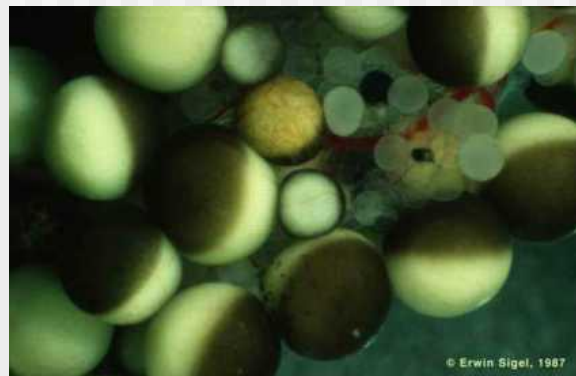


Experimentelle und theoretische Analyse des Wnt-Signalwegs

Anyess von Bock
Seminar: Wie Zellen denken; Struktur und
Funktion von Regulationsnetzen (2006)

Warum Wnt-Signalweg?

- Essentiell für normale Embryonalentwicklung
- Spielt Rolle bei der Krebsentstehung beim Menschen
- Kommt im frühen Xenopus-Embryo vor



© Erwin Sigel, 1987

www.cx.unibe.ch/~sigel/xenopicts.html

Wnt-Signalweg

Wnt-Signal („input“)



unmittelbares
Signalmolekül Dsh

→ *Signalweg*
(Schlüsselrolle: Axin)

