Steuerungs- und Regeltechnik

Julia Rex

Die bakterielle Entzündungsreaktion der Leber

Modellierung und modellbasierte Analyse des Einflusses von Zytokinen auf die apoptotische Signaltransduktion

Berichte aus dem
Institut für Systemdynamik
Universität Stuttgart

isys

Die bakterielle Entzündungsreaktion der Leber

Modellierung und modellbasierte Analyse des Einflusses von Zytokinen auf die apoptotische Signaltransduktion

Von der Fakultät
Konstruktions-, Produktions- und Fahrzeugtechnik der
Universität Stuttgart

zur Erlangung der Würde eines
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

von

Julia Rex (geb. Sanwald)
geboren in Aalen

Hauptberichter:	Prof. Dr.-Ing. habil. Oliver Sawodny
Mitberichter:	Prof. em. Dr. rer. nat. Irmgard Merfort
Tag der mündlichen Prüfung:	1. Oktober 2018

Institut für Systemdynamik der Universität Stuttgart

2018

Berichte aus dem
Institut für Systemdynamik
Universität Stuttgart

Band 46

Julia Rex

Die bakterielle Entzündungsreaktion der Leber

Modellierung und modellbasierte Analyse des Einflusses von Zytokinen auf die apoptotische Signaltransduktion

D 93 (Diss. Universität Stuttgart)

Shaker Verlag
Düren 2019

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Zugl.: Stuttgart, Univ., Diss., 2018

Copyright Shaker Verlag 2019
Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6691-3
ISSN 1863-9046

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren
Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9
Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Systemdynamik der Universität Stuttgart. Die durchgeführten Untersuchungen wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des nationalen systembiologischen Kompetenznetzes „Virtuelle Leber“ finanziell unterstützt.

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet, unterstützt und so auf vielfältige Art und Weise zum erfolgreichen Abschluss der Promotion beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Oliver Sawodny für das Ermöglichen und Betreuen meiner Doktorarbeit. Herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter des Sekretariats und der Werkstatt für ihre konstante Hilfsbereitschaft. Außerdem hat Michael Ederer, der jahrelang die Systembiologie-Gruppe geleitet hat, viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für die gute Betreuung, die konstruktive Kritik und das Gegenlesen meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Projektpartnern, ohne deren experimentelle Untersuchungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, für die produktive und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere danke ich Prof. Irmgard Merfort für die Übernahme des Mitberichts.

Während meiner Zeit am Institut habe ich viele tolle Kollegen und gute Freunde kennengelernt. Vielen herzlichen Dank an alle für ihr offenes Ohr, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen kleinen und größeren Problemen des Forschungsalltags. Und nicht zuletzt möchte ich mich für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden und Erlebnisse auch außerhalb des Instituts bedanken. Vielen Dank für lustige und leckere Mittagspausen, das morgendliche Beachvolleyballspielen, die vielen Feiern & Geburtstage, Skiausfahrten, Wander-Touren, Weinproben und vieles mehr!

Mein ausdrücklicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere Justus für den bedingungslosen Rückhalt und die großartige Unterstützung.

Stuttgart, im Oktober 2018 Julia Rex

Kurzfassung

Die Leber ist ein essentielles Organ des menschlichen Körpers und nimmt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel sowie der Immunantwort ein. Lebererkrankungen haben weitreichende Folgen und stellen ein medizinisches und gesellschaftliches Problem dar, da die einzige kurative Therapieoption für das Endstadium Leberzirrhose die Organtransplantation ist. Dabei besitzt die Leber eine einzigartige Fähigkeit zur Regeneration. Einsichten in die molekularen und physiologischen Details der Pathogenese von Lebererkrankungen und die Identifikation potentieller Risikofaktoren bieten die Möglichkeit in früheren Stadien therapeutische Maßnahmen zu ergreifen.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Entzündungsprozesse den Krankheitsverlauf aktiv verschlechtern und den Übergang in einen chronischen Zustand begünstigen können, welcher meist mit verstärktem Zelltod von Leberzellen, den Hepatozyten, assoziiert ist. Das Ziel dieser Arbeit ist daher ein besseres Verständnis der Beeinflussung des programmierten Zelltods, der Apoptose, durch Entzündungsprozesse zu erlangen. Beides, sowohl die Entzündungsreaktion als auch der apoptotische Zelltod, sind essentielle Prozesse des Körpers, denen ein komplexes Signaltransduktionsnetzwerk zu Grunde liegt, welches bei fehlerhafter Regulation pathologische Effekte verursachen kann. In dieser Arbeit wird ein systembiologischer Ansatz für die Analyse der kooperierenden und konkurrierenden Signale gewählt. Die mathematische Modellierung erlaubt eine konsistente Integration von vorhandenem Wissen und neuen experimentellen Ergebnissen, um eine ganzheitliche Analyse des betrachteten biologischen Systems zu ermöglichen.

