

IV117: Úvod do systémové biologie

David Šafránek

26.11.2008

Obsah

Řízení pohybu – chemotaxe bakterií

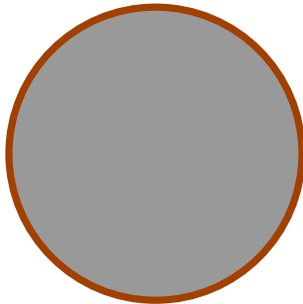
Robustnost adaptace chemotaxe

Obsah

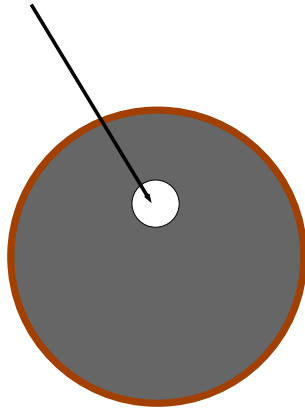
Řízení pohybu – chemotaxe bakterií

Robustnost adaptace chemotaxe

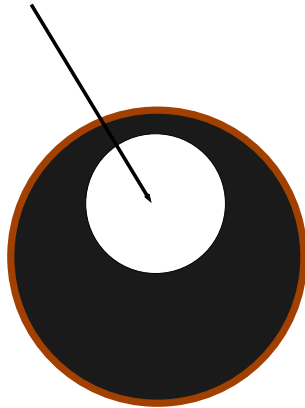
Pokus 1: Pohyb bakterií za přítomnosti repelentu



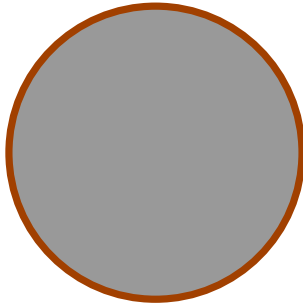
Pokus 1: Pohyb bakterií za přítomnosti repelentu



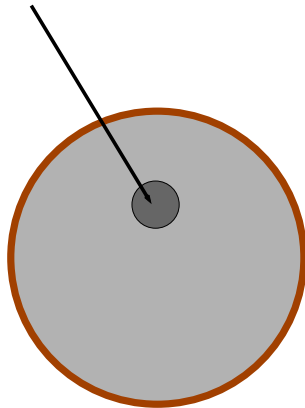
Pokus 1: Pohyb bakterií za přítomnosti repelentu



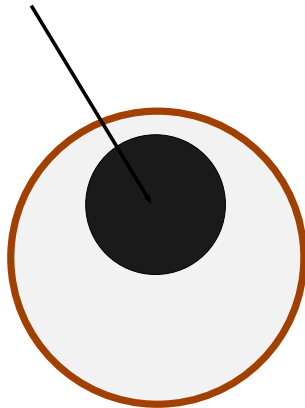
Pokus 2: Pohyb bakterií za přítomnosti atraktantu



Pokus 2: Pohyb bakterií za přítomnosti atraktantu



Pokus 2: Pohyb bakterií za přítomnosti atraktantu



Chemotaxe

- pohyb jedno i vícebuněčných organismů motivovaný chemickými podmínkami okolí
- pohyb citlivý na zvýšení/snížení koncentrace určitých látek v okolí
- detekováno signálními dráhami skrze receptory
- umožněno prostřednictvím bičíků
- nejzkoumanější druh pohybu živých organismů

Chemotaxe

- dva směry globálního pohybu
 - pozitivní – motivovaný atraktorem (např. glukóza)
 - negativní – motivovaný repelentem (např. fenol)
- u jednobuněčných organismů využito během celého buněčného cyklu
- u vícebuněčných organismů využito v raných fázích (spermie) a při vývoji orgánů a tkání (např. migrace neuronů v lymfocytách)

