

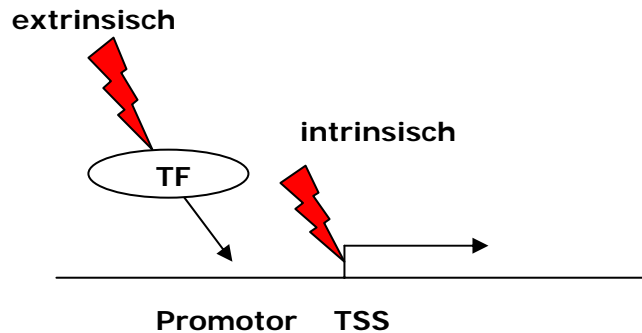


Rauschen und Robustheit

Özgür Demir
Robert Lehmann

Einführung

identische Proteinkonzentrationen
bei identischen Zellen?



Was zu welchem Rauschen gehört, ist Definitionssache !

Extrinsisches Rauschen

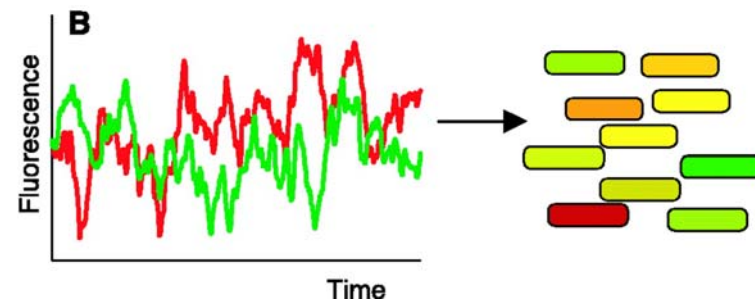
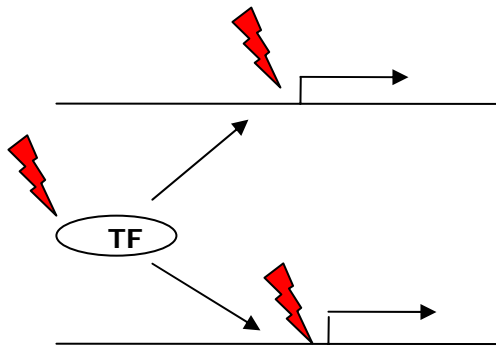
- Zellen in versch. Zellstadien
 - Versch. viele Moleküle der Transkription / Translation
 - Aktivität dieser unterschiedlich groß
 - Zellen unterschiedlich groß
- usw.

Intrinsisches Rauschen

Bindung des TF an Promotor und viele weitere Mechanismen der molekularen Maschinerie sind **stochastische Events** → an 2 Genen mit gleicher Sequenz passiert nie das gleiche

Einführung

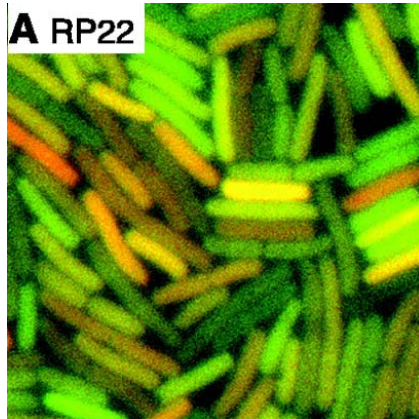
Können wir die beiden Teile des gesamten Rauschens messen / **unterscheiden**?



Intrinsisches Rauschen: Expression zweier Gene mit gleichem Promotor in einer Zelle variiert

Extrinsisches Rauschen: Expression eines Gens variiert zwischen Zellen einer Population

Einführung



Gesamtes Rauschen

Messe den Unterschied eines Reporters mit gleichem Promotor in versch. Zellen

Intrinsisches Rauschen

Unterschied zweier Reporter mit gleichem Promotor

→ Berechne aus diesen beiden das extrinsische Rauschen

Theoretischer Hintergrund

Gesamtes Rauschen:

$$\eta^2(t) = \frac{\langle P(t)^2 \rangle - \langle P(t) \rangle^2}{\langle P(t) \rangle^2},$$

$$\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N P_k^m \approx \int d\mathbf{E} d\mathbf{I} P^m(\mathbf{E}, \mathbf{I}) p(\mathbf{E}, \mathbf{I}).$$

$$\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N P_k^m \approx \int d\mathbf{E} p(\mathbf{E}) \int d\mathbf{I} P^m(\mathbf{E}, \mathbf{I}) p(\mathbf{I} | \mathbf{E}).$$

$$\langle P^m(\mathbf{E}) \rangle \equiv \int d\mathbf{I} P^m(\mathbf{E}, \mathbf{I}) p(\mathbf{I} | \mathbf{E}).$$

<> Mittel über alle intrinsischen Variablen bei festem E

$$\frac{1}{N} \sum_{k=1}^N P_k^m = \overline{\langle P^m \rangle},$$

Mittel über alle extrinsischen Variablen

$$\eta_{\text{tot}}^2 = \frac{\overline{\langle P^2 \rangle} - (\overline{\langle P \rangle})^2}{(\overline{\langle P \rangle})^2}.$$

E – Vektor der einzelnen extrinsischen Variablen pro Zelle

I – intrinsische Variablen

$P^m(\mathbf{E}, \mathbf{I})$ – Messwert bei fest gewählten E, I

$p(\mathbf{E}, \mathbf{I})$ – Wahrscheinlichkeit, E und I zu beobachten

$$\eta_{\text{tot}}^2 = \frac{\overline{\langle P^2 \rangle} - \langle P \rangle^2}{(\overline{\langle P \rangle})^2} + \frac{\overline{\langle P \rangle^2} - (\overline{\langle P \rangle})^2}{(\overline{\langle P \rangle})^2}$$

$$\equiv \eta_{\text{int}}^2 + \eta_{\text{ext}}^2$$

Theoretischer Hintergrund

Was muss ich messen, um die Rausch-Arten zu unterscheiden?

$$\eta_{\text{tot}}^2 = \frac{\overline{P^2} - \langle P \rangle^2}{(\langle P \rangle)^2} + \frac{\overline{P^2} - (\overline{P})^2}{(\langle P \rangle)^2} \equiv \eta_{\text{int}}^2 + \eta_{\text{ext}}^2$$

