

Rückkopplungen im Leben und Sterben einer Zelle: Ansätze zur systemtheoretischen Analyse

Feedback during Life and Death of a Cell: Approaches for Systems Theoretical Analysis

Steffen Waldherr, Thomas Eissing und Frank Allgöwer

Komplexe Interaktionen in biologischen Systemen erfordern die Anwendung systemtheoretischer Methoden, um ein tieferes Verständnis der beteiligten Prozesse zu erreichen. Eine wichtige Rolle spielen dabei verschiedene Rückkopplungsmechanismen, die viele physiologische Funktionen erst ermöglichen. Dieser Beitrag diskutiert solche Funktionen auf zellulärer Ebene sowie Ansätze, über die diese Mechanismen mit systemtheoretischen Methoden untersucht werden können. Beispielhaft werden Arbeiten aus unserer Gruppe vorgestellt, die einen Beitrag zu einem besseren Verständnis des programmierten Zelltods liefern.

Complex interactions in biological systems require the use of system-theoretic methods to allow a deeper understanding of the involved processes. In these systems, different feedback mechanisms play an important role and are a prerequisite for many physiological functions. This paper discusses such functions at the cellular level and describes approaches by which system-theoretic methods allow an analysis of these mechanisms. As an application example, projects from our group are presented which contribute to a more detailed understanding of programmed cell death.

Schlagwörter: Biologische Rückkopplungen, Apoptose, Bistabilität

Keywords: Biological feedback, apoptosis, bistability

1 Einleitung

Nur in wenigen Wissenschaften werden derzeit so viele grundlegende Entdeckungen gemacht wie in der Biologie. Vor dem 20. Jahrhundert lag der Fokus biologischer Forschung auf der Klassifizierung des Lebens sowie der Feststellung und Erklärung makroskopischer Unterschiede. Im vergangenen Jahrhundert haben genomische und biochemische Ansätze die molekularen Grundlagen des Lebens und seiner Vielfalt offenbart. Aber auch wenn heute viel über die statischen Bestandteile und Eigenschaften der Moleküle des Lebens bekannt ist, so sind wir doch noch weit von einem ganzheitlichen Verständnis der Vorgänge entfernt.

In der Systembiologie hat man es sich daher zum Ziel gesetzt, aufbauend auf dem Wissen über molekulare Eigenschaften, die dynamischen Interaktionen und Mechanismen

zu verstehen, die das Verhalten biologischer Systeme bestimmen. Aufgrund der Vielzahl der Interaktionen und der Komplexität der möglichen Verhaltensweisen scheint es hoffnungslos, einen tieferen Einblick in diese Prozesse allein aus der Anschauung zu erhalten. Methoden der mathematischen Modellierung und Analyse dagegen ermöglichen es, komplexe biologische Prozesse besser zu verstehen. Ein solches Verständnis ist nicht nur reizvoll aus wissenschaftlicher Perspektive, sondern auch für Anwendungen in der Biotechnologie und der Medizin von großem Interesse und von breiter gesellschaftlicher Relevanz.

Die komplexen Interaktionen in biologischen Systemen lassen eine Vielzahl von Rückkopplungen vermuten, deren Bedeutung erst zunehmend erkannt wird. In den letzten Jahren haben einige grundlegende Beiträge prinzipielle funktionelle Rollen für Rückkopplungen in biologischen

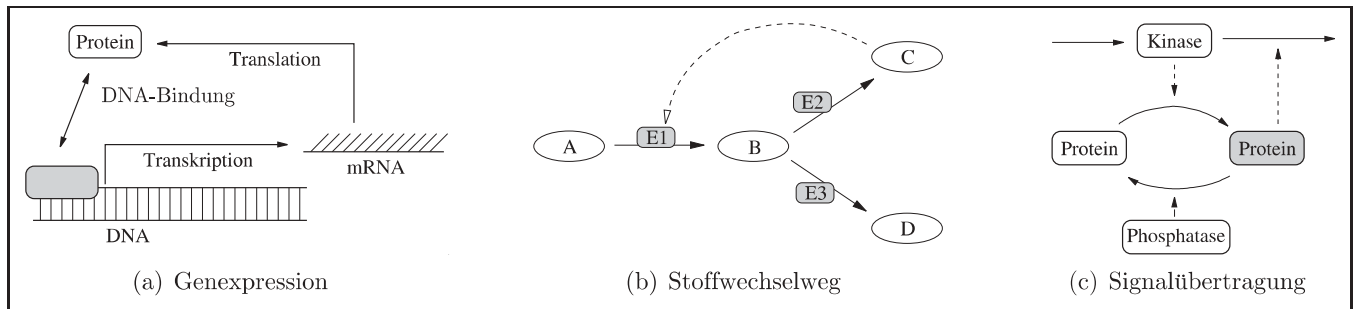


Bild 1: Rückkopplungsmechanismen auf verschiedenen biologischen Ebenen.

Systemen aufzeigen können und somit zu einem besseren Verständnis bestimmter biologischer Vorgänge beigetragen. Das Gebiet ist jedoch jung und bietet noch viele Herausforderungen. In diesem Beitrag werden einige grundlegende Eigenschaften biologischer Rückkopplungen sowie Ansätze zu deren systemtheoretischer Analyse diskutiert. Vertiefend werden Arbeiten aus unserer Gruppe zur Signaltransduktion des programmierten Zelltods, auch Apoptose genannt, vorgestellt.

Apoptose ist ein wichtiger physiologischer Prozess, durch den einzelne Zellen zum Wohl des Organismus als Ganzem abgetötet werden. Dieser Prozess ist essenziell, um Zellen zu eliminieren, die alt, infiziert, potenziell gefährlich sind oder einfach nicht länger benötigt werden. Im menschlichen Körper sterben jeden Tag durchschnittlich zehn Milliarden Zellen, um ein Gleichgewicht mit neu hergestellten Zellen zu gewährleisten. Störungen dieser Homöostase sind an der Entstehung zahlreicher Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder Alzheimer beteiligt.

