

Die Phototaxis von *Halobacterium salinarum* - Mathematische Beschreibung stochastischer Prozesse

Von der Fakultät Maschinenbau der Universität Stuttgart
genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr. Ing.)

Vorgelegt von

Dipl.-Ing. Torsten Nutsch

aus Stuttgart - Bad Cannstatt

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr.h.c.mult. E.D. Gilles
Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. W. Marwan

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2006

Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik
Universität Stuttgart

2005

Vorwort

Diese Arbeit ist während meiner fünfjährigen Beschäftigung am Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Magdeburg entstanden. Nach meiner Tätigkeit als Entwicklungsingenieur für Schaltnetzteile hatte ich dort die Möglichkeit, eine völlig neue Aufgabe zu übernehmen. Die Arbeit an diesem systembiologischen Thema war ausgesprochen interessant und hat mir großen Spaß gemacht. Für diese Chance sowie die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen danke ich Herrn Professor Gilles.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meinen Kooperationspartnern Herrn Professor Marwan, Herrn Professor Oesterhelt und Wilfried Staudinger. Sie haben mir geholfen, mich in die molekularen Prozesse der Phototaxis einzudenken und waren immer bereit und interessiert, auf meine Fragen und Ideen einzugehen.

Außerdem möchte ich hier noch das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima und die guten Rahmenbedingungen am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik, Stuttgart erwähnen. Mein Dank gilt meinem Zimmerkollegen Stefan Schwarzkopf, allen Kollegen am ISR, den Kollegen am MPI, Magdeburg sowie meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Taxis	14
1.2	Motivation	16
1.3	Aufbau der Arbeit	17
2	Stochastische Prozesse	18
2.1	Modellierung	19
2.1.1	Markov-Ketten (zeitdiskret)	19
2.1.2	Markov-Prozesse (zeitkontinuierlich)	20
2.2	Simulation	21
2.2.1	Stochastische Simulation - Monte Carlo	21
2.2.1.1	Gillespie-Algorithmus	21
2.2.1.2	Stochsim-Algorithmus	22
2.2.2	Deterministische Simulation	23
2.3	Eigenschaften stochastischer Prozesse	24
2.3.1	Vergleich zur deterministischen Betrachtung am Beispiel von chemischen Reaktionen	24
2.3.2	Vergleich von Mess- und Simulationsergebnissen am Beispiel von parallelen Reaktionen	25
2.3.3	Steilheit der Häufigkeitsverteilung am Beispiel des Poisson-Prozesses	28
3	Excitation und Adaptation	31
3.1	Molekulare Signaltransduktion	31
3.2	Verstärkung innerhalb von Rezeptorkomplexen	35
3.2.1	Definition der Verstärkung	35
3.2.2	Verstärkung bei <i>E. coli</i>	36
3.2.3	Verstärkung eines einfachen Rezeptormodells	38
3.2.4	Mögliche Verstärkungsmechanismen	40
3.2.4.1	Verstärkung durch Kooperativität im Rezeptorgitter	40
3.2.4.2	Verstärkung durch positive Rückkopplung	41

3.3	Perfekte und robuste Adaptation	42
3.4	Adaptationsmodell nach Barkai und Leibler	44
3.5	Innere und äußere negative Rückführung	46
3.6	Einfaches Modell der Excitation und Adaptation	47
3.6.1	Photozyklus	48
3.6.2	Transducer-Aktivität	50
3.6.3	Phosphatübertragung	51
3.6.4	Methylierungszustand	53
4	Schaltverhalten des Flagellarmotors	55
4.1	Beispielorganismus <i>E. coli</i>	56
4.1.1	Molekularer Aufbau des Flagellarmotors	57
4.1.2	Schaltverhalten des Flagellarmotors	57
4.1.3	Modelle aus der Literatur für <i>E. coli</i>	60
4.1.3.1	Zwei-Zustandsmodell	60
4.1.3.2	Vier-Zustandsmodell	61
4.1.3.3	Monod-Wyman-Changeaux MWC	63
4.1.3.4	Conformational Spread Modell	65
4.2	Modelle aus der Literatur für <i>Halobacterium salinarum</i>	67
4.2.1	Modell von Schimz und Hildebrand	67
4.2.2	Modell von Marwan und Oesterhelt	68
4.2.3	Modell von Naber	69
4.2.4	Modell von Nutsch, Marwan, Oesterhelt und Gilles	70
4.2.5	Modell von McCain, Amici und Spudich	72
4.3	Herleitung eines neuen Modells	72
4.3.1	Funktionszustände des halobakteriellen Motors	73
4.3.1.1	Stopp-Phase	73
4.3.1.2	Refraktär- und Kompetent-Phase	74
4.3.1.3	Aktiv-Phase	76
4.3.2	Eigenschaften des vollständigen Petri-Netz-Modells	77
4.3.3	Abschätzung der Anzahl nötiger Teilschritte	78
4.3.3.1	Stopp-Phase	79
4.3.3.2	Kompetent-Phase	79
4.3.3.3	Aktiv-Phase	80
4.3.4	Detailliertes Modell des Schaltkomplexes	83
4.3.5	Modellreduktion	85
4.3.6	Zeitverläufe im adaptierten Fall	86
4.3.7	Reduziertes signalorientiertes Modell	88

5	Ergebnisse	91
5.1	Deterministische Stimulation	91
5.1.1	Häufigkeitsverteilung von spontanen und lichtinduzierten Umschalteignissen	91
5.1.2	Stimulation mit Einfach- und Doppelpulsen	92
5.1.3	Schreckstimulation während und nach der Refraktär-Phase	95
5.1.4	Inverse Antwort auf einen Lockreiz	100
5.1.5	Größer werdende Reaktion auf eine Orangelicht-Pulsfolge	101
5.1.6	Geringer werdende Reaktion auf eine UV-Licht-Pulsfolge	103
5.2	Stochastische Stimulation	105
5.2.1	Messung der Dosis-Wirkungs-Kurve	106
5.2.2	Anzahl aktivierbarer Rezeptoren im Modell	108
5.2.3	Simulation der Dosis-Wirkungs-Kurve synchronisierter Zellen	112
5.2.4	Experimente mit unsynchronisierten Zellen	114
6	Diskussion	118
6.1	Modellierungsansatz	118
6.2	Rolle der Refraktär-Phase	118
6.2.1	Alternatives Schaltermodell	119
6.3	Dephosphorylierung von CheYP	120
6.4	Excitation auf schwache Lichtpulse	120
6.4.1	Alternative Signalform der Excitation	122
6.5	Adaptation	122
6.6	Fumarat	124
6.7	Schlussbemerkung	124
A	Anhang	125
A.1	Modellgleichungen	125
A.2	Modellparameter	127
	Abkürzungsverzeichnis	128
	Literaturverzeichnis	131

Zusammenfassung

Die Phototaxis von *Halobacterium salinarum* ist ein elegantes Beispielsystem für Signaltransduktion in Prokaryoten. Die Zellen verfügen über zwei verschiedene Typen von Photorezeptoren SRI und SRII, die für Licht verschiedener Wellenlängen empfindlich sind. An den Rezeptoren schließt sich ein molekulares Signaltransduktionsnetzwerk an, das das Schwimmverhalten der Zellen je nach äußerem Reiz beeinflusst. Ohne Stimulation wechseln die Zellen immer wieder zufällig zwischen der vorwärts- und rückwärts gerichteten Schwimmbewegung hin und her. Im Mittel geschieht das alle 12 Sekunden. Nach einer Schreckstimulation wird der Wechsel der Schwimmrichtung deutlich schneller eingeleitet, während die Zellen bei einer Lockstimulation die Dauer der aktuellen Schwimmrichtung noch länger ausdehnen. Beide Schwimmphasen verhalten sich sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Fall symmetrisch zueinander.

Dieses Signaltransduktionssystem ist für eine systembiologische Betrachtung besonders interessant, weil hier Auswirkungen von exakt dosierten Stimuli an einzelnen Zellen beobachtet werden können. Mittels computerbasierter Methoden ist eine automatisierte Messung der Häufigkeitsverteilung der Schwimmdauer möglich. Im Gegensatz zu reinen Mittelwerten ist in den Häufigkeitsverteilungen sehr viel mehr Informationsgehalt enthalten, der Einblicke auf den zugrundeliegenden Prozess erlaubt. Damit sind die Voraussetzungen für eine detaillierte Modellierung gegeben, die die stochastische Natur von Reaktionen an einem einzelnen Proteinkomplex, dem Motorkomplex, berücksichtigt.

Der Verlauf von Messungen des Eingangs-Ausgangs-Verhaltens von Zellen wird entscheidend von der Kinetik des Schaltprozesses beeinflusst. Deshalb ist es wichtig, ein möglichst genaues Modell des Schaltverhaltens von Halobakterien zu erstellen, um derartige Messungen analysieren zu können.

Im Gegensatz zu den gängigen Motormodellen von *E. coli* befindet sich der Schaltprozess von *Halobacterium salinarum* nicht im thermischen Gleichgewicht. Vielmehr handelt es sich hier um einen energieverbrauchenden

Kreisprozess, der nacheinander unterschiedliche Phasen in einer bestimmten Vorzugsrichtung durchläuft. In einem ersten Schritt konnten mittels Analyse von experimentellen Ergebnissen 8 verschiedene Funktionszustände (Phasen) des halobakteriellen Schaltprozesses identifiziert werden (4 Phasen pro Schwimmrichtung). Die **Stopp-Phase** ist leicht durch Beobachten der Schwimmbewegung zu erkennen. Sie dauert sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Fall im Mittel 0,43 Sekunden. Nach dieser Phase schwimmt die Zelle in der entgegengesetzten Richtung weiter. In den ersten 1-2 Sekunden nach dieser Richtungsumkehr reagiert sie allerdings verzögert (refraktär) auf einen Schreckreiz. Dieses Verhalten wird der **Refraktär-Phase** zugeordnet, deren Dauer durch einen Schreckreiz deutlich verlängert wird. Anschließend befindet sich der Schaltkomplex in der **Kompetent-Phase**. Hier ist der Motor 'kompetent', die Richtungsumkehr bei einem Schreckreiz zu aktivieren. Diese Aktivierung geschieht schließlich in der letzten Phase, der **Aktiv-Phase**. Danach stoppt der Motor, bevor die Funktionszustände in analoger Art und Weise in der entgegengesetzten Schwimmrichtung durchlaufen werden.

In einem zweiten Schritt wurde die Kinetik der einzelnen Phasen aufgrund von gemessenen Häufigkeitsverteilungen von Prozessdauern bestimmt. Daraufhin konnte schließlich ein detailliertes Modell aufgestellt werden, das die einzelnen Phasen sowie die Kinetik ihrer Übergänge miteinander vereint. Es besteht aus 44 Untereinheiten, die sich synchron in einem der oben genannten Funktionszustände befinden. Jede Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle des Schaltsignals CheYP. In der Refraktär-Phase sind die meisten Bindungsstellen anfänglich noch belegt. Allerdings wird nun gebundenes CheYP verstärkt hydrolysiert und dissoziiert schließlich als CheY und P_i von den Untereinheiten ab. Dieser Prozess erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit für einen kooperativen Übergang aller Untereinheiten in die Kompetent-Phase. Im Gegensatz zur Refraktär-Phase wird hier gebundenes CheYP weniger schnell hydrolysiert, so dass der Belegungsgrad in der Kompetent-Phase unter unstimulierten Bedingungen wieder ansteigt. Ein Schrecksignal erhöht die CheYP-Konzentration und beschleunigt diesen Prozess beträchtlich. Mit dem Belegungsgrad steigt auch die Wahrscheinlichkeit an, dass die nächste Phase, die Aktiv-Phase, eingeleitet wird. In dieser Phase durchlaufen alle Untereinheiten eine konformative Änderung, bevor der Motor in der Stopp-Phase anhält und schließlich in der entgegengesetzten Rotationsrichtung weiterdreht.

Um Simulationen von Experimenten mit unterschiedlichen Stimulationsprogrammen durchführen zu können, wird ein Modell der Signaltransduktion oberhalb des Motors benötigt. Dieses Modell muss sowohl die Signalbildung von den Rezeptoren bis hin zum Motor beschreiben können (Excitation) als auch die darauf folgende Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen

(Adaptation). Die Bedingungen für eine perfekte Adaptation wurden unter unterschiedlichen strukturellen Annahmen untersucht. Prinzipiell sind zwei grundlegend verschiedene Mechanismen möglich. Zum einen könnten durch eine Rückführung innerhalb eines Rezeptorkomplexes nur stimulierte Komplexe adaptiert werden. Zum anderen wäre auch eine Adaptation der Gesamtheit aller Rezeptoren denkbar, unabhängig davon, ob sie stimuliert wurden oder nicht. Hier wurde der letztere Mechanismus für die Adaptation bei *Halobacterium salinarum* gewählt. Dieses einfache Modell kann das Verhalten der Excitation und Adaptation ausreichend gut beschreiben, es stellt jedoch nur eine grobe Vereinfachung der molekularen Mechanismen dar.

Mit Hilfe des aufgestellten Gesamtmodells, bestehend aus dem einfachen Modell der Signaltransduktion und dem detaillierten Modell des Schaltverhaltens, war es möglich die verschiedensten Experimente zu simulieren. Alle Simulationen zeigten eine recht gute, viele sogar eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen. So kann das Modell z.B. die Häufigkeitsverteilung der Länge einer Schwimmpphase sowohl im spontanen als auch im lichtinduzierten Fall bei Stimulation mit einem Schreck- oder Locksignal korrekt wiedergeben [HS85]. Ebenso beschreibt es die mittlere Reaktionszeit der Zellen auf Einzel- und Doppelpulse aus blauem Licht [MO87]. Diese Reaktionszeit ist proportional zum Kehrwert der applizierten Lichtmenge sowie proportional zur Dunkelpause zwischen beiden Pulsen und ihrem Tastverhältnis. Weiterhin ist das Gesamtmodell in der Lage, Experimente zu beschreiben, für die bisher keine Erklärung bekannt war. Dies ist z.B. bei der inversen Antwort auf einen Lockreiz der Fall [MAS87]. Eine Stimulation mit einem Orangelicht-Puls hat normalerweise eine Verringerung der Schalthäufigkeit der Zellen zur Folge. Wird ein solcher Puls allerdings bis zu 8 Sekunden nach einem Schreckreiz gegeben, hat er die entgegengesetzte Wirkung und lässt die Zellen erneut die Schwimrichtung umkehren. Das Modell zeigt dasselbe Verhalten. Grund dafür ist die Refraktär-Phase, in der die Zellen nach dem Schreckreiz durch die erhöhte Konzentration des Schaltsignals 'festgehalten' werden. Der Orangelicht-Puls 'befreit' die Zellen wieder aus der Refraktär-Phase, indem er kurzzeitig die Schaltsignalkonzentration absenkt. Nach diesem Puls erhöht sich diese Konzentration wieder, weil die Adaptation an den noch andauernden Schreckreiz noch nicht abgeschlossen ist. Nun reagieren die Zellen aber mit einer erneuten Richtungsumkehr, da sie sich jetzt in der Kompetent-Phase befinden. Dadurch hat der Orangelicht-Puls, der normalerweise die Schalthäufigkeit verringert, eine inverse Wirkung.

Durch Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit, mit der die Rezeptoren von einem Lichtreiz stimuliert werden, war es ebenfalls möglich, die Wirkung schwacher Lichtpulsen auf das Schaltverhalten zu untersuchen. Bei niedrigen Lichtintensitäten ist es nicht mehr zulässig, den Stimulus nur durch seine

mittlere Wirkung zu berücksichtigen, vielmehr muss man jetzt betrachten mit welcher Wahrscheinlichkeit eine diskrete Anzahl von 'Treffern' erfolgt. Messungen haben gezeigt, dass ein einzelner Treffer genügt, um eine Umkehrreaktion auszulösen [MHO88]. Eine modellbasierte Analyse dieses Experiments hat ergeben, dass für ein derartiges Verhalten in einer Zelle nur etwa 22 Blaulichtrezeptoren für die Excitation zuständig zu sein scheinen. Für diesen Fall stimmen auch die gemessenen Häufigkeitsverteilungen bei schwacher Lichtstimulation mit den Simulationsergebnissen überein.

Durch den gewählten systembiologischen Ansatz war es möglich, neue Erkenntnisse über das Schaltverhalten von *Halobacterium salinarum* zu erlangen. So konnte zum Beispiel durch das Modell sowohl die inverse Antwort auf einen Orangelicht-Puls als auch die verzögerte Reaktion auf einen Schreckreiz, der direkt nach einem Umschaltvorgang appliziert wird, erklärt werden. Dieser Ansatz erlaubt zum einen eine Bündelung von biologischem Wissen und Hypothesen in mathematischen Modellen. Zum anderen ist auch deren Überprüfung anhand des Vergleichs von Simulation und Experiment möglich [Gil02].

Abstract

The phototaxis of *Halobacterium salinarum* forms an elegant example system of signal transduction in prokaryotes. These cells possess two kinds of photoreceptors SRI and SRII for light of different wave length. Downstream of the receptors a molecular signaltransduction network is active that modulates the swimming behavior of the cells according to the extracellular stimulus. Without a stimulus the cells continuously alternates between the forward and backward swimming direction in a random manner. In average this happens every 12 seconds. In response to a repellent stimulus the swimming direction is reversed earlier, whereas the reversal is delayed in response to an attractant stimulus. Both, the forward and the backward swimming direction behave symmetrically in the unstimulated as well as in the stimulated case.

Experimentally it is possible to observe the effect of exactly dosed stimuli on single cells in a relative simple way. Thus frequency distributions of hundreds of reversals can be measured using computer-based methods. The frequency distribution allows a much deeper insight in the underlying stochastic process, than a mean value would do. This property makes the phototaxis the ideal example system to analyze the behavior of a single complex of proteins, the flagellar motor, using a systems biological approach. Repeated measurements on single cells is the prerequisite for the modeling approach used here. This way a detailed mathematical model is developed that captures the stochastic behavior of single molecules.

The kinetic of the switch process determines the measured time course of the input-output behavior of cells in a crucial way. Thus, to analyze such measurements it is very important to formulate a mathematical model of the switch process that describes its behavior as accurate as possible.

In contrast to accepted models of motor switching in *E. coli* the switch process of *Halobacterium salinarum* is not in thermal equilibrium. It rather behaves as a cyclic process that needs energy to proceed through a number of subsequent phases in a preferred direction. In a first step it was possible to identify 8 different functional states (phases) of the halobacterial switch

process by analyzing experimental results (4 phases for each swimming direction). The **stop-phase** can be identified just by observation of swim paths. It takes in average a duration of 0.43 seconds in both, stimulated and unstimulated conditions. Subsequent to this phase the cell continues swimming in the opposite direction. However, in the first time after this reversal it reacts in a refractory way to a repellent stimulus. This behavior is related to the **refractory-phase**. Its duration is up to 2 seconds long in unstimulated conditions while it is prolonged by a repellent stimulus. With completion of the refractory-phase the switch complex proceeds to the **competent-phase** during which it is 'competent' to react to repellent stimuli by activating the reversal process. Finally this activation is related to the **active-phase** after which the motor stops before it proceeds to the same functional states of the opposite swimming direction in an analogous way.

After identification of the functional states, the kinetic of their transitions was examined in a second step. This was done by analyzing experimentally measured frequency distributions of interval lengths under different conditions. On the basis of these examinations it was possible to define a detailed mathematical model of motor switching that combines the discussed phases of the switch complex as well as the kinetic of their transitions. This model consists of 44 subunits, which are synchronously in one of the above mentioned functional states. Each subunit incorporates a binding site for the switch signal CheYP. Most binding sites are occupied in the beginning of the refractory-phase. However, an increased hydrolysis probability of bound CheYP during this phase decreases the occupancy level, because unphosphorylated CheY does not bind to the switch complex as effectively as CheYP. The lower the occupancy level is, the higher is the transition probability to the competent-phase. During this phase hydrolysis of bound CheYP is less effective, what leads to a rising number of bound CheYP in spontaneous case. A repellent signal accelerates this process considerably. Simultaneously with the rising occupancy level the probability rises that the reversal process is activated. This activation is carried out in the active-phase by a conformational change of all 44 subunits. With completion of the last conformational change the motor stops during the stop-phase and finally resumes rotation in the opposite direction.

To be able to perform simulations of experiments with various programs of stimulation it is necessary to model the signal transduction network upstream of the switch complex, too. This model needs to describe the signal formation from the receptors down to the motor (excitation) as well as the subsequent adaptation process to changed environmental conditions. The conditions for perfect adaptation are discussed for different structural assumptions. In principle two different mechanisms of adaptation are possible. One works via an

internal feedback of the activity of a receptor complex to its own adaptation and the other works via feedback of the total activity of all receptors to the adaptation of all receptors as a whole. The latter mechanism was chosen for the description of adaptation in *Halobacteria*. The developed model is able to describe the behavior of excitation and adaptation, though it must be considered as a rough simplification of the underlying molecular mechanism.

Using both, the model of signal transduction and the detailed model of motor switching it was possible to make simulations of various different experiments. Many simulation results showed very good correlation with the experimental data, while the rest showed at least a good qualitative agreement. For example the probability distribution of interval lengths in the spontaneous, attractant- or repellent-induced case [HS85] are captured by the model correctly. The same is true for stimuli with single and double blue light pulses [MO87]. In those experiments the mean response time of the cells is proportional to the inverse of the total light exposure and additionally proportional to the dark period between both pulses and their duty cycle. Furthermore the model is able to describe experimental findings that couldn't be explained before. This is the case for the inverse response to stimulation with an attractant light pulse [MAS87]. A stimulation with an orange light pulse usually leads to a reduced switching frequency of a population of cells. But, when such a pulse is applied up to 8 seconds after a repellent stimulus the cells react in the opposite way by inducing a second reversal. The model shows the same behavior. The reason is that most cells are 'locked' in the refractory-phase after the repellent light stimulus due to the increased concentration of CheYP. The orange light pulse transiently decreases this concentration. Consequently the cells are released from refractory-phase and proceed to the competent-phase. Subsequent to this pulse the CheYP concentration rises again because the adaptation process of the still present repellent stimulus is not yet finished. But now the cells react to this increased concentration of the switch signal, again. Thus the orange light pulse that normally reduces the switching frequency of the cells now exerts an inverse response.

When lowering the photon exposure of a stimulus beyond a certain limit the response of the cells becomes stochastic. The reason is the discrete nature of light that becomes apparent in weak light stimuli. In such a case the stimulus can not be considered by its mean effect on the receptors any more. Rather the probability of a discrete number of 'hits' has to be considered. Measurements have shown that a reversal can be triggered by a single photon-activated receptor [MHO88]. By analyzing this experiment with the developed model it is suggested that only about 22 blue light receptors SRII are responsible for the excitation process. In this case also the measured frequency distributions of run lengths for a weak light stimulus correlate with

the simulation results.

By means of the chosen systems biological approach it was possible to obtain new insight into the swimming behavior of *Halobacterium salinarum* and its underlying processes. This approach allows the representation of known biological knowledge in mathematical models that can be used to check new hypotheses by comparison of simulation and experiment [Gil02].

1 Einleitung

1.1 Taxis

Viele Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli* und auch Archaeen, zu denen *Halobacterium salinarum* gehört, können Geißeln ausbilden und sich mit ihrer Hilfe fortbewegen. Jede Geißel (Flagelle) wird von einem molekularen Motor angetrieben. Bei *E. coli* führt die Rotation der Flagellen gegen den Uhrzeigersinn zu einer Vorwärtsbewegung. Rotation im Uhrzeigersinn dagegen löst eine Taumelbewegung aus, d. h. eine zufällige Umorientierung der weiteren Schwimmrichtung. Im Gegensatz dazu können Halobakterien sowohl vorwärts wie auch rückwärts schwimmen. Brown'sche Bewegung im Medium bewirkt letztlich auch bei Halobakterien eine zufällige Richtungsänderung. Ohne äußeren Reiz ändern beide Organismen immer wieder zufällig ihre Schwimmrichtung. Mittels eines sensorischen Netzwerkes analysieren sie laufend ihre Umwelt auf vorhandene Nähr- sowie auf Schadstoffe. Steigende Konzentrationen von Lockstoffen (attractants) oder fallende Konzentrationen von Schreckstoffen (repellents) wirken dabei anziehend. In diesem Falle schwimmen sowohl Halobakterien als auch *E. coli* für längere Zeit in dieselbe Richtung, aus der das positive Signal kam. Entsprechend wirken fallende Lockstoff- und steigende Schreckstoffkonzentrationen abstoßend. Dabei zeigen die Organismen unterschiedliche Reaktionen. *E. coli* reagiert auf ein negatives Signal mit einer Taumelbewegung, *Halobacterium salinarum* dagegen sofort mit einer Umkehr der Schwimmrichtung. Beide Fortbewegungsarten führen letztlich zu einer gerichteten Bewegung hin zu den günstigsten Umgebungsbedingungen, der **Chemotaxis**. Sie ist für die Bakterien lebenswichtig, um besonders bei nicht optimalen Lebensbedingungen noch vorhandene Nährstoffquellen aufzuspüren.

H. salinarum kann neben Kohlenstoffquellen auch Licht über **Bakteriorhodopsin (BR)** und **Halorhodopsin (HR)** als Energiequelle nutzen. BR ist eine photonengetriebene Protonenpumpe: es pumpt in jedem Photozyklus ein Proton (H^+) gegen den elektrochemischen Ionengradienten aus der Zelle heraus. Dieser Ionengradient kann dann z.B. über die ATP Synthase in chemische Energie umgewandelt werden. Neben Bakteriorhodopsin gibt es noch eine weitere lichtgetriebene Pumpe, das **Halorhodopsin (HR)**. Es pumpt

Chloridionen (Cl^-) in die Zelle hinein, was für eine effiziente Nettoaufnahme von Salz wichtig ist. Damit beide lichtgetriebenen Pumpen effektiv arbeiten können, suchen Halobakterien mittels Photorezeptoren (Sensorrhodopsine) ihre Umgebung nach optimalen Lichtbedingungen ab[MO99]. Dieser Prozess wird **Phototaxis** genannt. Für die Photo- sowie die Chemotaxis wird mit Ausnahme des Rezeptors derselbe intrazelluläre Signalweg verwendet.

Die Organismen orientieren sich bei ihrer Suche nach den günstigsten Umgebungsbedingungen nicht an den absoluten Konzentrationen von Chemoeffektoren oder absoluten Lichtintensitäten, sondern reagieren nur auf deren Änderungen. Die Länge von *E. coli* und *H. salinarum* beträgt jedoch von Pol zu Pol nur ca. $1\mu\text{m}$. Dieser Abstand ist zu klein, um Konzentrations- oder Lichtgradienten direkt über dieser Länge zu bestimmen. Deshalb führen sie eine zeitliche Differentiation der Konzentrationen entlang ihrer Schwimmbewegung durch. Dazu benötigen sie eine Art 'Gedächtnis' von den Umgebungsbedingungen der Vergangenheit, mit denen sie die aktuellen Verhältnisse vergleichen. Das 'Gedächtnis' hat allerdings nur eine Halbwertszeit von einigen Sekunden und wird ständig an die aktuellen Verhältnisse angeglichen. Diesen Anpassungsprozess nennt man **Adaptation**. Die Adaptationszeit ist den Lebensbedingungen der Bakterien angepasst. Eine Information über zu weit zurückliegende Bedingungen wäre nutzlos, da die Bakterien durch Brown'sche Bewegungen im Medium sowieso nicht in der Lage sind, längere Zeit eine bestimmte Richtung beizubehalten.

1.2 Motivation

Die Chemotaxis von *E. coli* ist eines der am besten untersuchten Signaltransduktionssysteme in Prokaryoten. Weltweit gibt es viele Arbeitsgruppen, die sich mit diesem Thema beschäftigen und ständig neue Erkenntnisse veröffentlichen. Trotz dieser breiten Wissensbasis und des im Vergleich zu Eukaryoten einfachen Systems sind noch immer einige zentrale Fragen offen, wie die molekulare Signaltransduktion im Detail funktioniert. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, ist es nötig, einen systembiologischen Ansatz zu wählen. Durch das Zusammenspiel von mathematischer Modellierung und molekularbiologischen Experimenten ist es möglich, das vorhandene Wissen zu bündeln, Wissenslücken oder eventuelle Widersprüche zu erkennen und neue Hypothesen in effektiver Weise zu testen.

Eine Schwierigkeit bei der Chemotaxis stellt die experimentelle Durchführung von geeigneten Stimulationen dar. Es gibt zwar Strömungskammern, mit deren Hilfe man Zellen mit einer nahezu sprungförmigen Änderung in der Effektorkonzentration reizen kann, im Detail ist aber unklar, wie viele Rezeptoren durch ein einzelnes Effektormolekül gereizt werden können. In dieser Hinsicht sind bei der Phototaxis wesentlich elegantere Experimente möglich. Hier kann man verzögerungsfrei einen Stimulus mit nahezu beliebigem Zeitverlauf applizieren. Außerdem weiß man mit großer Genauigkeit, wie viele Rezeptoren durch diesen Lichtstimulus getroffen werden und nach welcher Zeit die Wirkung des Reizes wieder abgeklungen ist.

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist bei der Untersuchung der Taxis gegeben. Es ist möglich die stochastische Reaktion auf einen Reiz an einem individuellen Proteinkomplex, dem Flagellarmotor (oder eventuell einem Komplex von Motoren), *in vivo* zu messen. Das bedeutet einen wesentlichen Vorteil gegenüber der Messung eines Mittelwertes einer Zellpopulation. Auf dieser Eigenschaft basiert ein Großteil dieser Arbeit.

Zusätzlich ist es bei der Phototaxis möglich, sich die diskrete Eigenschaft des Lichts zu Nutze machen, die bei niedrigen Lichtintensitäten zum Tragen kommt. In diesem Fall kann man nämlich nicht mehr von einem kontinuierlichen Effekt des Reizes sprechen, sondern muss die diskrete Anzahl von Photonen berücksichtigen, die eine Zelle wahrnimmt. Dadurch sind weitere Rückschlüsse auf das zugrundeliegende Signaltransduktionssystem möglich.

1.3 Aufbau der Arbeit

Der erste Teil der Dissertation befasst sich mit der Modellierung und Simulation von stochastischen Prozessen im allgemeinen sowie deren Eigenschaften. Dieser Teil wird in **Kapitel 2** behandelt und stellt die Grundlage für die spätere Modellierung und Analyse des Schaltverhaltens von Halobakterien dar.

Das Beispielsystem, die Phototaxis, kann grob in zwei Funktionseinheiten unterteilt werden. Die erste Funktionseinheit wird in **Kapitel 3** behandelt. Sie beschreibt die Signaltransduktion der äußeren Reize bis hin zum ausführenden Element, dem molekularen Motor. Dieser Teil besteht aus spezifischen Rezeptoren für Licht verschiedener Wellenlänge. Mit den Rezeptoren sind weitere Proteine komplexiert, die die Rezeptorsignale ins Zellinnere weiterleiten und dort ein Schaltsignal für den Motor generieren. Dieser Prozess wird **Excitation** genannt. Parallel zur Excitation findet ständig eine Anpassung der Rezeptorkomplexe an die momentan herrschenden Umgebungsbedingungen statt, die **Adaptation** genannt wird. Dadurch herrscht bei gleichbleibenden Bedingungen eine konstante intrazelluläre Konzentration des Schaltsignals CheYP.

Dieses Schaltsignal ist der Eingang der zweiten Funktionseinheit, des Schaltkomplexes an den Flagellarmotoren. Die Eigenschaften dieser Funktionseinheit werden in **Kapitel 4** beschrieben und dort in ein detailliertes mathematisches Modell umgesetzt.

Schließlich folgen in **Kapitel 5** Auswertungen von Experimenten sowie Simulationen mit den zuvor aufgestellten Modellen. Die Experimente sind dabei in zwei Kategorien unterteilt. In der ersten Kategorie kann die Stimulation der Zellen nur durch deren Mittelwert in deterministischer Art und Weise betrachtet werden, während in der zweiten die stochastische Natur des Lichts berücksichtigt werden muss.

Am Ende der Arbeit folgt eine kurze, zusammenfassende **Diskussion** der Ergebnisse.

2 Stochastische Prozesse

Das Werfen eines Würfels ist ein klassisches Beispiel für ein stochastisches Experiment. Das Ergebnis für jedes Experiment $n = 0, 1, 2 \dots$ kann in der Zufallsvariablen X_n angegeben werden, die in diesem Fall die diskreten Werte $j = 1, 2 \dots 6$ annehmen kann. Für den Ausgang eines jeden Experiments n kann ein Erwartungswert angegeben werden: $EW_j = P\{X_n = j\}$.

Genau genommen stellen alle natürlichen Vorgänge Zufallsprozesse dar, weil sie auf stochastische Quanteneffekte zurückzuführen sind. Dementsprechend sind auch chemische Reaktionen stochastischer Natur. Die Struktur der möglichen Reaktionen ist bekannt (z.B. $A + B \rightarrow C$), aber der genaue Ablauf ist zufällig. D.h. man weiß nicht genau, welches Molekül A mit welchem Molekül B zu welchem Zeitpunkt zu C reagiert.

Bei hinreichend großen Molekülzahlen ist die deterministische, kontinuierliche Betrachtung des Problems völlig ausreichend, da durch das Gesetz der großen Zahlen die relativen Konzentrationsschwankungen mit steigender Molekülzahl abnehmen. Es müssen also nicht absolute, diskrete Molekülzahlen betrachtet werden, sondern lediglich kontinuierliche Mittelwerte der Konzentrationen aller beteiligten Stoffe. Mit den Reaktionsgleichungen lässt sich dann für jede Molekülspezies eine gewöhnliche Differentialgleichung aufstellen. Mit Hilfe der Massenbilanz kann man schließlich noch eine Gleichung des Differentialgleichungssystems eliminieren. Das zu simulierende Differentialgleichungssystem hat demnach die Ordnung: Anzahl möglicher Spezies -1. Eine Simulation dieses Systems liefert schließlich das mittlere Verhalten des Prozesses, nicht aber die Verteilung der Population.

Je geringer allerdings die mittlere Molekülzahl einer Spezies ist, desto weiter kann die tatsächliche, aktuelle Molekülzahl relativ zu ihrem Mittelwert schwanken. Betrachtet man z.B. im Extremfall nur zwei gleich wahrscheinliche Zustände A und A* eines einzelnen Moleküls, so kann es sich zu einem bestimmten Zeitpunkt entweder im Zustand A oder in A* befinden. Die relative Schwankungsbreite des tatsächlichen Zustands bezogen auf den Mittelwert wäre in diesem Fall 100%. Deshalb ist der Ansatz, lediglich das Verhalten des kontinuierlichen Mittelwerts aller vorkommenden Molekülspezies zu modellieren, nicht mehr ausreichend. Vielmehr muss nun jede mögliche (diskrete) Kombination von Molekülzahlen der beteiligten Spezies betrachtet werden.

2.1 Modellierung

2.1.1 Markov-Ketten (zeitdiskret)

Eine mathematische Beschreibung stochastischer Prozesse bieten Markov-Ketten. Dabei wird angenommen, dass der Prozess bestimmte diskrete Zustände ($j = 1, 2, \dots$) annehmen kann.

Im Falle der Reaktion $A+B \rightarrow C$ wäre ein möglicher Zustand eine bestimmte Kombination von diskreten Molekülzahlen von A , B und C . Beispielsweise könnte der Zustand $j = 1$ bedeuten, dass 100 Moleküle A , 200 Moleküle B und 0 Moleküle C vorhanden sind; $j = 2$ könnte entsprechend definiert sein als 99 Moleküle A , 199 Moleküle B und 1 Molekül C . Die Anzahl möglicher Zustände wäre in diesem Fall 101, sie wäre also durch den Anfangszustand begrenzt. Im allgemeinen Fall kann diese Anzahl der möglichen Zustände aber auch unendlich sein.

Mit jedem neuen Experiment, bzw. in jedem Zeitschritt kann sich der Zustand des Prozesses ändern, was mit Übergangswahrscheinlichkeiten angegeben wird. Eine Einschränkung für Markov-Ketten fordert, dass die zukünftige Entwicklung des Prozesses ausschließlich von dem aktuellen Zustand des Prozesses abhängt und nicht zusätzlich noch von vergangenen Zuständen [Bai90]. Für reale Prozesse stellt diese Forderung jedoch keine große Einschränkung dar.

Der Verlauf eines Prozesses wird in der Zufallsvariablen X_n für jeden Zeitschritt n festgehalten. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Prozess im Zeitschritt n in den Zustand j übergeht, wenn er im vorigen Zeitschritt $n-1$ im Zustand i war, wird mit der Übergangswahrscheinlichkeit p_{ij} angegeben:

$$p_{ij} = P\{X_n = j | X_{n-1} = i\}. \quad (2.1)$$

Fasst man nun alle Übergangswahrscheinlichkeiten in einer Matrix $\mathbf{P} = \{p_{ij}\}'$ zusammen, so kann man die Entwicklung des Prozesses von Zeitschritt zu Zeitschritt berechnen. Als Anfangsbedingung wird nun noch die Wahrscheinlichkeitsverteilung $\mathbf{p}^{(0)} = [p_1^{(0)}, p_2^{(0)}, \dots]'$ des Prozesses im 0-ten Zeitschritt benötigt. In der hier gewählten Schreibweise wird der betrachtete Zeitschritt oben rechts in Klammern angegeben:

$$\mathbf{p}^{(n+1)} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{p}^{(n)}. \quad (2.2)$$

Die Matrix \mathbf{P} wird auch als stochastische Matrix bezeichnet. Sie besitzt die Eigenschaft, dass alle Elemente $p_{ij} \geq 0$ sind und außerdem die Summe jeder Zeile genau 1 ergibt.

2.1.2 Markov-Prozesse (zeitkontinuierlich)

Zur Beschreibung stochastischer Prozesse werden diskrete Zufallsvariablen X benötigt, d.h. ein System kann nur diskrete Zustände annehmen, wie es auch in Markov-Ketten der Fall ist. Bei Markov-Ketten wird der Prozess außerdem nur an diskreten Zeitpunkten betrachtet, z.B. bei jedem neuen Würfelexperiment, oder nur an den Zeitpunkten, an denen auch tatsächlich eine Reaktion stattgefunden hat.

Allerdings ist es oft einfacher das Problem zeitkontinuierlich zu formulieren, anstelle mit diskreten Zeitabschnitten. Nimmt man nun den Übergang von der zeitdiskreten zur zeitkontinuierlichen Betrachtung vor, ergibt sich im homogenen Fall analog zu (2.2) die Änderung der Wahrscheinlichkeitsverteilung [Bai90]:

$$\frac{d\mathbf{p}(t)}{dt} = \mathbf{R} \cdot \mathbf{p}(t); \quad \mathbf{p}(0) = \mathbf{p}_0, \quad (2.3)$$

wobei in \mathbf{R} die Änderungswahrscheinlichkeiten r_{ij} des Zustands i in den Zustand j angegeben sind: $\mathbf{R} = \{r_{ij}\}'$. Da in \mathbf{R} nur die Änderung der Wahrscheinlichkeiten aller möglicher Zustandsübergänge angegeben sind, ist die Summe der Zeilen von \mathbf{R} jetzt 0 und nicht 1, wie es bei den Übergangswahrscheinlichkeiten \mathbf{P} von Markov-Ketten (??) der Fall war.

Markov-Prozesse erfüllen ebenso wie Markov-Ketten die Markov-Eigenschaft, d.h. dass die Entwicklung des Systems nur von seinem jetzigen Zustand abhängig ist und nicht noch zusätzlich von vergangenen Zuständen.

Der Markov-Prozess (2.3) stellt ein System gewöhnlicher **linearer** Differentialgleichungen dar. Eine eventuelle Nichtlinearität des eigentlichen Prozesses würde sich in den unterschiedlichen Änderungswahrscheinlichkeiten für jeden einzelnen Zustand widerspiegeln. Um diesen Zusammenhang zu verdeutlichen, soll folgendes Beispiel betrachtet werden. Eine Reaktion $A \rightarrow B$ sei in nichtlinearer Weise von der Konzentration $[B]$ abhängig. Formuliert man die Reaktion als Markov-Prozess, so kann der Zustand i z.B. der Anzahl Moleküle B entsprechen. In Abhängigkeit der Molekülzahl $n_B = i$ bestimmt sich nun für jeden möglichen Übergang die Änderungswahrscheinlichkeit $r_{ij} = f(i)$ in nichtlinearer Weise. Allerdings ist r_{ji} ein konstanter Parameter, weshalb der Markov-Prozess nur aus einem System linearer Differentialgleichungen besteht.

2.2 Simulation

2.2.1 Stochastische Simulation - Monte Carlo

Bei einer stochastischen Simulation eines Markov-Prozesses wird **ein** bestimmter Anfangszustand des Prozesses ausgewählt und **ein** zufälliger Prozessverlauf berechnet. Das System befindet sich also zu jedem Zeitpunkt t in einem bestimmten Zustand $X(t)$. Dementsprechend ergibt sich für die Wahrscheinlichkeitsverteilung $p_j(t)$, dass sich das System zur Zeit t in einem genau definierten Zustand j befindet:

$$p_j(t) = \begin{cases} 1; & j = X(t) \\ 0; & j \neq X(t). \end{cases} \quad (2.4)$$

Demnach ist für die Änderungswahrscheinlichkeiten des Prozesses in einem bestimmten Zeitpunkt nur die j -te Spalte der Matrix \mathbf{R} entscheidend. Mit Hilfe von Zufallszahlen wird entschieden, welchen Weg der Prozess nimmt. D.h. es wird gemäß der Änderungswahrscheinlichkeiten zufällig ein Übergang ausgewählt und zu einem zufälligen Zeitpunkt ausgeführt. Im Folgenden sollen zwei unterschiedliche Algorithmen für stochastische Simulationen erläutert werden.

2.2.1.1 Gillespie-Algorithmus

Ein relativ einfacher und effektiver Algorithmus für die Simulation von stochastischen Prozessen wurde von Gillespie entwickelt [Gil76]. Er basiert auf der Wahrscheinlichkeit $P(\mu, \tau)d\tau$, dass die nächste Reaktion im Prozess im Zeitbereich $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$ auftritt und dass es sich um die Reaktion μ handelt. Gillespie hat zwei alternative Methoden für die Berechnung von μ und τ vorgeschlagen, wovon hier die 'First-reaction'-Methode vorgestellt werden soll. Dazu werden im ersten Schritt alle Reaktionen, die innerhalb des Prozesses ablaufen können, isoliert betrachtet. Mittels Zufallszahlen wird für jede Reaktion μ der Zeitpunkt τ_μ berechnet, zu dem sie stattfindet. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Reaktionsschritt stattgefunden hat, folgt einer exponentiellen Verteilung. Der Zeitpunkt τ_μ zu dem diese Reaktion eintritt berechnet sich über die inverse Verteilung mit einer gleichverteilten

Zufallsvariablen $z' \in (0, 1)$ wie folgt:

$$E_0 \xrightarrow{k_\mu} E_1$$

$$p_1(t) = 1 - e^{-k_\mu t} \in (0, 1) \quad (2.5)$$

$$z = 1 - e^{-k_\mu \tau} \quad (2.6)$$

$$\tau_\mu = \frac{1}{-k_\mu} \ln(1 - z') \quad (2.7)$$

$$= \frac{1}{k_\mu} \ln\left(\frac{1}{z}\right), \quad (2.8)$$

wobei $z = 1 - z'$ ebenfalls eine gleichverteilte Zufallsvariable ist. In einem zweiten Schritt muss nun noch die Reaktion $\mu = \nu$ ermittelt werden, die als erste eintritt. Nur diese eine Reaktion wird dann ausgeführt und die Simulationszeit um die Zeit τ_ν erhöht. Im letzten Schritt müssen noch alle Reaktionswahrscheinlichkeiten k_μ neu berechnet werden, weil sich das System durch die Reaktion verändert hat, bevor der Algorithmus wieder von vorne beginnen kann.

