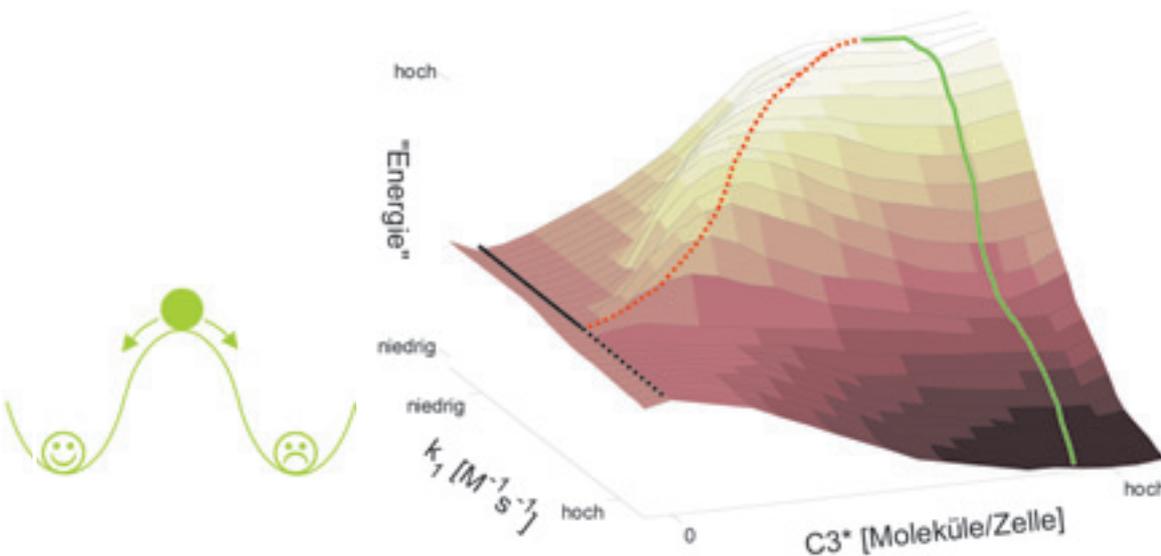


Sein oder Nichtsein?

Mathematische Systemtheorie zur Analyse Biologischer Signalverarbeitung



1. Überblick

Die mathematische Modellierung von Signaltransduktionsprozessen stellt besondere Herausforderungen an die Systembiologie. Das zu Grunde liegende komplexe dynamische Verhalten erfordert andere Herangehensweisen als sie z.B. bei der Modellierung von Stoffwechselfvorgängen angewendet werden können. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 495 „Topologie und Dynamik von Signalprozessen“ haben es sich die beteiligten Institute zum Ziel gesetzt, anhand der vom Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF) ausgelösten Signalwege prinzipielle Funktionsweisen zu verstehen, aber auch Antworten auf spezifische Fragen zu finden. TNF ist ein wichtiges inflammatorisches Signalmolekül, welches in Zellen so verschiedene Prozesse wie deren Aktivierung, Zellteilung oder den programmierten Zelltod auslösen kann. Damit vermag TNF über Sein oder Nichtsein von Zellen zu entscheiden. Obwohl man in Literaturdatenbanken bis zu

100.000 Einträge findet, die sich mit der Wirkweise von TNF auseinandersetzen, bestehen noch viele offene Fragen. Ein Kernproblem beruht in der ungeheuren Komplexität der TNF-Signaltransduktion, wobei hier mathematische Modelle helfen können, die komplexen Wirkweisen besser zu verstehen. Dabei ist die Modellierung aber nur ein Aspekt, denn erst die Analyse der gewonnenen Modelle bringt tiefere Einblicke. Da die zur Analyse eingesetzten Methoden oft ursprünglich für technische Fragestellungen entwickelt wurden, müssen sie von uns angepasst und weiter entwickelt werden.

1.1. Biologische Signaltransduktionsprozesse

Selbst einfach aufgebaute Einzeller, wie z.B. Bakterien, benutzen verschiedene chemische Signalwege, um sich ihrer Umwelt optimal anzupassen. Auch bei höher entwickelten Organismen stehen chemische Botenstoffe im Vordergrund, obwohl z.B.

die hoch spezialisierten Nervenzellen zusätzlich über elektrische Signale Informationen übermitteln. Im menschlichen Körper laufen zu jedem Zeitpunkt eine Vielzahl von Signalprozessen ab. Diese Signale ermöglichen die Kommunikation unterschiedlicher Körperbausteine untereinander und sind somit für die Koordination unseres komplexen Verhaltens essentiell. Mit Hilfe von Hormonen oder den so genannten Zytokinen können Signale vom Produzenten zu oft weit entfernten Zielzellen transportiert werden. Diese Signale bewirken dann auf der nächsten Ebene, der einzelnen Zelle, eine entsprechende Änderung des physiologischen Zustands und koordinieren somit die Homöostase des gesamten Organismus.

Auf der Ebene der einzelnen Zelle sind klassische Abschnitte der Signaltransduktion das Binden des Botenstoffes an seinen Membranrezeptor, welcher hierdurch aktiviert wird und das Signal an intrazelluläre Proteine übergibt. Auf ihrem Weg durch das Zytoplasma werden die Signale oft verstärkt und mit Signalen aus anderen Quellen verrechnet. Die Folge sind geänderte Proteinmengen oder geänderte Proteinaktivitäten. Neben ihrer Rolle als Signalträger fungieren Proteine oft als Enzyme, also Katalysatoren für Reaktionen – die Familie der Proteasen zum Beispiel hat die Fähigkeit andere Proteine zu spalten. Die Aktivität der Gesamtheit der Enzyme bestimmt somit die zelluläre Physiologie. Veränderungen in Enzymaktivitäten können dazu führen, dass die Zelle sich teilt, stirbt oder differenziert, also einen bestimmten Zelltyp ausprägt. Es gibt viele unterschiedliche Signale innerhalb einer Zelle, um deren unterschiedlichste Funktionen zu ermöglichen. Oft sind die Charakteristika der Signale und deren Zusammenspiel unzureichend verstanden; sie bieten somit eine große Herausforderung für die Systembiologie.

