

Schlussbericht

E:Bio – Modul I

**Verbundprojekt ImmunoQuant – Multiskalenmodellierung der angeborenen
Immunabwehr gegen virale Infektionen**

Teilprojekt S

FKZ 0316170E

Technische Universität Dresden

Prof. Dr. Lars Kaderali

I. Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Die frühe Immunantwort auf virale Infektionen wird durch Typ-I-Interferone vermittelt. Pathogene Viren hemmen diese Immunabwehr und verursachen schwere akute oder chronische Infektionen. Der ImmunoQuant-Verbund entwickelt einen systembiologischen Ansatz um den Wettlauf zwischen Infektion und Immunabwehr quantitativ zu charakterisieren. Ziel ist, die Auswirkung von pro- und antiviralen Prozessen auf die Dynamik der Virusausbreitung und Immunabwehr zu erfassen und in mathematischen Modellen abzubilden. Mittels Modellanalysen können dann antivirale Strategien *in silico* untersucht und optimiert werden.

Das vorliegende Teilprojekt war an vier Arbeitspaketen im ImmunoQuant-Verbund beteiligt. Zentrales Ziel dabei war es, die Dynamik der angeborenen Immunantwort und deren Zusammenspiel mit viraler Replikation des Hepatitis-C Virus zu untersuchen und mathematisch zu modellieren. Im Einzelnen wurden dabei die folgenden Teilziele verfolgt:

1. Kinetische Charakterisierung und mathematische Modellierung des Rig-I / Mda5 Signalweges
2. Untersuchung der viralen Replikation und Kopplung eines Modells der intrazellulären HCV Replikation mit der angeborenen Immunantwort auf intrazellulärer Ebene.
3. Analyse der HCV-Restriktionsfaktorkinetik, und
4. Untersuchung der spatiotemporalen Dynamik der Infektion und Interferon-Antwort, insbesondere Entwicklung eines Multi-Skalen-Modells der HCV-Replikation und Immunantwort auf Zellpopulationsebene.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Vor Projektstart gab es bereits eine erfolgreiche und intensive Kooperation im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projektes „SysPatho – New Algorithms for Host-Pathogen Systems Biology“; hier insbesondere mit den Arbeitsgruppen von Ralf Bartenschlager und Marco Binder, Universität Heidelberg / dkfz Heidelberg. Im Rahmen von SysPatho wurden mathematische Modelle des Hepatitis-C-Virus Lebenszyklus entwickelt, auf die in ImmunoQuant unmittelbar aufgebaut werden konnte. Darüber hinaus konnten die Antragsteller auf gemeinsame Vorarbeiten im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes „ViroQuant“ aufbauen, in dem es insbesondere mit der Abteilung von Ralf Bartenschlager (Uni Heidelberg) und Holger Erfle (BioQuant) eine enge Zusammenarbeit zur Bioinformatik-Auswertung von infektiologischen RNAi-Screening-Daten gab. Entsprechende Datenauswertungspipelines wurden in ImmunoQuant weiterentwickelt und angewendet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

In dem vorliegenden Vorhaben wurde das Arbeitspaket 1 „Kinetische Charakterisierung und mathematische Modellierung des RIG-I/Mda5 Signalweges“, das Arbeitspaket 2 „Virale Replikation“, das Arbeitspaket 4 „Analyse der HCV-Restriktionsfaktorkinetik“ und das Arbeitspaket 8 „Spatiotemporale Dynamik der Infektion und Immunantwort“ bearbeitet.

Für das Erreichen der genannten Ziele dieser Arbeitspakete wurden im Rahmen des Vorhabens folgende Meilensteine/Aufgaben bearbeitet:

Arbeitspaket 1, Meilenstein 1 (Monat 24): „Mathematische Modellierung des RIG-I/Mda-5 Signaltransduktionsweges“, Arbeiten abgeschlossen.

Arbeitspaket 1, Meilenstein 2 (Monat 36): „Statistische und Bioinformatik-Analyse des RNAi-Screens für neue Signaltransduzierer und regulatorische Gene“, Arbeiten abgeschlossen.

Arbeitspaket 2, Meilenstein 3 (Monat 30): „Integriertes Modell der intrazellulären HCV Replikation und Immunantwort“, Arbeiten abgeschlossen.

Arbeitspaket 3, Meilenstein 4 (Monat 36): „Analyse der HCV-Restriktionsfaktorkinetik“, Arbeiten abgeschlossen.

Arbeitspaket 8, Meilenstein 5 (Monat 36): „Multi-Skalen Modell der HCV Replikation und Immunantwort“, Arbeiten abgeschlossen.

Zum Projektstart konnte eine der beantragten Doktorandenstellen nicht unmittelbar besetzt werden, die dadurch entstehende Verzögerung im Projektfortschritt konnte in der Folge durch Doppelbesetzungen (Antrag an den Projektträger Jülich vom 2.3.2015) wieder aufgeholt werden. Insgesamt konnte trotz Abweichungen durch Anpassungen am Arbeitsablauf das Projekt erfolgreich durchgeführt werden.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Beantragung des Projekts erfolgte Aufbauend auf Vorarbeiten, die im Rahmen des von der Europäischen Union im 7. Rahmenprogramm geförderten internationalen Verbundprojektes „SysPatho – New Algorithms for Host-Pathogen Systems Biology“ erzielt wurden. Darüber hinaus haben einige der Projektpartner im Rahmen des vom BMBF geförderten Projektes ViroQuant kooperiert.

