

Systems-biological Approach to Ras-mediated Signal Transduction

Kurzfassung der Dissertation

Menschliche Zellen besitzen ein komplexes intrazelluläres Netzwerk von interagierenden Signalmolekülen, das es ihnen ermöglicht, Informationen über ihre Umgebung zu verarbeiten und entsprechend darauf zu reagieren. Dieses Signalnetzwerk ist essentiell zur Ausbildung und Organisation von Geweben und Organen. Zellen kommunizieren mit benachbarten Zellen durch die Ausschüttung von Hormonen. Diese werden von den benachbarten Zellen über Rezeptoren wahrgenommen, welche die Signale in das intrazelluläre Signalnetzwerk leiten. Dieses verarbeitet die Signale und steuert das genetische Programm, d.h. reguliert, welche Proteine in welcher Menge produziert werden. Aufgrund der Komplexität des Signaltransduktionsnetzwerks, sowie der quantitativen Art der Signalverarbeitung im Netzwerk sind klassische reduktionistische Herangehensweisen nicht dafür geeignet, das Netzwerk zu untersuchen. Es scheint dagegen viel versprechend, das Netzwerk mit systemischen Methoden zu untersuchen.

In der Dissertation „Systems-Biological Approaches to Ras-Mediated Signal Transduction“ habe ich den Teil dieses Signalnetzwerkes, der durch ein kleines, GTP-bindendes Protein (Ras) gesteuert wird, mit systembiologischen Methoden untersucht. Dieser Teil des Signalnetzwerks ist von fundamentaler Bedeutung in der Entstehung verschiedener Krebsarten, denn eine ganze Reihe von typischen Mutationen in Krebszellen betrifft Signalmoleküle in diesem Netzwerk. Das Netzwerk steuert wichtige zelluläre Funktionen, wie Wachstum, Differenzierung, Zellteilung und kontrollierter Zelltod. Große Hoffnungen in der Therapie von Krebs richten sich zurzeit auf neue zielgerichtete Therapien, die mit kleinen Inhibitoren und Antikörpern diesen Teil des Signalnetzwerkes modulieren. Allerdings haben diese Therapieformen derzeit unvorhersagbaren Erfolg. Systembiologische Forschung verspricht, mit Hilfe von mathematischen Modellen die Effekte solcher zielgerichteten Eingriffe vorherzusagen. Jedoch liegt eine der großen Schwächen derzeitiger mathematischer Modelle, dass sie sich entweder nur auf das Signalnetzwerk beschränken oder nur auf die Regulation von Zielgenen beschreiben, und somit Effekte, die aus der Interaktion dieser beiden wichtigen Prozesse resultieren, nicht beschreiben können. In meiner Dissertation habe ich versucht, beide Prozesse in die Modelle einzubeziehen.

Im ersten Teil der Arbeit werden zunächst wichtige Eigenschaften der Signalkaskade mit Hilfe mechanistischer Modelle untersucht. Hierbei werden vor allem die Signalübertragungseigenschaften, die so genannten Stimulus-Antwort-Kurven charakterisiert. Die Vorhersage dieser Modelle, dass die MAPK geringe Stimuli herausfiltern und ein Schwellwertverhalten zeigen, wird durch Experimente an Einzelzellen bestätigt.

Im Anfang des zweiten Teils der Arbeit werden Methoden entwickelt, mit denen die Funktionen von Zielgenen genomweit vorhergesagt werden

können. Die dort vorgestellte Methode erlaubt zum ersten Mal eine solche Vorhersage, ohne dass sie eine große Anzahl falscher Vorhersagen trifft. Mit Hilfe dieses Algorithmus wird vorhergesagt, dass einige Zielgene des MAPK-Signalwegs Phosphatasen sind, also potentiell den Signalwegs inhibieren. Diese Vorhersage wird durch eine Analyse von Hochdurchsatzdaten bestätigt. Daraus wird die Hypothese abgeleitet, dass der MAPK-Signalweg seine eigenen Phosphatasen induziert und sich dadurch nach einer gewissen Zeit selber abschalten kann. Ausgehend von dieser Hypothese wird ein systembiologisches Experiment entworfen, in dem ein Modell an Zeitreihen von Signalaktivitäten und Phosphatasenexpression angepasst wird und die Güte der Anpassung für verschiedene Hypothesen verglichen wird. Es zeigt sich, dass die Induktion der Phosphatasen und das Schwellwertverhalten, das im ersten Teil der Arbeit untersucht wurde, essentiell sind, um die gemessenen Zeitreihen zu verstehen.