1.2. Mathematische Betrachtung der Signaltransduktion

Der Prozess der Signaltransduktion in der Biologie ist also sehr komplex und aus mathematischer Sicht nicht-linear. Die Dynamik, also das zeitliche Verhalten, ist sehr wichtig und wird entscheidend von positiven und negativen Rückkopplungen (feedback loops) beeinflusst. Daher sind

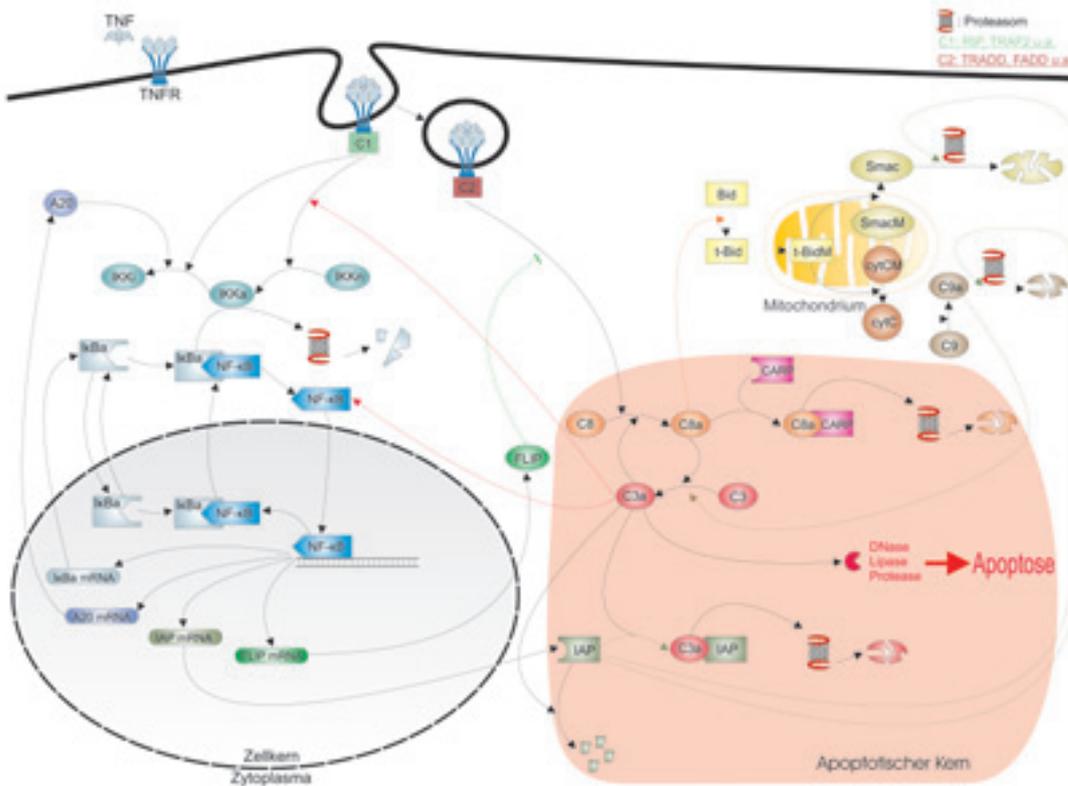
bestimmte Vereinfachungen, wie sie oft in mathematischen Modellen für Stoffwechselwege angenommen werden, ungeeignet. Auch wenn z.B. die Annahme eines Fließgleichgewichtes größere, handhabbare Modelle für Einblicke in die übergeordnete Netzwerkstruktur geben kann, gehen durch diese Einschränkung oft essentielle Charakteristika von Signalprozessen verloren. Weiterhin ist die klassische Unterteilung von Enzymen, Substraten und Produkten schwierig, da in Signalkaskaden das Produkt enzymatischer Reaktionen oft selbst wieder als Enzym fungiert. Bei einem solchen Prozess wird nur die Aktivität als Signal weitergegeben und es findet kein Stofffluss statt. Ein großes Problem bei der Modellierung von Signaltransduktionsprozessen wird weiterhin durch die begrenzte Datenlage geschaffen, die schnell zu unterdeterminierten Modellen führen kann. Prinzipiell stellt ein Modell immer eine Approximation der Wirklichkeit dar und die gewählte Modellierungsart, wie auch der gewählte Detaillierungsgrad (meist ausgedrückt in der Größe der Modelle) hängt von den zur Verfügung stehenden Daten und den Fragestellungen ab, die man untersuchen möchte. Eine Konsequenz dieser Umstände ist, dass es bei bestimmten Fragestellungen sinnvoll erscheint mit kleinen Modellen zu beginnen, die die essentiellen Verhaltensweisen des biologischen Systems wiedergeben können.

ZUSAMMENFASSUNG

Sein oder Nichtsein? – Mathematische Systemtheorie zur Analyse Biologischer Signalverarbeitung

Biologische Signaltransduktionswege sind verantwortlich für die Koordination unterschiedlicher Aspekte, die „das Leben“ ausmachen. Sie werden von einem komplexen Netzwerk biochemischer Reaktionen ausgeführt bei denen, im Unterschied zum Metabolismus, der Signalfluss und nicht der Massenfluss wichtig ist. Der Signalfluss wird durch nichtlineare dynamische Prozesse bestimmt, zu dessen effizienter Aufklärung es eines kombiniert experimentell-theoretischen Ansatzes bedarf. Dies stellt besondere Herausforderungen an die Systembiologie. Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 495 wird ein solch kombinierter Ansatz verfolgt, um tiefere Einblicke in die Funktionsweise des Zytokins Tumor Nekrose Faktor (TNF) zu erhalten und um grundlegende Mechanismen der biologischen Signaltransduktion sowie deren mathematische Beschreibung zu klären. TNF ist ein wichtiger Vermittler so diverser biologischer Phänomene wie Entzündung, Zellproliferation oder dem programmierten Zelltod (PCD). Obwohl die grundlegenden Signalwege auf molekularer Ebene enträtselt sind, ist ein detailliertes Verständnis des über Rückkopplungs-Mechanismen regulierten Netzwerks noch nicht vorhanden.