Der Beitrag beginnt mit einem kurzen Überblick zu biologischen Grundlagen, wobei insbesondere die zu Rückkopplungen führenden biochemischen Mechanismen vorgestellt werden. Im Anschluss werden Rückkopplungen in biologischen Systemen konkreter definiert und es wird gezeigt, welche unterschiedlichen biologischen Funktionen hierdurch generiert werden können. Als konkretes Anwendungsbeispiel wird dann der Prozess der Apoptose näher betrachtet. Mit einer systemtheoretischen Analyse, welche die spezifischen Eigenschaften darin auftretender Rückkopplungen berücksichtigt, kann man für diesen Prozess biologisch relevante Einblicke gewinnen.

2 Biologische Rückkopplungsmechanismen

Forschungen in der Molekularbiologie und Genetik haben in den letzten Jahrzehnten ein qualitatives Verständnis vieler biochemischer Vorgänge des Lebens hervorgebracht. DNA wurde als Erbsubstanz identifiziert, und die Mechanismen, mit denen die darin enthaltene Information durch Transkription in mRNA und Translation in Proteine übersetzt wird, wurden bis in viele Details untersucht. Proteine sind als zentrale Komponenten an einem Großteil der zellulären Prozesse beteiligt. Viele dieser Prozesse können

als biochemische Reaktionsnetzwerke beschrieben werden, innerhalb derer Proteine als reagierende Stoffe in verschiedenen Rollen auftreten.

Als Transkriptionsfaktoren beeinflussen Proteine die Genexpression und damit ihre eigene Herstellung. Dadurch gibt es innerhalb des sogenannten Genregulations-Netzwerkes viele Rückkopplungen, die funktionell von Bedeutung sind (vergleiche Bild 1a).

Außer als Transkriptionsfaktoren fungieren Proteine unter anderem als Enzyme, welche grundlegend für den Stoffwechsel und die Energiegewinnung der Zelle sind. Während Enzyme die Umwandlung einzelner Metabolite katalysieren, können Metabolite wiederum die Aktivität der Enzyme beeinflussen. Mittels dieser sogenannten allosterischen Modifikation werden im Stoffwechsel der Zelle vielfältige Rückkopplungen realisiert (vergleiche Bild 1b).

Proteine geben der Zelle aber auch Form und Struktur und ermöglichen Mobilität. Des Weiteren übertragen und verarbeiten sie Signale, welche essentiell für die Koordinierung der unterschiedlichen Vorgänge innerhalb einer Zelle, aber auch zwischen den Zellen innerhalb eines Organismus sind. In der Signaltransduktion spielen Rückkopplungen eine wichtige Rolle, um ein gewünschtes Verhalten der Signalübertragung zu erhalten (vergleiche Bild 1c). Die Rolle von Rückkopplungen in der Signalübertragung wird in den folgenden Abschnitten im Detail betrachtet.

Innerhalb der drei Ebenen Genexpression, Stoffwechsel und Signalübertragung findet man eine Vielzahl der beschriebenen Rückkopplungsmechanismen. Zusätzlich gibt es unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen den drei Ebenen, durch die weitere Rückkopplungen in der Zelle erzeugt werden. Da Rückkopplungen oft wichtige physiologische Funktionen haben, jedoch die wirkenden Mechanismen häufig nicht intuitiv verständlich sind, ist ein systemtheoretischer Ansatz zur Analyse von Rückkopplungsmechanismen erforderlich.

3 Systemtheoretische Untersuchung biologischer Rückkopplungen

Zur Verwendung systemtheoretischer Ansätze wird ein mathematisches Modell des zu untersuchenden biologischen Systems benötigt. Meistens wird dabei in einem ersten

Schritt anhand des verfügbaren biologischen Wissens oder in Zusammenarbeit mit Biologen ein einfaches Schema der beteiligten Komponenten und der jeweiligen Interaktionen erstellt. In einem zweiten Schritt kann anhand etablierter Ansätze aus der Biochemie ein mechanistisches Differentialgleichungsmodell des zu untersuchenden Systems aufgestellt werden. Zur Modellierung der hier betrachteten Klassen biologischer Systeme existiert bereits eine umfangreiche Literatur, für eine Einführung sei auf [10] verwiesen.

Ein so konstruiertes Differentialgleichungsmodell ist in allgemeiner Form gegeben durch

$$\dot{x} = F(x), \quad (1)$$

wobei der Zustandsvektor $x \in \mathbb{R}^n$ für jeden im betrachteten System vorhandenen chemischen Stoff die zu einem Zeitpunkt vorhandene Menge oder Konzentration angibt. Das Vorhandensein einer Rückkopplungsschleife kann nun über die partiellen Ableitungen $\partial F_j / \partial x_i$ definiert werden [3]:

Definition 1. Das m -Tupel $\mathcal{R} = (x_{r_1}, \dots, x_{r_m})$, $r_i \in \{1, \dots, n\}$, von Zustandsvariablen bildet eine Rückkopplungsschleife, falls

$$P_{\mathcal{R}}(x_0) = \prod_{i=1}^m \frac{\partial F_{r_i}}{\partial x_{r_{i+1}}}(x_0) \neq 0, \quad (2)$$

wobei $r_{m+1} = r_1$.

Zur Anwendung der Definition muss ein Zustand x_0 gewählt werden, für den die Ungleichung (2) ausgewertet wird, beispielsweise eine Ruhelage oder eine Anfangsbedingung. Allerdings hängt in biologischen Systemen die Bedingung $P_{\mathcal{R}}(x_0) \neq 0$ häufig nicht vom Wert für x_0 ab, oder sie ist nur für vereinzelte Punkte x_0 nicht erfüllt. In diesem Fall erhält man eine über den kompletten Zustandsraum konstante Rückkopplungsstruktur.

