

Kurzfassung der Dissertation

Intrazelluläre Regulationsnetzwerke, die an der Übertragung extrazellulärer Signale beteiligt sind, haben eine zentrale Bedeutung für alle Organismen. In Einzellern wird Signalübertragung zum Beispiel dazu genutzt, auf das extrazelluläre Nahrungsangebot oder auf Stress zu reagieren. In vielzelligen Organismen ist interzelluläre Kommunikation für das Gewebshomöostase unverzichtbar und ist dementsprechend in vielen Krankheiten wie Krebs gestört. Extrazelluläre Signale werden gewöhnlich durch mehrstufige enzymatische Kaskaden innerhalb weniger Minuten von der Zellmembran bis in den Zellkern weitergeleitet. Dort bewirken die durch das Signal aktivierten Enzyme dann relativ langsame Änderungen der Genexpression und beeinflussen so das Schicksal der Zelle. Intrazelluläre Regulationsnetzwerke sind durch die vielen molekularen Interaktionen hoch komplex und somit intuitiv nur ansatzweise zu verstehen. In der vorliegenden Arbeit wird kinetische Modellierung in einem systembiologischen Ansatz mit der Analyse quantitativer experimenteller Daten verknüpft, um die Prinzipien der intrazellulären Signalübertragung besser zu verstehen.

Im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 2-4) wird die rasche Signalübertragung von der Zellmembran zum Zellkern und somit die Dynamik mehrstufiger Enzymkaskaden untersucht. In den Kapiteln 3 und 4 wird genauer darauf eingegangen, wie Zellen relevante extrazelluläre Signale von zufälligem biologischem Rauschen unterscheiden, und zwar durch schalterartiges ('Alles-oder-Nichts') Anschalten intrazellulärer Signalwege. Insbesondere wird die Rolle positiver Rückkopplungen analysiert, und beschrieben, wie diese einmal initiierte Zellantworten irreversibel aufrecht erhalten können, selbst wenn der Initialstimulus nur transient vorhanden war. Die angesprochenen emergenten Netzwerkeigenschaften, Alles-oder-Nichts Verhalten und Irreversibilität, stellen sicher, dass die Zellen zuverlässig und robust von einem Zustand in den anderen übergehen. In Kapitel 3 wird beschrieben, wie eine versteckte positive Rückkopplung und Bistabilität durch einen zuvor unbekannt, aber durch experimentelle Daten nahegelegten, Kompetitionsmechanismus innerhalb der klassischen MAPK-Kaskade generiert werden kann. Die MAPK (mitogen-activated protein kinase) Kaskade reguliert wichtige physiologische Prozesse wie z.B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod. Der vorgeschlagene Mechanismus könnte erklären, wieso die MAPK Aktivierung und das nachgeschaltete Zellwachstum in Einzelzellmessungen häufig digital (also schalterartig) ist. Die Simulationen legen die molekularen Determinanten für schalterartiges Verhalten offen und wurden genutzt, um einen einfachen experimentellen Test zum Nachweis der versteckten positiven Rückkopplung vorzuschlagen.

Der programmierte Zelltod (auch Apoptose) ist ein klassisches Beispiel für eine digitale und irreversible zelluläre Antwort, da halbtote Zellen die Entstehung von Krankheiten begünstigen würden. Die molekularen Determinanten für irreversibles Schalterverhalten sind ungeklärt, es ist aber unbestritten, dass die Systemeigenschaften des Netzwerk und nicht einzelne Reaktionen verantwortlich sind. Kapitel 4 beschäftigt sich mit dem proteolytischen Caspase-Signalweg, der stromabwärts der Mitochondrien das zelluläre Selbstmord-Programm initiiert, wenn die Zelle durch Stressoren wie z.B. Chemotherapeutika zu stark beschädigt wurde. Es wurde ein mechanistisches Modell der Caspase-Aktivierung und deren Modulation durch Protease-Inhibitoren abgeleitet, welches das in der Literatur beschriebene Verhalten des Systems akkurat widerspiegelt. Insbesondere half das Modell zu verstehen, wie sich terminal differenzierte Gewebe (z.B. das Gehirn) unter normalen Bedingungen sehr effizient vor programmierten Zelltod und somit vor irreversibler Schädigung schützen können. Des Weiteren deuten die Simulationen auf eine unerwartete Rolle der sogenannten "inhibitors of apoptosis"-Proteine (IAPs) hin: Durch die simultane Hemmung mehrerer Caspasen durch die IAPs entsteht eine versteckte positive Rückkopplung, die im physiologischen Parameterbereich eine wichtige Rolle bei der Alles-oder-Nichts-Entscheidung über den Zelltod zu spielen scheint. Die Simulationen wurden zur Versuchsplanung genutzt, um eine optimale Strategie für die experimentelle Validierung des vorgeschlagenen Rückkopplungs-Mechanismus und des Schalterverhaltens zu erarbeiten.

