

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

GERONTOSYS - Verbundprojekt: AgeNet - Multi-Skalen Analysen der Alterung -
Vom Molekül zum Gewebe – Teilprojekt TU Dresden

Förderkennzeichen: 031A080

Zuwendungsempfänger: Technische Universität Dresden, 01069 Dresden

Projektleitung: Herr Prof. Dr. Lars Kaderali

Laufzeit: 15.03.2012 bis 31.05.2014

"Das diesem Bericht zugrundeliegende Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln
des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem
Förderkennzeichen 0315416C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser
Veröffentlichung liegt beim Autor".

GERONTOSYS - Verbundprojekt: AGENET - Multi-Skalen Analysen der Alterung - Vom Molekül zum Gewebe

Schlussbericht zu Nr. 8.2 (NKBF 98)

| | |
|--------------------------------|---|
| Zuwendungsempfänger: | TU Dresden (TUD) |
| Förderkennzeichen | 031A080 |
| Vorhabenbezeichnung: | GERONTOSYS - Verbundprojekt: AGENET – Multi-Skalen Analysen der Alterung - Vom Molekül zum Gewebe |
| Laufzeit des Vorhabens: | 1.6.2011 bis 31.5.2014 Kostenneutrale Verlängerung bis 31.12.2014 (nur DKFZ) [TUD: 15.3.2012 bis 31.5.2014]) |

| | | |
|-------|--|----|
| I. | Kurzdarstellung..... | 1 |
| I.1. | Aufgabenstellung..... | 1 |
| I.2. | Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde | 1 |
| I.3. | Planung und Ablauf des Vorhabens | 1 |
| I.4. | Wissenschaftlicher und technischer Stand | 2 |
| I.5. | Zusammenarbeit mit anderen Stellen..... | 3 |
| II. | Eingehende Darstellung | 4 |
| II.1. | Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele | 4 |
| II.2. | Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises..... | 10 |
| II.3. | Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit..... | 10 |
| II.4. | Voraussichtlicher Nutzens, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans..... | 11 |
| II.5. | Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen..... | 12 |
| II.6. | Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11 | 12 |

I. Kurzdarstellung

I.1. Aufgabenstellung

Die Alterung eines Organismus ist in allen Skalenbereichen und biologischen Organisationsstufen, von molekularen Netzwerken, über Zellen bis hin zu Geweben, zu beobachten. Somit kann ein Verständnis von Altern und die Entwicklung neuer Strategien zur Vorbeugung und Behandlung altersbedingten Erkrankungen nur erfolgreich sein, wenn die Netzwerkeigenschaften von Molekülen, Zellen und Geweben untersucht werden.

Der Forschungsverbund **AgeNet** untersucht Netzwerkeigenschaften, die zur Alterung von Zellen und Geweben führen, identifizieren und charakterisieren. Die Proteine und die DNA bestimmen die Lebensfähigkeit und das Altern einer Zelle. Die Ansammlung von Schäden Art im Erbgut und die Akkumulation von fehl gefalteten Proteinen und krankhaften Proteinansammlungen ist ein wesentliches Merkmal von gealterten Zellen und degenerative Erkrankungen. Daher soll untersucht werden, wie und warum DNA Reparatur und die Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle im Verlaufe des Lebens langsam an Effizienz verlieren. Der Forschungsverbund will verstehen, wie verschiedene Moleküle die Anfälligkeit des lebenden Systems gegen Schäden beeinflussen. AgeNet vereint dabei Studien zur Proteinqualitätskontrolle und DNA-Reparatur auf molekularer Ebene mit Untersuchungen zur Regeneration von Zellen und Geweben im Organsystem Haut. Die experimentellen Studien gehen dabei Hand in Hand mit der mathematischer Analyse und Modellierung der gewonnenen quantitativen Daten.

Der Projektpartner TUD übernimmt im Forschungsverbund Aufgaben in zwei Teilprojekten:

- Zum einen wird gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Luke (Uni Heidelberg / ZMBH) untersucht, wie sich die Telomer-Struktur und -Funktion im Alterungsprozess verändert. Partner TUD übernimmt dabei die Bioinformatik-Auswertung der erhobenen Daten die Entwicklung von Netzwerkinferenzmethoden zur Bildung von Modellen.
- Des Weiteren wird in enger Zusammenarbeit mit den Gruppen von Frank Lyko (DKFZ Heidelberg) und Marc Winnefeld (Beiersdorf AG) untersucht, welche epigenetischen Veränderungen in alternder Haut auftreten. Partner TUD übernimmt dabei die integrative Bioinformatik-Auswertung der erhobenen Daten und entwickelt prädiktive, mathematische Modelle der epigenetischen Hautalterung.

I.2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Vor Projektstart bestanden noch keine Kooperationen mit den beteiligten Partnern, diese konnten jedoch nach Projektstart sehr zügig durch engen Informationsaustausch und regelmäßige persönliche und telefonische Besprechungen initiiert werden. Mit allen Partnern entwickelte sich eine sehr enge Zusammenarbeit, die insbesondere auch auf Ebene der beschäftigten Mitarbeiter durch sehr intensiven und regelmäßigen Kontakt charakterisiert war.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die in I.1 genannten Ziele / Aufgabenstellungen wurden in zwei Arbeitspaketen, WP3 und WP4, des Gesamtverbundes bearbeitet.