Die Rückkopplungsstruktur eines Modells der Form (1) kann mit dem Interaktionsgraphen der Jacobi-Matrix $\partial F / \partial x(x_0)$ veranschaulicht werden. Die Knoten dieses Graphen entsprechen den Zustandsvariablen x_i , $i = 1, \dots, n$, und der Graph enthält eine Kante vom Knoten i zum Knoten j , falls $\partial F_j / \partial x_i(x_0) \neq 0$. Oftmals werden auch zwei unterschiedliche Typen von Kanten verwendet, um zwischen positivem und negativem Vorzeichen des jeweiligen Elementes in der Jacobi-Matrix zu unterscheiden. Ein Beispiel für einen solchen Interaktionsgraphen zeigt Bild 5, wo die Rückkopplungsstruktur eines Teilsystems des apoptotischen Netzwerkes dargestellt ist. Diese Darstellung zeigt auch eine Schwäche der gegebenen Definition für Rückkopplungsschleifen auf. In größeren Systemen können, insbesondere durch die in der biologischen Signalübertragung verbreitete Komplexbildung, sehr viele Rückkopplungsschleifen auftreten. Um dieses Problem zu umgehen, ist eine Modularisierung des Systems sinnvoll, in der Teilsysteme gekapselt werden können, deren Ein-/Ausgangsverhalten sich gut charakterisieren lässt [1; 15].

Um zur Analyse auf das ganze Spektrum regelungstechnischer Methoden zugreifen zu können, bietet es sich an, das Differentialgleichungsmodell (1) als ein in Rückkopplung geschlossenes Ein-/Ausgangssystem aufzufassen. Hierzu wählt man ein Ein-/Ausgangssystem

$$\dot{x} = f(x, u), \quad y = h(x), \quad (3)$$

sodass das durch die Rückkopplung $u = h(x)$ geschlossene System dem Originalsystem (1) entspricht, d.h. es muss $F(x) = f(x, h(x))$ gelten [18].

Im einfachen Fall ist der Ausgang nur ein Konzentrationswert, und man erhält $h(x) = x_i$. Das Ein-/Ausgangsverhalten des Systems (3) wird dabei nur dann nicht-trivial sein, wenn die Zustandsvariable x_i an einer Rückkopplungsschleife beteiligt ist und die Verbindung von y zum

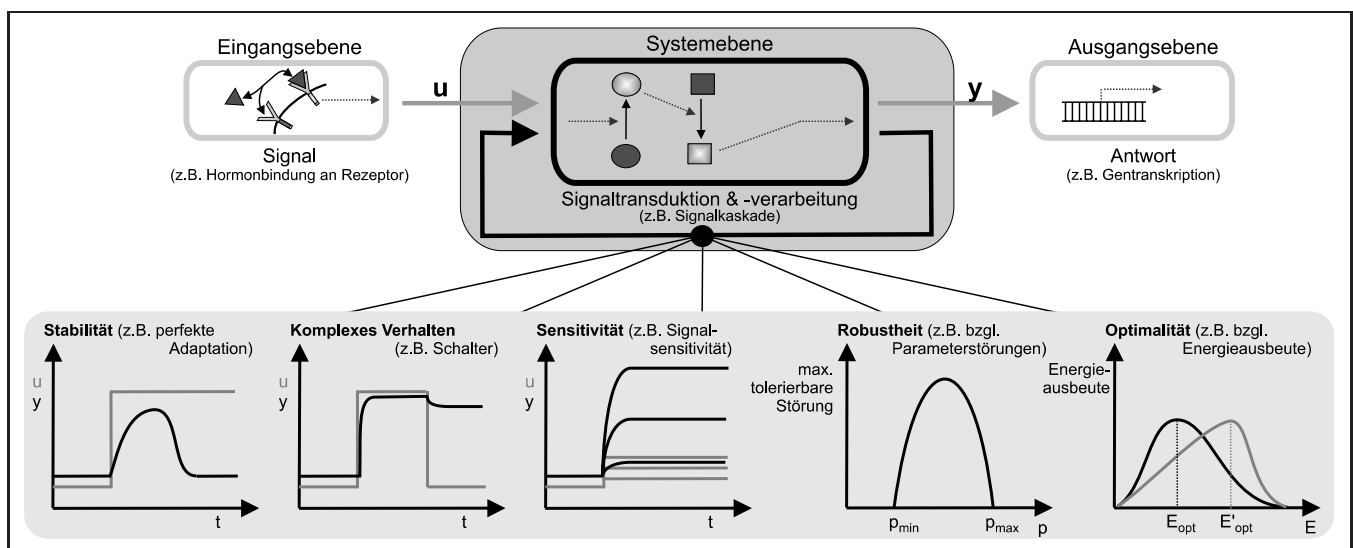


Bild 2: Ausgewählte funktionelle Rollen von Rückkopplungen in biologischen Systemen. In diesem Beispiel wird eine biochemische Signalübertragung dargestellt, wobei eine Rückkopplung auf Systemebene betrachtet wird. Die Systemebene besteht hier aus der schematisch dargestellten Proteinkaskade.

Eingriffsort des Eingangs u über diese Rückkopplungsschleife läuft. Mit dieser Konstruktion lassen sich durch Anwendung regelungstechnischer Methoden auf das Ein-/Ausgangssystem (3), wie eine Frequenzganganalyse oder Robustheitsuntersuchungen, Schlussfolgerungen über das geschlossene System (1) ziehen. Ein solcher Ansatz erlaubt es beispielsweise, Aussagen über das Auftreten und die Robustheit von komplexem dynamischen Verhalten wie Bistabilität oder Oszillationen zu machen [9; 18].

Ein anderer Ansatz verwendet den vollständigen Zustandsvektor x als Ausgang, und alle Interaktionen zwischen Zustandsvariablen werden in die äußere Rückkopplung $u = h(x)$ verschoben. Mit diesem Ansatz lassen sich Aussagen über die Relevanz unterschiedlicher Interaktionen für das Verhalten des geschlossenen Systems (1) machen [16; 19].

Welche Rolle für physiologische Funktionen spielen nun Rückkopplungen im komplexen Reaktionsnetzwerk der Zelle? Die Forschungen der letzten Jahre haben sich im Wesentlichen auf fünf Punkte konzentriert, welche in Bild 2 illustriert sind:

1. Stabilität eines Gleichgewichtszustandes,
2. Komplexes dynamisches Verhalten wie Bistabilität oder Oszillationen,
3. Sensitivität der zellulären Reaktion gegenüber extrinsischen oder intrinsischen Signalen,
4. Robustheit zellulärer Funktionen gegenüber konstanten oder variierenden Störungen,
5. Optimalität des zellulären Verhaltens.

