

Understanding Phototaxis of *Halobacterium salinarum*: A Systems Biology Approach

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

von

Stefan Streif

geboren am 5. Mai 1979 in Ravensburg

genehmigt durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter:

Prof. Dr.-Ing. Rolf Findeisen

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Marwan

Prof. Dr.-Ing. Martin Mönningmann

eingereicht am 1. Oktober 2010

Promotionskolloquium am 9. März 2011

Contributions in Systems Theory and Automatic Control
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Band 1

Stefan Streif

Understanding Phototaxis of
Halobacterium salinarum

A Systems Biology Approach

Shaker Verlag
Aachen 2011

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: Magdeburg, Univ., Diss., 2011

Copyright Shaker Verlag 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-0091-7

Shaker Verlag GmbH • P.O. BOX 101818 • D-52018 Aachen
Phone: 0049/2407/9596-0 • Telefax: 0049/2407/9596-9
Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

*“Progress in science depends on
new techniques, new discoveries and new ideas,
probably in that order.”*

Sydney Brenner
Nobel Prize in Medicine Laureate 2002

Danksagungen

Viele Personen haben zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen. Mein besonderer Dank gilt Prof. Wolfgang Marwan (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg und Max Planck Institut für Dynamik komplexer technischer System, Magdeburg) und Prof. Dieter Oesterhelt (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) für das interessante Forschungsthema, die wissenschaftlichen Gespräche und insbesondere für die Möglichkeit naturwissenschaftliche/biologische Arbeitsweisen kennen zu lernen und eigene Experimente machen zu dürfen. Herrn Prof. Marwan danke ich außerdem für seine Unterstützung beim Schreiben von Publikationen und die vielen hilfreichen Gespräche zum weiteren Fortgang meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Prof. Rolf Findeisen (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg) gilt mein besonderer Dank für seine langjährige Unterstützung, die freundschaftlichen und wertvollen Ratschläge als Mentor meiner wissenschaftlichen Arbeiten sowie für seine Tätigkeiten als erster Gutachter.

Prof. Martin Mönnigmann (Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die Erstellung des externen Gutachtens und sein Mitwirken am Promotionskolloquium.

Vieles Neues und Spannendes (mikrobiologisches Arbeiten und Einblicke in die Molekularbiologie und Biochemie) habe ich von Wilfried Staudinger während meiner Zeit am MPI in Martinsried gelernt. Ich danke ihm für die Freundschaft, für seine stets gewährte Hilfe und die geduldige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen.

Missen möchte ich auf keinen Fall die Erfahrungen die ich durch Betreuung meiner Studenten im Rahmen von Studienarbeiten, Diplomarbeiten, HiWi-Tätigkeiten und Praktika erlangt habe. Bedanken möchte ich mich bei Markus Rehberg für die Diskussionen und engagierte Mitarbeit bei der Modellierung der Phototaxis, bei Susanne Schach für die Ausdauer und Sorgfalt bei den Phototaxis-Messungen, bei Alexander Müller und Manuel Haas für die guten Ideen und den Fleiß während ihrer Mitarbeit bei der Entwicklung der Zellverfolgungsapparatur sowie bei Elisabeth Weidinger und Anne Dueck für die sehr gute Unterstützung bei den zahlreichen Phototaxis und Bioenergetik-Messungen.

Ich danke meinen ehemaligen Kollegen vom Max Planck Institut für Biochemie in Martinsried für die wunderbare gemeinsame Zeit. Matthias Schlesner und Ric del Rosario danke ich für die interessanten Diskussionen sowie die Möglichkeit bei ihren Projekten mitzuwirken. Geholfen haben mir auch die anregenden Gespräche mit Friedhelm Pfeiffer, Markus Rampp und Jörg Tittor. Den Mitarbeitern der Institutswerkstätten gilt meine besondere Anerkennung für die tatkräftige handwerkliche Unterstützung.

Bei meinem Wechsel von Martinsried an das Institut für Biologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg (am Max Planck Institut für Dynamik Komplexer Technischer Systeme) wurde ich von den Kolleginnen und Kollegen freundlich aufgenommen und bestens unterstützt. Für ihr Interesse an meiner Arbeit möchte ich meinen Dank an alle aussprechen, insbesondere auch an Christian Rohr für die gute Zusammenarbeit.

Meinen jetzigen Kollegen vom Institut für Automatisierungstechnik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg danke ich für ihre besonders hilfreichen Kommentare bei der Vorbereitung auf das Promotionskolloquium. Besonders erwähnen möchte ich Philipp Rumschinski für die hervorragende Zusammenarbeit bei alten und neueren Forschungsprojekten.