Historie výzkumu chemotaxe

Milestones in chemotaxis research



Leeuwenhoek
1703



Engelmann
1881



Pfeiffer
1884



Jennings
1906



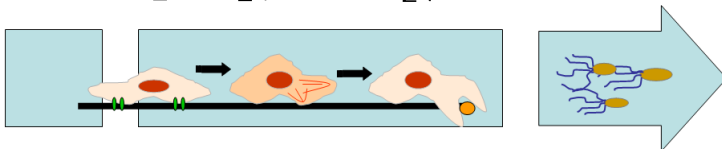
Metchnikoff
1908



Harris
1953



Adler
1973



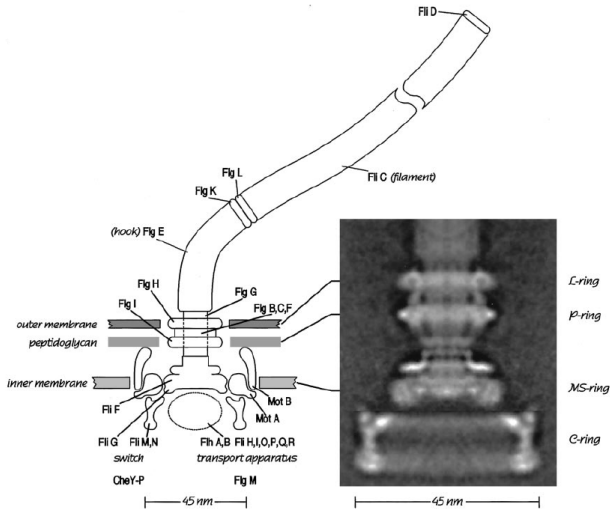
Historie výzkumu chemotaxe

- migrace buněk detekována již v raných fázích vývoje mikroskopu
- první studie provedena až roku 1881, 1884 v bakteriích [Pfeffer]
- další studie pohybu nálevníků 1906 [Jennings]
- 1908 studie chemotaxe vyústila v objev fagocytózy [Metchnikoff]
- ve třicátých letech již chemotaxe obecně akceptována
- 1973 začíná výzkum signálních drah řídících chemotaxi *E. coli* [Berg, Adler]

Další druhy řízení pohybu

- chemotaxe je nejčastější druh řízení pohybu
- existují i další druhy, zastoupeny velmi vzácně u specifických prokaryotických organismů
 - magnetotaxe
 - fototaxe
- nejvíce zkoumána chemotaxe *E. coli*

Pohybové ústrojí *E. coli*

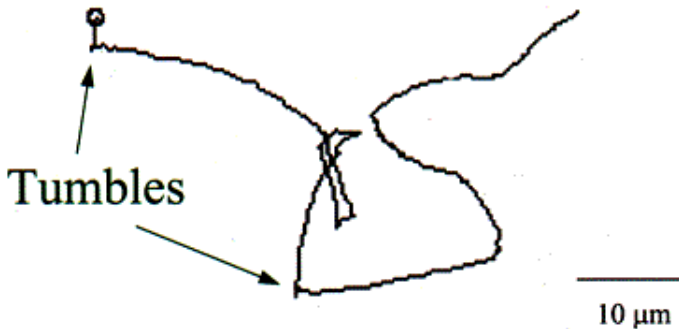


Operony kódující proteiny pohybového ústrojí *E. coli*

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flgAMN</i>	<i>fliC</i>
	<i>flgBCDEFGHIJKL</i>	<i>motABcheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fliAZY</i>	<i>aer</i>
	<i>fliDST</i>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fliFGHIJK</i>	
	<i>fliLMNOPQR</i>	

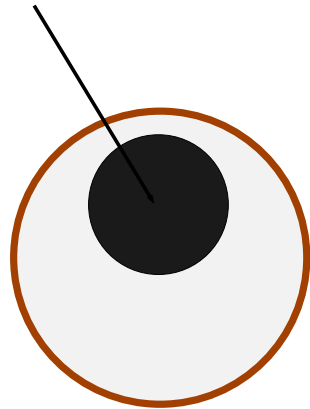
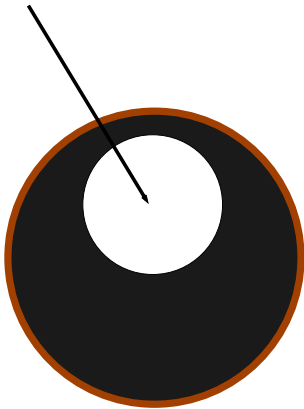
Módy pohybu E. coli

- dva módy pohybu
 - chaotické otáčení — tápání (tumbling)
 - plavání — v určitém směru
- za normálního stavu (uniformní prostředí) jsou módy stále střídány
- pohyb má charakter náhodné procházky
 - díky rotační difúzi způsobené Brownovým pohybem buňky nemohou držet směr déle než 1 s (buňky jsou velké cca $1\mu m$)
 - dochází tedy k náhodné změně směru (randomizovaném v průměru 90°)
 - otáčení trvá cca 0.1 s
- bakterie neustále mapují prostředí na přítomnost koncentračních gradientů