Insbesondere die Stabilität eines Gleichgewichtszustandes ist dem Regelungstechniker vertraut und hat auch in der Biologie eine hohe Bedeutung. In der biologischen Signalübertragung ist dabei im Besonderen die sogenannte perfekte Adaptation wichtig. Dabei wird auf eine bleibende Veränderung im Stimulus zwar eine transiente Zellreaktion erzeugt, der Zustand der Zelle kehrt jedoch nach dem Übergangverhalten wieder zum vorherigen Gleichgewichtswert zurück. Dies ist für viele physiologische Prozesse wichtig, um die Reaktionsfähigkeit der Zelle gegenüber weiteren Veränderungen im Stimulus zu erhalten. Ein gut untersuchtes Beispiel für diesen Fall ist die Chemotaxis, ein Mechanismus, der es Zellen erlaubt, ihre Bewegungsrichtung entsprechend dem Vorhandensein chemischer Substanzen zu wählen. Systemtheoretisch lässt sich nach dem Inneren-Modell-Prinzip zeigen, dass für eine perfekte Adaptation ein Subsystem im Rückkopplungspfad enthalten sein muss, welches die zu adaptierenden Signale generieren kann [17]. Im Beispiel der Chemotaxis ist unter Annahme stückweiser konstanter Störsignale im Rückkopplungspfad ein Integrator erforderlich [20].

Asymptotische Anpassung an einen stabilen Gleichgewichtszustand ist jedoch nur eines der vorkommenden Charakteristika in der Dynamik biologischer Systeme. Ebenfalls von großer Bedeutung ist Bistabilität, d. h. ein System besitzt zwei stabile Ruhelagen und kann abhängig von externen Signalen zwischen diesen Zuständen wechseln.

Damit wird in vielen biologischen Systemen eine Schalterfunktion mit Hysterese oder ein Vergangenheitspeicher realisiert, was beispielsweise für zelluläre Entscheidungen oder in der Zelldifferentiation relevant ist. Eine Schalterfunktion in einem zellulären Entscheidungsprozess tritt im programmierten Zelltod auf und wird im nächsten Abschnitt diskutiert. Ein weiteres Beispiel für dynamisches Verhalten mit einer wichtigen Funktion in biologischen Systemen sind nicht-abklingende Oszillationen. Der wohl bekannteste Fall ist der fast allen Lebewesen eigene Tag-Nacht-Rhythmus, der auch ein häufiger Forschungsgegenstand systembiologischer Untersuchungen ist. Theoretische Untersuchungen der verschiedenen Formen dynamischen Verhaltens haben gezeigt, dass eine Rückkopplungsschleife im jeweiligen System eine notwendige Voraussetzung für das Auftreten von Bistabilität oder Oszillationen ist. Dabei ist für Bistabilität eine positive Rückkopplung notwendig, während Oszillationen eine negative Rückkopplung erfordern [8]. Eine Kombination von Bistabilität und Oszillationen kann einen biochemischen Kippschwinger erzeugen [2], der beispielsweise im Zellzyklus eine zentrale Rolle spielt [14].

Die Beobachtung biologischer Systeme zeigt, dass deren Funktion robust ist gegenüber Parameteränderungen, die durch Genmutationen oder Umgebungsvariation verursacht werden. Für eine systemtheoretische Untersuchung ist es hierbei besonders wichtig genau zu spezifizieren, welche Funktion des Systems robust gegenüber welcher Art von Störeinflüssen sein soll. In mehreren Beispielen konnte bereits gezeigt werden, dass Rückkopplungen im biologischen System oft die Robustheit einer bestimmten Funktion verbessern. Allerdings fehlt es noch an Standardansätzen, wie sie etwa in der Regelungstechnik schon weit verbreitet sind.

Eine generische Funktion, die hier etwas näher betrachtet werden soll, ist die Reaktion einer Zelle gegenüber einem externen Stimulus, die typischerweise über biochemische Signalübertragungswege realisiert wird. Dabei ist für die Funktion wichtig, dass die Zelle spezifisch und quantitativ abgestimmt auf den Stimulus reagiert, d. h. eine gewisse Sensitivität gegenüber dem externen Stimulus zeigt. Hierfür muss die Zelle zum Teil widersprüchliche Anforderungen erfüllen: Die Reaktion muss oft schnell, allerdings auch präzise auf den Stimulus abgestimmt und gleichzeitig robust gegenüber anderen Umwelteinflüssen oder stochastischen Unsicherheiten sein. Biologische Systeme, in denen diese Eigenschaften mit theoretischen Methoden untersucht wurden, sind u. a. die schon angesprochene Chemotaxis [13] oder die Hitzeschock-Reaktion von Bakterien [11]. Ein zentrales Ergebnis der Untersuchung der Hitzeschock-Reaktion ist, dass unterschiedliche Rückkopplungsschleifen jeweils zur Erfüllung einzelner physiologischer Anforderungen an das Verhalten des Gesamtsystems beitragen.

Widersprüchliche Anforderungen an die Funktionen einer Zelle zeigen sich auch auf einer anderen Ebene: Jedes Lebewesen hat nur begrenzte Ressourcen zur Verfügung, mit denen es alle zum Überleben und zur Reproduktion

nötigen Funktionen in Gang halten muss. Die Mechanismen der Evolution wirken dabei darauf hin, dass mit den zur Verfügung stehenden Ressourcen eine möglichst hohe Leistungsfähigkeit erreicht wird. Untersuchungen verschiedener biologischer Systeme weisen darauf hin, dass Rückkopplungsmechanismen in diesem Zusammenhang wichtige Beiträge zu einer Optimierung biologischer Funktionen leisten [4]. Zur systemtheoretischen Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen fehlen derzeit jedoch noch geeignete Ansätze. Regelungstechnische Methoden erscheinen prinzipiell sehr gut geeignet, um solche Untersuchungen durchzuführen, Herausforderungen bestehen jedoch in der entsprechenden Formulierung biologischer Sachverhalte und umgekehrt in der biologischen Interpretation mathematischer Ergebnisse.