Stellvertretend für alle, die mir Simulationen auf den diversen Rechenclustern der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg ermöglicht haben, möchte ich mich bei Jörg Schulenburg vom Universitätsrechenzentrum bedanken.

Meinem „Vorgänger“ Torsten Nutsch danke ich für sein weiteres Interesse an der Phototaxis-Forschung und seine wertvollen Tipps.

Ich danke Prof. Eric Bullinger dafür, dass er mein Interesse für die Systembiologie während des Studiums geweckt hat, und für die vielen weiteren Dinge, die ich zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten von ihm gelernt habe. Sehr geholfen haben mir auch die Diskussionen mit Steffen Waldherr, Thomas Eissing und Prof. Erwin Frey.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern, Geschwistern und Freunden für ihre andauernde Unterstützung und den Glauben an meine Fähigkeiten danken. Mein besonderer Dank gilt meiner Verlobten Judith für ihre Geduld und ihr Verständnis, auch wenn sich die Arbeit oft bis tief in die Nacht oder über das Wochenende hinzog. Sie hat mir stets den Rücken freigehalten und mich unterstützt, wann immer sie konnte.

Stefan Streif
Magdeburg, 29. April 2011

Contents

List of symbols and abbreviations	XI
Deutsche Kurzfassung	XIII
1 Introduction	1
1.1 Taxis and motility of <i>Halobacterium salinarum</i>	1
1.2 Molecular machinery that controls taxis	3
1.2.1 Signal reception and signal cascade	4
1.2.2 Effector system: the flagellar motor and its switch	4
1.2.3 Sensory adaptation	6
1.2.4 Further components of the taxis signal transduction network	7
1.2.4.1 CheC and CheD	7
1.2.4.2 Fumarate	8
1.2.4.3 Archaea-specific taxis proteins	8
1.3 Interconnections between the signal transduction and energy transduction systems of <i>H. salinarum</i>	8
1.4 Motivation for a systems biology approach to understand signal processing in the taxis signal transduction network	9
1.5 Contribution and outline of the thesis	10
2 Quantitative measurements of motility and phototaxis by automated experimentation and model-based cell tracking	12
2.1 Quantitative measurements of phototaxis and motility	12
2.2 Setup for light-stimulation and image acquisition	13
2.2.1 Microscope and temperature-controlled stage	13
2.2.2 Cell observation and light-stimulation	14
2.2.3 Image acquisition and processing	17
2.3 Model-based tracking and analysis of the swimming behavior	18
2.3.1 Classification of cells as motile and non-motile	18
2.3.2 Mathematical description, filtering, and analysis	19
2.3.3 Filter design for cell track smoothing	21
2.3.4 Cell reversal detection algorithm	24
2.4 Automated experimentation	24
2.4.1 Hardware and software components	28
2.4.2 Processes and algorithms	29

2.4.3	Formal verification of the automation software	32
2.4.4	Performance	35
2.5	Discussion	35
3	Experimental investigation of the flagellar motility system	38
3.1	Molecular composition and driving force of the flagellar motility system	38
3.2	Energy transduction and bioenergetics	39
3.3	Results	41
3.3.1	DCCD prevents photokinesis by inhibiting the H ⁺ -ATP synthase but not flagellar motor components	41
3.3.2	Arginine enhances flagellar motility at low membrane potential	43
3.4	Discussion	43
4	Mathematical model of cooperative receptor/transducer units	49
4.1	Clustering and cooperativity of receptors and transducers	49
4.2	Results	51
4.2.1	Model for cooperative receptor/transducer units	51
4.2.2	Dose-response relation in thermal equilibrium	54
4.2.3	Effects of ligand depletion on the dose-response relation	58
4.2.4	Effects of physical association and direct molecular interactions of photoreceptors and transducers on the dose-response relation	59
4.3	Discussion	60
5	Kinetic mechanisms and feedback regulation of stimulus-induced transducer methylation	63
5.1	Sensory reception and adaptation	63
5.2	Results	66
5.2.1	Modeling concepts	66
5.2.2	Adaptation of the CheYp-level in wildtype cells	68
5.2.3	Methanol release of the wildtype and <i>cheY</i> -deletion mutant	70
5.2.4	Adaptation of the methylation-deficient mutant	76
5.2.5	Fitting of the final model to quantitative experimental data	77
5.3	Discussion	77
6	Stochastic dynamic model of phototaxis and comparison of model predictions with experimental data	83
6.1	Stochastic phenomena observed in phototaxis	83
6.2	The stochastic and dynamic model of phototaxis	85
6.2.1	Sensory reception and transduction – cooperative receptor/transducer units	85
6.2.2	Signal cascade – the phosphorylation and hydrolysis system	87
6.2.3	Effector system – the flagellar motor switch	88