In WP3 („A genomic/systems approach to understanding telomere structure and function during the aging process“) wurde die Arbeit weiter in folgende Meilensteine untergliedert:

1. Datenanalyse der Epistasis-Analyse für WP3: Hier wurde eine Bioinformatik-Pipeline zur Prozessierung der experimentellen Daten zum Telomer-Looping aus der Arbeitsgruppe von Dr. Luke (Universität Heidelberg) aufgesetzt und auf die erhobenen Daten angewendet
2. Untersuchung vom Zusammenspiel von Genregulation und Telomer-Struktur: In diesem Meilenstein wurden Netzwerkrekonstruktionsverfahren entwickelt und angewendet, um regulatorische Prozesse des Telomere Looping zu untersuchen
3. Analyse der Rohdaten von ChIP-Seq und mRNA-Seq für WP2: Dieser eher serviceorientierte Meilenstein umfasste die Datenauswertung für Arbeitspaket WP2
4. Genomweite Assoziierungskarte von HIPK2 regulierten Genen für WP2: Auch dieser serviceorientierte Meilenstein umfasste die Anwendung von Bioinformatik-Verfahren zur Identifikation von HIPK3-regulierten Genen für WP2
5. Publikation und/oder ggf. Patentierung von Ergebnissen

In WP4 („A systems biology approach for the characterization of age-related epigenetic changes“) wurde die Arbeit in folgende Meilensteine untergliedert:

1. Vorhersagekräftiges Modell von Alters-abhängigen Methylierungsänderungen basierend auf verfügbaren Daten einer Pilotstudie
2. Prozessierung der neu in AgeNet erhobenen Experimentaldaten
3. Entwicklung und Anwendung von maschinellen Lernverfahren zur Rekonstruktion von Modellen aus Daten
4. Entwicklung eines systembiologischen Modells der epigenetischen Veränderungen im Alter
5. Publikation von Ergebnissen

Die Arbeiten im Projekt erfolgten gemäß den Planungen entlang der oben dargestellten Meilensteine. Durch den Wechsel von Prof. Kaderali von Heidelberg nach Dresden kam es zum Projektbeginn zu Verzögerungen, da Stellen nicht sofort besetzt werden konnten, diese konnten durch Doppelbesetzungen nach erfolgtem Umzug nach Dresden jedoch zügig aufgeholt werden. Trotz Abweichungen konnte durch diese Anpassungen am Ablauf (Doppelbesetzungen) das Projekt erfolgreich und im Zeitplan durchgeführt werden.

I.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

I.4.1 WP3: A genomic/systems approach to understanding telomere structure and function during the aging process

Physikalisch ähneln Telomere einem Bruch doppelsträngiger DNS, und sollten entsprechend zelluläre Reparatursmechanismen initiieren. Es wird spekuliert das TRF2 eine Rolle spielt in der Bildung der sogenannten T-Loop, eine Rückfaltung der Telomer-Enden auf sich selbst, und damit DNS Repair-Mechanismen unterbindet. Die genauen Mechanismen der Regulierung der Bildung der T-Loop, und wie sich diese in Alterungsprozessen mit assoziierter Telomerverkürzung anpassen, ist jedoch unbekannt und sollte in WP3 untersucht werden. Dazu kooperierte die biologisch ausgerichtete Arbeitsgruppe von Dr. Brian Luke (Universität Heidelberg) mit der Bioinformatik-Gruppe von Lars Kaderali (TUD).

I.4.2 WP4: A systems biology approach for the characterization of age-related epigenetic changes

Epigenetische Modifikationen spielen eine wesentliche Rolle in der Etablierung und Erhaltung von gewebespezifischen zellulären Phänotypen. Epigenetische Veränderungen spielen eine wichtige Rolle in Alterungsprozessen, allerdings waren experimentelle Daten die diese Hypothese stützen zum Projektstart rar. Im Rahmen von WP4 sollte untersucht werden, welche Rolle epigenetische Veränderungen (Methylierungen) bei Alterungsprozessen der Haut spielen. Dazu kooperierte die biologisch ausgerichtete Forschungsgruppe von Frank Lyko am DKFZ mit der Forschungsabteilung von Dr. Marc Winnefeld bei der Firma Beiersdorf AG und der Bioinformatik-Gruppe von Lars Kaderali an der TUD.

Relevante Vorarbeiten der Projektpartner:

Für relevante Vorarbeiten der AG Luke wird auf den Bericht der Universität Heidelberg verwiesen.

Für relevante Vorarbeiten der Arbeitsgruppen von Dr. Lyko und Dr. Winnefeld wird auf die Berichte des DKFZ bzw. der Firma Beiersdorf verwiesen.

Für AgeNet wichtige Vorarbeiten der AG Kaderali für die Arbeitspaket 3 und 4 waren insbesondere die in der Gruppe entwickelten Netzwerkrekonstruktionsverfahren (Kaderali et al., 2009; Mazur et al., 2009) und Verfahren zur Bioinformatik-Analyse von Knockout-Daten (Boerner et al., 2010; Rieber et al., 2009), die im Rahmen von AgeNet für die Rekonstruktion und Analyse der experimentellen Daten aus WP3 angepasst und eingesetzt wurden (insbes. Meilensteine 1 und 2) sowie für die Datenprozessierung und Modellentwicklung in WP4 (Meilensteine 1-4).

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Der AgeNet Verbund setzte sich aus insgesamt vier Verbundpartner mit insgesamt neun Arbeitsgruppen zusammen. Diese sind:

1. DKFZ Heidelberg (AG Bukau (WP1), Höfer(WP1&2), Hofmann (WP2), Lyko (WP4), Angel (WP5), Eils (WP5&6))
2. Universität Heidelberg (AG Luke WP3)
3. Beiersdorf AG (AG Winnefeld, WP4)
4. TU Dresden (AG Kaderali, WP3&4)

Eine Kooperationsvereinbarung, die die Zusammenarbeit der Projektpartner DKFZ, Uni Heidelberg und Beiersdorf AG regelt, wurde im August 2011 abgestimmt und zwischen allen Partnern geschlossen, der PTJ wurde darüber am 15. September 2011 informiert. Durch den Umzug von Herrn Kaderali an die TU Dresden war eine Ergänzungsvereinbarung zu der Kooperationsvereinbarung notwendig geworden. Diese wurde wiederum mit allen Partnern abgestimmt und im April 2012 verabschiedet. Der PTJ wurde darüber am 11. Mai 2012 informiert.

