

Early gene regulation of osteogenesis in embryonic stem cells

Simon Johanning

Institut für Mathematik und Informatik der Universität Leipzig

January 11, 2016

Motivation

Kontext

- Mechanismen, die die Transformation von Stammzellen in differenzierte Zellen regulieren sind nur wenig verstanden
- Mechanismen, wie Knochenentwicklung getriggert wird ebenso Klar, dass Wachstumsfaktoren und Genregulationsnetzwerke eine Rolle spielen

Wachstumsfaktoren

- Wachstumsfaktoren Osteogenesis: BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) und TGF β 1 (*Transforming Growth Factor β 1*)
- BMP2: positiver Regulator in Osteogenese
- TGF β 1: negativer Regulator in O.; hohe Konzentration in Knochen und Knorpelgewebe
- Aber: Manche Studien sehen TGF β 1 als pro-osteogenisch, manche als kontra-osteogenisch
Spielt Schlüsselrolle in ihrer Regulation
Es gibt viele Studien, die suggerieren, dass TGF β 1 pro-osteogen ist

Wachstumsfaktoren

- Rolle von $\text{TGF}\beta 1$ in Osteogenese hängt von Zelltyp und lokaler Umgebung ab
- $\text{TGF}\beta 1$ alleine kann keine *de novo* Osteogenese initiieren
- wenig *in vitro*-Studien, die sowohl $\text{TGF}\beta 1$ als auch BMP2 untersuchen
- → Motivation für diese Studie

Gene

- Runx2 wesentliches regulatorisches Gen (Transkriptionsfaktor) in Osteoblasten
Wichtig für (down-stream) Expression vieler osteogenetischen Gene
- Bekannt, dass von BPM2 und $TGF\beta 1$ reguliert
- Ebenso von Genen Dlx5 und Msx2, welche beide von BPM2 und $TGF\beta 1$ stimuliert werden

Gene

- Dlx5 von BMP2 allein stimuliert
- Dlx5 stimuliert Runx2
- Msx2 wird oft als negativer Regulator von Runx2 gesehen (bindet an Runx2-Promoter ohne Expression zu induzieren)
Aber: Rolle nicht so klar; Manche Studien: Msx2 supprimiert, manche kein Effekt, manche pro-osteogenetisch unabhängig von Runx2

Genregulationsnetzwerke

- Signal- und Regulationsnetzwerke, die Interaktion zwischen BMP2 und TGF β 1 regeln, sind nicht bekannt
- Kandidaten für Netzwerke: Dlx5 und Msx2, da diese um Runx2-Promoter konkurrieren

Motivation mathematische Modelle

- Schwierig Unterschiede zwischen Versuchsgruppen und verschiedenen Zeiten zu analysieren
 - problematisch analytisch Beziehungen zwischen $DI \times 5$, $MS \times 2$ und $Run \times 2$
 - mathematische Modellierung der Netzwerke und Vergleich mit experimentellen Daten

Mathematische Modellierung

Boolsche Modelle

- Rigorose Repräsentation qualitativen biologischen Wissens
- Komponenten (*Spezies*) haben diskrete Zustände; oftmals binär: *An/Aus*
- Repräsentation als Graphen: Gene/Faktoren als Knoten, Kanten als Interaktionen (aktivierend/inhibierend)
- Diskrete Zeit: Zustand($t+1$) hängt von Zuständen(t) ab
- stabile steady-states: Zellphänotypen, die mit experimentellen Daten verglichen werden können
- Auch wenn grob, können BM das qualitative Verhalten biologischer Systeme recht gut reproduzieren