Mit jedem Zyklus des Gillespie-Algorithmus' wird eine Reaktion ausgeführt. Deshalb handelt es sich um einen sehr effektiven Algorithmus. Die Schrittweite der Simulation ist dabei zufällig.

2.2.1.2 Stochsim-Algorithmus

Im Gegensatz zum Gillespie-Algorithmus ist beim Stochsim-Algorithmus [MFB98, MFSB99] die Schrittweite der Simulationszeit konstant, außerdem wird nicht in jedem Simulationsschritt eine Reaktion ausgeführt. Dennoch stützt sich dieser Ansatz ebenfalls auf die Wahrscheinlichkeit, dass eine Reaktion in einem kleinen Zeitintervall $d\tau$ stattfindet.

In diesem Algorithmus wird jedes Molekül als eigenes 'Objekt' betrachtet, das auch verschiedene Zustände (z.B. Konformationen, Phosphorylierungen, usw.) annehmen kann. Zu Beginn eines Zeitschritts werden zufällig zwei Objekte aus dem gesamten System ausgewählt und die Wahrscheinlichkeit berechnet, dass diese miteinander reagieren. Mittels einer Zufallszahl wird dann entschieden, ob die Reaktion auch tatsächlich stattfindet oder nicht. Findet sie statt wird das System entsprechend aktualisiert, d.h. die Reaktion wird ausgeführt. Anschließend folgt ein neuer Zeitschritt. Damit dieser Algorithmus korrekt arbeitet, darf die Schrittweite nicht zu groß gewählt werden. Das bedeutet aber auch wiederum, dass in den meisten Zeitschritten keine Reaktion ausgeführt wird.

Damit auch unimolekulare Reaktionen ($A \rightarrow B$) möglich sind, müssen zusätzlich noch 'Pseudoobjekte' eingeführt werden, worauf hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.

Ein Vorteil dieses Algorithmus' liegt darin, dass besonders schnelle Prozesse, die sich im Gleichgewicht befinden, innerhalb von jedem Zeitschritt berücksichtigt werden können. Dazu wird vor einer Auswertung der eigentlichen Reaktion entschieden, in welchem Gleichgewichtszustand sich das Ausgangsmolekül gerade befindet. Damit können derartige im Vergleich zu den übrigen Reaktionen sehr viel schnellere Prozesse berücksichtigt werden, ohne den Rechenaufwand dramatisch zu erhöhen. Außerdem ist der Stochsim-Algorithmus von Vorteil, wenn nur wenige Moleküle betrachtet werden, die aber viele verschiedene Zustände annehmen können. Weiterhin verfügt das Simulationsprogramm Stochsim über eine Erweiterung, in der das kooperative Verhalten von Proteingittern simuliert werden kann [SNL⁺00].

2.2.2 Deterministische Simulation

Jede einzelne stochastische Simulation ergibt nur einen möglichen speziellen Prozessverlauf. Um letztlich Aussagen über das Verhalten von Populationen zu bekommen, müssen deshalb sehr viele stochastische Simulationen durchgeführt werden, aus denen dann in einem weiteren Schritt Mittelwerte und Verteilungen berechnet werden können.

Eine Alternative bietet die deterministische Integration des Markov-Prozesses (2.3). Als Anfangsbedingung kann dabei nicht nur ein bestimmter Zustand des Prozesses angegeben werden (wie bei einer stochastischen Simulation), sondern auch eine beliebige Anfangsverteilung $\mathbf{p}(t = 0)$.

Bedingung für die effiziente Durchführbarkeit einer deterministischen Simulation ist allerdings, dass die Anzahl möglicher Zustände eines Prozesses nicht zu groß ist. Für jeden möglichen Prozesszustand muss in der deterministischen Simulation eine Zustandsvariable angelegt werden. Durch Berücksichtigung aller kombinatorischen Möglichkeiten können auch schon einfache Systeme schnell Tausende von Zuständen erreichen ('kombinatorische Explosion'). Dagegen müssen stochastische Simulationen nur den aktuellen Zustand aller beteiligten Moleküle berücksichtigen, was bei geringer Molekülzahl von Vorteil sein kann.

In dieser Arbeit war es vor allem auch wegen entsprechender Vereinfachungen im Prozessmodell möglich, alle Simulationen deterministisch durchzuführen.

2.3 Eigenschaften stochastischer Prozesse

Für eine Analyse stochastischer Prozesse ist es nötig, das Verhalten einzelner Individuen zu betrachten und nicht nur das gemittelte Verhalten der Population. Wie wichtig eine Messung an einzelnen Individuen sein kann, zeigen Erfahrungen bei *E. coli*. Jahrelang wurde der Hill-Koeffizient für das Verhältnis der Rotationsrichtungen des Flagellarmotors in Bezug auf das Eingangssignal CheYP mit ≈ 2.5 angegeben [ACS⁺98]. Erst Messungen an einzelnen Zellen haben gezeigt, dass der Hill-Koeffizient tatsächlich im Bereich von 10 liegt [CSL00] (siehe Kap. 4.1.2). Für die früheren Messungen wurde der CheYP-Spiegel in einer Zellpopulation mittels IPTG-induzierbarem Plasmid eingestellt und das Schaltverhalten an einzelnen Zellen beobachtet. Der genaue Wert der CheYP-Konzentration in einer einzelnen Zelle war aber nicht bekannt, sondern wurde für die ganze Population homogen angenommen. Diese Annahme ist aber vor allem bei Verwendung von Plasmiden sehr kritisch, da deren Kopienanzahl in verschiedenen Zellen variieren kann und dementsprechend davon auszugehen ist, dass auch bei gleicher Inducerkonzentration das individuelle Expressionsniveau unterschiedlich hoch ist. Unterschiedliche Konzentrationsniveaus des Eingangssignals haben aber gerade bei einer steilen, schwellwertartigen Charakteristik einen großen Einfluss, da über Zellen gemittelt wird, die sich noch unterhalb oder schon oberhalb des Schwellwertes befinden. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist es möglich das Konzentrationsniveau von CheYP in einzelnen Zellen zu bestimmen und gleichzeitig das Schaltverhalten dieser Zelle zu beobachten. Erst durch solche Einzelzellmessungen konnte belegt werden, dass der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Rotationsrichtungen des Flagellarmotors und der CheYP-Konzentration einen sehr viel steileren Verlauf aufweist, als bisher über Zellpopulationen bestimmte Messergebnisse erahnen ließen.

2.3.1 Vergleich zur deterministischen Betrachtung am Beispiel von chemischen Reaktionen

Im Falle von chemischen Reaktionen können die Änderungswahrscheinlichkeiten r_{ij} durch Überlegungen der Kollisionshäufigkeit der beteiligten Reaktanten berechnet werden. Für jede Reaktion μ berechnet sich die Änderungswahrscheinlichkeit über eine Reaktionswahrscheinlichkeitskonstante c_μ und über die Anzahl der Kombinationsmöglichkeiten der Substrate in dem betrachteten Ausgangszustand [Gil77]. Am Beispiel von verschiedenen Reaktionstypen soll der Zusammenhang zwischen c_μ und der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_μ aus der deterministischen Betrachtung verdeutlicht werden. Dabei wird das Reaktionsvolumen mit V bezeichnet und die Anzahl der

Moleküle A , B , bzw. C im Zustand i mit a_i , b_i bzw. c_i .

$$\mu = 1 : A \xrightarrow{k_1} B : \quad r_{ij} = c_1 a_i ; b_j = b_i + 1 \quad (2.9)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1 [A] \quad (2.10)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = \frac{r_{ij}}{V} \quad (2.11)$$

$$\Rightarrow k_1 = c_1 \quad (2.12)$$

$$\mu = 2 : A + B \xrightarrow{k_2} C : \quad r_{ij} = c_2 a_i b_i ; c_j = c_i + 1 \quad (2.13)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = k_2 [A][B] \quad (2.14)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = \frac{r_{ij}}{V} \quad (2.15)$$

$$\Rightarrow k_2 = c_2 V \quad (2.16)$$

$$\mu = 3 : A + A \xrightarrow{k_3} B : \quad r_{ij} = c_3 \frac{a_i (a_i - 1)}{2} ; b_j = b_i + 1 \quad (2.17)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = k_3 [A]^2 \quad (2.18)$$

$$\frac{d[B]}{dt} = \frac{r_{ij}}{V} \quad (2.19)$$

$$\Rightarrow k_3 \approx c_3 \frac{V}{2} \quad (2.20)$$

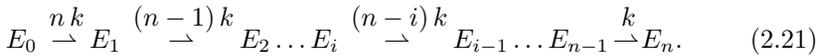
Im Falle der Reaktion $\mu = 3$ kann der Zusammenhang von k_3 und c_3 nur näherungsweise angegeben werden, was aber bei großen Molekülzahlen (für die die deterministische Betrachtung ohnehin nur gültig ist) keine Rolle spielt.

2.3.2 Vergleich von Mess- und Simulationsergebnissen am Beispiel von parallelen Reaktionen

Bei der Modellierung von unbekanntem Prozessen ist stochastisches Verhalten oft unerwünscht, da sich zwei Prozessverläufe unter denselben Umweltbedingungen nicht exakt gleich verhalten. Entsprechend kann man nach der Durchführung von nur wenigen Messreihen nicht entscheiden, welcher Verlauf nun der 'richtige' ist, den das Modell wiedergeben soll. Unter diesen Bedingungen kann man also nicht mit letzter Sicherheit entscheiden, ob die Abweichung der Modellvorhersage von den Messwerten im Rahmen der natürlichen stochastischen Schwankung liegt, oder ob ein struktureller Fehler im Modell besteht.

Die Schwankungen von Messwerten bei wiederholten Messungen von ein und demselben Prozess können jedoch bei der Strukturidentifikation auch von Vorteil sein, denn die Form der Häufigkeitsverteilung der Messwerte lässt wichtige Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Prozess zu. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass diese Häufigkeitsverteilung auch mit vertretbarem Aufwand messbar ist. Das bedeutet, dass es zum einen möglich sein muss, ein einzelnes Individuum zu beobachten und nicht nur den Mittelwert einer Population. Zum anderen müssen auch genügend Wiederholungen des Experiments durchgeführt werden können. In der Phototaxis sind diese Voraussetzungen erfüllt, da das Schwimmverhalten einzelner Zellen im Mikroskop beobachtbar ist und die Messung durch digitale Bildverarbeitung automatisiert werden kann.

Das Ergebnis von derartigen Experimenten ist eine Häufigkeitsverteilung einer bestimmten Eigenschaft des Systems. Am Beispiel von parallelen Bindungsreaktionen an einer Anzahl von Bindungsstellen eines Proteinkomplexes soll gezeigt werden wie eine ideale Häufigkeitsverteilung mittels einer deterministischen Simulation berechnet werden kann. Am Beginn des Prozesses, wenn alle n Bindungsstellen noch unbesetzt sind, besteht die n -fache Wahrscheinlichkeit, dass im nächsten Moment eine der n Stellen belegt wird. Mit dem Eintreten dieses Ereignisses verringert sich die Anzahl freier Bindungsstellen um eins und damit auch die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des nächsten Ereignisses. Damit sind die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen Ereignisse voneinander abhängig. Das folgende Reaktionsschema beschreibt einen solchen Prozess von parallelen Bindungsreaktionen:



Damit ergibt sich folgendes System von Differentialgleichungen für die Wahrscheinlichkeiten $p_i(t)$, dass zum Zeitpunkt t genau i Ereignisse eingetroffen sind:

$$\frac{dp_0(t)}{dt} = -nk p_0(t) \quad (2.22)$$

$$\frac{dp_i(t)}{dt} = +(n-i+1)k p_{i-1}(t) - (n-i)k p_i(t) \quad ; 1 \leq i < n \quad (2.23)$$

$$\frac{dp_n(t)}{dt} = +k p_{n-1}(t). \quad (2.24)$$

Kann man z.B. bei einem solchen Prozess den Zeitpunkt für das Eintreten des letzten Ereignisses bestimmen, so erhält man mit jeder Messung genau einen Wert für die Prozessdauer. Die Ergebnisse von 100 Einzelexperimenten

sind in Abb. 2.1 für $p_0(t=0) = 1$ und $n = 7$ dargestellt. Dazu wurden die gemessenen Durchlaufzeiten in **diskrete** Bereiche der Dauer 0,5s eingeteilt. Die **Häufigkeitsverteilung** der Prozessdauer gibt an, in wievielen Experimenten die Durchlaufzeit in einem bestimmten Bereich lag.

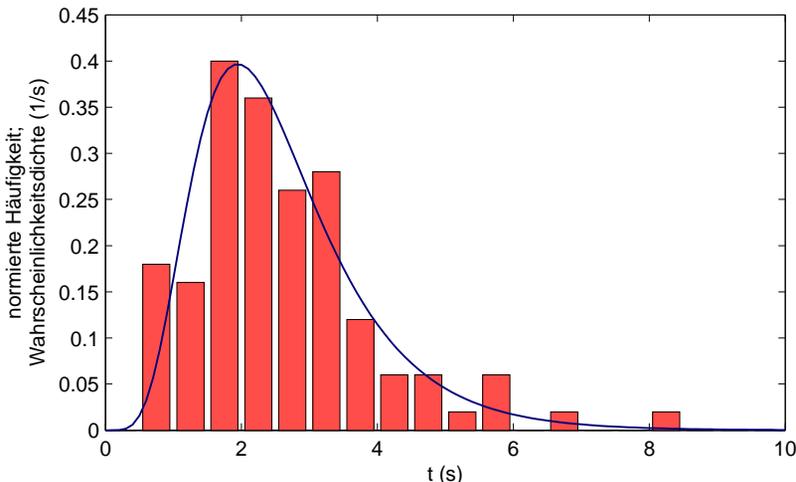


Abb. 2.1: Diskrete Häufigkeitsverteilung (Balken) und kontinuierliche Wahrscheinlichkeitsdichte (durchgezogene Linie) für die Dauer eines Prozesses mit $n = 7$ parallelen Reaktionen. Die Häufigkeitsverteilung wurde aus 100 stochastischen Experimenten berechnet. Sie wurde so normiert, dass ihr Integral 1 ergibt.

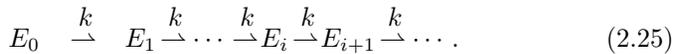
Bei einer deterministischen Simulation der Gleichungen (2.22)-(2.24) bekommt man eine **kontinuierliche** Aussage über die Wahrscheinlichkeit $p_n(t)$, dass das letzte Ereignis bereits stattgefunden hat. In der Wahrscheinlichkeitstheorie wird $p_n(t)$ kumulative **Verteilungsfunktion** genannt (Wahrscheinlichkeit für mindestens n Ereignisse). In diesem Fall ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit $p_n(t \rightarrow \infty) = 1$. Das Pendant zur diskreten Häufigkeitsverteilung ist die kontinuierliche **Wahrscheinlichkeitsdichte**, die sich aus einer Differentiation der kumulativen Verteilungsfunktion berechnet. Entsprechend ergibt sich in diesem Fall, dass das Integral der Wahrscheinlichkeitsdichte über alle Zeiten genau 1 sein muss. Um die kontinuierliche Wahrscheinlichkeitsdichte mit der experimentell ermittelten diskreten Häufigkeitsverteilung vergleichen zu können, wurde in Abb. 2.1 die Häufigkeitsverteilung so normiert, dass ihr Integral über alle Zeiten ebenfalls 1 ergibt.

2.3.3 Steilheit der Häufigkeitsverteilung am Beispiel des Poisson-Prozesses

Die Form der gemessenen Häufigkeitsverteilung lässt Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Prozess zu. So ist z.B. die Steilheit der Häufigkeitsverteilung abhängig davon, wie viele Teilschritte den Prozess bestimmen. Dieser Zusammenhang soll anhand eines Poisson-Prozesses betrachtet werden.

Ein Poisson-Prozess beschreibt den Zeitverlauf der Anzahl von Ereignissen, die mit einer konstanten Wahrscheinlichkeit k auftreten. Eine Voraussetzung für einen Poisson-Prozess ist die Unabhängigkeit der Zuwächse: ein Ereignis geschieht unabhängig von der Anzahl bisheriger Ereignisse. Außerdem darf maximal ein Ereignis zu einem Zeitpunkt stattfinden. In der Praxis kann man davon ausgehen, dass diese Bedingungen bei realen Phänomenen gegeben sind.

Ein Poisson-Prozess ist ein Markov-Prozess, weil sein Verlauf nur vom aktuellen Zustand und nicht von vergangenen Zuständen abhängt. Er kann in folgender Weise als Reaktionsschema modelliert werden:



Für die Wahrscheinlichkeiten $p_i(t)$, dass zur Zeit t genau i Ereignisse aufgetreten sind, ergibt sich folgendes System von Differentialgleichungen:

$$\frac{dp_0(t)}{dt} = -k p_0(t) \quad (2.26)$$

$$\frac{dp_i(t)}{dt} = k(p_{i-1}(t) - p_i(t)) \quad ; i > 1. \quad (2.27)$$

In Abbildung 2.2 wird das Anfangswertproblem $p_0(t = 0) = 1$ betrachtet. Für den Fall von 0 Ereignissen besteht eine konstante Wahrscheinlichkeit k , dass im nächsten Moment ein Ereignis auftritt und damit die Anzahl der Ereignisse auf 1 steigt. Für die Wahrscheinlichkeit $p_0(t)$ ergibt sich damit die Exponentialfunktion: $p_0(t) = e^{-tk}$. Die Wahrscheinlichkeit $p_1(t)$, dass zur Zeit t genau 1 Ereignis aufgetreten ist, steigt zu Beginn des Prozesses proportional zur Abnahme der Wahrscheinlichkeit $p_0(t)$ an. Nach Erreichen des Maximums bei $t = 1/k$ nähert sie sich dann immer mehr einem exponentiellen Abfall an. Betrachtet man eine immer größere Anzahl von Ereignissen i , so beginnt ihre zugehörige Wahrscheinlichkeit $p_i(t)$ mit einer horizontalen Tangente und einem immer flacher werdenden Anstieg. Das Maximum des Verlaufs wird bei $t = i/k$ erreicht.

Der Wahrscheinlichkeitsverlauf für genau i Ereignisse wird in analytischer Form durch die Poisson-Verteilung angegeben:

$$p_i(\lambda(t)) = \frac{\lambda(t)^i}{i!} e^{-\lambda(t)} \quad ; \quad i \in \{0, 1, 2, \dots\}. \quad (2.28)$$

Die Funktion $\lambda(t)$ gibt dabei die mittlere Anzahl zu erwartender Ereignisse (Erwartungswert) zur Zeit t an. In dem hier betrachteten Fall ergibt sich

$$\lambda(t) = k t. \quad (2.29)$$

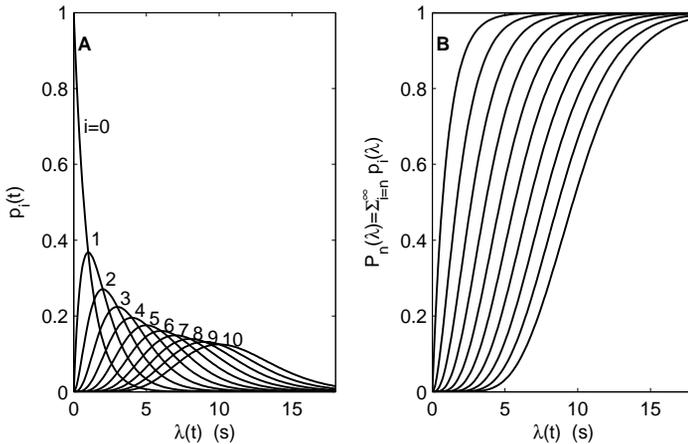


Abb. 2.2: A: Poisson-Verteilung $p_i(\lambda)$ für $\lambda = t$. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit für genau $i = 0 \dots 10$ Ereignisse in Abhängigkeit von dem Erwartungswert λ an. B: Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen von mindestens $n = 1 \dots 10$ Ereignissen $\hat{P}_n(\lambda)$.

In der Abb. 2.2 ist neben der Poisson-Verteilung $p_i(\lambda)$ auch die Wahrscheinlichkeit $\hat{P}_n(\lambda)$ für das Eintreffen von **mindestens** n Ereignissen angegeben. Sie berechnet sich aus der Poisson-Verteilung durch:

$$\hat{P}_n(\lambda) = \sum_{i=n}^{\infty} p_i(\lambda) = 1 - \sum_{i=0}^{n-1} p_i(\lambda). \quad (2.30)$$

In der Darstellung mit linearen Koordinaten werden die Kurven von $\hat{P}_n(\lambda)$ mit steigender Anzahl n immer flacher. Interessanterweise ist genau der umgekehrte Effekt bei einer halblogarithmischen Darstellung zu beobachten (siehe

Abb. 2.3). Anschaulich bedeutet das, dass die relative Streuung der Zeitpunkte, bei denen genau n Ereignisse aufgetreten sind, immer kleiner wird je größer die Anzahl der Ereignisse ist. Die Durchlaufzeit eines Prozesses, der aus nur wenigen Teilschritten besteht, weist also eine größere Streuung auf als die Durchlaufzeit eines Prozesses mit vielen (entsprechend schnelleren) Teilschritten. Analog dazu besitzt z.B. die Häufigkeitsverteilung von diskreten Molekülzahlen $[A]$ und $[B]$ bei einer Gleichgewichtsreaktion $A \rightleftharpoons B$ eine umso geringere relative Streuung je größer die mittlere Anzahl $\overline{[A]}$ bzw. $\overline{[B]}$ ist.

Die Form der Verteilung $\hat{P}_n(\lambda)$ ist in der halblogarithmischen Darstellung unabhängig davon, mit welcher Geschwindigkeit k ein einzelner Teilschritt auftritt. Eine Änderung in k bewirkt lediglich eine Verschiebung der Kurve entlang der x-Achse.

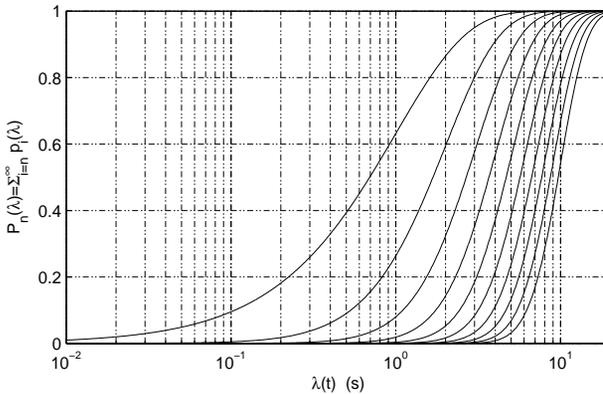


Abb. 2.3: $\hat{P}_n(\lambda)$ für $n = 1 \dots 10$ und $\lambda(t) = t$ in halblogarithmischer Darstellung.

3 Excitation und Adaptation

3.1 Molekulare Signaltransduktion

Das erste Glied in der Signaltransduktionskaskade bildet der Photorezeptor. *Halobacterium salinarum* besitzt zwei verschiedene Rezeptoren, die Sensorrhodopsine **SRI** und **SRII**. Diese membrangebundenen Proteine verdanken ihre Farbe und damit auch ihre Lichtempfindlichkeit einem eingebauten Retinal (Chromophor). Eine detaillierte zusammenfassende Beschreibung ist in [MO99] zu finden.

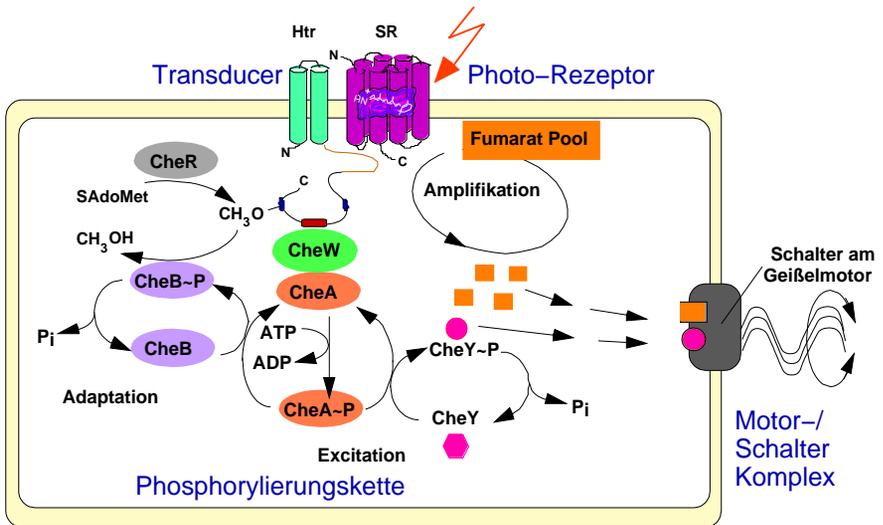


Abb. 3.1: Vereinfachter molekularer Mechanismus bei der Phototaxis

Bei **SRI** handelt es sich um einen photochromen Rezeptor, d.h. er kann durch zwei Arten von Licht unterschiedlicher Wellenlänge aktiviert werden. SRI erscheint im Grundzustand SR_{587} purpurfarben und kann durch oranges Licht der Wellenlänge 587nm angeregt werden. Nach dieser Anregung durchläuft er mehrere kurzlebige Zwischenzustände, bevor er in den Zustand SR_{373}

übergeht [SB84] und dann gelb erscheint. Durch Experimente mit alternativen Retinalen, die die Halbwertszeiten der aktivierten Zustände verändern wurde belegt, dass während des Zustands SR₃₇₃ ein positives Signal ausgelöst wird, d.h. dass der Flagellarmotor für längere Zeit die aktuelle Schwimmrichtung beibehält [YS91]. Ohne weitere Lichtabsorption relaxiert der Rezeptor schließlich mit einer Halbwertszeit von 750ms wieder in den Grundzustand. Während der Lebensdauer des durch das Orangelicht aktivierten Zustands ist der Rezeptor allerdings für UV-Licht empfindlich, das den Rezeptor kurzzeitig in den Zustand SR₅₁₀ versetzt. Dieser Zustand löst während seiner Lebensdauer ein negatives Signal aus [PLC94]. SRI wird hauptsächlich in der stationären Wachstumsphase exprimiert und ist dafür verantwortlich, dass die besten Lichtbedingungen für **Bakteriorhodopsin (BR)** und **Halorhodopsin (HR)** aufgesucht werden. BR und HR werden ebenfalls in der stationären Phase produziert.

SRII (auch P₄₈₀ oder Phoborhodopsin genannt) ist im Grundzustand SR₄₈₇ für blaues Licht empfindlich. Nach einer Anregung durch Blaulicht geht er in den Zustand SR₃₆₀ über und relaxiert dann über SR₅₄₀ wieder in den Grundzustand. Die beiden Zustände SR₃₆₀ und SR₅₄₀ des Photozyklus' geben während ihrer Lebensdauer ein Schrecksignal an den Flagellarmotor ab [YTJS91]. Der Rezeptor SRII wird hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase produziert und ist wahrscheinlich dafür zuständig zu hohe Sonneneinstrahlung unter relativ hoher Sauerstoffkonzentration zu erkennen und daraufhin eine Schreckreaktion auszulösen.

Die Rezeptoren SRI und SRII sind mit spezifischen **halobakteriellen Transducern HtrI** bzw. **HtrII** in der Membran komplexiert. Sie leiten die Konformationsänderung der Rezeptoren über lange Helices ins Zellinnere weiter, indem sie sich um eine minimale Länge ($\approx 1\text{Å}$) gegeneinander verschieben [FH01, Review]. Im Zellinneren verändern sie schließlich über die Adapterproteine CheW1 und CheW2 die **Aktivität** der Histidinkinase **CheA** und modulieren somit deren Autophosphorylierungsgeschwindigkeit. Warum es für die Signalübertragung im Rezeptorkomplex zwei homologe Proteine **CheW1** und **CheW2** gibt, ist noch unklar. Das phosphorylierte CheA kann seine Phosphatgruppe an **CheY** abgeben. Schließlich diffundiert CheYP zum Schaltkomplex des Motors und wirkt dort als Schaltsignal. Diesen Prozess nennt man **Excitation**.

Neben der Excitation erfüllen die Transducer noch eine wichtige Funktion bei der Adaptation. Sie können methyliert werden, d.h. verschiedene Aminosäuren in den Helices der Transducer können durch eine Methylgruppe modifiziert werden. Dadurch verändert sich ihre Aktivität, also die Autophosphorylierungsgeschwindigkeit von CheA [PS99]. Wegen ihrer Methylierungseigenschaft werden sie verallgemeinert auch **methyl-accepting phototaxis proteins**

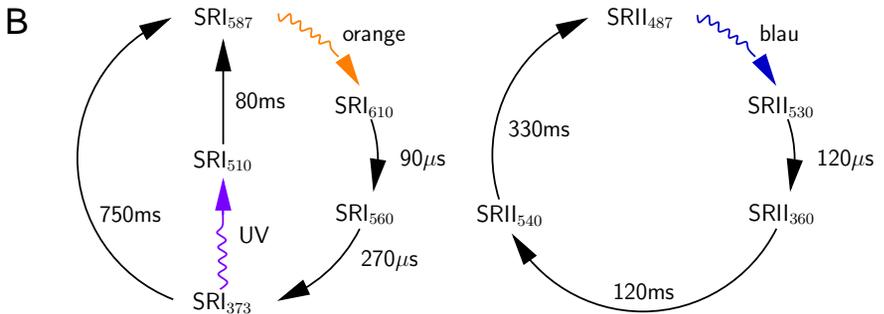
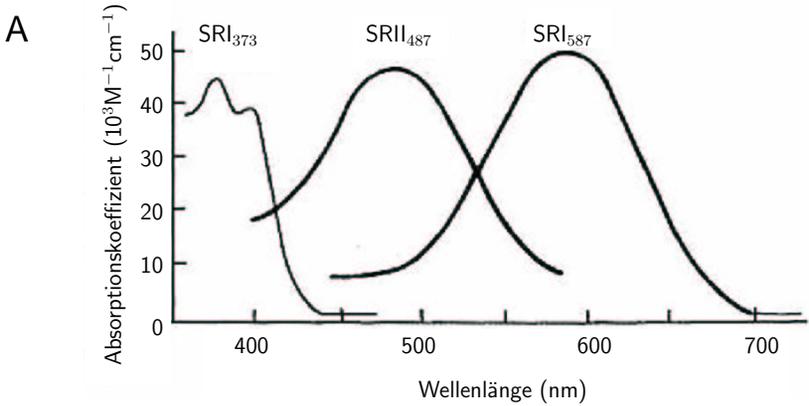


Abb. 3.2: Absorptionsspektren (A) und Photozyklen (B) der Sensorrhodopsine SRI und SRII. Die gewellten Pfeile stellen die Anregung durch Licht der entsprechenden Wellenlänge dar. Die glatten Pfeile geben die thermische Relaxation mit der entsprechenden Halbwertszeit an. [MO99]

MPP genannt bzw. bei der Chemotaxis entsprechend **methyl-accepting chemotaxis proteins MCP**.

Die Methylierung der MPPs erfolgt durch die Methyltransferase **CheR**, die die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf den Transducer überträgt. Bei *E. coli* geht man davon aus, dass CheR in Sättigung arbeitet, d.h. dass der Großteil CheR mit seinem Substrat, den MCPs gebunden ist und es gerade methyliert. Wegen der konstanten Gesamtmenge von CheR ist auch die Menge des Enzym-Substrat-Komplexes konstant, was zu einer gleichbleibenden Methylierungsrate führt. In *E. coli* erhöht der Methylierungsgrad der MCPs deren Aktivität, d.h. die Autophosphorylierungsrate von CheA. Der Gegenspieler zu CheR ist die Methylsterase **CheB**, die parallel zu CheY durch CheAP phosphoryliert werden kann. Die aktivierte Form CheBP ist schließlich für die Demethylierung der MCPs verantwortlich, wobei flüchtiges Methanol freigesetzt wird. In *E. coli* haben demethylierte Rezeptorkomplexe eine geringere Aktivität. Durch diese negative Rückkopplung adaptiert die Zelle ständig an die gerade herrschenden Umgebungsbedingungen: erhöhte Aktivität → mehr CheAP → mehr CheBP → erhöhte Demethylierung → adaptierte Aktivität.

Die Menge des durch Demethylierung freigesetzten Methanols kann mit Hilfe von radioaktiv markiertem Methionin *in vivo* gemessen werden. *E. coli* reagiert mit einer erhöhten Freisetzung nach einem Schrecksignal und mit einer verringerten Freisetzung nach einem Lockreiz [GSA77]. Dieses Verhalten passt genau zu dem beschriebenen Adaptationsmechanismus. Nach einem Schrecksignal steigt die Rezeptoraktivität und damit auch der Phosphorylierungsgrad von CheA, CheY und CheB an. Die erhöhte Konzentration von CheBP sorgt schließlich für eine vermehrte Freisetzung von Methanol. Entsprechend sinkt die Konzentration von CheBP nach einem Lockreiz unter den Wert des adaptierten Zustands, was auch eine verringerte Methanolfreisetzung zur Folge hat.

Halobacterium salinarum (*H.s.*) sowie auch *Bacillus subtilis* (*B.s.*) zeigen allerdings gegenüber *E. coli* ein verändertes Methylierungsmuster. Sie reagieren sowohl bei Lock- als auch bei Schreckstimulation mit einer Freisetzung von Methanol [KKFO97]. Die Menge des freigesetzten Methanols variiert je nach Art der Stimulation. *H.s.* zeigt eine stark erhöhte Freisetzung bei einem Schrecksignal und eine weniger stark erhöhte bei einem positiven Signal. Interessanterweise lässt sich dieses Methylierungsmuster durch Deletion von CheY in das Methylierungsmuster von *E. coli* überführen [PS99]. Allerdings ist kein zugrunde liegender Mechanismus bekannt, der das Verhalten von *H.s.* und *B.s.* erklären könnte. Deshalb wird dieser Effekt im Folgenden auch nicht weiter betrachtet.

Weitere Unterschiede in der Signalkaskade zwischen Halobakterien und *E.*

coli werden in den unterschiedlichen Komponenten beider Systeme deutlich. So besitzt *E. coli* ein Protein **CheZ**, das die Dephosphorylierung von CheYP katalysiert. CheYP ist dadurch sehr kurzlebig, was eine wichtige Voraussetzung für seine Eigenschaft als Signalmolekül darstellt, da es schnell auf Änderungen in der Rezeptoraktivität reagieren können muss. Halobakterien besitzen dagegen kein CheZ. Auf welche Weise hier die Funktion von CheZ übernommen wird, ist allerdings nicht klar. Eventuell wird hier CheYP erst am Motorkomplex hydrolysiert, d.h. dephosphoryliert (siehe Kap. 4.3.2).

So wie CheZ in *E. coli* vorkommt und nicht in *H.s.* gibt es auch in Halobakterien Proteine, die wiederum nicht in *E. coli* vorkommen. Die genaue Funktion dieser Proteine ist aber weitgehend noch nicht geklärt. So gibt es drei verschiedene **CheJ**: CheJ, CheJ2 und CheJ3. Sie besitzen homologe Bereiche zu CheC von *B.s.*, das den Motorproteinen FliM und FliN ähnlich ist [KKS⁺01]. CheC kann CheYP dephosphorylieren, kommt aber nur ca. 20x in der Zelle vor [SMO04]. Eine Deletion von CheJ in *H.s.* bewirkt, dass sich der prozentuale Anteil der Rotation im Uhrzeigersinn von 50% zu 88% verschiebt [RO96].

Weiterhin gehört **CheD** zu den Chemotaxisproteinen von Halobakterien. In *B.s.* katalysiert CheD Amide-Hydrolyse spezifischer Glutamat Seitenketten des Rezeptors McpA, was für eine effektive Signalübertragung zu CheA nötig ist [KO02]. Inwiefern CheD die Dynamik der Signalübertragung beeinflusst ist aber nicht klar.

Im Allgemeinen ist die Signaltransduktion in Halobakterien vom Rezeptor bis hin zum Motor näher mit *Bacillus subtilis* verwandt als mit *E. coli*.

3.2 Verstärkung innerhalb von Rezeptorkomplexen

3.2.1 Definition der Verstärkung

In einer Zelle beeinflussen tausende Rezeptorkomplexe die Aktivität der Histi-dinkinase CheA. Die Organismen können an veränderte Umweltbedingungen adaptieren und zeigen bei konstanten Verhältnissen das gleiche Schwimmverhalten. Deshalb kann man annehmen, dass bei konstanten Umgebungsbedingungen die adaptierte Gesamtaktivität aller Rezeptoren immer die gleiche ist ($A_{\text{adp}} = \text{const.}$).

Bereits die Chemo- oder Photostimulation von **einzelnen Rezeptoren** können eine Reaktion im Schaltverhalten bewirken [MHO88]. Damit aber einzelne Rezeptoren von tausenden die Gesamtaktivität und damit die CheYP-Konzentration in der Zelle spürbar verändern können, muss innerhalb des

Rezeptorkomplexes das Signal deutlich verstärkt werden. Für die Definition der Verstärkung liegt das Blockschaltbild Abb. 3.3 zugrunde.



Abb. 3.3: Blockschaltbild zur Verdeutlichung der Definition der Verstärkung innerhalb der Rezeptorkomplexe

Die Eingangsgröße der Rezeptorverstärkung ist die Änderung der Anzahl mit Liganden gebundenen bzw. von Photonen getroffenen Rezeptoren Δn_{Rez*} . Ausgangsgröße ist die Änderung der Gesamtaktivität aller Rezeptorkomplexe ΔA_* , also der Unterschied der Aktivität von stimulierten A_* und adaptierten A_{adp} Rezeptoren:

$$\Delta A_* = A_* - A_{adp}. \tag{3.1}$$

Damit das Maß der Verstärkung unabhängig von der Gesamtzahl der Rezeptoren n_{Rez} und der Aktivität im adaptierten Zustand ist, werden die verwendeten Größen normiert. Die Rezeptorverstärkung definiert sich also als:

$$V = \frac{A_* - A_{adp}}{\frac{\Delta n_{Rez*}}{n_{Rez}}} = \frac{\frac{\Delta Akt}{Akt_{adp}}}{\frac{\Delta n_{Rez*}}{n_{Rez}}}. \tag{3.2}$$

In Abbildung 3.4 ist die Verstärkungswirkung grafisch veranschaulicht.

3.2.2 Verstärkung bei E. coli

Mit Hilfe von FRET-Experimenten (CheZ-CFP; CheY-YFP) haben Sourjik und Berg die Änderungen in der intrazellulären CheYP-Konzentration bei Chemostimulation mit nicht metabolisierbarem α -Methylaspartat (MeAsp) *in vivo* bestimmt (Abb. 3.5 A)[SB02b]. In diesen Experimenten wurde die MeAsp Konzentration von einem stationären Wert aus sprunghaft nach unten und oben verändert. Das FRET-Signal zeigte entsprechend positive und negative Änderungen, die nach der Adaptation wieder den vorigen Wert annahmen.

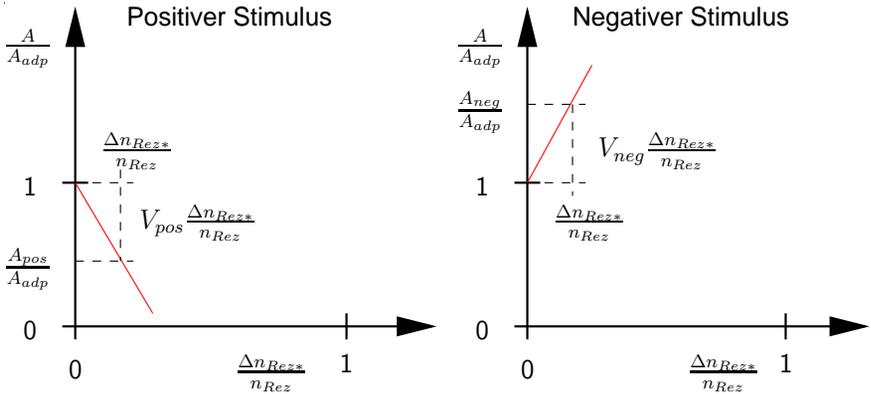


Abb. 3.4: Veranschaulichung der Verstärkungswirkung innerhalb von Rezeptorkomplexen.

Die Autoren gehen davon aus, dass das FRET-Signal proportional zur Aktivität der Histidinkinase ist. Deshalb kann die normierte Aktivitätsänderung der stimulierten Rezeptoren berechnet werden, indem der Spitzenwert des FRET-Experiments auf den stationären Wert bezogen wird.

Die Änderung im Belegungsgrad der Rezeptoren wurde mit Hilfe von K_D -Werten berechnet, die ebenfalls durch FRET-Experimente ermittelt wurden: Die Konzentration von MeAsp wurde ausgehend von 0 sprunghaft um eine gewisse Menge erhöht und der Spitzenwert der FRET-Reaktion bestimmt. Aus dem resultierenden Diagramm wurde der entsprechende K_D -Wert der Rezeptoren ermittelt. Da MeAsp sowohl durch den Tar-Rezeptor als auch durch den Tsr-Rezeptor wahrgenommen wird, wurden außerdem noch Mutanten mit demselben Experiment untersucht. Dabei zeigten $\Delta CheR\Delta CheB$ -Mutanten eine Reaktion, die mit einem Multi-Hill-Modell beschrieben werden kann, d.h. sie besitzen zwei unterschiedliche K_D -Werte. Diese Reaktion wird dem Tsr-Rezeptor zugeschrieben, wobei die Reaktion des Wildtyps wahrscheinlich vom Tar-Rezeptor dominiert wird. Aus diesen Experimenten ergibt sich der K_D -Wert $2.6\mu\text{M}$ für den Wildtyp und $K_{D1} = 150\mu\text{M}$ und $K_{D2} = 105\text{mM}$ für die $\Delta CheR\Delta CheB$ -Mutante.

Es wurden mehrere Experimente bei unterschiedlichen stationären Konzentrationen von MeAsp (0, 0.03, 0.1, 0.2, ... 10mM) durchgeführt. Die Spitzenwerte der Änderungen sind in Abb. 3.5 B gegenüber der anteiligen Änderung des Rezeptorbelegungsgrades aufgetragen. Der Belegungsgrad wurde dabei mit den K_D -Werten der $\Delta CheR\Delta CheB$ -Mutante bestimmt. Für diese Berechnung haben Sourjik und Berg wahrscheinlich deshalb die $\Delta CheR\Delta CheB$ -

Mutante ausgewählt, weil der Tar-Rezeptor schon bei sehr geringen Konzentrationen gesättigt ist und nur noch der Tsr-Rezeptor auf Konzentrationsänderungen reagieren kann.

Die Messpunkte bei unterschiedlichen stationären Konzentrationen von MeAsp liegen alle auf der gleichen Kurve und zeigen in einem weiten Bereich einen Verstärkungsfaktor von -36 ± 1 für ein positives und $+27 \pm 2$ für ein negatives Signal (Abb. 3.5 B).