SysPatho hatte die Entwicklung von Computeralgorithmen zur systembiologischen Untersuchung von Virus-Wirts-Interaktionen im Fokus, an diesem Projekt waren neben der Arbeitsgruppe Kaderali insbesondere die Abteilungen von Ralf Bartenschlager (Uni Heidelberg) und Marco Binder (dkfz Heidelberg) beteiligt. Im Rahmen von SysPatho wurde ein Modell der intrazellulären viralen Replikation des Hepatitis C Virus weiterentwickelt (Binder et al., PLoS Pathogens, 2013), auf das unmittelbar in Arbeitspaket 2 aufgebaut werden konnte. Darüber hinaus wurden in SysPatho methodische Pipelines z.B. zur Parameterschätzung und Identifizierbarkeitsanalyse etabliert, die in ImmunoQuant weitergenutzt werden konnten.

Im Rahmen von ViroQuant gab es enge Kooperationen zwischen der AG Kaderali mit den Arbeitsgruppen von Ralf Bartenschlager und Holger Erfle zur Analyse von viralen RNAi-Screening Experimenten. Insbesondere konnte die in ViroQuant entwickelte methodische Pipeline zur Analyse von RNAi-Daten (Rieber et al., Bioinformatics, 2009) in Arbeitspaket 1 von ImmunoQuant für die Analyse des dortigen RNAi-Screens angepasst und verwendet werden.

Eine regelmäßige Literaturrecherche erfolgte über die Datenbanken „PubMed“ und „Scopus“.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Konsortiums „ImmunoQuant“ erfolgte eine enge Zusammenarbeit mit den übrigen Projektpartnern. Insbesondere mit den Gruppen von Marco Binder (Meilenstein 1 bis 3), Holger Erfle (Meilenstein 2) und Ralf Bartenschlager (Meilenstein 4) erfolgte ein enger und regelmäßiger Austausch. Im Rahmen von Meilenstein 5 erfolgte eine regelmäßige Abstimmung mit der Arbeitsgruppe von Thomas Höfer.

Während der Projektlaufzeit erfolgte eine intensive Zusammenarbeit zwischen den Verbundpartnern. Während jährlicher Projekttreffen in Heidelberg wurden die erzielten Ergebnisse und der weitere Fortgang des Projektes diskutiert und abgestimmt. Darüber hinaus erfolgten regelmäßige elektronische Datenabgleiche der erzielten Ergebnisse und Telefonkonferenzen. In mehreren persönlichen Treffen in Heidelberg und regelmäßigen Video- und Telefonkonferenzen erfolgte eine sehr enge Abstimmung, mit den unmittelbaren Partnern in einzelnen Arbeitspaketen zum Teil auf wöchentlicher Basis.

Auf folgenden Konferenzreisen wurde ein intensiver Austausch über die Projektergebnisse mit der Wissenschaftscommunity geführt:

August 2013: International Conference on Systems Biology (ICSB), Kopenhagen, DK (Vortrag)

Januar 2014: Workshop Computational Science and Engineering (CompSE), Aachen (eingeladener Vortrag)

Juni 2014: European Conference on Mathematical and Theoretical Biology (ECMTB), Göteborg, SE (Vortrag)

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen

Meilenstein 1: „Mathematisches Modell des Rig-I/Mda-5 Signaltransduktionspfades“

(i) Welches Ziel wurde ursprünglich verfolgt?

In diesem Meilenstein sollte basierend auf den bei den Verbundpartnern in Task 1.2 und 1.3 erhobenen kinetischen Daten ein mathematisches Modell des Rig-I/Mda5 Signaltransduktionsweges erstellt werden. Im ersten Jahr des Förderzeitraumes sollte zunächst die Aktivierung des Rig-I/Mda5 Signaltransduktionspfades durch Bindung von Rig-I an virale RNA modelliert werden. Dieser Schritt ist der erste wichtige Schritt der Pathogen-Detektion und ist Basis für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort. Basierend auf publizierten Daten aus der Literatur sollte ein Basismodell der Aktivierung unter Verwendung von gewöhnlichen Differentialgleichungen erstellt werden. Anschließend sollte das Modell anhand von im Projekt neu erhobenen Daten der experimentellen Verbundpartner (insbesondere der Arbeitsgruppe Binder, Task 1.2) ergänzt und erweitert werden. Hiernach sollte das mathematische Modell sukzessive um die weiteren Schritte der Signaltransduktion bis zur Aktivierung der Interferon-Antwort ergänzt werden, wobei Daten aus Task 1.3 und 1.4 verwendet werden sollten. Meilenstein 1 sollte zum Ende des zweiten Jahres abgeschlossen und der vollständige Signaltransduktionspfad modelliert sein.

(ii) Welches relevante Ergebnisse wurden bei der Bearbeitung des Ziels erreicht?