4 Systembiologie des programmierten Zelltods

Einige der diskutierten Eigenschaften biologischer Rückkopplungen treten im physiologisch wichtigen Prozess des programmierten Zelltods, auch Apoptose genannt, auf und sollen im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Apoptose kann unter verschiedenen Bedingungen initiiert werden. Extrinsische Stimuli werden durch Signalproteine, sogenannte Todesliganden, ausgelöst, indem diese an spezielle Rezeptoren in der Zellmembran binden und eine intrazelluläre Signalübertragung anstoßen. Intrinsische Bedingungen sind beispielsweise Schäden an der DNA. Die unterschiedlichen Wege zur Apoptose konvergieren in einem Kernmodul, der sogenannten Caspase-Kaskade, in der die Entscheidung über den Eintritt in die Apoptose gefällt wird. Caspasen gehören zur Enzymfamilie der Proteasen. Dies sind Proteine, die andere Proteine spalten können. Caspasen werden in einer inaktiven Form, der sogenannten Pro-Form, produziert und selbst durch proteolytische Spaltung aktiviert. Initiator-Caspasen nehmen apoptotische Stimuli wahr und spalten darauf hin Effektor-Caspasen. Deren Aktivierung führt zur kontrollierten Selbsterstörung der Zelle. Die Reste werden anschließend von benachbarten Fresszellen aufgenommen, ohne Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Zur systemtheoretischen Untersuchung dieses Mechanismus ist ein mathematisches Modell erforderlich. Als Grundlage hierfür dient das in Bild 3 dargestellte Schema der apoptotischen Signalpfade. Das Modell beschränkt sich dabei auf das Kernmodul der Caspase-Kaskade und verwendet nur das in Bild 3 grau unterlegte

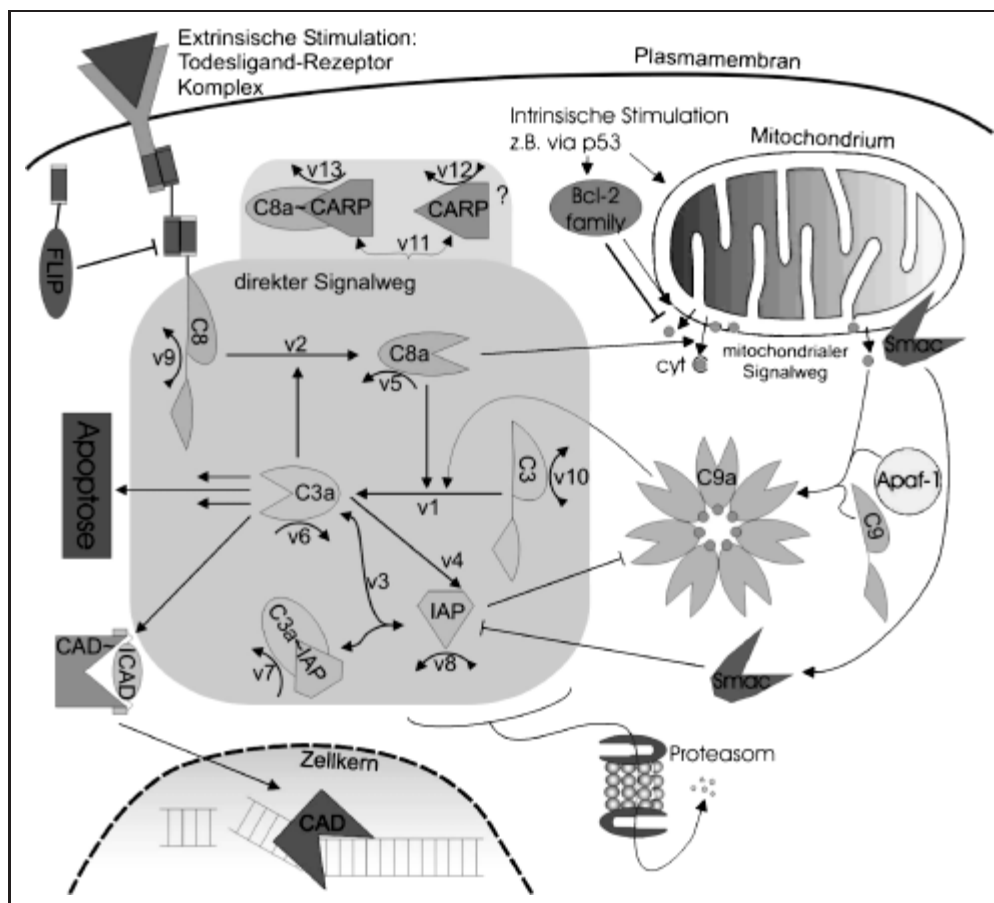


Bild 3: Überblick über apoptotische Signalwege. Ausgehend von einer extrinsischen Stimulation am Rezeptor werden über eine biochemische Signalübertragung die Caspasen aktiviert. Diese lösen Apoptose aus, womit auch die Spaltung der zellulären DNA verbunden ist. Eine intrinsische Stimulation aktiviert die Caspasen in erster Linie über das Mitochondrium. Das hier untersuchte Modul der Caspase-Kaskade ist grau hinterlegt. Bezeichnungen: C8(a) – (Pro-)Initiator-caspase-8, C3(a) – (Pro-)Effektor-Caspase-3, IAP – Inhibitoren der Apoptose Proteine, CARP – Caspase-assoziierte RING Proteine.

Reaktionsnetzwerk. Hierfür kann unter Anwendung des Massenwirkungsgesetzes ein Differentialgleichungssystem mit acht dynamischen Variablen und neunzehn konstanten Parametern aufgestellt werden. Aus Platzgründen wird hier das Modell nicht explizit angegeben, es sei statt dessen auf die Referenz [6] verwiesen. Da in diesem Modell die Effektor-Caspasen direkt den Zelltod auslösen, wird die Menge an aktivierter Effektor-Caspase-3 hier als Ausgang betrachtet, während die beispielsweise über Rezeptorsignalisierung erzeugte Menge an aktivierter Initiator-Caspase-8 als Eingang betrachtet wird.