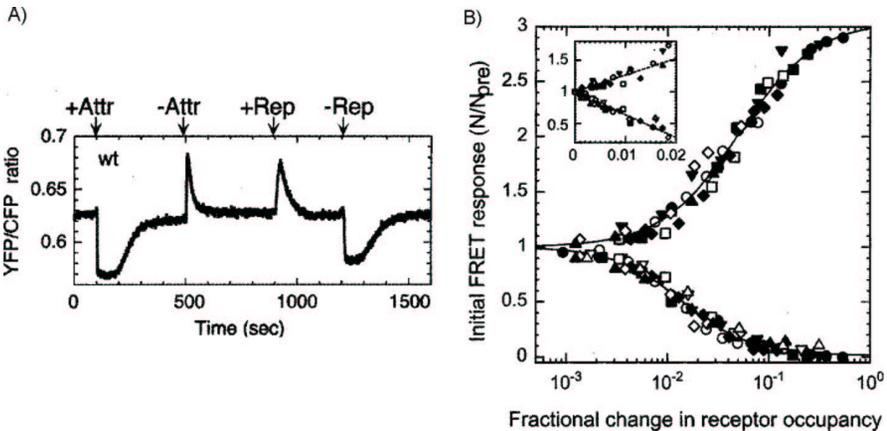


Abb. 3.5: A) FRET-Signal bei positiver und negativer Stimulation. B) Verstärkung: Spitzenwerte der Änderung des FRET-Signals bei sprunghörmiger Anregung mit MeAsp in Abhängigkeit von der berechneten Änderung in der Rezeptorbelegung (normalisiert). Das oben eingeblendete Diagramm zeigt einen kleinen Ausschnitt der Rezeptorverstärkung in linearen Koordinaten. Die unterschiedlichen Symbole markieren Experimente mit unterschiedlicher stationärer Konzentration von MeAsp. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung aus [SB02a].

3.2.3 Verstärkung eines einfachen Rezeptormodells

Im Folgenden soll ein einfaches Rezeptormodell betrachtet werden, bei dem kein besonderer Verstärkungsmechanismus vorgesehen ist. Ein Rezeptor kann dabei drei verschiedene Zustände annehmen: adaptiert, positiv oder negativ stimuliert. Diesen Zuständen sind folgende Aktivitäten zugeordnet: α_{adp} , α_{pos} , α_{neg} . Einfachheit halber wird die adaptierte Aktivität auf $\alpha_{adp} = 1$

festgelegt. Ein positiv stimulierter Rezeptor besitzt eine Aktivität $\alpha_{pos} < 1$, im Extremfall kann er die Aktivität 0 besitzen. Ein negativ stimulierter Rezeptor dagegen kann eine beliebig große Aktivität $\alpha_{neg} > 1$ annehmen. Es gilt also:

Rezeptorzustand	Aktivität pro Rezeptor
adaptiert	$\alpha_{adp} = 1$
pos. stimuliert	$0 \leq \alpha_{pos} < 1$
neg. stimuliert	$\alpha_{neg} > 1$

Im stationären Fall sind alle Rezeptoren adaptiert, die Gesamtaktivität A_{adp} ist demnach gleich der Gesamtzahl aller Rezeptoren n_{Rez} . Damit berechnet sich die Verstärkung wie folgt:

$$V = \frac{\frac{\Delta A^*}{A_{adp}}}{\frac{\Delta n_{Rez*}}{n_{Rez}}} = \frac{\frac{\Delta n_{Rez*}(\alpha_* - \alpha_{adp})}{n_{Rez} \alpha_{adp}}}{\frac{\Delta n_{Rez*}}{n_{Rez}}} = \frac{\alpha_* - \alpha_{adp}}{\alpha_{adp}} = \alpha_* - 1. \quad (3.3)$$

Bei positiven Signalen ergibt sich dadurch:

$$V_{pos} = \alpha_{pos} - 1 \in [-1, 0). \quad (3.4)$$

Die betragsmäßig maximale Verstärkung bei einem positiven Signal ist bei $\alpha_* = \alpha_{pos} = 0$ exakt 1. Das Signal wird also im eigentlichen Sinne überhaupt nicht verstärkt. Dagegen kann bei einem negativen Signal eine große Verstärkung erreicht werden, wenn die Aktivität eines negativ stimulierten Rezeptors um Faktoren größer ist als die eines adaptierten Rezeptors ($\alpha_{neg} \gg 1$):

$$V_{neg} = \alpha_{neg} - 1 > 0. \quad (3.5)$$

Anschaulich kann man sich dieses Phänomen anhand einer Gruppe von Menschen deutlich machen, in der jeder leise vor sich hinredet. Ein Einzelner aus dieser Gruppe kann deutlich hörbar alle anderen übertönen, wenn er schreit. Dagegen ist es kaum wahrzunehmen, wenn er plötzlich nichts mehr sagt.

Diese einfache Vorstellung von der Funktionsweise der Rezeptoren kann die Verhältnisse bei *E.coli* nicht wiedergeben. Vielmehr muss innerhalb der Rezeptoren ein Verstärkungsmechanismus aktiv sein, damit sowohl positive als auch negative Signale mit dem gleichen Faktor verstärkt werden. Bei Halobakterien liegen allerdings noch keine Erkenntnisse über die Verstärkung des Rezeptorsignals vor. Da aber schon ein einzelner aktivierter Rezeptor

ausreicht, um eine Schreckantwort zu erzeugen [MHO88] und die Zelle vorzeitig umkehren zu lassen, ist es sehr wahrscheinlich, dass ein Rezeptor die CheYP-Konzentration überproportional ansteigen lassen kann ($\alpha_{neg} \gg 1$). Es bleibt aber noch zu klären, ob die betragsmäßige Verstärkung bei Locksignalen ebenfalls größer als 1 ist wie es bei Schrecksignalen der Fall zu sein scheint.

3.2.4 Mögliche Verstärkungsmechanismen

3.2.4.1 Verstärkung durch Kooperativität im Rezeptorgitter

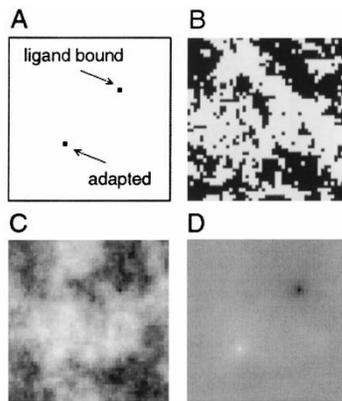


Abb. 3.6: *Stochastische Simulation eines kooperativen Rezeptorgitters. Teilbild A zeigt den im Rezeptorgitter 'fest eingebauten' inaktiven Rezeptor (ligand bound) und den adaptierten Rezeptor. Teilbild B ist eine Momentaufnahme der Simulation; C und D sind die Mittelwerte aus 100 bzw. 10000 Momentaufnahmen. (Bild mit freundlicher Genehmigung aus: [DB99])*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellmembranextrakten aus *E. coli* zeigen unterschiedliche, hoch geordnete Strukturen von Rezeptoren. Neben ringförmigen Strukturen wurden auch zweidimensionale kristallartige Rezeptorgitter gefunden [WHC⁺03]. Duke und Bray haben vorgeschlagen, dass kooperative Effekte innerhalb eines solchen Rezeptorgitters einen Verstärkungsmechanismus erzeugen könnten [DB99]. Das Modell ist ähnlich aufgebaut wie das von magnetischen Dipolen in metallischen Werkstoffen (Ising-Modell). Ein Rezeptor kann entweder in einer aktiven oder inaktiven Konformation

sein und wechselt ständig zwischen beiden hin und her. Wenn ein Rezeptor in einer aktiven Konformation ist, erhöht er die Wahrscheinlichkeit, dass auch der benachbarte Rezeptor in die aktive Konformation übergeht. Dieser Einfluss auf den benachbarten Rezeptor ist sehr moderat, benötigt also nur einen kleinen Teil der Energie aus der Bindungsenergie des Liganden. Ist der Rezeptor in einer inaktiven Konformation, erhöht er die Wahrscheinlichkeit seiner Nachbarn selbst ebenfalls die inaktive Konformation anzunehmen. In den in Abb. 3.6 dargestellten Simulationen wurde ein Rezeptorgitter betrachtet, das an einer festen Stelle einen adaptierten Rezeptor und an einer anderen Stelle einen mit Liganden gebundenen Rezeptor besitzt. Die Adaptation wurde für diese Simulation nicht betrachtet.

3.2.4.2 Verstärkung durch positive Rückkopplung

Barkai, Alon und Leibler [BAL01] haben einen Mechanismus vorgeschlagen, bei dem das unphosphorylierte CheB als Inhibitor wirkt. Im stationären Zustand ist fast das gesamte CheB, CheBP sowie CheR mit den Rezeptoren komplexiert. Bei einer Auslenkung des Systems aus der adaptierten Ruhelage verstärkt der Inhibitor CheB im ersten Moment die Wirkung, bis der adaptierte Zustand wieder erreicht wird.

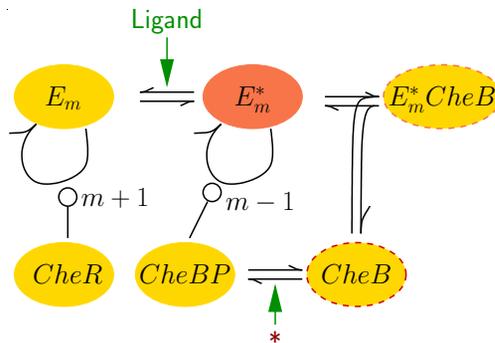


Abb. 3.7: Verstärkungsmechanismus durch positive Rückkopplung [BAL01].

Der Wirkmechanismus dieser Rückkopplung ist in Abb. 3.7 dargestellt. Dabei stellt E_m einen m -fach methylierten inaktiven Rezeptor dar. Der Stern kennzeichnet die aktive Konformation. An diese aktive Konformation kann unphosphoryliertes CheB binden und inhibiert damit die Aktivität des Komplexes. Aktive Komplexe sind für die Bildung von CheBP zuständig, wel-

ches wiederum die aktiven Rezeptorkomplexe demethyliert. CheR methyliert schließlich die inaktive Konformation von unbelegten Rezeptoren.

Erhöht sich z.B die extrazelluläre Lockstoffkonzentration, so gehen mehr aktive Rezeptoren E_m^* in die inaktive Konformation über. Damit sind auch weniger Bindungspartner von CheB vorhanden. Als Folge davon steigt die Anzahl freier Moleküle des Inhibitors CheB an, welche wiederum an E_m^* binden können und damit eine positive Rückkopplung des Eingangssignals bewirken.

Die Verstärkung dieses Modells liegt bei einer Effektorkonzentration im Bereich von 0 bis K_D (des Rezeptors) zwischen 35 und 10. Bei einer höheren Hintergrundkonzentration sinkt die Verstärkung ab.

3.3 Perfekte und robuste Adaptation

Bei Experimenten mit *E. coli* und auch mit *H.s.* zeigten die Zellen einige Zeit nach einer sprungförmigen Stimulation wieder dasselbe Schwimmverhalten wie vorher, obwohl die Stimulation noch immer andauerte. Die Organismen adaptieren also im Rahmen der Messgenauigkeit **perfekt**. Dies ist sogar bei extrem großen Reizen der Fall. Um eine perfekte Adaptation zu erreichen, müssen zu dem bisher beschriebenen Wirkmechanismus noch zusätzliche Annahmen getroffen werden. Der bisher beschriebene Mechanismus besteht darin, dass aktivierte Rezeptoren die CheBP-Konzentration erhöhen und daraufhin eine verstärkte Demethylierung der Rezeptorkomplexe verursachen, was wiederum die Rezeptoraktivität verringert. Ohne besondere Annahmen würde der Mechanismus zwar dem Stimulus entgegenwirken, ihn aber nicht vollständig, also perfekt, auslöschen. Grund dafür ist die schwankende Menge an methylierten beziehungsweise demethylierten Rezeptoren, die das Substrat für CheR und CheBP darstellen. Die folgende Gleichung verdeutlicht den Effekt für eine Methylierungsstelle im stationären Zustand (M_0 freie Methylierungsstellen, M_1 methylierte Stellen):



$$\frac{d[M_1]}{dt} = k'_{meth}[CheR][M_0] - k'_{dem}[CheBP][M_1] \stackrel{!}{=} 0 \quad (3.8)$$

$$[CheBP] = \frac{k'_{meth}[CheR][M_0]}{k'_{dem}[M_1]} \neq const. \quad (3.9)$$

$$\Rightarrow A_{adp} \neq const. \quad (3.10)$$

In diesem Fall ist die CheBP-Konzentration abhängig von der Konzentration der methylierten und unmethylierten Rezeptoren. Der Methylierungsgrad muss sich je nach Umgebungsbedingung ändern, weil gerade durch ihn die Stimulation der Rezeptoren ausgeglichen wird. Die stationäre CheBP-Konzentration ist also nicht unabhängig vom stationären Wert des Stimulus'. Die Methylesterase CheB wird ebenfalls wie das Schaltsignal CheY über die Histidinkinase CheA phosphoryliert. Ihr Phosphorylierungszustand ist also von der Rezeptoraktivität abhängig. Deshalb kann das Schaltsignal CheYP nur dann perfekt adaptiert sein, wenn auch CheBP adaptiert ist. Die negative Rückkopplung durch den oben beschriebenen Mechanismus wirkt also der Stimulation entgegen, kann sie aber nicht vollständig ausgleichen.

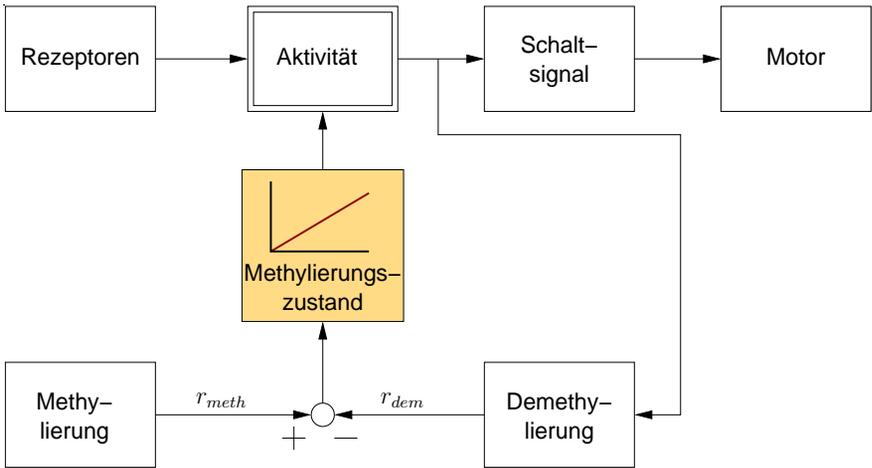


Abb. 3.8: Blockschaltbild eines Adaptationsmechanismus' mit negativer integraler Rückführung.

Perfekte Adaptation wird dann erreicht, wenn der Mechanismus einer negativen integralen Rückführung entspricht [YHSD00]. In Abbildung 3.8 ist ein signalorientiertes Blockschaltbild einer integralen Rückführung gezeigt. Der Methylierungszustand der Rezeptoren liegt in der negativen Rückkopplungsschleife und wirkt als Integrierer. Das System hat erst dann den stationären Zustand erreicht, wenn die Methylierungsrate der Demethylierungsrate entspricht ($r_{meth} = r_{dem}$). Nun muss noch gewährleistet sein, dass die Demethylierungsgeschwindigkeit monoton mit der Aktivität der Rezeptorkomplexe ansteigt, und zusätzlich die Methylierungsgeschwindigkeit konstant ist ($r_{meth} = const.$). Damit ist auch die stationäre Demethylierungsrate und

somit auch die stationäre Aktivität der Rezeptorkomplexe sowie das Schaltsignal zum Motor konstant. Das System führt also eine perfekte Adaptation aus.

Eine weitere nötige Eigenschaft der Adaptation stellt ihre **Robustheit** gegen Parameterschwankungen dar. Adaptation muss in den Organismen auch dann erreicht werden, wenn Schwankungen in Enzymkonzentrationen oder in Parameterwerten auftreten (z.B. durch Änderungen der Temperatur oder des pH-Wertes). Dabei ist der genaue Aktivitätswert, auf den die Rezeptorkomplexe adaptieren, nicht so wichtig. Wichtig ist dagegen, dass sie nach der Stimulation wieder den gleichen Wert erreichen wie davor.

3.4 Adaptationsmodell nach Barkai und Leibler

Eine Möglichkeit, wie robuste Adaptation erreicht werden kann, haben Barkai und Leibler für die Chemotaxis von *E. coli* vorgeschlagen [BL97]. Eine zentrale Annahme in ihrem Modell ist, dass ein Rezeptor (MCP) ständig zwischen zwei Aktivitätszuständen hin- und herschaltet. Dieser Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Konformation soll im Submillisekundenbereich stattfinden. Lediglich das Verhältnis zwischen der Lebensdauer beider Konformationen wird dadurch beeinflusst, ob der Rezeptor mit einem Liganden gebunden ist oder nicht und in welchem Methylierungszustand sich der Rezeptorkomplex befindet. Betrachtet werden 4 Methylierungsstellen pro MCP, von denen 0 bis 4 methyliert sein können. Die Gesamtaktivität A der Rezeptoren bestimmt sich aus der mit der spezifischen Aktivität α_m^i gewichteten Summe der Rezeptorzustände E_m^i :

$$A = \sum_{i=0}^1 \sum_{m=0}^4 \alpha_m^i [E_m^i], \quad (3.11)$$

wobei $m \in \{0, 1 \dots 4\}$ den Methylierungsgrad und $i \in \{0, 1\}$ den unbesetzten bzw. den mit einem Liganden besetzten Zustand darstellt.

Weiterhin wird davon ausgegangen, dass CheR in Sättigung arbeitet und die Rezeptorkomplexe unabhängig von ihrem Aktivitätszustand methylieren. Durch diese Annahme wird eine konstante Methylierungsrate erreicht, die unabhängig vom Methylierungszustand der Rezeptoren ist.

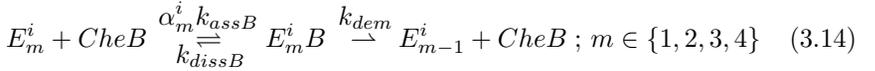
$$r_{meth} = const. \quad (3.12)$$

Im Gegensatz dazu liegt der Großteil von CheB, das die Rezeptoren wieder demethyliert, in ungebundener Form vor [*CheB*]. Der Phosphorylierungszustand von CheB wird in dem Modell nicht betrachtet. Die Gesamtmenge an

Enzymen, die die Demethylierung der MCPs katalysieren, ist hier also konstant. Die erzeugte Demethylierungsrate ist proportional zur Konzentration aller Enzym-Substrat-Komplexe $[E_m^i B]$:

$$r_{dem} \sim \sum_{i=0}^1 \sum_{m=0}^4 [E_m^i B]. \quad (3.13)$$

Im Folgenden wird die Konzentration $[E_m^i B]$ für den stationären Fall berechnet. Dafür werden Assoziation (Geschwindigkeits-Konstante k_{assB}), Dissoziation (k_{dissB}) und Methylierungsreaktion (k_{dem}) berücksichtigt. Zusätzlich wird in diesem Modell angenommen, dass CheB nur an die **aktive** Konformation eines Rezeptors binden kann.



$$\frac{d[E_m^i B]}{dt} = k_{assB} \alpha_m^i [E_m^i] [CheB] - k_{dissB} [E_m^i B] - k_{dem} [E_m^i B] \quad (3.15)$$

$$\stackrel{!}{=} 0 \quad (3.16)$$

$$[E_m^i B] = \frac{k_{assB} \alpha_m^i [E_m^i] [CheB]}{k_{dissB} + k_{dem}}. \quad (3.17)$$

Damit ergibt sich mit (3.11), (3.13) und (3.17):

$$r_{dem} \sim \sum_{i=0}^1 \sum_{m=0}^4 \frac{k_{assB} \alpha_m^i [E_m^i]}{k_{dissB} + k_{dem}} \cdot [CheB] \quad (3.18)$$

$$\sim A \cdot [CheB] \quad (3.19)$$

$$\approx A \cdot const. \quad (3.20)$$

Die Demethylierungsgeschwindigkeit ist also letztlich ungefähr proportional zur Rezeptoraktivität. Voraussetzung hierfür ist aber, dass die freie Konzentration von CheB $[CheB]$ in etwa konstant ist. Da im Modell von einer 10-fach höheren CheB-Gesamtkonzentration im Vergleich zu CheR ausgegangen wird und außerdem die Methylierungsgeschwindigkeitskonstante k_{meth} gleich der Demethylierungsgeschwindigkeitskonstanten k_{dem} gewählt worden ist, muss auch die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes von CheR und CheBP im stationären Fall gleich sein. Da CheR in Sättigung vorliegt, muss also etwa ein Zehntel der CheBP-Konzentration mit den MCPs (E_m^i) gebunden sein. Damit kann auch die freie CheBP-Konzentration als ungefähr konstant angesehen werden, wodurch sich im stationären Fall

auch eine konstante Aktivität A einstellt:

$$r_{meth} \stackrel{!}{=} r_{dem} \tag{3.21}$$

$$A \approx const. \tag{3.22}$$

Dieser Mechanismus erreicht also robuste und annähernd perfekte Adaptation. Robust ist der Mechanismus deshalb, weil die Güte der Adaptation weitgehend unabhängig von dem verwendeten Parametersatz und Konzentrationswerten ist [BL97].

Mello und Tu [MT03] haben die Bedingungen für perfekte Adaptation an einem Modell untersucht, das von dem Modell von Barkai und Leibler abgeleitet worden ist. Um perfekte Adaptation nicht nur näherungsweise zu erreichen, sind sie zum einen davon ausgegangen, dass CheBP nur an die aktive Konformation der Rezeptorkomplexe bindet, und zum anderen nur die inaktive Konformation ein Substrat für CheR ist.

3.5 Innere und äußere negative Rückführung

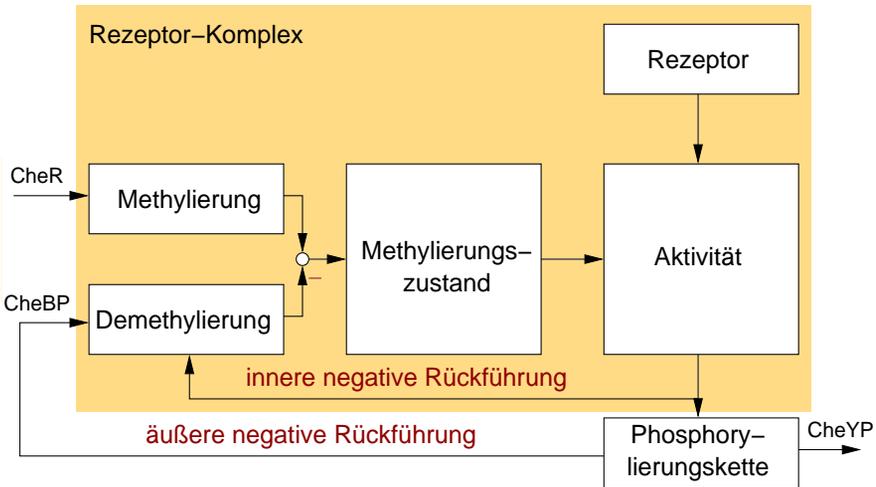


Abb. 3.9: Innere und äußere negative Rückführung bei der Adaptation.

Im Gegensatz zu der sonst üblichen Beschreibung, dass eine erhöhte Aktivität zu einer erhöhten CheBP-Konzentration und damit zu einer höheren

Demethylierungsrate führt, wird im Modell von Barkai und Leibler die Phosphorylierungskette mit CheA, CheAP und CheB, CheBP überhaupt nicht betrachtet. Vielmehr ist diese äußere negative Rückkopplung durch eine innere Rückkopplung ersetzt worden, die über die aktivitätsgesteuerte Demethylierbarkeit jedes einzelnen Rezeptors arbeitet (vergl. Abb. 3.9). Der Aktivitätszustand eines MCPs beeinflusst demnach nur seine eigene Demethylierungswahrscheinlichkeit und nicht die der anderen. Das bedeutet, dass in einer gemischten Population unterschiedlicher Rezeptoren die Adaptation an einen äußeren Reiz nur durch die stimulierten Rezeptoren selbst erreicht werden würde, und nicht durch eine Änderung des Methylierungszustands aller Rezeptoren.

Welche Rückführung bei der Adaptation in *Halobacterium salinarum* tatsächlich existiert, oder ob vielleicht sogar beide vorhanden sind, ist nicht geklärt.

3.6 Einfaches Modell der Excitation und Adaptation

Das oben vorgestellte Adaptationsmodell von Barkai und Leibler geht von 4 Methylierungsstellen an einem MCP aus. Perazzona und Spudich [PS99] haben jedoch bei Halobakterien gezeigt, dass HtrI zwar mehrere Konsensussequenzen für Methylierungsstellen besitzt, aber nur **eine** Mutation an der Stelle E265-E266 verhindert, dass der Transducer methyliert werden kann. HtrII besitzt sogar nur **eine** Konsensussequenz. Eine Mutation an dieser Stelle verhindert ebenfalls eine Methylierung des Transducers. Die Zellen adaptieren allerdings trotz der eingeführten Mutationen, also ohne dass der stimulierte Transducer selbst methyliert werden kann. Deshalb muss in diesem Fall die Adaptation über andere Rezeptoren laufen [PS99], also über die äußere Rückführung. Alternativ könnte auch ein zweiter, methylierungsunabhängiger Adaptationsmechanismus existieren.

Aufgrund dieser experimentellen Befunde soll an dieser Stelle ein Modell der Excitation und Adaptation eingeführt werden, das mit einer einzigen Methylierungsstelle pro Transducer auskommt und über eine äußere Rückführung über die Phosphorylierungskette verfügt. Trotz seiner Einfachheit soll es jedoch das Verhalten so gut wie möglich widerspiegeln können, auch wenn der zugrunde liegende biologische Mechanismus nicht dem modellierten entspricht, sondern nur eine grobe Vereinfachung seines Verhaltens darstellt. Dieser Ansatz ist sicherlich als erster Schritt gerechtfertigt und nötig, weil ein genaues Verständnis der Excitation und Adaptation besonders bei Halobakterien noch nicht vorhanden ist. Selbst grundlegende Mechanismen sind noch

unklar. So ist zum Beispiel nicht geklärt, ob ein Schrecksignal die intrazelluläre Konzentration von CheYP erhöht oder erniedrigt. Für beide Varianten sind Beispielorganismen bekannt. So zeigen *E. coli* und *B. subtilis* dasselbe Schwimmverhalten: durch Drehung ihrer Flagellen gegen den Uhrzeigersinn schwimmen sie vorwärts und bei entgegengesetzter Drehrichtung führen sie eine Taumelbewegung aus. Eine hohe CheYP-Konzentration führt jedoch bei *B. subtilis* zur Rotation der Flagellarmotoren entgegen dem Uhrzeigersinn, was einer Reaktion auf einen Lockreiz entspricht, während sie bei *E. coli* eine Drehung im Uhrzeigersinn verursacht und damit eine Schreckreaktion darstellt.

Im Modell wird angenommen, dass bei Halobakterien ein Schrecksignal die intrazelluläre CheYP-Konzentration erhöht und analog zu *E. coli* ein vorzeitiges Umschalten der Drehrichtung verursacht. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass bei Halobakterien ein einzelner, durch Blaulicht aktivierter Photorezeptor ausreicht, um ein vorzeitiges Umschalten des Motors zu bewirken [MHO88]. Deshalb muss man von einer hohen Rezeptorverstärkung eines Schrecksignals ausgehen, damit ein einzelner Rezeptor eine deutliche Konzentrationsänderung von CheYP bewirken kann. Diese Verstärkung ist leicht durch eine deutliche Aktivitätserhöhung stimulierter Rezeptoren zu erklären, die zu einer Konzentrationserhöhung des Schaltsignals führt (siehe Kap 3.2.3), dagegen wird für eine überproportionale Aktivitätsverringernung ein besonderer Verstärkungsmechanismus benötigt.

3.6.1 Photozyklus

Das Excitations-/Adaptationsmodell lässt sich in vier Module unterteilen. Das erste Modul bildet der Photozyklus des Photorezeptors (siehe Abb. 3.2). Seine Struktur sowie seine Kinetik sind durch photometrische Messungen gut bekannt. Allerdings wurden die Daten *in vitro* an Vesikeln gemessen. Dort unterscheidet sich das Membranpotential deutlich von intakten Zellen, weshalb sich unter *in vivo*-Bedingungen andere Zeitkonstanten ergeben können. So wurde z.B. in [MO90], von einer 4-8x längeren Halbwertszeit der aktivierten Zustände von SRI unter *in vivo*-Bedingungen berichtet. Dennoch werden für SRI die Parameter aus [MBMO95] verwendet. Dagegen mussten für eine bessere Übereinstimmung mit den Messergebnissen, vor allem bei den Experimenten mit Einzel- und Doppelpulsen aus Blaulicht, die Halbwertszeiten für SRII um den Faktor 10 vergrößert werden (siehe Kap. 5.1.2). Die extrem kurzlebigen Zwischenzustände mit Halbwertszeiten unter 1ms werden vernachlässigt, so dass für jeden Rezeptortyp nur drei Zustände verbleiben. Der Photozyklus ist mit folgenden Reaktionen modelliert:

SRI			SRII		
SR_{587}	$I_{or}\sigma\Phi$	SR_{373}	SR_{487}	$I_{bl}\sigma\Phi$	SR_{360}
SR_{373}	$I_{UV}\sigma\Phi$	SR_{510}			
SR_{373}	k_r^{373}	SR_{587}	SR_{360}	k_r^{360}	SR_{540}
SR_{510}	k_r^{510}	SR_{587}	SR_{540}	k_r^{540}	SR_{487}
$[SR_{587}] + [SR_{373}] + [SR_{510}] = 1$			$[SR_{487}] + [SR_{360}] + [SR_{540}] = 1$		

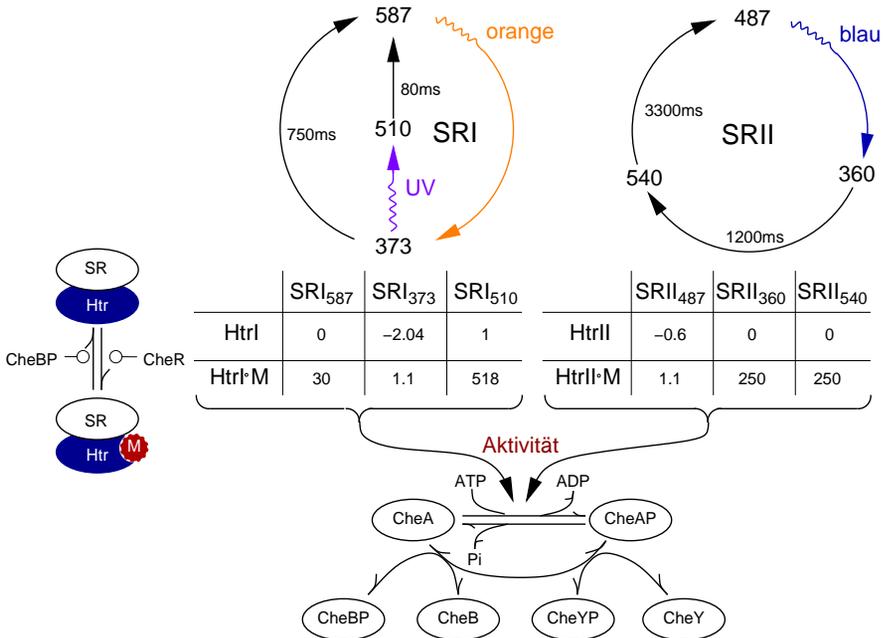


Abb. 3.10: Einfaches Modell der Excitation und Adaptation

I_{or} , I_{UV} und I_{bl} stehen dabei für die Lichtintensitäten von orangenem, UV-

bzw. blauem Licht. Die effektive Photorezeptorfläche σ und die Quantenausbeute Φ werden für beide Rezeptoren gleich angenommen. Die Summe aller Rezeptorzustände ist aus Gründen der Übersichtlichkeit auf 1 normiert.

3.6.2 Transducer-Aktivität

Der Zustand eines einzelnen Rezeptorkomplexes ist dadurch gekennzeichnet, dass sich der Rezeptor in einem der drei möglichen Zustände des Photozyklusses befindet und der zugehörige Transducer entweder methyliert oder unmethyliert ist. Er kann also einen von sechs verschiedenen Zuständen annehmen, für die je ein Parameter für die jeweilige Aktivität des Rezeptorkomplexes gewählt werden muss. Die Gesamtaktivität aller Rezeptoren ist schließlich das mit den Rezeptoraktivitäten gewichtete Mittel aller Rezeptorzustände. Um einen unerwünschten Einfluss der Adaptation verschiedener Rezeptortypen untereinander zu eliminieren, wird in diesem einfachen Modell entweder SRI oder SRII betrachtet und nicht beide Typen zur gleichen Zeit. Die Gesamtaktivität ergibt sich daher getrennt nach SRI und SRII:

$$\begin{aligned}
 SRI : A = & [SR_{587}]([M_0]\alpha_{587M0} + [M_1]\alpha_{587M1}) + \\
 & [SR_{373}]([M_0]\alpha_{373M0} + [M_1]\alpha_{373M1}) + \\
 & [SR_{510}]([M_0]\alpha_{510M0} + [M_1]\alpha_{510M1}) \quad (3.23)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 SRII : A = & [SR_{487}]([M_0]\alpha_{487M0} + [M_1]\alpha_{487M1}) + \\
 & [SR_{360}]([M_0]\alpha_{360M0} + [M_1]\alpha_{360M1}) + \\
 & [SR_{540}]([M_0]\alpha_{540M0} + [M_1]\alpha_{540M1}). \quad (3.24)
 \end{aligned}$$

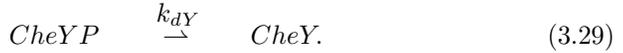
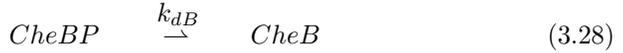
Wenn nichts anderes angegeben ist, beträgt die Gesamtaktivität im adaptierten Fall $A = 1$. Durch Veränderung dieses Wertes kann eine veränderte CheYP-Konzentration im adaptierten Fall berücksichtigt werden. Dies kann z.B. durch unterschiedliche Klone, veränderte Temperaturen oder sonstige Umgebungsbedingungen verursacht werden.

Analog zu Kap. 3.2.3 besitzt ein Transducer im adaptierten Fall also die mittlere Aktivität $\alpha_{adp} = 1$. Dagegen ist die mittlere Aktivität eines Schreckstoff-induzierten Transducers um ein Vielfaches höher und verstärkt damit den Stimulus um einen Faktor $V_{neg} \gg 1$ (vergleiche (3.5)). Durch die Annahme, dass ein positiv stimulierter Rezeptorkomplex auch eine negative Aktivität besitzen kann ($\alpha_{pos} < 0$) können auch für positive Signale Verstärkungen erreicht werden, die betragsmäßig größer als 1 sind (vergleiche (3.4) auf S. 39). Eine negative Aktivierung eines Transducers würde einer umgekehrten Phosphatübertragung entsprechen, also von CheYP bzw. von CheBP auf CheA

(siehe nächstes Kapitel). Allerdings haben sich im Vergleich zu den Aktivitätswerten von negativ stimulierten Rezeptorkomplexen im optimierten Parametersatz nur sehr moderate Werte für positiv stimulierte Komplexe ergeben (vergleiche Abb. 3.10).

3.6.3 Phosphatübertragung

Der Phosphorylierungsgrad von CheB und CheY ist von der Gesamtaktivität der Rezeptoren abhängig und wird im folgenden Modul berechnet. Grundlage für dieses Modul bildet das folgende vereinfachte Reaktionsschema:



Dieses Reaktionsschema vernachlässigt den Phosphatgruppendonor (ATP) sowie die Produkte (ADP und P_i) und alle Zwischenkomplexe. Dieses Modul würde in dieser Form bereits 5 Parameter beinhalten, von denen bei Halobakterien keine bekannt sind. Deshalb soll es hier noch weiter vereinfacht werden.

Damit eine effektive Signalübertragung möglich ist, muss die Phosphatübertragung sehr schnell ablaufen. Daher wird im ersten Schritt die Kinetik vernachlässigt und die Phosphorylierungskette nur im quasistationären Zustand betrachtet:

$$\begin{aligned} \frac{d[CheAP]}{dt} &= [CheA]A \cdot k_{pA} - \\ & [CheAP]([CheY]k_{pY} + [CheB]k_{pB}) = 0 \end{aligned} \quad (3.30)$$

$$\frac{d[CheYP]}{dt} = [CheAP][CheY]k_{pY} - [CheYP]k_{dY} = 0 \quad (3.31)$$

$$\frac{d[CheBP]}{dt} = [CheAP][CheB]k_{pB} - [CheBP]k_{dB} = 0. \quad (3.32)$$

Grundlage für eine weitere Vereinfachung ist die Überlegung, dass im adaptierten Fall das Gesamtsystem bei Stimulation deutliche positive Ausschläge in der CheYP- und CheBP-Konzentration ausführen können muss.

Deshalb ist es erforderlich, dass die Konzentrationen für die phosphorylierten Komponenten bezogen auf deren Gesamtkonzentration im adaptierten Fall sehr gering sind, damit der relative Phosphorylierungsgrad deutlich erhöht werden kann. Zur weiteren Betrachtung werden die phosphorylierten Komponenten auf deren Gesamtkonzentration normiert: $Ap = [CheAP]/([CheA] + [CheAP])$, $Yp = [CheYP]/([CheY] + [CheYP])$, $Bp = [CheBP]/([CheB] + [CheBP])$. Damit ergibt sich aus (3.31) und (3.32):

$$Yp = \frac{1}{1 + \frac{k_{dY}}{Ap \cdot k'_{pY}}} \ll 1 \quad (3.33)$$

$$Yp \approx Ap \frac{k'_{pY}}{k_{dY}} \quad (3.34)$$

$$Bp \approx Ap \frac{k'_{pB}}{k_{dB}} \quad (3.35)$$

mit $k'_{pY} = k_{pY}([CheA] + [CheAP])$ und $k'_{pB} = k_{pB}([CheA] + [CheAP])$. Und schließlich ergibt sich aus (3.30):

$$\begin{aligned} \frac{dAp}{dt} &= (1 - Ap)A \cdot k_{pA} - Ap(1 - Ap \frac{k'_{pY}}{k_{dY}})k'_{pY} - Ap(1 - Ap \frac{k'_{pB}}{k_{dB}})k'_{pB} \\ &= Ap^2 \left(\frac{k'_{pY}}{k_{dY}} + \frac{k'_{pB}}{k_{dB}} \right) - Ap(A \cdot k_{pA} + k'_{pY} + k'_{pB}) + A \cdot k_{pA} = \textcircled{3.36} \end{aligned}$$

Für $Ap \ll 1$ kann der quadratische Term vernachlässigt werden:

$$Ap \approx \frac{1}{1 + \frac{k'_{pY} + k'_{pB}}{A \cdot k_{pA}}} \quad (3.37)$$

$$\approx A \frac{k_{pA}}{k'_{pY} + k'_{pB}}. \quad (3.38)$$

Durch diese Vereinfachungen ergibt sich also, dass die CheYP- und CheBP-Konzentration in etwa proportional zur Gesamtaktivität A der Rezeptorkomplexe ist. Voraussetzung für die Vernachlässigungen war ein niedriger Phosphorylierungsgrad von CheA, CheY und CheB.

Durch die Annahme, dass ein Transducer auch eine negative Aktivität besitzen kann, sind mit diesem Ansatz jedoch auch negative CheYP- und CheBP-Konzentrationen möglich. Außerdem können auch extrem große Werte auftreten, wenn die Rezeptoraktivitäten entsprechend groß gewählt werden. Um

einem physiologisch sinnvollen Bereich für die Konzentrationen sicherzustellen, werden sie deshalb in einem letzten Schritt noch nach oben und unten begrenzt. Für die auf den adaptierten Fall normierten Konzentrationen von CheYP und CheBP ergibt sich damit:

$$\frac{[CheYP]}{[CheYP]_{adp}} = \begin{cases} 0 & A < 0 \\ A & 0 < A < y_{max} \\ y_{max} & A > y_{max} \end{cases} \quad (3.39)$$

$$\frac{[CheBP]}{[CheBP]_{adp}} = \begin{cases} 0 & A < 0 \\ A & 0 < A < b_{max} \\ b_{max} & A > b_{max}. \end{cases} \quad (3.40)$$

3.6.4 Methylierungszustand

Das letzte Modul bildet der Methylierungs- bzw. Adaptationszustand des Rezeptorkomplexes. Wie schon erwähnt wird angenommen, dass ein einzelner Rezeptor lediglich zwei Methylierungszustände annehmen kann: unmethyliert und methyliert, was im Modell lediglich durch den Mittelwert aller Rezeptorkomplexe mit einem einzigen Speicher M_1 berücksichtigt wird. Der Wert dieses Speichers wird ständig durch einen konstanten Einfluss erhöht, was die Methylierungsaktivität von CheR widerspiegelt (k_{meth}). Wie in *E. coli* wird davon ausgegangen, dass CheR in Sättigung arbeitet, d.h. dass die meisten Enzyme an ihr Substrat, den Rezeptorkomplexen, gebunden sind und diese im Moment methylieren. Das hat schließlich bei konstanter Gesamtkonzentration von CheR eine gleichbleibende Methylierungsrate r_{meth} zur Folge. Die Demethylierung wird dagegen hauptsächlich durch phosphoryliertes CheB katalysiert. Unphosphoryliertes CheB hat in *E. coli* eine deutlich geringere Demethylierungsaktivität als phosphoryliertes und wird deshalb hier völlig vernachlässigt. Um mit diesem Ansatz perfekte Adaptation zu erreichen, wird angenommen, dass auch CheBP in Sättigung arbeitet und somit die Demethylierungsgeschwindigkeit proportional zu seiner Konzentration ist (siehe unten). Außerdem soll die Methylierung unabhängig vom Zustand des Photozyklus' sein. Die Konzentrationen von CheR und CheBP werden aus Gründen der Übersichtlichkeit auf den adaptierten Zustand normiert.

$$\frac{dM_1}{dt} = k_{meth} \frac{[CheR]}{[CheR]_{adp}} - k_{dem} \frac{[CheBP]}{[CheBP]_{adp}} \quad (3.41)$$

$$[CheR] = [CheR]_{adp}. \quad (3.42)$$

Der Adaptationsprozess ist abgeschlossen, wenn $\frac{dM_1}{dt} = 0$ erreicht ist, d.h. wenn die Methylierungs- gleich der Demethylierungsgeschwindigkeit ist. Mit (3.40), (3.41) und (3.42) ergibt sich:

$$A = \frac{[CheBP]}{[CheBP]_{adp}} \quad (3.43)$$

$$A_{adp} = \frac{k_{meth}}{k_{dem}} = const. \quad (3.44)$$

Die Gesamtaktivität A ist demnach im stationären Fall konstant. Das System führt also eine perfekte Adaptation durch. Damit sich $A(t \rightarrow \infty) = 1$ einstellt, müssen die Geschwindigkeitskonstanten für die Methylierung und die Demethylierung gleich groß gewählt werden ($k_{meth} = k_{dem}$).

Der beschriebene Adaptationsmechanismus ist genau wie der Mechanismus von Barkai und Leibler (vergleiche Kap. 3.4) robust gegen Parameteränderungen. Auch wenn die Konstanten k_{meth} und k_{dem} oder der exakte Zusammenhang zwischen Aktivität und CheBP sich ändern, führt das System noch perfekte Adaptation aus.