Der Fortschritt des gesamt Verbundes wurde im Rahmen von halbjährliche Verbundtreffen in Heidelberg diskutiert. Weiterhin fand intensiver Austausch auf WP-Ebene zur inhaltlichen Abstimmung und zum Datenaustausch statt. Der Austausch wurde vom am DKFZ angesiedelten Projektmanagement (WP6) unterstützt.

Außerdem nahmen Wissenschaftler des Verbundes intensiv an den regelmäßig stattfindenden GerontoSys-Statusseminaren teil.

II. Eingehende Darstellung

II.1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

WP 3: A genomic/systems approach to understanding telomere structure and function during the aging process

Projektleiter: Brian Luke (Uni Heidelberg, ZMBH) und Lars Kaderali (TU Dresden)

Doktorand, Kaderali, TU Dresden

Meilenstein 1: Datenanalyse der Epistasis-Analyse für WP 3

In diesem Meilenstein sollte eine Bioinformatik-Pipeline zur Prozessierung von Experimentellen Daten (Hefe Primärscreen / Sekundärscreen und SGA-Screen) der Arbeitsgruppe von Brian Luke entwickelt werden, und in der Folge auf die in WP3 / AG Luke generierten Daten angewendet werden. Für resultierende Gene sollte darüber hinaus eine Geneset-Enrichment und Pathway-Analyse durchgeführt werden, um Prozesse zu identifizieren die die Bildung der Telomer-Rückfaltung regulieren bzw. beeinflussen.

Im ersten Jahr der Projektlaufzeit konnte erfolgreich eine Bioinformatik-Pipeline zur Verarbeitung der experimentellen Daten aufgesetzt werden. In der Folge wurde der Primärscreen der Arbeitsgruppe Luke mit dieser Pipeline ausgewertet. Kandidatengene wurden an die AG Luke übermittelt zur Durchführung eines Sekundärscreens, parallel wurde eine Pathway-Analyse durchgeführt. Nach Verfügbarkeit des Sekundärscreens wurde auch dieser ausgewertet, es konnte dabei eine wichtige Rolle von Rif2 in der Regulation der Telomer-Struktur nachgewiesen werden. Ergebnisse wurden gemeinsam mit der AG Luke in der Fachzeitschrift PLoS Genetics publiziert (Poschke et al., PLoS Genetics, 2012).

Erreichte Ergebnisse in diesem Meilenstein entsprachen in vollem Umfang den Erwartungen, die gesteckten Ziele wurden vollständig erreicht.

Meilenstein 2: Untersuchung zum Zusammenspiel von Signaltransduction/Genregulation und Telomer-Struktur

In diesem Meilenstein sollte das Zusammenspiel zwischen Genregulation und Telomer-Struktur mittels Netzwerkrekonstruktionsverfahren untersucht und modelliert werden. Dazu sollten zunächst geeignete Computerverfahren zur Netzwerkrekonstruktion implementiert werden, sowie anschließend auf die experimentellen Daten der Arbeitsgruppe von Dr. Brian Luke angewendet werden, um ein testbares, prädiktives Modell des Einflusses der Genregulation auf das Telomer-Looping zu erhalten.

Entsprechend wurde zunächst ein Computerverfahren zur Rekonstruktion von Netzwerken signifikant mit Telomerstruktur assoziierten Genen aus den Knockdown-Daten entwickelt. Dieses wurde zunächst auf einem anderen Knockdown-Datensatz getestet, da die Daten der AG Luke zum Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht abschließend prozessiert aus Meilenstein 1 vorlagen. Auf den verwendeten Testdaten konnten hervorragende Ergebnisse mit der Methode erzielt werden, entsprechend wurde eine methodische Publikation in der Fachzeitschrift PLoS One eingereicht (Knapp and Kaderali, PLoS One, 2013). Das zugehörige Computerprogramm wurde gleichzeitig als Open Source auf der Webseite der Arbeitsgruppe zum kostenfreien Download für akademische

Zwecke zur Verfügung gestellt. Im Anschluss an AgeNet wurde im Rahmen einer aus AgeNet hervorgegangenen Masterarbeit das Verfahren nochmals verfeinert (Matos et al., Bioinformatics, 2015), und die zugehörige Software über das Bioconductor Open-Source Repository veröffentlicht (IpNet, <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/IpNet.html>).

Nach Verfügbarwerden der experimentellen Daten aus der Arbeitsgruppe Luke zeigte sich, dass mit der gewählten Methode der Netzwerkinferenz und den hochdimensionalen experimentellen Daten gravierende Probleme mit der Modellidentifizierbarkeit auftreten, die auch durch Integration von „Prior Knowledge“ nicht behoben werden konnten. Weitere Computersimulationen zeigten, dass, um ein identifizierbares Modell zu erhalten, weitere experimentelle Messungen erforderlich wären, idealerweise z.B. Microarray-Expressionsprofile nach ausgewählten knockdown-Experimenten. Derartige Daten zur biologischen Fragestellung konnten in öffentlichen Datenbanken (z.B. ArrayExpress, Gene Expression Omnibus, und andere) nicht gefunden werden. Nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe Luke konnten entsprechende Experimente auch nicht im Rahmen von AgeNet oder aus anderen Projekt- oder Haushaltsmitteln finanziert werden. .

