

# Experimentelle und theoretische Analyse des Wnt-Signalwegs

## 1 Einleitung

Der Wnt-Signalweg ist essentiell für eine normale Embryonalentwicklung, wo er Zell-Zell Interaktionen reguliert. Verschiedene wissenschaftliche Studien bringen den Signalweg darüber hinaus mit Krebsentstehung beim Menschen in Verbindung.

Als "Input" dient ein Wnt-Signal, welches über den Rezeptor Frizzled das unmittelbare Signalmolekül Dishevelled (Dsh) aktiviert. Als Ergebnis kann die Abbaurrate des Transkriptionsaktivators  $\beta$ -Catenin gemessen werden, wobei die Bildung eines  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplexes, welcher im Zellkern als Transkriptionsfaktor wirkt, als eigentlicher "Output" gilt.

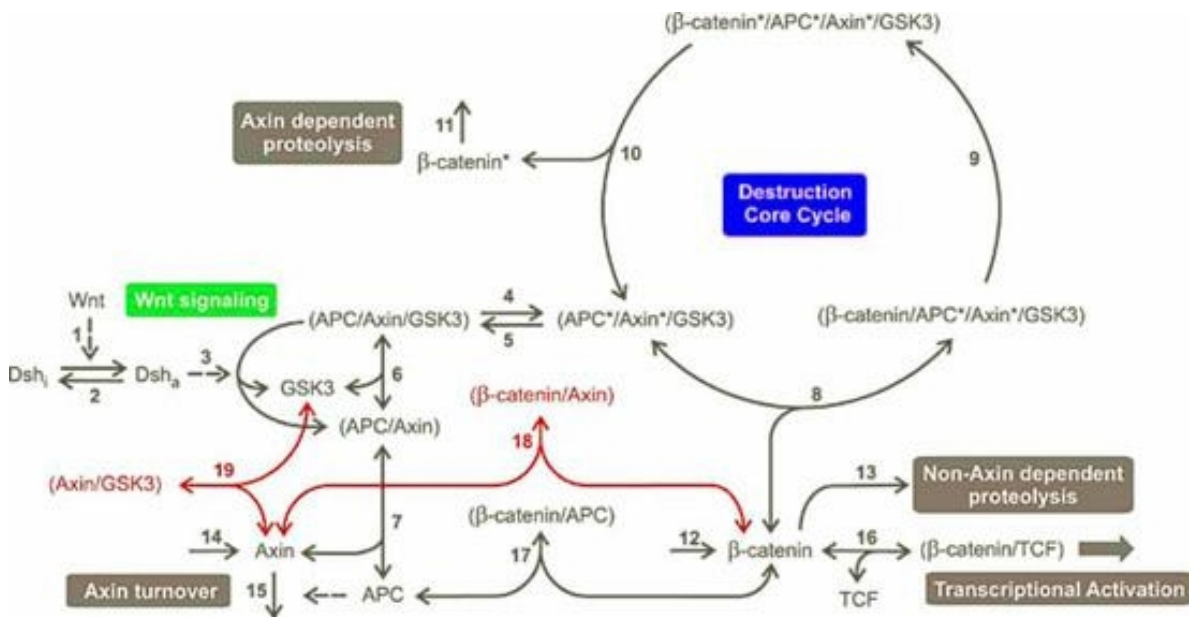


Abbildung 1: Reaktionsschema des Wnt-Pathways

Das Reaktionsschema in Abbildung 1 zeigt die Kernkomponenten des Signalwegs, welche bekannterweise nötig sind, um in den meisten Fällen ein Wnt-Signal zu übertragen. In Abwesenheit eines Wnt-Signals bindet die Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) an einen Komplex aus den zwei Gerüstproteinen Axin und Adenomatose Poliposis Coli (APC) und phosphoryliert diese. Der (APC\*/Axin\*/GSK3 $\beta$ )-Komplex kann freies  $\beta$ -Catenin binden und phosphorylieren. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird wieder abgespalten und dann schnell vom Proteasom abgebaut. Wird das Signalmolekül Dsh durch ein Wnt-Signal aktiviert, spaltet es GSK3 $\beta$  vom (APC/Axin/GSK3 $\beta$ )-Komplex ab, was zur Folge hat, dass  $\beta$ -Catenin nicht mehr phosphoryliert wird und die Konzentration an freiem  $\beta$ -Catenin steigt. Freies  $\beta$ -Catenin bindet an den T-Zell Faktor (TCF) und führt zur Transkription spezifischer Gene.