Würde CheBP nicht in Sättigung arbeiten, wäre die Demethylierungsgeschwindigkeit von der Konzentration seines Substrates (M_1) abhängig. Dadurch würde sich auch der stationäre Zustand des Systems mit dem Methylierungszustand ändern, d.h. es würde keine perfekte Adaptation erreicht werden.

4 Schaltverhalten des Flagellarmotors

Halobacterium salinarum kann Flagellenbündel an einem oder an beiden Polen ausbilden, die unabhängig voneinander in verschiedene Richtungen rotieren können. Um die Analyse des Schwimmverhaltens aber nicht durch die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten des oder der Flagellenbündel zu erschweren, wird in dieser Arbeit ausschließlich auf das Verhalten von einfach begeißelten Zellen eingegangen.

Die Flagellen können im oder gegen den Uhrzeigersinn rotieren. In beiden Rotationsrichtungen bleiben die Flagellen gebündelt und bilden eine Art Schraube. Bei Rotation im Uhrzeigersinn schiebt das Flagellenbündel die Zelle vorwärts, bei Rotation gegen den Uhrzeigersinn zieht es sie rückwärts. Die Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung ist mit ca. $3\mu\text{m}/\text{s}$ etwa doppelt so schnell wie die der Rückwärtsbewegung. Außerdem schlingert die Zelle beim Rückwärtsschwimmen mehr als in Vorwärtsrichtung. Eventuell ist in dieser Drehrichtung das Bündel nicht so stabil. Beide Schwimmphasen weisen jedoch eine recht konstante Dauer auf, bis die Zelle abrupt stoppt und nach kurzer Zeit in die entgegengesetzte Richtung weiterschwimmt [MAO91].

Allerdings ist noch nicht geklärt, ob jede Flagelle über einen eigenen Motor angetrieben wird, oder an einem Polende nur ein gemeinsamer Antrieb vorhanden ist. Bei *Haloarcula quadrata*, einem Verwandten von *H. salinarum*, sieht man jedoch, dass die Flagellen an unterschiedlichen Stellen der Zelle entspringen und dementsprechend von jeweils einem eigenen Motor angetrieben werden müssen [Ore02]. Wenn aber mehrere Motoren die Drehung des Bündels verursachen, ist es wahrscheinlich, dass sie über einen Synchronisationsmechanismus immer in dieselbe Richtung drehen, damit die beobachtete konstante Schwimmgeschwindigkeit erklärt werden kann.

Im unstimulierten Fall sind beide Schwimmphasen im Mittel gleich lang (ca. 12s) und zeigen auch dieselbe Häufigkeitsverteilung der Intervalldauern [MAO91]. Auch bei Lichtstimulation wird die Dauer beider Schwimmphasen in gleicher Weise beeinflusst [SH85]. Ein Schrecksignal lässt die Zellen vorzeitig die Schwimmrichtung umkehren, während ein Lockreiz die aktuelle Schwimmphase verlängert (siehe Abb. 4.1). Die Zelle bewegt sich also in

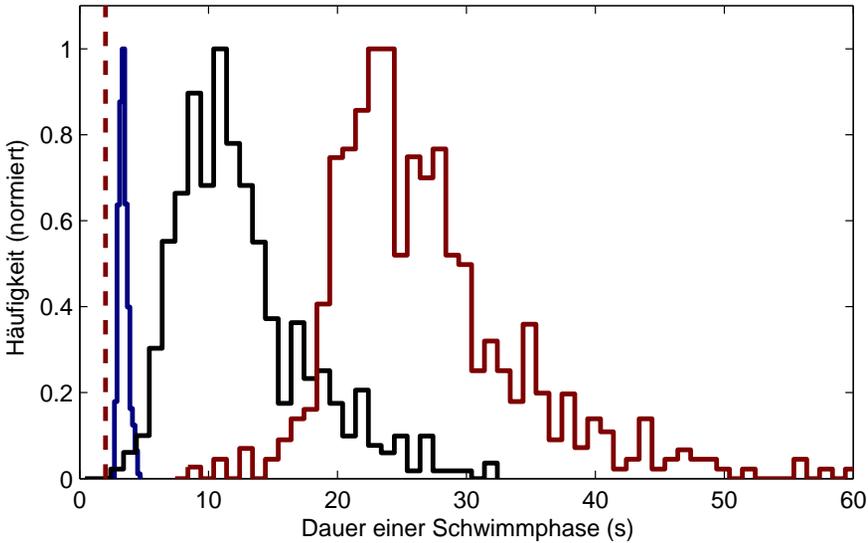


Abb. 4.1: Häufigkeitsverteilung von Intervalllängen im spontanen und im lichtinduzierten Fall. Das Maximum der Häufigkeitsverteilung ist im spontanen Fall bei $t = 11\text{s}$, bei Schreckstimulation bei $t = 2\text{s}$ und bei Lockstimulation bei $t = 23\text{s}$. Die gestrichelte Linie bei $t = 2\text{s}$ gibt den Zeitpunkt der Stimulation an. Die Messwerte stammen aus [HS85].

Richtung besser werdender Umgebungsbedingungen und kehrt bei schlechter werdenden Bedingungen vorzeitig um.

4.1 Beispielorganismus *E. coli*

Bei der Chemotaxis ist *E. coli* sicherlich der am besten erforschte Organismus. Deshalb soll in diesem Kapitel auf das Schaltverhalten von *E. coli* eingegangen werden, um beide Organismen miteinander vergleichen zu können. Eine *E. coli* Bakterie besitzt durchschnittlich vier Flagellarmotoren, die im Gegensatz zu *Halobacterium salinarum* auf der gesamten Zelloberfläche verteilt in der Zellmembran verankert sind. Das extrazelluläre Ende der Motoren geht in eine Flagelle über. Die Länge dieses fadenförmigen Proteinkomplexes beträgt mehrere Körperlängen. Die Motoren können die Geißeln mit einer Frequenz in der Größenordnung von 100Hz in beiden Richtungen drehen. Rotieren die Flagellen von außen betrachtet gegen den Uhrzeigersinn (**counter-clock-wise**

CCW), so vereinigen sich deren Flagellen zu einem schraubenförmigen Bündel und schieben die Zelle vorwärts. Dabei gleiten die einzelnen Flagellen ineinander, sodass sie sich nicht verknoten. Ändern einige Motoren die Rotationsrichtung und drehen im Uhrzeigersinn (clock-wise CW), so scheren deren Flagellen aus dem Bündel aus, was zu einer unkoordinierten Taumelbewegung der Zelle führt und ihr eine neue Schwimmrichtung verleiht [TRB00]. Eine derartige Taumelbewegung dauert im adaptierten Fall meistens weniger als eine Sekunde, während eine koordinierte Vorwärtsbewegung etwa 1-2s lang ist.

4.1.1 Molekularer Aufbau des Flagellarmotors

Ungefähr 20 verschiedene Proteine bilden den kompliziert aufgebauten molekularen Motor, dessen Funktionsweise noch nicht völlig erforscht ist. Sein Durchmesser beträgt nur etwa $50nm$ [Ber03]. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Motorkomplexen aus *Salmonella enterica* [TMD01] erkennt man, dass er aus mehreren Proteinringen aufgebaut ist. Der innerste Ring besteht unter anderem aus ca. 30 Proteinen FliM, an die das Schaltsignal CheY binden kann. Unphosphoryliertes CheY bindet dagegen deutlich schlechter an FliM. FliM wird für das Umschalten der Motordrehrichtung mitverantwortlich gemacht.

4.1.2 Schaltverhalten des Flagellarmotors

Die verschiedenen Flagellarmotoren eines *E. coli* Bakteriums schalten unabhängig voneinander ihre Drehrichtung um. Im adaptierten Fall drehen sie etwa zu 80% in die CCW-Richtung, schwimmen also vorwärts. Ein negatives chemotaktisches Signal verringert den Anteil der CCW-Drehung und erhöht die Wahrscheinlichkeit für eine Taumelbewegung. Entsprechend bewirkt ein positives Signal eine größere Wahrscheinlichkeit für eine gerichtete Vorwärtsbewegung.

In erster Näherung entspricht die Häufigkeitsverteilung der Dauer einer Schwimmphase einer exponentiellen Verteilung wie sie durch einen einzelnen Reaktionsschritt hervorgerufen wird. Bei genauer Analyse der Verteilung, vor allem für kurze Perioden, gibt es sich in diesem Punkt widersprechende experimentelle Ergebnisse. Die Messungen von Segall et al. [SMB82] entsprechen in fast allen Zeitintervallen einer exponentiellen Verteilung, nur die Häufigkeit des kürzesten Intervalles ist nur etwa halb so groß wie sie bei einer exponentiellen Verteilung sein müsste. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass für den Umschaltvorgang mehrere Reaktionsschritte benötigt werden, und nicht

nur ein einzelner. Kuo und Koshland [KK89] haben dagegen bei Zellen mit deletierter Signalkaskade, bei denen nur noch CheY vorhanden war, rein exponentielle Verteilungen gemessen. Bei Wildtyp-Zellen haben sie sogar von einer Überlagerung von zwei exponentiellen Verteilungen berichtet. Das bedeutet, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen von Segall et al. die kürzesten Intervalle noch häufiger vorkommen würden als bei einer einfachen exponentiellen Verteilung. Kuo und Koshland haben den Drehsinn des Flagellarmotors nicht nur in eine CW- und CCW-, sondern auch in eine Stopp-Phase unterteilt. Die Stopp-Phase ist deutlich kürzer als die beiden anderen Phasen, zeigt jedoch ebenfalls eine exponentielle Verteilung.

An den widersprüchlichen Ergebnissen wird deutlich, dass die Frage nach der genauen Form der Häufigkeitsverteilung, insbesondere für sehr kurze Intervalle, ein messtechnisches Problem darstellt. Die Schaltfrequenz der Zellen ist so hoch und damit die fraglichen Intervalle so kurz, dass die zeitliche Auflösung einer handelsüblichen Videokamera nicht mehr ausreicht, um die Messungen mit der nötigen Genauigkeit durchführen zu können. Bei einer Videofrequenz von 60Hz (beim amerikanischen Videoformat) steht nur alle $16,7\text{ms}$ ein neues Bild zur Verfügung. Außerdem werden mindestens zwei Bilder benötigt, um ein Umkehrereignis zweifelsfrei zu erkennen [KK89]. Dadurch ist keine Aussage über Intervalle möglich, die kürzer als $33,3\text{ms}$ sind.

Geht man nun in erster Näherung von einer exponentiellen Häufigkeitsverteilung der Schwimmphasen aus und lässt außerdem die Stopp-Phase außer Acht, so kann man das Schaltverhalten von *E. coli* mit zwei Parametern vollständig beschreiben: dem zeitlichen Anteil der Drehung im Uhrzeigersinn $CWbias$ und der Schaltfrequenz f . Damit liegt fest wie groß die mittlere Dauer τ_{CW} und τ_{CCW} beider Schwimmphasen ist:

$$f = \frac{1}{\tau_{CW} + \tau_{CCW}} \quad (4.1)$$

$$CWbias = \frac{\tau_{CW}}{\tau_{CW} + \tau_{CCW}} = \tau_{CW} \cdot f \quad (4.2)$$

$$\tau_{CW} = \frac{CWbias}{f} \quad (4.3)$$

$$\tau_{CCW} = \frac{1 - CWbias}{f}. \quad (4.4)$$

Gleichzeitige Messungen von der Schaltfrequenz f und des CW-Verhältnisses $CWbias$ an derselben Zelle wurden von Montrone et al. [MEOM98] veröffentlicht. Obwohl die Messpunkte aus einer 10s langen Beobachtung der Motordrehrichtung gemittelt wurden, zeigen die Messwerte noch eine deutliche Streuung (siehe Abb. 4.2 A). Trotzdem erkennt man einen glockenförmigen

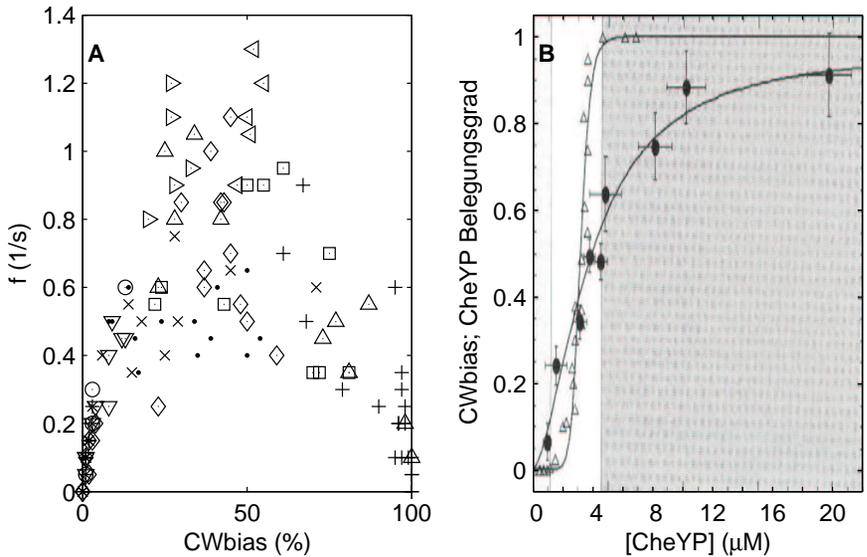


Abb. 4.2: A: Schaltfrequenz f in Abhängigkeit von $CWbias$. Ein Messpunkt entspricht dem Mittelwert aus einer 10s langen Beobachtung einer Zelle. Unterschiedliche Symbole entsprechen individuellen Zellen. Die Messwerte stammen aus [MEOM98]. B: Messung des $CWbias$ (Dreiecke) und des Belegungsgrades (Punkte) der $FliM$ -Moleküle mit $CheY$ in Abhängigkeit von der freien $CheY$ -Konzentration. Abbildung mit freundlicher Genehmigung aus [SB02a].

Verlauf der Schaltfrequenz f in Abhängigkeit des $CWbias$. Die Schaltfrequenz geht gegen 0, wenn der Motor ausschließlich entgegen dem Uhrzeigersinn dreht ($CWbias = 0$, $\tau_{CW} \rightarrow 0$, $\tau_{CCW} \rightarrow \infty$) und auch bei ausschließlicher Drehung im Uhrzeigersinn ($CWbias = 1$, $\tau_{CW} \rightarrow \infty$, $\tau_{CCW} \rightarrow 0$). Die maximale Schaltfrequenz wird erreicht, wenn beide Rotationsrichtungen in etwa gleich lang sind ($CWbias = 0,5$, $\tau_{CW} = \tau_{CCW}$).

Die Abhängigkeit von $CWbias$ von dem Schaltsignal $CheY$ wurde erstmals von Cluzel et al. [CSL00] an einzelnen Zellen gleichzeitig gemessen. Dazu verwendeten sie eine Mutante, in der $CheY$ mit einem grün fluoreszierenden Protein GFP markiert ist. Außerdem kann in dieser Mutante die $CheY$ -Konzentration mittels einer extrazellulären IPTG-Konzentration eingestellt werden. Die Mutante ist weiterhin dafür bekannt, dass das gesamte $CheY$ in phosphorylierter Form vorkommt. Damit ist es möglich, die $CheY$ -

Konzentration mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in einer einzelnen Zelle zu messen und zusätzlich zur gleichen Zeit das Schaltverhalten eines ihrer Flagellarmotoren zu bestimmen. Die Messergebnisse sind in Abb. 4.2 B zu sehen. Die Charakteristik von $CWbias$ in Abhängigkeit von der CheYP-Konzentration zeigt einen sehr steilen s-förmigen Verlauf und lässt sich sehr gut durch eine Hill-Kinetik mit dem Hill-Koeffizienten $h = 10,3$ beschreiben.

Das Schaltverhalten eines *E. coli* Motors wird durch $CWbias$, f und dem Einfluss von CheYP (siehe Abb. 4.2) zusammen mit dem Wissen, dass die Häufigkeitsverteilung der Dauer beider Rotationsrichtungen näherungsweise exponentiell ist, vollständig beschrieben.

4.1.3 Modelle aus der Literatur für *E. coli*

4.1.3.1 Zwei-Zustandsmodell

Eine auf den ersten Blick plausible Beschreibung des Schaltmechanismus⁷ von *E. coli* ist die folgende: Der Schaltkomplex kann das Schaltsignal CheYP binden. Ohne CheYP dreht der Flagellarmotor entgegen dem Uhrzeigersinn, schiebt also die Zelle vorwärts. Mit CheYP dagegen dreht er im Uhrzeigersinn und führt zu einer Taumelbewegung der Zelle. In Abb. 4.3 A ist diese Beschreibung in ein Reaktionsschema übersetzt. Es besitzt lediglich zwei Zustände, den freien Schaltkomplex, der in CCW -Richtung dreht, und den mit CheYP komplexierten Zustand, der eine CW -Rotation ausführt.

Analysiert man dieses Modell etwas genauer, so erkennt man, dass die mittlere Dauer τ_{CW} des mit CheYP komplexierten Zustands konstant ist, weil die Dissoziation von CheYP nicht von der Konzentration des freien Schaltsignals abhängig ist. Dagegen wird die mittlere Dauer τ_{CCW} des unbelegten Zustandes umso kürzer, je mehr CheYP in der Zelle vorhanden ist. Demnach ergibt sich für die Schaltfrequenz f mit (4.2) für dieses Modell eine linear steigende Schaltfrequenz in Abhängigkeit von $CWbias$ und gibt damit die Messergebnisse völlig falsch wieder (siehe Abb. 4.3 B):

$$\tau_{CW} = const. \quad (4.5)$$

$$f = \frac{1}{\tau_{CW}} CWbias \quad (4.6)$$

$$\sim CWbias. \quad (4.7)$$

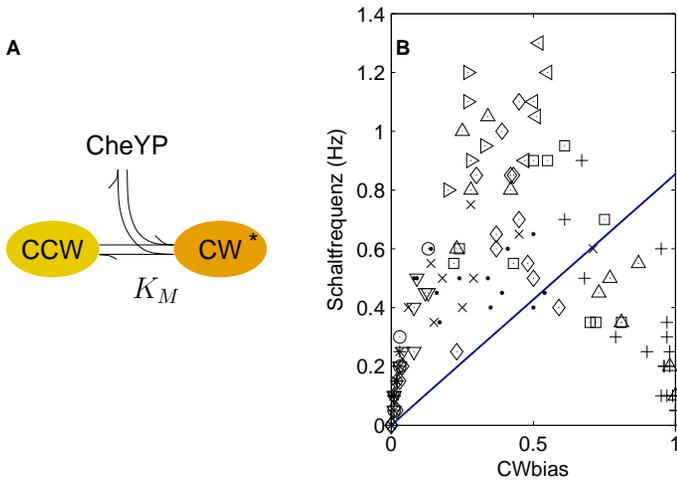


Abb. 4.3: *A: Zwei-Zustandsmodell des Schaltverhaltens von E. coli. B: Messungen (Symbole) und Modellverhalten (durchgezogene Linie) der Schaltfrequenz f gegen den zeitlichen Anteil der Drehrichtung im Uhrzeigersinn CW_{bias} .*

4.1.3.2 Vier-Zustandsmodell

In dieser Hinsicht liefert das Vier-Zustandsmodell eine deutliche Verbesserung. Das Modell ist in Abb. 4.4 A dargestellt. Es besteht aus jeweils zwei Zuständen pro Drehrichtung, einem unbelegten und einem mit dem Schaltsignal CheYP belegten Zustand. Ein Wechsel der Drehrichtung ist allerdings nicht in jedem Zustand möglich. Im unbelegten Zustand ist nur ein Übergang $CW \rightarrow CCW$ und im belegten Zustand nur der Übergang $CCW^* \rightarrow CW^*$ möglich. Die Irreversibilität der beiden Schaltreaktionen führt dazu, dass das Modell einen thermodynamischen Kreisprozess darstellt und deshalb Energie benötigt, um ständig in einer Vorzugsrichtung ablaufen zu können. Für die mathematische Beschreibung dieses Modells wird angenommen, dass die Bindung von CheYP an den Motorkomplex im Gleichgewicht ist. Sie wird in beiden Drehrichtungen mittels derselben Michaelis-Menten-Konstanten K_M berechnet. Damit ergeben sich folgende Gleichungen für die mittleren Auf-

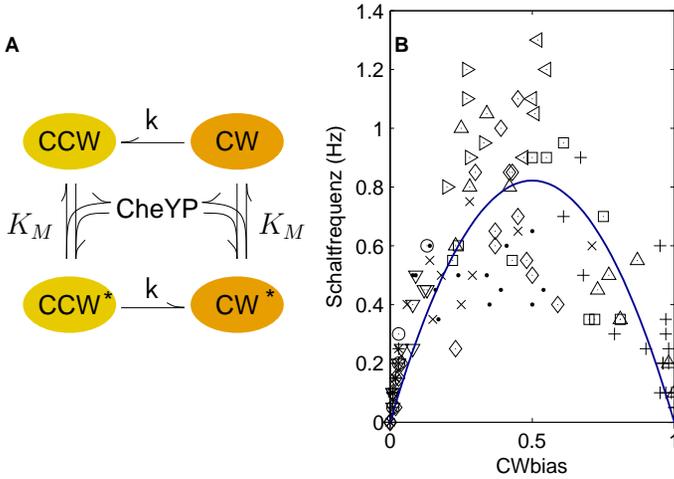


Abb. 4.4: A: Vier-Zustandsmodell des Schaltverhaltens von E. coli. B: Messungen (Symbole) und Modellverhalten (durchgezogene Linie) der Schaltfrequenz f gegen den zeitlichen Anteil der Drehrichtung im Uhrzeigersinn $CWbias$.

enthaltensdauern τ_{CW} und τ_{CCW} in beiden Schwimmphasen:

$$\tau_{CW} = \frac{1}{k} \left(1 + \frac{[CheYP]}{K_M} \right) \quad (4.8)$$

$$\tau_{CCW} = \frac{1}{k} \left(1 + \frac{K_M}{[CheYP]} \right). \quad (4.9)$$

In Abb. 4.4 B ist die vom Modell beschriebene Charakteristik zwischen $CWbias$ und der Schaltfrequenz f angegeben. Sie zeigt den von den Messungen beschriebenen glockenförmigen Verlauf. Allerdings ergibt sich für dieses Modell nur ein Michaelis-Menten-förmiger Zusammenhang zwischen der CheYP-Konzentration und $CWbias$. Es kann also den gemessenen steilen, schalterförmigen Verlauf nicht korrekt wiedergeben:

$$CWbias = \frac{[CheYP]}{K_M + [CheYP]} \quad (4.10)$$

$$f = k \frac{[CheYP]K_M}{(K_M + [CheYP])^2}. \quad (4.11)$$

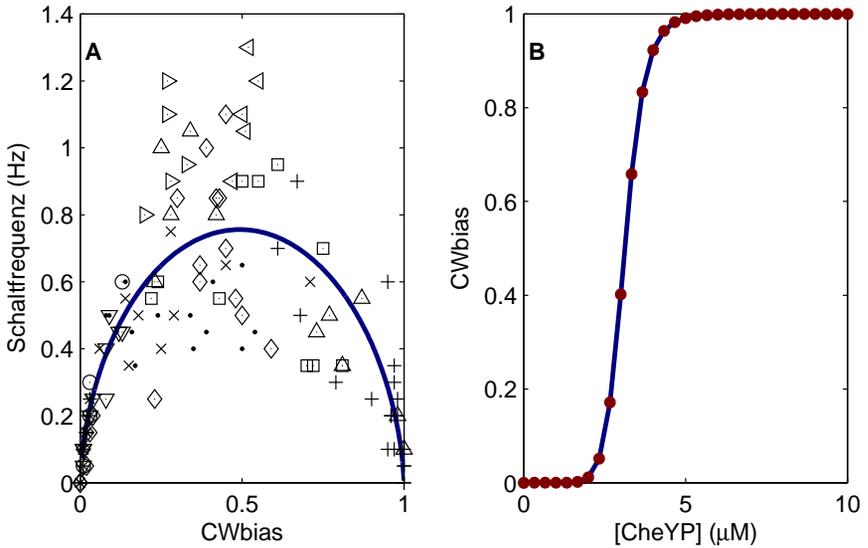


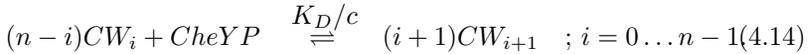
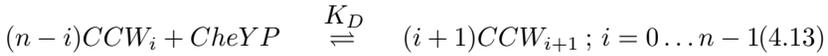
Abb. 4.5: Verhalten des MWC-Modells für $n = 30$, $K_0 = 10^9$, $K_D = 6,45 \mu\text{M}$, $c = 4,05$. Das Modell wurde um eine Geschwindigkeitskonstante $k = 3,2 \cdot 10^{-7} \frac{1}{\text{s}}$ für die Reaktionen $CW_i \rightleftharpoons CCW_i$ erweitert (siehe Gleichung (4.19)). A: Schaltfrequenz f in Abhängigkeit des CWbias; Modell (durchgezogene Linie); Messungen (Symbole) aus [MEOM98]. B: Der Belegungsgrad des Schaltkomplexes (durchgezogene Linie) folgt in guter Näherung einer Hill-Charakteristik mit $h = 10$ (gepunktete Linie).

4.1.3.3 Monod-Wyman-Changeaux MWC

Alon et al. [ACS⁺98] haben ein MWC-Modell [MWC65] für allosterische Enzyme an das Schaltverhalten von *E. coli* angepasst. Es besteht aus mehreren Untereinheiten, die den Flim-Proteinen im Schaltkomplex entsprechen und jeweils ein CheYP binden können. Alle Untereinheiten können synchron in einer der beiden Konformationen vorkommen: CCW und CW. Der Schaltkomplex kann zwar bei jedem Belegungsgrad von einer Drehrichtung in die andere umschalten, die Umschaltwahrscheinlichkeit ist aber vom Belegungsgrad abhängig. Je mehr CheYP-Moleküle am Komplex gebunden sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit für eine Drehung im Uhrzeigersinn (CW).

Das gesamte Modell wird quasistationär betrachtet und befindet sich zudem im thermischen Gleichgewicht. D.h. dass die Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Reaktion gleich groß ist wie seine Rückreaktion. Die Reaktionswahr-

scheinlichkeit berechnet sich aus der Wahrscheinlichkeit für den Ausgangszustand multipliziert mit der Übergangswahrscheinlichkeit in den Nachbarzustand. Durch diese Zwangsbedingung ergibt sich, dass das Modell mit nur 3 Parametern und der Anzahl der Untereinheiten n vollständig beschrieben ist. Ein Parameter wird für die Gleichgewichtskonstante K_0 der Umschaltreaktion zwischen beiden Konformationen im völlig unbelegten Zustand $i = 0$ benötigt. Ein weiterer Parameter für die Dissoziationskonstante K_D von CheYP im CCW-Zustand und der dritte Parameter für das Verhältnis c der Dissoziationskonstanten im CCW und CW Zustand. Damit ergibt sich folgendes Modell:



Wobei CW_i und CCW_i den Rotationszustand des Motors bei einem bestimmten Belegungsgrad i angeben. Aus diesem Reaktionsschema berechnen sich die einzelnen Zustände:

$$[CCW_i] = \frac{[CheYP]}{K_D} \frac{n-i+1}{i} [CCW_{i-1}] \quad ; i = 1 \dots n \quad (4.15)$$

$$= \left(\frac{[CheYP]}{K_D} \right)^i \binom{n}{i} \frac{[CCW_0]}{K_0} \quad (4.16)$$

$$[CW_i] = \left(\frac{[CheYP] \cdot c}{K_D} \right)^i \binom{n}{i} \frac{[CW_0]}{K_0}. \quad (4.17)$$

Aus (4.16) und (4.17) ergibt sich, dass die Gleichgewichtskonstante K_i zwischen den beiden Rotationsrichtungen des i -fach belegten Komplexes exponentiell von i abhängt:

$$K_i = \frac{[CCW_i]}{[CW_i]} = K_0 c^i. \quad (4.18)$$

Der Unterschied in den Dissoziationskonstanten beider Rotationsrichtungen ist die 'treibende Kraft' dafür, dass das MWC-Modell einen sigmoiden Verlauf von CW_{bias} gegen die CheYP-Konzentration zeigt (siehe Abb. 4.5 B). Je größer dieser Unterschied ist und je mehr Untereinheiten n der Komplex besitzt, desto steiler wird dieser Verlauf.

Dadurch dass der Übergang zwischen beiden Rotationsrichtungen im Modell nur durch die Gleichgewichtskonstante K_i formuliert ist, kann das Modell

in dieser Form keine Schaltfrequenz beschreiben. Deshalb soll die Gleichgewichtsreaktion zwischen CW und CCW im Folgenden in symmetrischer Art und Weise um eine Hin- und Rückreaktion erweitert werden:



Trotz dieser neuen Definition behalten die übrigen Gleichungen, insbesondere (4.18), ihre Gültigkeit. Nun lassen sich auch die mittleren Verweildauern jeder Rotationsrichtung berechnen, aus denen sich dann mittels (4.1) und (4.2) die Schaltfrequenz und $CWbias$ ergeben:

$$\tau_{CW} = \frac{\sum_{i=0}^n [CW_i]}{\sum_{i=0}^n [CW_i] \cdot k \cdot c^{i/2}} \quad (4.20)$$

$$\tau_{CCW} = \frac{\sum_{i=0}^n [CCW_i]}{\sum_{i=0}^n [CCW_i] \cdot k \cdot K_0 \cdot c^{-i/2}}. \quad (4.21)$$

In Abb. 4.5 A sieht man, dass auch der Verlauf von Schaltfrequenz und $CWbias$ von dem MWC-Modell gut beschrieben werden kann.

4.1.3.4 Conformational Spread Modell

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modellen definiert das Modell von Duke, Nevère und Bray [DNB01] nicht das Verhalten des Gesamtkomplexes, sondern die Eigenschaften der einzelnen FliM-Proteine, aus denen der Schaltkomplex des Motors aufgebaut ist. Jedes FliM (M) kann je nach Konformation entweder eine CW- oder CCW Drehung (M^+ , M^-) bewirken. Außerdem kann CheYP an FliM binden. Das mit CheYP gebundene Protein (MY) bevorzugt die CW-Richtung, was in Abb. 4.6 durch eine geringere freie Energie dargestellt ist. Dagegen ist beim ungebundenen Protein (M) die CCW-Richtung wahrscheinlicher. Aus den freien Energieniveaus der Zustände lassen sich die Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen berechnen.

Das Modell geht davon aus, dass 34 FliM-Proteine ringförmig in einem Schaltkomplex angeordnet sind. Der Zustand jeder Untereinheit hat dabei einen Einfluss auf seine Nachbarproteine. Jede Untereinheit besitzt eine um E_J niedrigere freie Energie, wenn ein Nachbarprotein dieselbe Drehrichtung besitzt und eine um E_J höhere Energie bei entgegengesetzter Drehrichtung. Dieser Beitrag kann also entweder $-2E_J$, 0 oder $+2E_J$ sein, je nachdem ob beide, nur einer oder keiner der Nachbarn die gleiche Drehrichtung besitzt. Abhängig von dem gesamten Energiezustand einer Untereinheit, der sich aus den vier oben beschriebenen Zuständen zusammen mit dem Einfluss

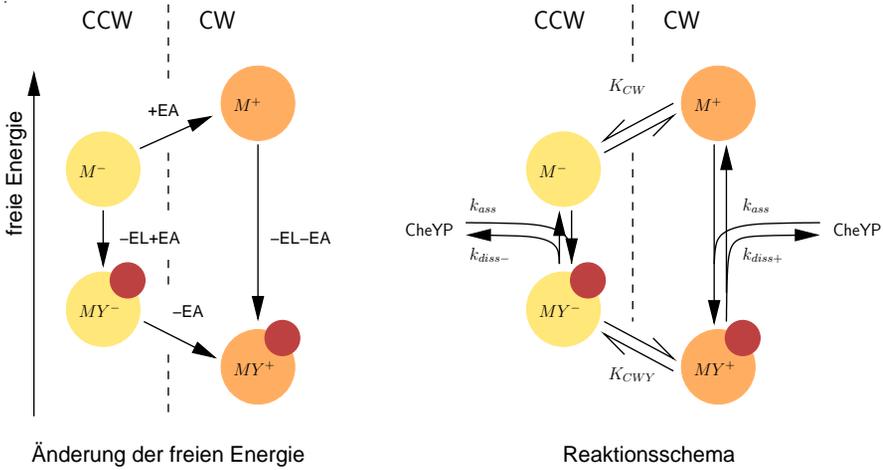


Abb. 4.6: Conformational Spread Modell. Freie Energie einer Untereinheit (M) und Reaktionsschema der vier Zustände. Hinzu kommt noch der Einfluss der Nachbarn auf die freie Energie der betrachteten Untereinheit (siehe Text).

der Nachbarproteine ergibt, entscheidet sich zufällig, welchen Drehsinn diese Einheit annimmt. Ist die kooperative Kopplung E_J groß genug, zeigt der gesamte Komplex mehrheitlich in eine einheitliche Drehrichtung. Bildet sich im Ring zufällig ein Bereich aus, der in die entgegengesetzte Richtung zeigt, so besteht eine gewisse Chance, dass sich dieser Bereich ausweitet und schließlich der gesamte Ring die Drehrichtung wechselt. Wegen dieser konformativen Ausbreitung wurde das Modell 'Conformational Spread' genannt.

Stochastische Simulationen haben gezeigt, dass das Modell ebenfalls einen scharfen, sigmoiden Verlauf von $CWbias$ in Abhängigkeit des Schaltsignals beschreibt und auch die Schaltfrequenz richtig wiedergibt. Ob dieses Modell oder das vorher beschriebene MWC-Modell die Wirklichkeit besser beschreibt, kann daher bislang nicht entschieden werden.

4.2 Modelle aus der Literatur für *Halobacterium salinarum*

Keines der im vorigen Kapitel beschriebenen Modelle von *E. coli* kann auf das Schaltverhalten von Halobakterien angewendet werden, weil sich beide Organismen in diesem Punkt zu stark unterscheiden. Für *Halobacterium salinarum* sind jedoch ebenfalls bereits einige Modelle aus der Literatur bekannt, welche im Folgenden kurz vorgestellt und diskutiert werden sollen.

4.2.1 Modell von Schimz und Hildebrand

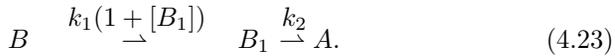
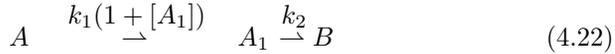
Die Form der Häufigkeitsverteilung von spontanen Umkehrereignissen (Abb. 4.1) unterscheidet sich gravierend von einer einfachen exponentiellen Verteilung wie man sie von einem einzelnen, stochastisch vorkommenden Reaktionsschritt erwarten würde. Aufgrund dieser Beobachtung haben Schimz und Hildebrand die Hypothese aufgestellt, dass der Umschaltprozess von einem intrazellulären Oszillator kontrolliert werden müsse [SH85]. Sie gehen davon aus, dass die Konzentration einer Substanz X in der Zelle eine sägezahnähnliche Schwingung ausführt. Direkt nach einem Umschaltereignis sinkt die Konzentration für ca. $2s$ ab und steigt dann nach ca. $4s$ wieder langsam an. Schließlich erfolgt bei Erreichen eines Schwellwertes eine erneute Richtungs-umkehr des Flagellarmotors und eine neue Periode der Oszillation beginnt.

Als ein weiteres Indiz für die Oszillator-Hypothese führten sie Experimente mit Lockreizen an, bei denen der Zeitpunkt der Stimulation relativ zum vorigen spontanen Umschaltereignis um eine Zeit t_d verzögert wurde [HS85]. Dabei stieg die mittlere Intervalldauer innerhalb der ersten $2s$ mit größer werdender Verzögerung t_d an. Für $t_d > 2s$ wird die mittlere Intervalldauer wieder kleiner. Das bedeutet, dass sich die Effektivität des Lockreizes während des gesamten Schaltprozesses ändert. Laut Schimz und Hildebrand ist das auch in ihrem Oszillator-Modell der Fall. Ein Lockreiz hat hier eine Verringerung der Konzentration von X zur Folge und wäre deshalb dann am effektivsten, wenn er während des Tiefpunkts der Schwingung bei $t_d = 2s$ appliziert werden würde.

Allerdings haben Schimz und Hildebrand ihr Modell nicht mathematisch formuliert und deshalb auch keine Simulationen durchgeführt. Sie haben alle Argumentationen lediglich zeichnerisch anhand eines angenommenen Konzentrationsverlaufs von X dargestellt.

4.2.2 Modell von Marwan und Oesterhelt

Das Schaltermodell von Marwan und Oesterhelt [MO87] beschreibt den Schaltvorgang als eine irreversible, autokatalytische Reaktion. Das Reaktionsschema sieht folgendermaßen aus:



Eine Komponente A reagiert zu A_1 und dieses Produkt A_1 hat einen positiven Effekt auf seine eigene Bildung. A und A_1 sind Zustände einer Drehrichtung. Die eigentliche Richtungsumschaltung erfolgt in einem Reaktionsschritt erster Ordnung, dessen Produkt mit B bezeichnet wird. In dieser Drehrichtung läuft die Reaktion $B \rightarrow B_1$ und schließlich die erneute Richtungsumkehr $B_1 \rightarrow A$ analog zur vorigen Richtung ab. Deshalb werden im Folgenden exemplarisch nur noch die Übergänge $A \rightarrow A_1 \rightarrow B$ betrachtet.

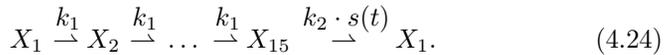
Der Übergang von A zu A_1 kann als konformative Änderung von einzelnen Untereinheiten des Schaltkomplexes betrachtet werden [PLC94]. So könnte man A_1 z.B. als Belegungsgrad des Schaltkomplexes mit dem Schaltsignal CheYP auffassen. Damit würde nicht etwa eine Konzentration eines Stoffes in der Zelle oszillieren, wie im Modell von Schimz und Hildebrand, sondern nur der Belegungsgrad des Schaltkomplexes bei einer konstanten Konzentration des Schaltsignals. Direkt nach dem Umschalten der Drehrichtung befindet sich der Motor in dem unbesetzten Zustand A . Danach binden langsam die ersten Moleküle des Schaltsignals an die Untereinheiten, wodurch sich A_1 erhöht. Durch eine kooperative Kopplung haben die mit dem Schaltsignal gebundenen Untereinheiten eine positive Wirkung auf die Geschwindigkeit weiterer Bindungsreaktionen. Während dieses Prozesses steigt die Wahrscheinlichkeit für eine Drehrichtungsumschaltung steil an, bis der kooperative Prozess abgeschlossen ist. Danach besitzt der Motor eine konstante Wahrscheinlichkeit für eine Richtungsumkehr. Dieser Verlauf der Umschaltwahrscheinlichkeit entspricht dem gemessenen Verlauf im spontanen Fall, wodurch das Modell auch eine sehr gute Übereinstimmung mit der spontanen Häufigkeitsverteilung von Umschaltereignissen aufweist.

Dieses Modell wurde allerdings weder im positiv noch negativ stimulierten Fall betrachtet. Geht man von einer erhöhten Schaltsignalkonzentration im negativ stimulierten Fall aus, so läuft der autokatalytische Prozess $A \rightarrow A_1$ sehr viel schneller ab als im spontanen Fall. Im Extremfall befindet sich der Schaltkomplex nahezu sofort im Zustand A_1 . Dann läuft die eigentliche Richtungsumschaltung aber mit der gleichen konstanten Geschwindigkeit k_2 wie

im spontanen Fall ab. Damit weist die simulierte Häufigkeitsverteilung im Vergleich zu den Messergebnissen (vergleiche Abb. 4.1) einen zu langsamen exponentiellen Abfall auf. Dieses Modell kann also nur eine Beschreibung des adaptierten Verhaltens leisten.

4.2.3 Modell von Naber

Das von Naber [Nab97] vorgeschlagene Modell beschreibt den Schaltvorgang als eine Kette von 15 Folgereaktionen, von denen die ersten 14 Reaktionen mit einer konstanten Reaktionsgeschwindigkeit k_1 ablaufen. Nur der letzte Schritt ist schließlich von einem Schaltsignal $s(t)$ abhängig:



Die Richtungsumkehr des Motors wird dem Übergang $X_{15} \rightarrow X_1$ zugeordnet. Aus Symmetriegründen wird in diesem Modell nur eine Schwimmphase betrachtet. Die Zustände X_i beschreiben die Wahrscheinlichkeit, dass der Motor sich im Zustand i befindet. Direkt nach dem Umschalten ist die Wahrscheinlichkeit für den Zustand $X_1 = 1$.

Die Parameter wurden so gewählt, dass die ersten 15 Schritte insgesamt eine mittlere Dauer von 6,2s benötigen. Sie sorgen dafür, dass die Häufigkeitsverteilung von spontanen Schaltereignissen dem beobachteten flachen Verlauf bei sehr kurzen Schwimmphasen und den darauf folgenden steilen Anstieg folgen (vergleiche Abb. 4.1). Der letzte Schritt sorgt im spontanen Fall für das exponentielle Abklingen der Häufigkeitsverteilung mit einer Zeitkonstanten von 7,1s. Damit wird die spontane Häufigkeitsverteilung gut beschrieben.

Das Stimulus-induzierte Verhalten des Modells stimmt allerdings weniger genau mit den Messungen überein. Dadurch, dass die ersten Reaktionsschritte eine konstante Durchlaufgeschwindigkeit aufweisen, ist die Antwort auf ein Schrecksignal während der ersten 6s sehr stark vom Zeitpunkt der Stimulation abhängig. Wird der Stimulus frühzeitig gegeben, ist sein Effekt jedoch erst nach einigen Sekunden zu beobachten, während der Effekt bei einer späteren Stimulation immer weniger verzögert wird. Messungen zeigen jedoch, dass die Zellen bereits 2s nach einer spontanen Umkehrreaktion viel schneller auf ein Schrecksignal reagieren als durch das Modell beschrieben wird.

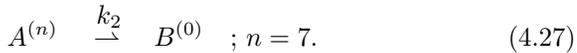
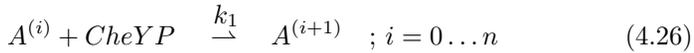
Auch das Verhalten bei Stimulation innerhalb der ersten 2s nach einem spontanen Schalten, bei der einige Zellen noch verzögert (refraktär) auf den Stimulus reagieren, kann nur durch eine sehr konstruierte Annahme beschrieben werden. In diesem Fall weist die Häufigkeitsverteilung von aufeinanderfolgenden Schaltreaktionen eine abklingende Periodizität auf (siehe S. 74 und Kap.