In vielen Fällen muss eine Zelle über mehrere Stunden kontinuierlich hormonell stimuliert werden, um auf eine phänotypische Antwort festgelegt zu sein. Also ist die Langzeit-Dynamik intrazellulärer Signalnetzwerke über mehrere Stunden entscheidend für zelluläre Antworten. Auf diesen Zeitskalen wird die Dynamik des Signalnetzwerks jedoch durch langsame,

stromabwärts gelegene Genexpressionsantworten moduliert. Solche langsamen Rückkopplungsschleifen werden im zweiten Teil der Arbeit (Kapitel 5 und 6) untersucht. In Kapitel 5 werden generelle Design-Prinzipien der transkriptionellen Rückkopplung in Säugetier-Signalkaskaden identifiziert. Genauer gesagt werden Genexpressionsmuster wenige Stunden nach extrazellulärer Stimulation systematisch auf Induktion oder Repression von Signalproteinen untersucht. Interessanterweise tritt transkriptionelle Rückkopplung in allen fünf zentralen Signalwegen (MAPK, PI3K, JAK/STAT, cAMP, Smad) auf. Die Analyse zeigt, dass die transkriptionelle Regulation des intrazellulären Signalnetzwerks ausschließlich negative Rückkopplung bewirkt und dass hauptsächlich hemmende Faktoren ("Inhibitoren") induziert werden, während die Repression von signalübertragenden Proteinen keine Rolle spielt. Ein Vergleich der transkriptionellen Daten mit mRNA- und Protein-Halbwertszeiten ergab eine bemerkenswerte Auftrennung des intrazellulären Signalnetzwerk in flexible und statische Protein-Spezies: die induzierten Inhibitoren sind sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene instabil, während die restlichen, unregulierten Spezies generell lange mRNA- und Protein-Halbwertszeiten aufweisen. Schnelle negative Rückkopplungsschleifen sorgen für rasche Adaptation biochemischer Netzwerke, sie bewirken also die Anpassung an geänderte äussere Bedingungen. Im Guten heisst dies, dass die identifizierten negativen Rückkopplungsschleifen Genexpressionsantworten wohl robuster und somit weniger variabel machen. Andererseits erlauben solche Rückkopplungsschleifen die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Kinaseinhibitoren (Cancer Res. 69, p565) und machen das System besonders sensitiv gegenüber bestimmten feedback-inaktivierenden Mutationen (PNAS 106, p4519). Die in Kapitel 5 identifizierten Rückkopplungsschleifen tragen also zu unserem Verständnis der Plastizität molekularer Netzwerke gegenüber therapeutischen Ansätzen und tumorigenen Mutationen bei.