2 Kopien (P_k^1 , P_k^2) des selben Gens in einer Zelle gemessen → intrinsische Variablen versch./ extrinsische gleich

$$\begin{aligned} \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N P_k^{(1)} P_k^{(2)} &\approx \int d\mathbf{E} d\mathbf{I}_1 d\mathbf{I}_2 P(\mathbf{E}, \mathbf{I}_1) P(\mathbf{E}, \mathbf{I}_2) p(\mathbf{E} | \mathbf{I}_1 \mathbf{I}_2) \\ &= \int d\mathbf{E} p(\mathbf{E}) \left[\int d\mathbf{I} P(\mathbf{E}, \mathbf{I}) p(\mathbf{I} | \mathbf{E}) \right]^2 \end{aligned}$$

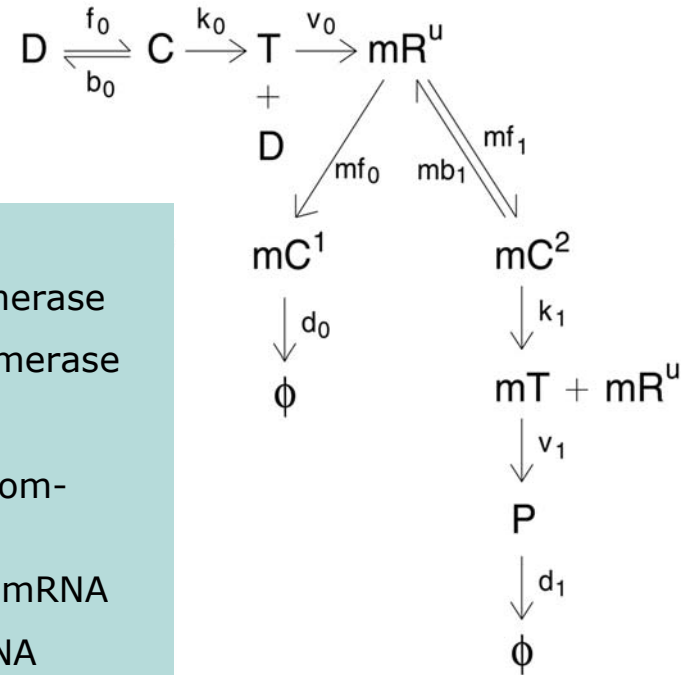
$$= \overline{P^2}, \quad (\overline{P}) \text{ sind die normalen Helligkeits Messwerte}$$

P_k^1 und P_k^2 sind Reportergene mit gleichem Promotor und versch. Farben (cfp, yfp)