Während die Aktivierung von Effektor-Caspasen innerhalb einer Population von Zellen normalerweise als langsamer Vorgang beobachtet wird, zeigen neue experimentelle Ergebnisse auf Einzelzellebene, dass die Caspasen sehr schnell aktiviert werden. Zwischen apoptotischem Stimulus und schlagartiger Aktivierung vergehen oft mehrere Stunden (Verzögerungsphase), und Zellen innerhalb einer Population sterben zu unterschiedlichen Zeitpunkten, obwohl alle dem gleichen Stimulus ausgesetzt sind. Während in seltenen Fällen eine partielle Aktivierung von Initiator-Caspasen auftritt, führt die Aktivierung von Effektor-Caspasen unweigerlich zum Zelltod. Somit ist zwischen dem Eingang in die Caspase-Kaskade und dem Ausgang ein irreversibler Schaltvorgang zu beobachten. Im Differentialgleichungssystem für die Caspase-Kaskade lässt sich dabei ein Schwellenwert für die Konzentration der aktivierten Initiator-Caspase-8 bestimmen, bei dessen Überschreiten eine substantielle und anhaltende Caspase-Aktivierung eintritt. Hierbei wurde vereinfachend angenommen, dass eine an physiologische Bedingungen angenäherte pulsformige Stimulation mit den entsprechenden Signalproteinen eine positive Anfangskonzentration der aktivierten Caspase-8 bewirkt. Das von der Anfangskonzentration abhängige Schaltverhalten der Caspase-Kaskade ist in Bild 4 dargestellt.

Im hier verwendeten mechanistischen Differentialgleichungsmodell wird der Schaltvorgang durch eine bistabile Dynamik ermöglicht. Im Fall der Apoptose entsprechen die beiden stabilen, stationären Zustände dabei dem apoptotischen Zustand mit hoher Caspase-Aktivierung und dem nicht-apoptotischen Normalzustand, in dem keine Caspasen aktiviert sind. Eine notwendige Voraussetzung für Bistabilität ist das Vorhandensein einer positiven Rückkopplungsschleife im entsprechenden System. Bei der Apoptose existiert eine solche für Bistabilität verantwortliche Rückkopplung (Bild 5) zwischen den Zustandsvariablen C8a (aktivierte Initiator-Caspase-8) und C3a (aktivierte Effektor-Caspase-3). Zusätzlich sind strukturell bestimmte Nichtlinearitäten notwendig, um in der algebraischen Gleichung für die Ruhelagen mehrere Lösungen zu erhalten. Diese Bedingungen sind jedoch nicht hinreichend für Bistabilität und sagen im Allgemeinen nichts über die zu Bistabilität führenden Parameterwerte aus. Über Bifurkationsanalysen können häufig geeignete Parameterwerte bestimmt werden. Das Ergebnis einer solchen Analyse ist ein sogenanntes Bifurkationsdiagramm, in dem die Ruhe-

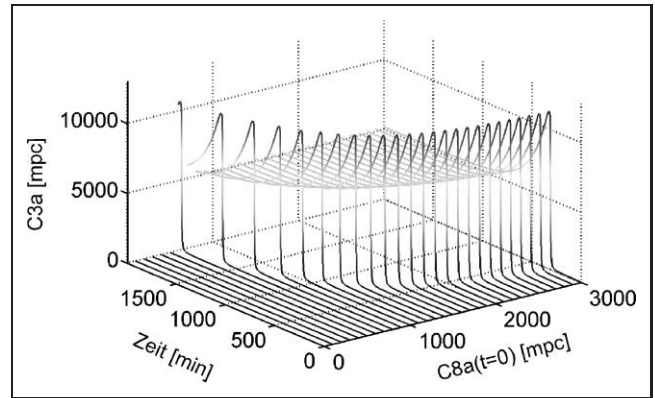


Bild 4: Simulationsergebnisse für das Schaltverhalten der Caspase-Kaskade (aus [6] reproduziert). mpc = Moleküle pro Zelle.

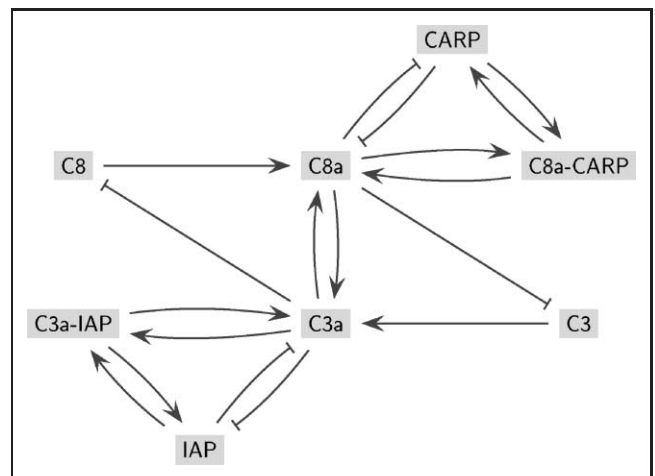


Bild 5: Interaktionsgraph der Caspase-Aktivierung.

lagen des Differentialgleichungssystems in Abhängigkeit eines Parameters eingezeichnet sind, wobei stabile Ruhelagen mit durchgezogener und instabile Ruhelagen mit gestrichelter Linie gezeichnet werden. Ein Bifurkationsdiagramm für das Modell der Apoptose ohne den in Bild 3 mit CARP bezeichneten Inhibitor ist in Bild 6 ersichtlich. Der Parameterbereich, in dem das System bistabil ist und somit schaltendes Verhalten zeigt, kann direkt aus dem Diagramm entnommen werden. Für das untersuchte System der Apoptose kann mit zusätzlichen Vereinfachungen auch der mehrdimensionale Parameterbereich, in dem Bistabilität gegeben ist, analytisch bestimmt werden [6].