In Kapitel 6 wurde in Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Ursula Klingmüller und Jens Timmer ein daten-basiertes mathematisches Modell des TGF β -Smad Signalwegs erstellt, um die Modulation dieser Kaskade durch transkriptionelle Rückkopplungen in primären Maushepatozyten zu verstehen. Der TGF β -Signalweg spielt eine wichtige Rolle für physiologische und pathologische Prozesse wie Embryonalentwicklung, Regeneration, Homöostase und Krebs. In der gesunden Leber ist TGF β ein zentraler Regulator der Organgrösse, der Faktor spielt aber auch eine wichtige Rolle für die Steuerung der Leberregeneration nach akuter Vergiftung und ist an der Leberfibrose nach Langzeit-Vergiftung beteiligt. Der extrazelluläre Botenstoff TGF β bindet an den membranständigen TGF β -Rezeptor, der dann durch Phosphorylierung die Translokation der Smad Transkriptionsfaktoren in den Zellkern induziert und so Genexpressionsantworten auslöst. Unsere Microarray- und Western Blot-Analysen in TGF β -stimulierten Hepatozyten legten nahe, dass das SnoN-Onkoprotein, ein kompetitiver Inhibitor der Smad Transkriptionsfaktoren, der zentrale Rückkopplungsregulator sein könnte. Absolute Quantifizierungen ergaben jedoch das SnoN nur in etwa 50-fach geringerer Konzentration vorlag als seine Zielproteine, die Smad-Faktoren. Um die Relevanz der Rückkopplung durch eine sub-stoichiometrische Menge des SnoN-Proteins zu verstehen, wurde ein mathematisches Modell des TGF β -Signalwegs inklusive SnoN-vermittelter Rückkopplung implementiert und mit zeitaufgelösten Messungen der Smad-/SnoN-Proteine kalibriert. Das Modell konnte Zeitverläufe in TGF β -stimulierten Hepatozyten akkurat beschreiben, unter anderem auch wenn transkriptionelle Rückkopplungen komplett durch den generellen Transkriptioneninhibitor Actinomycin D blockiert wurden. Dieses legte nahe, dass SnoN tatsächlich der zentrale transkriptionelle Rückkopplungsregulator ist, wie im Modell angenommen. Um das Modell zu weiter validieren, wurden zwei unabhängige Vorhersagen abgeleitet, die dann in "Knock-in"-Hepatozyten ohne funktionelles SnoN Protein experimentell bestätigt wurden: (i) SnoN beeinflusst die Komplexbildung aus Smad2 und Smad4, hat jedoch keinen Einfluss auf die Smad2 Phosphorylierung; (ii) SnoN verschiebt das Gleichgewicht der DNA-bindenden Smad-Komplexe von transkriptionsaktivierend zu transkriptionsreprimierend und blockiert somit zelluläre Antworten auf TGF β . In einem kombinierten Experiment-Theorie Ansatz konnte also gezeigt werden, dass SnoN als zentraler Rückkopplungsfaktor des TGF β -Signalweges in primären Hepatozyten fungiert, auch wenn es nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Die funktionellen Effekte der SnoN-Rückkopplung sind allerdings eher ungewöhnlich, da SnoN weder die Kinetik noch die Dauer des lange anhaltenden Smad Signals verändert, sondern nur dessen Amplitude moduliert. Weitere Simulation anhand unseres validierten Modells ergaben, dass SnoN-vermittelte Rückkopplung die Variabilität der TGF β -induzierten Genexpression vermindert, das Signal also robuster macht. Diese Vorhersage wird derzeit in der Klingmüller-Gruppe experimentell getestet. Wir glauben, dass unsere Einblicke in das Smad-SnoN-Netzwerk für die

Leberregeneration *in vivo* relevant sind, da SnoN während der proliferativen Phase der Leberregeneration hochreguliert wird, genau dann, wenn die sich teilenden Hepatozyten unempfindlich gegenüber wachstumshemmender TGF β Stimulation werden.

Durch Signaltransduktionskaskaden ausgelöste Genexpressionsantworten sind entscheidend für zelluläre Antworten auf extrazelluläre Signale, jedoch bisher nur ansatzweise verstanden. Viele der induzierten Gene fungieren wiederum als Transkriptionsfaktoren oder als genexpressionsmodulierende kleine RNAs. Also sind den Signaltransduktionskaskaden hochkomplexe genregulatorische Netzwerke nachgeschaltet, die im dritten Teil der Dissertation (Kapitel 7 und 8) analysiert werden. Insbesondere werden zwei Fragestellungen behandelt: (i) Wie können genregulatorische Netzwerke spezifisch auf extrazelluläre Faktoren reagieren, obwohl verschiedene extrazelluläre Stimuli häufig die gleichen Signalkaskaden aktivieren (Frage nach der Signalspezifität)? (ii) Können systembiologische Ansätze helfen, die molekularen Interaktionen in genregulatorischen Netzwerken besser zu verstehen (Frage nach der Topologie des genregulatorischen Netzwerks)?