6.2.4	Parameter estimation and stochastic simulation	89
6.3	Results	90
6.3.1	Stochasticity of the cellular response	90
6.3.1.1	Response time distributions of spontaneous and stimulus-induced switching and dose-dependent response to blue light	90
6.3.1.2	Model predictions and comparison of experiment and simulation	91
6.3.1.3	Statistical analysis of dose-response curves	93
6.3.2	Influence of intrinsic and extrinsic noise on the efficiency of signal transduction	96
6.3.3	Adaptation and sensitivity at constant background light	98
6.3.3.1	Comparison of experiment and simulation	99
6.3.4	Analysis of additional adaptation mechanisms	102
6.3.5	Integration of photo-sensory stimuli and spectral cross-talk	103
6.3.5.1	Response to repellent UV light	103
6.3.5.2	Effect of receptor concentration	105
6.3.5.3	Integration of photo-sensory signals	105
6.4	Discussion	106
7	Summary and conclusions	114
7.1	Summary and contributions	114
7.2	Concluding remarks	118
7.3	Outlook	118
A	Description, implementation, and simulation of mathematical models	120
A.1	Model of stimulus-induced transducer methylation and feedback regulation	120
A.1.1	Implementation and simulation	120
A.1.2	Parameter estimation	120
A.1.3	Equations and reactions	121
A.1.3.1	SRI and SRII photoreceptors	121
A.1.3.2	Chemotaxis transducers	121
A.1.3.3	R-TWA unit excitation	122
A.1.3.4	R-TWA unit adaptation	123
A.1.3.5	Two-component system	124
A.1.3.6	Radio-labeling and methanol release kinetics in the flow assay	124
A.1.4	Parameter values	126
A.2	Stochastic model of phototaxis	128

A.2.1	Implementation and hybrid stochastic-deterministic simulation algorithm	128
A.2.2	Parameter estimation	129
A.2.2.1	Stochastic optimization algorithm	129
A.2.3	Equations and reactions	132
A.2.3.1	Excitation of the photosensory system	132
A.2.3.2	Signal cascade	135
A.2.3.3	Switch complex	135
A.2.3.4	Adaptation	137
A.2.3.5	Discrete adaptation model for investigation of photon inefficiency	137
A.2.4	Parameter values	138
B	Quantitative and qualitative experimental findings relevant to the mathematical models	140
C	Materials and methods	142
C.1	Microbiological materials and methods	142
C.1.1	Overview of strains	142
C.1.2	Cell culturing and storage	142
C.1.3	Strain selection	143
C.1.4	Media and antibiotics	143
C.1.4.1	Complex medium	143
C.1.4.2	Antibiotics	143
C.2	Biochemical materials and methods	144
C.2.1	Treatment of cells with DCCD, CCCP, TPP ⁺ , and L-arginine	144
C.2.2	Measurements of photophosphorylation and cellular ATP concentration	144
C.3	Cell tracking experiments	145
C.3.1	Preparation of microscopic specimens	145
C.3.2	Quantitation of photokinesis and cell motility	146
C.3.3	Quantitation of phototaxis	146
C.4	Statistical and sensitivity analysis of phototaxis dose-response curves	148
C.4.1	Determination of confidence intervals for percentage of reversing cells	148
C.4.2	Analysis of dose-response curves by Poisson statistics	148
C.4.3	Determination of confidence intervals for the parameters of fitted Poisson distributions	150
C.5	Protein homology modeling	150
	Bibliography	151

List of symbols and abbreviations

This list serves as a reference for symbols and abbreviations that are not explained at each individual occurrence in the text.

Genes and proteins

BR	bacteriorhodopsin holoprotein
CheA/CheAp	unphosphorylated/phosphorylated autohistidine kinase
CheB/CheBp	unphosphorylated/phosphorylated methyl-esterase
CheC	phosphatase of CheY; short form for any one of the three CheCs: CheC1, CheC2, CheC3
CheR	methyl-transferase
CheW	scaffolding protein of the R-TWA complex; short form for any one of the two CheWs: CheW1, CheW2
CheY/CheYp	unphosphorylated/phosphorylated response regulator
<i>flaH</i>	flagellar accessory gene H
<i>flaI</i>	flagellar accessory gene I
HR	halorhodopsin holoprotein
Htr	halobacterial transducer protein, subscript indicates the methylation state
SRI	sensory rhodopsin holoprotein I; subscript indicates the absorption maximum of the corresponding photointermediate, e. g. <i>SRI</i> ₃₇₃
SRII	sensory rhodopsin holoprotein II; subscript indicates the absorption maximum of the corresponding photointermediate, e. g. <i>SRII</i> ₄₈₇