In diesem Artikel werden unterschiedliche Aspekte vergangener und aktueller Arbeiten unserer Gruppe vorgestellt. Arbeiten zum PCD-Signalweg werden detaillierter beschrieben, um exemplarisch zu zeigen, wie die Systemtheorie zur Biologie beitragen kann. Unter Verwendung eines reduzierten mathematischen Modells sechster Ordnung und durch Anwendung von Bifurkationsanalysen konnte gezeigt werden, dass es in dem System zusätzlicher Kontrollmechanismen bedarf. Die Modelluntersuchungen konnten genauere Anforderungen beschreiben, die diese Inhibitoren erfüllen müssen, deren Existenz neuerdings auch durch experimentelle Daten unterstützt wird. Das derart erweiterte Modell erfüllt zahlreiche Anforderungen, wie z.B. notwendige Stabilitätseigenschaften. Weiter bringt das Modell widersprüchlich erscheinende experimentelle Befunde in Einklang, welche unterschiedliche Aktivierungskinetiken von Schlüsselvorgängen des PCD auf Einzelzellebene bzw. Zellpopulationsebene beschreiben. Mit Hilfe mathematischer Modelle und deren Analyse können wir also tiefer gehende Einblicke in komplexe Signalnetzwerke erhalten.



01

TNF Signaltransduktion. Nach Bindung an seinen Rezeptor löst TNF unterschiedliche Signalwege aus. Ein Komplex aus unterschiedlichen Proteinen (C1) regt den Signalweg an, der letztendlich den Transkriptionsfaktor NF-κB aktiviert. Nach Internalisierung der TNF-Rezeptor-C1-Komplexe bildet sich ein Komplex mit anderer Proteinzusammensetzung (C2), welcher zur Aktivierung der Caspase 8 führt. In dem im Text näher analysierten Modell (hier rötlich unterlegt) dient diese Caspase 8-Aktivierung als Modelleingang, während die mit dem Zelltod verbundene Aktivierung der Caspase 3 als Modellausgang fungiert. Wie angedeutet, gibt es zahlreiche Interaktionspunkte zwischen den beiden Signalwegen.

1.3. Tumor Nekrose Faktor und Apoptose

Der Tumor Nekrose Faktor gehört zur Klasse der Zytokine, ist also ein hormonähnliches Molekül. TNF rückte ins Rampenlicht als man zeigen konnte, dass man durch eine einzige TNF-Injektion gezielt Tumore in Mäusen abtöten konnte. Aufgrund der starken Nebenwirkungen im Menschen ist die systemische Gabe von TNF zur Tumorbehandlung hier leider nicht möglich. Heute ist klar, dass TNF vor allem für die Aktivierung und Koordination von Abwehrleistungen des angeborenen Immunsystems wichtig ist. TNF entfaltet seine zelluläre Wirkung indem es an spezifische Membranrezeptoren der Zielzelle bindet. Diese Rezeptoren vermitteln das Signal über die Plasmamembran, und über zahlreiche Hilfsproteine werden in der Zelle entsprechende Signalwege ausgelöst (01). Ein wichtiger Signalweg führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Nuclear Factor kappa B), welcher die Produktion diverser Proteine hoch reguliert. Diese regulierten Proteine können in Entzündungsreaktionen helfen die Zellproliferation zu stimulieren und den programmierten Zelltod zu hemmen. Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein Programm, das jede Zelle beherbergt.

Er kann durch zahlreiche externe und interne Stimuli ausgelöst werden. Die Folge ist, dass die Zelle ein Selbstmordprogramm ausführt und anschließend kontrolliert, d.h. ohne Entzündungen hervorzurufen, beseitigt wird. Apoptose kann also als ein altruistischer Zelltod der einzelnen Zelle zum Wohl des gesamten Organismus angesehen werden. Eine Störung der Balance zwischen Zellteilung und Zelltod zugunsten des einen oder anderen Prozesses ist mit zahlreichen Krankheiten verbunden, unter denen Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer nur prominente Beispiele sind. In scheinbar paradoxer Weise induziert TNF nicht nur, wie oben beschrieben, anti-apoptotische Signale, sondern es kann selbst ebenfalls Apoptose auslösen. Das pro-apoptotische Signal wird parallel im Rezeptorkomplex initiiert und zahlreiche, nicht sehr gut verstandene Mechanismen kontrollieren, welcher der beiden Signalwege am Ende die Oberhand behält.

2. Frühe Ansätze und neue Herausforderungen

Erste Modelle der TNF-Signaltransduktion oder zur Rezeptor induzierten Apoptose wurden vor etwa fünf Jahren auch von unserer Arbeitsgruppe erstellt. Diese konnte einige Aspekte der Wechselwirkung der Signalwege gut beschreiben und prinzipielle Funktionsweisen veranschaulichen. Neue experimentelle Ansätze auf Einzelzellebene haben in den letzten Jahren aber zur überraschenden Einsicht geführt, dass vor allem die apoptotischen Signale auf der Einzelzellebene sehr viel schneller ablaufen als zuvor in Zellpopulationen beobachtet. Während man in Zellpopulationen ein graduell ansteigendes apoptotisches Signal über Stunden beobachten kann, werden die relevanten Moleküle auf Einzelzellebene, nach einer unterschiedlichen Wartezeit (lag phase), innerhalb weniger Minuten vollständig aktiviert. Diese neuen Daten waren mit dem

etablierten Modell nicht ohne weiteres wiederzugeben. Um diese Problematik detailliert untersuchen zu können, wurde der eigentliche apoptotische Kern des Modells isoliert, in der Hoffnung mit stringenteren mathematischen Analysen zu weiterreichenden Aussagen zu kommen.

2.1. Biologie des apoptotischen Kerns

Das erstellte Modell bildet den Kern der apoptotischen Reaktionen vereinfacht ab (01, rötlich hinterlegt). Hauptakteure bei der Rezeptor induzierten Apoptose sind die so genannten Caspasen, eine Subfamilie von Proteasen. Sie werden durch proteolytische Spaltung aktiviert und können dann weitere Caspasen, wie auch andere Proteine spalten. Somit existiert eine Caspase-Kaskade, von der die rezeptornahen Caspasen, im Folgenden durch Caspase 8 symbolisiert, direkt von TNF-Rezeptorkomplexen durch Spaltung aktiviert werden können. Die rezeptornahen Caspasen können ihrerseits rezeptorferne Caspasen, im Weiteren durch Caspase 3 symbolisiert, aktivieren. Letztere kann zahlreiche, für die Funktion der Zelle wichtige Proteine spalten. Ein prominentes Beispiel ist z.B. ein Inhibitor für eine so genannte DNase, welche nach Verlust des funktionellen Inhibitors die zelluläre DNS degradiert. Ein weiteres wichtiges Substrat für die Caspase 3 ist wiederum die Caspase 8 – hier liegt also eine positive Rückkopplung vor. Es ist offensichtlich, dass die Aktivierung der Caspasen streng kontrolliert werden muss und es wurden sowohl Inhibitoren identifiziert, die die Aktivierung der initialen Caspase 8 im Rezeptorkomplex verhindern (z.B. ein Molekül mit Namen *FLICE inhibitory protein*, FLIP), als auch solche, welche die aktivierte „Arbeits“-Caspase 3 hemmen (z.B. die Familie der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Proteine).