Als Alternative wurde ein zweites Netzwerkrekonstruktions-Verfahren getestet, das speziell für Knockdowns mit eindimensionalen Effekten (hier: Telomere Looping) geeignet ist (Kaderali et al., Bioinformatics, 2009), allerdings konnten auch hiermit keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden.

Da der ursprünglich geplante SGA-Screen durch die AG Luke abgebrochen wurde (siehe Bericht Uni Heidelberg / Dr. Brian Luke), und daher nicht mit weiteren experimentellen Daten zu rechnen war, wurden auch die Arbeiten zum Meilenstein 2 abgebrochen und freiwerdende Kapazitäten in Arbeitspaket 4 (WP4) eingebunden. Die Ziele für Meilenstein 2 konnten insoweit nur teilweise erreicht werden: Es wurden neue Verfahren zur Netzwerkrekonstruktion implementiert und als Softwarepakete der wissenschaftlichen Community zugänglich gemacht, diese Programme konnten erfolgreich auf Knockdown-Datensätzen anderer Projekte getestet und angewendet werden. Eine Anwendung auf K/O-Daten der Arbeitsgruppe Luke war nur eingeschränkt möglich, dies insbesondere auch deshalb, da der ursprünglich geplante SGA-Screen nicht durchgeführt wurde und somit nur eingeschränkt experimentelle Daten zur Verfügung standen.

Meilenstein 3: Analyse der Rohdaten von ChIP-Seq und mRNA deep-Seq für WP2

Ziel des Meilenstein 3 war es, für WP2 Unterstützung in der Bioinformatik-Auswertung von dort erhobenen Chip-Seq und mRNA-Seq Daten zu leisten. Zu diesem Zweck sollte eine Bioinformatik-Pipeline zur Verarbeitung dieser Daten aufgesetzt werden, und anschließend fortlaufend auf Daten aus WP2 entsprechend dem Anfallen der Daten in diesem Arbeitspaket angewendet werden.

Durch den Umzug der Arbeitsgruppe Kaderali von Heidelberg nach Dresden kam es zum Projektstart in diesem Arbeitspaket zunächst zu einigen Verzögerungen, die nach erfolgtem Umzug durch Doppelbesetzungen jedoch zügig aufgeholt werden konnten.

Es wurden zunächst unterschiedliche Softwareprogramme zur Analyse von Chip-Seq und mRNA-Seq Daten verglichen und getestet, basierend auf diesen Untersuchungen wurde entschieden die Galaxy-Plattform für die weitere Datenauswertung zu verwenden. In der Folge wurde eine entsprechende Pipeline aufgesetzt. Ein erster Test wurde mit mRNA-Seq Daten in einem Mausmodell der Gruppe Hofmann (siehe dort: Meilenstein 3) erfolgreich durchgeführt. In der Folge konnten mit der Pipeline alle weiteren Datenanalysen wie von der AG Hofmann angefordert durchgeführt werden, die

Rohdaten wurden verarbeitet und der Meilenstein konnte entsprechend erfolgreich abgeschlossen werden.

Meilenstein 4: Genomweite Assoziierungskarte von HIPK2 regulierten Genen für WP2

In diesem Meilenstein sollte als Bioinformatik-Dienstleistung für WP2 eine Pipeline zur Erstellung genomweiter Assoziierungskarten aufgesetzt werden und auf Daten des Arbeitspaketes 2 angewendet werden. Plangemäß wurde eine entsprechende Datenprozessierungs-Pipeline in der AG Kaderali aufgesetzt, und Daten aus WP2 wurden verarbeitet und eine entsprechende Assoziationskarte erstellt. Da die Projektpartner des WP2 (DKFZ) eine kostenneutrale Projektverlängerung bis 31.12.2014 beantragt und genehmigt bekommen haben, während das Teilprojekt der TU Dresden zum 31.5.2014 endete, wurden Ergebnisse und Pipeline an die AG Höfer (DKFZ) übergeben und die Arbeiten dort zu Ende geführt. Die Ziele des Meilensteins wurden vollumfänglich erreicht.

Meilenstein 5: Patentierung/Publication von Ergebnissen

Aus den Arbeiten in WP2 / AG Kaderali sind im Rahmen von AgeNet zwei Publikationen entstanden:

1. Poschke H, Dees M, Chang M, Amberkar S, Kaderali L, Rothstein R, Luke B (2012): Rif2 promotes a telomere fold-back structure through Rdp3L recruitment in budding yeasts. *PLoS Genetics* 8(9):e1002960.
2. Knapp B, Kaderali L (2013): Reconstruction of cellular signal transduction networks using perturbation assays and linear programming, *PLoS One* 8(7):e69220.

In der direkten Nachfolge zu AgeNet wurde eine Masterarbeit in der AG Kaderali durchgeführt, in der das Netzwerkinferenzverfahren zu Publikation 2 erweitert und verfeinert wurde, hieraus ist nach Projektende eine weitere Publikation entstanden: Matos M, Knapp B, Kaderali L (2015), IpNet: a linear programming approach to reconstruct signal transduction networks, *Bioinformatics*, in press.

Die Ziele des Meilenstein 5 wurden vollumfänglich erreicht.

WP 4: A systems biology approach for the characterization of age-related epigenetic changes

Projektleiter: Lars Kaderali (TU Dresden), Frank Lyko (DKFZ), Marc Winnefeld (Beiersdorf AG)

Doktorand, Kaderali, TU Dresden

Meilenstein 1: Vorhersagekräftiges Modell von Alters-abhängigen Methylierungsänderungen basierend auf verfügbaren Daten der Pilotstudie

In diesem Meilenstein sollten publizierte Daten aus einer Pilotstudie der Projektpartner zur altersabhängigen Methylierung der Haut (Grönniger, 2010) renormalisiert werden und ein vorhersagekräftiges Modell der altersabhängigen Methylierung entwickelt werden.