5.1.3). Die Ursache für die auftretende gedämpfte Schwingung hat Naber der Signalerzeugung zugeschrieben, indem er folgenden, schwer zu motivierenden, Verlauf des Schaltsignals voraussetzt [Nab97]:

$$s_r(t) = \max\{\epsilon; 1 + \mu \sin(2\pi t/T)e^{-k_a t}\}. \quad (4.25)$$

4.2.4 Modell von Nutsch, Marwan, Oesterhelt und Gilles

Während meiner eigenen Arbeit ist in Zusammenarbeit mit Herrn Professor Marwan, Herrn Professor Oesterhelt und Herrn Professor Gilles ein weiteres Modell des Schaltverhaltens entstanden [NMOG03, Modell c]. Es sieht strukturell ähnlich aus wie das oben beschriebene Modell von Naber und besteht aus einer Kette von Folgereaktionen. Im Unterschied zu diesem Modell sind hier jedoch die ersten Reaktionsschritte vom Schaltsignal CheYP abhängig, während der letzte Schritt, der die Richtungsumkehr bewirkt, mit konstanter Geschwindigkeit abläuft:



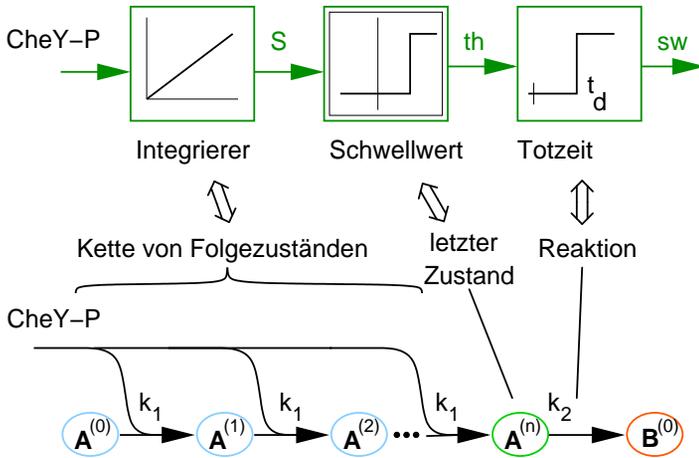
Aus Symmetriegründen wird hier ebenfalls nur eine Schwimmphase betrachtet.

Ähnlich wie die vorigen Modelle beschreibt auch dieses Modell das spontane Schaltverhalten sehr gut. In diesem Fall ist das Modell bis auf die Anzahl der Schritte fast identisch mit dem Modell von Naber. Die ersten 7 Schritte werden im Mittel in 3,7s durchlaufen, bevor der Schaltschritt in einer Reaktion erster Ordnung mit einer mittleren Dauer von 7,2s folgt.

Die besondere Stärke dieses Modells liegt in der Beschreibung von Experimenten mit Blaulicht Einzel- und Doppelpulsen [MO87] (siehe S. 76). Die experimentell bestimmten mittleren Reaktionszeiten auf unterschiedliche Stimulationen werden genau wiedergegeben. Allerdings muss dafür angenommen werden, dass bei Schreckstimulation die Schaltreaktion k_2 um ein Vielfaches schneller abläuft als im spontanen Fall.

Die ersten 7 Reaktionsschritte stellen einen Poisson-Prozess in Abhängigkeit des Schaltsignals CheYP dar (vergleiche Kap. 2.3.3). Da der Erwartungswert eines Poisson-Prozesses $EW(p_i(\lambda)) = \lambda$ ist, und in diesem Fall $\lambda = k_1 \cdot [CheYP] \cdot t$ ist, wirken die ersten Reaktionsschritte des Modells als Integrierer für das Schaltsignal CheYP. D.h. die ersten $n = 7$ Reaktionsschritte werden im Mittel in der Zeit $t = \frac{n}{k_1[CheYP]}$ durchlaufen. Das gemittelte

Signalorientiertes Modell mit Funktionsblöcken



Molekular orientiertes Modell

Abb. 4.7: Vergleich des molekular orientierten Schaltermodells mit dem vereinfachten signalorientierten Modell, das lediglich das mittlere Verhalten beschreibt [NMOG03, Modell c und b].

Verhalten kann entsprechend durch eine Integration von $k_1 \cdot [CheYP]$ über die Zeit beschrieben werden, bis der Schwellwert n erreicht ist (vergleiche Abb. 4.7). Der Schwellwert wird im Modell (4.26), (4.27) durch das Erreichen des Zustandes $A^{(n)}$ repräsentiert. Danach findet eine Reaktion erster Ordnung statt, die das Umschalten der Drehrichtung bewirkt. Im Mittel kann dieses Verhalten durch ein Totzeitglied beschrieben werden. In Abb. 4.7 ist die Beziehung zwischen dem signalorientierten Modell, das nur das mittlere Verhalten wiedergibt, und dem molekularen Modell (4.26), (4.27) dargestellt. Auch das signalorientierte Modell kann die mittlere Reaktion auf Blaulicht Einfach- und Doppelpulse beschreiben [NMOG03, Modell b].

Dieses Modell kann zwar die Mittelwerte der Reaktionszeiten bei Blaulicht-Stimulation korrekt wiedergeben, die entsprechenden Häufigkeitsverteilungen stimmen aber nicht mit den Messungen (Abb. 4.1) überein. Außerdem muss der Parameter k_2 für Blaulicht-induzierte Experimente angepasst werden.

4.2.5 Modell von McCain, Amici und Spudich

Ein weiteres Modell wurde von McCain et al. vorgeschlagen [MAS87]. Es besteht aus drei Funktionszuständen des Schaltkomplexes: 'Inactive', 'Nonreversing' und 'Reversing' (Abb. 4.8). Aus Symmetriegründen wird wiederum nur eine Schwimmphase betrachtet. Die drei Zustände werden in einer Vorzugsrichtung durchlaufen. Nach einem Umschaltvorgang befindet sich der Schaltkomplex im 'Inactive'-Zustand. Durch diesen Zustand wird berücksichtigt, dass der Schaltkomplex direkt nach einer Richtungsumkehr nicht auf ein Schaltsignal reagiert (Refraktivität). Im folgenden 'Nonreversing'-Zustand ist der Schaltkomplex für das Schaltsignal sensitiv und leitet den Umschaltprozess ('Reversing'-Zustand) je nach Stimulation früher oder später ein.

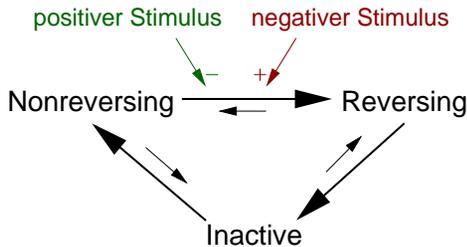


Abb. 4.8: Modell des halobakteriellen Schaltkomplexes mit drei Funktionszuständen nach McCain, Amici und Spudich [MAS87].

Dieses Modell berücksichtigt drei Funktionszustände des halobakteriellen Motors. Allerdings werden keine genauen Aussagen über die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den einzelnen Funktionszuständen gemacht, so dass es nicht möglich ist, Simulationen mit diesem Modell durchzuführen. Dadurch ist die Aussagekraft dieses Modelles sehr begrenzt, obwohl es die Grundzüge des Schaltprozesses richtig wiedergibt.

4.3 Herleitung eines neuen Modells

Kein bisher veröffentlichtes Modell des Schaltverhaltens von Halobakterien, das im vorigen Kapitel diskutiert wurde, beschreibt den Schaltprozess hinreichend genau. Deshalb wird in dem nun folgenden Kapitel ein neues Modell aufgestellt. Dabei werden zuerst die Funktionszustände des Prozesses ähnlich wie im Modell von McCain et al. bestimmt und dann in einem zweiten Schritt ein detailliertes Modell formuliert, um schließlich Simulationen durchführen zu können.

4.3.1 Funktionszustände des halobakteriellen Motors

Anhand von experimentellen Beobachtungen wird deutlich, dass der halobakterielle Flagellarmotor während des Schaltprozesses eine Kette von Zuständen durchläuft, die durch unterschiedliche Funktionen gekennzeichnet sind. Die einfachst mögliche Beobachtung ist, dass der Motor zwei Drehrichtungen besitzt, zwischen denen er hin- und herschaltet: Drehung im Uhrzeigersinn (clock-wise **CW**) und dagegen (counter-clock-wise **CCW**).

Zur Beschreibung beliebiger Prozesse mit verallgemeinerten Funktionszuständen eignen sich insbesondere Petri-Netze, die eine Beschreibung der Prozess-Struktur erlauben, ohne eine Aussage über die Kinetik der Übergänge machen zu müssen. Das zugehörige Petri-Netz der oben beschriebenen einfachst möglichen Motorbeschreibung ist in Abbildung 4.9 C gezeigt (Modell 1). Jeder Funktionszustand ist dabei einem 'Platz' zugeordnet und eine 'Marke' in einem Platz kennzeichnet den aktuellen Zustand des Systems. Petri-Netze erlauben eine beliebige Anzahl von Marken. In diesem Fall ist der Zustand des Motors aber nur durch eine einzige Marke gekennzeichnet, weil der Motor sich nicht gleichzeitig in die eine und die andere Richtung drehen kann. 'Kanten' verbinden die Plätze mit den 'Transitionen'. Wenn die Transitionen schalten, geht die Marke in Pfeilrichtung von dem aktuellen Platz zum nächsten über.

Im Folgenden werden diese Funktionszustände CW und CCW des Motors durch Analyse von experimentellen Beobachtungen noch detaillierter betrachtet und in weitere Funktionszustände unterteilt.

4.3.1.1 Stopp-Phase

Bei näherer Betrachtung des Schwimmverhaltens von Halobakterien fällt auf, dass die Zellen bei der Richtungsumkehr eine kurze Stopp-Phase durchlaufen. In Abbildung 4.9 B ist der Abstand einer Zelle zu ihrem Umkehrpunkt (Abstand 0) über die Zeit aufgetragen. Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Zelle auch noch nach Applikation des Schrecksignals einige Zeit mit gleicher Geschwindigkeit weiterschwimmt, dann für einige 100ms abrupt stehen bleibt und schließlich mit konstanter Geschwindigkeit in die entgegengesetzte Richtung weiterschwimmt. Die geringe Bewegung der Zelle während der Stopp-Phase ist auf Brown'sche Bewegung im Medium zurückzuführen und nicht etwa auf eine geringe Motorrotation [MAO91].

Petri-Netze bieten eine elegante Möglichkeit, das bestehende Prozessmodell konsistent durch genauere Betrachtungen zu erweitern, indem Plätze oder Transitionen durch detailliertere Teilnetze beschrieben werden können (Verfeinerung). In Abbildung 4.9 C werden die Transitionen T_{R12} und T_{R21}

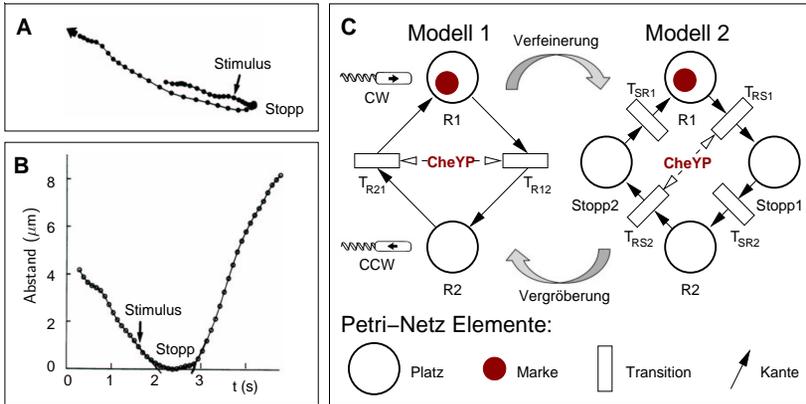


Abb. 4.9: A: Schwimmpfad einer Halobakterienzelle vor und nach Stimulation mit einem UV-Licht Puls (Schrecksignal). Der Pfad wurde mit einer computerbasierten Zellverfolgung mit einer Abtastzeit von 100ms aufgenommen (Daten aus [MAO91]). B: Aus (A) berechneter Abstand der Zelle vom Umkehrpunkt über der Zeit t . C: Einfache Petri-Netz-Modelle des Schaltverhaltens. Modell 2 ist durch Verfeinerung der Transitionen T_{R12} und T_{R21} aus Modell 1 entstanden und beinhaltet nun die in Teilbild B zu sehende Stopp-Phase.

von Modell 1 durch die Transitions-berandeten Teilnetze T_{RS1} (Transition Richtung1-Stopp), P_{Stopp1} und T_{SR2} (Tr. Stopp-Richtung2) bzw. T_{RS2} , P_{Stopp2} und T_{SR1} ersetzt, wodurch Modell 2 entsteht. Umgekehrt erlauben Petri-Netze auch eine 'Vergrößerung' von Modell 2 zu Modell 1.

4.3.1.2 Refraktär- und Kompetent-Phase

Durch zusätzliche experimentelle Untersuchungen ist es möglich, eine weitere Zerlegung der Schwimmphasen Richtung 1 und Richtung 2 durchzuführen. So belegen Experimente von Krohs [Kro95], dass sich direkt an eine Umschaltung der Motordrehrichtung eine Refraktär-Phase anschließt.

Refraktivität gibt es in vielen biologischen Sensorsystemen. Sie beschreibt das Phänomen, dass nachdem ein Organismus auf einen Reiz reagiert hat, er nicht mehr oder zumindest anders auf einen Folgereiz reagiert, bis er sich von dem vorigen Reiz wieder 'erholt' hat. Prinzipiell kann Refraktivität durch den Rezeptor, die Signal-Transduktion oder den Effektor hervorgerufen werden. Für

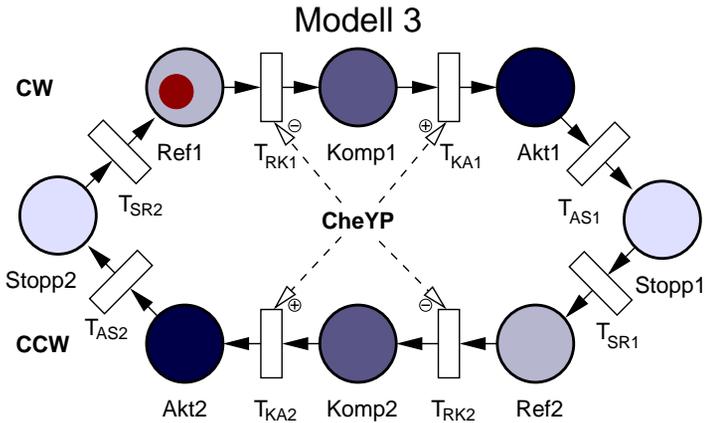


Abb. 4.10: Petri-Netz-Modell aller 8 Funktionszustände des halobakteriellen Schaltkomplexes bestehend aus: Stopp-, Refraktär-, Kompetent- und Aktiv- Phase für beide Schwimmrichtungen.

Halobakterien wurde jedoch gezeigt, dass es sich hier um eine Eigenschaft des Schaltkomplexes handelt [MAS87]. Außerdem wird hier die Refraktär-Phase durch eine Richtungsumkehr hervorgerufen, die nicht notwendigerweise durch ein Schrecksignal ausgelöst worden sein muss. Im Unterschied zur Dauer einer spontan durchlaufenen Refraktär-Phase, die ca 1 bis 2 Sekunden dauert, ist die Schreck-induzierte Refraktär-Phase jedoch deutlich länger.

Wird eine Zelle innerhalb dieser Refraktär-Phase durch ein Schrecksignal gereizt, so zeigt sie eine Antwort, dessen Mittelwert der spontanen Reaktion ähnlich ist, aber eine deutlich andere Häufigkeitsverteilung der Umschaltzeitpunkte aufweist. Das belegt, dass der Reiz empfangen wurde, aber der Motor anders darauf reagiert.

Die Schwimmphasen Richtung 1 und Richtung 2 ($R1$ und $R2$) müssen also jeweils in eine Refraktär- ($Ref1$ und $Ref2$) und eine Kompetent-Phase ($Komp1$ und $Komp2$) unterteilt werden. Direkt nach der Stopp-Phase geht der Schaltkomplex nun in die Refraktär-Phase über, bevor er in der Kompetent-Phase wieder 'kompetent' ist, um erneut verzögerungsfrei auf einen Schreckreiz reagieren zu können (siehe Abb. 4.10). Die Länge der Refraktärzeit beträgt, wie oben beschrieben, im adaptierten Fall 1-2s, während sie bei Schreckstimulation deutlich länger ist. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 4.10 durch ein Minuszeichen am Pfeil von CheYP zur Transition T_{RK} (Transition Refraktär-Kompetent) angedeutet.

4.3.1.3 Aktiv-Phase

Durch Auswertung von Experimenten mit Einfach- und Doppelpulsen [MO87] wird deutlich, dass ein weiterer Funktionszustand des Motors existieren muss. Bei den Experimenten wurden kurze Blaulicht-Pulse variabler Länge und Intensität ca. 2s nach dem spontanen Schalten einer Zelle appliziert. Schließlich wurde der Mittelwert der Reaktionszeit t_R gemessen, zu der die Zelle ihre Schwimmrichtung umgekehrt hat (Abb. 4.11). Marwan und Oesterhelt konnten alle Messergebnisse mittels einer empirisch gewonnenen Formel beschreiben:

$$t_R = t_{min} + \frac{b}{I(\tau_1 + \tau_2)} + D \frac{\tau_2}{(\tau_1 + \tau_2)} \quad ; \tau_1 + D + \tau_2 > t_R - t_{min}. \quad (4.28)$$

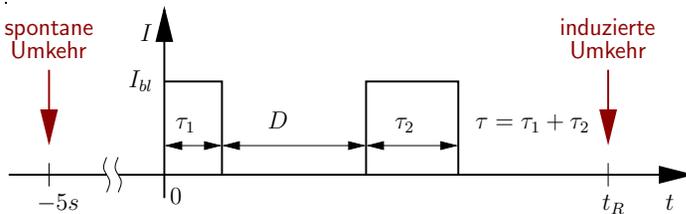


Abb. 4.11: *Stimulationsprogramm für Einfach- und Doppelpuls-Experimente mit blauem Licht [MO87].*

Wobei τ_1 und τ_2 die Längen des 1. und des 2. Pulses sind, die durch die Dunkelphase D getrennt werden; b ist eine Konstante und t_{min} ist die minimale Reaktionszeit, die auch nicht durch einen noch so starken Stimulus weiter verringert werden kann. Die Formel (4.28) entspricht der Vorstellung, dass die Wirkung der applizierten Lichtmenge des 1. und des 2. Pulses über die Zeit integriert wird, bis eine bestimmte Schwelle erreicht ist. Der tatsächliche Umkehrzeitpunkt ist dann noch um t_{min} verzögert. Die Dauer der Pulse τ_1 und τ_2 wurden für die Herleitung der Gleichung vernachlässigt. In (5.4) (S. 95) ist die exakte Gleichung angegeben.

Der verantwortliche Prozess für t_{min} (ungefähr 1s) könnte zum einen ein Sättigungseffekt in den Reaktionen sein, die zum Schaltsignal CheYP führen. Zum anderen wäre auch ein stimulusunabhängiger Vorgang im Schaltkomplex möglich. Das folgende Argument spricht gegen einen Sättigungseffekt: Die mittlere Reaktionszeit t_R ist proportional zum Kehrwert der gesamten Lichtmenge $I(\tau_1 + \tau_2)$ und proportional zur Dunkelzeit D zwischen den zwei

Pulsen. Das bedeutet, dass der zweite Puls noch genauso effektiv ist wie der erste, wenn man berücksichtigt, dass er mit der Verzögerung von D appliziert wurde. Dieser lineare Zusammenhang widerspricht nichtlinearen Sättigungseffekten in der Signaltransduktionskette. Wenn nämlich schon der erste Puls die Signalkette in den nichtlinearen Sättigungsbereich treiben würde, hätte der zweite Puls nur noch einen geringeren Effekt und die Proportionalität zu D und $\tau_2/(\tau_1 + \tau_2)$ ginge verloren. Simulationsergebnisse eines Modells mit einem hypothetisch angenommenen Sättigungseffekt in der Signalbildung sind in [NMOG03] veröffentlicht.

Zusätzlich machen folgende Überlegungen einen geschwindigkeitslimitierenden Prozess in der Signalkette unwahrscheinlich: Die Signaltransduktion scheint in *E. coli* und in Archaeen ähnlich zu sein [SMO04]. Experimente in *E. coli* haben aber gezeigt, dass die Bildung des Schaltsignals im Bereich von 10-30ms liegen muss [LMCL99], und ist somit um einen Faktor von 30-100 mal zu schnell um t_{min} zu erklären.

Aus diesen Überlegungen wird im Folgenden angenommen, dass der geschwindigkeitslimitierende Prozess, der für t_{min} verantwortlich ist, ein stimulusunabhängiger Prozess im Schaltkomplex sein muss. Dieser Prozess wird durch die Kompetent-Phase angestoßen und aktiviert den Schaltvorgang. Deshalb wird er Aktiv-Phase genannt. In Abb. 4.10 sind alle Funktionszustände des halobakteriellen Flagellarmotors dargestellt.

4.3.2 Eigenschaften des vollständigen Petri-Netz-Modells

Das vollständige Petri-Netz aller Funktionszustände (Abb. 4.10) hat folgende Eigenschaften: Direkt nach dem kurzen Stopp während *Stopp2* dreht sich der Motor während *Ref1* im Uhrzeigersinn, kann aber noch nicht wieder verzögerungsfrei auf ein Schrecksignal reagieren. Die Zeit, die der Motor in der Refraktär-Phase verbringt, wird durch eine erhöhte CheYP-Konzentration verlängert und durch eine niedrigere Konzentration verkürzt. Dagegen hat CheYP genau den entgegengesetzten Effekt auf die nachfolgende Kompetent-Phase *Komp1*, indem es den Übergang in die Aktiv-Phase *Akt1* beschleunigt. Die Aktiv-Phase und die nachfolgende Stopp-Phase werden nicht durch das Schaltsignal beeinflusst, sondern benötigen im Mittel immer gleich lang. Eventuell könnte die Dauer der beiden Phasen jedoch von der Temperatur oder dem Zellalter abhängen. Im Anschluss werden alle Phasen in gleicher Weise in der entgegengesetzten Schwimmrichtung durchlaufen.

Symmetrie:

Der völlig symmetrische Aufbau des Modells ist auf folgende experimentelle Beobachtungen gestützt:

- Ohne Stimulation ist die Schwimmdauer in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung sowohl im Mittel [HS85], als auch in ihrer Häufigkeitsverteilung gleich [MAO91].
- Die Schwimmdauer eines Intervalls hängt nicht von der Schwimmdauer des vorigen Intervalls ab [MAS87, SH85].
- Eine Stimulation der Zellen ist während beider Schwimmrichtungen gleich effektiv [SH85].

Kreisprozess:

Eine weitere Eigenschaft des Schaltprozesses und auch des Modells ist, dass es sich um einen thermodynamischen Kreisprozess handelt, weil er immer in derselben Richtung durchlaufen wird. Experimentell kann diese Irreversibilität schon daran gesehen werden, dass Wildtyp-Zellen, die stoppen, in der Folge immer in der entgegengesetzten Richtung weiterschwimmen. Wäre der Prozess im thermischen Gleichgewicht, so gäbe es keine Vorzugsrichtung. Die Wahrscheinlichkeit, dass der Motor in einer Richtung dreht, dann stoppt und wieder in die gleiche Richtung weiterdreht, wäre dann gleich groß wie eine Richtungsumkehr nach dem Stopp.

Damit dieser Kreisprozess in einer Vorzugsrichtung ablaufen kann, benötigt er mindestens einen energieverbrauchenden Reaktionsschritt. An welcher Stelle und wodurch der Prozess mit Energie versorgt wird, kann durch diese Arbeit nicht geklärt werden. Möglich wäre z.B., dass mechanische Energie aus der Drehung des Motors verwendet wird, oder dass chemische Energie aus der Dephosphorylierung (Hydrolysierung) von CheYP am Schaltkomplex genutzt wird. Die Energiegewinnung durch Hydrolysierung von CheYP stellt insofern eine elegante Möglichkeit dar, weil unphosphoryliertes CheY nicht so gut an den Schaltkomplex bindet wie phosphoryliertes. Damit könnte die Hydrolysierung von CheYP während der Refraktär-Phasen einerseits die nötige Energie für den Kreisprozess liefern und andererseits auch die Dissoziation von CheY während dieser Phasen erklären. Außerdem wurde in *Bacillus subtilis* ein Motorprotein identifiziert (FliY), das CheYP dephosphorylieren kann [SMO04].

Deshalb wird im Folgenden davon ausgegangen, dass phosphoryliertes CheYP an den Schaltkomplex bindet, dort besonders während der Refraktär-Phasen hydrolysiert wird und als CheY dissoziiert.

4.3.3 Abschätzung der Anzahl nötiger Teilschritte

Das Petri-Netz-Modell 3 (Abb. 4.10) macht bisher keine Aussage über die Kinetik des Schaltvorgangs von einem Funktionszustand zum nächsten. Würde

man jede Transition durch eine Reaktion erster Ordnung ersetzen, könnte man allerdings weder die spontane noch die lichtinduzierte Häufigkeitsverteilung der Schwimmphasen beschreiben. Die spontane Häufigkeitsverteilung ist direkt nach dem letzten Umschalten Null und beginnt mit einer horizontalen Tangente. Nach 2-3s steigt sie an, erreicht bei ca. 10s ihr Maximum und fällt dann näherungsweise exponentiell ab (Abb. 4.1). Eine solche 'Poisson-ähnliche' Form kann nur mit mehreren Teilschritten erreicht werden. Je steiler und ausgeprägter der Wellenberg ist, desto mehr geschwindigkeitsbestimmende Teilschritte bestimmen den Prozess (siehe Kap. 2.3.3).

Im nächsten Schritt soll die nötige Anzahl geschwindigkeitsbestimmender Prozess-Schritte für jeden Funktionszustand abgeschätzt werden. Dazu benötigt man die Häufigkeitsverteilung der Dauer eines jeden Teilschritts, die aber leider nicht immer direkt messtechnisch zugänglich ist.

4.3.3.1 Stopp-Phase

Die Dauer der Stopp-Phase lässt sich als einziger Funktionszustand des Motors direkt im Mikroskop beobachten. Eine Auswertung von Messungen der Stopp-Dauer ist in Abb. 4.12 zu sehen [MAO91]. Näherungsweise folgt die Häufigkeitsverteilung einer Geraden, was wegen der halblogarithmischen Darstellung einer Exponentialfunktion entspricht. Die Stopp-Phase lässt sich demnach am besten mit einem einzigen Reaktionsschritt beschreiben.

4.3.3.2 Kompetent-Phase

Im nächsten Schritt soll die Kompetent-Phase näher untersucht werden. Die Häufigkeitsverteilung ihrer Dauer lässt sich allerdings nicht direkt beobachten. Im adaptierten Fall ist diese Phase aber mit einem Mittelwert von ca. 10s viel länger als die Refraktär-Phase ($\approx 1s$) oder die Aktiv-Phase ($\approx 1s$) und hat somit auf die Form der spontanen Häufigkeitsverteilung den größten Einfluss.

Für eine erste Abschätzung der Anzahl der beteiligten Teilschritte soll ein kinetisches Modell mit vereinfachten Annahmen betrachtet werden (Abb. 4.13). Dafür wird die Refraktär-Phase zunächst vernachlässigt und die Kompetent-Phase durch n_a irreversible Assoziationsschritte von CheYP beschrieben. Es wird angenommen, dass am Anfang des Prozesses alle n_a Bindungsstellen frei sind und dann parallel sowie unabhängig voneinander besetzt werden können. Das bedeutet, dass die erste Bindungsstelle effektiv mit der n_a -fachen Geschwindigkeitskonstanten k_a besetzt wird und mit jeder weiteren Bindungsreaktion i die effektive Geschwindigkeit entsprechend abnimmt: $(n_a - i)k_a$ (siehe Kap. 2.3.2).

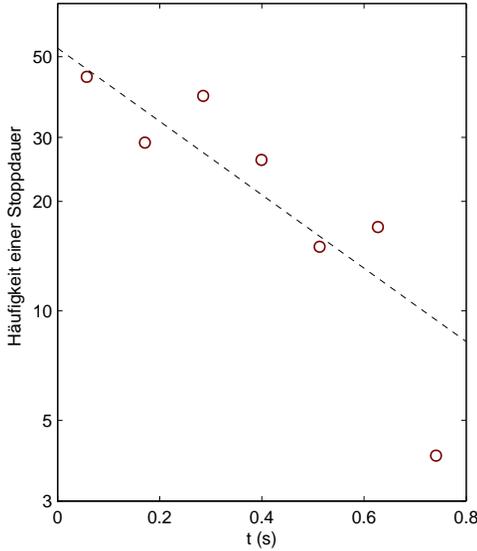


Abb. 4.12: Kreise: Messungen der Häufigkeitsverteilung der Dauer von Stopp-Phasen. Die Daten stammen aus [MAO91]. Gestrichelte Linie: Beste Anpassung einer exponentiellen Funktion auf die experimentellen Daten (Zeitkonstante: $\tau = 0.43s$)

Für eine unterschiedliche Anzahl von Teilschritten n_a wird die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_a auf die gemessene spontane Häufigkeitsverteilung optimiert. Wegen ihrer kurzen Dauer fällt die Aktiv-Phase bei dieser Verteilung nicht ins Gewicht und wird deshalb nur mit einem einzigen Teilschritt modelliert, der eine mittlere Dauer von $t_{min} = 0,95s$ benötigt. Die Simulationsergebnisse sind in Abb. 4.14 dargestellt. Man sieht deutlich, dass mit steigender Anzahl der Teilschritte die simulierte Wahrscheinlichkeitsdichte einen steileren Wellenberg aufweist und gleichzeitig der Anfang der Kurve immer flacher wird. Das Optimum ist mit $n_a = 10$ Teilschritten und $k_a = 0,27s^{-1}$ erreicht.

4.3.3.3 Aktiv-Phase

In einem zweiten Schritt soll unter Beibehaltung der Ergebnisse für die Kompetent-Phase die Aktiv-Phase anhand der Verteilung von Schrecksignal-

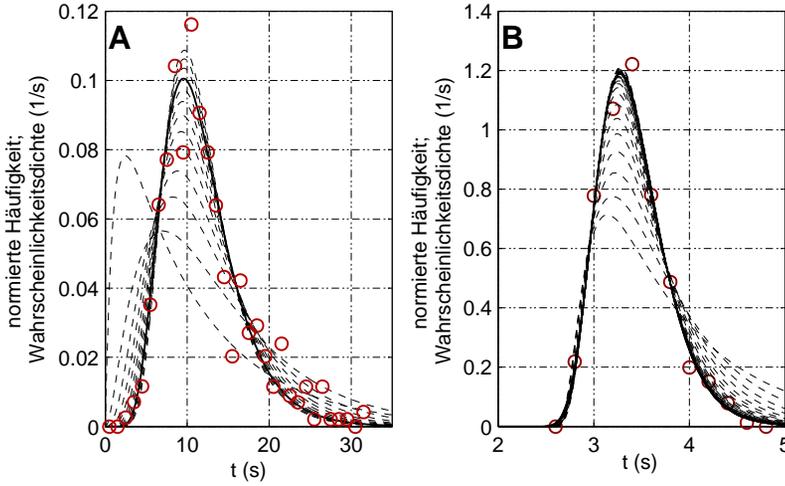


Abb. 4.14: Kreise: gemessene Häufigkeitsverteilung der Intervalldauer im spontanen (A) und im lichtinduzierten Fall (B) (UV-Licht Sprung bei $t = 2s$). Gestrichelte Linien: Simulationen von Modell 4 mit auf die Messung optimierten Parametern (siehe Text) für eine unterschiedliche Anzahl von Teilschritten n_a (A) und n_s (B). Durchgezogene Linien: bester Fit für $n_a = 10$ und $n_s = 44$ parallele Teilschritte.

induzierten Schaltvorgängen untersucht werden. Dazu wird die Anzahl benötigter parallel ablaufender Teilschritte für den Aktiv-Prozess zwischen $n_s = 1 \dots 50$ variiert. Zudem wird angenommen, dass nach Stimulation bei $t = 2s$ die intrazelluläre CheYP-Konzentration erst nach einer Verzögerung t_d auf einen erhöhten Wert springt. Für jede Anzahl von Teilschritten n_s wurden sowohl die Sprunghöhe des Schaltsignals CheYP als auch die Verzögerung des Schaltsignals t_d auf die Messdaten angepasst (Abb. 4.14). Die Geschwindigkeitskonstante k_s für einen einzelnen aktivierenden Schaltschritt wird dabei so gewählt, dass jeweils die Gesamtdauer der Aktiv-Phase im Mittel $0,95s$ beträgt:

$$k_s = \frac{1,054 \frac{1}{s}}{\sum_{i=1}^{n_s} i}. \quad (4.29)$$

Für $n_s = 44$ Schritte und eine 19-fache CheYP-Konzentration ist die optimale Anpassung erreicht. Interessanterweise ist die optimierte Verzögerung t_d des Schaltsignals in diesem Fall gleich Null, während sie bei einer geringeren

Anzahl von Teilschritten größer ist. Der Bereich von ca. 2 – 2,7s in dem trotz erhöhtem Schaltsignal so gut wie kein Umschaltereignis zu beobachten ist, wird also nur von der Aktiv-Phase verursacht, und nicht etwa durch die Annahme, dass das Schaltsignal mit einer Verzögerung den Motor erreicht.

4.3.4 Detailliertes Modell des Schaltkomplexes

Basierend auf den Ergebnissen der vorigen Abschätzung wird nun ein detailliertes kinetisches Modell des Schaltkomplexes aufgestellt, das jetzt auch die Refraktär-Phase beinhaltet und außerdem realistischere Annahmen über das Verhalten der Untereinheiten trifft. Es wird angenommen, dass der Komplex aus 44 Untereinheiten besteht, an die jeweils ein CheYP binden kann. Die Bindung ist nicht kooperativ, allerdings wird davon ausgegangen, dass ein kooperativer Mechanismus dafür sorgt, dass sich alle Untereinheiten gleichzeitig in einem der Funktionszustände 'Refraktär', 'Kompetent', 'Aktiv' oder 'Stopp' befinden. Der Belegungsgrad des Schaltkomplexes beeinflusst die Übergangswahrscheinlichkeiten von 'Refraktär' zu 'Kompetent' und von 'Kompetent' zu 'Aktiv', während die Aktiv- und die Stopp-Phase stimulusunabhängig sind.

Der wahrscheinlichste Pfad des detaillierten Modells im adaptierten Fall ist in Abb. 4.15 dargestellt. Direkt nach einer Richtungsumkehr befindet sich der Schaltkomplex in der Refraktär-Phase und die meisten Untereinheiten sind mit CheYP gebunden. Der hohe Belegungsgrad behindert einen Übergang zur Kompetent-Phase. Da aber angenommen wird, dass im Refraktär-Zustand CheYP verstärkt hydrolysiert wird und CheY nicht so stark an die Untereinheiten bindet, werden mehr und mehr Bindungsstellen frei, wodurch sich die Übergangswahrscheinlichkeit zur Kompetent-Phase erhöht. Für diese Übergangsgeschwindigkeit wird eine exponentielle Abhängigkeit vom Belegungsgrad angenommen wie er sich bei allosterischen Modellen, wie z.B. das Monod-Wyman-Changeaux Modell [MWC65] (vergleiche Gl. (4.18) auf Seite 64), ergibt:

$$k_{RK,i} = k_{RK}^0 e^{-\frac{E_R i}{kT}}. \quad (4.30)$$

Wobei k_{RK}^0 , $E_R = \text{konstant}$ ist und der Index $i = 0 \dots 44$ die Anzahl der gebundenen Moleküle CheYP angibt, die den synchronen Übergang aller Untereinheiten in die nächste Phase behindern. In der Kompetent-Phase werden die entgegengesetzten Eigenschaften angenommen: verminderte Hydrolyse von CheYP sowie eine höhere Wahrscheinlichkeit für den Übergang in die nächste Phase je größer der Belegungsgrad ist. Der Belegungsgrad nimmt also unter adaptierten Verhältnissen in der Kompetent-Phase wieder langsam zu, bis genug Moleküle CheYP gebunden sind, damit der Komplex in

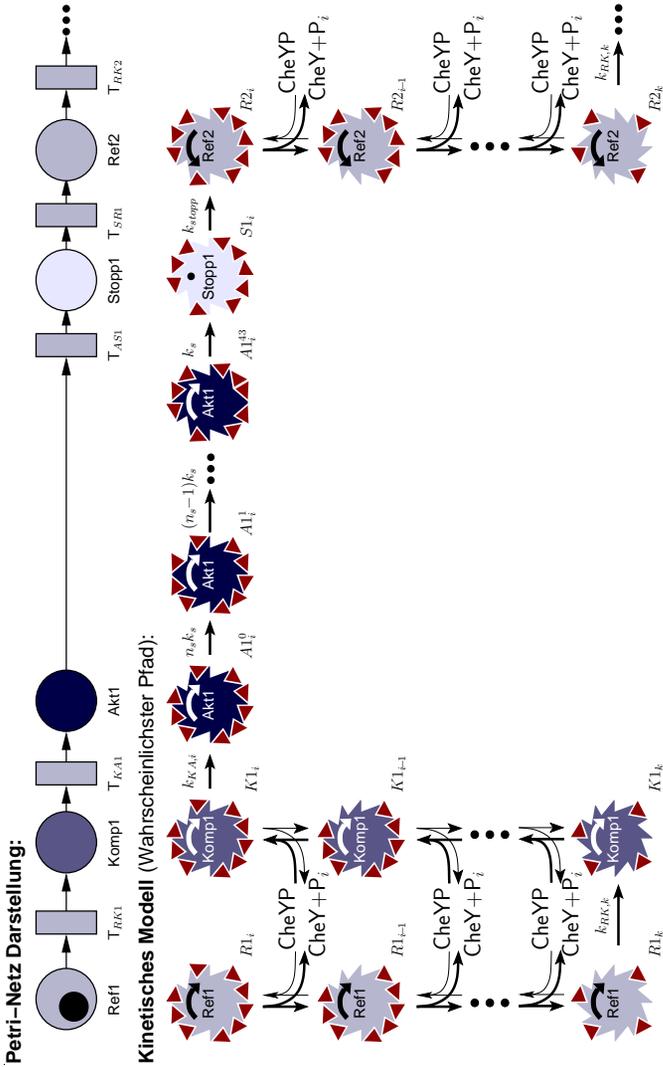


Abb. 4.15: Modell 5: Wahrscheinlichster Pfad durch das detaillierte kinetische Modell des Schaltkomplexes im adaptierten Fall. Zur Verdeutlichung sind die entsprechenden Funktionszustände der Petri-Netz Darstellung über dem kinetischen Modell angegeben. Die Dreiecke repräsentieren CheYp, die Orientierung der Bindestellen kennzeichnet die Konformation der Untereinheit.

die Aktiv-Phase übergehen kann. Analog zu k_{RK} ist dieser Übergang durch:

$$k_{KA,i} = k_{KA}^0 e^{\frac{E_K i}{kT}} \quad (4.31)$$

bestimmt, wobei k_{KA}^0 und E_K konstant sind und der Index $i = 0 \dots 44$ die Anzahl der gebundenen Moleküle CheYP darstellt. Im Gegensatz zu dem ersten Ansatz (Modell 4) sind die Konformationsänderungen zwischen den Funktionszuständen prinzipiell bei jedem Belegungsgrad möglich. Lediglich deren Wahrscheinlichkeit wird von der Anzahl gebundener Moleküle CheYP beeinflusst. Zusätzlich wird nun eine reversible Bindung von CheYP betrachtet, was ebenfalls eine realistischere Annahme darstellt.

In der Aktiv-Phase muss nun jede einzelne Untereinheit ihre Konformation ändern, was in 44 parallelen, stimulusunabhängigen Reaktionsschritten abläuft. Anschließend geht der Schaltkomplex in die Stopp-Phase über, bevor die entsprechenden Phasen der umgekehrten Schwimmrichtung in gleicher Weise durchlaufen werden.

4.3.5 Modellreduktion

In der bisherigen Modellbeschreibung hätte das vollständige Modell für jede Schwimmphase in Refraktär- und Kompetent-Phase jeweils 45 Zustände für die Anzahl gebundener Moleküle CheYP. Für die Aktiv- und die Stopp-Phase würden nochmals $44 \cdot 45 + 45$ Zustände hinzukommen. Insgesamt hätte das Modell also 2115 Zustände! Deshalb soll das Modell im Folgenden vereinfacht werden, indem mehrere Zustände zu verallgemeinerten Zuständen zusammengefasst werden. Dazu eignet sich insbesondere die Aktiv- und die Stopp-Phase. Sie benötigen nur etwas mehr als eine Sekunde, deshalb spielen hier die Assoziation und Dissoziation von CheYP bzw. CheY eine untergeordnete Rolle. So können die Bindungszustände der Aktiv- und der Stopp-Phase zusammengefasst werden, ohne das Systemverhalten wesentlich zu verändern. Damit reduziert sich die Zahl der Zustände des gesamten Modells auf $2 \cdot 45$ für Refraktär- und Kompetent-Phase und $44 + 1$ für Aktiv- und Stopp-Phase, also auf insgesamt 135 Zustände. Die Reaktionen von *Komp1* nach *Akt1* $r_{KA1,i}$;

$i = 0 \dots 44$ müssen demnach durch eine Summenreaktion ersetzt werden:

$$r_{KA1} = k_{KA}^0 \sum_{i=0}^{44} e^{\frac{E_K^i}{kT}} [K1] \quad (4.32)$$

$$[A1^k] = \sum_{i=0}^{44} [A1_i^k]; \quad k = 0 \dots 44 \quad (4.33)$$

$$[S1] = \sum_{i=0}^{44} [S1_i]. \quad (4.34)$$

Eine Schwierigkeit ergibt sich dann, wenn nicht nur eine Schwimmphase betrachtet werden soll, sondern nach dem *Stopp1*-Zustand ein weiterer Zyklus beginnen soll. Das Problem besteht darin, dass die Information über die Verteilung des Belegungsgrades durch die Summenbildung verloren gegangen ist. Als Lösung wird näherungsweise die aktuelle Verteilung der vorangehenden Kompetent-Phase herangezogen. Die Reaktionsrate für den Übergang von *Stopp1* zu dem i -fach belegten *Ref2*-Zustand $R2_i$ ergibt sich damit zu:

$$r_{SR1,i} = k_{stopp} [S1] \frac{[K1_i]}{\sum_{i=0}^{44} [K1_i]}. \quad (4.35)$$

Trotz der noch immer großen Anzahl von Zuständen hat das Modell 5 (Abb. 4.15) nur 10 Parameter.

4.3.6 Zeitverläufe im adaptierten Fall

In Abb. 4.16 wird das Verhalten des detaillierten Schaltermodells im Falle spontaner Richtungsumkehr analysiert, also für eine konstante CheYP-Konzentration. Die Wahrscheinlichkeitsdichte eines Umschaltereignisses (Teilbild A) entspricht der experimentell gemessenen Häufigkeitsverteilung der Intervalllängen. Die Parameter des Modells wurden besonders auf die experimentellen Häufigkeitsverteilungen von spontanen, Schreckreiz- und Lockreiz-induzierten Umschaltereignissen [HS85] optimiert. Außerdem gingen in die Parameteroptimierung die Experimente mit Einfach- und Doppelpulsen [MO87] sowie die Experimente von Krohs [Kro95] ein. Diese Experimente werden in den folgenden Kapiteln besprochen.