Das Schaltverhalten in der Apoptose entscheidet über Leben und Tod einzelner Zellen. Somit erwartet man, dass diese Entscheidung robust ist und kleine Schwankungen im physiologischen Zustand der Zelle keinen starken Einfluss auf die Entscheidung haben. Eine systemtheoretische Untersuchung dieser Hypothese erfordert eine präzise Definition von Robustheit für das System der Apoptose. Im Zusammenhang mit den vorangehenden Ergebnissen ist es sinnvoll, die Robustheit der Eigenschaft „Bistabilität“ gegenüber Änderungen in Systemparametern zu untersuchen. Für eine quantitative Analyse der Robustheit wurden verschiedene Robustheitsmaße verwendet, die auf

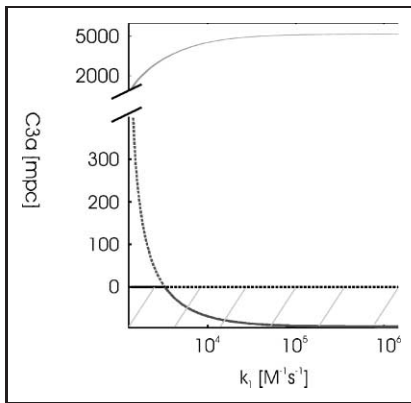


Bild 6: Bifurkationsanalyse des Modells der Caspase-Kaskade. Dargestellt ist die Menge an aktivierter Caspase 3 im stationären Zustand, in Abhängigkeit des Reaktionsparameters k_1 .

Monte-Carlo Tests bzw. auf der Bestimmung von Bifurkationspunkten, an denen Bistabilität verloren geht, beruhen. Damit konnte gezeigt werden, dass das Hinzufügen des Caspase-Inhibitors CARP (vgl. Bild 3) die Robustheit der Bistabilität deutlich erhöht [5]. Zusätzlich hat das Hinzufügen dieses Inhibitors den Effekt, dass das Apoptose-Modell für solche Parameterwerte Bistabilität erlaubt, die mit biologischen Messungen gut in Einklang stehen [6]. Der Inhibitor CARP war zuvor nicht bekannt, konnte jedoch inzwischen auch durch experimentelle Studien nachgewiesen werden [12].

Unterschiedliche Sensitivitätsuntersuchungen und Simulationsstudien des erweiterten Apoptosemodells zeigen, wie das beobachtete Verhalten von den Parametern abhängt. Ein relevantes Ergebnis ist, dass hoch regulierte Inhibitoren, wie sie in zahlreichen Krebserkrankungen beobachtet werden, Zellen nicht nur wie bisher angenommen gegen apoptotische Stimuli desensibilisieren, sondern ebenfalls zur Aggressivität und Progression der Tumore beitragen könnten. Da diese Inhibitoren als Ziele zur medikamentösen Intervention erkannt wurden, liefern die Analysen somit Erkenntnisse von medizinischer und pharmakologischer Relevanz [7].

Aus dem Interaktionsgraphen in Bild 5 ist ersichtlich, dass in der Apoptose mehrere Rückkopplungsschleifen involviert sind: neben der positiven Rückkopplung über die gegenseitige Aktivierung der Caspasen werden über die beiden Inhibitoren CARP und IAP zusätzliche Rückkopplungen realisiert. Der in Abschnitt 3 beschriebene Ansatz, in dem das System als ein in Rückkopplung geschlossenes Ein-/Ausgangssystem betrachtet wird, kann hier dazu beitragen, die Rollen der verschiedenen Interaktionen zu beleuchten [19]. Für den Prozess der Apoptose kann so gezeigt werden, dass während des Schaltens in erster Linie die Rückkopplungsschleife zwischen den Caspasen aktiv ist, während in den beiden stabilen Zuständen jeweils die Interaktionen mit den Inhibitoren dominieren. Für diesen Aspekt sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um ein genaues Verständnis der apoptotischen Signalübertragung zu erhalten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der Beitrag gibt einen Überblick über Rückkopplungsmechanismen in verschiedenen biologischen Prozessen. Dabei stellt sich heraus, dass Rückkopplungen eine wesentliche Funktion für die Realisierung unterschiedlicher physiologischer Prozesse haben. Fünf wichtige funktionelle Rollen biologischer Rückkopplungsschleifen werden kurz erläutert. Der Beitrag zeigt auf, wie mittels mathematischer Modellierung eine Verbindung von biologischen Fragestellungen zu systemtheoretischen Analysemethoden erreicht werden kann.

Es wird auch diskutiert, für welche Art von Fragestellungen geeignete Methoden aus der Regelungstheorie noch nicht existieren oder noch nicht auf die Besonderheiten biologischer Systeme angepasst wurden. Insbesondere die Bereiche der Robustheit und Optimalität biologischer Prozesse sowie deren Zusammenspiel stellen von methodischer Seite noch große Herausforderungen dar. Hier können Regelungstechniker noch Beiträge leisten, die für das Feld der Systembiologie zentrale Fragestellungen betreffen.

Als Beispiel für einen auf Rückkopplungsmechanismen basierenden biologischen Schalter wird die Apoptose herangezogen. Hierfür wird gezeigt, wie die Anwendung systemtheoretischer Methoden ein besseres Verständnis biochemischer Prozesse in der Zelle erlaubt.

Die Apoptose ist zwar wichtig, umfasst aber dennoch nur einen kleinen Bruchteil der Vorgänge in lebenden Zellen. Insgesamt wurden bisher nur sehr wenige biologische Prozesse auf zellulärer Ebene mathematisch modelliert und einer systemtheoretischen Analyse unterzogen. Für zukünftige Fortschritte in der Medizin wird es entscheidend sein, auch weitere biologische Prozesse mit solchen Ansätzen zu untersuchen.

Danksagung

Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Projekt „Systembiologische Untersuchungen und Weiterentwicklung eines mathematischen Modells TNF-induzierter zellulärer Reaktionen“ sowie vom Land Baden-Württemberg über das Zentrum für Systembiologie (ZSB) an der Universität Stuttgart gefördert. Die Autoren danken den Beteiligten in den einzelnen Projekten, insbesondere Eric Bullinger und Peter Scheurich, für ihre Beiträge zu diesen Arbeiten. Die beiden erstgenannten Autoren haben in gleichem Maße zu diesem Artikel beigetragen.

