

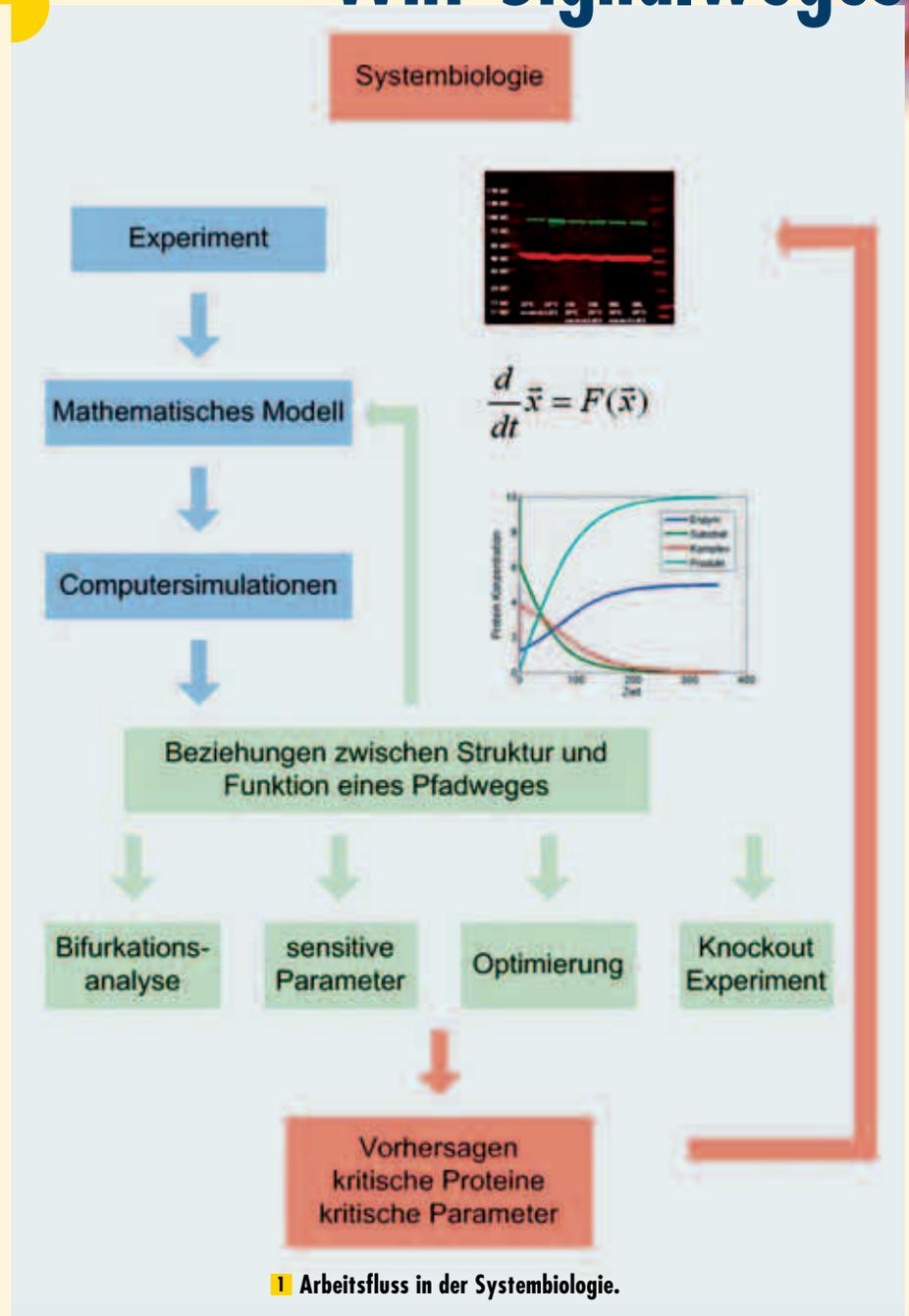
# Systembiologie des kanonischen Wnt-Signalweges

Die Systembiologie umfasst die mathematische Modellierung zellbiologischer Prozesse und die Untersuchung der Eigenschaften der Modelle durch Computersimulationen. Aufgrund der Möglichkeit, Experimente mit dem Computer zu planen, entwickelt sich diese Wissenschaft zu einer unverzichtbaren Unterstützung der Laborarbeit. In diesem Beitrag wird am Beispiel des kanonischen Wnt-Signalweges die Stärken der mathematischen Modellierung und der mögliche Gewinn für die Laborarbeit diskutiert.