Aus der Wahrscheinlichkeitsdichte eines Umschaltereignisses (Abb. 4.16 A) kann die Umschaltwahrscheinlichkeit berechnet werden (Teilbild B), die die Wahrscheinlichkeit für ein Umschaltereignis unter der Voraussetzung angibt, dass es noch nicht stattgefunden hat. Direkt nach dem letzten Schaltereignis

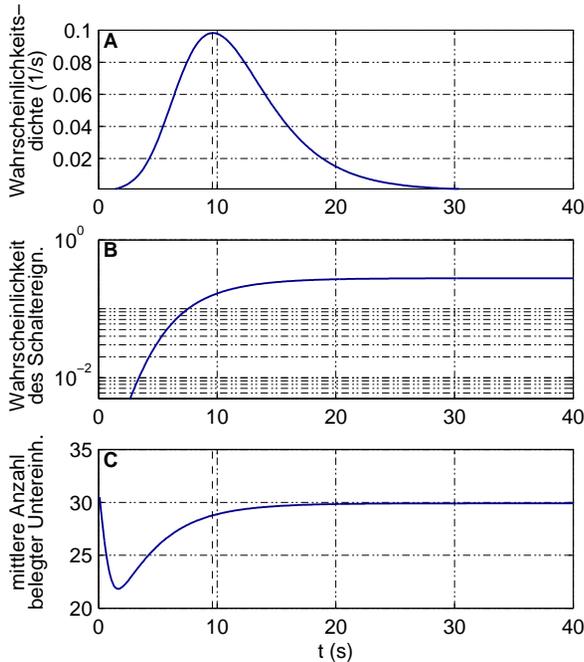


Abb. 4.16: *Simulationsergebnisse bei konstanter, adaptierter CheYP-Konzentration. A: Wahrscheinlichkeitsdichte eines Umschaltereignisses. B: Aus (A) berechnete Umschaltwahrscheinlichkeit. C: Mittlere Anzahl von mit CheYP belegten Untereinheiten des detaillierten kinetischen Modells (Modell5).*

treten so gut wie keine erneuten Ereignisse auf ($t < 2s$), was sich in einer extrem kleinen Schaltwahrscheinlichkeit äußert. Sie steigt jedoch ständig an und strebt für große Zeiten einem konstanten Wert zu. In der Wahrscheinlichkeitsdichte ergibt sich dadurch ein steiler Anstieg bis ca. $t = 10s$, der daraufhin in einen exponentiellen Abfall übergeht. Im Mittel schalten die Zellen alle 11,6s ihre Drehrichtung spontan um. Der Verlauf der Umschaltwahrscheinlichkeit deckt sich mit der Auswertung von experimentellen Befunden [Mar89]. Die Form dieses Verlaufs wird durch die Anzahl und die Geschwindigkeit der zum Umschalten erforderlichen Reaktionsschritte bestimmt. Im adaptierten Fall sind dafür die Assoziations- und Dissoziationsschritte maßgeblich. In Teilbild C ist deshalb die mittlere Anzahl mit CheYP gebundener Untereinheiten

über der Zeit aufgetragen. Direkt nach dem letzten Umschalten bei $t = 0s$ verringert sich der Belegungsgrad bis der Schaltkomplex von 'Refraktär' nach 'Kompetent' umschaltet. Danach steigt er wieder durch die erhöhte Stabilität von CheYP in der Kompetent-Phase an und damit vergrößert sich auch die Umschaltwahrscheinlichkeit des Motors. Bei Erreichen des Maximums der Wahrscheinlichkeitsdichte (Teilbild A) ist beinahe der konstante Endwert des Belegungsgrades und somit auch eine konstante Umschaltwahrscheinlichkeit erreicht.

4.3.7 Reduziertes signalorientiertes Modell

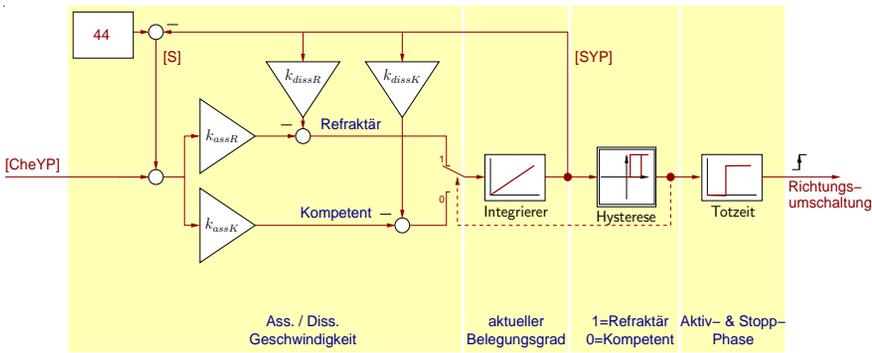


Abb. 4.17: Reduziertes signalorientiertes Modell des halobakteriellen Schaltkomplexes

Zur Verdeutlichung der Funktionsweise des detaillierten Modells 5 (Abb. 4.15) soll in diesem Kapitel ein reduziertes signalorientiertes Modell vorgestellt werden. Die Reduktion der Modellzustände kann analog zu Kap. 4.3.5 durch eine Zusammenfassung von Eigenschaften erreicht werden. Genau genommen ist der Belegungsgrad des detaillierten Modells auch schon eine reduzierte Betrachtung, denn es wird nicht jede mögliche Kombination von Belegungszuständen des Schaltkomplexes betrachtet ($2^{44} = 17,6 \cdot 10^{12}$ Zustände), sondern nur die Summe belegter Stellen (45 Zustände). Da sowieso keine Informationen über das Verhalten von bestimmten Belegungsmustern vorliegen, ist diese Reduktion sicherlich gerechtfertigt und sinnvoll. Mit einer Zustandsvariablen je Belegungsgrad kann das Modell Aussagen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung des Belegungsgrades liefern, d.h. es kann berechnen, mit welcher Wahrscheinlichkeit genau 1, 2, 3, ... 44 Untereinheiten mit CheYP belegt sind. Ist aber nur der Mittelwert der Wahrscheinlichkeitsverteilung

wichtig, so reicht ein einziger Zustand aus, um das gewünschte Verhalten zu beschreiben.

Im signalorientierten Modell (Abb. 4.17) wird genau diese Vereinfachung durchgeführt. Der Belegungsgrad des Schaltkomplexes wird nur noch durch seinen Mittelwert in einer Zustandsvariablen (Integrierer) repräsentiert. Aus den Parametern des detaillierten Modells kann man den stationären Belegungsgrad in Abhängigkeit von der CheYP-Konzentration für die Refraktär- und die Kompetent-Phase berechnen. Wegen der fehlenden Kooperativität der Bindungsstellen ergibt sich folgender Zusammenhang:



$$\frac{d[SYP]}{dt} = [CheYP][S]k_{ass} - [SYP]k_{diss} \quad (4.37)$$

$$[S] + [SYP] = 44, \quad (4.38)$$

wobei $[S]$ und $[SYP]$ die Anzahl freier bzw. gebundener Bindungsstellen des Schaltkomplexes sind.

Das Modell in Abb. 4.17 beinhaltet die signalorientierte Darstellung der Gleichungen (4.36-4.38) für den mittleren Belegungsgrad. Zu Beginn des Schaltprozesses befindet er sich in der Refraktär-Phase (Schalterposition 1), und es gelten die entsprechenden Assoziations- und Dissoziationskonstanten. Im adaptierten Fall führen diese Konstanten zu einer fallenden CheYP-Belegung bis der obere Ast der Hysterese den Umschaltpunkt bei ca. 20 belegten Untereinheiten erreicht hat und zur Kompetent-Phase (Schalterposition 0) umschaltet. Die dann geltenden Konstanten führen wieder zu einem steigenden Belegungsgrad bis der obere Umschaltpunkt der Hysterese bei ca. 30 belegten Bindungsstellen erreicht ist, und das Hystereseglied wieder auf '1' schaltet. Diese Werte der Umschaltpunkte wurden aus der Simulation des detaillierten Modells (Abb. 4.16) gewonnen. Der Zeitpunkt der Flanke $0 \rightarrow 1$ wird schließlich durch das Totzeitglied um die Zeit verzögert, die die Aktiv- und die Stopp-Phase im Mittel benötigen.

Das Modellverhalten ist von den genauen Werten der Assoziations- und Dissoziationskonstanten abhängig, die aber in der signalorientierten Darstellung (Abb. 4.17) nicht ersichtlich sind. Deshalb soll im Folgenden eine alternative Darstellung hergeleitet werden, die zwar nur eine Näherung der Gleichungen (4.36-4.38) ist, dafür aber die dominierenden Eigenschaften des Modells klarer hervortreten lässt.

Wenn der Motor nicht zwischen Refraktär- und Kompetent-Phase umschalten

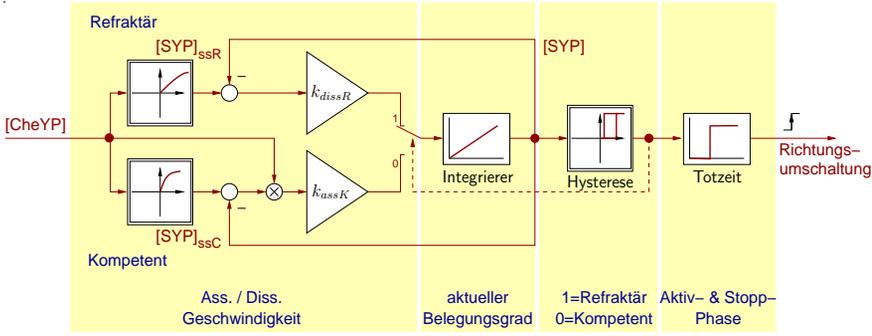


Abb. 4.18: Signalorientiertes Modell des halobakteriellen Schaltkomplexes mit näherungsweise Berechnung des Belegungsgrades über die Abweichung vom stationären Zustand.

würde, wäre nach einiger Zeit der stationäre Belegungsgrad $[SYP]_{ss}$ erreicht:

$$[SYP]_{ss} = 44 \cdot \frac{[CheYP]}{\frac{k_{diss}}{k_{ass}} + [CheYP]}. \quad (4.39)$$

Mit dem optimierten Parametersatz ergibt sich im adaptierten Fall ein stationärer Belegungsgrad von $[SYP]_{ssR} = 16$ in der Refraktär- und $[SYP]_{ssK} = 34,4$ in der Kompetent-Phase. Durch Einsetzen von (4.39) erhält man aus (4.37):

$$\frac{d[SYP]}{dt} = ([SYP]_{ss} - [SYP])(k_{diss} + [CheYP]k_{ass}). \quad (4.40)$$

In dieser Form erkennt man, dass die Abweichung vom stationären Belegungsgrad die 'treibende Kraft' für die Zustandsänderung darstellt und die Geschwindigkeit des Ausgleichs von den Bindungskonstanten und der CheYP-Konzentration abhängt. Während der Refraktär-Phase ist der aktuelle Belegungsgrad meistens größer als der stationäre, weshalb in diesem Fall die Dissoziation dominiert, wie man aus (4.37) absehen kann. Dagegen ist während der Kompetent-Phase meistens die Assoziation bestimmend. Näherungsweise ergibt sich also folgende Gleichung:

$$\frac{d[SYP]}{dt} \approx \begin{cases} ([SYP]_{ssR} - [SYP])k_{dissR} & ; \text{Refraktär} \\ ([SYP]_{ssK} - [SYP])[CheYP]k_{assK} & ; \text{Kompetent.} \end{cases} \quad (4.41)$$

Das entsprechende signalorientierte Schaltbild ist in Abb. 4.18 dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Deterministische Stimulation

5.1.1 Häufigkeitsverteilung von spontanen und lichtinduzierten Umschaltereignissen

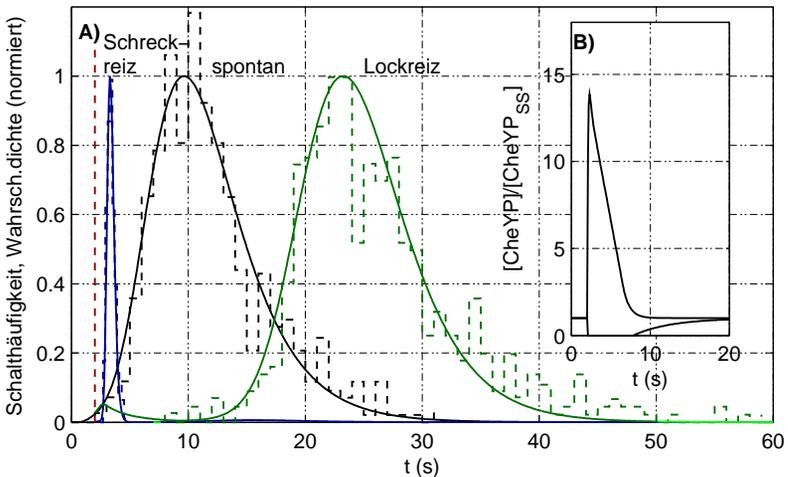


Abb. 5.1: *A: Messungen der Häufigkeitsverteilung (gestrichelte Linien) und Simulationen der Wahrscheinlichkeitsdichte (durchgezogene Linien) von Umschaltereignissen im spontanen, Schreckreiz- und Lockreiz-induzierten Fall. Die Lichtstimulation erfolgte jeweils bei $t = 2\text{s}$ (gestrichelte Linie) mit einem Sprung der UV-Licht Intensität (Licht an bzw. aus). Die Messdaten stammen aus[HS85]. B: Zeitverlauf des normierten Schaltsignals CheYP bei Schreckreiz (steiler Anstieg) und Lockreiz (Einbruch).*

Die Simulationsergebnisse des detaillierten kinetischen Modells sind in Abb.

5.1 A dargestellt. Der Verlauf der zugehörigen CheYP-Konzentration ist in Abb. 5.1 B für Schreck- bzw. Lockstimulation zu sehen. Er wurde mit dem in Kap. 3.6 beschriebenen Modell der Signalkaskade berechnet, das die Rezeptortypen SRI oder SRII und einen einfachen Adaptationsmechanismus beinhaltet.

In allen drei Fällen stimmen die Simulationsergebnisse sehr gut mit den gemessenen Häufigkeitsverteilungen überein. Die Stimulation erfolgt jeweils bei $t = 2s$ nach einer spontanen Richtungsumkehr. Zu dieser Zeit ist die Refraktär-Phase des Schaltkomplexes bereits vorbei und die Zellen können ohne Einschränkung auf den Reiz reagieren.

5.1.2 Stimulation mit Einfach- und Doppelpulsen

Die Experimente mit Einfach- und Doppelpulsen aus blauem Licht sind schon in Kap. 4.3.1.3 erwähnt worden, wo sie als Motivation für die Aktiv-Phase dienten. In Abb. 5.2 sind die Simulationsergebnisse für eine Variation der Lichtintensität (Teilbild A), der Dunkelpause zwischen zwei Pulsen (Teilbild B) und des Tastverhältnisses der Pulse (Teilbild C) dargestellt. Sie passen ebenfalls gut zu den theoretischen Werten der Doppelblitzgleichung (4.28).

Einige Abweichungen zwischen Simulation und Doppelblitzgleichung sind aber dennoch vorhanden. So liefert z.B. das Stimulationsprogramm mit Variation der Dunkelpause (im Teilbild B) für $D > 0,6s$ zu schnelle Reaktionszeiten. Dieser Effekt rührt daher, dass die Zelle auch ohne Stimulation nach $t_R = (11,6 - 2)s$ spontan die Schwimmrichtung umkehren würde. Die spontane Richtungsumkehr wurde jedoch bei der Herleitung der Doppelblitzgleichung (4.28) nicht berücksichtigt. Auch der erste Puls alleine würde bereits eine Umkehr bei $t_R = 8,5s$ bewirken. Die für größere D ebenfalls immer größer werdende Abweichung stellt schon den Beginn des Übergangs von der konstanten Anfangssteigung zur Steigung Null für sehr lange Dunkelpausen dar. Bei der Variation des Tastverhältnisses (Teilbild C) sind ebenfalls Abweichungen vom theoretischen Wert zu beobachten. Deshalb wird im Folgenden die Doppelblitzgleichung unter Annahme desselben Mechanismus', jedoch ohne Vernachlässigungen, erneut hergeleitet. Die Funktionsweise des Mechanismus' ist in Abb. 5.3 dargestellt. Am Schaltkomplex wird das Schaltsignal CheYP über die Zeit integriert bis eine bestimmte Schwelle b' erreicht ist. Danach vergeht bis zum eigentlichen Umschalten noch eine minimale Zeit t_{min} . Das Integral des Schaltsignals muss demnach während der Dauer $t_R - t_{min}$ die Schwelle b' erreichen:

$$\int_0^{t_R - t_{min}} [CheYP](t) dt = b'. \quad (5.1)$$

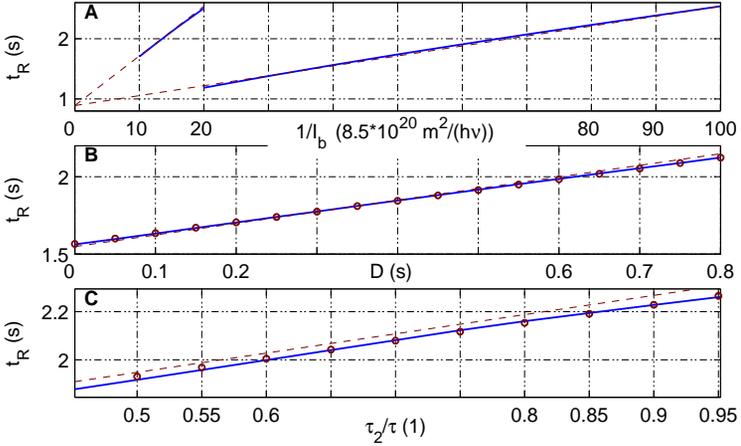


Abb. 5.2: Simulationen (durchgezogene Linien) und berechnete Werte aus der empirisch gewonnenen Gl. (4.28) [MO87] (gestrichelte Linien) der Reaktionszeit t_R nach Stimulation mit Einfach- oder Doppelpulsen aus blauem Licht. A: Variation der Lichtintensität eines Einzelpulses mit einer Dauer von $\tau = 20\text{ms}$ bzw. $\tau = 100\text{ms}$. B: Variation der Dunkelphase D zwischen dem ersten Puls $\tau_1 = 25\text{ms}$ und dem zweiten $\tau_2 = 75\text{ms}$. C: Variation des Tastverhältnisses $\tau_2/(\tau_1 + \tau_2)$ der Pulse bei $D = 800\text{ms}$ und $\tau = 100\text{ms}$. Die Doppelblitzgleichung (5.4) ohne Vernachlässigung der Pulsdauer und der spontanen Richtungsumkehr ist in B und C mit Punkten gekennzeichnet und liegt genau auf den Simulationsergebnissen.

Weiterhin wird angenommen, dass die CheYP-Konzentration proportional zur applizierten Lichtmenge $I\tau$ ist und sie im adaptierten Fall einen konstanten Wert besitzt: $[\text{CheYP}](t) \sim I\tau + c$. Daraus ergeben sich folgende Gleichungen unter der Bedingung, dass beide Lichtpulse noch während der

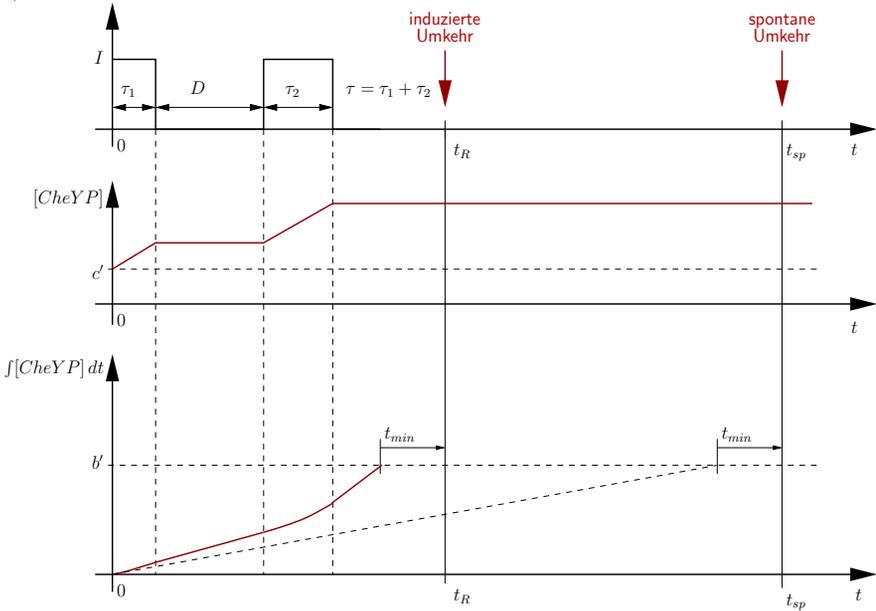


Abb. 5.3: Angenommener Mechanismus für die Herleitung der Doppelblitzgleichung ohne Vernachlässigungen. Ohne Stimulation wird die stationäre CheY-P-Konzentration über die Zeit integriert (gestrichelte Linie), mit Stimulation erhöht sich die Konzentration proportional zur applizierten Lichtmenge (durchgezogene Linie). Nach Erreichen der Schwelle b' vergeht noch die Zeit t_{min} bis zum endgültigen Umschalten.

Dauer $t_R - t_{min}$ appliziert wurden:

$$\int_0^{t_R - t_{min}} c \, dt + \int_0^{\tau_1} \frac{I\tau_1}{\tau_1} t \, dt + \int_{\tau_1}^{t_R - t_{min}} I\tau_1 \, dt + \int_{\tau_1 + D}^{\tau_1 + D + \tau_2} \frac{I\tau_2}{\tau_2} (t - \tau_1 - D) \, dt + \int_{\tau_1 + D + \tau_2}^{t_R - t_{min}} I\tau_2 \, dt = b \quad (5.2)$$

$$t_R - t_{min} + \frac{1}{2} I\tau_1^2 + I\tau_1(t_R - t_{min} - \tau_1) + \frac{1}{2} I\tau_2^2 + I\tau_2(t_R - t_{min} - \tau_1 - D - \tau_2) = b. \quad (5.3)$$

Und schließlich die exakte Doppelblitzgleichung:

$$t_R = t_{min} + \frac{b}{c + I\tau} + D \frac{\tau_2}{c/I + \tau} + \frac{\frac{1}{2}\tau_1^2 + \tau_1\tau_2 + \frac{1}{2}\tau_2^2}{c/I + \tau}, \quad (5.4)$$

mit $\tau = \tau_1 + \tau_2$. Unter der Annahme, dass die Pulsdauer beider Pulse klein ist, kann man den letzten Term der Gleichung vernachlässigen. Schließlich geht die Gleichung für eine Vernachlässigung des spontanen Schaltens ($c = 0$) in die einfache Doppelblitzgleichung (4.28) über.

Ohne Stimulation ($I = 0$) ergibt sich eine Reaktionszeit, die dem Mittelwert der spontanen Umschaltzeit $T_{sp} = 11,6s$ abzüglich der $2s$ bis zu Beginn des Experiments entsprechen muss. Daraus kann die Konstante c bestimmt werden:

$$c = \frac{b}{T_{sp} - 2s - t_{min}}. \quad (5.5)$$

Die exakte Doppelblitzgleichung ist in Abb. 5.2B und C mit Punkten eingezeichnet. Die Gleichung stimmt sehr genau mit den Simulationen überein. Direkt nach der Refraktärzeit wirkt der Schaltkomplex also als Integrierer, der das Schaltsignal CheYP über die Zeit integriert, bis er eine bestimmte Schwelle erreicht hat und danach mit einer Verzögerung von $t_{min} \approx 0,95s$ die Rotationsrichtung umkehrt. Der Großteil dieser Zeit wird laut detailliertem Modell von der Aktiv-Phase verursacht ($\approx 0,62s$), der Rest durch die Verzögerungen in der Signalkaskade.

Die anfängliche Abweichung von der einfachen Doppelblitzgleichung (4.28) in Teilbild C kann hauptsächlich durch die Vernachlässigung der Dauer beider Lichtpulse erklärt werden. Dagegen rührt die Abweichungen in Teilbild B für lange Dunkelpausen und in Teilbild C für große Tastverhältnisse von der Vernachlässigung des spontanen Schaltens her.

Bei der Durchführung der Experimente wurden besondere Klone ausgewählt, die nur sehr selten spontan die Schwimmrichtung umkehren. Das bedeutet, dass die mittlere Zeit T_{sp} der Zellen viel größer war als bei den Simulationen [W. Marwan]. Deshalb ist für die Messungen der Effekt des Parameters c in der exakten Gleichung sehr viel geringer. Für die Simulationen wurde aber dennoch der bisherige Parametersatz verwendet, um vergleichbare Simulationsergebnisse zu erhalten.

5.1.3 Schreckstimulation während und nach der Refraktär-Phase

In einer Reihe von Experimenten hat Krohs [Kro95] die Zellantwort auf Schreckstimulation (z.B. Anschalten von UV-Licht oder Ausschalten von

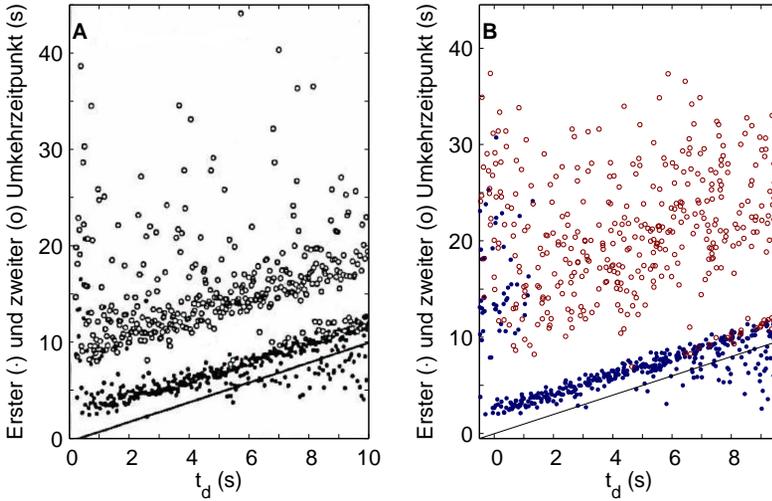


Abb. 5.4: Schreckstimulation nach einer Verzögerung t_d nach einer spontanen Umkehr; Messungen (A), Simulationen (B). Erster Umkehrzeitpunkt (Punkte) und zweiter Umkehrzeitpunkt (Kreise) sind entlang der y-Achse für eine bestimmte Verzögerung t_d aufgetragen. Als Lichtreiz wurde Orangelicht der Intensität $I_{or} = 1,8 \cdot 10^{20} \frac{h\nu}{m^2s}$ (A) bzw. $I_{or} = 3,42 \cdot 10^{20} \frac{h\nu}{m^2s}$ (B) verwendet. Der Zeitpunkt des Stimulus' wird durch die durchgezogene Linie markiert.

Orange-Licht) während und nach der Refraktär-Phase untersucht. Nach einer spontanen Richtungsumkehr einer Zelle wurde eine Verzögerungszeit t_d abgewartet, bevor der Stimulus appliziert wurde. Der Zeitpunkt t_r des Umkehrereignisses wurde entlang der y-Achse in Abhängigkeit von t_d aufgetragen. Abbildung 5.4 zeigt die Mess- und Simulationsergebnisse zu diesem Experiment, bei dem zwei aufeinanderfolgende Schwimmphasen ausgewertet wurden. Für das simulierte Diagramm wurden die zeitdiskreten Umkehrzeitpunkte mittels Zufallszahlen berechnet, deren Wahrscheinlichkeitsdichte mit dem detaillierten Modell simuliert wurden.

Die Simulationen stimmen qualitativ gut mit den experimentellen Ergebnissen überein. Insbesondere erkennt man deutlich, dass die Zellen entweder innerhalb von $1 \dots 2s$ nach der Stimulation reagieren oder dann erst wieder einige Sekunden später. Diese Lücke, in der kaum ein Umkehrereignis auftritt, ist unabhängig davon, ob es sich um die erste oder bereits die zwei-

te Richtungsumkehr handelt. Der Mechanismus, der im Modell diese Lücke erzeugt, ist folgender: Das Schrecksignal erhöht nach dem Stimulus die intrazelluläre CheYP-Konzentration. Zellen, die sich während dieser Zeit in der Kompetent-Phase befinden, schalten innerhalb der nächsten $1 \dots 2s$ die Schwimmrichtung um. In der darauf folgenden Refraktär-Phase werden die Zellen so lange festgehalten wie die erhöhte CheYP-Konzentration andauert. Dies trifft z.B. für die meisten Zellen bei $t_d = 3s$ zu. Befinden sich Zellen bei Applikation des Stimulus' bereits in der Refraktär-Phase, werden sie direkt in dieser Phase festgehalten, ohne vorher umzuschalten. In Abbildung 5.4 sieht man dieses Verhalten am besten für $t_d \rightarrow 0s$. Die Zellen werden erst durch niedrigere Werte von CheYP wieder in die nächste Phase, die Kompetent-Phase, 'entlassen'. Für hohe Werte der Stimulusverzögerung ($t_d > 6s$) kehren immer mehr Zellen bereits vor der Stimulation die Schwimmrichtung spontan um. Dementsprechend reagieren manche Zellen bei Auftreffen des Lichtsignals schon mit der 2. Richtungsumkehr (Kreise nahe der durchgezogenen Linie). Aber auch diese Zellen werden durch eine erhöhte CheYP-Konzentration in der Refraktär-Phase festgehalten, so dass eine gewisse Zeit nach der lichtinduzierten Richtungsumkehr keine weitere Umkehr stattfinden kann.

Das abrupte Ende der Lücke in den Messungen (entlang der y-Achse) wird durch das Modell nicht so gut wiedergegeben. Eventuell könnte ein zu einfaches Adaptationsmodell, das ein zu langsames Einschwingen der CheYP-Konzentration zur Folge hat, die Ursache dafür sein. Um diese Annahme zu überprüfen, ist in Abb. 5.5 die Auswirkung einer hypothetisch angenommenen, sprungförmigen Adaptation simuliert worden. Während der ersten $4,8s$ nach der Stimulation hat dabei die Adaptation keinerlei Einfluss auf das Schaltsignal. Danach geht das System schlagartig in den adaptierten Zustand über. Im Vergleich zu dem langsameren Adaptationsmechanismus ist ein steilerer Anstieg der Wahrscheinlichkeitsdichte nach der Refraktär-Phase zu sehen. Allerdings ist der Unterschied nicht so gravierend, als dass dieser Effekt das beobachtete Verhalten vollständig erklären könnte. Die Experimente legen viel mehr nahe, dass die Kompetent-Phase nach einer verlängerten Refraktär-Phase deutlich kürzer ist. Welcher Mechanismus dafür sorgt, muss aber an dieser Stelle offen bleiben.

Auch das reduzierte signalorientierte Modell (Abb. 4.17) zeigt qualitativ dasselbe Verhalten. In Abb. 5.6 sind die entsprechenden Simulationsergebnisse zu sehen. Im Unterschied zum detaillierten Modell findet allerdings der durch die Refraktär-Phase verzögerte Umschaltvorgang erst $20s$ nach der Stimulation statt, weil in dem vereinfachten signalorientierten Modell die Refraktär-Phase

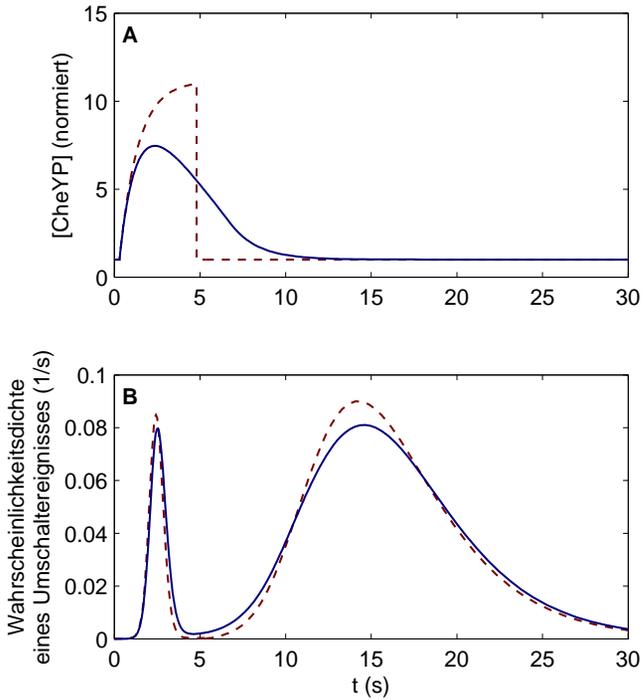


Abb. 5.5: Simulationsergebnisse für Schreckstimulation bei $t_d = 0,3\text{s}$ für zwei verschiedene Verläufe der CheY-P-Konzentration. Durchgezogene Linien: Stimulus und Adaptationsmechanismus wie in (Abb. 5.4B), gestrichelte Linien: hypothetische sprungförmige Adaptation bei $t = 4,8\text{s}$.

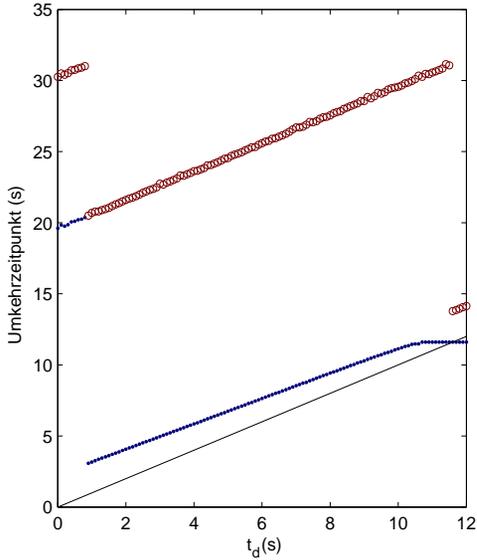


Abb. 5.6: *Simulationsergebnisse des signalorientierten Modells (Abb. 4.17) für Schreckstimulation während verschiedener Zeiten nach einer spontanen Richtungsumkehr. Gleiche Stimulation wie für das detaillierte Modell (Abb. 5.4B). Punkte: erster Umschalt-Zeitpunkt, Kreise: zweiter Umschalt-Zeitpunkt, durchgezogene Linie: Zeitpunkt der Stimulation.*

erst bei einer scharf definierten Grenze beendet werden kann. Im detaillierten Modell ist dagegen ein Übergang in die Kompetent-Phase auch schon bei einem größeren Belegungsgrad möglich, allerdings mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit.

Die verzögerte Reaktion auf den Schreckreiz hat Krohs 'indirekte' Reaktion genannt, während er die prompte Reaktion mit 'direkt' bezeichnet hat. Sowohl die Häufigkeitsverteilung der direkten Reaktion und der Folgereaktion als auch die Häufigkeitsverteilung der indirekten Reaktion und ihrer Folgereaktion weisen mehrere Höhepunkte im Abstand von jeweils ca. 5s auf. Krohs hat dieses Phänomen als 'gedämpfte Schwingung' bezeichnet und ist zu der Schlussfolgerung gekommen, dass wohl auch das Schaltsignal eine solche gedämpfte Schwingung aufweisen müsse [Kro95]. Naber hat diese Idee aufgenommen und mit einem einfachen Schaltermodell ein ähnliches Verhalten er-

zeugt [Nab97]. Dieses Modell besitzt allerdings keine Refraktär-Phase, sodass die gedämpfte Schwingung mit einem komplex geformten Schaltsignal erzeugt werden muss (vergleiche Kap. 4.2.3 Gl (4.25)). Mit dem hier vorgestellten Modell des Schaltkomplexes ist eine Annahme einer solch schwer zu motivierenden Signalform nicht nötig, um die Messungen zu erklären. Das Verhalten ergibt sich hier bei einer simplen abklingenden CheYP-Konzentration. Es wird allein durch das Zusammenspiel von Refraktär-Phase und Kompetent-Phase erzeugt, sowie durch die Tatsache, dass die Zellen durch den Stimulus in einen einheitlichen Motorzustand versetzt werden und diese 'Synchronisation' sich nach einiger Zeit verläuft.

5.1.4 Inverse Antwort auf einen Lockreiz

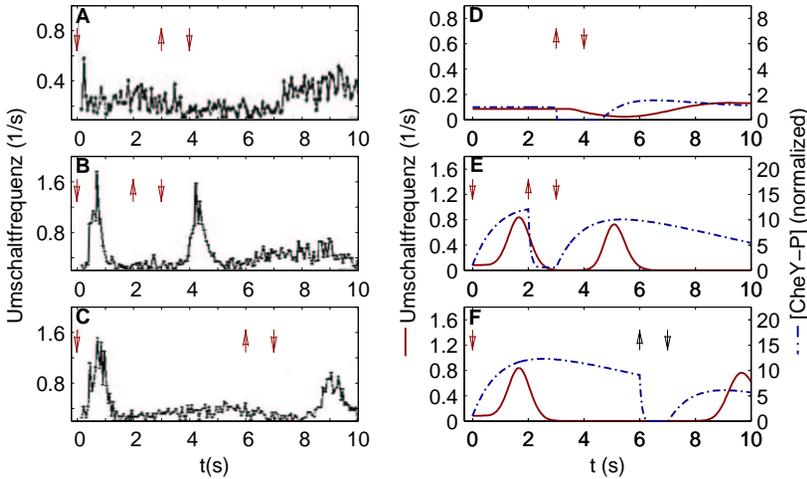


Abb. 5.7: Wirkung eines Orangerlicht-Pulses ohne (A,D) und nach Stimulation mit einem Schreckreiz (B-F) bei $t = 0s$. A-C: Messungen aus [MAS87]; D-E: Simulationen mit $I_{or} = 0,76 \cdot 10^{21} \frac{h\nu}{m^2s}$. Die Pfeile deuten das Ein- und Ausschalten von orangenem Licht an. Die durchgezogenen Linien zeigen die Schaltfrequenz von unsynchronisierten Zellen und die strichpunktierten Linien geben die normierte CheYP-Konzentration an.

Von McCain, Amici und Spudich liegen experimentelle Ergebnisse mit unsynchronisierten Zellen vor. Bei diesen Experimenten werden eine Anzahl

von Zellen gleichzeitig von einer Videokamera beobachtet und deren Umkehrereignisse von einem Computeralgorithmus automatisch ausgewertet. Dadurch, dass sich die Zellen in einem zufälligen Zustand des Schaltprozesses befinden, beobachtet man im unstimulierten Fall bei genügend großer Anzahl von Messungen eine konstante Frequenz f von Umkehrereignissen. Wenn unsynchronisierte, dunkeladaptierte Zellen einem Orangelicht-Puls ausgesetzt werden, reagieren sie mit einer Verringerung der Schalthäufigkeit wie man es von einem Lockreiz erwartet (siehe Abb. 5.7 A). Dagegen reagieren die Zellen mit einer erhöhten Schaltfrequenz bei einer negativen Stimulation, wie z.B. auf das Ausschalten von Orangelicht bei $t = 0s$ in Abb. 5.7 B&C. Wird jedoch innerhalb von ein paar Sekunden nach diesem Schreckreiz ein zweiter Orangelicht-Puls gegeben, so reagieren die Zellen mit einer **inversen Antwort**. Der Orangelicht-Puls, der vorher einen Lockreiz ausgelöst hat, bewirkt eine erhöhte Schaltfrequenz wie man es von einem Schreckreiz erwarten würde [MAS87]. Dieser Effekt ist bis zu sechs Sekunden nach dem Schreckreiz zu beobachten und kann auch durch Stimuli unterschiedlicher Wellenlänge ausgelöst werden. So kann z.B. dieses Phänomen auch beobachtet werden, wenn nach dem Ausschalten des Orangelichts bei $t = 0s$ ein inverser Blaulicht-Puls (kurzzeitiges Ausschalten von Blaulicht) verwendet wird. Der Effekt ist also unabhängig von SRI und SRII und deutet auf einen Prozess hin, der der Rezeptorstimulation nachgeschaltet ist.

Die Simulationsergebnisse zeigen wieder eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Das Modell liefert folgende Erklärung für diesen nicht intuitiv erkläraren Effekt: Im unstimulierten Fall (Teilbilder A&D) befinden sich die meisten Zellen in der Kompetent-Phase, weil diese im adaptierten Fall am längsten dauert. Sie reagieren auf eine fallende CheYP-Konzentration mit einer Verringerung der Schalthäufigkeit. Wurden die Rezeptoren aber bei $t = 0s$ durch einen Schreckreiz stimuliert, so erhöhen sie die CheYP-Konzentration. In der Folge schalten die Zellen ihre Drehrichtung um und werden solange in der Refraktär-Phase festgehalten, bis die Rezeptoren adaptiert sind. Eine Stimulation mit einem kurzem Lockreiz während dieses Adaptationsvorgangs verringert kurzzeitig die CheYP-Konzentration und 'befreit' die Zellen aus der Refraktär-Phase. Danach steigt das Schaltsignal wieder an, was noch immer eine Folge des Schreckreizes bei $t = 0s$ ist, und lässt die Zellen erneut die Richtung umschalten (Vergleiche Modell 3, Abb. 4.10).

5.1.5 Größer werdende Reaktion auf eine Orangelicht-Pulsfolge

Cercignani et al. [CLP98] haben unsynchronisierte Zellen mit einer Folge von Orangelicht-Pulsen stimuliert. Für schnell aufeinanderfolgende Pulse (Peri-

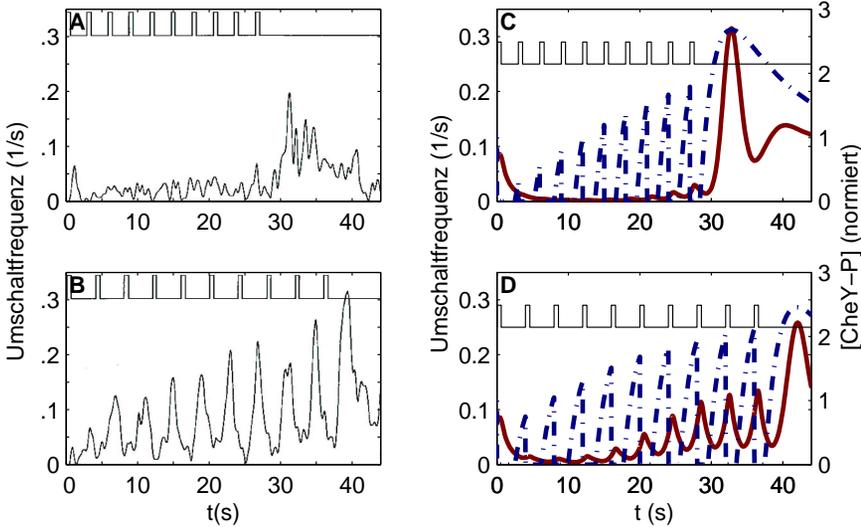


Abb. 5.8: Folge von 10 Orangelicht-Pulsen ($I_{or} = 3 \cdot 10^{21} \frac{h}{m^2 \cdot s}$) mit je 0,6s Länge und einer Periodendauer von 3s (A, C) bzw. 4s (B, D). A, B: Messungen aus [CLP98]. C, D: Simulationen mit leicht veränderten Parametern (siehe Text). Dicke gestrichelte Linien: Umschalthäufigkeit; strichpunktierte Linien: normierte CheY-P-Konzentration.

odendauer $T = 3s$, Pulslänge 0,6s) beobachteten sie eine Unterdrückung von Schaltereignissen während der Pulsfolge und eine kurzzeitig erhöhte Schaltfrequenz danach. Für eine etwas längere Periodendauer von $T = 4s$ dagegen konnten sie nach jedem Puls einen größer werdenden Spitzenwert von Umschaltereignissen beobachten.