Die Arbeiten zu diesem Meilenstein wurden gemäß Vorhabenbeschreibung mit Projektstart begonnen. Nach einer kurzen Einarbeitungsphase des Mitarbeiters wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Marco Binder (dkfz Heidelberg) ein erstes schematisches Modell der Bindung von Rig-I an virale RNA erstellt. Hierbei wurde insbesondere auf publizierte Daten aus der Literatur zurückgegriffen, die die RNA-konzentrationsabhängige und RNA-längenabhängige Aktivierung von Rig-I zeigen. Verschiedene mögliche Mechanismen der Bindungsreaktion wurden ausführlich mit der AG Binder diskutiert und verschiedene alternative Hypothesen in Differentialgleichungsmodelle übersetzt. Folgende Hypothesen wurden dabei durch Modelle untersucht:

1. Unabhängige Bindung der RIG-I Moleküle an die virale RNA. RNA-längenabhängige Aktivierung entsteht durch das unabhängige Binden von mehr Rig-I Molekülen an längeren RNA-Strängen, konzentrationsabhängige Aktivierung entsteht durch höhere Reaktionswahrscheinlichkeit bei höherer Molekülzahl. Es wurde angenommen, dass RIG-I an

beliebiger Stelle auf den RNA-Molekülen binden kann, und dass die einzelnen Bindereaktionen unabhängig voneinander stattfinden.

2. Sequentielle Bindung der RIG-I Moleküle an die virale RNA. RNA-längenabhängige Aktivierung entsteht durch das Binden von mehr RIG-I Molekülen an längeren RNA-Strängen, konzentrationsabhängige Aktivierung entsteht durch höhere Reaktionswahrscheinlichkeit bei höherer Molekülzahl. Es wurde angenommen, dass RIG-I das RNA-Molekül sequentiell besetzt, wobei am 5'-triphosphorylierten Ende begonnen werden muss und die RNA anschließend sequentiell aufgefüllt wird. Hier wurden drei verschiedenen Untermodelle getestet:
 - a. Das erste RIG-I Molekül bindet mit niedrigerer Reaktionsrate, sobald ein RIG-I an der RNA gebunden hat werden weitere RIG-I Moleküle effizienter rekrutiert (Kooperative Bindung)
 - b. Das erste RIG-I Molekül bindet mit gleicher Reaktionsrate wie folgende Moleküle
 - c. Das erste RIG-I Molekül bindet mit höherer Reaktionsrate, sobald ein RIG-I an der RNA gebunden hat werden weitere RIG-I Moleküle weniger effizienter rekrutiert (inhibitorisches Modell).

Es zeigte sich dabei relativ schnell, dass ein RIG-I Aktivierungsmuster wie in den experimentellen Daten (Challenge-Experimente mit unterschiedlichen RNA-Konzentrationen und unterschiedlich langen RNA-Molekülen) nicht erreicht werden kann mit einem Modell, das unabhängige Bindung verschiedener RIG-I Moleküle an die virale RNA postuliert. Eine Modellanalyse und Modellvergleich ergab, das Modell 2a (sequentielles kooperatives Binden) die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ergab. Damit konnte eine erste wichtige biologische Hypothese mit dem Modell unterstützt werden.

Das Bindungsmodell (RIG-I/RNA-Bindung) wurde anschließend ergänzt und erweitert um weitere Schritte der Signaltransduktion im RIG-I Pathway, insbesondere MAVS-Bindung und Aktivierung der Signalkomplexe sowie Aktivierung der Transkription eines Luziferase-Reporters, der an den Promoter eines ISGs gekoppelt ist. Eine zentrale Hypothese, die hier mit dem Modell getestet wurde ist, dass die Stabilität des Signaltransduktionskomplexes (Bindung RIG-I/RNA-Komplexe an MAVS) abhängig ist von der Anzahl beteiligter RIG-I Moleküle. Dadurch ist auch die Signaltransduktionsaktivität und damit die Gesamtaktivierung des Interferon-Systems unterhalb von MAVS abhängig von der Länge der viralen RNA.

Damit lag ein vollständiges, vereinfachtes Modell des gesamten RIG-I Pathways vor bis hin zur Bindung der Interferon-Stimulierten Gene (ISGs), siehe Abbildung. Detaillierte Daten zu Dosis-Wirkung-Beziehungen der antiviralen Antwort bei Transfektion von definierten dsRNA-Liganden aus der AG Binder können mithilfe des Modells akkurat beschrieben werden. Eine Analyse des Modells gibt Hinweise darauf, dass alle Parameter des Modells gut bestimmt sind, d.h. dass Modellkomplexität gut mit der Quantität and Qualität der zugrundeliegenden Daten übereinstimmt. Der Meilenstein MS1 konnte somit erfolgreich abgeschlossen werden.

