

VU Research Portal

Design and implementation of a bacterial signaling circuit

Lazova, M.D.

2013

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Lazova, M. D. (2013). *Design and implementation of a bacterial signaling circuit*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

(Translated in Dutch by Johannes Keegstra)

Het chemotaxis netwerk is het systeem welke bacterien in staat stelt fysische en chemische veranderingen omgeving waar te nemen en op deze te reageren. Het is een van de best gekarakteriseerde signaalnetwerken in de biologie. De gedetailleerde kennis van dit systeem op moleculair niveau heeft kwantitatief onderzoek mogelijk gemaakt, zowel theoretisch als experimenteel. Dit onderzoek heeft geleid tot een uitgebreide karakterisatie van het chemotaxis systeem, waaronder het effect van volledige aanpassing en de hoge signaalversterking. Veel van de eigenschappen van het chemotaxis systeem in bacterien spelen ook een rol bij complexere sensorische systemen bij meercellige organismen. Zo kan inzicht uit studies van de bacteriele chemotaxis het begrip van fundamentele eigenschappen van sensorische systemen binnen de biologie vergemakkelijken.

In het onderzoek beschreven in dit proefschrift werd het chemotaxis systeem van bacterien onderzocht vanuit het perspectief van functionaliteit. Metingen aan de chemotaxis respons van *Escherichia coli* en *Salmonella typhimurium* werden gebruikt om de eigenschappen van de receptorrespons en -aanpassing te karakteriseren op het niveau van de informatieverwerking. Uit de overdrachtsfuncties van de signaalverwerking werden strategieën van de bacterien voorspeld en met behulp van experimenten werden deze voorspellingen bevestigd. De functie van eerder ongekaracteriseerde eiwitten van het chemotaxis systeem werden onderzocht met behulp van fysiologische metingen en kwantitatieve beeldverwerking.

Fysiologische studies van zintuiglijke reacties geven aan dat de drempelwaarde van de reactie op een stimulus evenredig is met de grootte van de oorspronkelijke stimulus, wat bekend staat als de wet van Weber. Echter, de wet van Weber beschrijft de respons van een systeem op stimuli met een kleine stapgrootte op een bepaald tijdstip. In Hoofdstuk 2 tonen wij voor het eerst aan dat een adaptief zintuiglijk systeem voor het gehele

Samenvatting

tijdsinterval van zijn reactie hetingangssignaal herschaalt. We laten zien dat de chemotaxis respons van *E. coli* op α -methylaspartate (MeAsp) dat het uitgangssignaal gelijk is voor veelvouden van hetzelfde ingangssignaal en dus niet afhankelijk is van het absolute niveau, een eigenschap welke recent beschreven is als detectie veelvoudverandering (Fold-change detection - FCD). We gebruikten een fysische techniek gebaseerd op energieoverdracht door resonantie van verschillende fluorescerende deeltjes (Fluorescence resonance energy transfer - FRET) om de herschaling van het ingangssignaal in *E. coli* te bestuderen, en we hebben twee reeksen van achtergrondconcentraties gevonden voor waar FCD geldt, zogenaamde "FCD regimes". De amplitude van de respons verschilde tussen de twee regimes, maar de tijdschaal van de aanpassing was hetzelfde. We identificeerden drie voldoende voorwaarden voor FCD in bacteriële chemotaxis. FCD werd ook waargenomen voor de verdelingen van zwemmende *E. coli* in de ruimtelijke gradiënten van MeAsp welke tot stand kwamen in vloeistofcellen op micrometerschaal.

Ingang-uitgangs relaties van de chemotaxis respons zijn grondig gekarakteriseerd in de modelstam *E. coli* K12. Onderzoek met FRET toonde een hoge gevoeligheid van, alsmede een hoge cooperativiteit tussen, de receptoren. Ook de eigenschappen van het aanpassingssysteem werden onderzocht, met behulp van de tijd variërende stimuli. Echter, zelfs binnen de soort *E. coli* is er een grote variatie in de chemotactische prestaties van verschillende stammen, zoals is te zien in Appendix B. In Hoofdstuk 3 maken we een gedetailleerde vergelijking van de fysiologische respons van *E. coli* K12 en de nauw verwante species *S. typhimurium* LT2, welke homologe chemotactische netwerken bezitten. Het bleek dat de aanpassing aan MeAsp in *S. typhimurium* driemaal sneller is en de gemeten cooperativiteit van de receptor respons driemaal lager dan die van *E. coli*. Bovendien is de respons herschaling verschillend tussen de twee soorten: in tegenstelling tot *E. coli*, toonde *S. typhimurium* een FCD regime. Met behulp van de verkregen parameters voor de signaaloverdrachtsfuncties van beide soorten konden we de verschillen in de modulatie van de gevoeligheid van de reactie verklaren.