Will man ein möglichst einfaches Apoptose-Modell ohne Berücksichtigung der Rezeptorebene aufbauen, bildet die Initiator-Caspase 8 einen sinnvollen Eingang. Die Aktivität der Caspase 3 kann wiederum als Ausgang fungieren, da ihre Aktivierung mit dem Zelltod gut korreliert. Weiter muss die gegenseitige Caspase-Aktivierung berücksichtigt werden und die IAP-vermittelte Hemmung der aktivierten Caspase 3. Hinzu kommen dann noch Auf- und Abbaureaktionen für sämtliche beteiligte Komponenten, da diese auf den interessie-

renden Zeitskalen nicht vernachlässigbar sind.

2.2. Mathematisches Apoptose Modell

Eine mögliche Form, die biologischen Vorgänge mathematisch zu beschreiben, bilden Differentialgleichungssysteme. Mit Hilfe dieser Gleichungen kann beschrieben werden, wie sich die Konzentrationen der beteiligten Komponenten in Abhängigkeit von der Zeit ändern. Den Zeitverlauf erhält man in sehr einfachen Fällen durch analytisches Lösen des Differentialgleichungssystems und bei komplexeren Modellen allgemeiner durch deren numerische Lösung mit Hilfe von Computern, was auch als Simulation bezeichnet wird. Der Nachteil einer numerischen Lösung ist, dass hierfür numerische Zahlenwerte für Parameter eingesetzt werden müssen, deren genaue Werte oft nicht bekannt sind. Es ist also schwierig, mit Simulationen zu allgemeinen Aussagen zu kommen oder zu beschreiben, wie sich das prinzipielle Verhalten in Abhängigkeit von Parameterwerten ändert – ein Phänomen, das bei nichtlinearen Systemen sehr häufig vorkommt und sogar zu chaotischem Verhalten führen kann. Alternative Ansätze erlauben es jedoch, bestimmte Systemeigenschaften analytisch zu untersuchen, ohne konkrete Werte für alle Parameter einsetzen zu müssen.

Allgemein wird die zeitliche Veränderung einer Komponente beschrieben, indem man produzierende und konsumierende Reaktionen bilanziert. Mathematisch werden für Enzymreaktionen oft so genannte

SUMMARY

To Be or Not to Be? – Mathematical Systems Theory to Analyze Biological Signal Processing

Biological signal transduction pathways are responsible for the coordination of the different aspects that define life. These are carried out by a complex network of biochemical reactions where, unlike in metabolism, signal flow rather than mass flow is important. Signal flow is dictated by nonlinear dynamic processes that demand a combined experimental and theoretical approach in order to be efficiently explored which poses special challenges to systems biology. In the framework of the Sonderforschungsbereich 495 such a combined approach is taken to further elucidate the function of the cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF) and clarify principle mechanisms of biological signal transduction and its mathematical description. TNF is an important mediator of diverse biological effects ranging from inflammation and proliferation to programmed cell death (PCD). Although the major signaling pathways have been unraveled at the molecular level, a detailed mechanistic understanding of the underlying feedback-regulated network remains elusive.

Several aspects of our past and current work are sketched in this article. Work on the signaling pathway responsible for PCD is described in more detail to exemplify how systems theory can contribute to biology. Using a reduced mathematical model of sixth order and applying bifurcation analysis to it, it was worked out that the system requires additional control mechanisms. Model studies suggested their nature and have now become supported by recent experimental findings. The respective extended model fulfills desired characteristics, such as appropriate stability properties. Further, the results from the model studies allow the reconciliation of the fast activation kinetics of key PCD executioners observed at the single cell level opposed to the much slower kinetics found at the level of a cell population. With the help of mathematical modeling and analyses we can therefore gain deeper insight into complex signaling networks.

A

$$\begin{aligned}
 v_1 &= k_1 [C8a] \cdot [C3] \\
 v_2 &= k_2 [C3a] \cdot [C8] \\
 v_3 &= k_3 [C3a] \cdot [IAP] - k_{-3} [iC3a \sim IAP] \\
 v_4 &= k_4 [C3a] \cdot [IAP] \\
 v_5 &= k_5 [C8a] \\
 v_6 &= k_6 [C3a] \\
 v_7 &= k_7 [iC3a \sim IAP] \\
 v_8 &= k_8 [IAP] - k_{-8} \\
 v_9 &= k_9 [C8] - k_{-9} \\
 v_{10} &= k_{10} [C3] - k_{-10} \\
 v_{11} &= k_{11} [C8a] \cdot [CARP] - k_{-11} [iC8a \sim CARP] \\
 v_{12} &= k_{12} [CARP] - k_{-12} \\
 v_{13} &= k_{13} [iC8a \sim CARP]
 \end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned}
 \frac{d[C8]}{dt} &= -v_2 - v_4 \\
 \frac{d[C8a]}{dt} &= v_2 - v_5 - v_{11} \\
 \frac{d[C3]}{dt} &= -v_1 - v_{10} \\
 \frac{d[C3a]}{dt} &= v_1 - v_3 - v_6 \\
 \frac{d[IAP]}{dt} &= -v_3 - v_4 - v_8 \\
 \frac{d[C3a \sim IAP]}{dt} &= v_3 - v_7 \\
 \frac{d[CARP]}{dt} &= -v_{11} - v_{12} \\
 \frac{d[iC8a \sim CARP]}{dt} &= v_{11} - v_{13}
 \end{aligned}$$

02

Mathematisches Modell. *A* Aus den Reaktionen abgeleitete Raten und *B* das bilanzierte Differentialgleichungssystem des Modells. Das ursprüngliche Modell besteht hierbei aus den ersten zehn gezeigten Reaktionen und den ersten sechs Differentialgleichungen. Das erweiterte Modell beinhaltet alle Reaktionen und Differentialgleichungen.