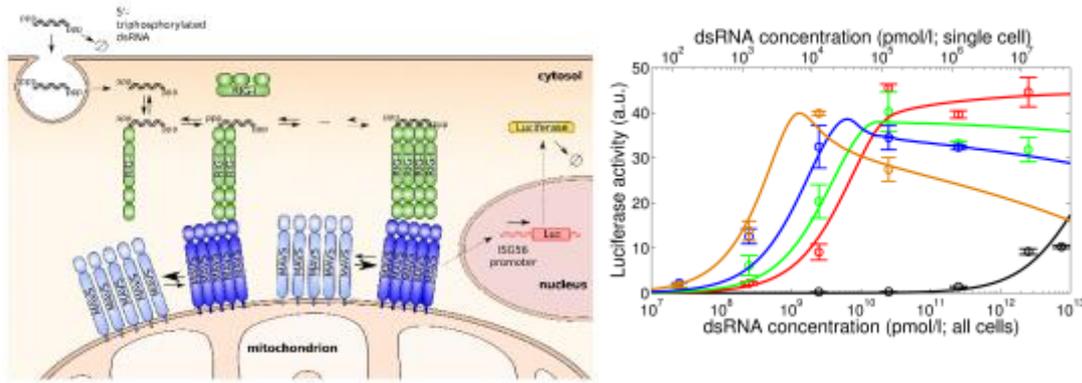


Fig. 1: Modell der antiviralen Antwort. (Links) Schema der beschriebenen Prozesse. (Rechts) Modellfit an detaillierte Dosis-Wirkungs-Daten für definierte 5'-triphosphorylierte dsRNA (schwarz: 40 bp, rot: 100 bp, grün: 200 bp, blau: 400 bp, und orange: 1600 bp lange dsRNA).

(iii) Entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen und konnte das ursprünglich geplante Ziel/Meilenstein damit erreicht werden?

Die erzielten Ergebnisse entsprachen in vollem Umfang den Erwartungen. Es konnte ein mathematisches Modell des Rig-I Signaltransduktionspfades entwickelt werden, Modellvorhersagen wurden mit experimentellen Daten validiert. Durch in-silico Simulationen konnte gezeigt werden, dass ein kooperatives Bindeverhalten essentiell ist für die Aktivierung des Rig-I Pathways und eine wichtige Funktion hat in der sensitiven Detektion viraler RNA bereits bei geringen Konzentrationen.

Meilenstein 2: „Statistische und Bioinformatik-Analyse des RNAi-Screens für neue Signaltransduzierer und regulatorische Gene“

(i) Welches Ziel wurde ursprünglich verfolgt?

Dieser Meilenstein ist ein unterstützender Meilenstein für die in den AGs Binder und Erfle durchgeführten Arbeiten zur Identifikation neuer Faktoren im Rig-I/Mda5 Signaltransduktionspfad. Im Verbundprojekt wird durch die Arbeitsgruppen Binder/Erfle ein mikroskopiebasierter RNAi-Screen zur Identifikation neuer Wirtsfaktoren im Rig-I/Mda5 Pfad durchgeführt. Die Mikroskopiedaten wurden zunächst durch die Arbeitsgruppe Rohr vorprozessiert (Bildverarbeitung), ausgehend von den Ergebnissen der Bildanalyse wurden in diesem Meilenstein die statistische und Bioinformatik-Auswertung der erhobenen Daten durchgeführt, und zum Ende des 3. Jahres Listen der Hit-Gene sowie die Bioinformatik-Annotation an die Arbeitsgruppe Binder weitergeleitet.

(ii) Welches relevante Ergebnisse wurden bei der Bearbeitung des Ziels erreicht?

Im Projektverlauf wurden durch die Arbeitsgruppen Binder und Erfle zunächst intensive Arbeiten zum Aufsetzen der Screening-Plattform durchgeführt, insbesondere sollte erstmals ein High-Density Labtek für das RNAi-Screening Experiment verwendet werden das im Rahmen des ebenfalls vom BMBF geförderten Verbundprojektes SysTec/Fancy entwickelt wurde. Die Testphase dieser Labteks wurde in diesem Meilenstein intensiv begleitet, und regelmäßig Feedback zu Qualität von erhaltenen Testdaten an die Arbeitsgruppen Binder und Erfle zurückgegeben. Parallel wurde die von uns in

Vorarbeiten entwickelte Auswertepipeline (Rieber, Knapp, Eils, Kaderali, 2009 sowie Knapp et al, 2011) an die Erfordernisse der High-Density Labteks angepasst und soweit möglich getestet. Ein vollständiger Test der Pipeline wurde auf einem anderen Datensatz aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bartenschlager (auf Daten die unabhängig von ImmunoQuant erhoben wurden, allerdings nicht mit Hochdichte-Arrays) erfolgreich durchgeführt.