Media and biochemical substances

Arg	L-arginine
ATP	adenosine triphosphate
BSH	<i>H. salinarum</i> complex medium without peptone
CCCP	carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
DCCD	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
EtOH	ethanol
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -(2-ethanesulfonic acid)
MetOH	methanol
Mev	mevinolin (lovastatin)
TPP ⁺	tetraphenylphosphonium cation

General abbreviations

CCW	counter-clockwise
CW	clockwise
fbm	feedback mechanism
FWHM	full width at half maximum or spectral width
OD	optical density; subscript gives the wavelength in nm at which the optical density was measured, e. g. OD ₆₀₀
ODE	ordinary differential equation
MWC	Monod-Wyman-Changeux
PDF	probability density function
pmf	proton motive force
PN	Petri Net
prob.	probability
R-TWA	receptor, transducer, CheW, CheA complex
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

Mathematical symbols and notation

1	(subscript) methylated state, e. g. Htr_1
0	(subscript) unmethylated state, e. g. Htr_0
3H	(superscript) tritium-labeled molecules
A	(subscript or superscript) activity, active state
I	(subscript or superscript) inactivity, inactive state
I_c	intensity (in photons/m ² /s) of light at color c
dm	demethylation rate
F_X	free energy (in units of $k_B T$) of state X
$h\nu_c$	energy content of a photon of wavelength or color c
$k_B T$	thermal energy (Boltzmann constant k_B , absolute temperature T)
λ	wavelength of light (in nm)
λ_{max}	wavelength of the intensity or transmission maximum of a light spectrum
m	methylation rate
σ	standard deviation

Deutsche Kurzfassung

Die Phototaxis von *H. salinarum*

Die Phototaxis des Archaeons *Halobacterium salinarum* ist ein Beispiel für Signaltransduktion in Prokaryoten. Die Phototaxis erlaubt den Zellen die Bereiche in der Umgebung zu finden, die die besten Lichtbedingungen bieten. Halobakterielle Zellen schwimmen vorwärts durch die Rotation eines Flagellenbündels im Uhrzeigersinn oder rückwärts durch Rotation gegen den Uhrzeigersinn. Außerdem verfügen die Zellen über zwei verschiedene Typen von Photo-Rezeptoren, die für Licht verschiedener Wellenlängen empfindlich sind. Die verschiedenen Lichtreize werden durch die Photo-Rezeptoren aufgenommen und deren Aktivierung einem molekularen Netzwerk übermittelt, welche das Umschaltverhalten zwischen den Rotationsrichtungen je nach äußerem Reiz beeinflusst. Im molekularen Netzwerk werden unterschiedliche Reize integriert, verstärkt und zeitlich verzögert gelöscht (Adaptation). Die Adaptation ermöglicht, dass sich die Zellen bei ihrer Suche nach den günstigsten Lichtbedingungen nicht an den absoluten Reizintensitäten orientieren, sondern nur auf deren Änderungen reagieren. Ohne Stimulation durch Lichtreize oder im adaptierten Zustand wechseln die Zellen immer wieder zufällig zwischen der vorwärts- und rückwärts gerichteten Schwimmbewegung. Im Mittel geschieht das alle 15 Sekunden. Nach einer Schreckstimulation wird der Wechsel der Schwimmrichtung deutlich schneller eingeleitet, während bei einer Lockstimulation die Dauer der aktuellen Schwimmrichtung ausgedehnt wird.

Systembiologische Untersuchung der Phototaxis

Das Phototaxis-Signaltransduktionsnetzwerk ist ein Modellsystem, um die molekularen Mechanismen und Prozesse zu verstehen, die es Zellen erlauben, sinnvoll auf Umgebungsreize zu reagieren. Als Modellsystem ist die Phototaxis besonders deshalb interessant, weil Auswirkungen von exakt dosierten Stimuli an einzelnen Zellen beobachtet werden können. Dies ist möglich, da zum einen Licht (d.h. der System-Eingang) bzgl. Wellenlänge, Intensität und Dauer exakt kontrolliert werden kann, und die Photo-Rezeptoren photo-biochemisch und kinetisch sehr gut charakterisiert sind. Zum anderen kann das Schaltverhalten (d.h. der System-Ausgang) einzelner Zellen leicht mittels Mikroskopie studiert werden. So können z. B. Häufigkeitsverteilungen der Dauer zwischen Lichtstimulation und Zellantwort gemessen werden. Im Gegensatz zu reinen Mittelwerten enthalten diese

stochastischen Verteilungen sehr viel mehr Information über das Signaltransduktionsnetzwerk.

Die Phototaxis von *H. salinarum* wird seit mehr als 30 Jahren untersucht. Mit Hilfe von biochemischen und molekularbiologischen Methoden wurden an der Signaltransduktion beteiligte molekulare Komponenten identifiziert. Desweiteren konnte die Dynamik und die Stochastizität des Schaltverhaltens quantitativ charakterisiert werden. Weil aber noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, wie einige der gemessenen (dynamischen, stochastischen, quantitativen und qualitativen) Phänomene entstehen, verfolgt diese Arbeit einen systembiologischer Ansatz.