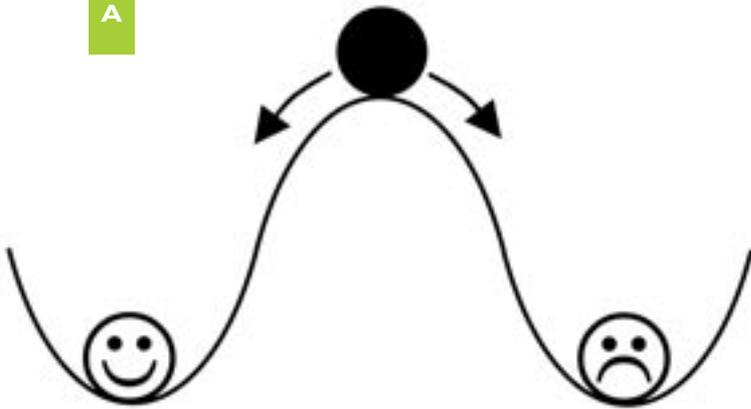
Michaelis-Menten-Kinetiken angenommen. In unserem Fall konnten wir aber zeigen, dass Kinetiken auf Basis des Massenwirkungsgesetzes sinnvoll sind, da man die so genannten Enzym-Substrat-Übergangskomplexe vernachlässigen kann. Dies führt zu einer vereinfachten Gleichungsstruktur, die mathematisch gesehen maximal quadratische Terme enthält. Diese Struktur ermöglicht Untersuchungen, die

anderenfalls so nicht möglich wären. Unser resultierendes Modell beinhaltet sechs Komponenten (Differentialgleichungssystem sechster Ordnung) und zehn Reaktionen (02).

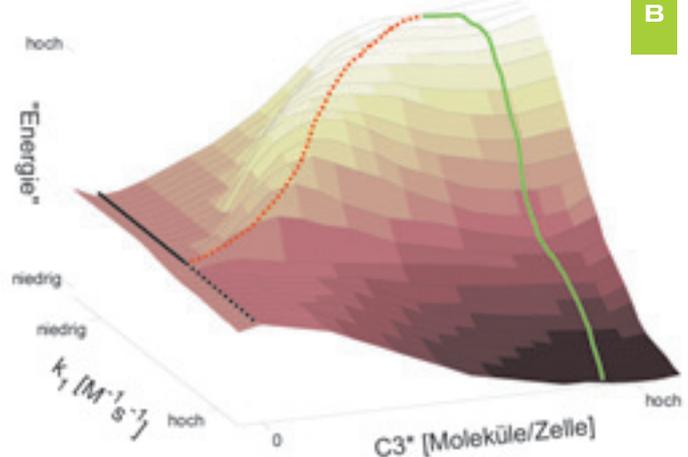
3. Anforderungen an das Modell

Die Entscheidung, ob eine einzelne Zelle Apoptose erleidet oder überlebt, ist letztendlich eine „Ja oder Nein“-Entscheidung. Für eine Zellpopulation ist dies nicht zwingend der Fall, da hier oft nur ein gewisser prozentualer Anteil der Zellen stirbt. Will man nun das Verhalten einer Einzelzelle beschreiben und den zugrunde liegenden Mechanismus verstehen, muss diesem Punkt jedoch Rechnung getragen werden. Neuere Experimentaldaten auf Einzelzellebene unterstreichen diese Überlegungen, da sie zeigen, dass die eigentliche Aktivierung der „Arbeits“-Caspasen (Caspase 3) irreversibel und rasch innerhalb eines sehr engen Zeitfensters nach einer unterschiedlich langen Warte- bzw. Entscheidungsphase abläuft. Offensichtlich wird also ein kontinuierliches Eingangssignal (Caspase 8-Aktivierung) in eine „Ja

A



B



03

Bifurkationsillustration. *A* In einer Ruhelage verändern sich die Konzentrationen der Komponenten des Systems nicht mit der Zeit. Wenn wir nahe diesen Konzentrationen starten und das System in die Ruhelage läuft, wird diese als stabil bezeichnet, sonst als instabil. Das gezeigte Beispiel ist bistabil, besitzt also zwei stabile Ruhelagen (und eine trennende instabile Ruhelage). *B* Hier ist das Stabilitätsverhalten

in Abhängigkeit von dem Parameter k_1 , bei sonst konstanten Parametern, dargestellt. Die „Energie-Koordinate“ soll der Veranschaulichung dienen. Durchgezogene Linien kennzeichnen stabile, gestrichelte Linien instabile Ruhelagen. Für kleine k_1 -Werte gibt es nur eine Ruhelage, die „Lebensruhe“, die für den gesamten Konzentrationsbereich attraktiv ist. Bei etwas größeren k_1 -Werten tauchen plötzlich

zwei weitere Ruhelagen im positiven Konzentrationsbereich auf. Ab diesem Bifurkationspunkt ergibt sich die Landschaft eines bistabilen Systems (wie in *A* dargestellt) – wir finden eine stabile „Lebensruhe“ (schwarze Linie), eine stabile „Todesruhe“ (grüne Linie) und eine instabile Ruhelage (rote Linie), die die Einzugsbereiche trennt. Mit weiter zunehmenden k_1 -Werten verändert sich die Landschaft

und die trennende instabile Ruhelage trifft auf die „Lebensruhe“. An diesem zweiten Bifurkationspunkt werden die Stabilitätseigenschaften ausgetauscht und die zuvor trennende Ruhelage verschwindet im biologisch irrelevanten negativen Konzentrationsbereich. Für große k_1 -Werte ist also die „Lebensruhe“ instabil und die „Todesruhe“ attraktiv für den gesamten positiven Konzentrationsbereich.

oder Nein“-Entscheidung am Ausgang (Caspase 3) umgesetzt.

Mathematisch gesehen lässt sich diese Forderung in ein bistabiles Schalterverhalten übersetzen. Bistabil bezeichnet hier die Tatsache, dass zwei stabile Ruhelagen vorliegen. Als Ruhelage wird derjenige Zustand bezeichnet, der zeitlich invariant unter dem Einfluss der Differentialgleichungen ist. Wenn sich die Konzentrationen der Komponenten über die Zeit also nicht ändern, befindet sich das System in einer Ruhelage. Für die Konzentrationen der im Modell berücksichtigten Komponenten kann angenommen werden, dass sie sich in einer nicht stimulierten Zelle nicht ändern, sich das System also in einer „Lebensruhelage“ befindet. Eine Ruhelage wird dann als stabil bezeichnet (03), wenn kleine Auslenkungen im Zustand zur Rückkehr in die Ruhelage führen (ähnlich einer Kugel in einer Mulde) und als instabil, wenn dies nicht der Fall ist (ähnlich einer Kugel auf einer Anhöhe). Die Lebensruhelage muss stabil sein, da kleine Störungen nicht automatisch den Zelltod zur Folge haben dürfen. Nach einem starken Stimulus des apoptotischen Signalsystems wird die Zelle jedoch unwiderruflich in einen anderen Zustand gebracht, welcher als „Todesruhelage“ bezeichnet werden kann und ebenfalls stabil sein muss. Somit muss das Differentialgleichungssystem zwei stabile Ruhelagen ermöglichen und je nach Anregung muss die eine oder andere angesteuert werden.