Nach Erhalt der Screening-Daten von den experimentellen Projektpartnern wurde die Pipeline auf den Rig-I/Mda5-Screen aus ImmunoQuant angewandt. Insbesondere wurden verschiedene Methoden der Normalisierung der Daten getestet, mit einem speziellen Augenmerk auf die Behandlung des relevanten Phänotyps „IRF3-Translokation in den Zellkern“ als Signal für die Aktivierung des Rig-I/IFN-Systems. Es zeigte sich, dass die experimentellen Daten auf Grund der großen Anzahl Spots und damit relativ geringen Zellzahl pro Spot eine hohe Variabilität aufweisen, und eine sehr vorsichtige und gründliche Normierung durchgeführt werden muss. Verschiedene Methoden zur Quantifizierung des Phänotyps wurden getestet, unter anderem

- Prozent aktivierte Zellen pro siRNA-Knockdown, mit einem Threshold auf das Verhältnis nukleäres Signal zu zytoplasmatisches Signal
- Mittleres Verhältnis von nukleärem zu zytoplasmatischem Signal pro siRNA- Knockdown
- Einzelzellanalyse mit MARS-Regression zur Korrektur von Zellpopulationsfaktoren und anschließendem Enrichment-Test auf den Einzelzelldaten, analog zu Knapp et al., 2011.

Es zeigten sich deutliche Vorteile der einzelzellbasierten Analyse.

In der Folge wurde die Auswertepipeline entsprechend adaptiert, und auf die Daten angewendet. Eine annotierte Hitliste wurde erzeugt und an die Arbeitsgruppen Binder und Erfle weitergegeben.

(iii) Entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen und konnte das ursprünglich geplante Ziel/Meilenstein damit erreicht werden?

Die Auswertung der Hochdichte-Arrays erwies sich als komplexer als zunächst bei Projektplanung erwartet. Dies ist insbesondere zurückzuführen auf die geringere Zellzahl pro siRNA-Knockdown and die damit einhergehende höhere Variabilität der Daten (größerer Standard Error of the Mean S.E.M. bei geringerer Zellzahl). Dennoch konnten die Arbeiten erfolgreich durchgeführt werden, die Daten wurden normiert und eine Hitliste an die Kooperationspartner zurückgegeben.

Meilenstein 3: „Integriertes Modell der intrazellulären HCV Replikation und Immunantwort“

(i) Welches Ziel wurde ursprünglich verfolgt?

Basierend auf Vorarbeiten aus dem FORSYS/ViroQuant-Projekt sollte in diesem Meilenstein ein integriertes mathematisches Modell der intrazellulären Hepatitis-C-Virus (HCV) Replikation und deren Interaktion mit der angeborenen Immunantwort erstellt werden. Dazu sollte das im Rahmen des ViroQuant-Projektes erstellte intrazelluläre Replikationsmodell zunächst um den Effekt einer antiviralen Antwort auf die Virus-Replikation ergänzt werden und hier unterschiedliche Modellierungsansätze verglichen werden. Im nächsten Schritt sollten dann basierend auf Literatur und Daten aus Task 2.2 sowie in enger Kooperation mit WP3 und WP1 das Modell sukzessive um den Rig-I und Jak/Stat Pathway als wesentliche Prozesse der angeborenen Immunantwort auf virale Infektionen ergänzt werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf Interaktionen zwischen

Virus und Immunantwort-Pathways liegen, um akkurat beschreiben zu können wie HCV die zelluläre Immunantwort zu unterdrücken versucht. Das integrierte Modell sollte anschließend analysiert werden um auf intrazellulärer Ebene ein besseres Verständnis des Rennens zwischen viraler Replikation und angeborener Immunantwort zu erreichen.

(ii) Welches relevante Ergebnisse wurden bei der Bearbeitung des Ziels erreicht?

Im Berichtszeitraum wurde ein integriertes mathematisches Modell der intrazellulären Hepatitis-C-Virus (HCV) Replikation und deren Interaktion mit der angeborenen Immunantwort entwickelt. Dazu wurde das durch uns publizierte mathematische Modell der HCV RNA-Replikation (Binder et al., PLOS Pathogens 2013) um eine Beschreibung der Aktivierung der intrazellulären antiviralen Antwort, sowie deren Interaktionen mit Virusspezies erweitert. Hierbei wurden die in Meilenstein 1 gewonnenen Erkenntnisse zur Aktivierung des Rig-I Pfades berücksichtigt. Zunächst wurde die adaptive Immunantwort als neue Spezies in das Replikationsmodell aufgenommen, und deren Aktivierung durch virale RNA sowie deren Effekt auf virale Replikation in das Modell integriert. Dabei wurde der Einfluss des Interferonsystems auf die virale Replikation über drei Mechanismen berücksichtigt: (1) bei der Proteintranslation, (2) bei der zytosolischen RNA-Degradierung, und (3) der Etablierung des RNA-Replikationskomplexes; hierbei wurden Ergebnisse aus Meilenstein 4 berücksichtigt. Parameter wurden soweit möglich aus Literaturdaten bestimmt. Für unbekannte Modellparameter der Immunantwort wurde das Modellverhalten zunächst in einem großen Parameterbereich umfassend analysiert, und eine gründliche Bifurkationsanalyse zum Systemverhalten wurde durchgeführt. Dabei wurden einige nichtintuitive Phänomene gefunden, insbesondere konnten wir zeigen, dass unter gewissen Parameterkombinationen die Aktivierung der angeborenen Immunantwort z.B. durch Interferongabe theoretisch einen proviralen Effekt haben kann. Eine Publikation hierzu ist in Vorbereitung.