Die Systembiologie bemüht sich um ein systemisches und dynamisches Verständnis von komplexen Prozessen in biologischen Netzwerken. Dazu werden mathematische Modelle verwendet, um das biologische Wissen über die Struktur und die Dynamik eines Netzwerks zu bündeln und zu formalisieren, und um mit Hilfe von systemtheoretischen Methoden Vorhersagen und Hypothesen zu generieren. Ein Schwerpunkt bei der Systembiologie liegt außerdem auf der Entwicklung von neuen Messmethoden, um physiologische Vorgänge besser und genauer zu erfassen.

Die Struktur eines (systembiologischen) mathematischen Modells wird oftmals durch die biochemischen Reaktionen von Molekülen definiert. Die Dynamik des Modells (d.h. die zeitliche Entwicklung von Molekülmengen) wird über Reaktionskinetiken beschrieben. Oft jedoch, und so auch im Fall der Phototaxis, ist nur unvollständiges Wissen über die Struktur und die Dynamik vorhanden, und in den seltensten Fällen können molekulare Reaktionen direkt gemessen werden. Deshalb ist in der Systembiologie ein iterativer Zyklus bestehend aus mathematischer Modellierung, Simulation und Vergleich von experimentellen Daten und Simulationsergebnissen von zentraler Bedeutung. Dabei werden Hypothesen zur Struktur und Dynamik möglicher molekularer Mechanismen zu Modellen umgesetzt und diese Modelle anhand von experimentellen Daten validiert. Häufig können so bestimmte Hypothesen verworfen oder bestätigt werden.

Entsprechend der untersuchten Fragestellung und der vorhandenen Daten kommen andere Modellierungsformalismen zum Einsatz. So ist z. B. eine deterministische-kontinuierliche Modellierung (gewöhnliche Differentialgleichungen) und Simulation für die Beschreibung und Analyse von stochastischen Phänomenen meistens ungeeignet. Weiterhin werden bei der mathematischen Modellierung eines biologischen Systems in einem ersten Schritt häufig zuerst nur einzelne Teile eines Netzwerks betrachtet und modelliert. Da die Systembiologie sich aber um ein systemisches Verständnis bemüht, sollten die einzelnen Teilmodelle letztendlich zusammengeführt werden, um so ein kohärentes, konsistentes und durch biologische Experimente validiertes mathematisches Modell des Gesamtsystems zu gewinnen.

Forschungsbeiträge dieser Arbeit

Ziel der Arbeit ist ein verbessertes systemisches Verständnis für die bei der Phototaxis-Signaltransduktion ablaufenden molekularen Vorgänge, sowie eine Erklärung der dynamischen, quantitativen und stochastischen Phänomene. Zur Erreichung dieses Ziels wird ein systembiologischer Ansatz gewählt. Dieser besteht aus (1.) biologischen Experimenten, (2.) der Entwicklung einer Versuchsapparatur zur quantitativen Messungen der Zellantworten nach genau definierten Perturbationen (Lichtstimuli) des Phototaxis-Netzwerks und (3.) der mathematischen (deterministischen und stochastischen) Analyse und Modellierung der biologischen Vorgänge. In den einzelnen Kapiteln der Arbeit werden folgende Forschungsbeiträge erarbeitet:

In **Kapitel 2** (basierend auf [185]) wird eine Versuchsapparatur entwickelt, die dazu dient, Zellen mit Licht zu stimulieren und eine darauf folgende Änderung des Schwimmverhaltens zu messen. Die Apparatur besteht aus einem Lichtmikroskop und weiteren optischen, mechanischen und elektronischen Komponenten. Zur Analyse des Schwimmverhaltens kommen Bildverarbeitungsmethoden und u. a. ein modellbasiertes stochastisches Filterverfahren (Kalman-Filter) zum Einsatz.

In einem nächsten Entwicklungsschritt werden weitere Software- und Mechatronik-Komponenten eingeführt, welche es erlauben, dass verschiedene Phototaxis-Versuche nach festlegbaren Messparametern automatisiert durchgeführt werden. Außerdem wird eine Rückführung implementiert, in der die online ausgewerteten Messergebnisse die Reihenfolge der verschiedenen Versuche beeinflusst. Ziel der einfachen Regelung ist dabei eine vorgegebene Standardabweichung (der Messdaten zu den verschiedenen Versuchen) zu erfüllen und die Gesamtmesszeit so kurz wie möglich zu halten.