→ Abbaurrate
von β -Catenin



Messbares
Ergebnis

Wnt-Signalweg

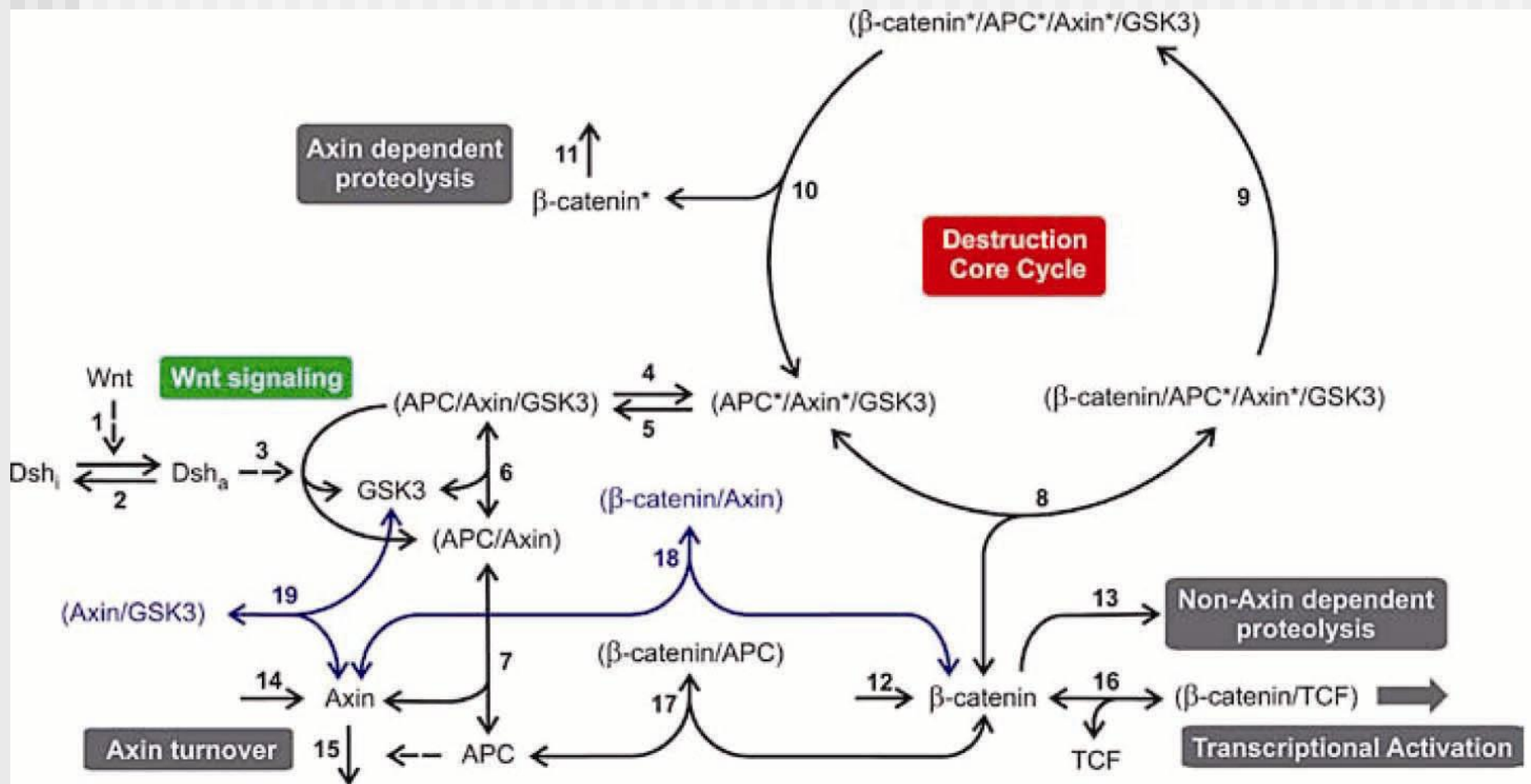


Figure 1. Reaction Scheme for Wnt Signaling

Mathematische Analyse

- Synthese von β -Catenin und Axin: v_i
- Irreversible Reaktionen: $v_i = k_i * X_j$

- Reversible Bindungsreaktionen:

$$v_i = k_{+i} X_j Y_l - k_{-i} (X_j Y_l)$$

- Dissoziationskonstanten: $K_i = k_{-i} / k_{+i}$
(reversible Bindungen zwischen Axin, β -Catenin, APC, TCF)

Mathematische Analyse

- Stimulierung des Signalwegs: $wnt(t)$
- Erhaltungsgleichungen:
 - (1) $Dsh^0 = Dsh_i + Dsh_a$
 - (2) $TCF^0 = TCF + (\beta\text{-Catenin}/TCF)$
 - (3) $GSK3\beta^0 = GSK3\beta + (APC/Axin/GSK3\beta)$
 $+ (APC^*/Axin^*/GSK3\beta)$
 $+ (\beta\text{-Catenin}/APC^*/Axin^*/GSK3\beta)$
 $+ (\beta\text{-Catenin}^*/APC^*/Axin^*/GSK3\beta)$
 - (4) $APC^0 = APC + (\beta\text{-Catenin}/APC)$

Referenzstatus: Abwesenheit eines Wnt-Signals

Symbol	Description	Reference value
<i>Concentrations</i>		
Dsh^0	total Dsh	100 nM
APC^0	total APC	100 nM
TCF^0	total TCF	15 nM
GSK^0	total GSK3 β	50 nM
$Axin^0$	total axin	0.02 nM
$\beta\text{-catenin}^0$	total β -catenin	35 nM
$\beta\text{-catenin}^*$	free phosphorylated β -catenin	<i>1 nM</i>
<i>Dissociation constants</i>		
K_6	binding of GSK3 β to (APC/axin)	<i>10 nM</i>
K_7	binding of APC to axin	<i>50 nM</i>
K_8	binding of β -catenin to (APC/axin/GSK3 β)	<i>120 nM</i>
K_{16}	binding of β -catenin to TCF	<i>30 nM</i>
K_{17}	binding of β -catenin to APC	<i>1200 nM</i>
<i>Concentration ratios</i>		
$\frac{(APC^*/Axin^*/GSK3\beta)}{(APC/Axin/GSK3\beta)}$		2
$\frac{(\beta\text{-catenin}^*/APC^*/Axin^*/GSK3\beta)}{(\beta\text{-catenin}/APC^*/Axin^*/GSK3\beta)}$		1
<i>Flux and flux ratio</i>		
v_{11}	degradation flux of β -catenin via the proteasome	25 nM/h
v_{13}/v_{11}		0.015
<i>Characteristic times</i>		
$\tau_{K,P}$	phosphorylation/dephosphorylation of APC and axin	2.5 min
$\tau_{GSK,ass}$	GSK3 β association/dissociation	1 min
$\tau_{ax,deg}$	Axin degradation	6 min