Pohyb E. coli za normálního stavu

Pohyb E. coli v přítomnosti gradientu

- řízení pohybu je založeno na tzv. temporálním gradientu [Berg]
 - antény na obou koncích E. coli vzhledem ke své velikosti nemohou rozpoznat prostorový gradient (problém je fluktuační prostředí)
 - prostorové gradienty (např. koncentrační gradient určité látky) si E. coli převádí na temporální gradienty
 - v přítomnosti gradientu E. coli jedná ve smyslu přiblížení/oddálení střetu s gradientem
- vnímání gradientů je dvoustupňové
 - paměť “minulé” koncentrace
 - porovnání s aktuální koncentrací
- bakterie je citlivá na změnu gradientu

Pohyb E. coli za přítomnosti gradientu

Pohyb E. coli v přítomnosti gradientu

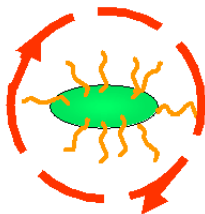
- řízení pohybu je umožněno snížením/zvýšením frekvence tápání
- v přítomnosti atraktantu je frekvence tápání snížena
- v přítomnosti repelentu naopak zvýšena
- realizováno řízením flagelárního motoru
 - otáčení motoru proti směru hodinových ručiček — bičíky tvoří svazek \Rightarrow posun bakterie
 - otáčení motoru po směru hodinových ručiček — bičíky chaoticky rozhozené \Rightarrow tápání

Módy pohybu E. coli

Correlation of swimming behaviour
and flagellar rotation in *E. coli*

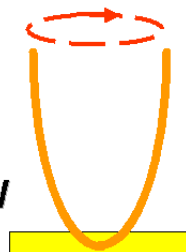


straight swim



tumbling

CCW

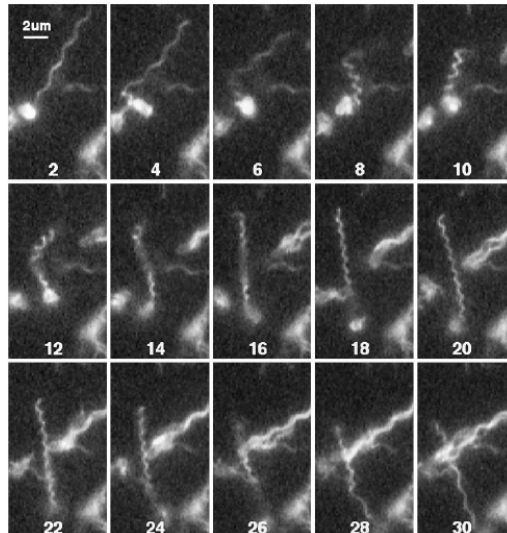


CW



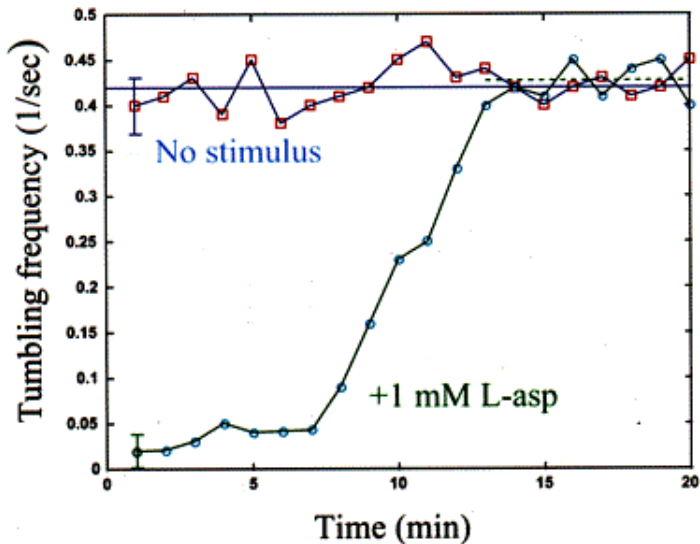
(CCW= counter-clockwise, CW= clockwise)