Durch die Automatisierung werden manuelle Eingriffe des Experimentators erheblich reduziert, bekannte systematische Fehlerquellen eliminiert und eine objektivierete und standardisierte Messung der Phototaxis wird ermöglicht. Die entwickelte Apparatur wird in dieser Arbeit eingesetzt, um quantitative Daten für die Modellierung der Phototaxis zu erheben. Darüber hinaus lieferte sie in weiteren Projekten [2, 164, 181, 195] wichtige Beiträge zur Charakterisierung der am Phototaxis-/Chemotaxis-Signaltransduktionsnetzwerk beteiligten molekularen Komponenten.

Das Phototaxis-Netzwerk des Archaeons *H. salinarum* ist aus ähnlichen molekularen Komponenten aufgebaut und funktioniert nach ähnlichen Prinzipien wie das Chemotaxis-Netzwerk von Bakterien wie *E. coli* und *B. subtilis*. Über das Effektorsystem (d.h. den Motor und dessen Umschaltmechanismus) ist in Archaeen aber nur sehr wenig bekannt. Er scheint aus völlig anderen molekularen Komponenten zu bestehen als der bakterielle Motor, da die orthologen Gene bakterieller Motorkomponenten in Archaeen fehlen.

In **Kapitel 3** (basierend auf [184]) wird der grundlegenden, aber bisher vernachlässigten Frage nachgegangen, welche Energiequelle die Rotation des Flagellenbündels antreibt. Durch biochemische Experimente und durch Messungen mittels der in

Kapitel 2 entwickelten Zellverfolgungsapparatur wird festgestellt, dass der Motor in *H. salinarum* durch ATP angetrieben wird und nicht durch einen Protonengradienten wie in den meisten Bakterien. Somit kann zum einen ein fundamentaler Unterschied zur bakteriellen Motilität gezeigt werden und zum anderen wird auch ein wichtiger Beitrag zu einem besseren Verständnis der biochemischen Prozesse bei der Phototaxis geleistet.

Nachdem die experimentell-methodische Grundlage für quantitative Phototaxis-Messungen gelegt und eine wichtige biologische Frage geklärt wurde, behandelt der weitere Teil der Arbeit (**Kapitel 4–6**) die mathematische Modellierung und Analyse. Das Hauptaugenmerk liegt auf der Modellierung der Adaptation, der Signalintegration, der Signalamplifikation, der Effizienz der Signalverarbeitung im Netzwerks und der Stochastizität der Zellantwort. Dazu werden in Kapitel 4 und 5 zuerst verschiedene Teile des Phototaxis-Netzwerks getrennt betrachtet und modelliert. In Kapitel 6 werden diese Teile dann zu einem konsistenten Modell zusammengeführt. Die quantitativen Daten für die Validierung der (Teil-)Modelle werden teils aus der Literatur übernommen, überwiegend aber in eigenen Experimenten mittels der entworfenen Messapparatur (Kapitel 2) gewonnen.

In **Kapitel 4** wird ein mathematisches Modell für die Aktivierung der Phototaxis und Chemotaxis Rezeptoren/Transducer hergeleitet. Die Aktivierung der Phototaxis-Transducer erfolgt durch die Photo-Rezeptoren und die Aktivierung der Chemo-Rezeptoren durch Bindung von Signalmolekülen. Das Modell macht die Annahme, dass benachbarte Phototaxis- und Chemotaxis-Rezeptoren/Transducer in Einheiten organisiert sind und durch konformative Koppelung alle zeitgleich entweder aktiv oder inaktiv sind und somit gemeinsam das nachgeschaltete molekulare Netzwerk aktivieren. Dabei trägt jeder Rezeptor/Transducer in der Einheit zur Aktivierung/Inaktivierung der gesamten Einheit bei. Durch die Kooperativität und durch die konformative Koppelung innerhalb einer Einheit werden verschiedene chemo- und photo-sensorische Reize integriert, d.h. miteinander verrechnet, und durch die gemeinsame Aktivierung verstärkt.

Um eine analytische Gleichung für die Aktivierungswahrscheinlichkeit einer Einheit herzuleiten, werden ähnliche Annahmen wie im weit verbreiteten Modell von Monod-Wyman-Changeux (MWC) gemacht. Das MWC-Modell findet seit seiner Veröffentlichung 1965 häufig Anwendung in systembiologischen Modellen. Es ist allerdings nur unter restriktiven und biologisch teilweise unrealistischen Voraussetzungen (völlige Durchmischung des Reaktionsvolumens, Reaktanden in nicht limitierenden Konzentrationen vorhanden, kontinuierliche Konzentrationen anstatt diskrete Molekülzahlen) gültig. In dieser Arbeit wird z. B. erstmals gezeigt, dass das MWC-Modell bei einer geringen Anzahl von aktivierenden Signalmolekülen eine weit geringere Kooperativität zeigt als unter den angenommenen idealen Bedingungen. Im Gegensatz zum MWC-Modell ist das in dieser Arbeit hergeleitete Modell auch unter nicht idealen Bedingungen gültig und kann auf die Modellierung von Phototaxis Rezeptoren/Transducer und Chemo-Rezeptoren angewendet werden. Auf dieses Modell für kooperative Rezep-

tor/Transducer Einheiten wird im weiteren Verlauf der Arbeit vielfach zurückgegriffen und die Annahme kooperativen Verhaltens wechselwirkender Moleküle wird mehrfach und unabhängig bestätigt.