KATJA RATEITSCHAK\*, CHRISTIAN LANGE\*\*,  
EILHARD MIX\*\*, ARNDT ROLFS\*\*,  
OLAF WOLKENHAUER\*

Prozesse in biologischen Zellen, wie Signaltransduktion, Stoffwechsel und Zellteilung werden durch komplexe Netzwerke biochemischer Reaktionen gesteuert. Diese Netzwerke lassen sich auf mathematische Modelle abbilden, die die zeitlichen Änderungen der Proteinkonzentrationen basierend auf verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen beschreiben. Die mathematische Modellierung der Netzwerke und die Untersuchung der Eigenschaften der mathematischen Modelle durch Computersimulationen ist Gegenstand der sich rasant entwickelnden Wissenschaft der Systembiologie. Grundlagen der Systembiologie sind die Biologie und die Systemtheorie aus den Ingenieurwissenschaften. Letztere stellt Methoden zur Analyse mathematischer Modelle bereit. Die Systembiologie hat zum Ziel, Beziehungen zwischen der Struktur und der Funktion eines biochemischen Reaktionsnetzwerkes zu identifizieren und darüber hinaus experimentell

\* Systembiologie und Bioinformatik,  
Universität Rostock, 18051 Rostock  
\*\* Neurobiologisches Labor,  
Universität Rostock, 18055 Rostock



1 Arbeitsfluss in der Systembiologie.

überprüfbare Vorhersagen über dessen Eigenschaften zu erstellen. Der Arbeitsfluss in der Systembiologie ist in Abbildung 1 dargestellt.

## Vom Experiment zum mathematischen Modell

Ein traditioneller mathematischer Modellierungsansatz in der Systembiologie basiert auf Differentialgleichungen zur Beschreibung der zeitlichen Änderungen der

Proteinkonzentrationen, der sich durch viele Anwendungen etabliert hat [1–8]. Die Differentialgleichungen werden auf Grundlage von experimentellen Erkenntnissen über die Wechselwirkungen spezifischer Proteine in einem biochemischen Reaktionsnetzwerk aufgestellt. Die Parameter der Gleichungen sind die chemischen Reaktionskonstanten, die mit statistischen Methoden aus quantitativen experimentellen Daten berechnet werden können [8]. Die

ser Modellierungsansatz ermöglicht quantitative Vorhersagen der dynamischen Eigenschaften eines biochemischen Reaktionsnetzwerkes und unterstützt damit direkt die Planung von Experimenten.

Die Eigenschaften eines mathematischen Modells können durch Computersimulationen sehr schnell und für umfangreiche Parametervariationen untersucht werden (s. Abb. 1). Mit Methoden der Bifurkationsanalyse können kritische Parameter identifiziert werden, die zu qualitativen Änderungen der Stabilität der Protein-Konzentrationen führen [2]. Zum Beispiel kann das Überschreiten eines kritischen Parameters Oszillationen im zeitlichen Verlauf der Konzentration eines oder mehrerer Proteine hervorrufen, deren Konzentrationen unterhalb des kritischen Parameters konstante stationäre Werte annehmen. Parameter oder Konzentrationen, die sensitiv das Ausgangssignal beeinflussen, werden durch die traditionelle metabolische Kontrollanalyse bestimmt [5]. Unbekannte Parameter können optimiert werden, um ein bestimmtes Ausgangssignal zu simulieren.