© Kohidai, L

Módy pohybu E. coli

Stabilizace frekvence tápání a adaptace

- frekvence tápání je za normálních podmínek stabilizována (cca $1s^{-1}$)
- zvýšíme-li uniformní koncentraci atraktantu (rovnoměrně bez gradientů):
 - buňky detekují “lepší podmínky”
 - sníží frekvenci tápání na cca $0.1s^{-1}$
- po čase se frekvence tápání vrátí na původní hladinu
 - dochází k **adaptaci** na nové prostředí
 - rozumná frekvence vhodná pro skenování prostředí je udržena

Stabilizace frekvence tápání a adaptace

Receptory chemotaxe (citlivost na aspartát)

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flg</i> <u>AMN</u>	<i>fliC</i>
	<i>flg</i> BCDEFGHI <u>JKL</u>	<i>motABcheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar</i> <i>tap</i> <i>cheRBYZ</i>
	<i>fli</i> <u>AZY</u>	<i>aer</i>
	<i>fli</i> <u>DST</u>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fli</i> FGHIJK	
	<i>fli</i> LMNOPQR	

Receptory chemotaxe (citlivost na dipeptidy)

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flg</i> <u>AMN</u>	<i>fliC</i>
	<i>flg</i> BCDEFGHI <u>JKL</u>	<i>mot</i> ABcheAW
	<i>flh</i> BAE	<i>tar</i> tap cheRBYZ
	<i>fli</i> <u>AZY</u>	<i>aer</i>
	<i>fli</i> <u>DST</u>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fli</i> FGHIJK	
	<i>fli</i> LMNOPQR	

Receptory chemotaxe (citlivost na galaktózu)

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flg</i> <u>AMN</u>	<i>fliC</i>
	<i>flg</i> BCDEFGHI <u>JKL</u>	<i>motABcheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fli</i> <u>AZY</u>	<i>aer</i>
	<i>fli</i> <u>DST</u>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fli</i> FGHIJK	
	<i>fli</i> LMNOPQR	

Receptory chemotaxe (citlivost na sérin)

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flg</i> <u>AMN</u>	<i>fliC</i>
	<i>flg</i> BCDEFGHI <u>JKL</u>	<i>motABcheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fli</i> <u>AZY</u>	<i>aer</i>
	<i>fli</i> <u>DST</u>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fli</i> FGHIJK	
	<i>fli</i> LMNOPQR	

Komponenty chemoreceptorových komplexů

Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flgAMN</i>	<i>fliC</i>
	<i>flgBCDEFGHIJKL</i>	<i>motA</i> <i>cheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fliAZY</i>	<i>aer</i>
	<i>fliDST</i>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fliFGHIJK</i>	
	<i>fliLMNOPQR</i>	

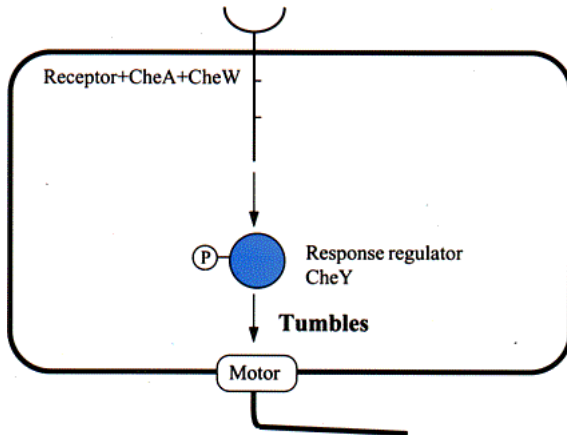
CheA – fosforylační enzym kináza

CheW – adaptér receptoru

Řídící enzymy chemotaxe

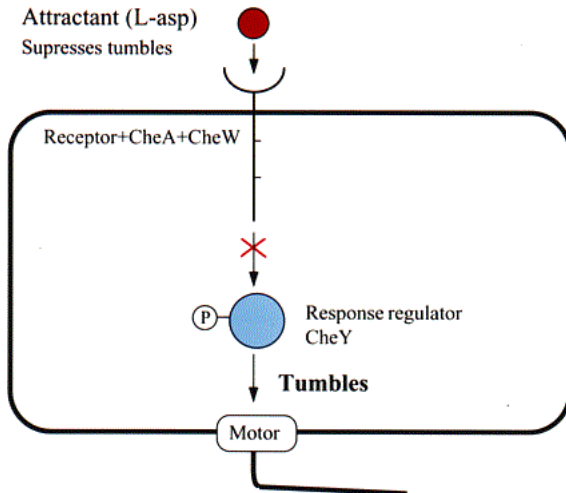
Class 1	Class 2	Class 3
<i>flhDC</i>	<i>flgAMN</i>	<i>fliC</i>
	<i>flgBCDEFGHIJKL</i>	<i>motABcheAW</i>
	<i>flhBAE</i>	<i>tar tap cheRBYZ</i>
	<i>fliAZY</i>	<i>aer</i>
	<i>fliDST</i>	<i>trg</i>
	<i>fliE</i>	<i>tsr</i>
	<i>fliFGHIJK</i>	
	<i>fliLMNOPQR</i>	