Nachdem weitere experimentelle Daten durch die AG Binder gemessen wurden, wurden diese zur Bestimmung der Immunantwort-Parameter genutzt. Seitens der AG Binder wurden Daten zur Infektionsdynamik nach Interferon-Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen gemessen und für die Modellierung zur Verfügung gestellt. Messreihen mit niedriger Interferonkonzentration wurden zur Modellkalibrierung verwendet, und Daten für hohe Konzentration wurden als Testdatensatz benutzt. Das Modell konnte die Effekte der hohen Interferonkonzentration vorhersagen und kann daher als komplett und für die quantitative Vorhersage tauglich angesehen werden. Eine Analyse des Integrierten Modells wurde durchgeführt, und konnte unter anderem erklären, warum eine Kombinationstherapie mit Interferon zur Aktivierung der Immunantwort und einem Replikaseinhibitor effektiver ist als die Summe des Effektes der Interferongabe plus des Effektes des Replikaseinhibitors: Hier tritt ein synergistischer Effekt auf, durch den Replikase-Inhibitor wird das gekoppelte System sensitiver gegenüber der Aktivierung des Interferonsystems, und der Effekt der Kombinationstherapie ist dadurch stärker als die Summe ihrer Komponenten.

Mit diesen Ergebnissen konnte der Meilenstein erfolgreich abgeschlossen werden.

(iii) Entsprechen die Ergebnisse den Erwartungen und konnte das ursprünglich geplante Ziel/Meilenstein damit erreicht werden?

Die erzielten Ergebnisse übertrafen die Erwartungen. Es konnte ein integriertes mathematisches Modell der viralen Replikation gekoppelt werden mit einem Modell des angeborenen

Immunsystems. Modellvorhersagen wurden mit experimentellen Daten validiert. Eine Modellanalyse lieferte neue Erklärungsansätze zu Wirkmechanismen von antiviralen Kombinationstherapien.

Meilenstein 4: „Analyse der HCV-Restriktionsfaktorkinetik“

(i) Welches Ziel wurde ursprünglich verfolgt?

In diesem Meilenstein sollten die in der Arbeitsgruppe Bartenschlager gemessenen kinetischen Daten zur Expression und Induktion der HCV Restriktionsfaktoren sowie deren Relation zur HCV Replikation (Task 4.1 und 4.2) normalisieren und statistisch aufbereitet werden. Gemessene Dynamiken sollten anschließend verwendet werden um die in diesem Teilprojekt entwickelten mathematischen Modelle zu ergänzen (insbes. Meilenstein 3).

(ii) Welches relevante Ergebnisse wurden bei der Bearbeitung des Ziels erreicht?

Im ersten Projektjahr wurde ein erster Datensatz zur Genexpression von Dengue-Virus von der AG Bartenschlager zur Verfügung gestellt, mit dem ein erster Eindruck zum Zeitpunkt der Regulierung der ISGs gewonnen werden konnte. Anhand dieser Daten wurden Abschätzungen getroffen zur Zeitdauer bis zur vollen Aktivierung des Interferon-Systems nach Infektion, die in Meilenstein 3 (Entwicklung eines gekoppelten Modells der Hepatitis-C-Virus Replikation und angeborenen Immunantwort) eingeflossen sind.

Erste Daten zur HCV-Induktion wurden von der AG Bartenschlager generiert insbesondere zum Restriktionsfaktor NOS (Stickstoffmonoxid-Synthase), dessen Runterregulation allerdings insgesamt zu einer Reduktion der Aktivierung der Interferonantwort führte und der somit nicht den erwarteten Effekt zeigte. Seitens der AG Bartenschlager wurden die Arbeiten an NOS daher eingestellt und mit anderen Restriktionsfaktoren fortgeführt. In der Folge wurden seitens der AGs Bartenschlager, Lohmann, Binder und Fackler im Rahmen eines siRNA-basierten Hochdurchsatztests Gene identifiziert, die zu einer funktionalen IFN-gamma Antwort gegen HCV beitragen. Dabei wurde das Protein DEcD/H-Box helicase DDX60L als ein ISG der Type II Interferon-Antwort gegen HCV identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass DDX60L direkt als antivirales Effektorprotein gegen HCV wirkt, in dem es Schritte der HCV RNA Replikation blockiert (Grünvogel et al., J Virol 2015). Zeitaufgelöste Daten zu viraler RNA sowie zu IFN β und DDX60/DDX60L mRNA nach Infektion wurden renormiert und es wurde versucht, diese Daten zu verwenden um das gekoppelte Modell zu parametrisieren. Hierbei traten allerdings Probleme mit der Modellidentifizierbarkeit auf, so dass eine eindeutige Parametrisierung nicht gelang. Daraufhin wurde entschieden, ISG-Effekte in drei grobe Kategorien einzuteilen und diese in dem gekoppelten Modell in Meilenstein 3 zu integrieren, wobei die Stärke der jeweiligen Effekte durch jeweils einen Modellparameter beschrieben werden: (1) ISG-Effekte auf die Proteintranslation (Reduzierung der Translation), (2) ISG-Effekte auf die zytosolische RNA-Degradierung, und (3) ISG-Effekte auf die Etablierung des RNA-Replikationskomplexes (wie exemplarisch durch DDX60L).