### Beispiel – der kanonische Wnt-Signalweg

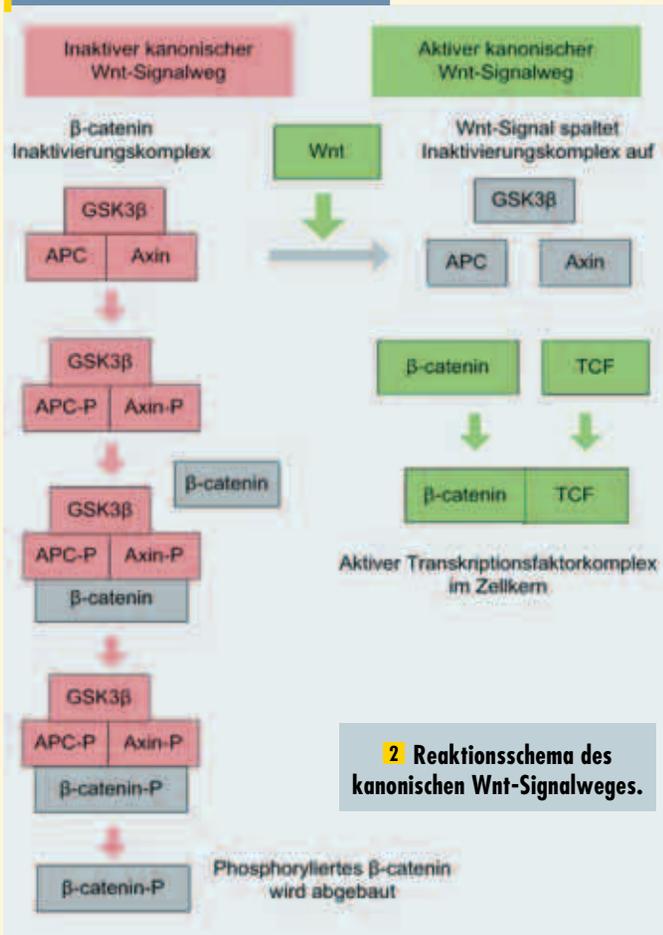
Durch die schnelle und umfangreiche Analyse der Eigenschaften mathematischer Modelle biochemischer Reaktionsnetzwerke entwickelt sich die Systembiologie zu einer praktischen Unterstützung der Laborarbeit. Knock-out- und sRNAi-Experimente können schnell durch das Verringern der entsprechenden Variablen in den Differenzialgleichungen modelliert werden. Der Einfluss einer hypothetischen Wechselwirkung kann durch das Einfügen von neuen Variablen in die Differenzialgleichungen untersucht werden. Kritische Parameter, die zu qualitativen Änderungen der Eigenschaften führen, können vorhergesagt werden. Durch diese detaillierten Untersuchungen der mathematischen Modelle unterstützt die Systembiologie die Planung von Experimenten und hilft dabei, quantitative Daten schnell und effizient zu erzeugen. In zwei aktuellen Veröffentlichungen hat die mathematische Modellierung zu neuen Erkenntnissen über biochemische Reaktionsnetzwerke geführt, die experimentell bestätigt wurden [8, 10].

Nachfolgend wird eine aktuelle Veröffentlichung über ein mathematisches Modell des kanonischen Wnt-Signalweges [7] vorgestellt und über den möglichen Gewinn für die Laborarbeit diskutiert.

Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und in der Biologie adulter Stammzellen, ein-

