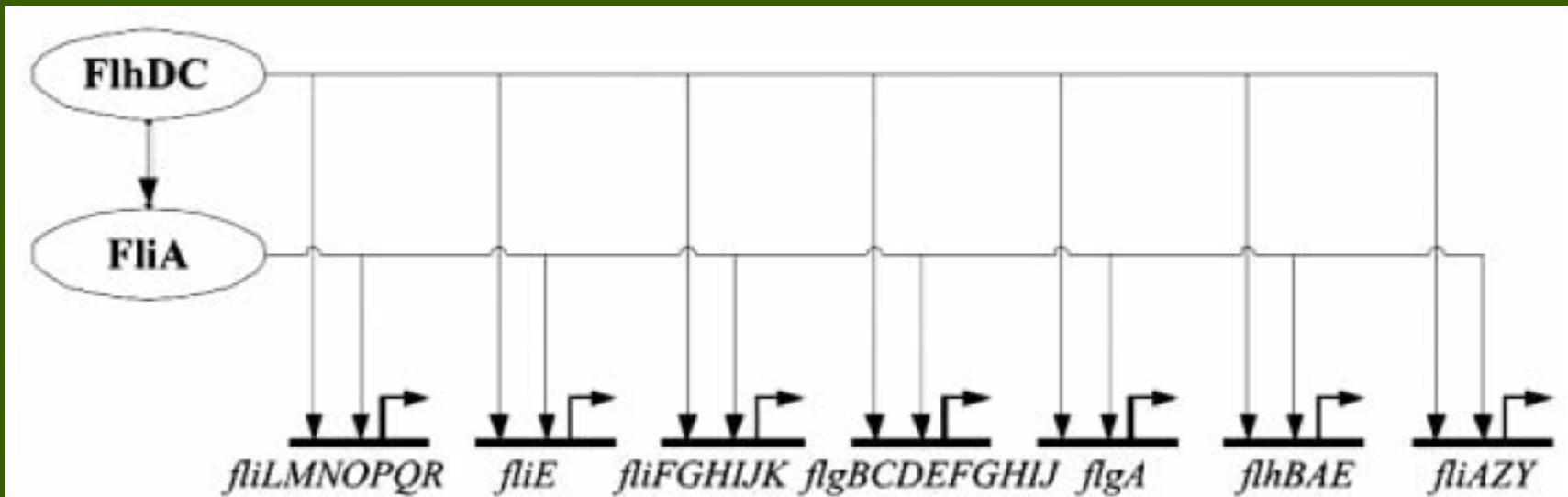
# Flagella Gene Network - Überblick



Quelle: Kalir – Ordering Genes in a Flagella Pathway by Analysis of Expression Kinetics from Living Bacteria