Auf Grund des Umzugs der AG Kaderali von Heidelberg nach Dresden kam es zum Projektstart in diesem Meilenstein zunächst zu Verzögerungen, da Stellen nicht besetzt werden konnten und entsprechend die Modellierungsarbeiten erst verzögert einsetzen konnten. Ab Transfer des Projektes nach Dresden (zum 15.3.2012) konnten die Arbeiten zügig durchgeführt werden, durch Doppelbesetzungen konnte der Zeitplan wieder aufgeholt werden.

Die Daten der Pilotstudie aus Grönniger, 2010 wurden für die Verarbeitung aufbereitet, d.h. die Rohdaten wurden in R/Bioconductor neu normalisiert, annotiert, und fehlende Werte imputiert.

Statistische Verfahren (Limma) wurden verwendet um differentiell methylierte Arrayproben zu identifizieren, die eine Korrelation mit dem Alter der Probanden aufweisen. Dazu wurde zunächst eine Klassifikation in „Junge“ und „Alte“ Probanden vorgenommen, anschließend wurde mittels dem Empirical Bayes-Verfahren auf differentiell methylierte Marker getestet. Auf dem Gesamtdatensatz konnten ca. 2.000 Sonden identifiziert werden, die mit Alterung korrelieren. Hierarchisches Clustern zeigte vier Gruppen in den untersuchten Proben, die sich in alte und junge Proben jeweils aus Dermis- und Epidermis aufsplitteten (d.h. ein Cluster jeweils für junge bzw. alte Probanden in der Dermis und der Epidermis), hierbei konnte eine fast 100% korrekte Klassifikation erzielt werden. Des Weiteren wurde eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) auf den Daten durchgeführt. Es zeigte sich, dass die größte Varianz in den Daten zwischen Proben der Dermis- und Epidermis lag, d.h. Dermis- und Epidermis zeigten die größten Methylierungsunterschiede, gefolgt von altersabhängigen Unterschieden jeweils innerhalb der Gewebegruppen. Dies bestätigte vorher publizierte Ergebnisse (Grönniger, 2010).

Im nächsten Schritt wurden verschiedene maschinelle Lernverfahren mit Kreuzvalidierung auf dem Datensatz getestet, um ein prädiktives Modell der altersabhängigen Methylierung zu entwickeln und zu testen und junge und alte Methylierungsmuster voneinander zu unterscheiden. Mit einer linearen SVM konnte in 10-facher Kreuzvalidierung eine 100% korrekte Vorhersage der Gruppenzugehörigkeit (100% Accuracy, Sensitivity und Specificity für Gruppeneinteilung „Jung“ bzw. „Alt“ basierend nur auf den Methylierungsmustern) erreicht werden. Eine direkte Vorhersage des biologischen Alters basierend auf den epigenetischen Profilen mit einer Regressions Support-Vector-Machine zeigte ebenfalls einen sehr hohen prädiktiven Wert, mit einem mittleren absoluten Vorhersagefehler in der Kreuzvalidierung von ca. 11.7 Jahren.

Die Ziele dieses Meilensteines wurden vollumfänglich erreicht, die Ergebnisse übertrafen deutlich die vorherigen Erwartungen hinsichtlich der Güte und Qualität der Altersvorhersagen des prädiktiven Modells.

Meilenstein 2: Prozessierung der Experimentaldaten

Im Rahmen von AgeNet wurden durch die Partner Bayersdorf und DKFZ (AG Lyko) weitere Probandendaten mittels Tiefensequenzierung (ChIP-Seq) erhoben. In Meilenstein 2 sollte für diese Daten eine Bioinformatik-Analyse durchgeführt werden (gemeinsam mit AG Lyko), und die Daten anschließend in das in Meilenstein 1 entwickelte prädiktive Modell integriert werden.

Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Frank Lyko am DKFZ wurde eine bioinformatische und statistische Prozessierung der Sequenzierungsdaten durchgeführt. Dazu wurden zunächst die erhaltenen Reads auf das Referenzgenom gemappt, und differentiell methylierte Regionen identifiziert. Differentiell methylierte Gene wurden auf Pathways gemappt und Geneset-Enrichment Tests durchgeführt. Ein Vergleich der besten Signatur-Gene aus den ChIP-chip (Grönniger et al.) und ChIP-Seq Daten wurde durchgeführt, und prädiktive Modelle unabhängig auf beiden Datensätzen sowie dem integrierten Datensatz aufgesetzt. Zwischen den beiden Datensätzen zeigten sich geringe, aber statistisch signifikante Überlappungen in den Signaturen. Auch auf Grund der unterschiedlichen Auflösung der ChIP-chip Daten (37K Arrays) und der ChIP-Seq Daten (genomweit) ist eine direkte Integration der Daten auf Ebene einzelner Gene nur eingeschränkt sinnvoll, hierbei geht ein Großteil der Informationen aus den Sequenzierungsdaten verloren und die prädiktive Qualität der Modelle leidet.

Ergebnisse wurden an Meilenstein 3 weitergegeben, um dort mit maschinellen Lernverfahren ein integriertes, prädiktives Modell auf Netzwerkebene zu lernen, und damit die Nachteile einzelgenbasierter Signaturen zu relativieren. Die Arbeiten an Meilenstein 2 konnten vollumfänglich erfolgreich abgeschlossen werden.

Meilenstein 3: Entwicklung und Anwendung von Maschinellen Lernverfahren zur Rekonstruktion von Modellen aus Daten

Ziel dieses Meilensteins war es, ein maschinelles Lernverfahren zur Inferenz von netzwerkbasierten Modellen der altersrelevanten Prozesse aus den experimentellen Daten zu entwickeln und auf die Daten der Projektpartner Beiersdorf und DKFZ (AG Lyko) anzuwenden.