CheR, CheB – metylace, CheY – přenos signálu do motoru,
CheZ – defosforylační enzym

Signální řízení chemotaxe

Signální řízení chemotaxe

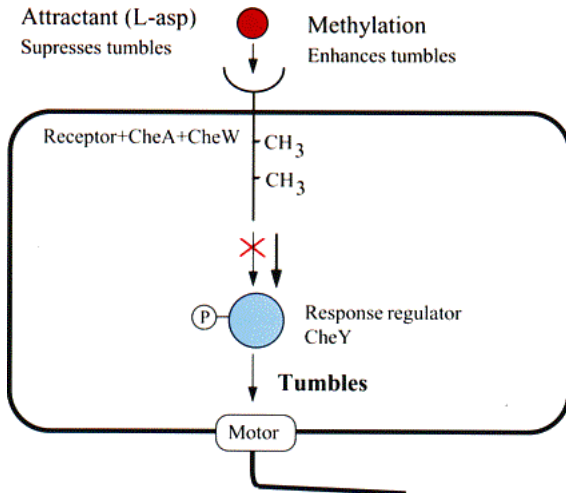
- receptor přenáší signál k fosforylaci CheY
- CheY-P zvyšuje frekvenci tápání
- CheZ vyvažuje tento vliv defosforylací CheY (za normálních okolností vede ke stabilní situaci)
- odezva tohoto řízení je **vysoká**

Signální řízení chemotaxe (vliv atraktoru)

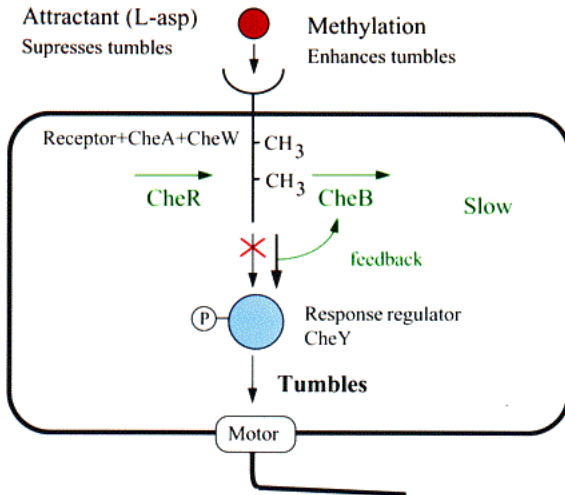
Signální řízení chemotaxe

- receptor je metylován enzymem CheR
 - metylace zvyšuje citlivost receptoru
- naopak dochází k demethylaci receptoru enzymem CheB
 - snížení citlivosti receptoru
- odezva tohoto řízení je **pomalá**
- metylace/demethylace přesně vyvažuje snížení účinku CheY-P vyvolané atraktorem a tím umožňuje adaptaci buňky na nové trvalé podmínky

Signální řízení chemotaxe (vliv metylace)



Signální řízení chemotaxe (zpětná vazba)



Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme X receptorový komplex CheA + CheW + Receptor

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme X receptorový komplex CheA + CheW + Receptor
- X je metylováno enzymem CheR a demetylováno enzymem CheB

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme X receptorový komplex CheA + CheW + Receptor
- X je metylováno enzymem CheR a demetylováno enzymem CheB
- označme X_m metylovaný receptorový komplex

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme X receptorový komplex CheA + CheW + Receptor
- X je metylováno enzymem CheR a demetylováno enzymem CheB
- označme X_m metylovaný receptorový komplex
- budeme měřit aktivitu X_m (vliv na frekvenci tápání)