Adaptation an gleichbleibende Umgebungs- und Lichtbedingungen erfolgt, zumindest teilweise, durch reversible Methylierung der an der Signalverarbeitung beteiligten Transducer-Proteine. Dadurch wird ein stimulus-aktivierter oder -inaktivierter Transducer wieder ab- oder angeschaltet, so dass sich der Aktivitätszustand der vor dem Stimulus herrschte, zeitlich verzögert wieder einstellt. Die Demethylierung der Transducer kann quantitativ und zeitaufgelöst als freigesetztes Methanol (MetOH) gemessen werden. Das experimentell beobachtete charakteristische Verhalten von Wildtyp-Zellen (Anstieg der MetOH-Freisetzung bei jeder Art des Stimulus) und das von verschiedenen Mutanten konnte zu Beginn der Arbeit nicht erklärt werden. Durch iterative Zyklen bestehend aus mathematischer Modellierung und Vergleich von Modellprädiktionen mit experimentellen Daten werden in **Kapitel 5** (basierend auf [183]) verschiedene Hypothesen, wie die beobachteten MetOH-Muster zustande kommen könnten, untersucht. Dabei kommt ein deterministischer-kontinuierlicher Modellierungsformalismus (gewöhnliche Differentialgleichungen) zur Anwendung, da dieser die iterative Modellierung und Parameterbestimmung vereinfacht, und die Modelle zur Beschreibung der experimentellen Daten aus Populationsmessungen ausreichend sind.

Das Modell reproduziert (quantitativ) die MetOH-Freisetzung von Wildtyp-Zellen und von den untersuchten Mutanten. Dabei ergeben sich aus der iterativen Modellierung strukturelle und dynamische Modellmerkmale, die zwingend notwendig sind, um die Experimente erklären zu können. Das Modell sagt voraus, dass die Transducer eine aktivierende und eine inaktivierende Methylierungsstelle besitzen, und dass die Adaptation durch antagonistische, selektive und reversible Methylierung dieser zwei unterschiedlichen Methylierungsstellen erfolgt. Außerdem wird festgestellt, dass die Demethylierung der Transducer in nichtlinearer Art und Weise sowohl von deren Aktivität, als auch von der Konzentration des Antwort-Regulator-Protein CheY abhängig ist. Desweiteren wird vorausgesagt, dass Rezeptoren und Transducer mit unterschiedlichen Stimulus-Spezifitäten kooperative Einheiten bilden (vgl. Kapitel 4), wodurch Mutationen an den Methylierungsstellen ausgeglichen werden können.

Bei niedrigen Intensitäten eines Lichtstimulus werden nur wenige Photo-Rezeptoren in einer einzelnen Zelle aktiviert. Die Anzahl der aktivierten Photo-Rezeptoren pro Zelle unterliegt einer stochastischen Verteilung, weshalb deterministische-kontinuierliche Modellierung und Simulation nicht gut geeignet sind, um die physiologische Antwort der Zellen bei Aktivierung einzelner Photo-Rezeptoren zu beschreiben. Aus diesem Grund wird in **Kapitel 6** ein stochastisches und diskretes Modell des Phototaxis-Netzwerks erstellt. Das Modell bündelt das in den vorherigen Kapiteln gewonnene Wissen über die Adaptation, die Amplifikation sowie die Signalintegration in den kooperativen Rezeptor/Transducer Einheiten und verknüpft diese Teilmodelle mit dem zu Beginn der Arbeit vorhandenen Modell des Motor-Umschaltmechanismus [123].

Das Modell reproduziert experimentelle Dosis-Wirkungskurven und die zeitlich aufgelöste Wahrscheinlichkeitsdichten für ein Umschaltereignis nach verschiedenen Lichtstimuli. Als Stimuli werden verschiedene kurze und längere Lichtpulse einer oder mehrerer Wellenlängen verwendet, um verschiedene Aspekte, wie die gezielte Anregung eines bestimmten Photo-Rezeptortyp, als auch die Integration und der „cross-talk“ aller Photo-Rezeptoren, zu untersuchen.