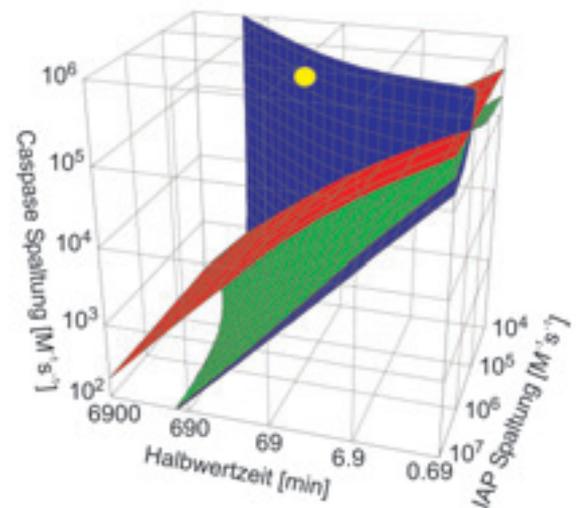
3.1. Bistabilitätsanalyse

Wir haben untersucht, für welche Parameterbereiche das mathematische Modell des apoptotischen Kerns ein bistabiles Verhalten zulässt. Die hierbei angewandten Methoden nutzen die relativ einfache Gleichungsstruktur aus und ermöglichen es, zu analytischen Aussagen bezüglich der Lage und Stabilität der Ruhelagen zu kommen, was selten für Systeme solch hoher Ordnung möglich ist. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten stark auf einen Widerspruch des Modellverhaltens mit den Experimentaldaten hin. Obwohl ein kleiner Parameterbereich identifiziert werden konnte, der prinzipiell ein bistabiles Verhalten ermöglicht, zeigte sich jedoch, dass diese Parameterwerte weit weg von denjenigen der Experimentaldaten liegen (04). Die aus experimentellen Daten ermittelte

Modellstruktur ließ sich also nicht mit experimentell bestimmten kinetischen Daten in Einklang bringen.

3.2. Modellerweiterung

Mit Hilfe der Modellbildung ist es nun möglich zu untersuchen, welche strukturellen Veränderungen diese Diskrepanz eliminieren könnten. Das Verhalten des Modells – eine instabile Lebensruhelage bei Parameterkombinationen, die mit den Literaturwerten in Einklang standen, legte es nahe, nach einer zusätzlichen inhibitorischen Komponente des apoptotischen Weges zu suchen. Stabilitätsuntersuchungen und Simulationen zeigen, dass die Einführung eines solchen hypothetischen Inhibitors auf der Ebene der Caspase 8 zu einem Modell führt (02), welches im Einklang mit Parameterwerten der Literatur ein bistabiles Verhalten aufweist. Wie in (05) gezeigt, erfüllt dieses modifizierte Modell alle gestellten Anforderungen: Bei einer schwachen Aktivierung der Caspase 8 gibt es keine signifikante, dauerhafte Aktivierung der rezeptorfernen Caspase 3. Ab einer bestimmten Anregungsschwelle werden jedoch die Effektor-Caspasen maximal aktiviert, das System springt von der stabilen „Lebensruhelage“ in die stabile „Todesruhelage“. Eine weitere Erhöhung des Eingangsstimulus führt interessanterweise nur zu einem früheren Schalten, ändert aber nichts an der Amplitude der Caspase-Aktivierung. Dieses Verhalten des Modells stimmt gut mit publizierten Experimentalergebnissen überein. Ebenfalls in Einklang mit aktuellen Ergebnissen anderer Gruppen, konnten wir die positive Rückkopplung in unserem Modell als notwendige Voraussetzung für ein bistabiles Verhalten identifizieren. Neue Experimentaldaten weisen im Übrigen eindeutig auf die Existenz von Inhibitoren der Caspase 8 hin – wenn auch noch keine biochemischen Details bekannt sind, die in das Modell integriert werden könnten.


04

Bistabilitätsanalyse. Die analytische Lösung der Ruhelagengleichungen, in Kombination mit Stabilitätsanalysen ermöglicht eine dreidimensionale Bifurkationsuntersuchung in einem großen Parameterbereich. Für die Visualisierung wurden folgende, biologisch sinnvolle Parameterverhältnisse gewählt: für die gegenseitige Caspase Aktivierung $k_1 = 2 \cdot k_2$, für die Halbwertszeiten $k_7 = 2 \cdot k_5 = 2 \cdot k_6 = 4 \cdot k_8 = 4 \cdot k_9 = 4 \cdot k_{10}$, und für die IAP-Spaltung k_4 ; k_3 und k_3 wurden auf als genau einzuschätzende Literaturwerte fixiert. Der gelbe Punkt deutet die Lage weiterer Literaturwerte an. Über der roten Fläche gibt es keine stabile „Lebensruhelage“, unter der blauen Fläche gibt es keine zweite stabile Ruhelage im positiven Konzentrationsbereich und unter der grünen Fläche gibt es nur komplexe Lösungen. Für Bistabilität werden also Parameterkombinationen benötigt, die unter der roten und über der blauen und über der grünen Fläche liegen.

3.3. Einzelzell- und Populationsverhalten

Die eindeutige zeitliche Abhängigkeit des „Schaltvorganges“ von der Stimulusstärke ermöglicht es nun, die beobachtete Diskrepanz zwischen Einzelzell- und Populationsmessungen zu erklären:

Es ist bekannt, dass praktisch jedes Molekül innerhalb einer Population von Zellen eine Streuung bezüglich seiner Anzahl aufweist. Bildet man diese Population durch eine entsprechende Anzahl unterschiedlicher Parametersätze im Modell nach, würde jetzt diese „virtuelle Zellpopulation“ auf ein konstantes Eingangssignal mit einem

zeitlich gestreuten Spektrum an Caspase 3-Aktivierung antworten. Gibt man nun das zeitliche Populationsverhalten an Hand von Experimentaldaten vor, so kann man zurückrechnen, welche Eingangssignalverteilung nötig wäre, um das entsprechende Populationsverhalten zu erreichen (06).

