

## Eine systemwissenschaftliche Betrachtung der Zelltod-Signaltransduktion

von Thomas Eißing

**Zusammenfassung.** Einem systembiologischen Ansatz folgend gewährt die Dissertation neue Einblicke in die zelluläre Signaltransduktion, indem biologisches Wissen in mathematische Modelle integriert wird, welche im Weiteren mit systemtheoretischen Methoden analysiert werden. Dem biologischen Vorgang des programmierten Zelltodes, auch Apoptose genannt, wird in der Arbeit besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Aufgrund der medizinischen Relevanz dieses Vorganges, sind die erzielten Ergebnisse nicht nur für die Grundlagenforschung von Bedeutung, sondern auch unmittelbar für die medizinische Anwendung und Pharmaforschung interessant.

**Einleitung.** Apoptose ist ein wichtiger physiologischer Prozess, durch den einzelne Zellen zum Wohl des Organismus als Ganzen abgetötet werden. Apoptose ist essentiell, um Zellen zu eliminieren, die alt, infiziert oder potentiell gefährlich sind oder einfach nicht länger benötigt werden. Im menschlichen Körper sterben jeden Tag durchschnittlich 10 Milliarden Zellen, um ein Gleichgewicht mit neu hergestellten Zellen zu gewährleisten. Störungen oder Fehlregulationen dieser Homöostase sind an der Entstehung zahlreicher Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder Alzheimer beteiligt.

Apoptose kann extrinsisch durch Zytokine oder intrinsisch als Antwort auf DNA- oder anderweitige intrazelluläre Schäden initiiert werden. Die unterschiedlich initiierten Wege konvergieren, und Caspasen können als Kernkomponenten der apoptotischen Maschinerie angesehen werden. Caspasen sind Proteasen, die in einer inaktiven Form produziert (Pro-Form oder Zymogen) und selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Aktivierung und Aktivität werden durch zahlreiche weitere Proteine reguliert, wie zum Beispiel den Inhibitoren der Apoptose Proteine (IAPs). Initiator-Caspasen nehmen apoptotische Stimuli wahr und spalten daraufhin Effektor-Caspasen. Deren Aktivierung führt zur kontrollierten Selbstzerstörung der Zelle, und die Reste werden anschließend von benachbarten Phagozyten aufgenommen, ohne Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Während die Aktivierung von Effektor-Caspasen innerhalb einer Population von Zellen normalerweise als langsamer Vorgang beobachtet wird, zeigen neue experimentelle Ergebnisse auf Einzelzellebene, dass diese sehr schnell aktiviert werden. Zwischen apoptotischem Stimulus und schlagartiger Aktivierung vergehen dabei oft mehrere Stunden (Verzögerungsphase), und Zellen innerhalb einer Population sterben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, obwohl alle dem gleichen Stimulus ausgesetzt sind. Während in seltenen Fällen eine partielle Aktivierung von Initiator-Caspasen von physiologischer Relevanz zu sein scheint, führt eine signifikante Aktivierung von Effektor-Caspasen unweigerlich zum Zelltod. Somit ist zwischen dem Eingang in die Caspase-Kaskade und dem Ausgang ein irreversibler Schaltvorgang zu beobachten.

Schaltvorgänge (in der Apoptose) können mathematisch durch gewöhnliche Differentialgleichungen beschrieben werden, die Bistabilität erlauben. Bistabilität in biochemischen Reaktionsnetzwerken benötigt in der Regel zwei Voraussetzungen auf Reaktionsebene. Die erste ist Ultrasensitivität, die ein Ein-/ Ausgangsverhalten (Stimulus-/ Antwortverhalten) beschreibt, welches sensitiver bezüglich des Eingangs ist als eine hyperbolische Michaelis-Menten-Kinetik (z. B. Hill-Kinetik). Die zweite ist eine positive Rückwirkung des Ausgangs auf den Eingang. Während diese Bedingungen für bestimmte Systemklassen notwendig sind, sind sie nicht hinreichend und sagen im Allgemeinen nichts über die notwendigen Parameterkonstellationen aus. Diese können durch Phasenraum und Bifurkationsbetrachtungen erschlossen werden.

Das Schaltverhalten in der Apoptose entscheidet über Leben und Tod einzelner Zellen. Somit erwartet man, dass diese Entscheidung robust ist und kleine Schwankungen im physiologischen Zustand der Zelle keinen starken Einfluss auf die Entscheidung haben. Allgemeiner kann Robustheit