Anhand des Modells können verschiedene in der Literatur beschriebene Phänomene besser verstanden werden. Dazu gehört z. B. eine Hypothese (basierend auf einer statistischen Analyse von Dosis-Wirkungskurven [97]), die besagt, (1.) dass bereits ein einziger aktivierter Blaulichtrezeptor eine Umschaltreaktion bewirken kann, und (2.) dass nur $1/10 - 1/20$ der aktivierten Blaulichtrezeptoren eine Umschaltreaktion bewirken, hingegen alle anderen aber keinerlei Reaktion hervorrufen.

Um die Reaktion auf einzelne Photonen zu reproduzieren, ist im Modell eine hohe Verstärkung in der ultrasensitiven Signalkaskade (Phosphorylierung von CheY durch CheA und Hydrolyse durch CheC) notwendig aber nicht hinreichend. Durch eine zusätzlich kooperative Antwort von Rezeptor/Transducer-Einheiten ist die Gesamtverstärkung des Netzwerks aber hinreichend, um die Daten zu reproduzieren. Entscheidend ist dabei die Größe und die damit verbundene gemeinsame Antwort der Rezeptoren/Transducer einer Einheit. Beide Verstärkungsmechanismen zusammen, d. h. (1.) wenige aber große Einheiten und (2.) eine ultrasensitive Signalkaskade erlauben es, die Dosis-Wirkungskurven wiederzugeben.

Für den gewählten Parametersatz besitzt das Modell 30 kooperative Einheiten bestehend aus 360 Rezeptor- und Transducer-Molekülen pro Zelle. Das Modell hat damit aber weit weniger ($< 1/30$) Rezeptor-Moleküle als experimentell bestimmt. Dies lässt sich wie folgt erklären. In Kapitel 5 wird festgestellt, dass die Einheiten nicht nur aus Phototaxis-Rezeptoren/Transducer bestehen, sondern auch aus Chemotaxis-Rezeptoren/Transducern. Dadurch werden aber nicht nur Lichtsignale verstärkt, sondern auch chemotaktische Umgebungsreize. Durch Simulationen wird gezeigt, dass diese Umgebungsreize eine saturierende Aktivierung oder Inaktivierung einzelner Einheiten bewirken können. Ist eine Einheit saturiert, dann kann sie nicht mehr durch ein Photon aktiviert werden, oder anders ausgedrückt: das Photon bleibt wirkungslos. Würde man im Modell die Anzahl der kooperativen Einheiten z. B. verdreifachen und würde man die Umgebungsreize berücksichtigen, so ließe sich die experimentell beobachtete Photoneneffizienz erklären, während das Modell in etwa die spektroskopisch gemessene Zahl der Rezeptoren/Transducer annimmt. Der beschriebene Sättigungseffekt kann im Prinzip auch durch die Methylierung der Transducer entstehen. Allerdings können keine Parameter gefunden werden, für die der Effekt stark genug ist, um die Photoneneffizienz zu erklären.

Im Modell führt die Aktivierung eines einzelnen Blaulichtrezeptors zu einer starken und sehr schnellen Aktivierung der Signalkaskade. Bei Blaulichthintergrund werden die Rezeptoren nur alle paar Sekunden durch ein Photon aktiviert, wobei die Zeitintervalle zwischen den Aktivierungen (annähernd) exponential verteilt sind. Bei Blaulichthintergrund ist der Adaptationsmechanismus im Modell nicht in der Lage dieses starke und fluktuierende Signal zu kompensieren und so eine Adaptation zu vermitteln. Hingegen adaptierten die Zellen im biologischen Experiment sehr wohl. Eine Analyse des Modells deutet darauf hin, dass es einen weiteren Adaptationsmechanismus neben der reversiblen Methylierung geben muss. Es wird gezeigt, dass eine Veränderung der Größe der kooperativen Einheiten einen Mechanismus darstellt, welcher die Adaptation an blaues Hintergrundlicht ermöglicht. Neuere Forschungsergebnisse [38] legen einen ähnlichen Adaptationsmechanismus im *E. coli* Chemotaxis-Netzwerk nahe. In *Halobacterium salinarum* könnte die Größenänderung der Einheiten ein direkter Effekt der reversiblen Methylierung (Kapitel 5) sein.

Schlussbemerkung

Die Kombination von technischen Entwicklungen, biologischen Experimenten sowie mathematischer Modellierung und Analyse liefert einen wesentlichen Beitrag zu einem besseren Verständnis der verschiedenen beobachteten quantitativen und stochastischen Phänomene in der Phototaxis. Außerdem werden durch die Analyse der Modelle neue Hypothesen zu biologischen Prozessen aufgestellt, wodurch sich neue Ansätze für weitere systembiologisch-orientierte Studien ergeben.