## 2 Das mathematische Modell

Die Schlüssel-moleküle um ein Wnt-Signal zu übertragen sind bekannt, aber ein quantitatives Verständnis fehlt noch. Um dieses zu erhalten wurde ein mathematisches Modell erstellt: Die Stimulierung des Signalwegs wird von der zeitabhängigen Funktion  $wnt(t)$  beschrieben. Die Faktoren Dsh, GSK3 $\beta$  und TCF werden sehr langsam abgebaut, so dass ihre Konzentrationen

innerhalb der betrachteten Zeitspanne als konstant angenommen und durch folgende Erhaltungsgleichungen dargestellt werden: (Eine hochgestellte "0" bedeutet Gesamtkonzentration).

$$(1) Dsh^0 = Dsh_i + Dsh_a$$

$$(2) TCF^0 = TCF + (\beta - Catenin)$$

$$(3) GSK3\beta^0 = GSK3\beta + (APC/Axin/GSK3\beta) + (APC^*/Axin^*/GSK3\beta) + (\beta - Catenin/APC^*/Axin^*/GSK3\beta) + (\beta - Catenin/APC^*/Axin^*/GSK3\beta)$$

$$(4) APC^0 = APC + (\beta - Catenin)$$

Da die Konzentration von Axin im Vergleich zu der von GSK3 $\beta$  sehr gering ist, können die Axin-haltigen Komplexe vernachlässigt und die Gleichung (3) vereinfacht werden:  $GSK3\beta^0 = GSK3\beta$ . Und man erhält ebenfalls folgende vereinfachte Gleichung: (4)  $APC^0 = APC + (\beta - Catenin/APC)$ . Die Synthese von  $\beta$ -Catenin und Axin wird durch konstante Raten beschrieben:  $v_i$ .

Irreversible Reaktionen:  $v_i = k_i * X$  ( $k_i$  : Geschwindigkeitskonstante, X: Konzentration)

Reversible Bindungsreaktionen:  $v_i = k_{+i}X_iY_j - k_{-i}(X_iY_j)$  (X, Y: Konzentrationen der Bindungspartner,  $(X_i Y_j)$  Konzentration des Komplexes)

Dissoziationskonstanten:  $K_i = \frac{k_{-i}}{k_{+i}}$  (für die reversiblen Bindungen zwischen Axin,  $\beta$ -Catenin, APC, TFC)

Für den Referenzstatus des Modells wird die Abwesenheit eines Wnt-Signals angenommen. Die Input-Daten für das Modell können in fünf Gruppen eingeteilt werden:

- Gesamtkonzentrationen ( $Dsh^0, APC^0, TCF^0, GSK3\beta^0$ ), steady-state Konzentrationen ( $Axin^0, \beta - Catenin^0, \beta - Catenin^*$ )
- Dissoziationsraten von Proteinkomplexen
- Konzentrationsverhältnisse für Komplexe, die  $\beta$ -Catenin beinhalten und für die, die  $\beta$ -Catenin nicht beinhalten
- Steady-state Fluss für Abbau von  $\beta$ -Catenin via Wnt-Signalweg und Flussrate welcher  $\beta$ -Catenin-Abbau-Anteil nicht via Wnt-Signalweg läuft
- Zeitkonstante  $\tau$  für ausgewählte Prozesse (Zeit bis Konzentration auf 1/e des ursprünglichen Wertes fällt)

Für den "Standard-Stimulierten-Status" kommen weitere Input-Daten hinzu:

- Verhältnis aktive/inaktive Dsh-Form
- Verhältnis Nicht-Dsh-vermittelter und Dsh-vermittelter Freisetzung von GSK3 $\beta$  vom Abbaukomplex
- charakteristische Zeit für Dsh Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus

Vergleicht man die steady-state Konzentrationen der Signalwegkomponenten für Referenzstatus und Standard-Stimulierten-Status, so lässt sich erkennen, dass beispielsweise die Konzentration an freiem unphosphoryliertem  $\beta$ -Catenin um den Faktor 6 ansteigt, die Konzentration des Komplexes  $\beta$ -Catenin/TCF um den Faktor 1,8. Die Konzentration von freiem phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin sinkt um 8%, die Gesamtkonzentration von Axin sinkt um den Faktor 2,7 und auch die von APC sinkt. Es fällt auf, dass Wnt-Stimulation die steady-state Konzentrationen von Axin (wird gesenkt) und  $\beta$ -Catenin (wird erhöht) entgegengesetzt beeinflusst.

### 3 Vergleich von mathematischem Modell und Experiment

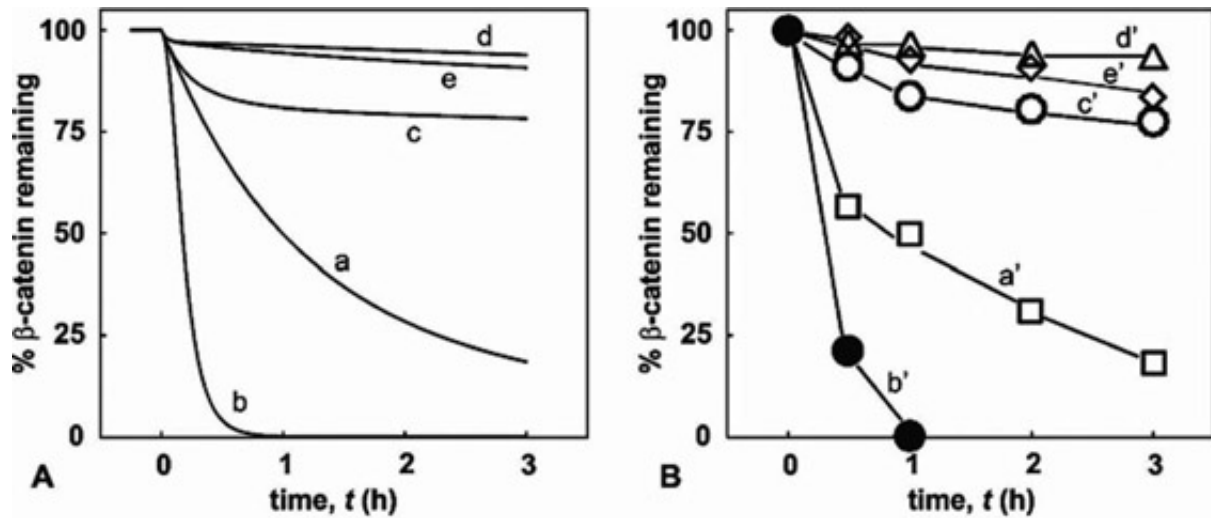


Abbildung 2: Kinetiken des  $\beta$ -Catenin Abbaus: Simulation vs. Experiment

Die experimentellen Analysen wurden in *Xenopus* Embryonen durchgeführt, welche sich bezüglich des Wnt-Signalwegs verhalten wie von in vivo Experimenten erwartet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die theoretischen Daten den experimentellen sehr gut entsprechen (Abbildung 2).

**Kurven a:** Referenzstatus: keine Proteinsynthese von  $\beta$ -Catenin ( $v_{12} = 0$ ) und Axin ( $v_{14} = 0$ )

**Kurven b:** Eine Zugabe von Axin führt zu einer höheren Konzentration des Komplexes APC/Axin, wodurch mehr Abbaukomplex gebildet und  $\beta$ -Catenin phosphoryliert werden kann. Entsprechend sinkt die Konzentration an freiem  $\beta$ -Catenin.

**Kurven c:** Eine erhöhte  $Dsh_a$  Konzentration inhibiert den  $\beta$ -Catenin Abbau leicht verzögert. Zu dieser Verzögerung kommt es, da GSK3 $\beta$  nur vom unphosphorylierten (APC/Axin/GSK3 $\beta$ )-Komplex abgespalten wird und der phosphorylierte Komplex so noch etwas Zeit hat,  $\beta$ -Catenin zu phosphorylieren.

**Kurven d:** Inhibierung von GSK3 $\beta$  führt zu einer Inhibierung der Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin wodurch dieses nicht mehr abgebaut wird und die Konzentration ansteigt.

**Kurven e:** Eine erhöhte TCF-Konzentration führt dazu, dass mehr  $\beta$ -Catenin gebunden wird und somit nicht mehr phosphoryliert und abgebaut werden kann, wodurch die Gesamtkonzentration ansteigt.

#### 3.1 Der Abbau von Axin ist APC-abhängig

Es sollte analysiert werden, welche Effekte Veränderungen in den Leveln von Wnt-Signalwegkomponenten haben. Dabei wurde herausgefunden, dass der Abbau von Axin APC-abhängig sein könnte.