schließlich Krebs. Seine Dysregulation ist z.B. die prominenteste Ursache für Dickdarmkrebs [12]. Der Wnt-Signalweg setzt sich aus verschiedenen Teilsignalwegen zusammen. Der bekannteste ist der kanonische Wnt-Signalweg [11]. Das Reaktionsschema dieses Signalweges ist in Abbildung 2 dargestellt. Er hat die Aufgabe, die Expression bestimmter Gene zu regulieren. Der kanonische Wnt-Signalweg wird durch die Bindung des Wnt-Proteins an einen Zweikomponenten-Rezeptorkomplex aktiviert. Dieser Komplex besteht aus den Proteinen LRP5/6 und Frizzled auf der Zellmembran. Der aktive Signalweg führt zur Stabilisierung des Transkriptionskofaktors  $\beta$ -catenin. Das wird erreicht durch die Aufspaltung des  $\beta$ -catenin-Inaktivierungskomplexes, bestehend aus den Proteinen APC, Axin und GSK3 $\beta$ . APC und Axin sind Scaffoldproteine. GSK3 $\beta$  phosphoryliert Axin und APC, wodurch der  $\beta$ -catenin-Inaktivierungskomplex aktiviert wird sowie daran gebundenes  $\beta$ -catenin, das dadurch abgebaut werden kann. Ein erstes mathematisches Modell, das wichtige biochemische Reaktionen für die Signalübertragung im kanonischen Wnt-Signalweg in *Xenopus* Oocyten Extrakten beschreibt, wurde in einer aktuellen Veröffentlichung von Zellbiologen der Harvard Universität in Boston und Systembiologen der Humboldt Universität zu Berlin vorgestellt [7]. Auf Grundlage von experimentellen Daten (Proteinkonzentrationen und Abbauprozesse) haben die Autoren Differenzialgleichungen für zeitliche Änderungen der Proteinkonzentrationen aufgestellt. Da die Details der Wechselwirkungen der Proteine unbekannt waren, wurden diese in der einfachsten mathematischen Form beschrieben. Unbekannte Parameter, die sensitiv die Eigenschaften des Modells beeinflussen, wurden experimentell gemessen. Die verbleibenden unbestimmten Parameter wurden optimiert, damit das Modell den experimentell gemessenen zeitlichen Verlauf des Ausgangssignals quantitativ reproduziert. In *Xenopus* Oocyten Extrakten konnte nur der inaktive Signalweg untersucht werden, in dem der Abbauprozess des Proteins  $\beta$ -catenin die Hauptrolle spielt. Der zeitliche Verlauf des Abbaus von  $\beta$ -catenin stimmte quantitativ zwischen Simulation und Experiment für die Standardparameter und für Variationen einzelner Proteinkonzentrationen überein. Die Autoren hatten das Ziel, durch mathematische Modellierung Details des Abbauprozesses besser zu verstehen – mit besonderem Interesse für die Fragen:

Warum ist die Axin Konzentration so klein (0,02nM) und was sind die Funktio-



nen der beiden Scaffold Proteine APC und Axin?

Auf Grund der geringen Axin-Konzentration wurde die Hypothese aufgestellt, dass Axin der Hauptregulator des kanonischen Wnt-Signalweges ist. Diese Hypothese wurde durch Computersimulationen und Experimente untersucht. In den Simulationen führte eine Verdoppelung der Axin-Konzentration zur Halbierung der Halbwertszeit von  $\beta$ -catenin. Dagegen blieb bei einer Verdoppelung der GSK3 $\beta$ -Konzentration die Halbwertszeit von  $\beta$ -catenin fast konstant. Experimente bestätigten qualitativ, dass der  $\beta$ -catenin Abbau viel sensibler von der Axin-Konzentration abhängt, als von der GSK3-Konzentration. Quantitative Unterschiede wurden vermutlich durch inaktive Proteine verursacht.

### Untersuchung durch Computersimulationen

Die Autoren haben durch Computersimulationen die Eigenschaften der beiden Scaffold-Proteine des  $\beta$ -catenin-Inaktivierungskomplexes Axin und APC verglichen. Sie konnten zeigen, dass die gemessene Konzentration von Axin kleiner ist als eine optimale Konzentration, die zum schnellsten Abbau von  $\beta$ -catenin führt. Es wurde vermutet, dass die Axin-Konzentration nicht für den  $\beta$ -catenin-Abbau optimiert wurde, sondern um Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen zu unterdrücken, die eine viel höhere Axin-Konzentration benö-

zungsrate steuert die Amplitude und Dauer des  $\beta$ -catenin-Signals. Die Bestimmung sensibler Parameter mit Methoden der metabolischen Kontrollanalyse führte zu dem Ergebnis, dass die stationäre  $\beta$ -catenin Konzentration sensitiv von der  $\beta$ -catenin-Syntheserate, der Aktivierung des Inaktivierungskomplexes und von der Axin-Umsetzungsrate abhängt, aber nicht von den  $\beta$ -catenin-Abbauraten. Das bedeutet, die  $\beta$ -catenin-Konzentration lässt sich besser über den Inaktivierungskomplex als über seine Abbauraten kontrollieren.