Qualitativ zeigt das detaillierte Modell dasselbe Verhalten. Allerdings tritt dieser Effekt mit dem bisher verwendeten Parametersatz bei genau der halben Periodendauer der Orangelicht-Pulse auf als bei den Experimenten. Damit die Ergebnisse besser mit den Messungen vergleichbar sind, wurde der Parametersatz auf diese Experimente 'von Hand' optimiert. Dazu wurden zwei Parameter für die Simulationen in Abb. 5.9 verändert: die Relaxationsgeschwindigkeit des Orangelicht-stimulierten Rezeptors SRI ist um den Faktor 2 und die Methylierungs- bzw. Demethylierungsgeschwindigkeit der Adaptation um den Faktor 5 langsamer als in den vorigen Simulationen. Ein Grund warum die Parameter für dieses Experiment angepasst werden mussten, liegt zum einen bestimmt an dem sehr einfachen Excitations/Adaptations-Modell

und den noch nicht vollständig gesicherten Parameterwerten. Zum anderen können aber auch unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie z.B. Zellkultur, Temperatur, Zellalter etc. ausschlaggebend sein. Außerdem sind Zweifel an der Güte des Algorithmus' zur Auswertung der Messungen angebracht. Erstens fängt jede Messung in Cercignani et al. [CLP98] bei einer Umschaltfrequenz von Null an, während jedoch ein Wert im Bereich von $0,1 \frac{1}{s}$ zu erwarten wäre. Dies liegt sicherlich an der fehlenden Initialisierung des Programms, das zur Erkennung der Umkehrereignisse verwendet wurde. Für eine einwandfreie Funktionsweise würde es wahrscheinlich erst einige Bilder 'Vorlauf' benötigen. Zweitens liegt die spontane Umschaltfrequenz nur bei ca $0,05 \frac{1}{s}$ wie man aus anderen Messungen ablesen kann. Ob die verwendeten Zellen unter den experimentellen Umständen tatsächlich nur etwa halb so oft schalten wie von anderen Arbeitsgruppen berichtet, oder ob hier ebenfalls ein Messproblem die Ursache ist, bleibt offen.

Trotz aller Abweichungen wird das qualitative Ergebnis korrekt wiedergegeben. Die Erklärung für die immer größer werdende Umschalthäufigkeit während der Pulsfolge mit $T = 4s$ ist in der Adaptation begründet. Ein orangefarbener Lichtpuls senkt die CheYP-Konzentration kurzzeitig ab. Die Adaptation wirkt dem entgegen, indem sie mehr Rezeptorkomplexe aktiviert, bis der Mittelwert wieder dem adaptierten Wert entspricht. In den Simulationsergebnissen sieht man deutlich, dass während der Pulsfolge der Mittelwert und dadurch auch der Spitzenwert der CheYP-Konzentration nach jedem Puls ansteigt.

In den Simulationen mit $T = 3s$ sieht man, dass die Spitzenwerte der CheYP-Konzentration nur wenig niedriger sind als für $T = 4s$, allerdings ist das 'Tastverhältnis' des CheYP-Verlaufs merklich niedriger. D.h. die Zeit, in der eine hohe Schaltsignalkonzentration auftritt, ist bei einer kleineren Periodendauer kürzer als bei einer größeren. Dieser Effekt reicht gerade aus, um während der 10 Pulse eine Richtungsumkehr der Zellen nahezu vollständig zu unterdrücken.

5.1.6 Geringer werdende Reaktion auf eine UV-Licht-Pulsfolge

Analog zu den vorigen Experimenten mit einer Orangelicht-Pulsfolge haben Cercignani et al. [CLP98] auch Experimente mit einer UV-Licht-Pulsfolge ($400nm$) durchgeführt. Das Ergebnis ist entsprechend der umgekehrten Wirkung des Stimulus' in gewisser Weise ebenfalls umgekehrt. Für langsam aufeinanderfolgende Pulse (Periodendauer $T = 12s$, Pulslänge $0,6s$) beobachteten sie gleichbleibende Reaktionen auf jeden einzelnen Puls. Dagegen nahm

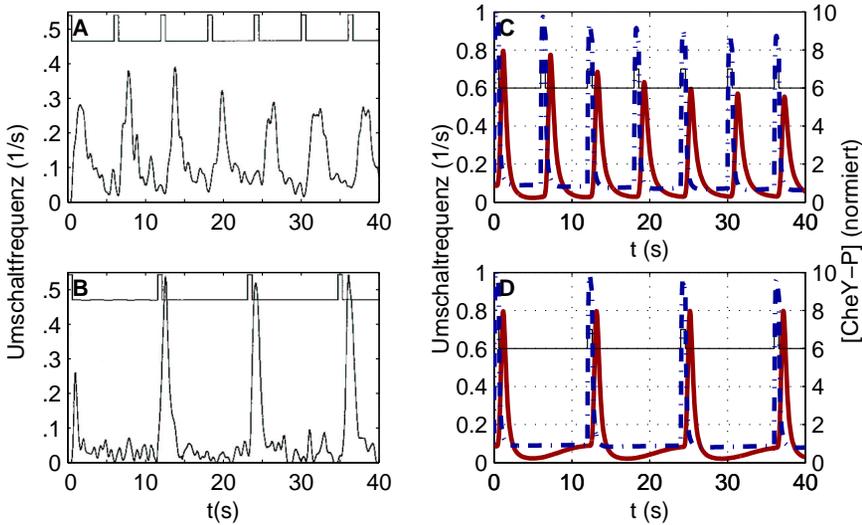


Abb. 5.9: Folge von 10 UV-Licht-Pulsen ($I_{UV} = 1,4 \cdot 10^{20} \frac{h\nu}{m^2 \cdot s}$) mit je 0,6s Länge und einer Periodendauer von 6s (A, C) bzw. 12s (B, D) und Orangelicht Hintergrund ($I_{or} = 1 \cdot 10^{20} \frac{h\nu}{m^2 \cdot s}$). A, B: Messungen aus [CLP98]. C, D: Simulationen mit leicht veränderten Parametern (siehe Text). Dicke gestrichelte Linien: Umschalthäufigkeit; strichpunktierte Linien: normierte CheY-P-Konzentration.

die Reaktion für eine halb so lange Periodendauer ($T = 6s$) mit jedem Puls ab.

Um die Simulationsergebnisse gut mit den Messungen vergleichen zu können, mussten ebenfalls Parameter angepasst werden. In diesem Fall wurden wie für die Orangelicht-Pulse die Methylierungs- und Demethylierungsgeschwindigkeit um den Faktor 5 verringert. Die Relaxationszeit des Rezeptors blieb jedoch unverändert.

Am Anfang des Experiments sieht man auch hier, wie im vorigen Kapitel, die Probleme der Auswertung der Messungen. Der erste Spitzenwert der Umkehrfrequenz sollte mindestens so groß sein wie der zweite.

Der Grund für die abnehmende Reaktion auf die UV-Licht-Pulse mit größerer Wiederholfrequenz liegt ebenfalls in dem Adaptionsmechanismus. Durch die UV-Pulse wird die CheY-P-Konzentration erhöht. Die Adaptation steuert dagegen, bis die mittlere Konzentration wieder den adaptieren Wert erreicht hat. Deshalb werden die Spitzenwerte des Schaltsignals und damit auch die

Reaktion der Zellen mit jedem Puls geringer.

5.2 Stochastische Stimulation

Im vorigen Kapitel wurde davon ausgegangen, dass durch einen applizierten Lichtstimulus viele Rezeptoren einer Zelle aktiviert werden. Folglich wurde die Auswirkung auf die Rezeptoren nur durch einen kontinuierlichen Anteil getroffener Rezeptoren berücksichtigt. Bei schwachen Lichtstimuli muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Reiz genau genommen aus einer ganzzahligen Anzahl von Photonen besteht. Die Rezeptoren einer Zelle decken zudem nur einen bestimmten Teil der Fläche ab, die die Photonen durchdringen. Die aktive Fläche eines Rezeptors kann also nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit von einem Photon getroffen werden. Bei Wiederholung von ein und demselben Experiment ist demnach selbst bei gleichen Umgebungsbedingungen eine unterschiedliche Trefferanzahl zu erwarten.

Mittels Poisson-Verteilung $p_i(\lambda)$ (siehe Kap. 2.3.3) kann die Wahrscheinlichkeit angegeben werden, dass bei einem Experiment genau i Ereignisse auftreten. Dabei muss die mittlere Anzahl von zu erwartenden Ereignissen λ bekannt sein. Diese Anzahl ergibt sich aus der Photonenbelichtung pro Flächeneinheit $\int I dt$ des Lichtstimulus' und der aktiven Gesamtfläche aller Rezeptoren einer Zelle $\sigma\Phi n_{Rez}$. Für einen kurzen Lichtpuls der Dauer τ bei $t = 0s$ ergeben sich die folgenden Beziehungen:

$$\lambda = I\tau \cdot \sigma\Phi n_{Rez} \quad (5.6)$$

$$p_i(\lambda) = \frac{(I\tau \cdot \sigma\Phi n_{Rez})^i}{i!} e^{-I\tau \cdot \sigma\Phi n_{Rez}} \quad ; \quad i \in \{0, 1, 2, \dots\}. \quad (5.7)$$

Im Falle der niedrigsten Photonenbelichtung bei den Experimenten mit Blaulicht Einfach- und Doppelpulsen (Kap. 5.1.2) ist in der Abbildung 5.10 die Wahrscheinlichkeit für die Anzahl der Treffer aufgetragen. Dabei wurden 430 Moleküle SRII pro Zelle [MMG⁺93] und eine aktive Rezeptorfläche von $\sigma\Phi = 1,47 \cdot 10^{-20} m^2$ [MO90, MO99] angenommen. Weiterhin wurde von einer Photonenbelichtung von $I_{bl}\tau = 1,065 \cdot 10^{18} \frac{h\nu}{m^2}$ ausgegangen. Dieser Wert berücksichtigt die in [MO87] angegebene Lichtmenge und eine relative Rezeptoreffektivität von 20% bei der benutzten Wellenlänge von 520nm [MO87]. Damit ergibt sich eine mittlere Trefferanzahl von $\lambda = 6,7 \frac{h\nu}{Zelle}$. Die Schwankungsbreite ist hier bereits enorm. In 4,7% aller Experimente wurden nur 3 oder weniger Rezeptoren getroffen! Allerdings haben bei diesen Experimenten trotzdem alle Zellen auf den Stimulus reagiert [W. Marwan]. Unterhalb dieser Lichtmenge wird die Antwort der Zellen stochastisch. D.h. es gibt Zellen, die

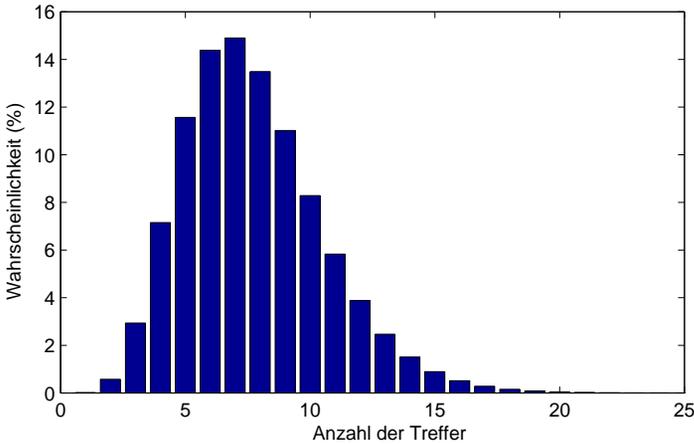


Abb. 5.10: *Wahrscheinlichkeit der Anzahl aktivierter SRII-Rezeptoren bei einem schwachen Blaulicht-Puls $I_{bl}\tau = 1,065 \cdot 10^{18} \frac{h\nu}{m^2}$ ($\sigma\Phi = 1,47 \cdot 10^{-20} m^2$, $n_{Rez} = 430$).*

mit einer vorzeitigen Umkehr auf einen Schreckreiz reagieren und welche, die den Reiz ignorieren und wie bisher weiterschwimmen. Bei einer solchen niedrigen Photonenbelichtung ist es deshalb unausweichlich, die Wahrscheinlichkeit für die genaue Trefferanzahl zu berücksichtigen.

5.2.1 Messung der Dosis-Wirkungs-Kurve

Experimente mit kurzen Blaulicht-Pulsen sehr niedriger Intensität sind von Marwan et al. [MHO88] durchgeführt worden. Sie benutzten dabei Pulse von $50ms$ Dauer, die sie $2s$ nach einer spontanen Umkehr der betrachteten Zelle applizierten. Durch diese zeitliche Synchronisation auf das Umschalteereignis befindet sich die zu messende Zelle bei der Stimulation mit großer Sicherheit in einem gut definierten Zustand am Anfang der Kompetent-Phase.

In Abhängigkeit von der Lichtintensität wurde nun beobachtet, ob eine Zelle auf das Schrecksignal innerhalb von wenigen Sekunden reagiert oder nicht. Schließlich wurde der Anteil der reagierenden Zellen R gegen die Lichtintensität in einem halblogarithmischen Maßstab aufgetragen. Der Verlauf der Messwerte zeigt die Charakteristik eines Poisson-Prozesses. Die beste Übereinstimmung wurde für $n \geq 1$ Ereignisse gefunden (Abb. 5.11). Das bedeutet, dass ein einziger aktivierter Rezeptorkomplex ausreicht, um eine vorzeitige Umkehr der Zelle zu bewirken.

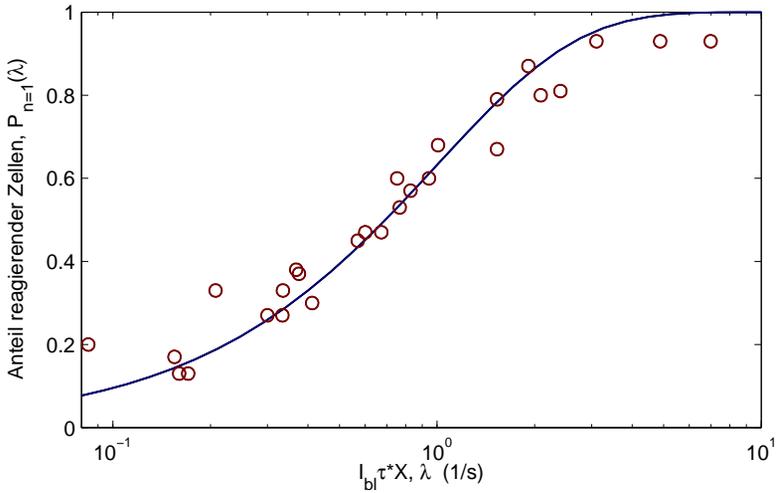


Abb. 5.11: Reaktion auf einen schwachen Blaulicht-Puls. Kreise: Messungen des Anteils R der Zellen, die auf einen schwachen Blaulicht-Puls $I_{bl}\tau$ innerhalb von wenigen Sekunden mit einer Richtungs-umkehr reagiert haben. Die Lichtmenge ist mit dem Faktor X so normiert, dass bei $I_{bl}\tau X = 1$ etwa 63% der Zellen reagieren. Die Messungen stammen aus [MHO88]. Durchgezogene Linie: Berechnete Kurve $\hat{P}_{n=1}(\lambda)$ für die Wahrscheinlichkeit von $n \geq 1$ Ereignissen bei einer mittleren Wahrscheinlichkeit von λ Ereignissen.

Laut Poisson-Verteilung werden bei einer mittleren Trefferwahrscheinlichkeit von $\lambda = 1 \frac{h\nu}{Zelle}$ genau 63,2% der Zellen mit $n = 1, 2, 3$ oder mehr Photonen getroffen. Die Lichtmenge, die für eine 63 prozentige Reaktion aller Zellen benötigt wird, betrug im Experiment in etwa $I_{bl}\tau = 4,89 \cdot 10^{18} \frac{h\nu}{m^2}$. In Abb. 5.11 sind Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen gemeinsam aufgetragen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Der genaue Wert der benötigten Lichtmenge für eine 63 prozentige Reaktion zeigte von Tag zu Tag eine geringe Schwankung. Deshalb wurden die Messwerte so entlang der x-Achse verschoben, dass sie möglichst gut übereinander lagen. Durch die halb-logarithmische Darstellung bleibt die Form des Messwertverlaufs durch die Verschiebung unverändert. Ein Grund für die schwankende absolut benötigte Lichtmenge kann eine Änderung der absoluten Anzahl von Rezeptorkomplexen bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen sein. Wie stark die

Wirkung eines Lichtstimulus' von Experiment zu Experiment schwankt, sieht man auch schon im Vergleich der Lichtmenge für eine 63 prozentige Reaktion zu der niedrigsten Lichtmenge bei Blaulicht Einzel- und Doppelpulsen. Dort bewirkte eine ca. 4-fach geringere Lichtintensität noch das Umschalten von (nahezu) 100% der Zellen.

Wenn bei einer Lichtmenge von $I_{bl}\tau = 4,89 \cdot 10^{18} \frac{h\nu}{m^2}$ im Mittel genau 1 Rezeptor getroffen wird, so kann man schließlich mit (5.6) berechnen, dass in diesen Zellen nur 14 aktivierbare Rezeptoren vorhanden sein sollten. Dabei wurden die vorher genannten Parameter für die effektive Fläche der Rezeptoren σ und die Photoneneffektivität Φ zugrunde gelegt. Berücksichtigt man noch Schwankungen der Parameter, so kann man davon ausgehen, dass nur etwa jeder 10-te bis 30-ste Rezeptorkomplex die Signalkaskade erfolgreich stimulieren kann [MHO88].

5.2.2 Anzahl aktivierbarer Rezeptoren im Modell

Die Frage ist also, wie viele 'aktivierbare' Rezeptoren einer Zelle entsprechen einer vollen Stimulation in dem Modell? Oder anders ausgedrückt: Wenn man durch einen starken Lichtreiz alle Blaulichtrezeptoren SRII einer Zelle aktiviert - wie viele der 430 Rezeptoren aktivieren dann erfolgreich die Signalkaskade?

Diese Frage soll anhand eines Experiments mit einem schwachen Blaulicht-Puls behandelt werden. Marwan und Oesterhelt [MO87] haben die Häufigkeitsverteilung der Umkehrzeiten bei Stimulation mit einem schwachen, kurzen Blaulicht-Puls gemessen. Der Puls wurde 5s nach einer spontanen Umkehr einer Zelle appliziert und die Dauer bis zur nächsten Umkehr ausgewertet.

Für diese Messungen (wie auch für die Messungen in Kap. 5.2.1) wurden besondere Einzelklone verwendet, die wegen ihrer geringen Umschalthäufigkeit im spontanen Fall ausgewählt wurden [W. Marwan]. Diese Klone schalten im Mittel nur alle 22s ihre Drehrichtung um, während die von Hildebrand und Schimz verwendeten Zellen zur Messung der spontanen Umschalthäufigkeit alle 11,6s umkehren (vergleiche Kap. 4.3.6). Beobachtet man solche Klone über mehrere Generationen hinweg, gleicht sich die spontane Umschalthäufigkeit wieder an das durchschnittliche Verhalten an [W. Marwan].

Um dieser verringerten Umschalthäufigkeit gerecht zu werden, wird im Modell der Parameter der Demethylierungsgeschwindigkeit auf $k_{dem}^* = 1,59 \cdot k_{dem}$ vergrößert. Damit stellt sich im stationären Fall eine Aktivität $A < 1$ ein und bewirkt eine ebenfalls geringere CheYP-Konzentration, was schließlich zu einer mittleren Umschalthäufigkeit von 22s führt. Zusätzlich wird im Modell noch die Geschwindigkeitskonstante in der Aktiv-Phase auf $k_{sw}^* = 2,5 \frac{1}{s}$

um einen Faktor 2,8 gegenüber der bisherigen Einstellung verringert. Dadurch lässt sich eine deutlich bessere Übereinstimmung von Simulation und Messung erreichen.

430 aktivierbare Rezeptoren

Im ersten Schritt soll angenommen werden, dass tatsächlich alle der 430 Moleküle SRII einer Zelle aktivierbar sind. Ein einzelner aktivierter Rezeptor stellt also nur ein $\frac{1}{430}$ -stel Teil der Gesamtmenge von SRII-Rezeptoren dar.

Die Simulationen für eine Stimulation mit einem schwachen Blaulicht-Puls werden folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wird die Wahrscheinlichkeitsdichte eines Umschaltereignisses für eine ganzzahlige Anzahl von Treffern bei $t = 5s$ simuliert. Auf der linken Seite in Abb. 5.12 sind die Simulationsergebnisse für 0 bis 4 Treffer abgebildet, was in diesem Fall einer SRII-Stimulation von $\frac{0}{430}$ -stel bis $\frac{4}{430}$ -stel entspricht.

In der Realität kann man allerdings nicht wissen, wie viele Rezeptoren genau bei einem Experiment durch den jeweiligen Stimulus getroffen wurden. Deshalb müssen nun die Simulationsergebnisse für die Einzeltreffer entsprechend ihrer Wahrscheinlichkeit bei einem Mittelwert von λ aufsummiert werden. So müssen z.B. für eine mittlere Trefferwahrscheinlichkeit von $\lambda = 1 \frac{h\nu}{Z_{elle}}$ die Wahrscheinlichkeitsdichten für genau 0, 1, 2, 3, ... Treffer mit den Gewichten 36,8%, 36,8%, 18,4%, 6,1%, ... addiert werden. Die Ergebnisse sind auf der rechten Seite in Abb. 5.12 zu sehen. Je größer die applizierte Lichtmenge und damit die mittlere Trefferwahrscheinlichkeit wird, desto mehr verschiebt sich die Häufigkeitsverteilung der Antwortzeiten erwartungsgemäß zu kürzeren Reaktionszeiten hin. Allerdings ist keine deutliche Trennung der Wahrscheinlichkeitsdichte in getroffene und nicht getroffene Zellen zu sehen, wie es bei der gemessenen Häufigkeitsverteilung der Fall ist. Der Grund dafür liegt darin, dass sich die Wahrscheinlichkeitsdichte für genau einen Treffer nicht stark genug von der für keinen Treffer unterscheidet. Ein einzelner Rezeptor muss also einen deutlich größeren Effekt verursachen als $\frac{1}{430}$ -stel des maximalen Effekts. Deshalb wird in einem zweiten Schritt die Gesamtzahl aktivierbarer Rezeptoren verringert, damit ein einzelner Rezeptor eine größere Wirkung auf das Schaltsignal hat.

22 aktivierbare Rezeptoren

Die optimale Übereinstimmung von Mess- und Simulationsergebnissen wurde für eine Anzahl von 22 aktivierbaren Rezeptoren erreicht. In Abb. 5.13 sind wiederum die Wahrscheinlichkeitsdichten eines Umschaltereignisses für eine ganzzahlige Anzahl aktivierter Rezeptoren bei $t = 5s$ (linke Seite) und die daraus berechnete Reaktion auf schwache Lichtpulse (rechte Seite) dargestellt. Man sieht deutlich, dass nun ein einzelner Rezeptor einen sehr viel

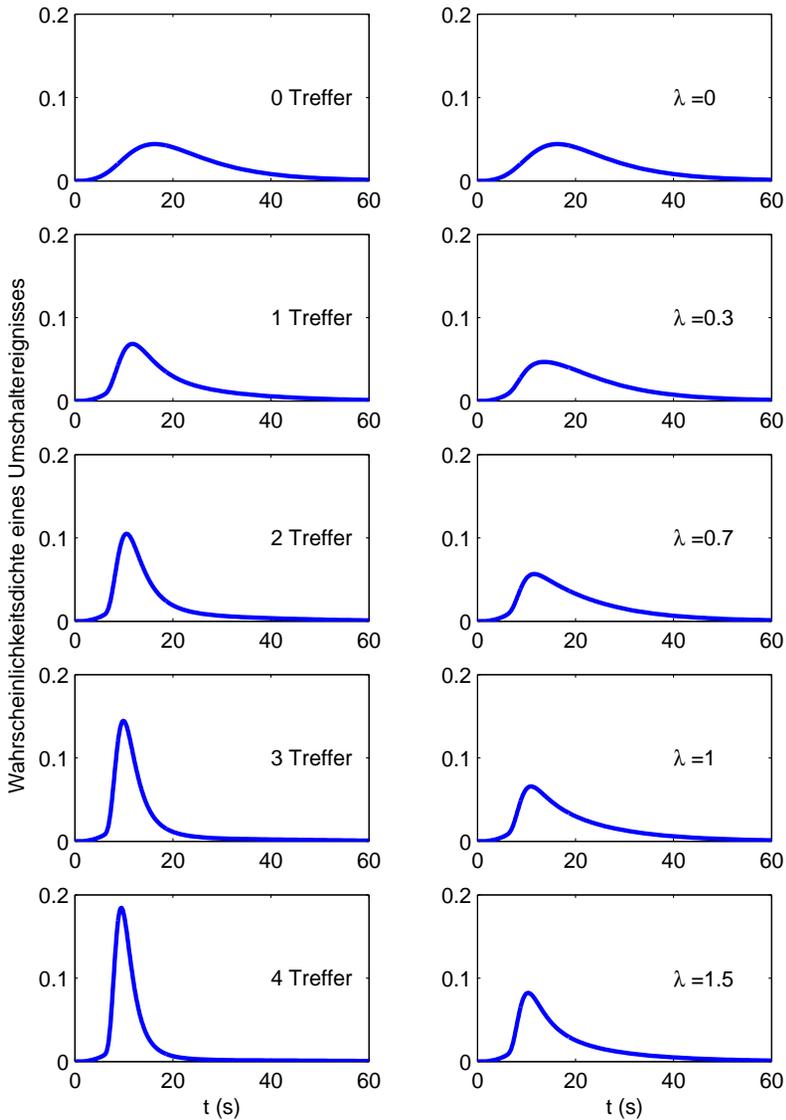


Abb. 5.12: Simulationsergebnisse für einzelne aktivierte Rezeptoren aus einer Gesamtheit von 430 aktivierbaren Rezeptoren. Linke Seite: Ganzzahlige Treffer bei $t = 5\text{s}$. Rechte Seite: daraus mittels Poisson-Verteilung berechnete Reaktionen auf schwache Lichtstimulation, wobei λ die mittlere Anzahl getroffener aktivierbarer Rezeptoren angibt.

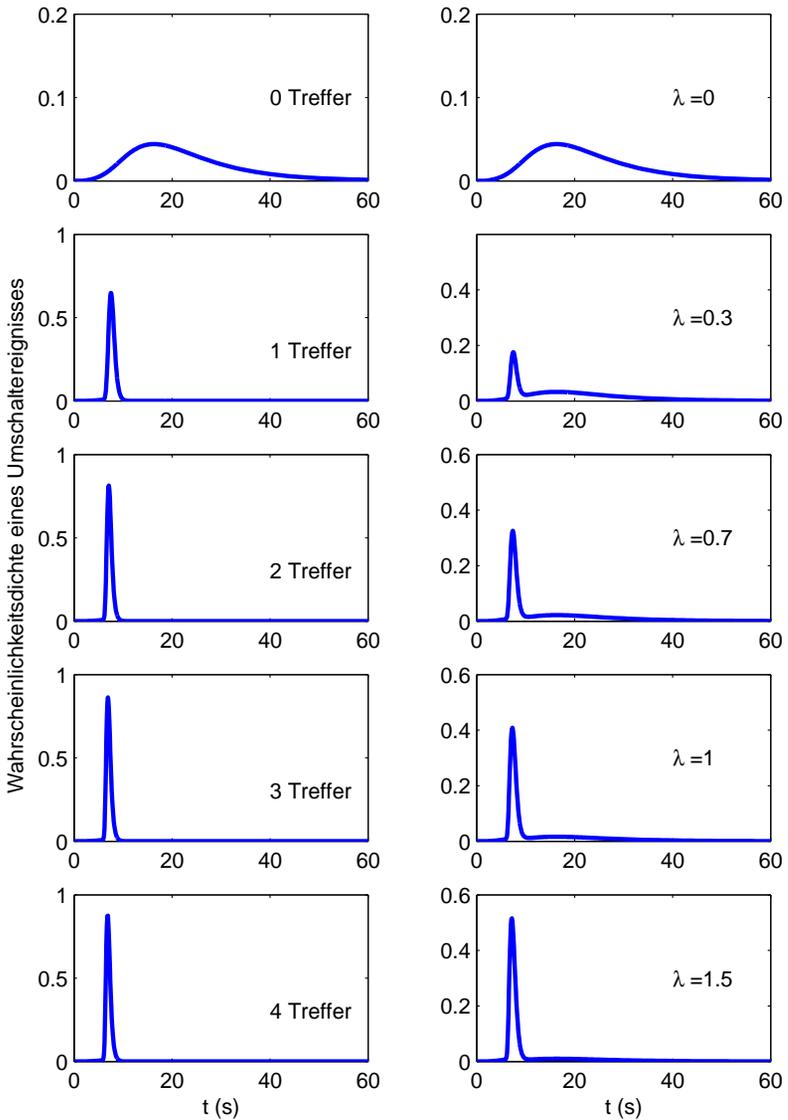


Abb. 5.13: Simulationsergebnisse für einzelne aktivierte Rezeptoren aus einer Gesamtheit von 22 aktivierbaren Rezeptoren. Linke Seite: Ganzzahlige Treffer bei $t = 5\text{s}$. Rechte Seite: daraus mittels Poisson-Verteilung berechnete Reaktionen auf eine schwache Lichtstimulation, bei der im Mittel λ aktivierbare Rezeptoren getroffen werden.

größeren Effekt ausübt (man beachte die zu Abb. 5.12 geänderte Achsenskalierung). Nun erkennt man auch bei der lichtinduzierten Wahrscheinlichkeitsdichte z.B. für $\lambda = 0,3 \frac{h\nu}{Zelle}$ oder $\lambda = 0,7 \frac{h\nu}{Zelle}$ eine Einschnürung bei 10s, mit deren Hilfe man getroffene von nicht getroffenen Zellen unterscheiden kann. Die experimentell ermittelte Häufigkeitsverteilung wird vom detaillierten Schaltermodell mit sehr guter Übereinstimmung für $\lambda = 0,636 \frac{h\nu}{Zelle}$ wiedergegeben (siehe Abb. 5.14).

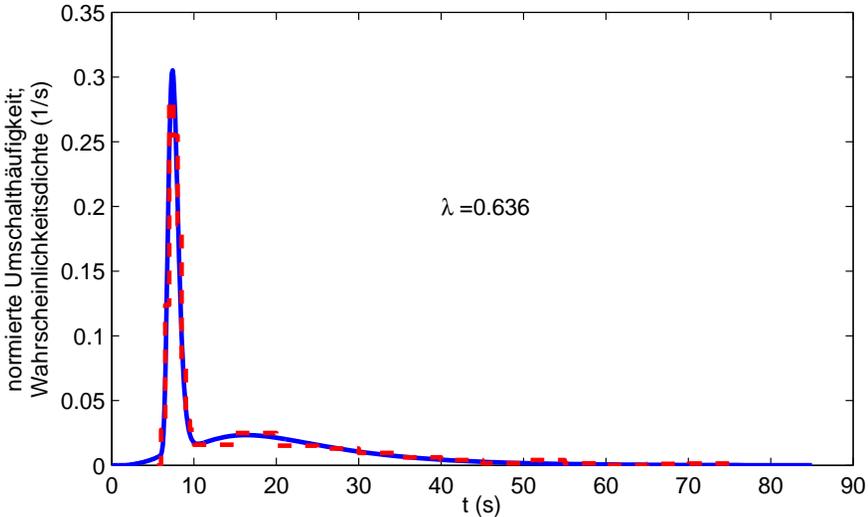


Abb. 5.14: *Simulation (durchgezogene Linie) und Messung (gestrichelte Linie) bei Stimulation durch einen schwachen Blaulicht-Puls ($\lambda = 0,636 \frac{h\nu}{Zelle}$) bei $t = 5s$. In der Simulation wurde angenommen, dass volle Stimulation von SRII 22 aktivierten Rezeptoren entspricht. Die Messwerte stammen aus [MO87].*

5.2.3 Simulation der Dosis-Wirkungs-Kurve synchronisierter Zellen

Mit den oben bestimmten Parametern für Klone mit verminderter spontaner Schalthäufigkeit und der Annahme, dass 22 aktivierbare Rezeptoren für die Excitation zuständig sind, wird nun die Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet. Die experimentellen Ergebnisse sind bereits in Kap. 5.2.1 diskutiert worden. Im Unterschied zu den Experimenten im vorigen Kapitel wurden die Zellen

hier allerdings nicht erst nach $5s$, sondern schon $2s$ nach einer spontanen Umkehr mit einem Lichtpuls stimuliert. Hat eine Zelle innerhalb von $4s$ nach dem Lichtpuls mit einer Richtungsumkehr geantwortet, so wurde sie als reagierende Zelle gezählt. Die Ergebnisse der Simulation sowie der Experimente sind in Abb. 5.15 gezeigt.

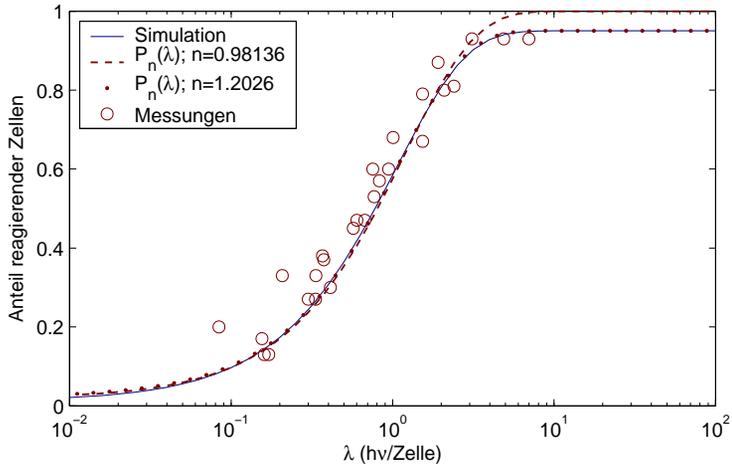


Abb. 5.15: *Simulierte Dosis-Wirkungs-Kurve für 22 aktivierbare Rezeptoren (durchgezogene Linie). An die Simulationsergebnisse wurde die theoretische Poisson-Charakteristik $\hat{P}_n(\lambda)$ für n minimal benötigte Treffer für zwei Fälle angepasst. Zum einen ohne (gestrichelte Linie) und zum anderen mit Berücksichtigung der minimal und maximal reagierenden Zellen R_{min} und R_{max} (gepunktete Linie). Die Messungen (Kreise) stammen aus [MHO88].*

Selbst bei maximaler Lichtintensität wurde bei nur ca. $R_{max} = 95\%$ der Zellen eine Umkehrreaktion beobachtet. Das gleiche Verhalten zeigt das Modell. Grund dafür ist, dass $2s$ nach der letzten spontanen Richtungsumkehr die Refraktär-Phase noch nicht bei allen Zellen abgeschlossen ist und eine erhöhte CheYP-Konzentration während der Refraktär-Phase den Übergang in die Kompetent-Phase blockiert. Dadurch können sie nicht sofort auf den Reiz reagieren, obwohl sie ihn registriert haben. Somit werden sie nicht als umkehrende Zellen registriert.

In der Simulation reagieren ca. $R_{min} = 2\%$ der Zellen auch ohne Blaulicht-Puls während $t = 2 \dots 6s$. Der Grund dafür liegt in der Wahrscheinlichkeitsdichte der spontanen Umkehrreaktion, dessen Integral über diesen Zeitraum

bereits 2% erreicht. Bei den Messungen kann man nur vermuten, dass hier ebenfalls ein paar Zellen bereits spontan die Schwimmrichtung umschalten.

Passt man nun die theoretisch berechnete Wahrscheinlichkeit für minimal n zum Umkehren benötigter Ereignisse $\hat{P}_n(\lambda)$ auf die Simulationsergebnisse an, hat man zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man die Kurve auf die Rohdaten anpassen, wie es z.B. in Abb. 5.11 gemacht wurde. In diesem Fall ergibt sich eine optimale minimale Anzahl zum Umkehren benötigter Ereignisse von $n = 0,98 \approx 1$, wie es auch die Auswertung in [MHO88] ergeben hat. Zum anderen kann man auch die minimal und maximal mögliche Umkehrreaktion R_{min} und R_{max} der Zellen berücksichtigen und die Kurve:

$$R' = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R_{min}} \quad (5.8)$$

an eine Poisson-Charakteristik anpassen, wobei R der gemessene Anteil reagierender Zellen ist. Bei diesem Ansatz ergibt sich ein Optimum von minimal $n = 1,2$ Photonentreffer pro Zelle.

5.2.4 Experimente mit unsynchronisierten Zellen

Ähnliche Experimente an unsynchronisierten Zellen wie die oben beschriebenen liegen von W. Staudinger vor. Bei diesen Experimenten werden Populationen von Zellen (ca. 10 Stück bei einer Messung) beobachtet, die sich alle in einem zufälligen Zustand des Schaltprozesses befinden. Nach Stimulation mit einem Blaulicht-Puls von $100ms$ Dauer und variabler Intensität wird nun ausgewertet, wie groß der Anteil R der Zellen ist, der innerhalb von $3s$ seine Schwimmrichtung umschaltet. Der Beobachtungszeitraum ist eigentlich $5s$ lang. Der computerbasierte Algorithmus, der die Richtungsumkehr automatisch erkennt, braucht allerdings eine Beobachtungszeit von ca. $1s$ vor und nach einem Ereignis, um es eindeutig erkennen zu können. Deshalb wird die Messung schon $1s$ vor dem Stimulus gestartet und nur die nächsten $3s$ ausgewertet.

Im Gegensatz zu den Experimenten von McCain et al. (Kap. 5.1.4) wird bei diesen Experimenten nur ein einziges Umschaltereignis einer Zelle gemessen. Deshalb wird hier auch nicht von einer Umschaltfrequenz f gesprochen, sondern von dem Anteil umkehrender Zellen R . Genau wie bei den Experimenten von McCain et al. kehrt auch hier im Beobachtungszeitraum ein Teil R_{min} der Zellen bereits im adaptierten Fall (ohne Stimulus) die Schwimmrichtung

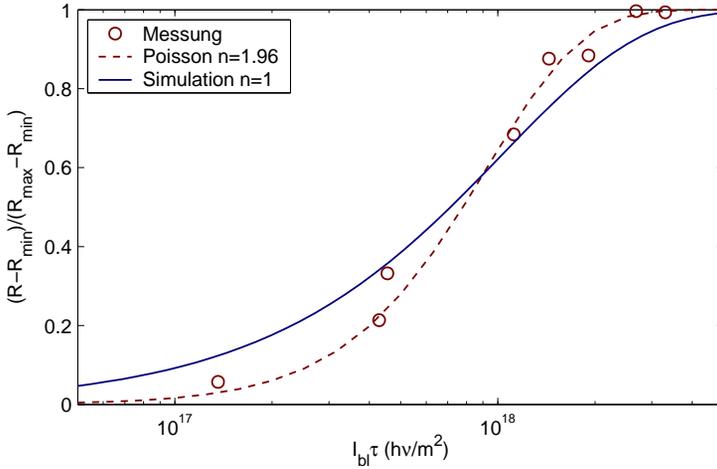


Abb. 5.16: Dosis-Wirkungs-Kurve von unsynchronisierten Zellen. Die Simulationsergebnisse beschreiben eine Poisson-Charakteristik $\hat{P}_n(\lambda)$ mit $n = 1$. Damit Messung und Simulation im selben Bereich liegen, musste die Simulation mit der 3-fachen Lichtmenge durchgeführt werden wie im Diagramm angegeben ist. Die Messungen sind an D1-Zellen am 26.6.2004 und 28.6.2004 von W. Staudinger durchgeführt worden.

um. Da nur ein Ereignis gezählt wird, berechnet sich dieser Anteil zu:

$$R_{adp}(t) = \int_0^t f \cdot (1 - R_{adp}(\tau)) \cdot d\tau \quad ; \quad R_{adp}(t = 0) = 0 \quad (5.9)$$

$$R_{min} = R_{adp}(t = 3s) = 1 - e^{-f \cdot 3s} \approx f \cdot 3s. \quad (5.10)$$

Näherungsweise ist die Approximation zulässig, weil der Beobachtungszeitraum von $3s$ deutlich kürzer ist als die mittlere Intervalldauer $T_{sp} = 1/f \approx 11s$ und damit die e -Funktion als Gerade angenähert werden kann. In Abb. 5.16 sind zwei Experimente vom 26.6.2004 und 28.6.2004 zusammengefasst, um eine größere Datenbasis und damit weniger Streuung in den Messwerten zu bekommen. In diesem Fall war $R_{min} = 23\%$, damit ergibt sich eine mittlere Intervalldauer von $T_{sp} = 11,5s$. Auch bei maximal starker Stimulation reagieren nicht alle Zellen innerhalb von $3s$. Bei diesen Messungen war dieser Anteil $R_{max} = 93\%$. Die nicht reagierenden Zellen müssen zum Zeitpunkt der Stimulation in der Refraktär-Phase gewesen sein. Deren mittlere Länge

berechnet sich aus diesem Messergebnis wie folgt:

$$\tau_{Ref} = \frac{1 - R_{max}}{f}. \quad (5.11)$$

Für $R_{max} = 93\%$ ergibt sich eine mittlere Dauer der Refraktär-Phase von $\tau_{Ref} = 0,8s$. Da bei diesen Experimenten keine extrem selten umschaltenden Zellen verwendet wurden, wird auch der 'normale' Parametersatz für die Simulation verwendet. In der Simulation ergab sich $R_{min} = 26\%$ und $R_{max} = 90\%$, was einer mittleren Intervalldauer $T_{sp} = 10s$ und $\tau_{Ref} = 1s$ entspricht.

Die Messungen zeigen eine Poisson-Charakteristik $\hat{P}_n(\lambda)$ mit $n = 1,96$. Bei denselben Werten von R_{min} und R_{max} weist die Messung vom 26.6.2004 eine Charakteristik von $n = 2,17$ und die Messung vom 28.6.2004 $n = 2,8$ auf. Diese Werte sind allerdings sehr stark von dem genauen Wert von R_{min} und R_{max} abhängig. Wie stark diese Abhängigkeit ist, verdeutlicht folgende Tabelle:

Anpassung der Messdaten auf eine Poisson-Charakteristik						
$\hat{P}_n(\lambda)$ für unterschiedliche R_{min} und R_{max}						
R_{min}	20%	20%	23%	20%	26%	26%
R_{max}	100%	95%	93%	90%	95%	90%
n	1,82	1,96	1,96	2,5	3,75	3

Trotz dieser großen Schwankung liegen alle Werte deutlich über $n = 1$. Woher dieser Unterschied zu den vorigen Messungen und auch zur Simulation kommt, ist allerdings nicht klar. In Abb. 5.17 sieht man den Vergleich der gemessenen Häufigkeitsverteilungen bei einer bestimmten Lichtmenge zu der entsprechenden Wahrscheinlichkeitsdichte der Simulation. Im Rahmen der Messgenauigkeit erkennt man eine gute Übereinstimmung, auch wenn die Zellen im allgemeinen etwas früher reagieren als es das Modell vorhersagt.