→ Berechne $\overline{P^2}$, und damit η_{ext}^2 → hieraus dann η_{int}^2

Modell für Intrinsisches Rauschen

Modell für die Bildung eines neuen Moleküls



D – Promotor des Gens

C – Promotor + RnaPolymerase

T – transkribierende Polymerase

mR^u – mRNA

mC^1 – Komplex Degradosom-mRNA

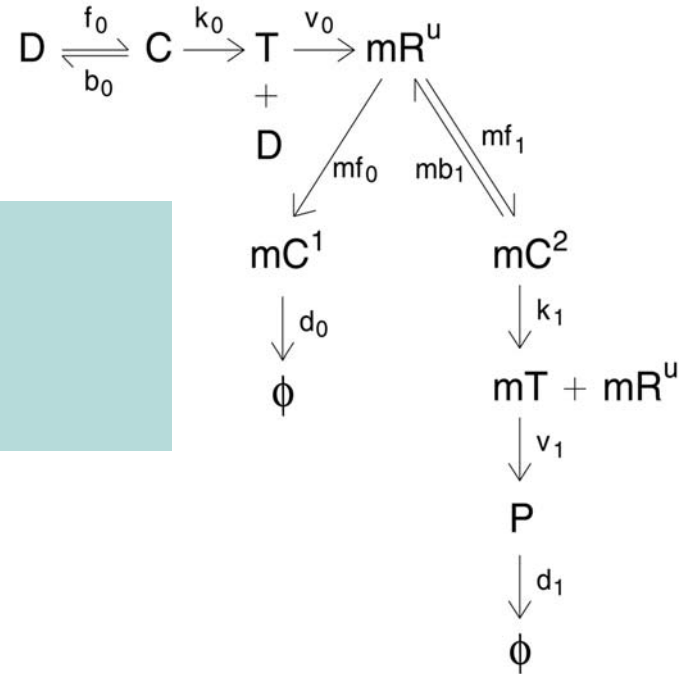
mC^2 – Komplex Ribosom-mRNA

mT – Translation der mRNA

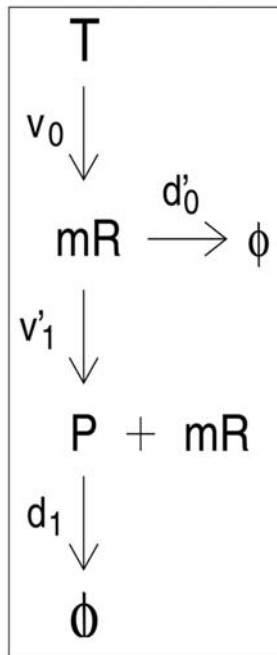
P – fertiges Protein mit Abbau

Modell für Intrinsisches Rauschen

Modell für die Bildung eines neuen Moleküls

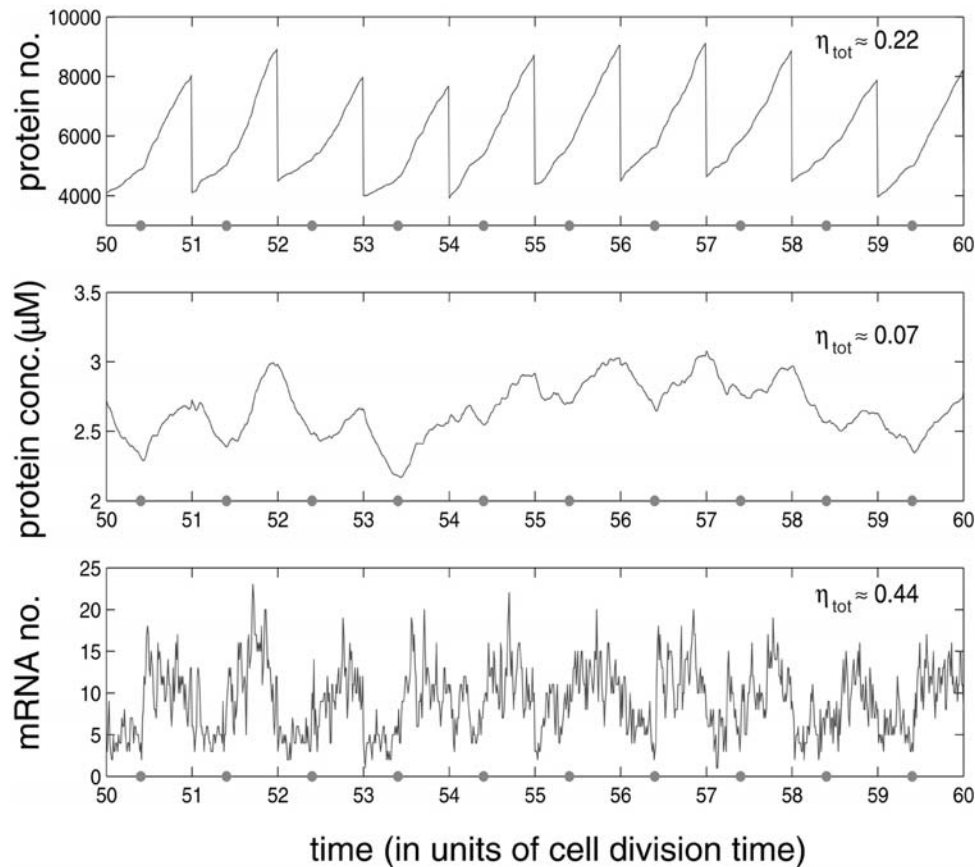


T - Transkriptionsstart
 mR - mRNA
 P - fertiges Protein
 Φ - Abbau



Vereinfachtes Modell
 kann analytisch gelöst werden

Stochastische Simulation des Modells

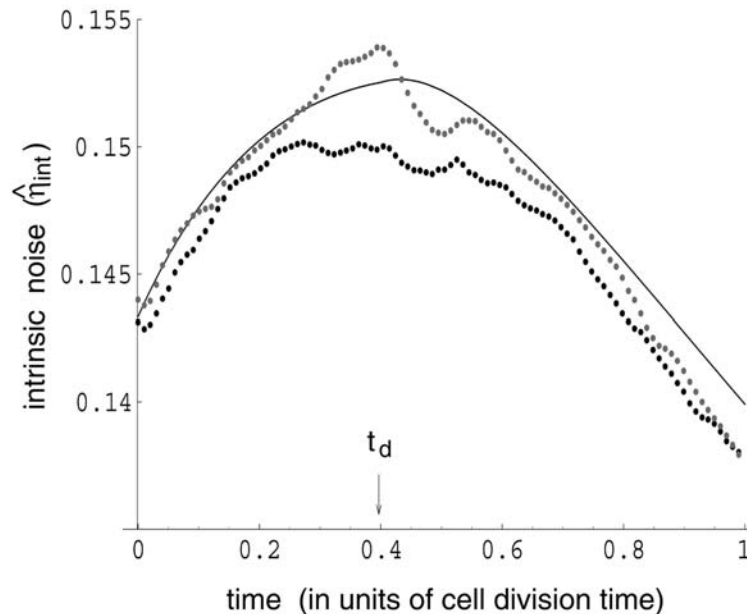


-Reaktion als Markov-Prozess mit diskreten Zeitschritten

-Reaktions-Wahrscheinlichkeit gleich Produkt der Ratenkonstante und den Reaktanden-Konzentrationen

-Zellwachstum und -Teilung berücksichtigt

Analytische Berechnung des vereinfachten Modells



Analytische Lösung

Glatte Kurve- berechnet nach (vereinfachtes Modell) :

$$\hat{\eta}_{int}^2(t) = \frac{1}{\langle P(t) \rangle} + \frac{1}{\langle mR \rangle} \left(1 - \frac{f_0 k_0}{\ell^2} \right) \frac{d_1}{d_0} \Phi_1(t)$$

Simulation

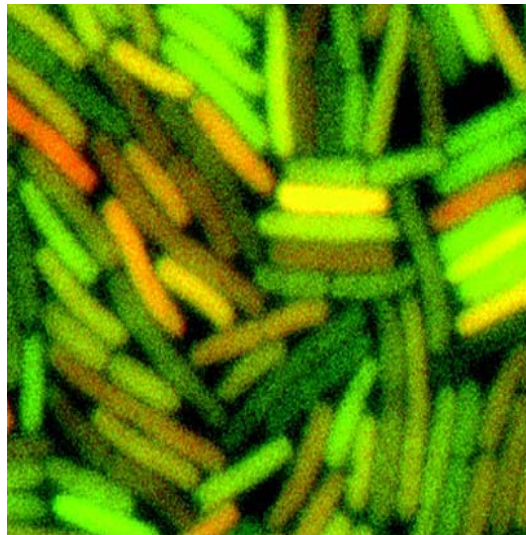
Obere gepunktete Kurve Vereinfachtes Modell

Untere gepunktete Kurve- Volles Modell

Anwendung der Theorie

Ansatz:

2 unterscheidbare Reporter (cfp, yfp) mit **gleichem Promotor** pro Zelle



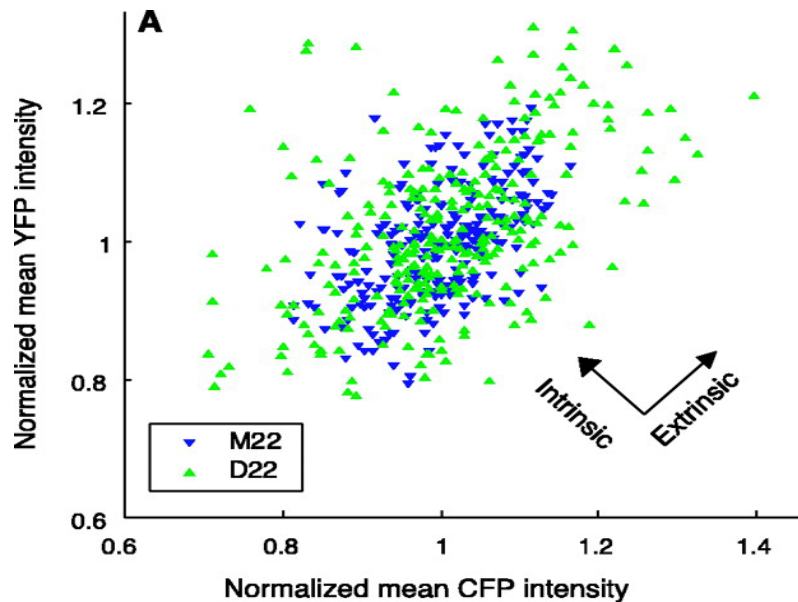
Konzentrationsdifferenz
in einer Zelle (Verhältnis grün-rot) → Intrinsisches
Rauschen