Die Folgende Abbildung fasst die Struktur der Arbeit zusammen.

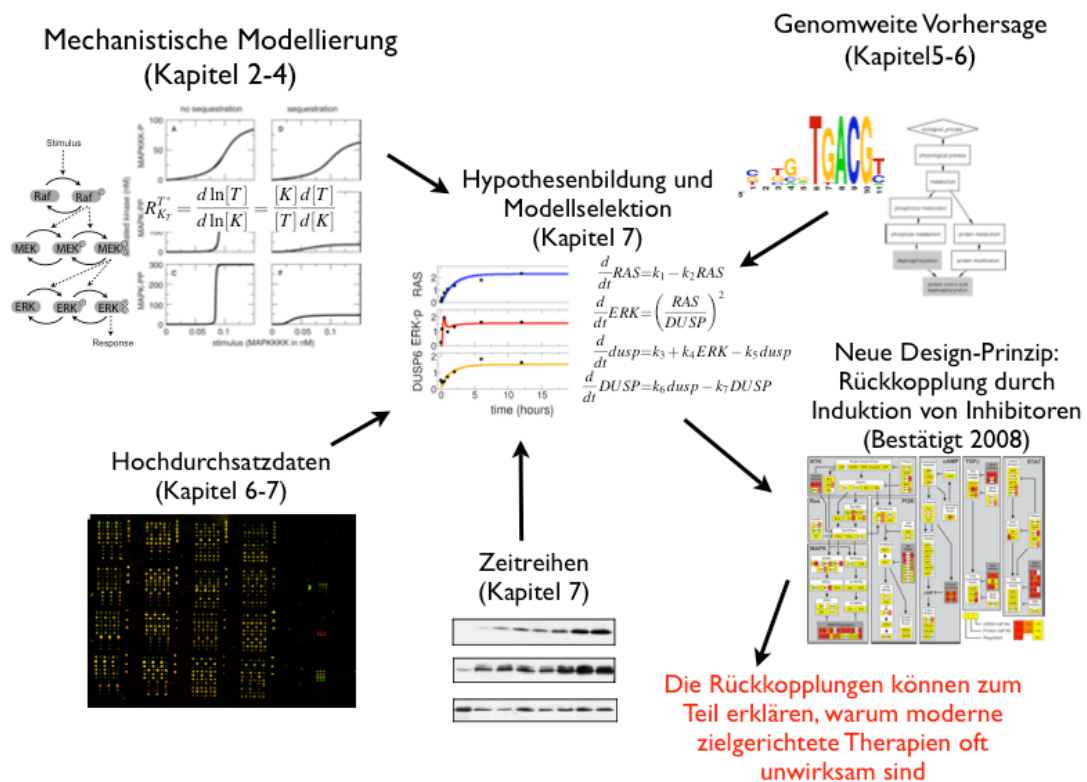


Abbildung: Überblick über die Arbeit und die daraus resultierenden Schlussfolgerungen für die medizinische Forschung. In den Kapiteln 2-4 werden mechanistische Modelle diskutiert, die das Schwellwertverhalten vom MAPK-Signalweg vorhersagen, welches in Kapitel 4 bestätigt wird. Genomweite Vorhersage von Zielgenen sagt voraus, dass Phosphatasen reguliert werden, was experimentell durch die Analyse von Hochdurchsatzdaten bestätigt wird. Daraus resultiert eine Hypothese zur Rückkopplungsregulation, die mit Hilfe von Modellselektion, Hochdurchsatzdaten und Zeitreihendaten bestätigt wird. Wir konnten mittlerweile zeigen, dass das gefundene Design Prinzip der Rückkopplungsregulation durch die Induktion von Inhibitoren ist nicht nur begrenzt auf die MAPK-Signaltransduktion ist, sondern ein generelles Prinzip der Regulation von eukaryotischen Signalwegen ist.