Makrophagen sind essentielle Zellen des Immunsystems, die bakterielle Infektionen erkennen und daraufhin eine Entzündungsreaktion einleiten, indem sie eine Vielzahl von Mediatoren freisetzen, welche im weiteren Verlauf der Entzündung die Hepatozyten beeinflussen. Dabei sind Makrophagen flexible und anpassungsfähige Zellen, die entsprechend den Signalen aus ihrer Umgebung ihren Phänotyp und damit ihr Funktionsspektrum anpassen. Dadurch üben sie unterschiedlichen Einfluss auf die Entzündungsreaktion aus, weshalb eine funktionelle und phänotypische Charakterisierung der Makrophagen entscheidend für ein besseres Verständnis ihrer Rolle in Krankheitsverläufen ist. Ausgehend von einer umfangreichen Literaturrecherche wird ein boolesches Modell der aktivierten Signalwege und regulierten Entzündungsmediatoren der beiden wichtigsten Makrophagen-Phänotypen, den M1- und M2-Makrophagen, aufgestellt. Die regulatorische Netzwerkstruktur wird durch verschiedene Modelliterationen in Kombination mit dynamischer Modellierung und Schätzung der Transkriptionsfaktoraktivität sowie Verifizierung durch experimentelle Daten angepasst und

verfeinert. Dadurch können biologische Hypothesen abgeleitet werden, beispielsweise wird gezeigt, dass zusätzliche regulatorische Signale im PI3K/Akt-Signalweg die Makrophagen-Polarisation beeinflussen.

Unter den Entzündungsmediatoren nehmen IL-1β und TNFα eine besondere Rolle ein, da für beide Zytokine eine Beeinflussung der Viabilität von Hepatozyten beschrieben ist. Aufgrund der Bedeutung von Fas und Fas-Ligand im Immunsystem und der Leber, steht der Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine auf die FasL-induzierte apoptotische Signaltransduktion im Fokus dieser Arbeit. Die verstärkte Induktion von Apoptose in Hepatozyten infolge Stimulation mit TNFα wurde bereits gezeigt; über IL-1β werden sowohl protektive als auch nachteilige Effekte auf die Viabilität beschrieben. Experimentell wird der zunächst widersprüchlich erscheinende Effekt beobachtet, dass Stimulation mit IL-1β, trotz erhöhter Induktion von Caspase-3-Aktivität, die Hepatozyten vor FasL-induziertem Zelltod schützt. Durch die Modellierung und die modellbasierte Analyse der involvierten Signalwege kann der zugrundeliegende Mechanismus untersucht und gezeigt werden, dass IL-1β in Hepatozyten zwei unterschiedliche Effekte induziert. Zum einen bewirkt die Stimulation mit IL-1β ein Umschalten zur Typ II Apoptose und damit eine Verstärkung der Caspase-3-Aktivierung. Zum anderen übt IL-1β protektive Effekte über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB aus, woraufhin das anti-apoptotische Protein A20 aufreguliert wird, welches die Caspase-8-Aktivierung im Apoptosesignalweg inhibiert. Entsprechend dem internen Zustand der Zelle wird so entweder Apoptose mit starker Caspase-3-Aktivierung induziert oder ein Überleben ermöglicht, weshalb im Mittel über ein heterogene Zellpopulation beide Effekte, erhöhte Caspase-3-Aktivität und erhöhte Viabilität, detektiert werden.