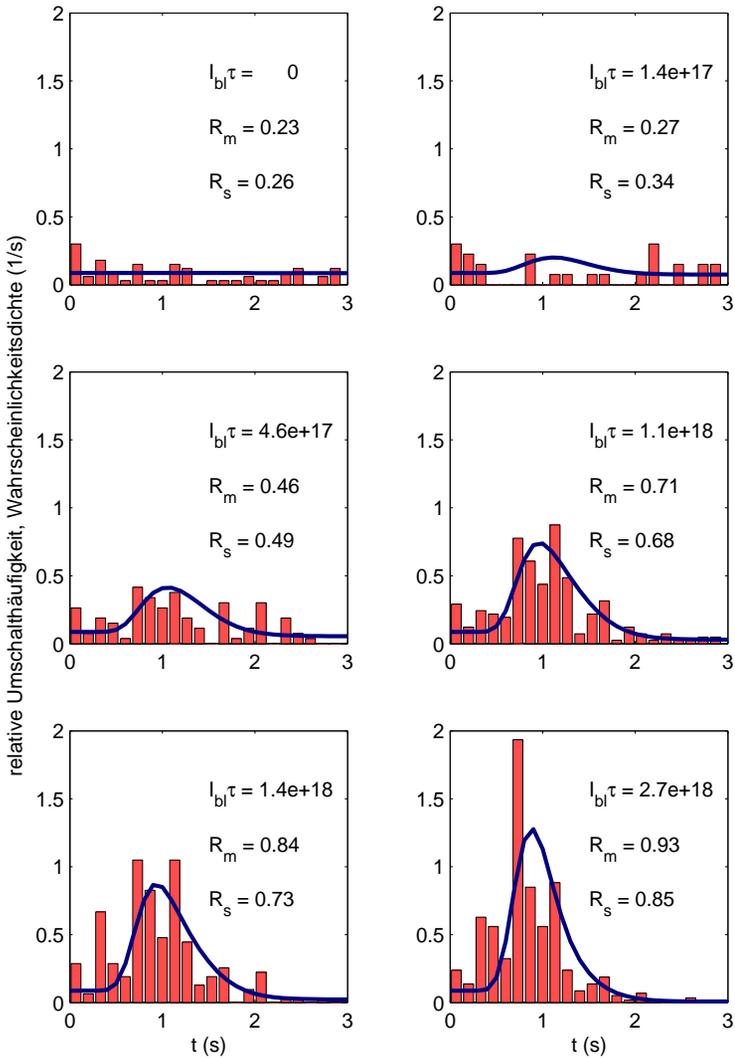


Abb. 5.17: Häufigkeitsverteilung (Messung) und Wahrscheinlichkeitsdichte (Simulation) von Umschaltereignissen bei schwacher Blaulichtstimulation unsynchronisierter Zellen. Die applizierte Lichtmenge $I_{bl}\tau$ ist in jedem Teilbild angegeben. Die Simulation wurde mit einem 3-fach höheren Wert durchgeführt. R_m und R_s geben den Anteil reagierender Zellen in der Messung bzw. in der Simulation an. Den Häufigkeitsverteilungen liegen dieselben Messungen zugrunde wie in der vorigen Abbildung.

6 Diskussion

6.1 Modellierungsansatz

Die Modellierung der Phototaxis unterscheidet sich in einem wichtigen Punkt grundlegend von anderen systembiologischen Projekten, wie z.B. der Modellierung von Stoffwechselfvorgängen in einer Zelle [GKN⁺03]. Der Unterschied zu einem solchen System liegt darin, dass bei der Phototaxis das Verhalten eines einzelnen Proteinkomplexes, des Motorkomplexes, beschrieben werden muss, während bei Stoffwechselfvorgängen im Allgemeinen eine große Menge von Molekülen betrachtet wird. Demnach reicht dort eine Beschreibung des mittleren Verhaltens völlig aus, während es bei der Betrachtung von einem einzelnen Molekülkomplex wichtig ist, mit welcher Wahrscheinlichkeit er sich in welchem Zustand befindet.

Dementsprechend wurde während dieser Arbeit ein detailliertes Modell für den Schaltkomplex hergeleitet, das die stochastische Natur einzelner Ereignisse erfasst. Dieses Modell beschreibt den Schaltvorgang als Markov-Prozess. Es existieren mehrere Funktionszustände (Phasen) des Prozesses, in denen der Schaltkomplex mit bis zu 44 Molekülen CheYP komplexiert sein kann. Die Wahrscheinlichkeit für einen bestimmten Belegungsgrad beeinflusst schließlich den Ablauf des Schaltprozesses.

In Verbindung mit einem einfachen Modell für die Excitation und die Adaptation ist dieses Modell in der Lage, viele Experimente quantitativ korrekt wiederzugeben. So stimmt z.B. die Wahrscheinlichkeitsdichte der Dauer einer Schwimmphase sowohl im spontanen als auch im stimulierten Fall mit den gemessenen Häufigkeitsverteilungen überein (siehe Kap. 5.1.1). Ebenso beschreibt das Modell auch exakt die Reaktion auf Blaulicht Einfach- und Doppelpulse nach der Refraktär-Phase (siehe Kap. 5.1.2).

6.2 Rolle der Refraktär-Phase

Bei Stimulation während der Refraktär-Phase treten einige, auf den ersten Blick nicht sofort erklärbare Phänomene auf. So ist die Refraktär-Phase z.B.

für die inverse Antwort auf einen kurzen Lockreiz nach einem zuvor applizierten Schrecksignal verantwortlich (Kap. 5.1.4). Ebenso kann sie erklären, wie es möglich ist, dass in Folge eines sprungförmigen Schreckreizes die Dauer von nur einer einzigen Schwimmphase verkürzt ist und danach wieder im Mittel den spontanen Wert annimmt [HS85]. Scheinbar ist die Zelle also bereits wieder nach der ersten induzierten Schwimmrichtungsumkehr perfekt an einen sprungförmigen Reiz adaptiert. Dieses Verhalten wird allerdings nicht dadurch erreicht, dass die Schaltsignalkonzentration nach der ersten Schreckantwort des Motors schon wieder den adaptierten Wert erreicht hat. Vielmehr benötigt die Adaptation des Schaltsignals mehrere Sekunden und ist außerdem unabhängig von dem tatsächlichen Umschaltzeitpunkt des Motors. Während dieser Zeit kehren die Zellen jedoch nur ein einziges Mal die Schwimmrichtung auch tatsächlich um, weil sie bei einer stark erhöhten CheYP-Konzentration in der Refraktär-Phase festgehalten werden. Ist die CheYP-Konzentration nur noch leicht erhöht, kann der Schaltkomplex in die Kompetent-Phase umschalten, die jetzt aber schneller durchlaufen wird. Dadurch benötigen beide Phasen zusammen im Mittel genauso lange wie im adaptierten Fall, obwohl die Adaptation von CheYP während dieser Schwimmphase noch nicht abgeschlossen ist. Das Modell beschreibt sowohl diese Experimente als auch die inverse Antwort auf einen Lockreiz qualitativ richtig.

6.2.1 Alternatives Schaltermodell

Die genaue Häufigkeitsverteilung der Dauer einer durch die Refraktär-Phase verlängerten Schwimmperiode wird durch das Modell jedoch leider nicht exakt beschrieben wie man im Vergleich mit den Messungen von Krohs sehen kann (siehe Kap. 5.1.3). Ein Grund dafür könnten noch nicht absolut gesicherte Modellparameter sein. Die Modellparameter wurden zwar unter anderem auch mit einem genetischen Algorithmus optimiert, der durch eine zufällige Komponente einen möglichst großen Parameterraum absucht. Aber auch mit diesem Ansatz ist es nicht sicher, das globale Optimum zu finden. Ein anderer Grund könnte aber auch sein, dass die Struktur des Modells noch verändert werden muss. Deshalb soll im Folgenden ein alternativer Modellvorschlag diskutiert werden.

Ein alternatives Modell des Schaltkomplexes könnte z.B. *zwei* Bindungsstellen je Untereinheit besitzen. Dadurch wäre es möglich, dass die Refraktär- und Kompetent-Phase an den zwei Bindungsstellen einer Untereinheit gleichzeitig ablaufen würden. Nach einer Richtungsumkehr würde an den 'refraktären' Bindungsstellen des Schaltkomplexes, die in der vorigen Schwimmrichtung in der Kompetent-Phase waren, die Hydrolyse von CheYP und die anschließende Dissoziation beginnen. Zur gleichen Zeit könnte an den

anderen Bindungsstellen schon die Kompetent-Phase ablaufen, indem diese Bindungsstellen vermehrt mit CheYP assoziieren. Durch diesen Mechanismus könnte bei einer hohen Schaltsignalkonzentration die Kompetent-Phase bereits abgeschlossen sein, bevor die Refraktär-Phase beendet ist. Eine Aktivierung des Umschaltvorgangs würde aber erst dann erfolgen, wenn beide Phasen abgeschlossen sind. Dadurch ergäbe sich eine zum jetzigen Modell veränderte Häufigkeitsverteilung von Schaltereignissen nach einer Schreckreiz-induzierten Umkehr, die eventuell die experimentellen Ergebnisse von Krohs besser beschreiben könnte.

6.3 Dephosphorylierung von CheYP

Das bisherige Modell der Excitation und Adaptation geht davon aus, dass die Schaltsignalkonzentration im adaptierten Fall konstant ist. Weiterhin existiert keinerlei Rückkopplung des Motormodells auf die CheYP-Konzentration, weil angenommen wird, dass diese Konzentration hauptsächlich von den *tausenden* Rezeptorkomplexen einer Zelle bestimmt wird und damit die Rückwirkung des *einen* Motorkomplexes dementsprechend gering ist. Allerdings ist bei Halobakterien die Frage, wo und wie CheYP dephosphoryliert wird, noch nicht geklärt, da Halobakterien im Gegensatz zu *E. coli* nicht über eine Phosphatase CheZ verfügen. Das Motormodell legt jedoch nahe, dass die Dephosphorylierung von CheYP zumindest teilweise während der Refraktär-Phase am Motor stattfindet. Wenn dies die einzigste Senke von CheYP wäre, könnte der Motor doch eine spürbare Rückwirkung auf die CheYP-Konzentration ausüben. In dem jetzigen detaillierten Modell würde demnach die Konzentration während der Refraktär-Phase fallen und in der Kompetent-Phase wieder ansteigen. Damit hätte das Modell Ähnlichkeiten mit dem von Hildebrand und Schimz vorgestellten Oszillatormodell (vergleiche Kap. 4.2.1). Dieser Effekt wäre allerdings bei dem im vorigen Kapitel angedachten alternativen Schaltermodell deutlich geringer, weil sich dort eine der zwei verschiedenen Bindungsstellen immer in der Refraktär-Phase befindet.

6.4 Excitation auf schwache Lichtpulse

Die gemessene Häufigkeitsverteilung von Intervalllängen bei Stimulation mit einem schwachen Blaulicht-Puls wird durch das Modell sehr gut beschrieben (siehe Abb. 5.14). Dazu musste die Annahme getroffen werden, dass nur etwa

22 der ca. 430 Photorezeptoren SRII einer Zelle die Signalkaskade auch erfolgreich aktivieren können. Diese Annahme bewirkt, dass unter Beibehaltung des optimierten Parametersatzes die Wirkung eines einzelnen Rezeptors aus nur 22 Rezeptoren größer ist, als die Wirkung von einem aus 430 Rezeptoren. Diese Annahme stimmt mit der Schlussfolgerung aus [MHO88] überein, dass nur etwa jeder 10-te bis 20-ste Rezeptor aktivierbar ist.

Die große Wirkung eines einzelnen Rezeptorkomplexes ist nötig, um die Häufigkeitsverteilung von Intervalllängen von getroffenen und nicht getroffenen Zellen unterscheiden zu können, wie es z.B. in Abb. 5.14 der Fall ist. Diese Unterscheidbarkeit von reagierenden und nicht reagierenden Zellen ist die Voraussetzung dafür, eine Dosis-Wirkungs-Kurve überhaupt messen zu können, weil hier eben gerade der Anteil reagierender Zellen in Abhängigkeit der Reizstärke aufgetragen wird.

Die experimentell gemessenen Häufigkeitsverteilungen zeigen aber, dass diese Voraussetzung gegeben ist. Marwan et al. [MHO88] haben die Dosis-Wirkungs-Kurve an synchronisierten Zellen gemessen. Ein Vergleich mit der Poisson-Charakteristik ergab schließlich, dass unter den gewählten Bedingungen bereits ein einziger Photonentreffer genügt, um eine vorzeitige Richtungs-umkehr der Zellen zu bewirken. Auch die Simulationsergebnisse zeigen eine Poisson-Charakteristik mit $n = 1$ (siehe Abb. 5.15). Allerdings ergaben andere Experimente an unsynchronisierten Zellen eine Poisson-Charakteristik mit $n \approx 2$ (Abb. 5.16). Das bedeutet, dass im Mittel zwei Treffer benötigt werden, um eine vorzeitige Umkehr zu bewirken. Ein einzelner Treffer wird also (im Mittel) völlig ignoriert und hat nicht etwa nur den halben Effekt von zwei Treffern auf die Reaktionszeit! Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass die Zahl der benötigten Treffer mit dem Alter der Zellen zunimmt [W. Marwan].

Das Modell beschreibt in seiner jetzigen Form allerdings nur Dosis-Wirkungs-Kurven mit einer Poisson-Charakteristik von $n = 1$. Der Grund liegt darin, dass ein einzelner durch ein Photon aktivierter Rezeptorkomplex die aktuelle Schwimmphase auf jeden Fall verkürzt, weil jeder Stimulus durch den Motor aufintegriert wird. Diese Integatoreigenschaft ist wichtig, um die Experimente mit Blaulicht Einfach- und Doppelpulsen erklären zu können, sowie die Form der spontanen und lichtinduzierten Häufigkeitsverteilung zu erreichen.

Ein auf den ersten Blick nahe liegender Gedanke ist, dass die mit dem Zellalter zunehmende minimal benötigte Trefferanzahl eventuell durch eine geringere Effektivität eines Rezeptors hervorgerufen wird. Die Auswirkung eines ineffektiveren Rezeptors wäre jedoch lediglich, dass er bei Aktivierung die aktuelle Schwimmphase nur weniger stark verkürzen würde als ein effektiverer Rezeptor. Dadurch würden sich die Häufigkeitsverteilungen von einer getroffenen und einer spontan schaltenden Zelle stärker überlappen. Das kann aber

wiederum in den Experimenten nicht beobachtet werden (siehe Abb. 5.17). Es muss also ein anderer Mechanismus für eine Poisson-Charakteristik mit $n > 1$ verantwortlich sein.

6.4.1 Alternative Signalform der Excitation

Die Integratoreigenschaft des Schaltkomplexes widerspricht auf den ersten Blick der Forderung, dass zu wenige Photonentreffer völlig ignoriert werden müssen, um eine Poisson-Charakteristik mit $n > 1$ zu erreichen. In dem bisherigen einfachen Modell der Excitation und Adaptation bewirkt ein einzelner Schreckreiz-aktivierter Rezeptor eine schlagartig erhöhte CheYP-Konzentration. In der Folge geht sie wieder auf den adaptierten Wert zurück, ohne stark überzuschwingen. Das Integral des Schaltsignal wäre damit deutlich höher als im adaptierten Fall. Würde das Schaltsignal aber nach dem kurzzeitig erhöhten Wert eine kurze Periode mit einem deutlich verminderten Wert aufweisen, so wäre es möglich, dass das Integral der CheYP-Konzentration gleich groß bliebe wie im adaptierten Fall. Erreicht die erhöhte CheYP-Konzentration nicht den nötigen Schwellwert, um die Motordrehrichtung umzuschalten, würde die darauf folgende niedrigere Konzentration die Wirkung des einzelnen Photonentreffers wieder rückgängig machen.

6.5 Adaptation

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem Schaltverhalten des Motorkomplexes. Dementsprechend wurde für die Adaptation nur ein stark vereinfachtes Modell aufgestellt, um auch Experimente simulieren zu können, bei denen der Lichtstimulus längere Zeit andauert. Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Adaptation wurde jedoch nicht näher untersucht. Es sind also gerade hier noch einige interessante Fragen offen, die über einen systembiologischen Ansatz angegangen werden können.

Eine der offenen Fragen wurde bereits in Kap. 3.5 angesprochen: Läuft die Adaptation über die Gesamtheit aller Rezeptoren, d.h. wirkt sie über einen äußeren Rückkopplungsmechanismus oder betrifft sie nur die aktivierten Rezeptoren selbst mittels einer inneren Rückkopplung. Das in dieser Arbeit verwendete Modell der Adaptation arbeitet mit einer äußeren Rückführung der Gesamtaktivität aller Rezeptorkomplexe über die Phosphorylierung von CheB auf die Demethylierungsgeschwindigkeit aller Transducer. Dieser Ansatz wurde deshalb gewählt, weil im Falle von unmethylierbaren Transducern die Adaptation anscheinend über andere Rezeptorkomplexe wirken muss (siehe Kap. 3.6). Das wäre bei einer inneren Rückkopplung auf den stimulierten

Rezeptor selbst nicht möglich. Allerdings bedeutet eine äußere Rückkopplung, dass sich bei Stimulation eines bestimmten Rezeptortyps ebenso der Methylierungszustand von anderen Rezeptoren ändern würde. Damit müsste man auch eine veränderte Sensitivität der anderen Rezeptortypen erwarten. Vorläufige experimentelle Ergebnisse von W. Staudinger haben allerdings ergeben, dass genau das nicht der Fall zu sein scheint. Eventuell sind also beide Rückführungen in der Signaltransduktion aktiv. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es einen alternativen Adaptationsmechanismus in den Zellen gibt, der nicht über die Methylierung von Transducern arbeitet.

Eine weitere äußerst interessante Frage ist, wie eine Zelle überhaupt auf sehr schwaches Blau- oder UV-Licht adaptieren kann, wenn doch schon die Aktivierung einzelner Rezeptoren eine Umkehrreaktion bewirkt (vergleiche Kap. 5.2.1). Bei einem schwachen Dauerlicht muss man davon ausgehen, dass z.B. alle paar Sekunden ein Photon zufällig einen der 22 aktivierbaren Rezeptoren trifft. Trotzdem wird in diesem Fall keine Umkehrreaktion ausgelöst. Dagegen können die Zellen sehr wohl auf eine weiter erhöhte Lichtintensität reagieren, und zwar ebenfalls mit einer Poisson-Charakteristik mit $n = 1$ (Messungen von W. Staudinger). Das bedeutet also, dass die Effektivität eines aktivierbaren Rezeptors auch in diesem Fall sehr hoch ist. Wie kann die Zelle also bei einem Photonentreffer unterscheiden, ob es ein zufälliger Treffer des schwachen Dauerlichts war, den sie ignorieren kann, oder ob es sich um eine gerade sprunghaft erhöhte Lichtintensität handelt, auf die sie reagieren muss?

Eine mögliche Erklärung bietet eine Theorie von W. Marwan, die besagt, dass es zwei verschiedene Populationen von Rezeptoren geben muss. Die einen sind für die Excitationsantwort zuständig (im dunkeladaptierten Zustand ca. 22 Stück) und bewirken eine schnelle, kurzzeitige Erhöhung von CheYP. Die große Mehrheit aber bewirkt die Adaptationsantwort, indem sie bei Lichtstimulation die CheYP-Konzentration nach einer kurzen Verzögerung absenkt. Bei einem andauernden schwachen Lichtstimulus würde sich die Wirkung der zufälligen Treffer auf beide Arten von Rezeptoren ausgleichen. Dagegen würden die für die Excitation zuständigen Rezeptoren bei einer plötzlich erhöhten Intensität von Blaulicht schneller reagieren und ein Umkehrereignis hervorrufen, bevor die anderen Rezeptoren die Absenkung des CheYP-Spiegels bewirken könnten. Durch einen solchen Mechanismus könnte auch die in Kap. 6.4.1 diskutierte Signalform von CheYP ermöglicht werden, indem die einen Rezeptoren schnell die Konzentration für eine kurze Zeit erhöhen und danach die anderen Rezeptoren eine verringerte Konzentration verursachen. So wäre es möglich, dass das Integral des Konzentrationsverlaufs dem adaptierten Fall entspricht und ein einzelner Photonentreffer vollständig ignoriert werden würde.

Eine andere, ebenso grundsätzliche Frage betrifft das Methylierungsmuster

von Halobakterien. Im Gegensatz zu *E. coli* werden in Halobakterien sowohl bei einer positiven als auch bei einer negativen Stimulation Methanol freigesetzt (vergleiche Kap. 3.1). Könnten auch in diesem Fall unterschiedliche Rezeptorpopulationen der Grund für diese Beobachtung sein?

6.6 Fumarat

Eine Frage, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnte, ist die Frage nach der Funktion des alternativen Schaltsignals Fumarat. In Halobakterien wurde gezeigt, dass sich die intrazelluläre Konzentration von Fumarat durch einen Lichtstimulus erhöht. Bei einem Blaulicht-Puls, bei dem 43% aller Rezeptoren angesprochen werden, werden ca. 70000 Moleküle Fumarat aus einem membrangebundenen Fumaratpool freigesetzt [MMG+93]. Wahrscheinlich interagiert Fumarat mit dem Schaltkomplex von *Halobacterium salinarum*. Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Fumarat die freie Energiedifferenz zwischen dem CW- und CCW-Zustand des Motors reduziert und somit die Schaltfrequenz erhöht [PCE98]. Allerdings war die Annahme eines zweiten Schaltsignals, das parallel zu CheYP auf den Motor wirkt, während des Modellierungsprozesses nicht nötig, um das Schaltverhalten zu beschreiben. Deshalb kann das Modell auch keine Aussage über die Funktionsweise von Fumarat machen.

6.7 Schlussbemerkung

Diese Auswahl von unbeantworteten Fragen macht deutlich, dass es noch genügend offene Punkte in der Phototaxis von Halobakterien gibt. Zum einen handelt es sich um Details, zum anderen aber auch um grundlegende Mechanismen, die noch nicht bekannt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen aber deutlich, dass der systembiologische Ansatz äußerst vielversprechend ist, um zumindest einige dieser Fragen in naher Zukunft beantworten zu können.

A Anhang

A.1 Modellgleichungen

Die Modellgleichungen für den Mechanismus der Excitation und Adaptation sind bereits in dem Kap. 3.6 aufgeführt. Im Folgenden werden deshalb nur die Gleichungen des Schaltermodells angegeben.

Das detaillierte Modell des Schaltverhaltens von *Halobacterium salinarum* umfasst mit den in Kap. 4.3.5 eingeführten Vereinfachungen 135 Zustände je Schwimmintervall. Der Komplex kann sich entweder in der Refraktär-Phase befinden (Zustandsvariable R), in der Kompetent-Phase K , in der Aktiv-Phase A oder in der Stopp-Phase S . Die folgenden Zustandsvariablen geben die Wahrscheinlichkeit für einen bestimmten Zustand des Komplexes an:

$$R1_i; \quad i = 0 \dots 44 \quad (\text{A.1})$$

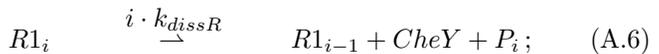
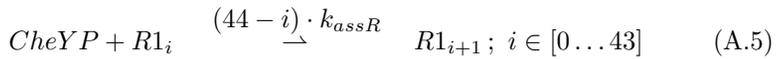
$$K1_i; \quad i = 0 \dots 44 \quad (\text{A.2})$$

$$A1^k; \quad k = 0 \dots 43 \quad (\text{A.3})$$

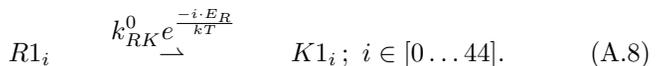
$$S1 \quad . \quad (\text{A.4})$$

Die Zahl '1' hinter den Zustandsvariablen bezeichnet das erste betrachtete Schwimmintervall. Sollen mehrere aufeinanderfolgende Intervalle voneinander unterschieden werden, so muss das Modell entsprechend erweitert werden. Der tiefgestellte Index i steht dabei für die Anzahl der an den Schaltkomplex gebundenen Moleküle CheYP, während der hochgestellte Index k den Fortschritt der Aktiv-Phase kennzeichnet.

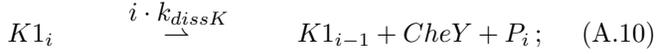
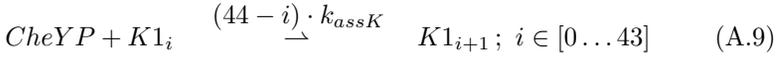
Bei den Assoziations- und Dissoziationsreaktionen in der Refraktär- und Kompetent-Phase muss berücksichtigt werden, wie viele Plätze noch frei sind, bzw. wie viele Plätze frei werden können:



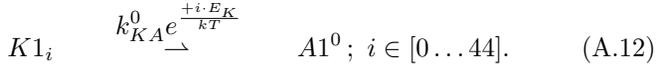
$$i \in [1 \dots 44] \quad (\text{A.7})$$



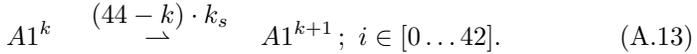
Für die Übergangswahrscheinlichkeit in die Kompetent-Phase wird angenommen, dass sie mit der Anzahl freier Bindungsstellen exponentiell steigt. Für den Übergang von der Kompetent- zur Aktiv-Phase gilt das umgekehrte Verhalten.



$$i \in [1 \dots 44] \quad (A.11)$$



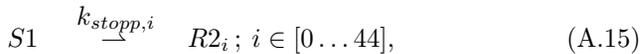
Die Aktiv-Phase wird in 44 parallelen, irreversiblen Schritten modelliert:



Der letzte Schritt der Aktiv-Phase ist schließlich der Übergang in die Stopp-Phase:



Die Stopp-Phase wird nur durch einen einzigen Reaktionsschritt modelliert. Allerdings braucht sie nur berücksichtigt zu werden, wenn mehrere aufeinanderfolgende Umschaltereignisse betrachtet werden sollen, weil in den Messungen das Ende einer Schwimmphase meistens mit dem Beginn der Stopp-Phase zusammenfällt. Während der Aktiv- und der Stopp-Phase wurde der Belegungsgrad vernachlässigt. Für den Übergang in die Refraktär-Phase der nächsten Schwimmrichtung muss er aber jetzt wieder berücksichtigt werden. Näherungsweise wird dazu die Verteilung des Belegungsgrades von Schaltkomplexen verwendet, die sich noch in der Kompetent-Phase befinden:



mit:

$$k_{stopp,i} = k_{stopp} \frac{[K1_i]}{\sum_{i=0}^{44} [K1_i]} \quad (A.16)$$

$$\sum_{i=0}^{44} k_{stopp,i} = k_{stopp}. \quad (A.17)$$

A.2 Modellparameter

Schaltkomplex		
k_{assR}	0.5341	$\frac{1}{[CheYP_{ss}] s}$
k_{dissR}	0.9314	1/s
k_{assK}	0.1177	$\frac{1}{[CheYP_{ss}] s}$
k_{dissK}	0.03338	1/s
k_{RK}^0	$810 \cdot 10^3$	1/s
k_{KA}^0	$2.07 \cdot 10^{-9}$	1/s
E_R	0.6	kT
E_K	0.6	kT
k_s	7	1/s
k_{stopp}	2.48	1/s

SRI			SRII		
$\sigma \Phi$	$1.47 \cdot 10^{-20}$	m^2	$\sigma \Phi$	$1.47 \cdot 10^{-20}$	m^2
k_{r373}	0.924	1/s	k_{r360}	0.577	1/s
k_{r510}	8.66	1/s	k_{r540}	0.21	1/s
α_{587M0}	0		α_{487M0}	-0.6	
α_{587M1}	30		α_{487M1}	1.1	
α_{370M0}	-2.04		α_{360M0}	0	
α_{370M1}	1.1		α_{360M1}	250	
α_{510M0}	1		α_{540M0}	0	
α_{510M1}	518		α_{540M1}	250	

Methylation		
k_{meth}	0.0212	1/s
k_{dem}	0.0212	1/s
y_{max}	30	
b_{max}	3	

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin Diphosphat
Akt	Aktiv-Phase
ATP	Adenosin Triphosphat
B.s.	<i>Bacillus subtilis</i>
BR	Bakteriorhodopsin (Protonenpumpe)
CCW	counter-clock-wise (gegen den Uhrzeigersinn)
CFP	cyan fluorescent protein
CheA	Histidinkinase
CheB	Methylesterase
CheD	Deamidase
CheJ	Chemotaxis Protein J
CheR	Methyltransferase
CheW	Adapterprotein im Rezeptorkomplex
CheY	Schaltsignal
CheZ	Phosphatase für CheYP
Cl ⁻	Chloridion
CW	clock-wise (im Uhrzeigersinn)
ΔCheRΔCheB	Mutante ohne CheR und CheB
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
Fli	Protein des Schaltkomplexes
FRET	fluorescence resonance energy transfer
GFP	green fluorescent protein
H ⁺	Proton
H.s.	<i>Halobacterium salinarum</i>
HR	Halorhodopsin (Chloridionenpumpe)
Htr	Halobacterial transducer
IPTG	Isopropyl beta D-Thiogalactopyranosid
Komp	Kompetent-Phase
MCP	Methyl-accepting chemotaxis protein
MeAsp	α-Methylaspartat
MPP	Methyl-accepting phototaxis protein
P	Platz eines Petri-Netzes
P _i -P	Anorganisches Phosphat, phosphoryliert
Ref	Refraktär-Phase
SRI	Sensorrhodopsin I (orangenes und UV-Licht)
SRII	Sensorrhodopsin II (blaues Licht)
T	Transition eines Petri-Netzes
Tar	Aspartat Rezeptor
Tsr	Serin Rezeptor
YFP	yellow fluorescent protein

Formelzeichenverzeichnis

A	mittlere Gesamt-Aktivität aller Rezeptoren
α	spezifische Aktivität eines Rezeptors
c	Verhältnis von Dissoziationskonstanten im MWC-Modell
c_μ	Reaktionswahrscheinlichkeitskonstante
$CWbias$	Verhältnis der Dauer τ_{CW} zur Gesamtdauer $\tau_{CW} + \tau_{CCW}$
D	Dauer der Dunkelphase zwischen zwei Licht-Pulsen
Δ	Änderung
E	Energie
EW	Erwartungswert
f	Schaltfrequenz
h	Hill-Koeffizient
$h\nu$	Anzahl Photonen
I	Lichtintensität
K	Dissoziationskonstante, Gleichgewichtskonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
kT	Boltzmannkonstante multipliziert mit absoluter Temperatur
λ	mittlere Anzahl Ereignisse
n	Anzahl
P	Wahrscheinlichkeit
\mathbf{p}	Vektor von Wahrscheinlichkeiten
\mathbf{P}	Matrix von Übergangswahrscheinlichkeiten p_{ij}
p_{ij}	Übergangswahrscheinlichkeit von X_j nach X_i
$p_i(\lambda)$	Poisson-Verteilung: Wahrscheinlichkeit für genau i Ereignisse
$\hat{P}_n(\lambda)$	Wahrscheinlichkeit für mindestens n Poisson-verteilte Ereignisse
Φ	Quantenausbeute eines Rezeptors
r	Rate
\mathbf{R}	Matrix von Änderungswahrscheinlichkeiten r_{ij}
r_{ij}	Änderungswahrscheinlichkeit von X_j nach X_i
R	Anteil mit einer Umkehr reagierender Zellen
σ	effektive Rezeptorfläche des photoaktiven Bereichs
T	Periodendauer
t	Zeit
τ	Dauer
V	Verstärkung
X	Zufallsvariable
z	gleichverteilte Zufallszahl zwischen 0 und 1

Indizes

<i>adp</i>	adaptierter Fall
<i>ass</i>	Assoziation
<i>assB</i>	Assoziation von CheBP
<i>assK</i>	Assoziation von CheYP in der Kompetent-Phase
<i>assR</i>	Assoziation von CheYP in der Refraktär-Phase
<i>bl</i>	blaues Licht
<i>CCW</i>	Counter-clock-wise Zustand
<i>CW</i>	Clock-wise Zustand
<i>d</i>	Verzögerung
<i>dB</i>	Dephosphorylierung CheBP
<i>dissB</i>	Dissoziation von CheBP
<i>dissK</i>	Dissoziation von CheY in der Kompetent-Phase
<i>dissR</i>	Dissoziation von CheY in der Refraktär-Phase
<i>dem</i>	Demethylierung
<i>diss</i>	Dissoziation
<i>dY</i>	Dephosphorylierung CheYP
<i>KA</i>	Übergang Kompetent- Aktiv-Phase
<i>m</i>	Methylierungs-Zustand
<i>meth</i>	Methylierung
<i>neg</i>	negativ stimulierter Fall
<i>or</i>	orangenes Licht
<i>pA</i>	Phosphorylierung CheA
<i>pB</i>	Phosphorylierung CheB
<i>pos</i>	positiv stimulierter Fall
<i>pY</i>	Phosphorylierung CheY
<i>R</i>	Reaktion (Umkehrereignis)
<i>Rez</i>	Rezeptoren
<i>RK</i>	Übergang Refraktär- Kompetent-Phase
<i>s</i>	schalteraktivierender Schritt
<i>sp</i>	spontaner Fal
<i>ss</i>	stationary state (stationärer Zustand)
<i>*</i>	stimulierter Fall
<i>tot</i>	Gesamt
<i>UV</i>	UV-Licht

Literaturverzeichnis

- [ACS⁺98] U. Alon, L. Camarena, M. Surette, B. Aguera y Arcas, Y. Liu, S. Leibler, and J. Stock. Response regulator output in bacterial chemotaxis. *EMBO J*, 17(15):4238–48, 1998.
- [Bai90] N. Bailey. *The elements of Stochastic Processes*. Wiley, 1990.
- [BAL01] N. Barkai, U. Alon, and S. Leibler. Robust Amplification in Adaptive Signal Transduction network. *C. R. Acad. Sci. Sér. IV*, 2:871–877, 2001.
- [Ber03] H.C. Berg. The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem*, 72:19–54, 2003.
- [BL97] N. Barkai and S. Leibler. Robustness in simple biochemical networks. *Nature*, 387(6636):913–7, 1997.
- [CLP98] G. Cercignani, S. Lucia, and D. Petracchi. Photoresponses of *Halobacterium salinarum* to repetitive pulse stimuli. *Biophys J*, 75(3):1466–72, 1998.
- [CSL00] P. Cluzel, M. Surette, and S. Leibler. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science*, 287(5458):1652–5, 2000.
- [DB99] T.A. Duke and D. Bray. Heightened sensitivity of a lattice of membrane receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18):10104–8, 1999.
- [DNB01] T. Duke, N. Novere, and D. Bray. Conformational spread in a ring of proteins: a stochastic approach to allostery. *J Mol Biol*, 308(3):541–53, 2001.
- [FH01] J.J. Falke and G.L. Hazelbauer. Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci*, 26(4):257–65, 2001.

- [Gil76] D.T. Gillespie. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J of Comp Phys*, 22:403–434, 1976.
- [Gil77] D.T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem*, 81(25):2340–2361, 1977.
- [Gil02] E.D. Gilles. Regelung - Schlüssel zum Verständnis biologischer Systeme. *at*, 50(1):7–17, 2002.
- [GKN⁺03] M. Ginkel, A. Kremling, T. Nutsch, R. Rehner, and E.D. Gilles. Modular modeling of cellular systems with ProMoT/Divi. *Bioinformatics*, 19(9):1169–76, 2003.
- [GSA77] M.F. Goy, M.S. Springer, and J. Adler. Sensory transduction in *Escherichia coli*: role of a protein methylation reaction in sensory adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(11):4964–8, 1977.
- [HS85] E. Hildebrand and A. Schimz. *Sensing and Response in Microorganisms*, chapter Behavioral Pattern and its Photosensory Control in *Halobacterium halobium*, pages 129–142. Elsevier Science Publischer B.V., 1985.
- [KK89] S.C. Kuo and D.E. Koshland, Jr. Multiple kinetic states for the flagellar motor switch. *J Bacteriol*, 171(11):6279–87, 1989.
- [KKFO97] J.R. Kirby, C.J. Kristich, S.L. Feinberg, and G.W. Ordal. Methanol production during chemotaxis to amino acids in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 24:869–878, 1997.
- [KKS⁺01] J.R. Kirby, C.J. Kristich, M.M. Saulmon, M.A. Zimmer, L.F. Garrity, I.B. Zhulin, and G.W. Ordal. CheC is related to the family of flagellar switch proteins and acts independently from CheD to control chemotaxis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 42(3):573–85, 2001.
- [KO02] C. Kristich and G. Ordal. *Bacillus subtilis* CheD is a chemoreceptor modification enzyme required for chemotaxis. *J Biol Chem*, 277(28):25356–62, 2002.
- [Kro95] U. Krohs. Damped oscillations in photosensory transduction of *Halobacterium salinarium* induced by repellent light stimuli. *J Bacteriol*, 177(11):3067–70, 1995.
- [LMCL99] R. Lux, V.R.N. Munasinghe, F. Castellano, and J.W. Lengeler. Elucidation of a PTS-Carbohydrate Chemotactic Signal Pathway

in *Escherichia coli* Using a Time-resolved Behavioral Assay. *Mol. Biol. Cell*, 10:1133–1146, 1999.

- [MAO91] W. Marwan, M. Alam, and D. Oesterhelt. Rotation and Switching of the Flagellar Motor Assembly in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.*, 173(6):1971–1977, 1991.
- [Mar89] W. Marwan. *Die Photophobische Reaktion von Halobacterium halobium*. PhD thesis, Ludwig-Maximilian-Universität, München, 1989.
- [MAS87] D.A. McCain, L.A. Amici, and J.L. Spudich. Kinetically resolved states of the *Halobacterium halobium* flagellar motor switch and modulation of the switch by sensory rhodopsin I. *J Bacteriol*, 169(10):4750–8, 1987.
- [MBMO95] W. Marwan, S. I. Bibikov, M. Montrone, and D. Oesterhelt. Mechanism of Photosensory Adaptation in *Halobacterium salinarium*. *J Mol Biol*, 246:493–499, 1995.
- [MEOM98] M. Montrone, M. Eisenbach, D. Oesterhelt, and W. Marwan. Regulation of switching frequency and bias of the bacterial flagellar motor by CheY and fumarate. *J Bacteriol*, 180(13):3375–80, 1998.
- [MFB98] C.J. Morton-Firth and D. Bray. Predicting Temporal Fluctuations in an Intracellular Pathway. *Journal of Theoretical Biology*, 192:117–128, 1998.
- [MFSB99] C.J. Morton-Firth, T.S. Shimizu, and D. Bray. A free-energy-based stochastic simulation of the tar receptor complex. *J Mol Biol*, 286:1059–1074, 1999.
- [MHO88] W. Marwan, P. Hegemann, and D. Oesterhelt. Single Photon Detection by an Archaeobacterium. *J Mol Biol*, 199:663–664, 1988.
- [MMG⁺93] M. Montrone, W. Marwan, H. Grünberg, S. Mußebeck, C. Starostzik, and D. Oesterhelt. Sensory rhodopsin-controlled release of the switch factor fumarate in *Halobacterium salinarium*. *Mol Microbiol*, 10(3):1077–1085, 1993.
- [MO87] W. Marwan and D. Oesterhelt. Signal Formation in the Halobacterial Photophobic Response Mediated by a Fourth Retinal Protein (p475). *J Mol Biol*, 195:333–342, 1987.

- [MO90] W. Marwan and D. Oesterhelt. Quantitation of Photochromism of Sensory Rhodopsin-i by Computerized Tracking of *Halobacterium halobium* Cells. *J Mol Biol*, 215:277–285, 1990.
- [MO99] W. Marwan and D. Oesterhelt. Die Phototaxis der Halobakterien: Biochemische Mechanismen einer einfachen Verhaltensreaktion. *Chemie in unserer Zeit*, 33(3):140–151, 1999.
- [MT03] B.A. Mello and Y. Tu. Perfect and near-perfect adaptation in a model of bacterial chemotaxis. *Biophys J*, 84(5):2943–56, 2003.
- [MWC65] J. Monod, J. Wyman, and J.P. Changeaux. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol*, 12:88–118, 1965.
- [Nab97] H. Naber. The response of halobacteria to single light stimuli: a theoretical analysis. *Eur. Biophys. J.*, 26:163–173, 1997.
- [NMOG03] T. Nutsch, W. Marwan, D. Oesterhelt, and E.D. Gilles. Signal processing and flagellar motor switching during phototaxis of *Halobacterium salinarum*. *Genome Res*, 13(11):2406–12, 2003.
- [Ore02] A. Oren, editor. *Halophilic Microorganisms and their Environments*, volume 5. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [PCE98] K. Prasad, S. Caplan, and M. Eisenbach. Fumarate modulates bacterial flagellar rotation by lowering the free energy difference between the clockwise and counterclockwise states of the motor. *J Mol Biol*, 280(5):821–8, 1998.
- [PLC94] D. Petracchi, S. Lucia, and G. Cercignani. Photobehaviour of *Halobacterium halobium*: proposed models for signal transduction and motor switching. *J. Photochem. Photobiol. B*, 24:74–99, 1994.
- [PS99] B. Perazzona and J. Spudich. Identification of methylation sites and effects of phototaxis stimuli on transducer methylation in *Halobacterium salinarum*. *J Bacteriol*, 181(18):5676–83, 1999.
- [RO96] J. Rudolph and D. Oesterhelt. Deletion analysis of the che operon in the archaeon *Halobacterium salinarium*. *J Mol Biol*, 258:548–558, 1996.
- [SB84] J.L. Spudich and R.A. Bogomolni. Mechanism of colour discrimination by a bacterial sensory rhodopsin. *Nature*, 312(5994):509–13, 1984.

- [SB02a] V. Sourjik and H. Berg. Binding of the *Escherichia coli* response regulator CheY to its target measured in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20):12669–74, 2002.
- [SB02b] V. Sourjik and H. Berg. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1):123–7, 2002.
- [SH85] A. Schimz and E. Hildebrand. Response regulation and sensory control in *Halobacterium halobium* based on an oscillator. *Nature*, 317:641–643, 1985.
- [SMB82] J. Segall, M. Manson, and H. Berg. Signal processing times in bacterial chemotaxis. *Nature*, 296(5860):855–7, 1982.
- [SMO04] H. Szurmant, T.J. Muff, and G.W. Ordal. *Bacillus subtilis* CheC and FliY are members of a novel class of CheY-P-hydrolyzing proteins in the chemotactic signal transduction cascade. *J Biol Chem*, 279(21):21787–92, 2004.
- [SNL+00] T.S. Shimizu, N. Le Nov'ere, M.D. Levin, A.J. Beavil, B.L. Sutton, and D. Bray. Molecular model of a lattice of signalling proteins involved in bacterial chemotaxis. *Nature Cell Biology*, 2:792–796, 2000.
- [TMD01] D. Thomas, D.G. Morgan, and D.J. DeRosier. Structures of bacterial flagellar motors from two FliF-FliG gene fusion mutants. *J. Bacteriol*, 21(183):6404–12, 2001.
- [TRB00] L. Turner, W. Ryu, and H. Berg. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *J Bacteriol*, 182(10):2793–801, 2000.
- [WHC+03] R.M. Weis, T. Hirai, A. Chalah, M. Kessel, P.J. Peters, and S. Subramaniam. Electron microscopic analysis of membrane assemblies formed by the bacterial chemotaxis receptor Tsr. *J Bacteriol*, 185(12):3636–43, 2003.
- [YHSD00] T.M. Yi, Y. Huang, M. I. Simon, and J. Doyle. Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *PNAS*, 97(9):4649–4653, 2000.
- [YS91] B. Yan and J.L. Spudich. Evidence that the repellent receptor form of sensory rhodopsin I is an attractant signaling state. *Photochem Photobiol*, 54(6):1023–6, 1991.

- [YTJS91] B. Yan, T. Takahashi, R. Johnson, and J.L. Spudich. Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulus-induced conformations: the case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry*, 30(44):10686–92, 1991.