als die Erhaltung von Funktion in Anbetracht von Störungen bezeichnet werden. Robustheit wird als weit verbreitetes Prinzip für viele biologische Vorgänge postuliert und als Funktionsprinzip durch theoretische und experimentelle Betrachtungen unterstützt. Die Struktur komplexer Netzwerke als solche, wie auch spezifische Leistungsanforderungen führen jedoch zu einem Kompromiss zwischen Robustheit und Funktionalität und dem Auftreten von Schwachstellen (Fragilitäten). Zur Charakterisierung der Robustheit von Differentialgleichungsmodellen wird oft der Einfluss von Parameteränderungen bewertet. Außer Parameterabhängigkeiten wird im Zusammenhang mit Robustheit teilweise aber auch die Auswirkung von stochastischen Einflüssen untersucht, denn prinzipiell sind biologische Vorgänge stochastische Vorgänge. Vor allem bei Betrachtung kleiner Molekülzahlen ist eine kontinuierliche und deterministische Sichtweise, wie sie bei Verwendung von gewöhnlichen Differentialgleichungen implizit angenommen wird, oft problematisch. Diese Thematik ist relevant für die Apoptose, da wie oben beschrieben, stochastische Effekte beobachtet werden – während einzelne Zellen schnell und zu verschiedenen Zeitpunkten schalten, zeigt die Population oft kein Schaltverhalten mehr, sondern ein langsames Anwachsen der Effektor-Caspase-Aktivität. Dies kann als Mittelungseffekt gedeutet werden.

Zusammenfassend wurde Apoptose hier als ein robustes, bistabiles System eingeführt. Die Beschreibung als ein solches ist im Laufe der Arbeit entstanden und gereift und stellt somit bereits ein erstes Teilergebnis dar. Einige Annahmen, wie die Rechtfertigung der Untersuchung des Systems anhand von Differentialgleichungen, werden durch erzielte Ergebnisse nachhaltig gestärkt. Andere Annahmen, wie die der Robustheit, werden kritisch evaluiert und diskutiert. Die Hauptergebnisse werden im Folgenden zusammenfassend vorgestellt.

**Ergebnisse.** In der Arbeit werden verschiedene biochemische Reaktionsnetzwerke durch mathematische Modelle, basierend auf gewöhnlichen Differentialgleichungen, beschrieben und eingehend analysiert.

Zunächst werden drei Modelle beschrieben, die alle zwei Proteasen beinhalten und sich im Reaktionsmechanismus zur Generierung von Ultrasensitivität unterscheiden. Die Ultrasensitivität wird erzeugt durch *a)* Sättigungseffekte (nullter Ordnung), *b)* Inhibitoren und *c)* Kooperativität. In Kombination mit positiver Rückkopplung zwischen den Proteasen erlauben alle Modelle Bistabilität. Während zur Generierung von Ultrasensitivität nullter Ordnung klassischerweise Sättigungseffekte in den Rückreaktionen reversibler Reaktionen betrachtet werden, kann eine Sättigung im Protein-Abbau in irreversiblen Proteasenznetzwerken denselben Effekt erzielen. Der Einfluss einer Restaktivität der inaktiven Proteaseformen (Zymogenität) wird untersucht. Die Analysen zeigen, dass dieser Einfluss vor allem die Generierung von Bistabilität durch den kooperativen Mechanismus erschwert. Die Ergebnisse sind unmittelbar für die Caspase-Kaskade, aber auch für weitere Signalwege wie den der Blutgerinnung relevant.

Im Weiteren werden die gewonnenen Einblicke auf den direkten Weg der Rezeptor-induzierten Apoptose angewendet. Eine Beschreibung des zehndimensionalen Parameterraumes, welcher Bistabilität erlaubt, zeigt einen Widerspruch zu in der Literatur beschriebenen Parameterwerten auf. Im Modell ist Bistabilität nur für um Größenordnungen langsamere Proteaseaktivierungskinetiken möglich, als in Experimenten gemessen. Die Analysen zeigen, dass vor allem das Fehlen eines Inhibitors der Aktivator-Caspase 8 problematisch ist. Auf den Ergebnissen basierend, wird die Existenz eines solchen Inhibitors postuliert – eine Vorhersage, die mittlerweile durch experimentelle Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gestützt wird. Das um diese zweite Gruppe an Inhibitoren erweiterte Modell reproduziert wichtige experimentell beobachtete Verhaltensweisen, wie Toleranz von unterschwelligen Eingängen (Bistabilität) und eine schnelle Caspaseaktivierung nach einer Verzögerungsphase, deren Länge invers proportional zur Größe des Stimulus ist. Simulationsstudien zeigen weiter, wie ein Zusammenspiel von verketteten Rückkopplungen das charakteristische Zeitverhalten von langsamen und schnellen Vorgängen ermöglicht.