Abstract

The liver is an essential organ of the human body and occupies important functions in metabolic processes and the immune response. Therefore, liver diseases pose a serious threat to health and, thus, represent a major burden on health care. Liver cirrhosis, the end stage of chronic liver diseases with organ transplantation as single treatment option, is associated with high mortality. But the liver has a unique capability to regenerate. Insights into the molecular and physiological details of the pathogenesis of liver diseases and the identification of potential risk factors offer the possibility for early therapeutic interventions.

Various studies demonstrated a role of inflammatory processes in disease progression and chronification of liver diseases, whereby chronic liver diseases are often associated with increased cell death of liver cells, also called hepatocytes. The aim of this work is a deepened understanding of the influence of inflammatory mediators, released by macrophages during an inflammatory response, on apoptotic signal transduction. Both the inflammatory response as well as apoptosis are essential processes of the human body and subject to a complex network of regulatory signaling pathways, whose dysregulation can have detrimental effects. In this work, a systems biology approach is applied to analyze the underlying signal transduction network with many cooperative and competing signals. Mathematical modeling provides the means to consistently integrate existing knowledge and current experimental results to allow for a holistic analysis of the biological network under study.

Macrophages are essential cells of the immune system that recognize bacterial infections and, subsequently, initiate an inflammatory response by releasing a variety of inflammatory mediators ideally leading to the clearance of bacteria and restoration of homeostasis. But macrophages are also cells with remarkable plasticity. They integrate various signals from their microenvironment leading to context-dependent polarization into specific phenotypes owning a distinct gene expression pattern as well as secretory profile. These macrophage-derived mediators largely influence the response of the hepatocytes during infections. Depending on the phenotype and the cellular context, macrophages either deliver protective and pro-regenerative signals, but may also be responsible for aggravation of liver injury. Thus, a phenotypic and functional characterization of macrophages is crucial for a better understanding of their impact on the pathogenesis of liver diseases. A comprehensive Boolean model is developed based on an extensive literature review to describe the activated signal transduction pathways in the two main phenotypes, the M1 and M2 macrophages. A dynamic

model is additionally used to estimate the time of transcription factor activation for investigating the role of autocrine signaling. By this iterative approach, the regulatory network topology is verified, adapted and refined using gene expression data from murine bone marrow-derived macrophages. The results provide a deepened understanding of the physiological balance influencing macrophage polarization, revealing an impact of additional co-regulatory signals that are integrated in the PI3K/Akt signaling pathway for directing macrophage polarization.

Among the pro-inflammatory mediators released by macrophages, tumor necrosis factor α (TNFα) and interleukin-1β (IL-1β) are of particular importance since they are both known to influence the viability of hepatocytes. Due to the relevance of Fas and Fas ligand (FasL) in the immune system and the liver, the aim of this work is to investigate the influence of pro-inflammatory mediators on FasL-induced apoptotic cell death. Previous studies already demonstrated an increase in FasL-induced caspase-3 activation and, subsequently, apoptosis in hepatocytes treated with TNFα, whereas both pro-survival and pro-apoptotic effects are reported for IL-1β stimulation. The experimental results initially reported a seemingly contradictory scenario. Both an increase in FasL-induced caspase-3 activity as well as an increase in cell viability have been observed. The underlying mechanisms are investigated by mathematical modeling of the involved signaling pathways. The results demonstrate that IL-1β induces two distinct effects in hepatocytes. On the one hand, stimulation with IL-1β induces a switch to the type II apoptotic pathway and, thus, causes increased caspase-3 activity. On the other hand, IL-1β exerts protective effects by activating the transcription factor NFκB. This induces upregulation of the anti-apoptotic protein A20, which inhibits caspase-8 activation within the death-inducing signaling complex (DISC) that is formed following FasL stimulation. In summary, treatment with IL-1β either induces apoptosis or rescues hepatocytes from cell death depending on the internal state of the cell. Due to the largely heterogeneous cell population, both effects, increased caspase-3 activity as well as increased cell viability, can be simultaneously observed in the population measurements.

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung **1**
1.1 Physiologie der Leber . . . 2
1.2 Ziele und Gliederung der Arbeit . . . 3

2 Methoden zur Modellierung von Signaltransduktionswegen **7**
2.1 Dynamische Modellierung mit gewöhnlichen Differentialgleichungen . . . 9
2.1.1 Parameterschätzung . . . 13
2.1.2 Identifizierbarkeit . . . 14
2.1.3 Evaluation differentialgleichungsbasierter Modelle . . . 16
2.2 Boolesche Modellierung biologischer Netzwerke . . . 17
2.2.1 Darstellung boolescher Netzwerke . . . 18
2.2.2 Analyse boolescher Modelle . . . 20
2.2.3 Erweiterungen der booleschen Logik . . . 22
2.2.4 Evaluation boolescher Modelle . . . 24
2.3 Kombination von boolescher und dynamischer Modellierung . . . 25
2.3.1 Bestehende Ansätze . . . 26
2.3.2 Hybridmodell . . . 27
2.4 Zusammenfassung . . . 31

3 Einfluss des Phänotyps der Makrophagen **33**
3.1 Makrophagen – Effektorzellen des angeborenen Immunsystems . . . 34
3.2 Experimentelle Arbeiten . . . 36
3.3 Modellbildung . . . 37
3.3.1 Signalwege in M1-Makrophagen . . . 37
3.3.2 Signalwege in M2-Makrophagen . . . 40
3.3.3 Der PI3K/Akt-Signalweg in M1- & M2-Makrophagen . . . 40
3.3.4 Initiale Modellversion . . . 41
3.3.5 Besonderheiten bei der Modellbildung . . . 42
3.4 Modellanalyse & Validierung . . . 45
3.5 Dynamische Modellierung des Genexpressionsmoduls . . . 50
3.6 Vergleich mit Protein-Daten & finale Modellversion . . . 56
3.7 Diskussion . . . 58

4 Einfluss von Zytokinen auf die apoptotische Signaltransduktion 65
4.1 Apoptose – der programmierte Zelltod . . . 66
4.2 Proinflammatorische Signalwege in Hepatozyten . . . 69
4.2.1 Der TNFα-Signalweg . . . 70
4.2.2 Der IL-1β-Signalweg . . . 71
4.2.3 Der NFκB-Signalweg . . . 71
4.3 Mathematische Modellierung der Apoptosesignalwege . . . 71
4.4 Motivation und experimentelle Arbeiten . . . 73
4.4.1 Charakterisierung des IL-1β-induzierten pro-apoptotischen Effekts 75
4.4.2 Charakterisierung des IL-1β-induzierten protektiven Effekts . . 76
4.5 Modellbildung . . . 78
4.5.1 Das Fas-Ligand-Modul . . . 79
4.5.2 Das IL-1β-Modul . . . 82
4.5.3 Das NFκB-Modul . . . 85
4.5.4 Das IL-1β/FasL-Modell . . . 93
4.6 Simulation des IL-1β-induzierten Sensibilisierungseffekts . . . 94
4.7 Simulation des IL-1β-induzierten protektiven Effekts . . . 98
4.8 Einfluss von Überständen LPS-stimulierter Makrophagen . . . 102
4.9 Diskussion . . . 104

5 Zusammenfassung 111

A Experimentelle Methoden 115
A.1 Tiere und Ethik-Erklärung . . . 115
A.2 Isolierung und Kultivierung der Zellen . . . 115
A.3 Stimulation der Zellen . . . 116
A.4 Bestimmung des mRNA-Levels . . . 117
A.5 Bestimmung des Proteinlevels . . . 121
A.6 Methoden zur Bestimmung des Zelltods . . . 122

B Ergebnisse zur Charakterisierung der Makrophagen 123

C Ergebnisse zur Apoptose der Hepatozyten 127

D Makrophagen Modelle 139
D.1 Boolesches Modell der Makrophagen-Aktivierung . . . 139
D.2 Genexpressionsmodell der Makrophagen . . . 153

E Hepatozyten Modell 157
E.1 Zustände . . . 157
E.2 Parameter . . . 160
E.3 Modellgleichungen . . . 163

Abbildungsverzeichnis **169**

Tabellenverzeichnis **171**

Symbole und Notationen **173**

Literatur **179**