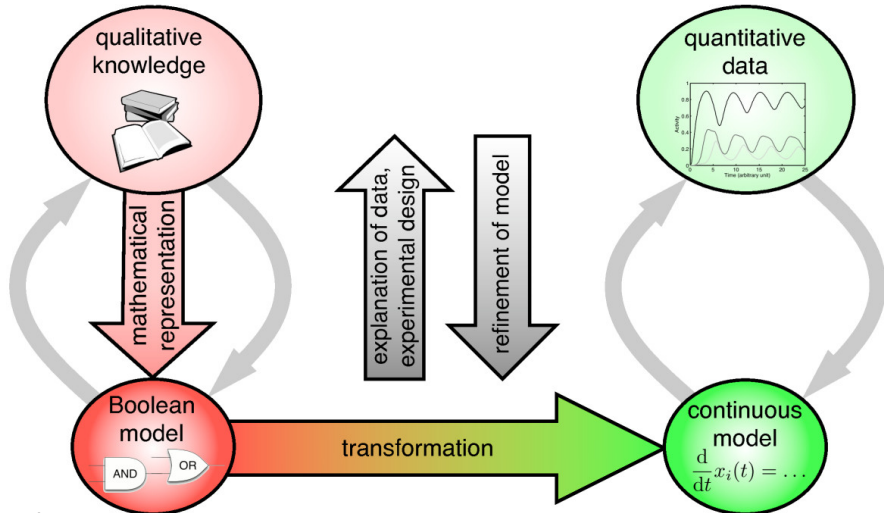
Boolsche Modelle: Beschränkungen

- Können weder kontinuierliche Konzentrationslevel noch realistische Zeitskalen abbilden
 - ⇒ Können quantitative (biologische) Experimente weder erklären noch vorhersagen (zunehmend wichtig in systems biology)
 - Übergang zu Differentialgleichungssystemen: HillCube model / odefy

odefy

- Erlauben detailliertere und quantitative Charakterisierung der Genregulationsnetzwerke
- Einfach Eingangskonzentrationen und Parameter zu modellieren
- stabile steady-states in ODEs: Zellphänotypen

odefy



Generalisierung boolsches Modell

- Phänomenologische Beschreibung von Prozessen
- Lassen oft Einflussfaktoren und Zwischenschritte aus
→ Kontinuierliche Modelle sind ebenso phnomenologisch
- Top-down Methode für Netzwerke mit inkompletten Wissen, wo kinetische Modellierung unpraktisch ist
- Kontinuierliches Modell kann Verhalten des Booleschen Modells reproduzieren, aber auch verschiedene Zeitskalen der Interaktion modellierung
→ Generalisierung des boolschen Modells (mehr dynamische Eigenschaften).

Formale Darstellung boolsches Modell

- N Spezies X_1, X_2, \dots, X_N mit $x_i \in \{0, 1\}$
- Für jede Spezies: Menge von Spezies, die x_i beeinflussen:
 $R_i := \{X_{i_1}, \dots, X_{i_2}, X_{i_N}\} \subset \{X_{i_1}, \dots, X_{i_N}\}$,
sowie eine Aktualisierungsfunktion $B_i : \{0, 1\}^{N_i} \rightarrow \{0, 1\}$ für jede
Kombination von $(x_{i_1}, \dots, x_{i_2}, x_{i_N}) \in \{0, 1\}^{N_i}$
- Betrachte B_i auf (Hyper-)Einheitswürfel: Knoten
 $(\xi_{i_1}, \dots, \xi_{i_2}, \xi_{i_N}) \in \{0, 1\}^{N_i}$ entspricht
 $(\bigwedge_{ij|\xi_{ij}=1} x_{ij}) \wedge (\bigwedge_{ij|\xi_{ij}=0} \neg x_{ij})$

Formale Darstellung boolsches Modell

- sum-of-product Repräsentation: $B(x_{i_1}, \dots, x_{i_2}, x_{i_{N_i}}) = \bigvee_{(\xi_{i_1}, \dots, \xi_{i_2}, \xi_{i_{N_i}}) | B_i(\xi_{i_1}, \dots, \xi_{i_2}, \xi_{i_{N_i}}) = 1} [(\bigwedge_{ij | \xi_{ij} = 1} x_{ij}) \wedge (\bigwedge_{ij | \xi_{ij} = 0} \neg x_{ij})]$
- Nun ersetzen von $x_i \in \{0, 1\}$ durch $\overline{x}_i \in [0, 1] \rightarrow \overline{B}_i : [0, 1]^n \rightarrow [0, 1]$: kontinuierliche homologue von B_i
- Normalisierte HillCubes:
$$\overline{B}_{n_i}^H(\overline{x}_1, \overline{x}_2, \dots, \overline{x}_n) := \overline{B}_i^I\left(\frac{f_{i_1}(\overline{x}_{i_1})}{f_{i_1}(1)}, \frac{f_{i_2}(\overline{x}_{i_2})}{f_{i_2}(2)}, \dots, \frac{f_{i_n}(\overline{x}_{i_n})}{f_{i_n}(n)}\right)$$

HillCubes

- \overline{B}_i^I : lineare Interpolation von B_i mittels multivariater polynomialer Interpolation: BooleCubes. \overline{B}_i^I affin multilinear:
 $\forall 1 \leq j \leq N_i, \overline{x}_{ik} \text{ fix} : \exists a, b \in \mathbb{R} : \overline{B}_i^I(\overline{x}_{i1}, \overline{x}_{i2}, \dots, \overline{x}_{iN_i}) = a + b\overline{x}_{ij}$
- f: Hill-Funktionen: $f(\overline{x}) = \frac{\overline{x}^n}{\overline{x}^n + k^n}$
- Sigmoidale Funktionen mit
n: Anstieg der Funktion: Kooperativität der Interaktion
k: Schwellenwert des Booleschen Modelles (Halbmaximalität von f)
- $\frac{f_{i_\ell}(\overline{x}_{i_\ell})}{f_{i_\ell}(\ell)}$: Normalisierung, sodass $f(\zeta) = 1$ erreicht wird

Eigenschaften HillCubes

- $\overline{B} := \overline{B}_{n_i}^H(\overline{x_1}, \overline{x_2}, \dots, \overline{x_n}) := \overline{B}_i^I(\frac{f_{i_1}(\overline{x_{i_1}})}{f_{i_1}(1)}, \frac{f_{i_2}(\overline{x_{i_2}})}{f_{i_2}(2)}, \dots, \frac{f_{i_n}(\overline{x_{i_n}})}{f_{i_n}(n)})$ ist perfektes Homolog von B_i
- steady-states von Booleschen Modellen übertragen sich
- HillCubes stimmen auf Knoten mit BoolCubes überein
- Haben 'schöne' analytische Eigenschaften (bspw. Stetigkeit)
- Eindeutige minimale Lösung innerhalb Funktionenklasse

Konstruktion kontinuierliches Modell

- Option 1 (zeitdiskretes Modell):

$$\bar{x}_i(t+1) = \bar{B}_i(\bar{x}_{i_1}(t), \bar{x}_{i_2}(t), \dots, \bar{x}_{i_{N_i}}(t))$$

Nachteil: Unsteitigkeit lässt analytische Methoden nicht zu

- Option 2 (zeitkontinuierliches Modell): Annahme: \bar{B}_i ist

Produktionsrate von \bar{x}_i , Abbau mit Rate \bar{x}_i :

$$\text{Differentialgleichung } \dot{\bar{x}}_i = \frac{1}{\tau_i}(\bar{B}_i(\bar{x}_{i_1}, \bar{x}_{i_2}, \dots, \bar{x}_{i_{N_i}}) - \bar{x}_i)$$

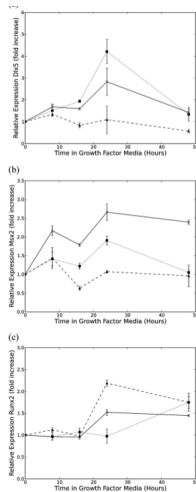
mit τ_i Lebensdauer der Spezies X_i

Modellierung paper

Versuchsaufbau

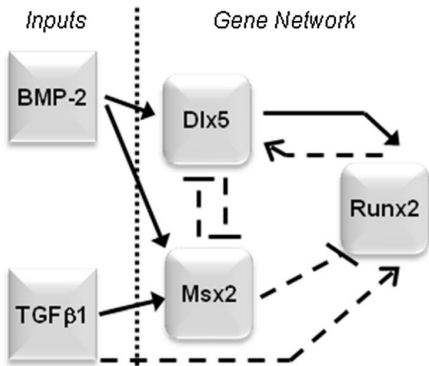
- Beobachtung von Dlx5, Msx2 und Runx2 embryonalen Stammzellen (Maus) über Zeitraum von 48 Stunden
- Kontrollkondition: Stammzellen ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren
- Dlx5: Nach 24 Stunden signifikant gesteigerte Expression mit BMP2 und BMP2/TGF β 1 (Kombination stärkerer Effekt)
- Msx2: TGF β 1 deutlich reduzierte Expression (ab 16 Stunden). BMP2: höhere Expression als TGF β 1 und BMP2/TGF β 1
- Runx2: Erhöhte Expression sowohl mit TGF β 1 als auch BMP2, aber nicht in Kombination

Resultate Experiment



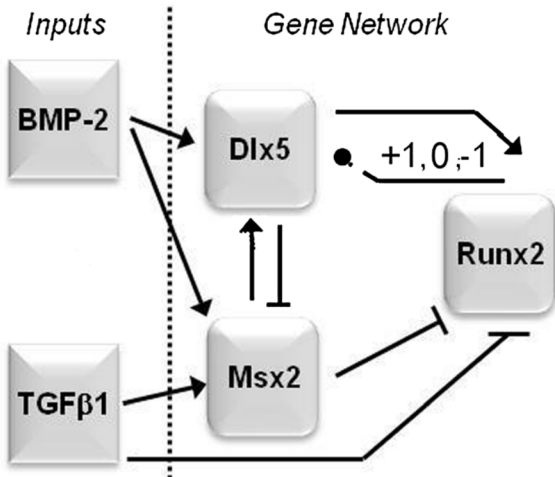
Setup mathematisches Modell

Modellierung Genregulationsnetzwerk nach bestehenden Studien :



Setup mathematisches Modell II

- Konstruktion boolescher Modelle, die konsistent mit Beobachtungen der Expressionsprofile sind ($t \in \{0, 24\}$);
An falls signifikanter Unterschied zu $t=0$, sonst *Off* (da mRNA niedrig in mES-Zellen)
- Modelle, die zu experimentellen Daten passen: Regulation von *Dlx5* durch *Runx2* unklar



Setup mathematisches Modell III

- Transformation in ODE mittels *HillCube*-Methode
- Fitten der Differentialgleichungen mittels experimenteller Daten ($t \in \{0, 8, 16, 24\}$) mittels Parameterschätzung mit *EcsPy* (Python-Modul)

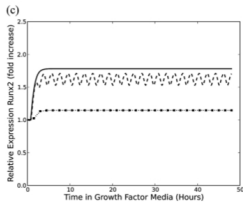
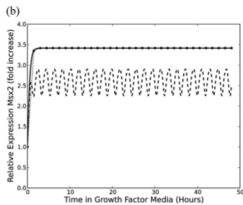
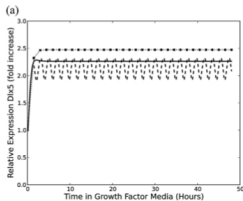
Unter- / Überexpression

- Untersuchung des Einflusses von Runx2 auf Dlx5:
Positive Regulation: Gesteigerte Expression in TGF β 1 und Kontrollmedium, verringerte Expression von Msx2 in TGF β 1
- Festhalten des Expressionslevel an 0 (Unterexpression), 1 (Überexpression):

Ergebnis

Ergebnis

- Simulationen: Boolesche Modelle ergeben oszillierende Ergebnisse in $TGF\beta 1$, wobei ODE-Modelle dies nur ergeben, wenn Runx2 Dlx5 negativ reguliert (intuitiv sinnvoll, da Oszillationen nur auftreten, wenn alle Transkriptionsfaktoren sowohl hoch- als auch heruntergeregelt werden können, und $TGF\beta 1$ sowohl als positiver wie negativer Regulator Osteogenese gesehen wird)
- Nur ein Modell zeigt mit Experiment konsistentes Verhalten
→ Alle anderen Modelle verworfen
- Modell bildet weiterhin das Verhalten der Transkriptionsfaktoren ab (Runx2 beginnt nach Dlx5 und Msx2)



Ergebnis

- Erhöhte Expression von Runx2 in BMP2-Medium wird von Veränderung in Dlx5-Expression beeinflusst
Diese wiederum wird durch erhöhte BMP2-Konzentration oder BMP2-Msx2-Mechanismus erreicht
- Erhöhte Expression von Runx2 in TGF β 1 legt nahe, dass dieses durch Msx2-Stimulation von Dlx5 bedingt ist
- Weiterhin funktioniert Dlx5 als negativer Regulator von Msx2 (und somit indirekt hemmend auf Zellproliferation)
- Verhalten im Bezug auf TGF β 1 und Einfluss von Msx2 in dieser Studie das erste Mal aufgezeigt

Kritik

Praktikumsarbeit