Unterschiedliche Sensitivitätsuntersuchungen und Simulationsstudien des erweiterten Apoptosemodells zeigen, wie das beobachtete Verhalten von den Parametern abhängt. Die Analysen zeigen

zum Beispiel, dass hoch regulierte Inhibitoren, wie sie in zahlreichen Krebserkrankungen beobachtet werden, Zellen nicht nur wie bisher angenommen gegen apoptotische Stimuli desensibilisieren, sondern ebenfalls zur Aggressivität und Progression der Tumore beitragen können. Da diese Inhibitoren als Ziele zur medikamentösen Intervention erkannt wurden, liefern die Analysen somit Erkenntnisse von direkter medizinischer und pharmakologischer Relevanz. Globalere Betrachtungen des qualitativen Systemverhaltens werden als Indikatoren für Robustheit herangezogen. Ein Robustheitsmaß, basierend auf einem Monte Carlo Ansatz zur Bestimmung des Gebietes im höherdimensionalen Parameterraum, welcher Bistabilität erlaubt, wird beschrieben. In Kombination mit anderen in der Literatur beschriebenen Maßen wird die Robustheit der vorgestellten Modelle untersucht und verglichen. Die Analysen zeigen, dass alle drei eingangs eingeführten Mechanismen grundsätzlich ein robustes bistabiles Verhalten erzeugen können und berichtigen damit anderweitige Literaturergebnisse. Der Vergleich der speziell für die Apoptose beschriebenen Modelle zeigt, dass die Modellerweiterung auch die Robustheit verstärkt. Des Weiteren erlaubt die Modellerweiterung vor allem eine schnelle Caspaseaktivierung in Kombination mit langsameren Halbwertszeiten der beteiligten Proteine, was im Einklang mit biologischen Messungen ist.

Stochastische Simulationen der Apoptosemodelle zeigen, wie Inhibitoren als Rauschfilter wirken und die Variabilität aufgrund der intrinsischen Stochastizität stark begrenzen. Demgegenüber können Parameter mit stochastischen Verteilungen, die biologisch motiviert werden, experimentell beobachtete stochastische Effekte erklären und erlauben ein besseres konzeptionelles Verständnis von widersprüchlichen Ergebnissen in Experimenten an einzelnen Zellen gegenüber Zellpopulationen.

**Diskussion und Ausblick.** Zum Abschluss der Arbeit werden Möglichkeiten zur weiteren experimentellen Verifikation bestimmter Modellaussagen dargelegt, welche teilweise derzeit bearbeitet werden (Institut für Zellbiologie und Immunologie, Universität Stuttgart). Potentielle Erweiterungsmöglichkeiten der vorgestellten Modelle und Analysemethoden werden beschrieben. Eine Erweiterung beinhaltet die Integration anti-apoptotischer Signalwege. Die in diesem Zusammenhang weitergehend diskutierte physiologische Bedeutung ermöglicht eine zusammenfassende Interpretation der durch die Robustheitsuntersuchungen erzielten Ergebnisse. Zellen scheinen einen vorteilhaften Kompromiss zwischen Robustheit und Verhaltensanforderungen gefunden zu haben, welcher durch die Netzwerkstruktur und evolutionäre Selektionsbedingungen vorgegeben wird. Einerseits wird das intrinsische Rauschen gefiltert und das qualitative Modellverhalten ist vergleichsweise robust, um sorgfältige Entscheidungen zu gewährleisten. Andererseits erlaubt die Sensitivität von quantitativen Aspekten eine Beeinflussung des Verhaltens durch interagierende Signalwege und weiterhin eine Variabilität innerhalb einer Population von Zellen. Eine solche Variabilität wird in Experimenten beobachtet und ist, wie aktuelle Arbeiten aus dem Bereich der Immunologie zeigen, wahrscheinlich von wichtiger physiologischer Bedeutung zur Regulation von Immunantworten. Die Analysen zeigen ebenfalls, dass dieser Kompromiss zu Schwachstellen führt, die von klinischer Relevanz sind.

**Bewertung.** Zahlreiche Ergebnisse dieser Arbeit sind nicht auf die Apoptose-Signaltransduktion beschränkt, sondern konzeptionell relevant für weitere Signalwege und deren systembiologische Betrachtung. Die Ergebnisse abschließend bewertend zeigt die modellbasierte Vorhersage zusätzlicher Regulationsmechanismen in Form von zusätzlichen Inhibitoren elegant das Potential der Systembiologie auf, gezielt biologisches Wissen zu bündeln und auf Konsistenz zu überprüfen. Weiterhin erlauben die modellbasierten Untersuchungen Einblicke, die experimentell, wenn überhaupt, nur unter hohem Aufwand möglich sind. Aus medizinischer Sicht von besonderer Bedeutung ist hier die Rolle der IAP Moleküle in der Progression von Tumoren. Ein anderer wichtiger Beitrag der Arbeit könnten aber auch die vorgeschlagenen Konzepte zur Untersuchung der Apoptose sein. So wurde die Betrachtung der Apoptose als bistabiler Vorgang bereits von zahlreichen Gruppen weltweit aufgegriffen und der diskutierte Kompromiss zwischen notwendiger Robustheit einerseits und Sensitivität zur Erfüllung von Funktion andererseits erscheint sehr viel versprechend für ein ganzheitliches Verständnis des physiologischen Vorgangs der Apoptose.