Im Projektverlauf wurde zunächst ein neues Verfahren zur netzwerkbasierten Modellinferenz entwickelt. Dazu wurde zunächst ein humanes Protein-Interaktionsnetzwerk aus verschiedenen öffentlich zugänglichen Datenbanken zusammengestellt. Die grundlegende Idee des entwickelten Verfahrens besteht nun darin, mittels Clusterverfahren Untermodule in dem Proteinnetzwerk zu detektieren, die stark verbunden sind (also vermutlich in einem funktionalen Zusammenhang stehen) und die gleichzeitig signifikant angereichert sind mit differenziell methylierten Genen, also assoziiert sind mit dem Alterungsprozess. Ein entsprechendes Computerprogramm für diese Analysen wurde im Rahmen von AgeNet entwickelt. Ein erster Test erfolgte zunächst auf einem kleineren Datensatz aus einem anderen Projekt, auf dem das Verfahren optimiert werden konnte. Ergebnisse wurden publiziert (Amberkar et al., World J. Virol, 2013 und Amberkar et al., BMC Alg Mol Biol, 2015); des weiteren entstand eine erfolgreich abgeschlossene Promotionsarbeit aus den Ergebnissen dieses Meilensteins (S. Amberkar, 2014, Dr. rer. nat (Bioinformatik)). In der Anwendung auf die ChIP-Chip und ChIP-Seq-Daten bestätigten sich im Wesentlichen die Ergebnisse der vorausgegangenen Pathwayanalyse (Meilenstein 2). Ergebnisse wurden an Meilenstein 4 weitergeleitet zur Entwicklung eines systembiologischen Modells der epigenetischen Veränderungen in alternder Haut; die Arbeiten an Meilenstein 3 waren damit abgeschlossen, alle Ziele des Meilensteins wurden erreicht.

Meilenstein 4: Entwicklung eines Systems-Level Modells der epigenetischen Veränderungen im Alter

Ziel von Meilenstein 4 war es, ein quantitatives, prädiktives, systembiologisches Modell der epigenetischen Veränderungen in der Hautalterung zu entwickeln und mit den im Projekt erhobenen Daten zu kalibrieren. Um dieses Ziel zu erreichen sollten die Ergebnisse aus den Meilensteinen 1 bis 3 integriert werden.

Durch Publikationen von dritter Seite ergaben sich an diesem Meilenstein Modifikationen. Zunächst wurde in 2012 in PNAS ein Artikel von Heyn et al veröffentlicht, in dem Methylierungsprofile von Neugeborenen mit denen in Hundertjährigen verglichen wurden. In 2013 erschien in der Fachzeitschrift Molecular Cell ein Artikel, der ein sehr ähnliches Modell wie das in diesem Meilenstein geplante Modell beschreibt (Hannum et al., Mol. Cell, 2013). Daten in dieser Publikation stammen aus Periphärblut und ganzem Gewebe, dies vernachlässigt die Existenz verschiedener Methylierungsmuster in unterschiedlichem Gewebe wie in unseren eigenen Daten gezeigt (Meilenstein 1), die Publikation eröffnete dadurch die Möglichkeit, diesen Aspekt weiter zu untersuchen. Kurze Zeit später erschien ein weiterer Artikel in der Fachzeitschrift Genome Biology, in der ein quantitatives, prädiktives Modell der altersassoziierten epigenetischen Veränderung in einem breitem Spektrum verschiedener Gewebe und Zelltypen entwickelt und untersucht wurde (Horvath,

Genome Biology, 2013). Beide Modelle wurden verglichen und auf AgeNet-Daten angewendet, sowie mit den in Meilenstein 1-3 entwickelten Modellen verglichen.

Im Vergleich unserer Ergebnisse mit dem Heyn et al.-Papers zeigte sich, dass einige Unterschiede in Signaturen auftraten, die vermutlich durch entwicklungsbedingte Methylierungsprozesse in den von Heyn et al. untersuchten sehr jungen Probanden auftreten, während in AgeNet junge Erwachsene untersucht wurden (jeweils in der „Jungen“ Gruppe). Ähnliche Unterschiede wurden auch in Vergleich unserer Signaturen zu Hannum et al. beobachtet, eine Erklärung ist die Verwendung von Periphärblut und ganzem Gewebe in Hannum et al., während in unseren Daten Dermis und Epidermis separat untersucht wurden.

In der Anwendung des gewebeübergreifenden Prädiktors aus Horvath et al. auf die AgeNet-Daten zeigte sich, dass der prädiktive Wert des Horvath-Modells deutlich schlechter ist als der unseres eigenen, Haut-spezifischen Prädiktors. Dies deutet darauf hin, dass es hautspezifische Besonderheiten in der altersabhängigen Methylierung gibt, erklärbar z.B. durch die besonders exponierte Lage von Dermis und Epidermis gegen Umwelteinflüsse.