Die erhaltene Kurve deckt sich gut mit der experimentell beobachteten Verteilung der Membranrezeptoren. Alleine diese Streuung der auf der Zelloberfläche vorhandenen Membranrezeptoren würde also bei einer konstanten Stimulation einer Zellpopulation (z.B. eine gegebene TNF-Konzentration) zu einer zeitlich gestreuten apoptotischen Antwort führen. Diese Untersuchungen zeigen, dass auch einfache Modelle mit vereinfachten Annahmen bereits ein tieferes Verständnis über die zu Grunde liegenden prinzipiellen Vorgänge liefern können – wie z.B.

grundsätzliche Zusammenhänge zwischen Experimentaldaten aus Einzelzell- und Zellpopulationsmessungen.

4. Aktuelle Arbeiten

Aufbauend auf den neu gewonnenen Erkenntnissen werden zurzeit weitere biologische und theoretische Fragestellungen bearbeitet.

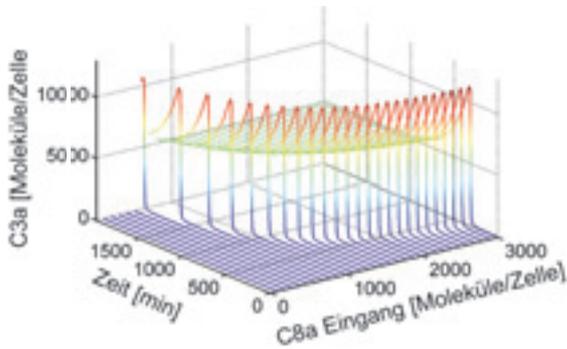
Wie Anfangs erwähnt, werden von TNF zwei widersprüchlich erscheinende Signalwege gleichzeitig aktiviert. Ein Schwerpunkt unserer Arbeiten bildet daher die Beschreibung des Zusammenspiels des apoptoti-

schen Signalwegs mit dem anti-apoptotischen, NF- κ B vermittelten Signalweg. Letzterer wurde isoliert in jüngster Vergangenheit von einigen Gruppen näher charakterisiert und modelliert und dabei wurde die Bedeutung der Signalform herausgearbeitet. Es gibt zahlreiche Interaktionspunkte der beiden Wege miteinander, deren Bedeutung nun theoretisch und experimentell hinterfragt werden kann.

Weiter sind die Vorgänge bei der Signalinitiierung im Rezeptorkomplex noch unzureichend verstanden. Sowohl auf experimenteller, als auch theoretischer Ebene finden hier Arbeiten statt, die zu einem tieferen Verständnis dieser Vorgänge beitragen sollen. Ein besonderes Interesse richtet sich dabei auf die Klärung der Rolle von Rezeptoraggregaten, die hierbei experimentell beobachtet werden.

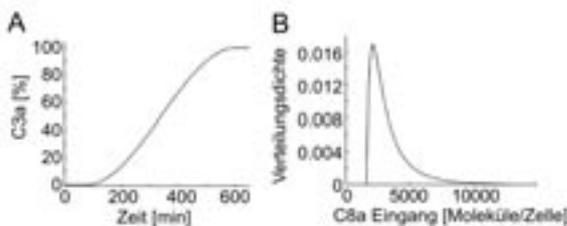
In diesem Fall war es aufgrund des biologischen Wissens möglich, ein Modul (Teilsystem) aus den komplexen TNF Signalwegen zu isolieren und in diesem Modell durch spezifische Untersuchungen Vereinfachungen in den Reaktionsschemata vorzunehmen, die das Systemverhalten kaum verändern und damit noch biologisch sinnvoll wiedergeben. Weitere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe befassen sich damit, selbst bei begrenztem biologischem Wissen systematisch, zum einen Module isolieren zu können und zum anderen komplexe Module zu vereinfachen. Zum Beispiel würde eine exakte Beschreibung der molekularen Vorgänge am TNF-Rezeptor aufgrund der kombinatorischen Vielfalt der zahlreichen interagierenden Proteine viele Millionen Zustände liefern (welche alle in Differentialgleichungen bilanziert werden müssten), obwohl viele dieser Zustände im Informationsgehalt redundant und/oder experimentell nicht differenzierbar sind.

Bei den oben genannten Ergebnissen hat uns die Kombination von theoretischen Untersuchungen mit experimentellen Daten geholfen, eine geeignete Modellstruktur zu finden. Von theoretischer Seite her versuchen wir Verfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe man unterschiedliche Modelle diskriminieren kann, um zu entscheiden, welches Modell unter verschiedenen vorgeschlagenen Modellen das Bessere ist. Hierbei steht die Methodenentwicklung im Vordergrund. Die zwei vorgestellten Modelle dienen hier als Testobjekte. Die derzeitigen Ansätze nutzen die kürzlich herausgearbeitete Eigenschaft der Robustheit



05

Simulation des bistabilen Verhaltens des erweiterten Modells. Es sind zeitliche Verläufe der aktivierten Caspase 3 für verschiedene Eingänge gezeigt. Oberhalb einer Schwelle (~ 75 Moleküle aktivierter Caspase 8 pro Zelle) wird das System vollständig aktiviert, während unterhalb dieser Schwelle keine signifikante Aktivierung stattfindet. Die „Lebensruhelage“ entspricht in etwa dem blauen Bereich und die „Todesruhelage“ dem grünen Bereich, der nach langer Zeit erreicht wird.