Konzentrationsdifferenz
zwischen den Zellen → Gesamtes
Rauschen

Messung der Rausch-Anteile

Die Rausch-Anteile addieren sich

$$\sigma_{\text{tot}}^2 = \sigma_{\text{int}}^2 + \sigma_{\text{ext}}^2$$



Verhältnis CFP/ YFP in
einer Zelle

CFP, YFP zwischen
mehreren Zellen

M22 – Zellstamm mit geringem
Rauschen

D22 – Stamm mit viel Rauschen

Unterschiedliche Rausch-Niveaus

Was führt zu unterschiedlichen Rausch-Stärken?

starker konstitutiver Promotor (lac-sensitiver Promotor, λP_R)

→ geringstes Rausch-Niveau bei beiden

- Konstitutive Expression kann erstaunlich uniform sein (hier bei unphysiologischen Verhältnisse)
- geringes Rausch Niveau hängt nicht vom speziellen Promotor ab

lac-sensitiver Promotor im Wildtyp (3 – 6% der ursprünglichen Expression)

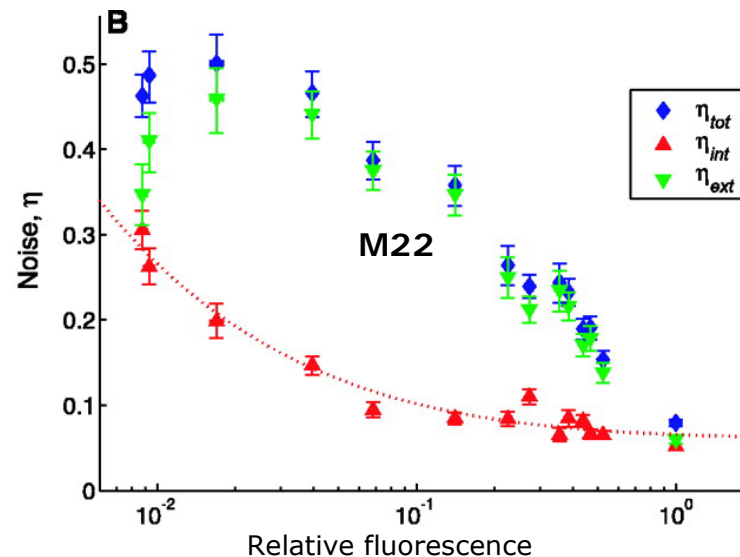
→ beide Rausch-Anteile steigen um ca. Faktor 5

Abschalten der Hemmung durch lacI (mittels IPTG) → Rauschen sinkt wieder auf o.g. Werte

→ Rausch- Anstieg wirklich auf Hemmung zurückzuführen

Unterschiedliche Rausch-Niveaus

-Rausch-Anteile bei verschiedenen starker Hemmung gemessen



Messwerte sind
Mittelwerte über eine
gesamte Population

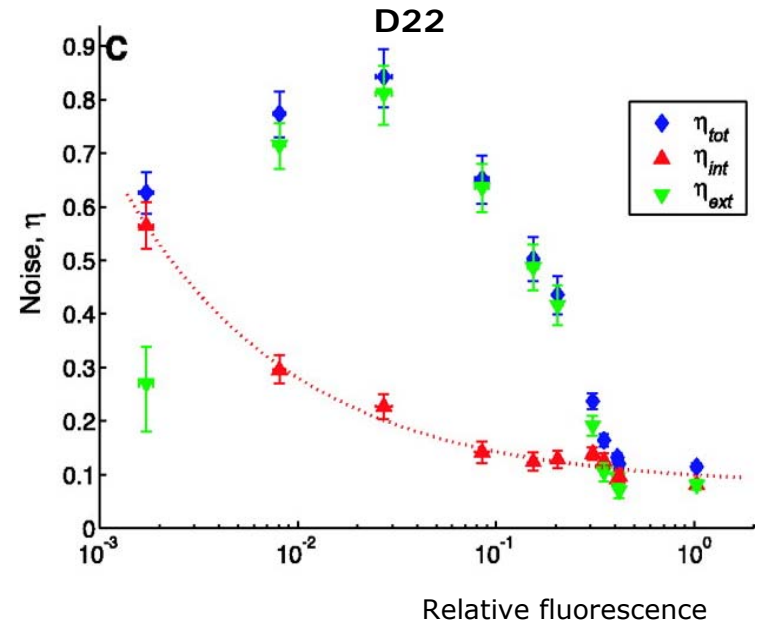
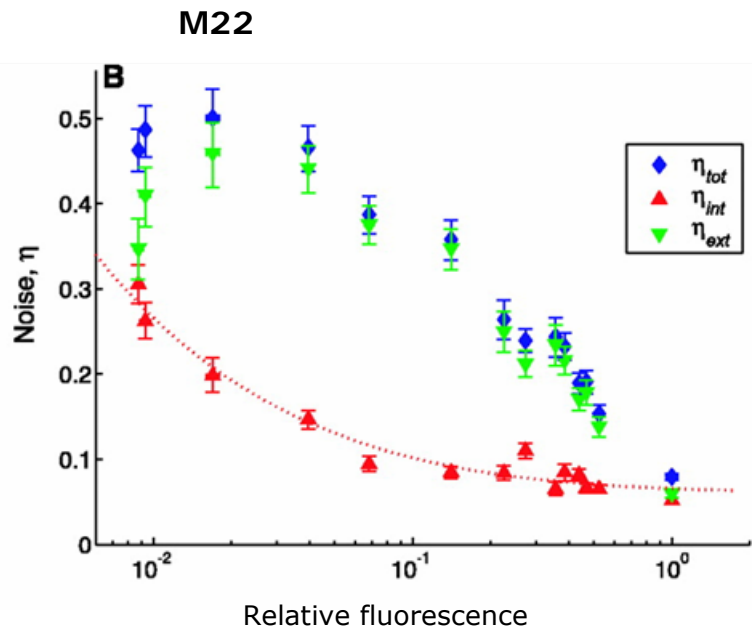
-intrinsisches Rauschen nimmt mit sinkender Expression zu
-extrinsisches Rauschen hat Maximum \rightarrow ist aus gesamtem Rauschen nicht eindeutig berechenbar

Warum Maximum bei extrinsischem Rauschen: mit sinkender Expression des Reporters steigt Expression des Repressor \rightarrow Rauschen in der Konzentration des Repressors nimmt bei steigender Repression ab

Genetische Ursachen von Rauschen

D22-Stamm von E.Coli fehlt recA-Gen (Reparatur von abgerissenen Replikationsgabeln)