Aus diesem Design-Prinzip leiten sich Erklärungsmuster für die Unwirksamkeit der modernen zielgerichteten Krebstherapien ab.

Bezug zur Medizinischen Systembiologie

Die Arbeit integriert theoretische und experimentelle Ansätze und generiert dadurch eine Hypothese zur Regulation eines der wichtigsten Signalwege im Menschen. Dadurch wird zum ersten Mal ein mathematisches Modell des MAPK-Signalwegs für eine krebs-transformierende Zelle vorgestellt, das die Rückkopplungen durch Änderungen in der Expression von Genen mit einbezieht. Klinische Forschung hat gezeigt, dass der identifizierte and modellierte Feedback in der Tat große Bedeutung in der Therapieresistenz von Brustkrebs hat (Cui et al, Cancer Research 2006, 66, 5950-5959).

Während die Arbeit sich zunächst auf den MAPK-Signalweg beschränkt, konnten wir mittlerweile zeigen, dass das gefundene Muster, das heißt die Induktion von Inhibitoren durch ihre Signalwege, universell in Säuger-signalwegen auftritt. Das bedeutet für weitere systembiologische Untersuchungen von Signalnetzwerken: *Um prediktiven Wert für medizinische Eingriffe in das Signalnetzwerk zu haben, sollten mathematische Modelle die gen-regulatorische Antwort auf die Aktivierung von Signalwegen miteinbeziehen.* Für das Design und die Vorhersage der Effizienz von modernen, zielgerichteten Therapien sind diese transkriptionellen Rückkopplungen von entscheidender Bedeutung, denn:

- 1. Die Rückkopplungen greifen auf einer Zeitskala in das Signalnetzwerk ein, in der wichtige zelluläre Entscheidungen getroffen werden.*
- 2. Wenn innerhalb eines negativen Feedbacks eingegriffen wird, ist die Effizienz des Eingriffs viel geringer als außerhalb.*

Die negativen, transkriptionellen Rückkopplungsschleifen, die in der Dissertation untersucht wurden, können demnach eine mögliche Erklärung bieten, warum sich die zunächst sehr viel versprechenden MEK-Inhibitoren in klinischen Tests nicht bewähren konnten. Die in der Arbeit entwickelten Modelle legen nahe, dass man entweder außerhalb der Rückkopplungsschleife inhibieren sollte, oder die Rückkopplung selber stören könnte.

Die Arbeit wurde vom Juli 2002 bis Ende 2005 in der Arbeitsgruppe von Prof. Herzel am Institut für Theoretische Biologie der HU Berlin in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Tumorpathologie der Charite erstellt, und am 19.5.2006 am Institut für Biologie in Berlin verteidigt und mit dem Gesamtprädikat summa cum laude ausgezeichnet.

Aktuelles Publikationsverzeichnis

Begutachtete Publikationen:

1. Legewie, S, Herzel H, Westerhoff HV, **Blüthgen N**: Conserved design patterns in the feedback regulation of the eukaryotic signalling network, **Molecular Systems Biology** 2008, in press
2. Mrowka R, **Blüthgen N**, Fahlig M: Systematic Discovery of Specific Transcription Factor Target Genes, **FEBS J** 2008, in press
3. **Blüthgen N**, Legewie S: Systems analysis of MAPK signal transduction. **Essays in Biochemistry** 2008, accepted.
4. Mrowka R, Steege A, Kaps C, Herzel H, Thiele BJ, Persson PB, **Blüthgen N**: Dissecting the action of an evolutionary conserved non-coding region on renin promoter activity. **Nucleic Acids Res** 2007, 35:5120-5129.
5. Legewie S, Schoeberl B, **Blüthgen N**, Herzel H: Competing Docking Interactions Can Bring About Bistability in the MAPK Cascade. **Biophys J** 2007, 93:2279-2288.
6. Blüthgen N, Menzel F, Hovestadt T, Fiala B, **Blüthgen N**: Specialization, constraints, and conflicting interests in mutualistic networks. **Curr Biol** 2007, 17(4):341-346. (on the title)
7. Legewie S, **Blüthgen N**, Herzel H: Mathematical modeling identifies inhibitors of apoptosis as mediators of positive feedback and bistability. **PLoS Comput Biol** 2006, 2(9):e120. (Editors choice in Science, 20 October 2006)
8. Blüthgen N, Menzel F, **Blüthgen N**: Measuring specialization in species interaction networks. **BMC Ecol** 2006, 6:9.
9. **Blüthgen N**, Bruggeman FJ, Legewie S, Herzel H, Westerhoff HV, Kholodenko BN: Effects of sequestration on signal transduction cascades. **FEBS J** 2006, 273(5):895-906. (2nd most downloaded paper in FEBS Journal in 2006, see FEBS News 6/2007)
10. **Blüthgen N**: Sequestration shapes the response of signal transduction cascades. **IUBMB Life** 2006, 58(11):659-663.
11. Bandapalli OR, Geheeb M, Kobelt D, Kuehnle K, Elezkurtaj S, Herrmann J, Gressner AM, Weiskirchen R, Beule D, **Blüthgen N et al**: Global analysis of host tissue gene expression in the invasive front of colorectal liver metastases. **Int J Cancer** 2006, 118(1):74-89.
12. Legewie S, **Blüthgen N**, Schafer R, Herzel H: Ultrasensitization: switch-like regulation of cellular signaling by transcriptional induction. **PLoS Comput Biol** 2005, 1(5):e54.
13. Legewie S, **Blüthgen N**, Herzel H: Quantitative analysis of ultrasensitive responses. **Febs J** 2005, 272(16):4071-4079.
14. Kleinschmidt M, Grundmann O, **Blüthgen N**, Mosch HU, Braus GH: Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* cells under adhesion-inducing conditions. **Mol Genet Genomics** 2005, 273(5):382-393.

15. **Blüthgen N**, Kielbasa SM, Herzel H: Inferring combinatorial regulation of transcription in silico. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(1):272-279.
16. **Blüthgen N**, Brand K, Cajavec B, Swat M, Herzel H, Beule D: Biological profiling of gene groups utilizing Gene Ontology. *Genome Inform* 2005, 16(1):106-115.
17. Kielbase SM, **Blüthgen N**, Sers C, Schafer R, Herzel H: Prediction of cis-regulatory elements of coregulated genes. *Genome Inform* 2004, 15(1):117-124.
18. **Blüthgen N**, Kielbasa SM, Cajavec B, Herzel H: HOMGL-comparing gene lists across species and with different accession numbers. *Bioinformatics* 2004, 20(1):125-126.
19. **Blüthgen N**, Herzel H: How robust are switches in intracellular signaling cascades? *J Theor Biol* 2003, 225(3):293-300.
20. **Blüthgen N**, Verhaagh M, Guitiia, W, **Blüthgen N**: Ant nests in tank bromeliads - an example of non-specific interaction. *Insects Sociaux* 2000, 47:313-316.

Artikel in Sammelbänden/Proceedings:

1. **Blüthgen N**, Kielbasa SM, Beule D: Handling, comparing and interpreting gene groups. In: Choi, S (ed.), Introduction to Systems Biology, Humana Press, 2007.
2. **Blüthgen N**, Legewie S, Herzel H, Kholodenko BN: Mechanisms generating ultrasensitivity, bistability and oscillation in signal transduction. In: Choi, S (ed.), Introduction to Systems Biology, Humana Press, 2007.
3. Kielbasa SM, **Blüthgen N**, Herzel H: Genome-wide analysis of functions regulated by sets of transcription factors. In: Giegerich, R (ed.), German Conference on Bioinformatics 2004. Gesellschaft für Informatik, Bonn, 2004, P-53, 105-113.
4. **Blüthgen N**, Herzel H: MAP-Kinase-Cascade: Switch, Amplifier or Feedback Controller? In: R. Gauges, C. van Gend, U. Kummer (ed.) 2nd Workshop on Computation of Biochemical Pathways and Genetic Networks - Berlin: Logos Verlag 2001, pages 55-62.