06

Einzelzell- und Populationsverhalten in Einklang gebracht. A Zeitverlauf der Caspase 3 Aktivierung einer Zellpopulation. B Verteilungsdichte des Eingangsimpulses in das in Abbildung 5 beschriebene Modell, welche nötig ist, um das in A gezeigte Populationsverhalten zu erhalten.

von biologischen Signalwegen als Diskriminierungskriterium. Hiermit ist gemeint, dass das Systemverhalten oder bestimmte Systemeigenschaften relativ tolerant gegenüber Störungen sind. Wir untersuchen zum einen die Robustheit des bistabilen Verhaltens bezüglich Parametervariationen und zum anderen die Robustheit der bistabilen Schwelle unter dem Einfluss der stochastischen Natur der Reaktionen. Die hier vereinfacht dargestellten Einflüsse von unterschiedlichen Molekülkonzentrationen in unterschiedlichen Zellen sind in realen Systemen nicht die einzigen stochastischen Einflüsse auf die Signalübertragung. Die biochemischen Reaktionen an sich können nämlich nur näherungsweise mit dem hier vorgestellten deterministischen Ansatz wiedergegeben werden. Diese Untersuchungen sind rechenintensiv, können aber nicht nur ein Kriterium zur Modelldiskriminierung liefern, sondern wir erhoffen uns hiervon weitere Einblicke in das prinzipielle Systemverhalten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde beispielhaft gezeigt, wie mit Hilfe von mathematischer Modellierung in Kombination mit einer anschließenden Analyse experimentelle biologische Daten und Sichtweisen auf Konsistenz überprüft werden können. Des Weiteren können die theoretischen Überlegungen helfen, scheinbar widersprüchliche Daten in Einklang zu bringen und somit zum tieferen Verständnis der zugrunde liegenden Vorgänge beitragen. Diese Arbeiten zeigen exemplarisch einige Vorzüge und Möglichkeiten der systemtheoretischen Analyse biologischer Vorgänge auf. Während die angewandten Methoden bisher meistens nur für Systeme sehr geringer Ordnung (≤ 3) angewendet wurden, zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse und die damit gewonnenen Einsichten, dass auch für größere Modelle oft noch sehr allgemeine Aussagen über interessierende Systemeigenschaften möglich und sinnvoll sind.

Zum Abschluss wurden noch einige zusätzliche Arbeitsgebiete angesprochen, die weitere Herausforderungen in diesem neuen Arbeitsgebiet aufzeigen. Ein besseres Verständnis des Systemverhaltens ist nicht nur für die Grundlagenwissenschaften von großem Interesse, sondern natürlich essentiell, um in der Zukunft rationale, sinnvolle

Angriffspunkte für potentielle Medikamente zu identifizieren. Hier können mathematische Modelle helfen, Medikamente *in silico* auf Wirksamkeit und Spezifität zu untersuchen. Modelle mit einer Qualität, die Experimente überflüssig machen, liegen aber wohl noch sehr weit in der Zukunft.

Frank Allgöwer
Thomas Eißing
Peter Scheurich

Literatur

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2003). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Conzelmann, H., J. Saez-Rodriguez, T. Sauter, E. Bullinger, F. Allgöwer and E. D. Gilles (2004). Reduction of mathematical models of signal transduction networks: simulation-based approach applied to EGF receptor signalling. *IEE Systems Biology* 1(1): 159–169.
- Eißing, T., H. Conzelmann, E. D. Gilles, F. Allgöwer, E. Bullinger and P. Scheurich (2004). Bistability analyses of a caspase activation model for receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279(35):36892–7.
- Fall, C. P., E. S. Marland, J. M. Wagner and J. J. Tyson (2002). *Computational cell biology*. Springer-Verlag, New York.
- Kitano, H. (2002). *Systems biology: a brief overview*. *Science* 295(5560):1662–4.
- Saez-Rodriguez, J., A. Kremling, H. Conzelmann, K. Bettenbrock and E. D. Gilles (2004). *Modular Analysis of Signal Transduction Networks*. *IEEE Control Systems Magazine* 24(4):35–52.
- Schoeberl, B., E. D. Gilles and P. Scheurich (2001). *A mathematical vision of TNF receptor interaction*. *Proceedings of the International Congress of Systems Biology, Pasadena, CA, pp. 158–167*, Omnipress, Madison.
- Stelling, J., U. Sauer, Z. Szallasi, F. J. Doyle, 3rd and J. Doyle (2004). Robustness of cellular functions. *Cell* 118(6):675–85.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). *Tumor necrosis factor signaling*. *Cell Death Differ.* 10(1):45–65.

DIE AUTOREN

THOMAS EISSING

ist zur Zeit wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemtheorie technischer Prozesse der Universität Stuttgart und Student der Technischen Kybernetik. Er erlangte den Abschluss Diplom-Biologe (technisch orientiert) im Jahr 2002 nach Studien an der Universität Stuttgart und der University of New South Wales. Ein Forschungsaufenthalt brachte ihn 2001 zur Fa. Millennium Pharmaceuticals nach Cambridge, Massachusetts. Sein Forschungsschwerpunkt liegt in der Anwendung von Systemtheorie auf molekulare Zellbiologie.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Systemtheorie technischer Prozesse, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-7750

E-Mail: eissing@ist.uni-stuttgart.de

PETER SCHEURICH

ist Professor für Molekulare Immunologie am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart. Er hat in Mainz Chemie studiert und im Fach Biochemie promoviert. Danach war er Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Medizin der damaligen Kernforschungsanlage Jülich, am Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz sowie bei einer Klinischen Arbeitsgruppe der Max-Planck-Gesellschaft in Göttingen. Sein Hauptarbeitsgebiet sind Signal- und Wirkmechanismen immunregulatorischer Zytokine.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Allmandring 31, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-6987

E-Mail: Peter.Scheurich@izi.uni-stuttgart.de

FRANK ALLGÖWER

ist Professor für Systemtheorie technischer Prozesse und Leiter des gleichnamigen Instituts an der Universität Stuttgart. Er hat in Stuttgart Technische Kybernetik und an der University of California at Los Angeles Angewandte Mathematik studiert und promovierte in der Fakultät Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart. Vor seiner Berufung nach Stuttgart im Jahr 1999 hatte er eine Professur für Nichtlineare Systeme im Departement Elektrotechnik der ETH Zürich. Längere Forschungsaufenthalte brachten Frank Allgöwer an das NASA Ames Research Center, das California Institute of Technology, die University of California at Santa Barbara und zur Fa. DuPont in Wilmington, Delaware. Sein Hauptarbeitsgebiet ist die Entwicklung und Anwendung systemtheoretischer Methoden zur Analyse und Regelung dynamischer Systeme.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Systemtheorie technischer Prozesse, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-7733

E-Mail: allgower@ist.uni-stuttgart.de

WEITERE AN DEN PROJEKTEN BETEILIGTE PERSONEN

Markus Branschüdel, Eric Bullinger, Carla Cimatoribus, Holger Conzelmann, Ernst D. Gilles, Cedric Gondro, Thomas Sauter, Monica Schliemann, Birgit Schoeberl, Harald Wajant, Gudrun Zimmermann