Kleine RNAs sind in den letzten Jahren als zentrale Regulatoren der Genexpression beschrieben worden. In den meisten Fällen unterdrücken sie die Genexpression, indem sie die Degradation von messenger RNAs induzieren oder deren Translation unterdrücken. Ein systembiologisches Verständnis der Regulation durch kleine RNAs fehlt bisher, erscheint aber für die quantitative Beschreibung der Dynamik genregulatorischer Netzwerke unerlässlich. In Kapitel 7 wurde ein einfaches mechanistisches Modell der mRNA Regulation durch kleine RNAs implementiert. Zwei zentrale Vorhersagen wurden aus der qualitativen Analyse abgeleitet: (i) kleine RNAs unterdrücken die Genexpression bei niedrigen mRNA Transkriptionsraten sehr effizient, haben aber bei starker mRNA Transkription nur geringen Einfluss; kleine RNAs konvertieren also eine graduell mit der Transkriptionsrate ansteigende Genexpressionsantwort in ein digitales Alles-oder-Nichts-Verhalten. (ii) kleine RNAs beeinflussen die Kinetik der Genexpression; wird ein Gen durch eine kleine RNA reguliert, wird es in den meisten Fällen langsamer durch extrazelluläre Signale induziert als ein entsprechendes unreguliertes Gen. Diese beiden Modellvorhersagen wurden dann durch biologische Kooperationspartner um Ilka Axmann experimentell bestätigt: Die cyanobakterielle Eisenstress-Protein IsiA wird durch die kleine RNA LsrR kontrolliert. Interessanterweise wird unter verschiedenen experimentellen immer nur entweder IsiA oder LsrR exprimiert, jedoch niemals beide gleichzeitig (Schwellwertverhalten). Desweiteren wird IsiA rascher durch Eisenstress induziert, wenn die kleine RNA experimentell aus dem System entfernt wird (verlangsamte Dynamik durch kleine RNAs). Weitere theoretische Analysen ergaben, dass kleine RNAs Genexpressionsantworten spezifisch für ausreichend lange und starke Input-Signale machen; sie könnten also erklären, wieso lange intrazelluläre Signale häufig andere Genexpressionsmuster und zelluläre Antworten auslösen als kurze. Die Ergebnisse in Kapitel 7 tragen also zu unserem Verständnis der Spezifität in intrazellulären Regulationsnetzwerken bei.

Das Ras-Protein ist eine kleine GTPase, die in vielen Tumoren permanent aktiviert ist und dort das Zellwachstum dereguliert. Während die Regulation der Ras-Aktivierung gut verstanden ist, fehlen bisher detaillierte Einsichten in stromabwärts gelegene Genexpressionsantworten. In Kooperation mit der molekularen Tumorphologie der Charité haben wir Microarray-Daten nach Überexpression von mutiertem Ras-Protein ausgewertet und sieben zentrale Transkriptionsfaktoren identifiziert, die alle essentiell für die Ras-vermittelte Transformation der Zellen sind. Um die hochkomplexen molekularen Interaktionen dieser Faktoren besser zu verstehen, wurden RNAi-vermittelte Perturbationen durchgeführt und gleichzeitig die Expression aller Faktoren auf mRNA- und Protein-Ebene gemessen. Aus dieser Perturbationsmatrix wurde anhand eines sogenannten "Reverse Engineering Algorithmus" (Modifikation von Kholodenko et al. 2002) die Topologie des Transkriptionsfaktornetzwerks abgeleitet. Interessanterweise ergab sich aus den Rechnungen eine sehr deutliche Hierarchie der Transkriptionsfaktoren, bei der drei der Faktoren die vier verbleibenden kontrollieren, ohne dass es signifikante Rückkopplung gibt. Experimentell wurde die vorhergesagte Hierarchie mittlerweile bestätigt: Die Genexpressionsantworten nach Knockdown der stromaufwärts gelegenen Faktoren sind sehr ähnlich, aber signifikant verschieden von den wiederum sehr ähnlichen Genexpressionsantworten nach Knockdown der stromabwärts gelegenen Faktoren. Desweiteren kontrollieren nur die stromaufwärts gelegenen Faktoren das Zellwachstum und den Zellzyklusarrest in G1/G0. Unsere Ergebnisse identifizieren also drei zentrale Transkriptionsfaktoren, die vielversprechende Targets für die pharmakologische Intervention in

Ras-abhängigen Tumoren darstellen. Dies ist insofern entscheidend, weil direkte Inhibitoren des Ras-Proteins (Farnesyltransferase-Inhibitoren) in klinischen Studien beträchtliche Nebenwirkungen zeigten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass meine Arbeit einen Beitrag zur Erstellung integrativer systembiologischer Modelle leistet, die sowohl die Dynamik von raschen Signaltransduktionskaskaden als auch das zeitliche Verhalten von langsameren genregulatorischen Netzwerken beinhalten. In meiner jetzigen Forschung am Deutschen Krebsforschungszentrum versuche ich weiter stromabwärts gelegene zelluläre Antworten, wie Zelwwachstum, mit in die Beschreibung einzubeziehen.