Bei den in-silico Untersuchungen zu den ISG-Effekten zeigte sich unerwartete Komplexität des Zusammenspiels – insbesondere die Effekte auf Proteintranslation wirken sich in den Modellsimulationen ebenfalls aus auf die Translation antiviraler Proteine des Interferonsystems selbst, und führen so zu einer komplexen negativen Feedback-Schleife. Die Effekte dieses Mechanismus erwiesen sich als zu komplex, um diese in den in ImmunoQuant entwickelten Modellen

unmittelbar abbilden zu können, und wurden hier daher zunächst vernachlässigt. Diese Rückkopplung ist derzeit Untersuchungsgegenstand in einem Nachfolgeprojekt.

Die Ergebnisse der Arbeiten an Meilenstein 4 zur HCV-Restriktionsfaktorkinetik sind in das Modell in Meilenstein 3 eingeflossen, der Meilenstein konnte insgesamt erfolgreich abgeschlossen werden.

(iii) Entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen und konnte das ursprünglich geplante Ziel/Meilenstein damit erreicht werden?

Durch Verzögerungen in den experimentellen Arbeitspaketen und insbesondere dem negativen experimentellen Ergebnis mit dem Restriktionsfaktor NOS kam es auch in der Modellierung der Restriktionsfaktorkinetiken zu Verzögerungen. Daten zu Dengue-Virus sowie zu DDX60L konnten verwendet werden, um eine grobe Abschätzung der Dynamik der HCV-Restriktionsfaktorinduktion und deren Rückkopplung auf HCV-Replikation zu erhalten, die in die Modellierung in Meilenstein 3 eingeflossen sind. Die vorgesehenen Ergebnisse in diesem Meilenstein konnten im Wesentlichen erreicht werden, wenn auch mit Einschränkungen hinsichtlich der genauen Identifizierbarkeit der Modellparameter. Es zeigte sich interessanterweise in Modellsimulationen, dass die zu erwartenden Kinetiken nach ISGs mit Auswirkungen auf Proteintranslation interessante Rückkopplungseffekte auf das Interferonsystem haben sollten, diese Fragestellung wird in einem Nachfolgeprojekt zu ImmunoQuant weiter untersucht.

Meilenstein 5: „Multi-Skalen Modell der HCV Replikation und Immunantwort“

(i) Welches Ziel wurde ursprünglich verfolgt?

In diesem Meilenstein sollte ein Multi-Skalenmodell der HCV Infektion entwickelt werden, das Aufbauend auf dem gekoppelten Modell aus Meilenstein 3, welches nur intrazelluläre Aspekte berücksichtigt, nun auch Effekte zwischen verschiedenen Zellen (d.h. auf Zellkulturebene) integriert. Das zu entwickelnde Modell sollte die intrazelluläre virale Replikation (WP2) und intrazelluläre Immunantwort (WP1) mit Effekten auf Zellpopulationsebene koppeln (WP7). Mit diesem Modell sollte untersucht werden, welche Auswirkung diese Effekte auf die akute Infektion haben und wie sie die virale Persistenz beeinflussen.

(ii) Welches relevante Ergebnisse wurden bei der Bearbeitung des Ziels erreicht?

Im diesem Meilenstein wurde plangemäß ein Multi-Skalen-Modell entwickelt, das intrazelluläre Vorgänge entsprechend unserem publiziertem Modell für die intrazelluläre HCV-Replikation (Binder et al, PLOS Pathogens, 2013) mit Vorgängen der Infektionsdynamik auf Zellpopulationsebene (Infektionsdynamik zwischen verschiedenen Zellen) koppelt. Dazu wurde das intrazelluläre Replikationsmodell als Komponente in ein Modell auf Zellpopulationsebene angelehnt an das „Standardmodell nach Neumann“ (Neumann et al, Science 1998) integriert, und beide Modellkomponenten über die Anzahl Infizierter Zellen miteinander gekoppelt. Eine genaue Charakterisierung des Effektes der angeborenen Immunantwort erwies sich hierbei als schwierig, da die vorhandenen experimentellen Daten nicht ausreichen, um die Immunantwort-Parameter des Modells eindeutig zu bestimmen. Eine vereinfachte Version des Multiskalenmodells konnte jedoch erfolgreich aufgesetzt und parametrisiert werden. Dieses Modell wurde mit klinischen Daten zur

Infektionsdynamik in HCV-Patienten unter Behandlung mit Daclatasvir kalibriert, und konnte die beobachteten Zeitverläufe unter Behandlung gut erklären. Das Modell ist dabei in der Lage, basierend auf intrazellulären Effekten der Daclatasvir-Behandlung über die Kopplung mit dem Zellpopulationsmodell die Viral-Load-Kinetik auf Patientenebene korrekt vorherzusagen, und trifft Vorhersagen wie die Behandlung durch Kombinationstherapie mit Polymerase-Inhibitoren weiter optimiert werden kann. Ergebnisse konnten im Berichtszeitraum in der Fachzeitschrift Virus Research publiziert werden (Clausnitzer et al., Virus Res., 2016). Der Meilenstein konnte damit erfolgreich abgeschlossen werden.

