

Dynamische Modellierung biologischer Systeme

In dieser Dissertation wurden neuartige Methoden zur Verbesserung des gesamten wissenschaftlichen Prozesses von der Experimentplanung über molekulare Messungen bis hin zur Aufstellung und Analyse mathematischer Modelle entwickelt. Die Konzepte wurden gleichzeitig als einfach zu bedienende Computerprogramme implementiert, so dass sie auch anderen Wissenschaftlern für ihre Arbeit zur Verfügung stehen.

Die Arbeit beruht auf engen Kollaborationen mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Ursula Klingmüller, DKFZ Heidelberg, insbesondere Dr. Marcel Schilling, Dr. Peter Nickel, und Dr. Sebastian Bohl, sowie Dr. Stefan Legewie, Humboldt Universität Berlin und Clemens Kreutz und Stefan Hengl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Jens Timmer, Universität Freiburg. Sie wurde von der HepatoSys-Initiative des BMBF gefördert.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden 14 wissenschaftliche Manuskripte veröffentlicht, sechs weitere eingereicht und 20 internationale Vorträge gehalten. Die Arbeit wurde mit „summa cum laude“ bewertet.

Der Text gliedert sich in fünf Kapitel:

- **Experimentelles Design** und Machbarkeitsuntersuchung unter Berücksichtigung der konkreten Bedingungen und Messmethoden im Labor. Mit dieser Methode können die Anzahl von Versuchstieren sowie der zeitliche und finanzielle Aufwand minimiert werden, da z.B. Fragestellungen bereits in der Projektplanung ausgeschlossen werden, die beim vorhandenen Messrauschen nicht beantwortbar sind.
- Strategien zur **Reduktion systematischer Fehler** beim quantitativen Western blotting und damit effizienterer Einsatz experimenteller Ressourcen.
- Das Konzept **In Silico Labeling** zum Markieren von Spezies in einem mathematischen Modell. Auf diese Weise kann zum Beispiel bestimmt werden, wie lange ein Medikament im Körper einem Organ zur Verfügung steht und wie diese Verweildauer erhöht werden kann, um die Gesamtmenge des einzunehmenden Medikamentes zu verringern.
- Entwicklung der **Software PottersWheel** zum Erstellen dynamischer Modelle und deren Analyse im Zusammenhang mit gemessenen Daten. Die frei verfügbare Software wird von hunderten Wissenschaftlern weltweit in der Systembiologie und darüber hinaus eingesetzt.
- Modellierung und Analyse des **TGFbeta/SMAD** Signalweges, der den programmierten Zelltod einleiten und deshalb bei Fehlfunktion kanzerogen wirken kann.

Nach einer Einführung wichtiger Begriffe der molekularen Biologie und mathematischen Modellierung in Kapitel 1, wird in Kapitel 2 ein Vorgehen zum experimentellen Design vorgeschlagen, das eine Aussage trifft, ob unter Berücksichtigung der Laborbedingungen wie Meßrauschen und den technisch möglichen Stimulationsarten zwischen konkurrierenden biologischen Hypothesen unterschieden werden kann. Dazu wird ein minimaler hinreichender Satz an erforderlichen Experimenten mit dem höchsten Informationsgewinn zusammengestellt, um die betrachteten Modelle signifikant unterscheiden zu können. Hierbei ist die Schlüsselstrategie die Verwendung von Multi-Experiment-Fitting, bei dem ein Modell gleichzeitig an mehrere Experimente unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. gepulste oder kontinuierliche Stimulation, angepaßt wird.

Westernblotting ist eine weit verbreitete Technik, um die Proteinzusammensetzung einer Lösung zu bestimmen. Kombiniert mit Methoden zu Chemilumineszenz-Detektion können sogar quantitative Aussagen über die enthaltenen Proteinkonzentrationen getroffen werden. Wie jedoch in der vorliegenden Arbeit in enger Zusammenarbeit mit Dr. Marcel Schilling, DKFZ Heidelberg, gezeigt werden konnte, leidet die Datenqualität dieser Methode deutlich unter systematischen Fehlern während des Blotting-Vorgangs. Dies kann zu falschen Schlußfolgerungen über das beobachtete System führen, wenn beispielsweise während untersuchter Zeitverläufe korrelierte Fehler eine irreführende Dynamik vortäuschen. Im Kapitel 3 werden Testmessungen mit starkem Blottingfehler diskutiert und sowohl experimentelle als auch statistische Methoden vorgeschlagen, um den Einfluß solcher systematischer Fehler zu reduzieren.

Mathematische Modelle dynamischer Systeme ermöglichen es, charakteristische Eigenschaften zu berechnen, die nur schwierig experimentell bestimmt werden können. In Kapitel 4 wird ein neuer Ansatz vorgestellt, die Halbwertszeit und die Verweildauer von Molekülen in beliebig komplexen nichtlinearen Reaktionsnetzwerken zu bestimmen. Zur Untersuchung einer Substanz wird diese im mathematischen Modell markiert, um ihren Weg durch die Zelle verfolgen zu können. Zu diesem Zweck wird ein zusätzliches Set von Reaktionen aufgestellt, das ein Mehrfach-Zählen in geschlossenen Kreisläufen vermeidet, Zuflüsse ausklammert und kombinatorische Vielfachheit für Komplexbildung oder Reaktionen mit mehreren Reaktanden berücksichtigt.

Modellierer in der Systembiologie brauchen eine flexible Plattform, die ihnen erlaubt, schnell und einfach neue dynamische Modelle zu entwerfen, deren Eigenschaften zu untersuchen und an mehrere Datensätze simultan anzupassen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine umfassende Modellierungssoftware namens PottersWheel entwickelt, mit welcher die Wissenschaftler ihre Modelle wie ein Töpfer mit seiner Drehscheibe effizient formen und dynamisch anpassen können. Sie umfasst neuartige Funktionen um den Anforderungen des inversen Problems gerecht zu werden, welches die datenbasierte Modellierung nur teilweise beobachtbarer und verrauschter Systeme beinhaltet, wie z.B. zelluläre Signaltransduktionswege und

Stoffwechsel-Netzwerke. Wie in Kapitel 5 vorgestellt, wurde PottersWheel als Matlab-Toolbox mit vielen graphischen Oberflächen entwickelt. Deterministische und stochastische Optimierungsroutinen werden zum Fitten im normalen oder logarithmischen Parameterraum kombiniert, was robuste Parameterschätzung erlaubt. Dieser Ansatz ist entscheidend, um Modelle in der Systembiologie anzupassen, deren Parameter sich oft über mehrere Größenordnungen unterscheiden. Die Untersuchung des Modells umfasst statistische Tests zur Verträglichkeit von Modell und Daten, zur Unterscheidung konkurrierender Modellvorstellungen, zur Analyse der Parameteridentifizierbarkeit und zur Berechnung von Konfidenzintervallen der geschätzten Parameter. Eine umfangreiche Funktionsbibliothek steht zur Verfügung, um die Software in eigenen Matlab Code einzubinden. Viele fortgeschrittene Modellierungstechniken werden unterstützt, wie zum Beispiel die Berücksichtigung impliziter algebraischer Ungleichungen während der Parameterkalibrierung. Die Rechenleistung von PottersWheel ist stark optimiert, da zeitkritische Funktionen durch neu entwickelten oder existierenden C- und FORTRAN-Code inklusive Echtzeit-Kompilierung ersetzt wurde. Dadurch konnte die Geschwindigkeit der Parameterschätzung um bis zu 3000-fach gegenüber Matlab-eigenen Funktionen erhöht werden. Die Software steht anderen Wissenschaftlern kostenlos auf www.potterswheel.de zur Verfügung.

Der Signaltransduktionsweg von TGFbeta-Smad ist eine wichtige funktionelle Einheit im Kontext von Mitose und Zelldifferenzierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine umfassende mathematische Analyse entwickelt und in enger Zusammenarbeit mit Stefan Legewie und Peter Nickel auf mRNA- und Proteindaten angewendet, die das Protein SnoN als den wichtigsten Rückkopplungsfaktor in der Kontrolle des TGFbeta-Smad-Signalweg in primären Hepatozyten identifiziert. In Kapitel 6 wird ein mathematisches Modell aufgestellt und an mehrere quantitative Immunoblotting Datensätze angepasst. Die Modellvorhersagen wurden anhand von mit siRNA transfizierten Wildtyp- und Mutanten-Hepatozyten überprüft. Das Modell erklärt mechanistisch wie geringe Konzentrationen von SnoN in der Lage sind, eine weit größere Menge von Smad-Proteinen zu regulieren, und es bietet die Grundlage für weitere quantitative Analysen des TGFbeta-Smad-Signalwegs.