Literatur

- [1] D. Angeli and E. D. Sontag: Monotone Control Systems. IEEE Trans. Autom. Control, 48:1684–1698, 2003.
- [2] L. Chen and K. Aihara: A model of periodic oscillation for genetic regulatory systems. IEEE Trans Circ. Syst. I, 49(10):1429–1436, 2002.
- [3] O. Cinquin and J. Demongeot: Positive and negative feedback: striking a balance between necessary antagonists. J. Theor. Biol., 216(2):229–241, May 2002.
- [4] F. J. Doyle III and J. Stelling: Systems interface biology. Journal of The Royal Society Interface, 3(10):603–616, October 2006.

- [5] *T. Eissing, F. Allgöwer, and E. Bullinger*: Robustness properties of apoptosis models with respect to parameter variations and intrinsic noise. *IEE Proc. Syst. Biol.*, 152(4):221–228, December 2005.
- [6] *T. Eissing, H. Conzelmann, E. D. Gilles, F. Allgöwer, E. Bullinger, and P. Scheurich*: Bistability analyses of a caspase activation model for receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 279(35):36892–97, August 2004.
- [7] *T. Eissing, S. Waldherr, E. Bullinger, C. Gondro, O. Sawodny, F. Allgöwer, P. Scheurich, and T. Sauter*: Sensitivity analysis of programmed cell death and implications for crosstalk phenomena during Tumor Necrosis Factor stimulation. In *Proc. IEEE Conf. Contr. Appl. (CCA)*, pages 1746–1752, 2006.
- [8] *J.-L. Gouzé*: Positive and negative circuits in dynamical systems. *J. Biol. Syst.*, 6:11–15, 1998.
- [9] *E. W. Jacobsen and G. Cedersund*: On parametric sensitivity and structural robustness of cellular functions – the oscillatory metabolism of activated neutrophils. In *Proc. of the 44th IEEE Conf. on Dec. and Control and Europ. Contr. Conf. ECC'05*, Sevilla, Spain, pages 3681–3686, 2005.
- [10] *E. Klipp, R. Herwig, A. Kowald, C. Wierling, and H. Lehrach*: *Systems Biology in Practice. Concepts, Implementation and Application*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005.
- [11] *H. Kurata, H. El-Samad, R. Iwasaki, H. Ohtake, J. C. Doyle, I. Grigorova, C. A. Gross, and M. Khammash*: Module-based analysis of robustness tradeoffs in the heat shock response system. *PLoS Comput. Biol.*, 2(7):e59, Jul 2006.
- [12] *E. R. McDonald and W. S. El-Deiry*: Suppression of caspase-8- and -10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(16):6170–6175, Apr 2004.
- [13] *M.-J. Park, F. W. Dahlquist, and F. J. Doyle III*: Simultaneous high gain and wide dynamic range in a model of bacterial chemotaxis. *Systems Biology, IET*, 1(4):222–229, 2007.
- [14] *J. R. Pomeroy, E. D. Sontag, and J. E. Ferrell*: Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nature Cell. Biol.*, 5(4):346–351, Apr 2003.
- [15] *J. Saez-Rodriguez, A. Kremling, H. Conzelmann, K. Bettenbrock, and E. D. Gilles*: Modular analysis of signal transduction networks. *IEEE Control Syst. Mag.*, 24(4):35–52, 2004.
- [16] *H. Schmidt and E. W. Jacobsen*: Identifying feedback mechanisms behind complex cell behaviour. *IEEE Control Syst. Mag.*, 24:91–102, 2004.
- [17] *E. D. Sontag*: Adaptation and regulation with signal detection implies internal model. *Syst. Contr. Lett.*, 50:119–126, 2003.
- [18] *S. Waldherr and F. Allgöwer*: A feedback approach to bifurcation analysis in biochemical networks with many parameters. In *Proc. of the 2nd Foundations of Syst. Biol. in Engin. (FOSBE)*, pages 479–484, 2007.
- [19] *S. Waldherr, T. Eissing, M. Chaves, and F. Allgöwer*: Bistability preserving model reduction in apoptosis. In *Proc. of the 10th IFAC Comp. Appl. in Biotechn.*, pages 327–332, Cancun, Mexico, 2007.
- [20] *T. M. Yi, Y. Huang, M. I. Simon, and J. Doyle*: Robust perfect adaptation in bacterial chemotaxis through integral feedback control. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(9):4649–4653, Apr 2000.

Manuskripteingang: 3. Dezember 2007.



Dipl.-Ing. Steffen Waldherr ist wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Hauptarbeitsgebiete: Systembiologie, Systemtheoretische Methoden, Nichtlineare Dynamik.

Adresse: Universität Stuttgart, Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart,
E-Mail: waldherr@ist.uni-stuttgart.de



Dipl.-Biol. Thomas Eißing ist Leitender Mitarbeiter bei Bayer Technology Services und war zuvor wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Hauptarbeitsgebiete: Systembiologie, Biologische Signaltransduktion, Physiologie-basierte Pharmakokinetik und -dynamik.

Adresse: Bayer Technology Services GmbH, PT-AS Systems Biology, Geb. E 41, 51368 Leverkusen,
E-Mail: thomas.eissing@bayertechnology.com



Prof. Dr.-Ing. Frank Allgöwer ist Leiter des Instituts für Systemtheorie und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Hauptarbeitsgebiete: Nichtlineare und robuste Regelung, Prediktive Regelung, Identifikation nichtlinearer Systeme, und Anwendung moderner System- und Regelungstheorie in unterschiedlichen Gebieten wie Verfahrenstechnik, Mechatronik, Systembiologie, Biomedizin, und Nanotechnologie.

Adresse: Universität Stuttgart, Pfaffenwaldring 9, Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik, 70569 Stuttgart,
E-Mail: allgower@ist.uni-stuttgart.de