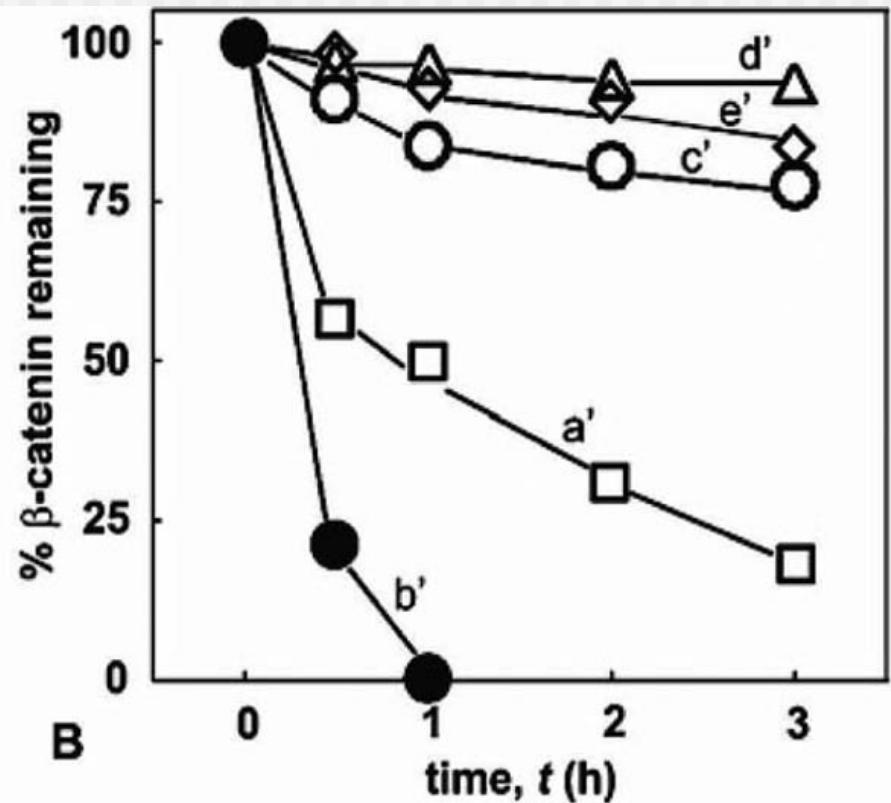
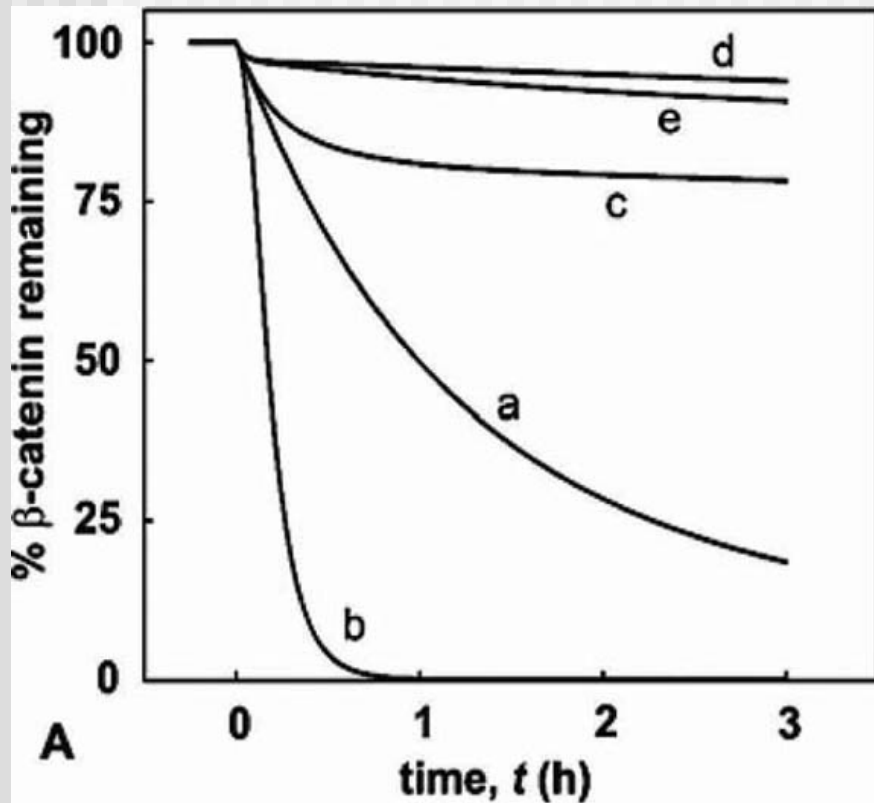
Referenzstatus vs Standard-Stimulierter-Status