(iii) Entsprachen die Ergebnisse den Erwartungen und konnte das ursprünglich geplante Ziel/Meilenstein damit erreicht werden?

Durch Kopplung des intrazellulären Modelles mit einem Modell auf Zellpopulationsebene gelang es, Viral-Load-Kinetiken von Patienten unter Behandlung mit Daclastavir zu erklären mit intrazellulären Wirkmechanismen des Medikamentes auf virale Replikation. Dies ist ein hochinteressantes Ergebnis allein schon deshalb, weil es damit im Modell gelungen ist die Brücke zu spannen von molekularen Mechanismen zu Dynamiken auf Patientenebene. Mittels Modellanalysen können darüber hinaus theoretische Vorschläge erarbeitet werden, wie die Therapie weiter optimiert werden kann. Die erzielten Ergebnisse entsprechen insoweit vollumfänglich den besten Erwartungen, und konnten dementsprechend erfolgreich in der Fachzeitschrift Virus Research publiziert werden. Das ursprünglich geplante Ziel / Meilenstein wurde erreicht.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal:

Im Rahmen des Projektes wurden folgende Stellen bewilligt.

2x Doktorand (E13, 50%, 3 Jahre)

Die erste Stelle konnte fristgerecht zum Projektstart besetzt werden, bei der zweiten Stelle kam es zu Verzögerungen in der Besetzung durch eine schwierige Bewerberlage. Die dadurch entstandene Verzögerung an den Projektarbeiten konnte in der Folge durch Doppelbesetzung (nach Abstimmung mit dem Projektträger) aufgeholt werden, so dass alle Arbeiten wie ursprünglich geplant durchgeführt und abgeschlossen werden konnten.

Verbrauchsmaterial:

Im Rahmen des Projektes erfolgten keine Abweichungen von den ursprünglichen Planungen.

Vergabe von Aufträgen:

Im Rahmen des Projektes erfolgte keine Vergabe von Aufträgen.

Investitionen:

Im Rahmen des Projektes erfolgten keine Investitionen.

Insgesamt wurden final alle bewilligten Mittel für die Durchführung des Projektes und die Erreichung der Projektziele verwendet.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten haben unmittelbar zu einem besseren Verständnis des Zusammenspiels zwischen Viraler Replikation und angeborener Immunantwort beigetragen, wobei systembiologische Methoden und mathematische Modelle eine maßgebliche Rolle zur Untersuchung der dynamischen Vorgänge gespielt haben. Damit hat das Teilprojekt wesentlich zu den Zielen des Gesamtverbundes beigetragen, und insbesondere auch wichtige Beiträge zur Erreichung der förderpolitischen Ziele der gesamten e:Bio Ausschreibung geliefert.

Die angeforderten Personal- und Verbrauchsmittel wurden angemessen eingesetzt und haben einen wesentlichen wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn sichergestellt (wird durch bereits erfolgte und weitere anstehende Publikation dokumentiert). Dabei sind in diesem Teilprojekt vor allem Personalmittel eingesetzt worden, die unmittelbar für die Entwicklung und Untersuchung der mathematischen Modelle benötigt wurden.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Im Rahmen der Antragstellung wurden keine wirtschaftlichen Erfolgsaussichten für das vorliegende Projekt in Aussicht gestellt. In Bezug auf den fortgeschriebenen Verwertungsplan haben sich keine direkten wirtschaftlichen Erfolgsaussichten nach Projektende ergeben. Während der Projektlaufzeit gab es keine Erfindungen/Schutzrechanmeldungen.

Eine unmittelbare wissenschaftliche Anschlussfähigkeit ist gegeben. Ergebnisse des ImmunoQuant-Teilprojektes sind in das BMBF/EraNet „EraSysApp“ Projekt SysVirDrug eingeflossen, in dem Modelle wie sie in ImmunoQuant für Hepatitis C entwickelt wurden nun für ein breites Panel an verschiedenen Plus-Strang RNA-Viren entwickelt werden, darunter Dengue Virus, HCV, Sars-Coronavirus, Chikungunya-Virus und weitere. Zielstellung in SysVirDrug ist es, die entwickelten Modelle einzusetzen zur Identifikation von Breitband-Antiviralen Medikamenten, entsprechende Industrie- und Technologietransferpartner sind in SysVirDrug involviert. Die Arbeiten in ImmunoQuant haben für die Einwerbung dieses Europäischen Verbundprojektes wichtige Voraussetzungen geschaffen, der Teilprojektleiter Lars Kaderali ist Koordinator von SysVirDrug.

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

Es sind keine Ergebnisse bekannt geworden, die die Projektziele oder den Projektablauf verändert haben.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Erfolgte Veröffentlichungen:

1. D. Clausnitzer, J. Harnisch, L. Kaderali (2016). Multi-scale model for hepatitis C viral load kinetics under treatment with direct acting antivirals. *Virus Res.* 218:96-101.

Geplante Veröffentlichung:

Es ist eine Veröffentlichung des Rig-I Modells (Meilenstein 1) geplant, das entsprechende Manuskript ist derzeit in Vorbereitung.