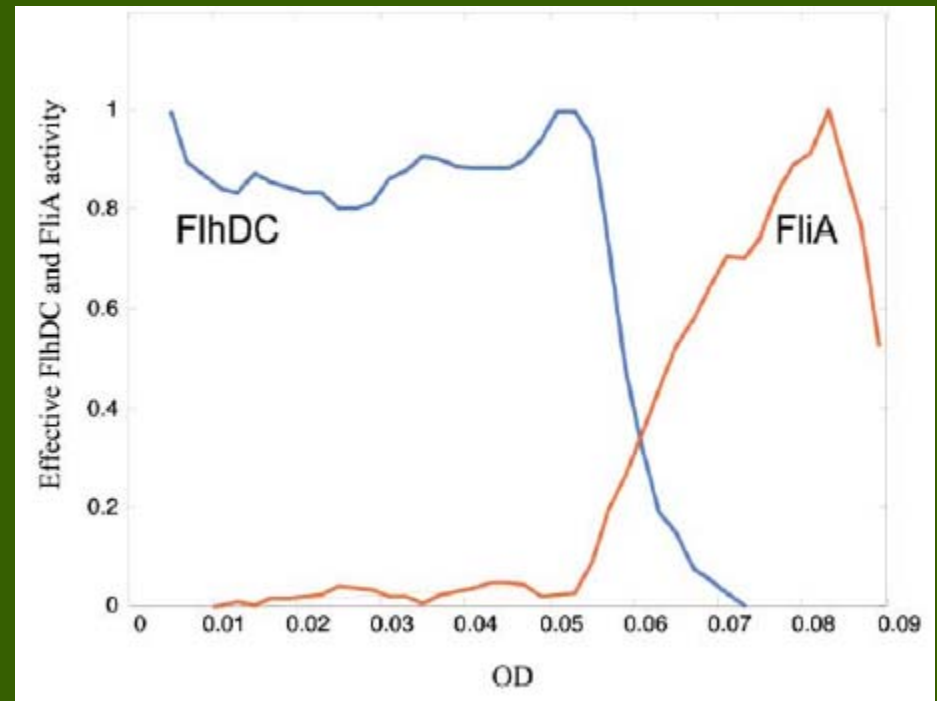
# Flagella Gene Network - Überblick



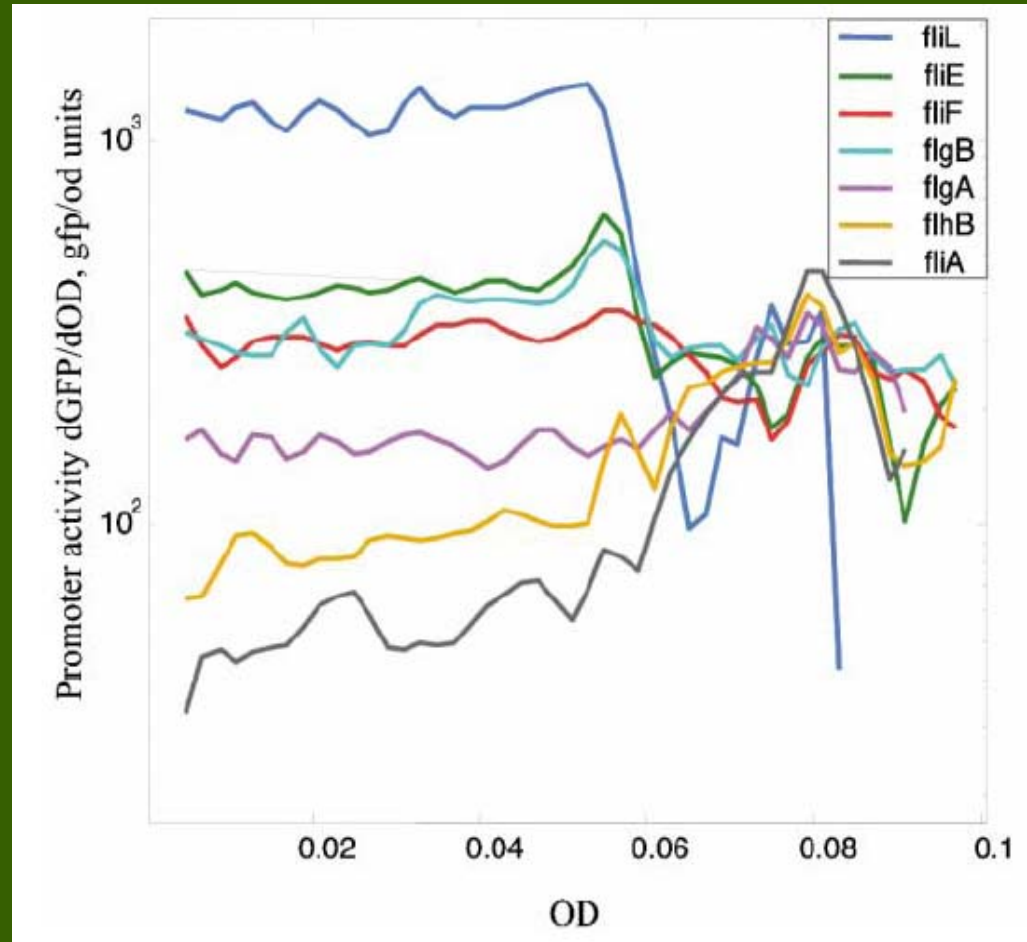
- FlhDC als Masterregulator
- FliA als Downstreamregulator (exprimiert vom *fliAZY*-Operon)
- FlgM als Inhibitor von FliA (exprimiert von Klasse2- und 3-Operons)
- Aktivierung der Klasse2-Operons in zeitlicher Abfolge