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme X receptorový komplex CheA + CheW + Receptor
- X je metylováno enzymem CheR a demetylováno enzymem CheB
- označme X_m metylovaný receptorový komplex
- budeme měřit aktivitu X_m (vliv na frekvenci tápání)
- vývoj X_m závisí na vlivu metylace/demetylace:

$$\frac{dX_m}{dt} = V_R[\text{CheR}] - \frac{V_B[\text{CheB}]X_m}{K + X_m}$$

V_R určuje spontánní (saturovaný) vliv metylace

V_B určuje maximální projev demetylace

Model signálního řízení chemotaxe

- v rovnovážném stavu (pro $\frac{dX_m}{dt} = 0$) dostáváme:

$$X_m = \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]}$$

- aktivitu řízení v tomto rovnovážném stavu značíme A_0 a definujeme pro nenulovou konstantu a_0 vyjadřující celkovou aktivitu receptorového komplexu (dána počtem navázaných ligandů):

$$A_0 = a_0 X_m$$

Model signálního řízení chemotaxe

- aktivita X_m se sníží vlivem atraktantu
- označíme-li tuto aktivitu A_1 pro konstantu a_1 :

$$A_1 = a_1 X_m$$

- s ohledem na snížení aktivity platí $a_1 \ll a_0$ a tedy

$$A_1 \ll A_0$$

Model signálního řízení chemotaxe

- pomalu nastoupí účinek saturované metylace pomocí CheR

Model signálního řízení chemotaxe

- pomalu nastoupí účinek saturované metylace pomocí CheR
- jelikož je aktivita receptorů snížena, je vliv demethylace nepatrný

Model signálního řízení chemotaxe

- pomalu nastoupí účinek saturované metylace pomocí CheR
- jelikož je aktivita receptorů snížena, je vliv demethylace nepatrný
- metylace způsobí zvýšení aktivity receptorů

Model signálního řízení chemotaxe

- pomalu nastoupí účinek saturované metylace pomocí CheR
- jelikož je aktivita receptorů snížena, je vliv demethylace nepatrný
- metylace způsobí zvýšení aktivity receptorů
- X_m se opět stabilizuje, označme novou stabilní koncentraci X'_m :

$$X'_m = \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V'_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]}$$

V'_B určuje nový (snížený) projev demethylace ($V'_B \ll V_B$)

Model signálního řízení chemotaxe

- pomalu nastoupí účinek saturované metylace pomocí CheR
- jelikož je aktivita receptorů snížena, je vliv demethylace nepatrný
- metylace způsobí zvýšení aktivity receptorů
- X_m se opět stabilizuje, označme novou stabilní koncentraci X'_m :

$$X'_m = \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V'_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]}$$

V'_B určuje nový (snížený) projev demethylace ($V'_B \ll V_B$)

- označíme-li výslednou aktivitu chemoreceptorového komplexu A_2 :

$$A_2 = a_1 X'_m$$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m$$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]}$$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]} = 10$$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]} = 10$$

- jak docílit přesné adaptace?

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]} = 10$$

- jak docílit přesné adaptace?
 - potřebujeme dostat $A_0 = A_2$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]} = 10$$

- jak docílit přesné adaptace?
 - potřebujeme dostat $A_0 = A_2$
 - při daných hodnotách by po snížení aktivity např. na $a_1 = 1$ bylo nutné nastavit snížený projev demetylace na $V'_B[\text{CheB}] = 1.1$

Model signálního řízení chemotaxe

- nyní můžeme analyzovat projev adaptace
- nastavíme-li $a_0 = 10$, $a_1 = 1$, $K = 1$, $V_R[\text{CheR}] = 1$, $V_B[\text{CheB}] = 1$ potom:

$$A_0 = a_0 X_m = a_0 \frac{KV_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]} = 10$$

- jak docílit přesné adaptace?
 - potřebujeme dostat $A_0 = A_2$
 - při daných hodnotách by po snížení aktivity např. na $a_1 = 1$ bylo nutné nastavit snížený projev demetylace na $V'_B[\text{CheB}] = 1.1$
- uvažovaný model je velmi citlivý na malé změny parametrů

Obsah

Řízení pohybu – chemotaxe bakterií

Robustnost adaptace chemotaxe

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme receptorový komplex v aktivním metylovaném stavu X_m^* i neaktivním metylovaném stavu X_m

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme receptorový komplex v aktivním metylovaném stavu X_m^* i neaktivním metylovaném stavu X_m
- předpokládáme saturevanou metylaci
- předpokládáme, že pouze aktivní receptory lze demetylovat
- budeme měřit aktivitu X_m (vliv na frekvenci tápání)