Diese neuen Einsichten über die unterschiedlichen Eigenschaften des Axin-Proteins im kanonischen Wnt-Signalweg wurden durch mathematische Modellierung und Simulation gewonnen. Die Ergebnisse, die zum Teil experimentell bestätigt wurden, belegen eine Schlüsselrolle von Axin im Wnt-Signalweg. Da scheint es widersprüchlich, dass die Axin-Konzentration zu klein für einen optimalen  $\beta$ -catenin-Abbau ist, sondern vermutlich eher optimiert wurde, um Wechselwirkungen mit anderen Signalwegen zu vermeiden. Das wirft die Frage nach Evolutionskriterien für Signalwege auf. Darüber hinaus sind

tigen. Im Gegensatz dazu ist die APC-Konzentration optimal für den  $\beta$ -catenin-Abbau.

In das mathematische Modell können auch leicht neue experimentell identifizierte Wechselwirkungen integriert werden. Simulationen des Modells erweitert mit APC-abhängigem Axin-Abbau zeigten, dass Axin Schwankungen der APC-Konzentration ausgleichen kann, was zur Stabilisierung des kanonischen Wnt-Signalweges beiträgt. Die kritische Rolle von Axin spiegelt sich auch in der Simulation des transient aktivierten Signalweges wieder. Die Axin-Umset-

diese Erkenntnisse für experimentelle Untersuchungen des Wnt-Signalweges von Bedeutung. Entsprechend der Ergebnisse aus den Simulationen wäre Axin das geeignete Zielprotein, um den kanonischen Wnt-Signalweg im Experiment zu aktivieren oder zu deaktivieren, wobei aber eine zu starke Erhöhung der Axin-Konzentration einen Einfluss auf andere Signalwege haben kann. Allerdings sind noch keine Moleküle bekannt, die Axin inaktivieren können. In vitro kann der kanonische Wnt-Signalweg z.B. durch Zugabe von LiCl aktiviert werden, das aber GSK3 $\beta$  deaktiviert.

### Computersimulation bringt neue Erkenntnisse

Tatsächlich konnte durch nachfolgende Experimente anderer Gruppen gezeigt werden, dass im aktiven kanonischen Wnt-Signalweg ein Teil des Zweikomponenten-Rezeptorkomplexes (LRP5/6) freies Axin bindet und somit seine Konzentration im Cytoplasma verringert [13]. Die Aktivierung von LRP5/6 im Rezeptorkomplex wird in neuesten Arbeiten als der entscheidende Schritt angesehen, der den kanonischen Wnt-Signalweg von anderen Wnt-Signalwegen unterscheidet, in denen Wnt auch an Frizzled, nicht aber an LRP5/6 bindet, und in denen keine Erhöhung der  $\beta$ -catenin-Konzentration zu beobachten ist [14]. Somit wurden durch die mathematische Modellierung des kanonischen Wnt-Signalweges entscheidende Hinweise zum Design geeigneter Experimente zur Aufklärung der molekularen Mechanismen geliefert.

Die Autoren dieses Artikels untersuchen den kanonischen Wnt-Signalweg in der Differenzierung neuronaler Stammzellen. Der Schwerpunkt in der Modellierung liegt auf der Untersuchung des Einflusses von Rückkopplungsschleifen auf die Dynamik. Durch den Transkriptionsfaktorkomplex TCF/ $\beta$ -catenin werden Gene transkribiert, und einige der gebildeten Proteine wechselwirken mit Proteinen des kanonischen Wnt-Signalweges. Bekannte Rückkopplungen in

diesem Signalweg sind in dem Übersichtsartikel von Logan und Nusse zusammengefasst [11].

Danksagung: Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Bildung, Wissenschaft und Kultur des Landes Mecklenburg-Vorpommern mit Mitteln des „Europäischen Fonds für regionale Entwicklung“ (EFRE) der Europäischen Union finanziell unterstützt.

### Weitere Informationen:

[www.laborpraxis.de](http://www.laborpraxis.de)

InfoClick 150614

- Systembiologie und Bioinformatik an der Universität Rostock
- Webseite des Neurobiologischen Labors
- Liste der Literaturstellen

Fax: +49 (03 81) 4 98 75 72