# Promotoraktivität der Klasse2-Operons erfolgt in zwei Phasen

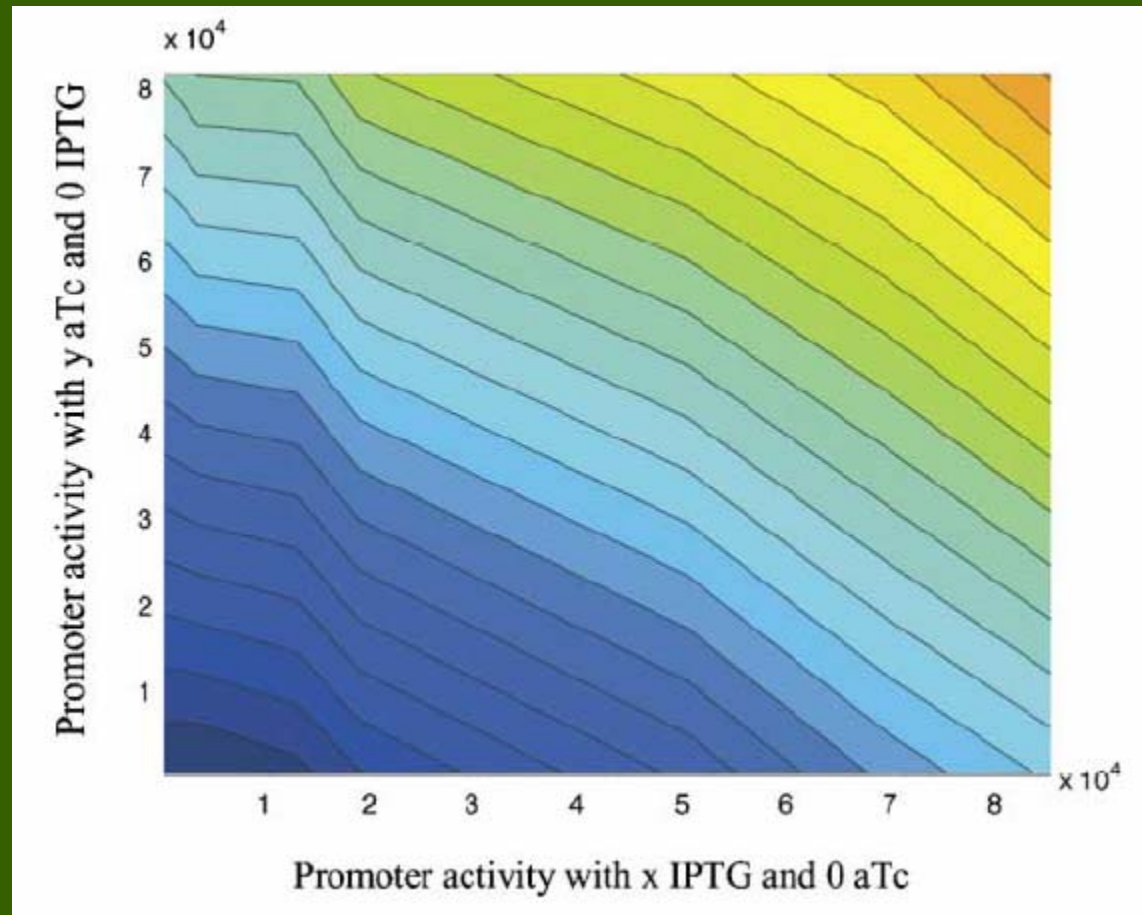
1. jeder Promotor mit unterschiedlich starker, aber konstanter Aktivität
  - nur FlhDC ist aktiviert, nicht FliA
  - FliA wird als letztes der Klasse2-Operons aktiviert
2. Promotoraktivitäten nähern sich an
  - FlhDC-Aktivität sinkt, FliA-Aktivität nimmt zu
  - Beginn der Klasse3-Operon-Aktivierung