Während der Dissertation entstandene Publikationen

- 1) Stefan Legewie, Nils Blüthgen and Hanspeter Herzel
Quantitative analysis of ultrasensitive responses
FEBS Journal, 272 (2005), 4071-4079
- 2) Stefan Legewie, Nils Blüthgen, Reinhold Schäfer, Hanspeter Herzel
Ultrasensitization: Switch-like Regulation of Cellular Signalling by Transcriptional Induction
PLoS Comput Biol. 1 (2005), e54
- 3) Nils Blüthgen, Frank J. Bruggeman, Stefan Legewie, Hanspeter Herzel, Hans V. Westerhoff and Boris N. Kholodenko
Effects of sequestration on signal transduction cascades
FEBS Journal 273 (2006) 895-906.
- 4) Stefan Legewie, Nils Blüthgen, Hanspeter Herzel
Mathematical Modeling Identifies Inhibitors of Apoptosis (IAPs) as Mediators of Positive Feedback and Bistability
PLoS Comput Biol. 2 (2006) e120
(Editors' Choice in *Science* 314: 389)
- 6) Stefan Legewie, Birgit Schoeberl, Nils Blüthgen, Hanspeter Herzel
Competing Docking Interactions Can Bring About Bistability in the MAPK Cascade
Biophysical Journal (2007), 93, 2279-2288
- 7) Ilka Axmann, Stefan Legewie, Hanspeter Herzel
A Minimal Circadian Clock Model.
Genome Informatics (2007), 18, 54–64
- 8) Nils Blüthgen, Stefan Legewie, Hanspeter Herzel, and Boris N. Kholodenko
Mechanisms generating ultrasensitivity, bistability and oscillation in signal transduction
In Choi, S., (ed.), *Introduction to Systems Biology*, Humana Press (2007)
- 9) Anuradha Chauhan*, Stefan Legewie*, Pal Westermark, Stephan Lorenzen, Hanspeter Herzel
A mesoscale model of G1/S phase transition in liver regeneration.
Journal of Theoretical Biology (2008) 252, 465-473
- 10) Stefan Legewie, Hanspeter Herzel, Hans V. Westerhoff, Nils Blüthgen
Recurrent design patterns in the feedback regulation of the mammalian signalling network
Molecular Systems Biology (2008), 4, 190
- 11) Nils Blüthgen*, Stefan Legewie*
Systems analysis of MAPK signal transduction
Essays in Biochemistry (2008), 45, 95-108
- 12) Stefan Legewie, Dennis Dienst, Annegret Wilde, Hanspeter Herzel and Ilka Axmann
Small RNAs Establish Delays and Temporal Thresholds in Gene Expression
Biophysical Journal (2008) 95, 3232-8
- 13) Stefan Legewie, Christine Sers, Hanspeter Herzel
Kinetic mechanisms for overexpression insensitivity and oncogene cooperation
FEBS Letters (2009)
- 14) Nils Blüthgen, Stefan Legewie, Szymon M. Kielbasa, Anja Schramme, Oleg Tschernitsa, Jana Keil, Andrea Solf, Martin Vingron, Reinhold Schäfer, Hanspeter Herzel, Christine Sers
A Systems Biological Approach unveils a Transcriptional Feedback Loop Shaping ERK Activity in RAS-Transformed Fibroblasts.
FEBS Journal (2009)

15) Nikolay Borisov, Edita Aksamitiene, Anatoly Kiyatkin, Stefan Legewie, Jan Berkhout, Thomas Maiwald, Nikolay Kaimachnikov, Jens Timmer, Jan B. Hoek and Boris N. Kholodenko
Systems-level interactions between insulin and epidermal growth factor networks potentiate mitogenic signaling
Molecular Systems Biology (2009)

16) Peter Nickel^{*}, Stefan Legewie^{*}, Thomas Maiwald^{*}, Qingwei Zhu, Stephanie Müller, Sebastian Bohl, Thomas Frahm, Lorenza D'Alessandro, Christoph Meyer, Patricio Godoy, Alexander Bauer, Elke Ueberham, Norbert Gretz, Rolf Gebhardt, Jan G. Hengstler, Steven Dooley, Kunxin Luo, Hanspeter Herzel, Jens Timmer & Ursula Klingmüller
Central Role of SnoN feedback regulation in restraining excess TGFbeta signaling in the liver
(to be submitted)

17) Iwona Stelnic^{*}, Stefan Legewie^{*}, Nils Blüthgen, Hanspeter Herzel, Reinhold Schäfer
Reverse Engineering the compensatory regulation of K-Ras-dependent signal transduction and transcriptional network.
(to be submitted)