Freies unphos. β -Catenin: *6
 Freies phosp. β -Catenin: -8%
 β -Catenin/TCF: *1,8
 Gesamt Axinkonzentration: *(-2,7)

Table 2. Steady-State Concentrations of Pathway Compounds in the Reference State and in the Standard Stimulated State

Compound	Concentration (nM)	
	$W = 0$	$W = 1$
Dsh _i	100	9.09
Dsh _a	0	90.9
(APC*/Axin*/GSK3 β)	$9.66 \cdot 10^{-3}$	$1.46 \cdot 10^{-3}$
(APC/Axin/GSK3 β)	$4.83 \cdot 10^{-3}$	$7.29 \cdot 10^{-4}$
(APC/Axin)	$9.66 \cdot 10^{-4}$	$9.75 \cdot 10^{-4}$
APC	98.0	88.7
(β -catenin/APC)	2.05	11.3
(β -catenin/APC*/Axin*/GSK3 β)	$2.02 \cdot 10^{-3}$	$1.86 \cdot 10^{-3}$
(β -catenin*/APC*/Axin*/GSK3 β)	$2.02 \cdot 10^{-3}$	$1.86 \cdot 10^{-3}$
β -catenin*	1.00#	0.92
β -catenin	25.1	153
Axin	$4.93 \cdot 10^{-4}$	$4.93 \cdot 10^{-4}$
TCF	8.17	2.46
(β -catenin.TCF)	6.83	12.5
β -catenin ⁰	35.0#	178
Axin ⁰	$2.00 \cdot 10^{-2}$ #	$7.28 \cdot 10^{-3}$