Model signálního řízení chemotaxe

- uvažujeme receptorový komplex v aktivním metylovaném stavu X_m^* i neaktivním metylovaném stavu X_m
- předpokládáme saturevanou metylaci
- předpokládáme, že pouze aktivní receptory lze demetylovat
- budeme měřit aktivitu X_m (vliv na frekvenci tápání)
- uvažujeme vývoj $X_m + X_m^*$:

$$\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = V_R[\text{CheR}] - \frac{V_B[\text{CheB}]X_m^*}{K + X_m^*}$$

V_R určuje spontánní (saturevaný) vliv metylace

V_B určuje maximální projev demetylace

Model signálního řízení chemotaxe

- v rovnovážném stavu (pro $\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = 0$) dostáváme:

$$V_R[\text{CheR}] = \frac{V_B B X_m^*}{K + X_m^*}$$

Model signálního řízení chemotaxe

- v rovnovážném stavu (pro $\frac{d(X_m+X_m^*)}{dt} = 0$) dostáváme:

$$V_R[\text{CheR}] = \frac{V_B B X_m^*}{K + X_m^*}$$

- aktivitu řízení v tomto rovnovážném stavu značíme A_0 a definujeme přímo jako koncentraci aktivního receptorového komplexu:

$$A_0 = X_m^*$$

Model signálního řízení chemotaxe

- v rovnovážném stavu (pro $\frac{d(X_m+X_m^*)}{dt} = 0$) dostáváme:

$$V_R[\text{CheR}] = \frac{V_B B X_m^*}{K + X_m^*}$$

- aktivitu řízení v tomto rovnovážném stavu značíme A_0 a definujeme přímo jako koncentraci aktivního receptorového komplexu:

$$A_0 = X_m^* = \frac{K V_R[\text{CheR}]}{V_B[\text{CheB}] - V_R[\text{CheR}]}$$

Model signálního řízení chemotaxe

- při snížení aktivity vlivem atraktoru dochází k rapidnímu snížení X_m^*

Model signálního řízení chemotaxe

- při snížení aktivity vlivem atraktoru dochází k rapidnímu snížení X_m^*
- to má za následek omezení vlivu demetylace dle rovnice:

$$\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = V_R[\text{CheR}] - \frac{V_B[\text{CheB}]X_m^*}{K + X_m^*}$$

Model signálního řízení chemotaxe

- při snížení aktivity vlivem atraktoru dochází k rapidnímu snížení X_m^*
- to má za následek omezení vlivu demethylace dle rovnice:

$$\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = V_R[CheR] - \frac{V_B[CheB]X_m^*}{K + X_m^*}$$

- záporný člen je minimalizován a tedy se výrazně projeví satureovaná metylace ($V_R[CheR]$), která zvýší $X_m + X_m^*$ a tedy zejména X_m^*

Model signálního řízení chemotaxe

- při snížení aktivity vlivem atraktoru dochází k rapidnímu snížení X_m^*
- to má za následek omezení vlivu demetylace dle rovnice:

$$\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = V_R[\text{CheR}] - \frac{V_B[\text{CheB}]X_m^*}{K + X_m^*}$$

- záporný člen je minimalizován a tedy se výrazně projeví saturovaná metylace ($V_R[\text{CheR}]$), která zvýší $X_m + X_m^*$ a tedy zejména X_m^*
- aktivita v rovnovážném stavu je opět

$$A_0 = X_m^*$$

Model signálního řízení chemotaxe

- při snížení aktivity vlivem atraktoru dochází k rapidnímu snížení X_m^*
- to má za následek omezení vlivu demetylace dle rovnice:

$$\frac{d(X_m + X_m^*)}{dt} = V_R[CheR] - \frac{V_B[CheB]X_m^*}{K + X_m^*}$$

- záporný člen je minimalizován a tedy se výrazně projeví satureovaná metylace ($V_R[CheR]$), která zvýší $X_m + X_m^*$ a tedy zejména X_m^*
- aktivita v rovnovážném stavu je opět

$$A_0 = X_m^* = \frac{KV_R[CheR]}{V_B[CheB] - V_R[CheR]}$$

- aktivita nezávisí na vlivu ligandů
- model je **robustní** vůči změnám parametrů (je citlivý pouze na stabilní koncentraci X_m^*)