Für den Fall, dass der Axin-Abbau APC unabhängig ist (ohne "regulatory loop", siehe Abb. 3), führt eine sinkende APC-Konzentration dazu, dass die  $\beta$ -Catenin-Konzentration steigt und für die Axin-Abbaurrate gilt:  $v_{15} = k_{15}Axin$ .

Angenommen, der Axin-Abbau ist APC abhängig (mit "regulatory loop"), dann gilt immer noch, dass eine sinkende APC-Konzentration dazu führt, dass die  $\beta$ -Catenin-Konzentration steigt. Dem wird aber entgegengewirkt, da eine steigende Axin-Konzentration dann die  $\beta$ -Catenin-Konzentration wieder senkt. Die Axin-Abbaurrate wäre folgende:  $v_{15} = \frac{k'_{15}APC * Axin}{K_M + APC}$

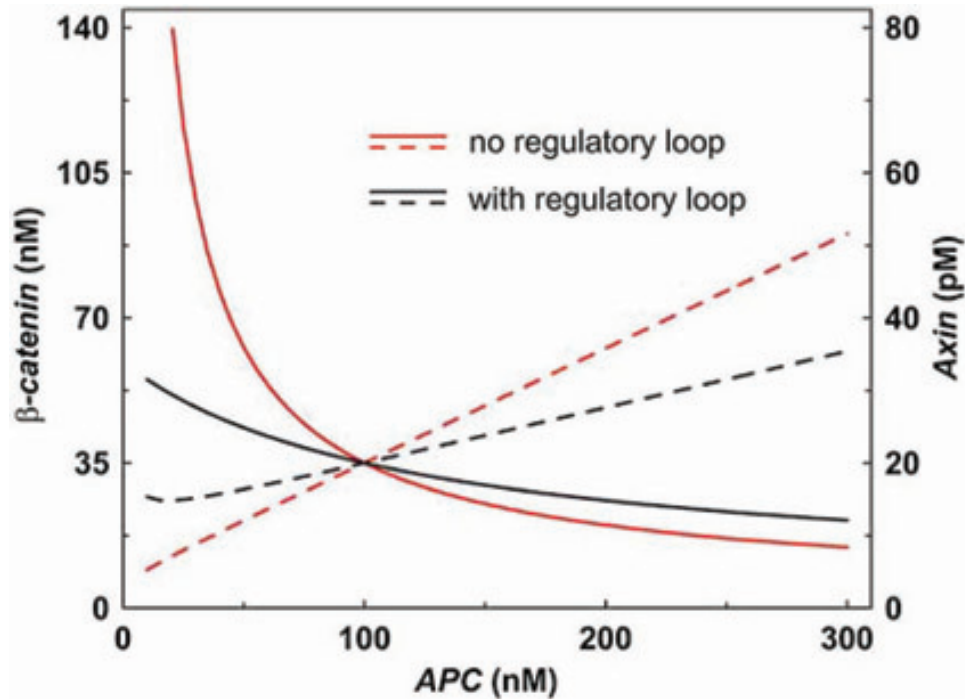


Abbildung 3: **Theoretischer Effekt von APC auf die Konzentration von Axin und  $\beta$ -Catenin** (Der Wert von  $k'_{15}$  wurde so gewählt, dass im Referenzstatus beide Fälle die gleiche Abbaurrate von Axin haben ( $k'_{15} = 0,33 \text{min}^{-1}$ ). Es wurde angenommen, dass im Referenzstatus die APC-Aktivierung die Hälfte ihres Maximums hat ( $K_M = 98,0 \text{nM}$ ). Gestrichelte Linie: Axin, durchgezogene Linie:  $\beta$ -Catenin)

Es lässt sich ablesen, dass die Unterschiede in der APC-Konzentration den  $\beta$ -Catenin-Abbau recht wenig beeinflussen würden. Das bedeutet, dass ein APC-abhängiger Axin-Abbau den Wnt-Signalweg gegen Schwankungen der APC-Konzentration stabilisieren würde.

So gesehen wäre der “regulatory loop” ein wichtiges Designmerkmal des Wnt-Signalwegs.

## 4 Kontrollkoeffizienten

Das Modell enthält viele Parameter, die das System auf verschiedene Arten und unterschiedlich stark beeinflussen. Bei welchen Parametern reagiert das System besonders sensitiv oder robust auf Störungen?

Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten individueller Prozesse verändern die Gesamtkonzentrationen von  $\beta$ -Catenin und Axin. Zur Quantifizierung der Effekte der Geschwindigkeitskonstanten werden Kontrollkoeffizienten genutzt:

$$C_{\pm i}^{\beta\text{-Catenin}} = \frac{k_{\pm i}}{\beta\text{-Catenin}} \frac{\partial(\beta\text{-Catenin})}{\partial k_{\pm i}} \quad (\text{für Axin entsprechend})$$

$\partial k_{\pm i}$  Ratenänderung der i-ten Reaktion

$\partial(\beta - \text{Catenin})$  resultierende Änderung der steady-state Konzentration von  $\beta$ -Catenin

$\frac{k_{\pm i}}{\beta\text{-Catenin}}$  Normierungsfaktor

Es gibt in einem Signalweg Schritte mit positiver und Schritte mit negativer Kontrolle (siehe Abbildung 4).

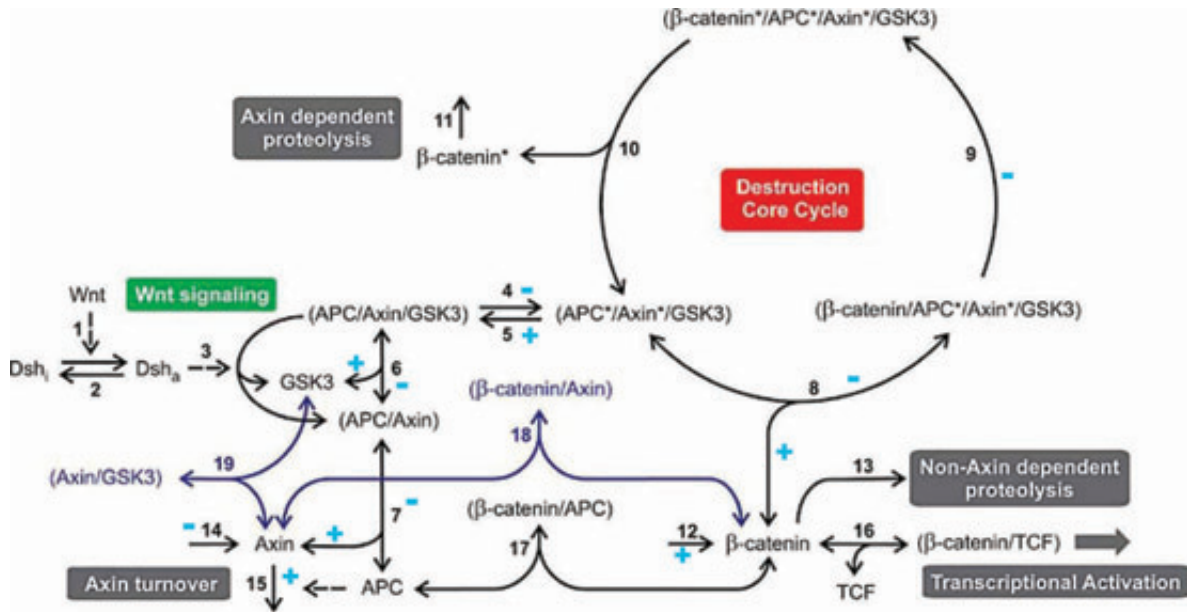


Abbildung 4: Kontrolle der  $\beta$ -Catenin-Konzentration

Die Effekte von Parameterveränderungen auf die Axin-Konzentration sind entgegengesetzt zu denen bei  $\beta$ -Catenin. Eine Ausnahme ist die Synthese von  $\beta$ -Catenin, die positive Kontrolle auf beide ausübt.

#### 4.1 Summationstheorem

Wenn man die Werte für die Kontrollkoeffizienten der Geschwindigkeitskonstanten von  $\beta$ -Catenin und Axin betrachtet, fällt auf, dass sie sich zu Null summieren. Dies wird auch als "Summationstheorem für Konzentrationskontrolle" bezeichnet:  $\sum_{i=1}^r C_{k_{\pm i}}^{r S_j} = 0$

Die Ursache ist, dass während einige Reaktionskomponenten/-schritte die Stoffkonzentration erhöhen, andere sie entsprechend senken.

Es gibt im Wnt-Signalweg Untergruppen von Prozessen, deren Kontrollkoeffizienten sich auch schon zu Null summieren. Dies deutet auf eine Modulstruktur des Signalwegs hin. (Es gibt das Dsh-Modul, das Kinase/Phosphatase-Modul, das  $\beta$ -Catenin-Modul und das Axin-Modul.)