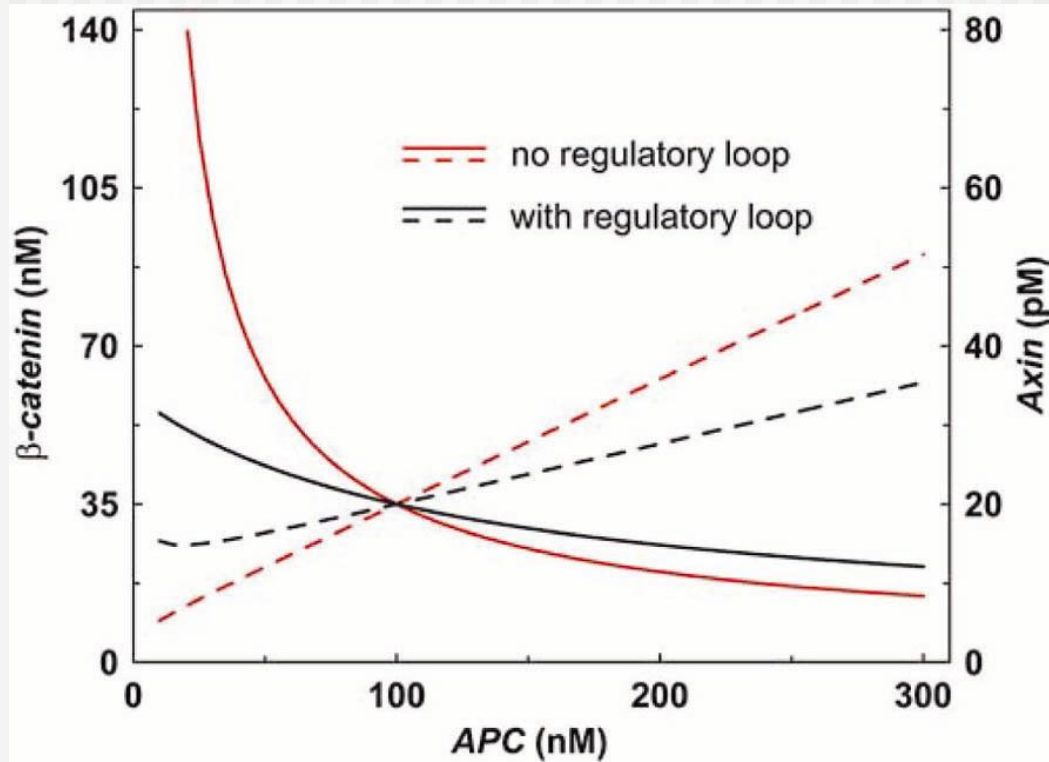
Model vs. Experiment



a) Referenzstatus; b) erhöhte Axin-Konzentration; c) erhöhte Dsh_a -Konzentration; d) Inhibierung von GSK3 β ; e) erhöhte TCF-Konzentration

Abbau von Axin ist APC-abhängig

Theoretischer Effekt von APC auf die Konzentration von Axin und β -Catenin:

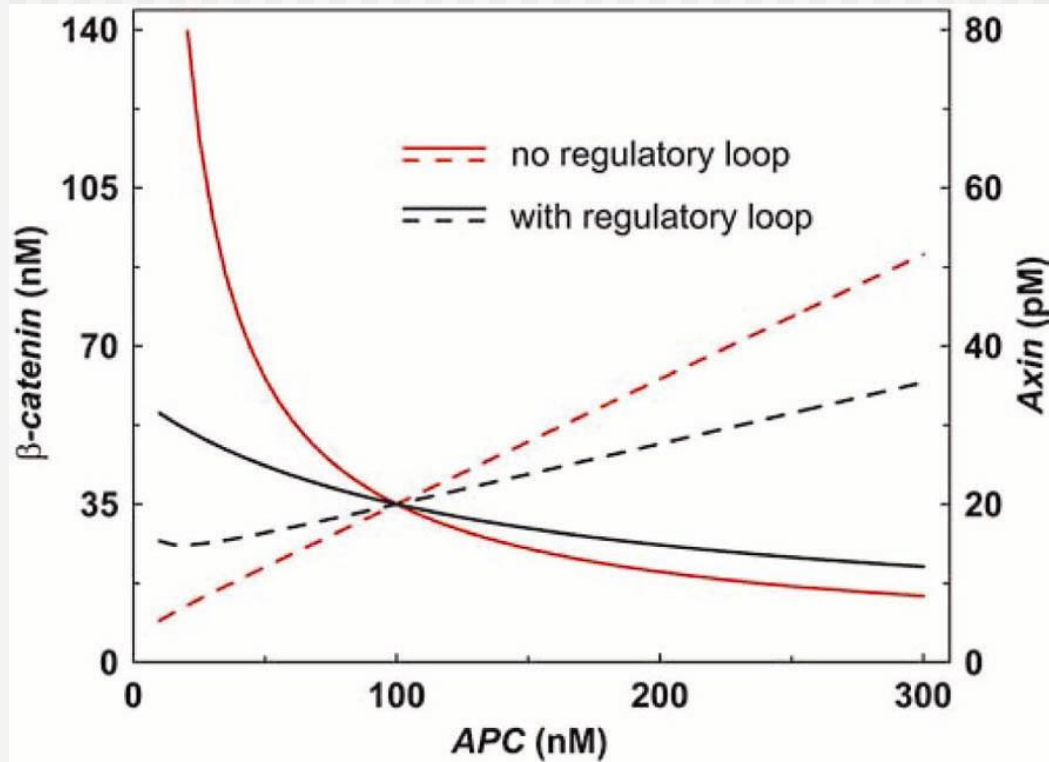


Ohne „regulatory loop“:
Axin-Abbau APC
unabhängig: APC-
Konzentration sinkt ->
 β -Catenin-
Konzentration steigt

$$v_{15} = k_{15} Axin$$

Abbau von Axin ist APC-abhängig

Theoretischer Effekt von APC auf die Konzentration von Axin und β -Catenin:



Mit „regulatory loop“:
ebenfalls: APC-
Konzentration sinkt \rightarrow
 β -Catenin-
Konzentration steigt
Aber dagegen wirkt:
Axinkonzentration
steigt \rightarrow β -Catenin-
Konzentration sinkt

$$v_{15} = \frac{k'_{15} APC * Axin}{K_M + APC}$$

Abbau von Axin ist APC-abhängig

- Unterschiede in der APC-Konzentration beeinflussen den β -Catenin-Abbau recht wenig
- ⇒ APC-abhängiger Axin-Abbau stabilisiert den Wnt-Signalweg gegen Schwankungen der APC-Konzentration

So gesehen wäre der „regulatory loop“ ein wichtiges Design Merkmal des Wnt-Signalwegs

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

- Kalkulation der Veränderungen der Gesamtkonzentrationen von β -Catenin und Axin nach Veränderungen der Geschwindigkeitskonstanten individueller Prozesse:

Kontrollkoeffizienten:
$$C_{\pm i}^{\beta cat} = \frac{k_{\pm i}}{\beta - \text{Catenin}} \frac{\partial(\beta - \text{Catenin})}{\partial k_{\pm i}}$$

für Axin entsprechend

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

Kontrollkoeffizienten für die Gesamtkonzentrationen von β -Catenin und Axin:

Table 3. Control Coefficients for the Total Concentrations of β -Catenin and Axin and Parameters Quantifying the Sensitivity and the Robustness of the Wnt/ β -Catenin Pathway

	Parameter of step j	$C_j^{\beta cat}$	C_j^{axin}
Kinase/ phosphatase module	k_4	-0.89	0.50
	k_5	0.89	-0.50
β -catenin module	k_9	-0.89	-0.08
	k_{10}	$-(10^{-5})$	-0.10
	k_{11}	-0.03	0
	v_{12}	0.93	0.19
	k_{13}	-0.01	-0.01
Axin module	v_{14}	-0.89	0.82
	k_{15}	0.89	-0.82
Binding, dissociation	k_6, k_{-6}	± 0.89	± 0.74
	k_7, k_{-7}	± 0.89	± 0.79
	k_8, k_{-8}	± 0.89	± 0.02
	k_{16}, k_{-16}	± 0.11	0
	k_{17}, k_{-17}	± 0.08	± 0.02
	σ	0.66	0.44
	ρ	0.60	0.70

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

„Summationstheorem für Konzentrationskontrolle“:
Die Werte der Kontrollkoeffizienten für die Geschwindigkeitskonstanten summieren sich zu Null.

$$\sum_{i=1}^r C_{k_{\pm i}}^{S_j} = 0$$

Während einige Enzyme die Stoffkonzentration erhöhen, senken andere sie.

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

Kontrollkoeffizienten für die Gesamtkonzentrationen von β -Catenin und Axin:

Table 3. Control Coefficients for the Total Concentrations of β -Catenin and Axin and Parameters Quantifying the Sensitivity and the Robustness of the Wnt/ β -Catenin Pathway

	Parameter of step j	$C_j^{\beta cat}$	C_j^{axin}
Kinase/ phosphatase module	k_4	-0.89	0.50
	k_5	0.89	-0.50
β -catenin module	k_9	-0.89	-0.08
	k_{10}	$-(10^{-5})$	-0.10
	k_{11}	-0.03	0
	v_{12}	0.93	0.19
	k_{13}	-0.01	-0.01
Axin module	v_{14}	-0.89	0.82
	k_{15}	0.89	-0.82
Binding, dissociation	k_6, k_{-6}	± 0.89	± 0.74
	k_7, k_{-7}	± 0.89	± 0.79
	k_8, k_{-8}	± 0.89	± 0.02
	k_{16}, k_{-16}	± 0.11	0
	k_{17}, k_{-17}	± 0.08	± 0.02
	σ	0.66	0.44
	ρ	0.60	0.70