Daraufhin wurde entschieden, mit der Entwicklung eines eigenen, Haut-spezifischen Modells basierend auf den Ergebnissen der Meilensteine 1 bis 3 fortzufahren. Entsprechend wurden die Ergebnisse der Meilensteine 1-3 in ein „finales“ systembiologisches, quantitatives und prädiktives Modell integriert, das hautspezifische Signaturen zur Vorhersage des „biologischen“ Alters einer Hautprobe verwendet, und gleichzeitig Informationen zu den relevanten biologischen Prozessen liefert. Mit diesem Modell konnte eine mittlere Vorhersagegenauigkeit (Kreuzvalidiert) von etwas unter 8 Jahren erreicht werden, das Modell wurde des weiteren verwendet um vorzeitig gealterte „junge“ Probanden sowie junggebliebene „alte“ Probanden zu identifizieren. Die erzielten Ergebnisse wurden dem Projektpartner Beiersdorf übergeben und dort mit großem Enthusiasmus aufgenommen. Im Anschluss an AgeNet entstand hieraus eine enge weitere, projektbezogene Zusammenarbeit zu diesem Thema zwischen der Firma Beiersdorf und der Arbeitsgruppe Kaderali, um einzelne Ergebnisse weiter zu vertiefen und mit zusätzlichen, ausserhalb von AgeNet erhobenen proprietären Daten der Firma Beiersdorf zu validieren.

Der Meilenstein wurde erfolgreich abgeschlossen, alle Ziele konnten vollumfänglich erreicht werden.

Meilenstein 5: Publikation von Ergebnissen

Aus den Arbeiten zu WP4 / AG Kaderali sind mehrere Publikationen hervorgegangen:

- Raddatz G, Hagemann S, Aran D, Söhle J, Kulkarni P, Kaderali L, Hellman A, Winnefeld M, Lyko F (2013): Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. *Epigenetics&Chromatin* 6(1):36
- Amberkar S, Kiani NA, Bartenschlager R, Alivis G, Kaderali L (2013): High-throughput RNA interference screens integrative analysis: Towards a comprehensive understanding of the virus-host interplay. *World J Virol* 2(2):18-31
- Amberkar S, Kaderali L (2015): An integrative approach for a network based meta-analysis of viral RNAi screens. *Algorithms Mol Biol* 10:6

Ziele dieses Meilensteins wurden vollumfänglich erreicht.

II.2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Pos. 0843: Verbrauchsmaterial

An Verbrauchsmaterial wurden Softwarelizenzen der Firma The Mathworks (Matlab und zugehörige Toolboxes) sowie eine Ingenuity Pathway Analysis (IPA)-Lizenz der Firma Qiagen beschafft. Die Matlab-Lizenzen wurden über die gesamte Projektlaufzeit für die Datenanalyse und Modellentwicklung benötigt, IPA wurde für die Pathway- und Geneset-Enrichment-Analysen in den Arbeitspaketen 2 und 4 benötigt. Die Beschaffungen der Lizenzen entsprachen den Planungen.

Pos. 0812: Personal

An Personalkosten wurden zwei Doktorandenstellen über die gesamte Projektlaufzeit bewilligt, um die Aufgaben jeweils in den Arbeitspaketen 2 bzw. 4 durchzuführen. Jeweils ein Doktorand war dabei für Arbeitspaket 2 und für Arbeitspaket 4 zuständig.

Durch den Wechsel von Prof. Kaderali von der Universität Heidelberg an die TU Dresden kam es zum Projektbeginn zu Verzögerungen, da das Projekt transferiert werden musste. Hierdurch konnten Stellen zum Projektstart nicht sofort besetzt werden. In Absprache mit dem Projektträger wurde der dadurch entstandene Zeitverlust durch Doppelbesetzungen nach erfolgtem Transfer des Projektes nach Dresden aufgeholt, es kam zu keiner Beeinträchtigung anderer Arbeitspakete, und alle Meilensteine konnten plangemäß abgeschlossen werden.

Pos. 0850: Investitionen

An Investitionen wurde ein projektspezifisch genutzter Laptop mit externem Display und Zubehör (Kabel, Maus, Adaptoren etc.) über die Firma a.s.t.i. GmbH beschafft.

Vergabe von Aufträgen:

Nicht zutreffend.

II.3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die zunehmende Alterung der menschlichen Gesellschaft hat substantielle volkswirtschaftliche Auswirkungen auf die bestehenden Gesundheitssysteme. So ist das Alter beispielsweise der wichtigste Risikofaktor für die Krebsentstehung, und auch viele weitere Erkrankungen stehen in direktem Bezug zum Alter der Bevölkerung. Das Verbundprojekt AgeNet hat sich zum Ziel gesetzt, neue altersabhängige zelluläre Regulationsmechanismen zu identifizieren und zu charakterisieren. Mittels systembiologischer Ansätze sollten Modelle geschaffen werden, die ein umfassendes Verständnis pathogener Alterungsvorgänge erlauben.

In den beiden Arbeitspaketen an denen die TUD beteiligt ist sollten

- Grundlagen der Regulation des Telomer-Loopings untersucht werden, um die Grundlagen zu schaffen zu verstehen, wann Telomer-Disfunktion durch Alterungsprozesse auftritt, und wie dies die altersabhängige Genominstabilität beeinflusst. Diese Fragestellung hat eine grundlegende Bedeutung z.B. im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, die gehäuft im fortgeschrittenen Alter auftreten.
- Die epigenetische Regulation von zellulären Prozessen in alternder Haut untersuchen, um Hinweise darauf zu erhalten wie Alterungsprozesse insbesondere in der Haut ablaufen, und längerfristig darauf hinarbeiten wie diese ggf. verlangsamt, aufgehalten oder gar rückgängig gemacht werden können.

Beide Fragestellungen haben eine fundamentale Bedeutung für die Allgemeinheit, da sie grundlegende Prozesse der Alterung untersuchen mit einem direkten Bezug zu altersassoziierten Krankheiten. In WP3 konnten neue regulatorische Mechanismen identifiziert werden, die das Telomer-Looping steuern, diese Ergebnisse dürften von großem Interesse für die wissenschaftliche Community im Bereich Altersforschung sein; in WP4 gelang es, ein prädiktives Modell der epigenetischen Hautalterung zu entwickeln, das von der Firma Beiersdorf weiter genutzt wird um Hautalterung weiter zu untersuchen, wichtige epigenetische Prozesse in der Hautalterung weiter zu charakterisieren, um mittel- bis langfristig therapeutische Optionen zu entwickeln.