→ evtl. erhöhtes Rausch-Niveau wegen untersch. Anzahl von Kopien einiger Gene in dieser Population



Rauschen bei Regulationsvorgängen

- Bis jetzt nur Rauschen in Abwesenheit regulativer Signale
- Repressilator: Netzwerk schaltet lacl an und aus
- Rauschen während des Erreichens des Regulationsziels untersucht

Wie erwartet:

- deutlich erhöhtes Gesamt-Rauschen
- erhöhtes intrinsisches Rauschen

→ Dynamik in der Regulation beeinflusst das Rausch-Niveau empfindlich

Zusammenfassung

- Gibt intrinsisches und extrinsisches Rauschen
- Rausch-Anteile unterscheidbar / berechenbar → addieren sich zum Gesamtrauschen
- Intrinsisches Rauschen nimmt bei steigender Expression ab

Literature

Stochastic gene expression in a single cell


Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS
<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/297/5584/1183>

Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system

Alejandro Colman-Lerner, Andrew Gordon, Eduard Serra, Tina Chin,
Orna Resnekov, Drew Endy, C. Gustavo Pesce and Roger Brent
<http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7059/full/nature03998.html>

Intrinsic and extrinsic contributions to stochasticity in gene expression

Peter S. Swain, Michael B. Elowitz, and Eric D. Siggia
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/99/20/12795>



Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system

Alejandro Colman-Lerner, Andrew Gordon, Eduard Serra, Tina Chin, Orna Resnekov, Drew Endy, C. Gustavo Pesce & Roger Brent

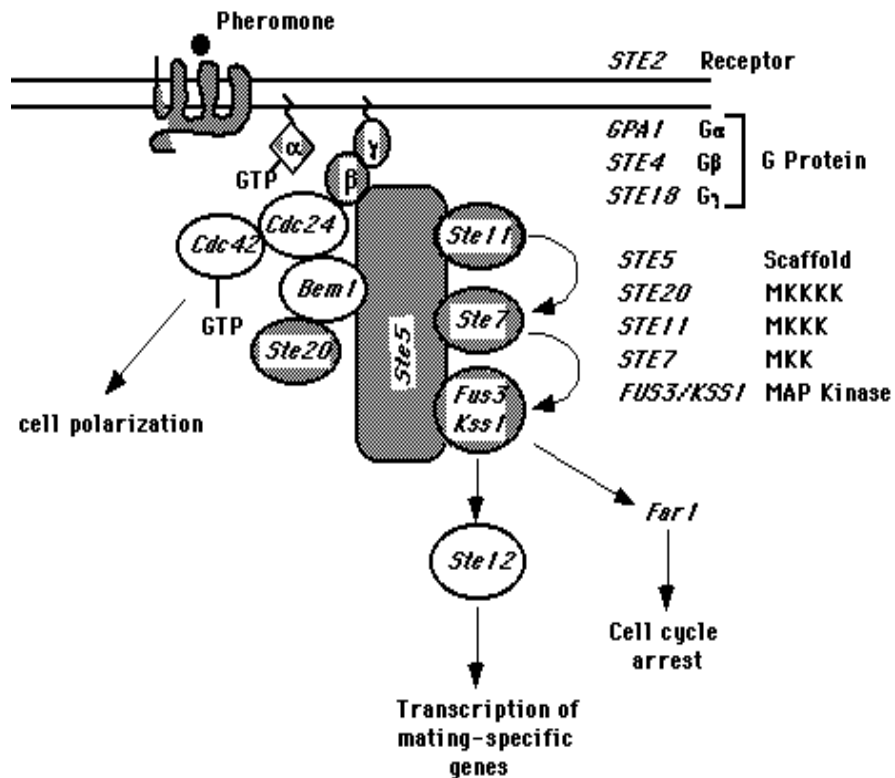
Definition Rauschen (bisher)

- Intrinsic:
 - Stochastische Fluktuationen bei der Expression eines Proteins
- Extrinsic:
 - Unterschiede im Vorhandensein von Zellulären Komponenten

Ansatz

- Der Pheromone Signalweg in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde auf Zell-Zell-Unterschiede hin untersucht

Übersicht Signalweg



Durch Pheromone (hier: alpha-Faktor) induzierte Transkription von Genen für die Zellteilung

Idee

- Pheromon induzierte Expression von fluoreszierenden Proteinen
 - Unterschiede in Expression würden dann Rückschlüsse auf Signalübertragung / Genexpression zulassen

Durchführung

- Züchtung von Hefe Zellen, die 2 verschieden fluoreszierende Proteine enthalten:
 1. YFP yellow fluorescent protein
 2. CFP cyan fluorescent protein

Durchführung

2 Typen von Hefe Zellen:

1.

- YFP mit alpha-Faktor **abhängigen** Promoter
- CFP mit alpha-Faktor **unabhängigen** Promoter

2.

- YFP und CFP mit alpha-Faktor **abhängigen** Promoter



Framework

(zur Interpretation des Experiments)

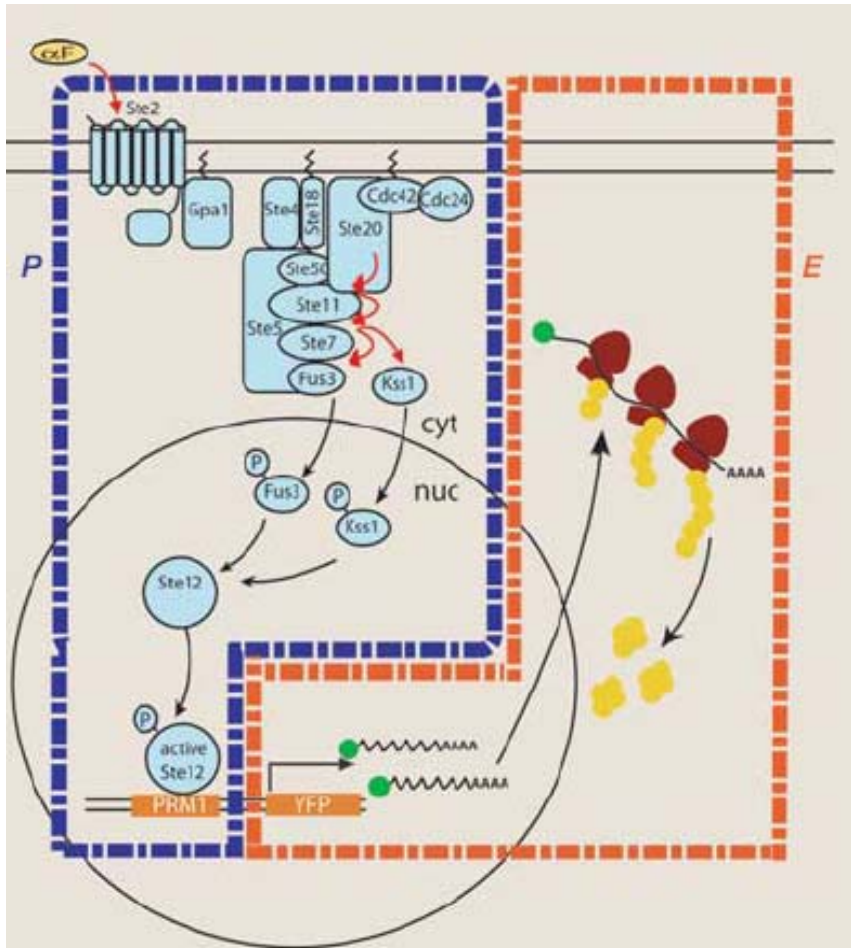
- Betrachte Alpha-Faktor Signalweg und seine Aktivität als ein System aus **2 Subsystemen**