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

Schätzung der Gesamteffekte von Parameterstörungen auf das System als Ganzes: Standardabweichung σ der Kontrollkoeffizienten vom Mittelwert (welcher Null ist) für β -Catenin:

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

Kontrolle, Modulkomposition und Robustheit des Wnt-Signalwegs

Robustheit ρ einer Variable gegenüber Veränderungen aller Parameter: $\rho = \frac{1}{1 + \sigma}$

Kleine σ -Werte \rightarrow hohe ρ -Werte \rightarrow Variable ist robust gegen Parameterstörungen

Die Gesamtkonzentration von Axin ist robuster gegen Parameterstörungen als die Gesamtkonzentration von β -Catenin.

Diskussion

- Metabolische Kontrolltheorie -> Signaltransduktion

Metabolismus	Signaltransduktion
<ul style="list-style-type: none">■ Transfer von Masse■ bestimmte Komponenten■ hohe Spezifität der Interaktionen von Substraten und Enzymen	<ul style="list-style-type: none">■ Transfer von Informationen■ diverse Komponenten■ schwache Interaktionen

Diskussion

- Metabolische Kontrolltheorie:
Quantifizierung des Einflusses kleiner Parameteränderungen auf die Variablen eines metabolischen Systems
 - Kontrollierende Parameter:
 - kinetische Konstanten
 - Enzymkonzentrationen
 - Kontrollierte Variablen:
 - Substratkonzentrationen
 - Flüsse

Diskussion

- Kontrollkoeffizienten sind nützliche Maße für die Wirkung eines Prozesses (oder einer Quantität) auf eine andere Größe (z.B. Konzentration einer Komponente)
 - Die Größen dieser Kontrollkoeffizienten geben etwas Aufschluss welche Genprodukte Onkogene oder Tumorsuppressoren sein könnten.
(-> Produzierende Reaktionen haben eine positive Kontrolle (Onkogene), abbauende Reaktionen eine negative Kontrolle (Tumorsuppressoren) über eine Stoffkonzentration)

[es gibt viele Veröffentlichungen, die Wnt-Signale mit Krebs in Verbindung gebracht haben]