#### 4.2 Gesamteffekte von Parameterstörungen

Um die Gesamteffekte von Parameterstörungen auf das System als Ganzes abzuschätzen, wird die Standardabweichung  $\sigma$  der Kontrollkoeffizienten vom Mittelwert (welcher Null ist) errechnet:

$$\sigma^{\beta cat} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_j (C_j^{\beta cat})^2}$$

(für  $\beta$ -Catenin)

Hohe  $\sigma$ -Werte deuten darauf hin, dass die gegebene Variable im Durchschnitt sehr sensitiv gegenüber Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten ist.

Die Robustheit  $\rho$  einer Variable gegenüber Veränderungen aller Parameter wird folgendermaßen berechnet:  $\rho = \frac{1}{1+\sigma}$

Kleine  $\sigma$ -Werte für die Kontrollkoeffizienten führen zu hohen  $\rho$ -Werten, was bedeutet, dass die entsprechende Variable robust gegenüber Parameterstörungen ist.

Für den Wnt-Signalweg gilt, dass die Gesamtkonzentration von Axin robuster gegen Parameterstörungen ist als die Gesamtkonzentration von  $\beta$ -Catenin.

## 5 Metabolische Kontrolltheorie

Die hier vorgestellte Art der mathematischen Modellierung eines Signalwegs zeigt eine der ersten Anwendungen der "Metabolischen Kontrolltheorie" auf Signaltransduktionen. Metabolismus und Signaltransduktion unterscheiden sich in mehreren Punkten: Transfer von Masse (Metabolismus) vs. Transfer von Informationen (Signaltransduktion); bestimmte Komponenten vs. diverse Komponenten; hohe Spezifität der Interaktionen von Substraten und Enzymen vs. schwache Interaktionen.

Mit Metabolischer Kontrolltheorie ist die "Quantifizierung des Einflusses kleiner Parameterstörungen auf die Variablen eines metabolischen Systems" gemeint. Genauer gesagt: Ein System metabolischer Reaktionen ist in einem stationären Zustand, es erfolgt eine kleine Störung irgendeiner Reaktion, woraufhin das System in einen neuen stationären Zustand übergeht. Kontrollierende Parameter sind beispielsweise kinetische Konstanten und Enzymkonzentrationen, die kontrollierten Variablen können Substratkonzentrationen und Flüsse sein. Mit der metabolischen Kontrolltheorie können Fragen untersucht werden wie: wie stark sich steady-state Variablen auf Grund der Störung einer einzigen Reaktion verändern, welcher Schritt eines metabolischen Systems einen bestimmten Fluss kontrolliert und welcher nicht oder welche Effektoren oder Modifikationen den größten Einfluss auf die Reaktionsrate haben.

Kontrollkoeffizienten spielen eine wichtige Rolle in der metabolischen Kontrolltheorie: Sie sind ein nützliches Maß für die Wirkung eines Prozesses (oder einer Quantität) auf eine andere Größe (z.B. Konzentration einer Komponente). Ein Beispiel im Wnt-Signalweg wäre die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von APC und Axin, welche einen großen Einfluss auf die  $\beta$ -Catenin-Konzentration haben.

### 5.1 Onkogene oder Tumorsuppressoren

Es gibt verschiedene Veröffentlichungen, die Wnt-Signale mit Krebs in Verbindung gebracht haben und es wurden auch mittlerweile Zielgene von  $\beta$ -Catenin identifiziert, welche Einfluss auf die Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung haben. Die Größen und Vorzeichen von Kontrollkoeffizienten können zur Klärung beitragen, welche Genprodukte Onkogene oder Tumorsuppressoren sein könnten. Produzierende Reaktionen haben eine positive Kontrolle (Onkogene), abbauende Reaktionen haben eine negative Kontrolle (Tumorsuppressoren) über eine Stoffkonzentration. Im Wnt-Signalweg sind APC, Axin und GSK3 $\beta$  potentielle Tumorsuppressoren und  $\beta$ -Catenin ein potentielles Onkogen.

## 6 Quellen

- The roles of APC and Axin Derived from Experimental and Theoretical Analysis of the Wnt Pathway; E. Lee, A. Salic, R. Krüger, R. Heinrich, M. W. Kirschner; PLoS Journals, 2003
- [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)
- [http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor\\_2004/](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/)
- [www.molgen.mpg.de/ag\\_klipp/lecture/5-MCA-WS05.pdf](http://www.molgen.mpg.de/ag_klipp/lecture/5-MCA-WS05.pdf)