# Aktivität der Klasse2-Promotoren



# Promotoraktivität von *fliL*



# Herleitung des mathematischen Modells

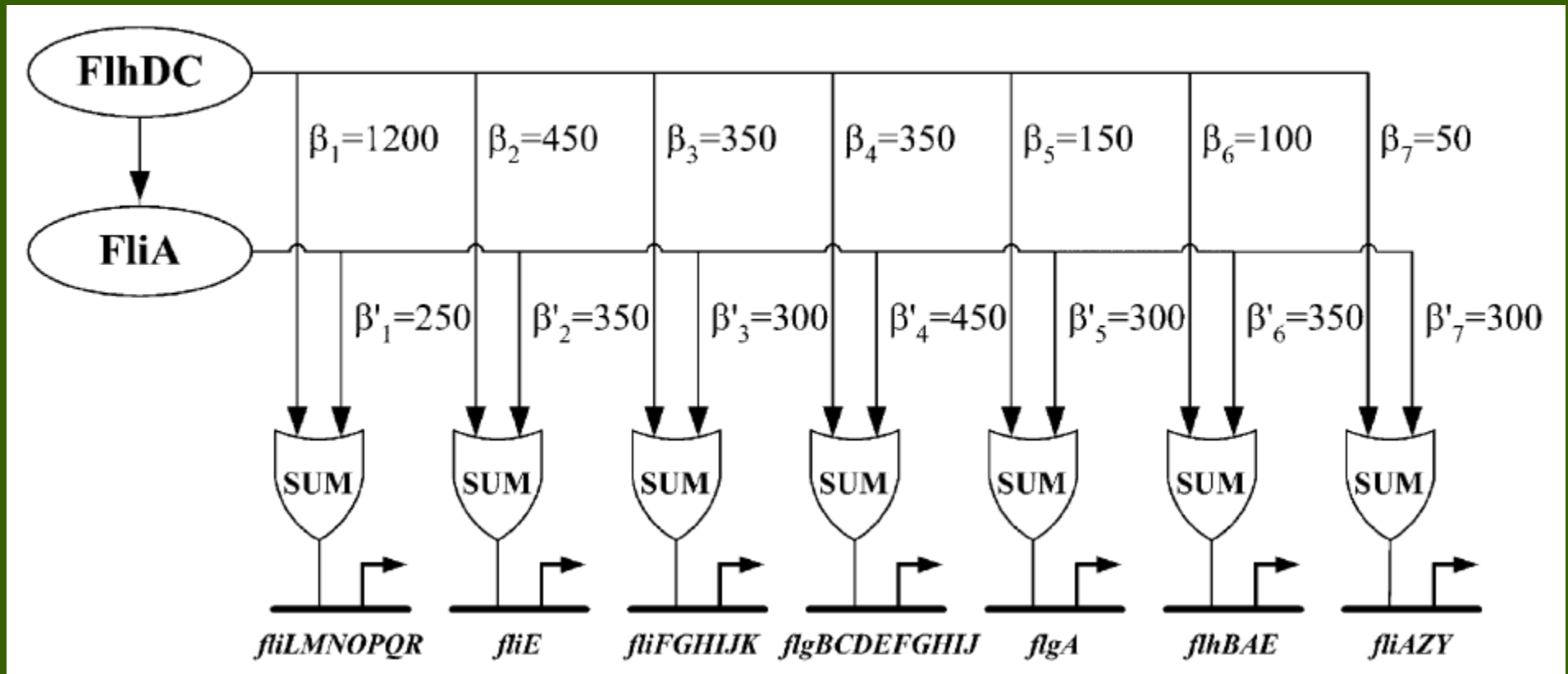
- n Messungen der i Promotoren  
→ i Vektoren im n-dimensionalen Raum
- Eine Ebene des Raums (mit Basisvektoren A und B) erklärt 97% der Varianz in der Promotoraktivität
- X(t) (FlhDC-Aktivität) und Y(t) (FliA-Aktivität) in dieser Ebene → darstellbar als Linearkombination:  
 $X(t) = aA + bB$  und  $Y(t) = cA + dB$
- 4 Annahmen:  $\max(X)=1$ ,  $\max(Y)=1$ ,  $X(t=0)=1$ ,  $Y(t=0)=0$   
→ Werte für a, b, c, d
- Alle Promotoraktivitäten nun als Linearkombination von X(t) und Y(t) darstellbar

# Mathematisches Modell des Klasse2- Gennetzwerkes

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

- $P_i(t)$  – Aktivität der einzelnen Promotoren
- $X(t)$  – Aktivität von FlhDC
- $Y(t)$  – Aktivität von FliA
- $\beta_i$  – Aktivierungskoeffizient resultierend aus FlhDC-Aktivität
- $\beta'_i$  – Aktivierungskoeffizient resultierend aus FliA-Aktivität

# Vorhergesagte $\beta_i$ - und $\beta'_i$ -Werte



# Zusammenfassung

Für einen TF:

- $K_m$ s der TF-Bindung bestimmt die Expressionsabfolge
- Auf- und Abbaurate des TF bestimmt Expressionsdauer



# Zusammenfassung

Beispiel für mehrere TF:

- System mit Feedforward Loop
- Hierarchie in Promotoraktivität der Zielgene durch unterschiedlich starke Bindung des TF  
→ genaue Anpassung an Bedarf der Zelle
- Zusammenspiel mehrerer TF erzeugt Phasensystem
  - Regulation des Phase2-TF durch Regulator, der während Phase 1 hergestellt wird  
→ Checkpoint für Phasenübergang

# Quellen

- *Ronen et al., Assigning numbers to the arrows: parametrizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics, PNAS 99 (16), 10555-10560, 2002*
- *S. Kalir and U. Alon, Using a quantitative blueprint to reprogram the dynamics of the flagella gene network, Cell 117, 713-720, 2004*