(Aktivität: gemessen an der ReporterGen Expression)

1. Signalweg Subsystem
2. Expressions Subsystem

Framework

(zur Interpretation des Experiments)



Blauer Rahmen:

- Signalweg Subsystem

Roter Rahmen:

- Expressions Subsystem

Gesamtaktivität gemessen an der ReporterGen Expression

Framework

(zur Interpretation des Experiments)

- In jedem Subsystem wird zwischen 2 Quellen der Variation unterschieden:
 1. Stochastische Fluktuationen
 - Spontane Unterschiede im Auftreten und Timing von chemischen Reaktionen → **Rauschen**
 2. Zell-Zell unterschiede in der Kapazität
 - Hängt ab von Anzahl / Lokalisation / Aktivität der Proteine:
 1. Die Signalweg übermitteln → Signalweg Kapazität
 2. Die Gene in Proteine exprimieren → expressions- Kapazität

Framework

(zur Interpretation des Experiments)

- Wenn man in der Lage wäre, in der Zeit zurückzugehen, um eine Zelle mehrmals zu stimulieren
- Würde der gemittelte System-Output dem Erwartungswert des Output entsprechen
- Nach Framework wäre dies abhängig von Signalweg und Expressions- Kapazität
- Jeglicher Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen würde durch zufällige Fluktuationen hervorgerufen werden
 - Anzahl / Arbeitsweise von Proteinen:
 1. Signal weiterleiten
 2. Reporter Protein exprimieren



Framework

(zur Interpretation des Experiments)

- Selbes Experiment auf eine andere Zelle angewandt, könnte ein anderen Mittelwert des System-output ergeben
- Dies wäre ein Indiz, für Zell-Zell Unterschiede in den Kapazitäten der beiden Subsysteme
- Z.B. anfängliche Unterschiede in der Anzahl von Molekülen, die für Signalweiterleitung / Genexpression zuständig sind

Analytischer Framework

(zur Interpretation des Experiments)

1. Subsystem (Alpha-Faktor Signalweg)

Definition:

für eine individuelle Zelle i , ist der Signalweg-Output definiert als $P_i \Delta T$

P_i = gemittelter Output pro Zeiteinheit

$$P_i = L_i + \lambda_i$$

L_i = Erwartungswert des Output \rightarrow pathway power

λ_i = stochastische Fluktuationen in P

Ansatz kann auf jeden Signalweg übertragen werden

Analytischer Framework

(zur Interpretation des Experiments)

2.Subsystem (Genexpression)

Definition:

für eine individuelle Zelle i , ist der Genexpressions-Output definiert als E_i

$$E_i = G_i + \gamma_i$$

G_i = Erwartungswert von E_i → Expressions- Kapazität

γ_i = stochastische Fluktuationen von E_i

Analytischer Framework

(zur Interpretation des Experiments)

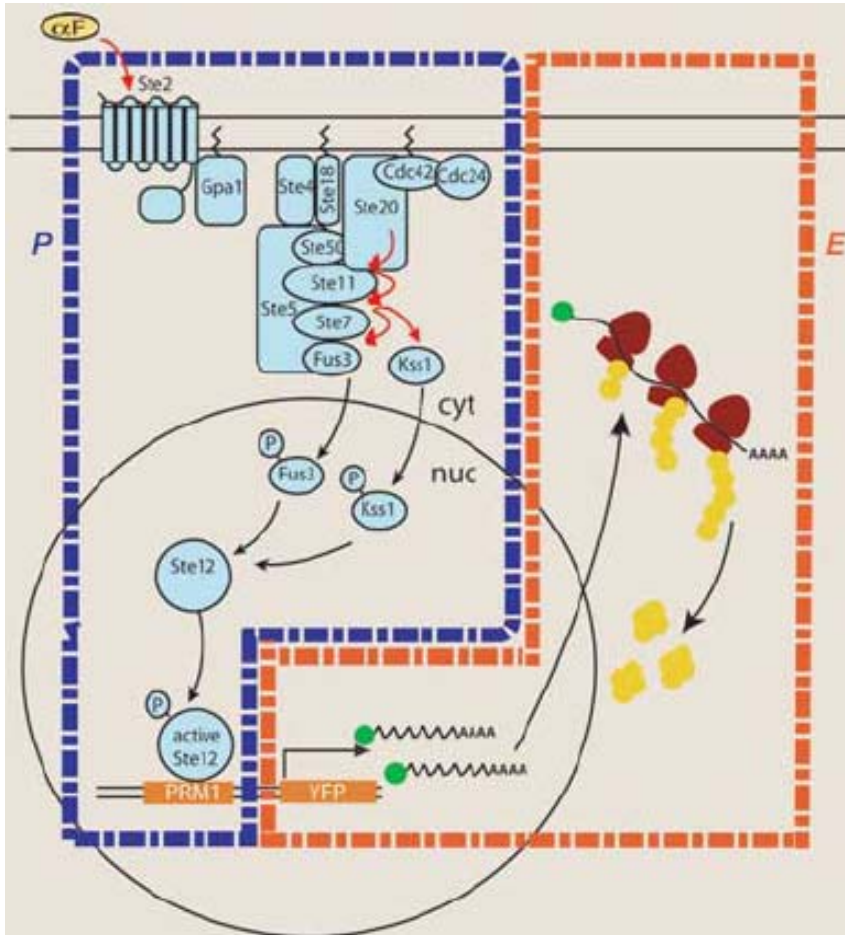
Gesamt-Output des Systems:

$$y_i = P_i \Delta T * E_i$$

Wobei P abhängig von E:

- Höheres E könnte P erhöhen / erniedrigen, wenn E das Verhältnis positive Regulatoren zu negativen Regulatoren des Signalweges beeinflusst

Analytischer Framework (zur Interpretation des Experiments)



System output for cell i

$$y_i = P_i \Delta T \times E_i = (L_i(\alpha \text{ factor}) + \lambda_i) \Delta T \times (G_i + \gamma_i)$$

Variation in system output

$$\eta^2(y) = \eta^2(L) + \eta^2(\lambda) + \eta^2(\gamma) + \eta^2(G) + 2\rho(L, G)\eta(L)\eta(G)$$

$$\text{where } \eta^2 \equiv \frac{\sigma^2}{\mu^2}$$

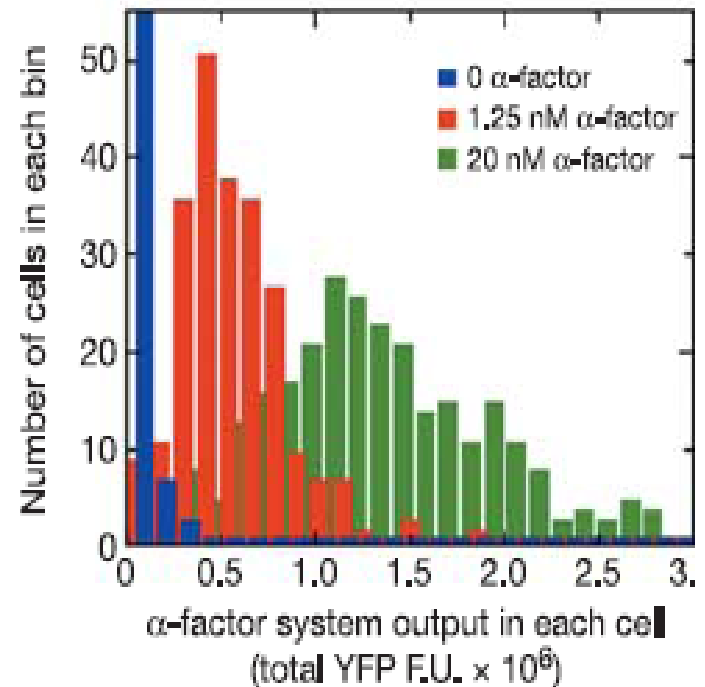
- $\eta^2(L)$ = Variation der pathway power
- $\eta^2(\lambda)$ = Übertragungs - Rauschen
- $\eta^2(G)$ = Variation der Expressions-Kapazität
- $\eta^2(\gamma)$ = Expressions- Rauschen \rightarrow intrinsisches - Rauschen
- $\rho(L, G)$ = Korrelationskoeffizient zwischen L und G

Durchführung

- Konstruierte Hefe Zellen wurden mit Alpha-Faktor stimuliert und Fluoreszenz gemessen
- 1. CFP / YFP gesteuert durch gleichen Alpha-Faktor abhängigen Promoter $\rightarrow \eta^2(\gamma) = \text{Expressions-Rauschen}$
 - Da Signalübertragung bei beiden Genen gleich
- 2. CFP / YFP gesteuert durch unterschiedliche Promoter $\rightarrow \text{Expressions-Rauschen} + \text{Übertragungs-Rauschen}$
 - unterschiedliche Signalwege

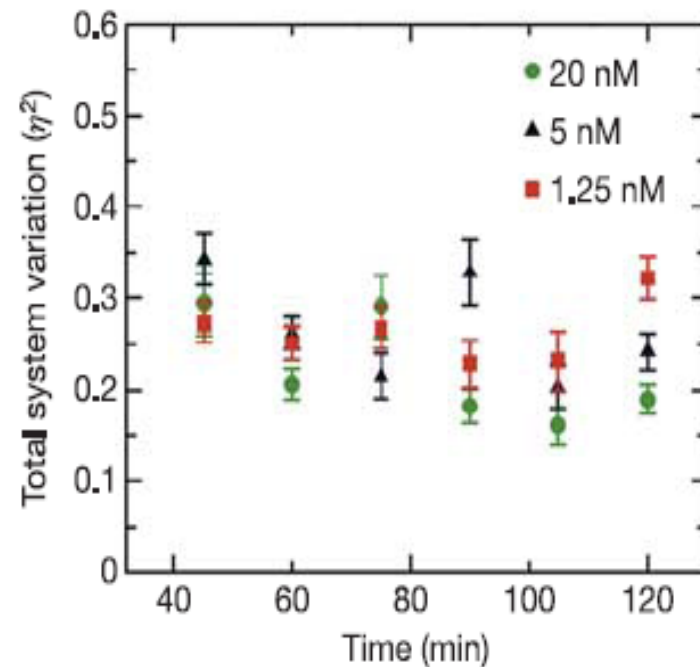
Ergebnisse

- Große Unterschiede zwischen einzelnen Zellen beim System – Output
 - Oberen 5% zeigten ca. 4-fach höheren Output als unteren 5%

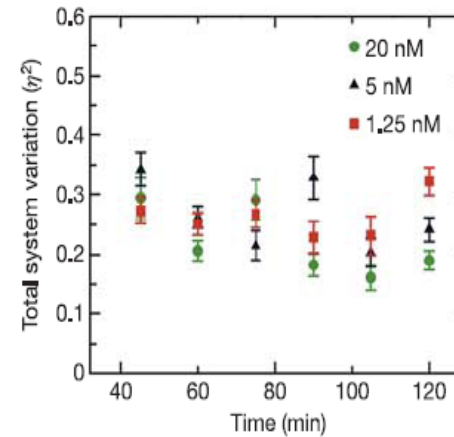
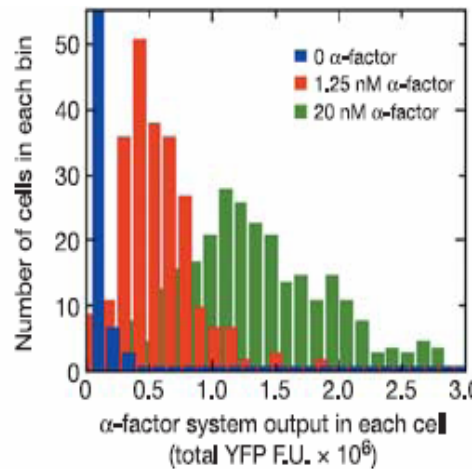