In Hoofdstuk 4 bestuderen we twee chemoreceptors van *S. typhimurium*, McpB en McpC, met tot nu toe onbekende functies. Radiale

migratie in halfzachte agar platen gesuggereert dat deze receptoren reageren op het aminozuur cysteine en zijn geoxideerde dimeer cystine als stoffen met een aantrekkende functie. Onze FRET metingen van de chemotactische kinase reactie toonden echter aan dat cellen met alleen McpB / C chemoreceptors slechts reageren op de geoxideerde vorm, en de respons was onverwacht in de afstotende richting. Verder toonden we aan dat de gereduceerde vorm, cysteine, als een aantrekkende stof wordt waargenomen door Tsr en Tar. We toonden aan dat de aanpassing aan zowel cystine en cysteine methylering afhankelijk is, en dat de aanpassing aan cystine onvolledig is, dat wil zeggen dat de adaptatie het signaal niet terugbrengt naar het niveau voor de stimulus. We bespreken dat cysteine-cysteine omzetting en de onvolledige aanpassing aan cystine de aantrekkend-achtige reacties aan beide componenten in de halfzachte agar assays kunnen uitleggen. De dosis-respons afhankelijkheid van de tegenovergestelde reacties op het cystine / cysteine redoxsysteem wordt besproken in Appendix A. We observeerden lineaire schaling van de omvang van de respons op cystine met de logaritme van cystine concentratie. Onverwacht, we ontdekten enkele McpB / C onafhankelijke reacties op cystine in *S. typhimurium* LT2, welke een redox respons zou kunnen representeren. In Hoofdstuk 6 presenteren wij onze voorlopige resultaten over het testen van de reacties van *S. typhimurium* aan redox gradienten.

Een ander chemotaxis eiwit zonder eerder gekenmerkte functie *S. typhimurium* is CheV: een hybride eiwit dat bestaat uit een structuurdomein en een fosforyleerbare ontvangdomein. CheV speelt een rol in receptor-kinase structuur en aanpassing aan chemo-effectoren in sommige bacteriesoorten. Het kenmerkende fenotype van cellen zonder het *cheV* gen in stammen van *S. typhimurium* welke niet in staat waren tot methylering suggereert dat CheV een andere functie heeft binnen het chemotaxis netwerk van *S. typhimurium*'s. Onze FRET metingen gepresenteerd in Hoofdstuk 5 toonden gedeeltelijke aanpassing aan MeAsp onafhankelijk van methylering en afhankelijk van CheV. Voor een mechanistisch begrip van deze gedeeltelijke aanpassing voerden we een kwantitatieve beeldanalyse van de receptorclusters uit, en daarmee toonden we aan dat het aantal detecteerbare clusters afneemt bij cellen

Samenvatting

waarin het *cheV* gen is verwijderd. Er is met name minder laterale clusters, dwz clusters die niet gelokaliseerd bij de polen van de bacterie, in de cellen zonder het *cheV* gen. We speculeren dat een fosforylatie-afhankelijke terugkoppeling op de stabiliteit van de receptorclusters de rol van CheV bij *S. typhimurium* zou kunnen verklaren.

We verkenden een andere fosforylatie-afhankelijke terugkoppelingsmechanisme: de negatieve terugkoppeling geïntroduceerd door fosforylering van de methylesterase CheB in *E. coli* chemotaxis, hetgeen is beschreven in Appendix C. Met behulp van FRET hebben we de adaptatiekinetica van cellen met genetisch gemodificeerde CheB fosforylatieposities onderzocht. We hebben laten zien dat de sterke niet-lineariteit in de overdrachtsfunctie die de methylatiesnelheid als een functie van de kinase activiteit een gevolg zou kunnen zijn van de fosforylatie terugkoppeling van CheB activiteit.

Samengevat hebben we de overdrachtsfunctie van het chemotaxis systeem in *E. coli* en *S. typhimurium* met *in vivo* experimenten onderzocht. We hebben de FCD eigenschap aangetoond in zowel soorten op zowel de signalering en gedragsniveau. We hebben verschillen aangetoond in de functionaliteit van chemotaxis netwerken in homologe bacteriën, en legde de waargenomen verschillen in de onderliggende fysiologie. We hebben bestaande experimentele technieken gebruikt om de functies van niet eerder gekenmerkte chemotaxis componenten in kaart te brengen. Toekomstige studies van signaalverwerking in functioneel perspectief kunnen leiden tot een beter begrip van de vraag hoe biologische systemen zijn ontworpen.