Neben den biologischen / biomedizinischen Erkenntnissen wie oben dargestellt sind auf methodischer Seite neue Algorithmen zur Netzwerkinferenz und integrativen Datenanalyse entwickelt worden, die in der wissenschaftlichen Community sehr gut aufgenommen wurden (Zitierungen von methodischen Publikationen, Downloads der entwickelten Softwareprogramme).

Um die Projektziele erreichen zu können sind beim Partner TUD für die Datenanalyse und Modellentwicklung im Rahmen von AgeNet hauptsächlich Personalkosten für 2 Doktoranden für WP3 und WP4 angefallen, sowie anteilig geringe Kosten für benötigte Softwarelizenzen. Der Mittelverbrauch für das Projekt ist dabei als angemessen zum Erkenntnisgewinn zu betrachten.

II.4. Voraussichtlicher Nutzens, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Verwertung von Ergebnissen der Teilprojekte der TU Dresden (WP3 und WP4) ist bisher wesentlich über Präsentationen auf Fachkonferenzen und wissenschaftliche Publikationen in Fachzeitschriften erfolgt. Aus den Arbeiten an WP3 und WP4 sind fünf Publikationen unmittelbar aus AgeNet hervorgegangen, aus dem Projekt ist eine Masterarbeit hervorgegangen die im Frühling dieses Jahres mit einer weiteren Publikation in der renommierten Fachzeitschrift „Bioinformatics“ erfolgreich abgeschlossen werden konnte, und die auf Ergebnisse aus AgeNet aufbaut. Darüber hinaus wurden in AgeNet entwickelte Softwareprogramme über Open-Source-Lizenzen der wissenschaftlichen Community kostenfrei zur Verfügung gestellt, z.B. als Paket innerhalb des Open-Source Bioinformatik-Repositories Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

Eine wirtschaftliche Anschlussfähigkeit ist gegeben insbesondere für die Ergebnisse aus WP4 („A systems biology approach for the characterization of age-related epigenetic changes“), das unter direkter Beteiligung des Industriepartners Beiersdorf AG durchgeführt wurde. Epigenetische Signaturen für die Hautalterung, insbesondere auf Ebene von molekularen Prozessen (und nicht individuellen Genen) sind von großem Interesse für die Beiersdorf AG, da diese Hinweise auf Ziele für Anti-Aging Produkte geben können. Die in AgeNet entwickelten prädiktiven Modelle der Hautalterung sind darüber hinaus von Interesse, da sie verwendet werden können, um molekular vorzeitig gealterte oder junggebliebene Probanden identifizieren zu können, die wiederum Hinweise auf alterungsassoziierte molekulare Prozesse und damit mögliche Medikamentenziele geben können. Die Zusammenarbeit zwischen der AG Kaderali und der Beiersdorf AG in diesem Kontext wird über das Projektende von AgeNet hinaus fortgeführt.

Eine Anschlussfähigkeit ist also sowohl aus wirtschaftlicher wie auch wissenschaftlicher Sicht gegeben.

II.5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Projektverlaufes wurden von Dritten Publikationen veröffentlicht, die einen direkten Bezug zu der im Projekt untersuchten Fragestellung und Zielsetzung aufweisen. Dies betrifft insbesondere WP4 („A systems biology approach for the characterization of age-related epigenetic changes“). Folgende Publikationen wurden von dritten während der Projektlaufzeit veröffentlicht:

1. Heyn H, Li N, Ferreira HJ et al. (2012), Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians, *Proc Natl Acad Sci USA* 109(26):10522-7
2. Hannum G, Huinney J, Zhao L et al. (2013), Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates, *Mol Cell* 49(2):359-67
3. Horvath S (2013), DNA methylation age of human tissues and cell types, *Genome Biol.* 14(10):R115

Die genannten Arbeiten sowie weitere aktuelle Literatur wurden in das Vorhaben miteinbezogen. Eine detailliertere Beschreibung der durchgeführten Arbeiten und wie die genannten Veröffentlichungen einbezogen wurde findet sich in Abschnitt II.1 des vorliegenden Berichts.

II.6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11

1. Poschke, H., Dees, M., Chang, M., Amberkar, S., Kaderali, L., Rothstein, R., & Luke, B. (2012). Rif2 promotes a telomere fold-back structure through Rpd3L recruitment in budding yeast. **PLoS Genet**, 8(9), e1002960. doi: 10.1371/journal.pgen.1002960
2. Knapp, B., & Kaderali, L. (2013). Reconstruction of cellular signal transduction networks using perturbation assays and linear programming. **Plos One**, 8(7), e69220. doi: 10.1371/journal.pone.0069220
3. Raddatz, G., Hagemann, S., Aran, D., Sohle, J., Kulkarni, P.P., Kaderali, L., Hellman, A., Winnefeld, M., & Lyko, F. (2013). Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis. **Epigenetics Chromatin**, 6(1), 36. doi: 10.1186/1756-8935-6-36
4. Amberkar, S.S., & Kaderali, L. (2015). An integrative approach for a network based meta-analysis of viral RNAi screens. **Algorithms Mol Biol**, 10, 6. doi: 10.1186/s13015-015-0035-7
5. Amberkar, S., Kiani, N.A., Bartenschlager, R., Alvisi, G., & Kaderali, L. (2013). High-throughput RNA interference screens integrative analysis: Towards a comprehensive understanding of the virus-host interplay. **World J Virol**, 2(2), 18-31. doi: 10.5501/wjv.v2.i2.18