Ergebnisse

- Variation des Alpha – Faktor – System - Output war über die Zeit relativ konstant



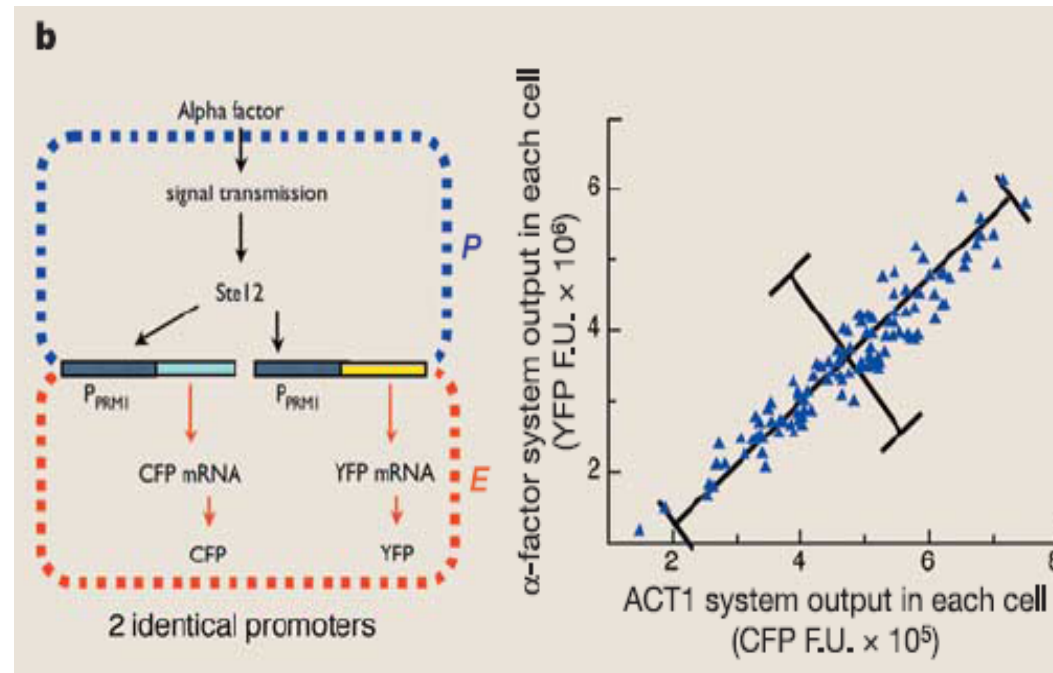
Ergebnisse



→ Großteil der Variationen beruht auf Zell – Zell Unterschieden, die schon vor dem Experiment vorhanden waren

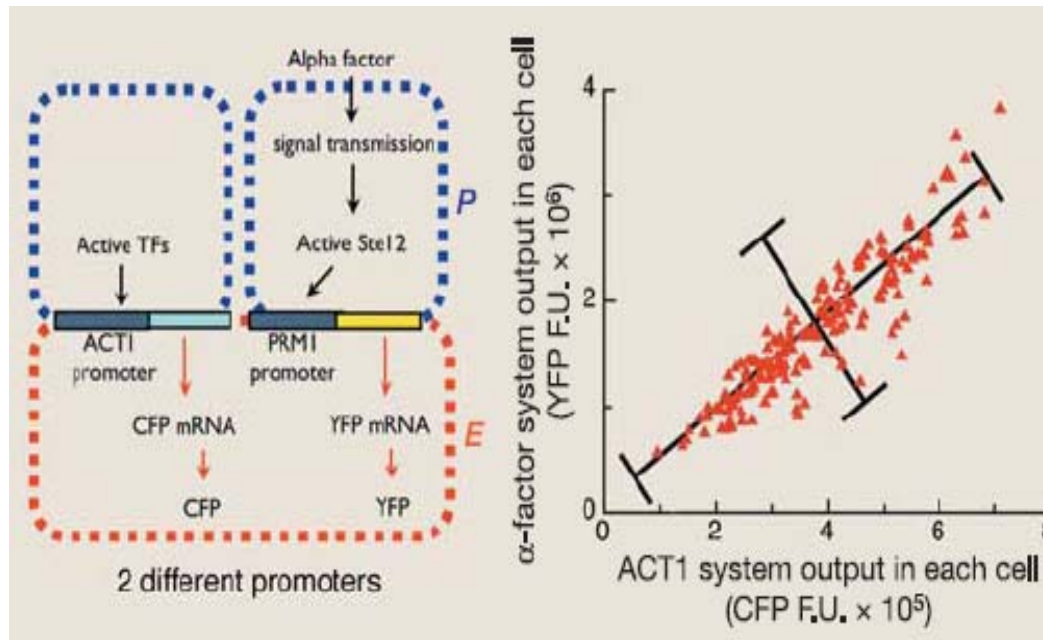
Ergebnisse

Versuch 1



- Wenig Variation durch Expressions- Rauschen

Ergebnisse Versuch 2



- Wenig Variation im Signalweg - Output



Ergebnisse

→ Größten Anteil an der Zell-Zell Variation besitzt die Expressions-Kapazität

Ergebnisse

Zellzyklusstopp

- Auswirkungen des Zellzyklus wurden untersucht:
 - Cdc 28 durch (Cdc-28-as2)²¹ ersetzt
 - (Cdc-28-as2)²¹ wird durch 1-NM-PPI inhibiert
 - Durch Zugabe vom Inhibitor wird Zellzyklus im G2/M Übergang gestoppt



Ergebnisse

Zellzyklusstopp

- Gesamt Alpha – Faktor System
Output Variation um 45% gesunken
- CFP Variation nicht beeinflusst
(Alpha – Faktor unabhängiger Promoter)
 - Zellzyklus beeinflusst nur Signalweg Subsystem, aber nicht Expressions-Subsystem

Ergebnisse

- Bei hohen Alpha – Faktor Konzentrationen weniger Variation, als bei niedrigen Konzentrationen
 - Gesamtvariation bleibt jedoch gleich !
- Negative Korrelation zwischen G und L, also zwischen Signalweg – und Expressions- Kapazität

Ergebnisse

Zusammenfassung

- Wenig Variation durch zufällige Fluktuationen in Gentranskription und -translation
- Statt dessen Variation durch Signalweg - und Expressions- Kapazität
- Signalweg - und Expressions- Kapazität korrelieren negativ miteinander
 - präzisere Antwort der Zelle auf Pheromone, trotz Vorhandensein einer großen Variation bei der Expressions - Kapazität