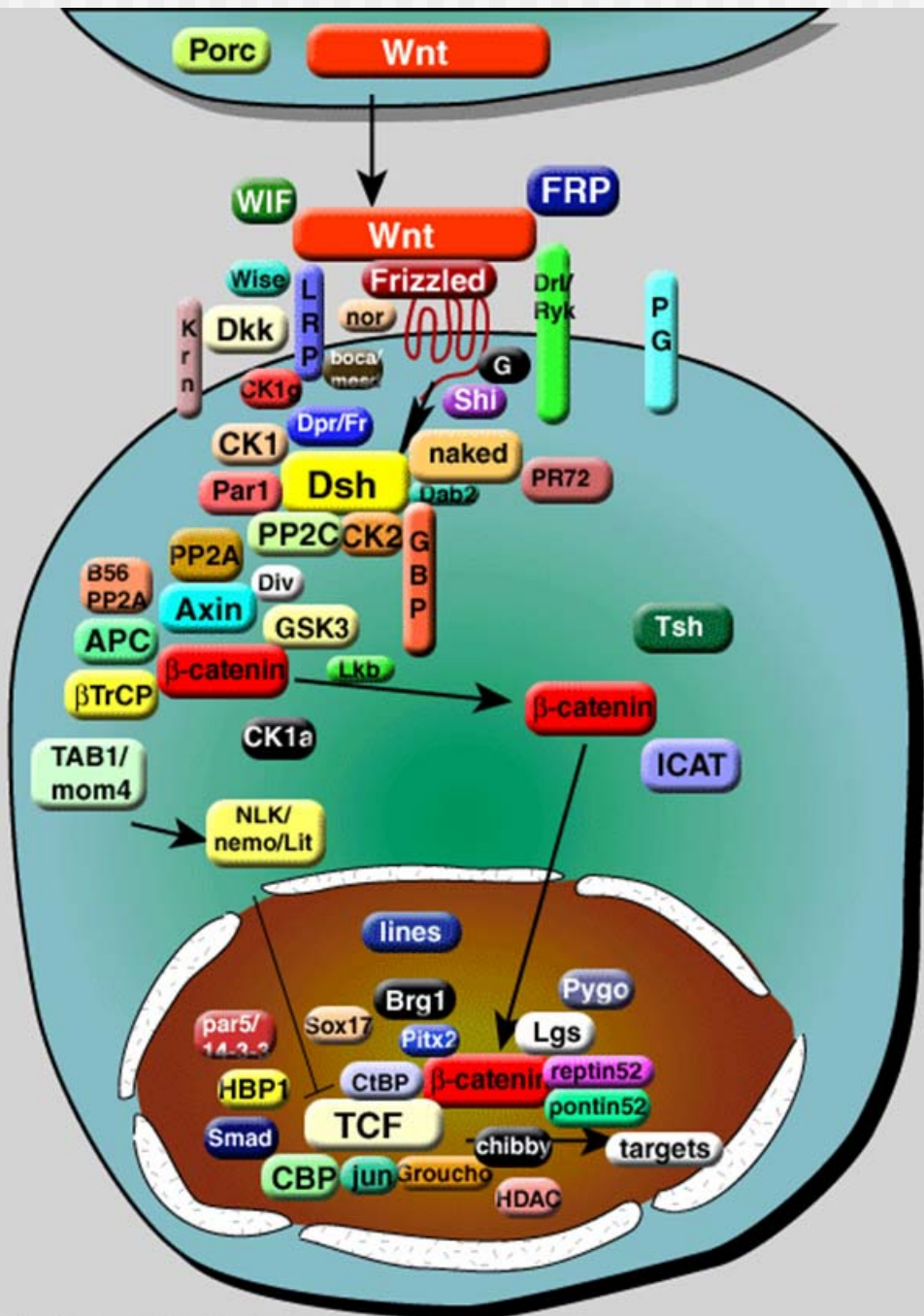
Diskussion

- Robustheit

„Robust“ wird als etwas Gutes eingeschätzt, aber die damit einhergehende Adaptation könnte auch negativ sein, wenn der Signalweg so designt ist, dass auf Veränderungen eines einzelnen Parameters reagiert werden soll.

Diskussion

- Was leistet das verwendete Xenopus-Ei-System?
 - Reproduziert die in vivo Abbaurate von β -Catenin
 - Reagiert auf die bekannten Regulatoren
 - Man kann Konzentrationen der Komponenten präzise beeinflussen
- Was fehlt im System?
 - Ereignisse am Rezeptor und der Plasmamembran
 - Weitere Komponenten der *Wnt-Signalgebung* (Kasein Kinase I δ , Kasein Kinase I ϵ , PAR1) sowie „cross-talk“ von anderen Signalwegen
 - Die verschiedenen Phosphorylierungsschritte wurden vereinfacht.
 - Das Ei ist transkriptionell inaktiv auch wenn die Komponenten des Wnt-Signalweges schon vorhanden sind



Model of Wnt signaling (R. Nusse, Jan 2006)

<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

Zusammenfassung

- Theoretisches Model für den Wnt-Signalweg gut -> Ergebnisse entsprechen ungefähr den experimentellen
- APC-abhängiger Axin-Abbau stabilisiert den Wnt-Signalweg gegen Schwankungen der APC-Konzentration
- Kontrollkoeffizienten (Maß in der metabolischen Kontrolltheorie) induzieren quantitativ die Effekte einer bestimmten (einzelnen) Reaktion auf eine andere Größe (z.B. Konzentration einer Komponente)

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://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/biotutor_2004/
- <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>
- www.molgen.mpg.de/~ag_klipp/lecture/5-MCA-WS05.pdf

Danke für Eure
Aufmerksamkeit (c: