

Schlussbericht

LungSys – Systembiologie von Lungenkrebs Dynamische Eigenschaften Früher Metastasierung und Therapeutische Optionen

Teilprojekte WP1, WP2 und WP4

Förderkennzeichen: 0316042C

01.02.2012 – 31.07.2015

Beteiligte Partner:

- Prof. Dr. Ursula Klingmüller
- Dr. Hauke Busch
- Dr. Melanie Boerries
- PD Dr. Kai Breuhahn
- Prof. Dr. Dr. Fabian Theis
- Prof. Dr. Michael Thomas
- Dr. Michael Meister

Projektleiter:

Prof. Dr. Benedikt Brors / Prof. Dr. Roland Eils / Prof. Dr. Dirk-Peter Herten
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 267
69120 Heidelberg
Tel.: +49 6221 423614
Fax: +49 6221 423626
E-mail: b.brors@dkfz.de

Heidelberg, 29.01.2016

Prof. Dr. Benedikt Brors/ Prof. Dr. Dirk-Peter Herten/ Dr. Stefan Kallenberger

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0316042C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor".

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Für die Entschlüsselung der zentralen Regulationsmechanismen der frühen Metastasierung der Tumorzellen und die Etablierung der quantitativen Verbindung zwischen Informationsprozessen durch Signal-Netzwerke, Induktion der Zielgene und Migration von Lungenkrebszellen sollten die Signaltransduktion von TGFbeta, HGF, IGF-1 und Epo in ausgewählten NSCLC Adenokarzinom-Zelllinien analysiert werden. Außerdem sollte die Induktion von Zielgenen und mikro-RNAs sowie die Proliferation und Migration auf Zellpopulationsebene untersucht werden. Dazu war geplant, quantitative Daten mittels quantitativem Immunoblotting, Protein-Arrays, Massenspektrometrie, qRT-PCR und NGS zu erheben und für die Etablierung detaillierter mechanistischer Signalwegsmodelle zu nutzen, die mit Genregulatorischen- und mikroRNANetzwerk-Modellen verknüpft und in Beziehung zu den zellulären Antworten gestellt werden sollten. Auf der Einzelzellebene sollten Biosensoren, SMART Sonden und fluoreszenzmarkierte Liganden und Signalkomponenten analysiert und Raum-Zeit-Modelle etabliert werden. Modell-basierte Vorhersagen über potentielle Biomarker für das migratorische Verhalten sollten im Patientenmaterial überprüft werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Projekt basiert auf Vorarbeiten aus dem Vorgängerprojekt LungSys I, in dem die Bedeutung der Signalübertragung durch Erythropoietin auf die Genese, Progression und Therapie des Lungenkrebses untersucht wurde und mathematische Modelle der Signalübertragung erstellt wurden. In diesem Projekt sollten zum einen die Arbeiten weitergeführt und zum anderen auf die Signalübertragung durch HGF, IGF, TGF beta sowie die Interaktion von Karzinomzellen mit der Mikroumgebung ausgedehnt werden. Dazu wurden exemplarisch die Lungenkrebszelllinien H838, H1650 und H1975 als Modellsysteme ausgewählt. In einem Multiskalenansatz sollten das Tumorwachstum durch Imaging-Methoden untersucht, durchs Wachstumsmodelle beschrieben und simuliert sowie die Signalvorgänge in Krebszellen und in der Interaktion zwischen Zellen studiert werden; relevante Erkenntnisse sollten an Tumorproben von Lungenkrebspatienten überprüft und ihre klinische Relevanz verstanden werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In diesem Teilprojekt wurden zum einen Messungen, insbesondere mit Methoden der Next-Generation-Sequenzierung (NGS), durch statistische Verfahren ausgewertet, um quantitative Maße über die Abundanz von Transkripten, den Mutationsstatus und den Methylierungsstatus regulatorischer Regionen zu bekommen. Diese Daten wurden verwendet, um Modelle der Signalübertragung aus zeitaufgelösten Messungen der mRNA- und Protein-Expression in Zelllinien des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) zu entwickeln. Für die Untersuchung von Signalwegen auf Einzelzellebene wurden Konstrukte etabliert, die wichtige Komponenten im Erythropoietin- oder Insulin-like-growth-factor-Signalweg mit fluoreszenten Sonden fusioniert haben; das zeitaufgelöste Verhalten dieser Proteine wurde dann zeitaufgelöst mit konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Mathematische Modelle wurden entwickelt und an die Daten angepasst, um das Verhalten von Einzelzellen nicht-kleinzelliger Lungenkrebs-Zelllinien zu beschreiben und ihre Interaktion zu verstehen.

Die Meilensteine M1.4, M1.6, M1.10 und M1.11 beschreiben wichtige Kernarbeiten dieses Teilprojekts und wurden alle erreicht, lediglich in M1.5 stehen noch Restarbeiten aus, die nachgelagert durchgeführt werden. Die Ergebnisse waren die Grundlage weiterer Modellierungsarbeiten bei anderen Projektpartnern; diese sind in den Meilensteinen M1.12, M1.13, M1.14, M2.5, M3.6, M3.8, M3.9, M3.10, M3.12 beschrieben. Der Beitrag dieses Teilprojekts zu den letztgenannten Meilensteinen wurde in allen Fällen erreicht, die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner. Meilenstein M3.7 wurde in Absprache durch andere Projektpartner bearbeitet. Die Daten wurden mit publizierten Daten aus dem Cancer

Genome Atlas Projekt (TCGA) verglichen und zur Identifizierung von Biomarkern benutzt (M3.13, M4.20).

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Aus LungSys I standen Erkenntnisse, Modellsysteme und Werkzeuge zur Untersuchung des Epo-Signalwegs zur Verfügung. Daten von Tumorproben von Lungenkrebspatienten (Expression, microRNA-Expression, z.T. Exom-Sequenzdaten) wurden über Jahre systematisch in der Thoraxklinik Heidelberg gesammelt und mit klinischen Daten der Patienten verbunden. Kurz nach Projektstart wurden darüber hinaus Exom-, Transkriptom- und Methylomdaten einer größeren Kohorte von Lungenkrebspatienten aus dem Cancer Genome Atlas Projekt (TCGA) publiziert und standen über das TCGA Data Portal zur Verfügung. Es existierte weiterhin eine umfassende Expertise der beteiligten Arbeitsgruppen in der mathematischen Modellierung von Signalwegen (z.B. bei Apoptose) und Tumorwachstum sowie in der fluoreszenzmikroskopischen zeitaufgelösten Messung von Proteinen. Dies wurde kompensiert durch Ausstattung und Expertise zur bildgestützten Verfolgung des Tumor- und Gefäßwachstums in Patienten und zur Analyse von Proteinphosphorylierung mittels Massenspektrometrie.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zu Beginn des Projekts wurde ein Konsortialvertrag abgeschlossen. Im Rahmen dieses Teilprojekts wurde intensiv mit Projektpartnern in der Thoraxklinik (Meister, Thomas), am DKFZ (Klingmüller), der Uniklinik Heidelberg (Breuhahn) sowie theoretisch arbeitenden Arbeitsgruppen an der Universität Freiburg (Busch) und dem Helmholtz-Zentrum München (Theis) zusammengearbeitet. Innerhalb des LungSys II Verbundes erfolgte die Abstimmung durch monatliche Treffen mit den Heidelberger Arbeitsgruppen sowie in halbjährlichen Gesamttreffen des Verbundes. Wesentliche Erkenntnisse wurden auf den Gesamttreffen aller CancerSys-Projekte vorgestellt.

Außerhalb des LungSys II-Konsortiums bestanden Zusammenarbeiten mit dem ICGC-Projekt PedBrain (Eils, Lichter, Pfister), dem Heidelberger Zentrum für Personalisierte Onkologie im DKFZ (DKFZ-HIPO, Eils, Ishaque, Thomas) sowie für epigenetische Fragestellungen mit der AG Plass am DKFZ.

Liste der Gesamtkonsortiumstreffen:

19. – 20.1.2012,	Thoraxklinik, Heidelberg
25. – 26.6. 2012,	Thoraxklinik, Heidelberg
9. – 10.10.2012,	Thoraxklinik, Heidelberg
18. – 19.2.2013,	Thoraxklinik, Heidelberg
8. – 9.7.2013,	Thoraxklinik, Heidelberg
7. – 8.10.2013,	Thoraxklinik, Heidelberg
3. – 4.2.2014,	Thoraxklinik, Heidelberg
3. – 4.11.2014,	Thoraxklinik, Heidelberg
2. – 23. 2.2015,	Thoraxklinik, Heidelberg
13. – 14.7.2015,	Thoraxklinik, Heidelberg

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

AG Herten

Beitrag zu WP1

M1.4 / M1.6: Lebendzelleexperimente zur Untersuchung der Erythropoetinrezeptordynamik

Zur quantitativen Untersuchung der Erythropoetinrezeptor(EpoR)-Dynamik in lebenden Zellen wurde in Zusammenarbeit mit der AG Eils eine H838-Zelllinie mit GFP-markiertem EpoR mit einem mCherry-markierten Membranmarker (MyrPalm-mCherry) ausgestattet, um in Lebendzelleexperimenten die Segmentierung unterschiedlicher EpoR-Populationen zu ermöglichen. Die EpoR-Dynamik wurde anschließend unter verschiedenen Bedingungen mit zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zur Stimulation wurde hierfür Erythropoetin eingesetzt, das wir zuvor spezifisch und unter Erhalt der Funktionalität mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 markiert hatten. Die zeitaufgelösten Daten aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wurden anschließend von Stefan Kallenberger (AG Eils) segmentiert und zur Modellierung der Epo/EpoR-Dynamik herangezogen. Die Daten werden zurzeit gemeinsam mit der AG Eils in zur Veröffentlichung vorbereitet.

M1.5 (1): Stabile Expression des IGF1R-SNAP oder IGF1R-Halo Fusionsproteins in H838 Zellen

Um ein Fusionsprotein zwischen dem IGF-1 Rezeptor und dem fluoreszent markierbaren SNAP-tag zu generieren, wurde das IGF1R Gen aus einem pEGFP-N1-IGF1R Plasmid extrahiert und in einen retroviralen pMOWS-M2-SNAP-tag Vektor kloniert. Das resultierende pMOWS-M2-IGF1R-SNAP Plasmid wurde retroviral über Spin-Infektion mithilfe der Phoenix-AMPHO Helferzelllinie in H838 Zellen eingebracht. Für die Generierung einer Kontrollzelllinie wurde ein retrovirales Plasmid kloniert, das einen induzierbaren SNAP-tag trägt (Tet-On System). Auch dieses Plasmid wurde stabil in H838 Zellen eingebracht. Die Expression und Funktionalität des IGF1R-SNAP Fusionsproteins wurde mittels Western-Blot bestätigt. Die stabile IGF1R-SNAP Zelllinie (IGF1R-S) zeigt vergleichbare Expressionslevel des endogenen IGF-1 Rezeptors und des IGF1R-SNAP Fusionskonstrukts. Sowohl der endogene IGF1R als auch das IGF1R-SNAP Fusionsprotein werden gleich stark und nur nach IGF-1 Stimulation phosphoryliert. Außerdem zeigen die Downstream-Proteine AKT und ERK1/2 in der stabilen IGF1R-S Zelllinie sowie in der Kontrollzelllinie (SNAP), die lediglich den SNAP-tag exprimiert, eine zur Wildtyp-Zelllinie vergleichbare Phosphorylierung nach IGF-1 Stimulation.

Als weitere Vergleichszelllinie wurde eine stabile H838 IGF1R-Halo Zelllinie generiert. Ausgehend vom pMOWS-M2-SNAP-tag Plasmid wurde der SNAP-tag durch einen HaloTag ersetzt und das resultierende pMOWS-M2-HaloTag Plasmid wie bereits beschrieben in H838 Zellen eingebracht.

M1.5 (2): Spezifische Markierung des IGF1R-SNAP und IGF1R-Halo Fusionsproteins in lebenden H838 Zellen

Um ein effizientes Färbeprotokoll für das IGF1R-SNAP Fusionsprotokoll zu entwickeln, wurden verschiedene SNAP-tag Substrate getestet und sowohl die Konzentration als auch die Inkubationsdauer variiert. Da das Ziel dieses Projektteils das Einzelmolekültracking des IGF-1 Rezeptors in lebenden Zellen war, waren wir auf zwei zellgängige SNAP-tag Substrate beschränkt. Das beste Signal-zu-Hintergrund Verhältnis wurde mit dem SNAP-Substrat Siliziumrhodamin-SNAP (SiRS) erreicht. Kontrollmessungen mit entsprechend gefärbten Wildtyp-Zellen zeigten jedoch, dass SiRS nicht vollständig aus der Zelle ausgewaschen werden konnte und somit unspezifisches Hintergrundsignal lieferte. Die Stärke dieses Hintergrundsignal war für das gängige SNAP-Substrat TMRStar noch größer, sodass dieses Substrat verworfen wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturhinweisen, dass SNAP-Substrate zum Teil unspezifisch zelluläre Strukturen anfärben. Im Vergleich zum

SNAP-tag zeigte der HaloTag eine spezifischere Färbung. Eine Inkubation der stabilen IGF1R-Halo Zelllinie mit dem HaloTag-Substrat HaloTMR führte zu einem Signal-zu-Hintergrund Verhältnis, das Einzelmolekültracking ermöglicht, während HaloTMR in Wildtyp-Zellen nahezu vollständig herausgewaschen werden konnte.

M1.5 / M1.6 (3): Diffusionsverhalten der IGF1R-SNAP und IGF1R-Halo Fusionsproteine in lebenden H838 Zellen

Das IGF1R-SNAP bzw. das IGF1R-Halo Fusionsprotein wurde in lebenden H838 Zellen angefärbt und seine Diffusion bei 37 °C mithilfe von Interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF) verfolgt. Die resultierenden Videos wurden mit der Trackingsoftware u-track 2.1.3 analysiert. Wir fanden zwischen den beiden Proteintagsystemen deutliche Unterschiede in der Anzahl der detektierten Trajektorien. Das IGF1R-SNAP Konstrukt lieferte weniger Trajektorien als das IGF1R-Halo Konstrukt und gleichzeitig war die Anzahl der Trajektorien, die in den Wildtyp-Zellen detektiert werden konnten, für das SNAP-Substrat deutlich höher. Dies spricht dafür, dass der SNAP-tag im Vergleich zum HaloTag weniger effizient markiert werden kann, während das SNAP-tag Substrat zusätzlich einen stärkeren unspezifischen Hintergrund hervorruft.

AG Eils/Legewie

Beitrag zu WP1, Meilensteine 1.4 und 1.6

Charakterisierung der zellulären Variabilität beim Erythropoietin-Rezeptor-Traffic auf Basis mathematischer Modellierung

Die Untersuchung der Ursachen zellulärer Variabilität ist ein wichtiges Thema im Bereich der Molekularen Systembiologie. Insbesondere werden im Kontext der Krebsforschung die Ursachen zellulärer Variabilität untersucht, um zu verstehen, wodurch nach einer erfolgten pharmakologischen Therapie ein Teil der Krebszellen überlebt oder sogar beschleunigt proliferiert. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, die Variabilität im Bereich des zellulären Erythropoietin-Rezeptor-(EpoR-)Transports quantitativ zu charakterisieren.

Zu Beginn des Förderzeitraumes wurde im Rahmen des Projekts aus der Lungen-Adenokarzinomzelllinie H838 eine Zelllinie etabliert, die GFP-gebundene EpoR (EpoR-GFP) und an mCherry gebundene Membranmarker (MyrPalm-mCherry) exprimiert. An lebenden Zellen wurden das Binden an EpoR und die Internalisierung von Cy5.5-markiertem Erythropoietin (Epo-Cy5.5) durch Konfokalmikroskopie gemessen und quantifiziert

Zu diesem Zweck wurde eine Segmentierungs-Software entwickelt, um aus den Mikroskopiedaten das Signal von Epo-Cy5.5 und EpoR-GFP in verschiedenen zellulären Kompartimenten zu extrahieren.

Der experimentelle Datensatz wurde im Förderzeitraum um Messungen aus Zellen, in denen die Aufnahme von Epo-Cy5.5 über einen Zeitraum von sechs Stunden gemessen wurde, erweitert. Außerdem wurden Datensätze von Zellen aufgenommen, in denen die Neusynthese von EpoR-GFP oder die Degradation von EpoR quantifiziert werden konnte. Zur Beobachtung der Neusynthese wurde zunächst das gesamte Signal von EpoR-GFP durch Bleichen mit Hilfe eines Lasers entfernt, um neu entstandene EpoR-GFP anhand des Signalanstieges nach dem Bleichen quantifizieren zu können. Zur selektiven Messung der Degradation wurde mit Hilfe von Cycloheximid die Neusynthese blockiert und danach das Epo-GFP-Signal extrahiert. Mit Hilfe der Segmentierungs-Software wurde in verschiedenen Kompartimenten (Bereich der Plasmamembran, EpoR-GFP-Vesikel, Epo-Cy5.5-positive EpoR-Vesikel, residuelles Plasmavolumen) die Fluoreszenzintensität von EpoR-GFP und Epo-Cy5.5 für jeden Zeitpunkt der Experimente quantifiziert. Insgesamt ergaben sich so Datensätze für über 40 Zellen mit insgesamt etwa 2000 Messungen.

Mathematische Modelle wurden weiterentwickelt, um Prozesse in einzelnen Zellen zu beschreiben: die Synthese und Degradation von EpoR, Austausch zwischen Plasmamembran und Zytosol, Internalisierung und Recycling von Epo-gebundenen EpoR. Beim Fitting der Daten aus den verschiedenen Einzelzellexperimenten wurde die selbstentwickelte

Vorgehensweise bei der Beschreibung von Variabilität in zellulären Ensemble-Modellen weiterentwickelt (publiziert in Kallenberger et al., Science Signaling 2014).

Durch die Zunahme der Menge an Einzelzellendaten wurden die Konvergenzeigenschaften des Modells verschlechtert. Dadurch wurden umfassendere Model-Fittings über eine längere Zeit auf Rechner-Clustern bis zum Erreichen der Konvergenz verschiedener Modellvarianten erforderlich. In der letzten Zeit beschäftigten sich die Beteiligten mit dem Abschluss des Projekts und dem Verfassen einer gemeinsamen Publikation.

Die Ergebnisse der Kombination aus Einzelzellexperimenten und mathematischer Modellierung kann in folgenden Aussagen zusammengefasst werden: Die internalisierte Menge von Epo korrelierte mit der Gesamtzahl von EpoR, nicht aber mit dem Anteil der Rezeptoren an der Plasmamembran oder der zellulären Konzentration von Epo-Rezeptoren. Zelluläre Ensemble-Modelle konnten erfolgreich verwendet werden, um zwischen kinetisch relevanten und irrelevanten intrazellulären EpoR-Transportprozessen zu unterscheiden und somit ein minimales essenzielles Modell zu erhalten. Ein grundlegendes Ergebnis war dabei, dass Verhalten einzelner Zellen mit einem Modell charakterisiert werden konnte, das einem auf Basis von Populationsmittelwerten etabliert Modell sehr ähnlich ist (Becker et al., Science 2010). Hierbei unterscheidet sich die Dynamik des EpoR-Systems von anderen Signaltransduktionssystemen, bei denen das Verhalten einzelner Zellen vom Verlauf der Populationsmittelwerte deutlich abweicht. Die beobachteten EpoR-Flüsse bei den im Modell beschriebenen Transportreaktionen bestätigten das auch schon zuvor beschriebene Vorliegen eines sehr schnellen Austauschs von EpoR zwischen der Plasmamembran und dem Zytosol und eine bedeutsame Rolle des Rezeptor-Recyclings für die Dynamik des Systems. Es konnte beobachtet werden, dass die zelluläre Variabilität in den beschriebenen Prozessen der Synthese, Degradation, des Transports und Recyclings mit Variationskoeffizienten um 0,5 in etwa gleich verteilt war. Insgesamt konnte in Bezug auf die zelluläre Variabilität der internalisierten Epo-Menge und der Menge an EpoR-Recycling Schwankungen um einen Faktor von etwa 10 zwischen den am wenigsten und den am meisten aktiven Zellen beobachtet werden. Aus einer Sensitivitätsanalyse des Modells konnte geschlossen werden, dass die Variabilität bei der EpoR-Internalisierung und dem EpoR-Recycling die größte Auswirkung auf die Variabilität zwischen Zellen hatten.

AG Eils/Brors

Im Rahmen dieses Projekts wurde die Mutationslandschaft sowie das Transkriptom und Methylohm der drei Lungenkrebslinien charakterisiert, die in LungSys II paradigmatisch verwendet wurden (H838, H1650, H1975). Hier bestand ein Problem darin, dass es zu diesen Zelllinien – im Gegensatz zu Tumorproben in der Krebsgenomsequenzierung – keine Kontrolle mit nicht-malignem Normalgewebe gibt, so dass Abweichungen vom Referenzgenom nicht klar als somatische Varianten bestimmt werden können. Hier haben wir ein neues Verfahren etabliert, das durch Filterung der Treffer gegen Datenbanken mit bekannten Polymorphismen gute Kandidaten für somatische Mutationen liefert. Dieses Verfahren haben wir an Gesamtexom-Daten von Tumorproben und Normalkontrollen von NSCLC getestet und erreichen für die somatischen Varianten eine Sensitivität von 95%. Im Mittel werden ca. 280 somatische Einzelnukleotidvarianten pro Zelllinie beobachtet, die im exonischen Bereich liegen und nicht-synonym sind. Bekannte Mutationen in den Genen EGFR, PIK3CA, TP53, CDKN2A, PTEN und KRAS konnten verifiziert werden.

In einer Clusterung von Krebstypen aus TCGA anhand der signifikant mutierten Gene werden die Lungenkrebszelllinien zusammen mit Lungen-Adenokarzinomen, Lungen-Plattenepithelkarzinomen und Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen gruppiert, die alle eine ähnliche Genese haben (Abb. 3). Die Clusterung von Lungenadenokarzinom- und Lungenplattenepithelkarzinom-Zelllinien aus TCGA anhand der mit den LungSys-Zelllinien überlappenden Mutationen ergab die erwartete Zuordnung zu den beiden Subtypen (Abb. 4).

Weiterhin wurden Kopienzahlaberrationen in den Zelllinien detektiert, die gut mit Daten aus Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung korrelierten. Der auffälligste Befund war hier eine 5-fache Amplifikation eines Chromosomenabschnitts, der das Gen KRAS einschloss (in H838).

Aus RNA-seq Daten der Zelllinien konnten quantitative Genexpressionsmaße bestimmt und zwischen den Zelllinien verglichen werden. Die beobachtete Amplifikation von KRAS äußerte

sich dementsprechend in einer korrespondierenden erhöhten Expression. Ebenso konnten Anzeichen autokriner Stimulation gefunden werden, insbesondere im TGF-beta-Signalweg. Die Expressionsdaten wurden in der Datenbank Lungsys-SEEK für alle Proejktpartner bereitgestellt.

Ebenso haben wir die DNA-Methylierung in den drei Zelllinien untersucht. Dazu standen Daten aus Methyl-CpG-Immünpräzipitation mit anschließender Sequenzierung zur Verfügung (MCIp-Seq). Hier haben wir zunächst Algorithmen für die Normalisierung entwickelt und anschließend differentiell methylierte Bereiche anhand heuristischer Kriterien bestimmt. Die weitere Analyse konzentrierte sich auf Promoter-Regionen, die als 2 kb upstream Regionen der in GENCODE annotierten Transkriptionsstartstellen definiert wurden. Dieselben Analysen wurden auch zum Vergleich an Methylierungsdaten von 464 Lungenadenokarzinomen aus TCGA durchgeführt. So konnten Korrelationsstudien von Methylierung und Expression ausgeführt werden, die eine große Fallzahl benötigen, um aussagekräftig zu sein. Hier wurde insbesondere der Promoter von MET als durch Methylierung reguliert identifiziert, wobei ein upstream gelegener alternativer Promoter in manchen der Zelllinien aktiv zu sein scheint.

Auch diese Ergebnisse wurden via LungSys-SEEK bereitgestellt. Mit den Ergebnissen unterstützten wir die Modellierungsansätze der anderen Teilprojekte durch Informationen über die konstitutionelle Situation der untersuchten Signalwege in H838, H1650 und H1975.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit den Meilensteinen 1.4 und 1.6

Aktuell arbeiten die beteiligten Arbeitsgruppen AG Eils und AG Herten an der Fertigstellung einer Publikation über die Modellierung intrazellulärer Transportprozesse des Epo-Rezeptors und von internalisiertem Erythropoietin (Kallenberger/Unger et al.). Im Kontext der Arbeiten am Epo-Projekt konnten Methoden entwickelt werden, die auch in einer anderen Publikation angewandt wurden (Kallenberger et al., 2014).

Kallenberger SM*, Unger AL*, Lympelopoulos K, Klingmueller U, Eils R, Herten DP. Cellular variability in erythropoietin receptor traffic. *In Preparation*
*equal contribution

Kallenberger SM, Beaudouin J, Claus J, Fischer C, Sorger PK, Legewie S, et al. Intra- and Interdimeric Caspase-8 Self-Cleavage Controls Strength and Timing of CD95-Induced Apoptosis. *Sci Signal*. 2014;7: ra23. doi:10.1126/scisignal.2004738

Gegenüberstellung von Projektzielen und Ergebnissen (nach Meilensteinen)

Meilenstein	Arbeiten	Status
M1.4: Dynamische Modellierung TGFbeta, HGF und Epo Signaltransduktion in NSCLC Zellpopulation	Zum Arbeitsbereich der AG Eils gehörte die Arbeit an der dynamischen Modellierung intrazellulärer Prozesse Transportprozesse des Epo-Rezeptors und von internalisiertem Erythropoietin in Kooperation mit der AG Herten. Die Arbeiten im Rahmen des Meilensteins sind abgeschlossen, aktuell ist ein Manuskript in Vorbereitung.	abgeschlossen
M1.5: Zeitaufgelöste Messungen IGF-1R Internalisierung	Die dynamische Modellierung der EpoR-Dynamik erforderte zusätzliche experimentelle Daten, die wir in Kooperation mit der AG Eils durch zeitaufgelöste Messungen an der modifizierten H838-Zelllinie erhalten konnten. Die zeitaufgelösten Messungen am IGF-Rezeptor erforderten zunächst die Etablierung einer Zelllinie mit markiertem IGF-1R, die aufgrund der Arbeiten an EpoR und Schwierigkeiten bei der Klonierung mit zeitlicher Verzögerung erhalten wurde. Inzwischen konnte die Zelllinie ebenso wie ein Markierungsprotokoll erarbeitet werden, die Messung der Dynamik von IGF-1R in lebenden Zellen erlaubt. Die Lebendzell-experimente zur IGF-1R Internalisierung konnten in der Laufzeit von LungSys II aber nicht fertig gestellt werden.	teilweise abgeschlossen
M1.6: Dynamik der Ligand-Rezeptor Interaktion, Rezeptorinternalisierung und Einfluss von Effektormolekülen in lebenden Zellen	Gemeinsam mit der AG Herten wurde, basierend auf H838 Zellen eine Zelllinie generiert, die stabil EpoR-GFP und einen fluoreszierenden Membranmarker exprimiert (MyrPalm-mCherry). Gemeinsam mit der AG Herten wurden konfokalmikroskopische Experimente u. a. zur Internalisierung von Epo-Cy5.5 durchgeführt, eine Segmentierungssoftware zur Auswertung der experimentellen Bilddaten programmiert, kinetische Modelle entwickelt und mittels Modellselektion anhand der experimentellen Daten eine optimale Modellvariante bestimmt.	abgeschlossen
M1.10: Etablierung, Parametrisierung und Validierung der Modelle für Zellzykluskontrolle durch Wachstumsfaktoren	Wir haben die Expression sowie den Mutationsstatus von Schlüsselfaktoren der Zellzykluskontrolle durch Wachstumsfaktoren im Grundzustand der drei in LungSys II verwendeten Zelllinien charakterisiert.	abgeschlossen
M1.11: Dynamik der TGFbeta- und HGF-induzierten Genexpression und mikroRNA Induktion in	Methoden für die Analyse von RNA-seq und microRNA-seq Daten im Kontext dieses Meilensteins wurden erarbeitet; die weitere Anwendung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen

NSCLCs		
M1.12: Integratives mathematisches Modell der TGFbeta und HGF abhängigen Signaltransduktion, mikroRNA Regulation und Genexpression	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M1.13: Mathematisches Modell der Dynamik der zellulären Signaltransduktion mit Gewebe-Kontext	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M1.14: Analyse von Crosstalk-Effekten bei Modell-Integration	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M2.5: Genexpression-Dynamiken bei TGFbeta und HGF abhängiger Signaltransduktion mittels NGSseq und statistische Modellierung und Korrelation mit mikroRNA Profilen in NSCLC	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.6: Faktor-induzierte Gennetzwerke und mikroRNAs in der Tumor-Stroma-Interaktion	Wir haben wichtige Faktoren für die Tumor-Stroma-Interaktion in den verwendeten LungSys II Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression, ihres Mutationsstatus und der Methylierung regulatorischer Bereiche charakterisiert. Die weitere Bearbeitung des Meilensteins erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.7: Computergestützte Vorhersage von Transkriptionsfaktor-bindestellen und Integration in genregulatorische Modelle	Nach Absprache mit den anderen beteiligten Arbeitsgruppen erfolgte die Bearbeitung durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.8: Integratives Modell der Signaltransduktion und Genexpression in Ko-Kultur mit Endothelzellen	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.9: Modelle des Cross-Talks zwischen relevanten Signalwegen in NSCLC Zellen in Ko-Kultur	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch	abgeschlossen

	Projektpartner.	
M3.10: Methode und Anwendung von Modellintegration auf verschiedenen Zeitskalen	Nach Absprache mit den anderen beteiligten Arbeitsgruppen erfolgte die Bearbeitung durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.12: Übertragung der Modelle auf klinisch relevante Ko-Kulturen	Der Beitrag bestand in der Verfügbarmachung von Genexpressionsdaten im Grundzustand (M1.10) sowie von Methoden (M1.11). Die weitere Bearbeitung erfolgte durch Projektpartner.	abgeschlossen
M3.13: Identifikation Biomarker in Patientenmaterial	Die erhobenen Daten aus M1.10 und M1.11 wurden mit Daten aus dem Cancer Genome Atlas Projekt verglichen und zur Ableitung von Biomarkern benutzt.	abgeschlossen
M4.20: Identifikation Biomarker in Patientenmaterial	Die erhobenen Daten aus M1.10 und M1.11 wurden mit Daten aus dem Cancer Genome Atlas Projekt verglichen und zur Ableitung von Biomarkern benutzt.	abgeschlossen

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Den beteiligten Arbeitsgruppen, Eils/Legewie, Eils/Brors und Hertens, stand von 1.2.2012 bis 31.1.2015 jeweils eine Doktorandenstelle (50% TV-L E13) zur Verfügung. Da diese Stellen nicht durchgängig besetzt werden konnten, wurden verbleibende Restmittel nach Genehmigung durch den Projektträger eingesetzt, um verbleibende Arbeiten in einer Phase kostenneutraler Verlängerung bis zum 31.7.2015 abzuschließen.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die in diesem Teilprojekt geleisteten Arbeiten waren notwendig, um Signalübertragung in Lungenkrebszelllinien zu verstehen (Eils/Legewie, Hertens) und Grundlagen für die Modellierung von Signalwegen in anderen Teilprojekten zu legen, indem Mutationen, relative Expression und Methylierung in den zur Modellierung und für experimentellen Studien verwendeten Lungenkrebszelllinien bestimmt wurden. Die Aktivierung oder auch Inaktivierung wichtiger Signalwege bei der Steuerung der Zellwachstums stellt eine bedeutende Randbedingung in der Modellierung von Signalwegen dar, darüber hinaus lassen sich umgekehrt Hypothesen an den gewonnenen Daten leicht überprüfen. Die Arbeiten tragen damit zum Gesamtergebnis von LungSys II bei, aus dem ein verbessertes Verständnis der Signalübertragung wichtiger Wege der Zellzyklus- und Zellwachstumskontrolle resultiert. Dieses wird in Zukunft helfen, Therapieresistenz besser zu verstehen und neue Angriffspunkte für zielgerichtete Medikamente bei Lungenkrebs zu definieren.

4. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit des Ergebnisses

Die in diesem Projekt erzielten Ergebnisse lassen sich nicht unmittelbar wirtschaftlich verwerten, da sie zwar die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien liefern könnten, aber noch kein vielversprechendes Target identifiziert und anschließend validiert werden konnte. Die entwickelten Verfahren und Werkzeuge stehen in Konkurrenz zu anderen, frei verfügbaren Tools und werden sich nicht einfach wirtschaftlich verwerten lassen.

Dem gegenüber sind diese Ergebnisse von hohem wissenschaftlichen Wert und stellen wichtige Ressourcen für zukünftige Forschungsprojekte dar. Die umfassende molekulare Charakterisierung der Zelllinien, z.B., ist für alle Projekte relevant, die diese als Modellsysteme für zellbiologische Untersuchungen oder in der Systembiologie benutzen. Wir werden diese Daten öffentlich verfügbar machen und in einer begleitenden Publikation beschreiben, so dass die Ergebnisse auch für andere Gruppen nutzbar gemacht werden. Die Anschlussfähigkeit ist ebenfalls gegeben, da Modelle und Daten konsistent in der projekteigenen Plattform LungSys-SEEK gespeichert und damit leicht für zukünftige Forschungsfragestellungen verfügbar sind.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Berichtszeitraum wurden mehrere Arbeiten zur genetischen Landschaft bei verschiedenen Formen des nichtkleinzelligen und kleinzelligen Lungenkrebses publiziert (Imielinski et al. Cell 2012; Govindan et al. Cell 2012; Seo et al. Genome Biol 2012; Cancer Genome Atlas Network Nature 2012; Pfeifer et al. Nat Genet 2012; Fernández-Cuesta et al. Genome Biol 2015; George et al. Nature 2015). Ebenso etablieren sich im Berichtszeitraum molekulare Konzepte, um fortgeschrittene Lungenkarzinome mit verschiedenen Inhibitoren zu behandeln (Buettner et al. J Clin Oncol 2013). Diese Arbeiten komplementieren sehr gut die hier geleisteten Beiträge zum mechanistischen Verständnis dieser Signalwege, insbesondere ihres dynamischen Verhaltens, und erlauben dessen Übertragung von Modellsystemen auf klinische Fragestellungen.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Kallenberger SM*, Unger AL*, Lymperopoulos K, Klingmueller U, Eils R, Hertens DP. Cellular variability in erythropoietin receptor traffic. *In Preparation*.

*equal contribution

Kallenberger SM, Beaudouin J, Claus J, Fischer C, Sorger PK, Legewie S, et al. Intra- and Interdimeric Caspase-8 Self-Cleavage Controls Strength and Timing of CD95-Induced Apoptosis. *Sci Signal*. 2014;7: ra23. doi:10.1126/scisignal.2004738