



**Technische Universität München; Fakultät für Medizin
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und
Hygiene
Trogerstr. 30; 81675 München**

**CompLS -Runde 1-TIDY -Toolbox für die Inferenz
zellulärer Dynamik in Geweben- Teilprojekt C**

Dr. Michael Floßdorf ; Dr. Atefeh Kazeroonian

031 L0170C

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Zuwendungsempfänger:
Technische Universität München

Förderkennzeichen: **031L0170C**

Vorhabenbezeichnung:
**e:Bio – Computational Life Science:
TIDY – Toolbox für die Inferenz zellulärer Dynamik in Geweben - Teilprojekt C**

Laufzeit des Vorhabens: **01.04.2019 - 31.12.2022**

I Kurze Darstellung

a. Aufgabenstellung und den wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde

Zellproliferation und -differenzierung sind wichtige Prozesse, die bei der Erhaltung von Gewebe, der Alterung, der Reaktion auf Umwelteinflüsse und dem Fortschreiten von Krankheiten eine Rolle spielen. Um diese Prozesse besser zu verstehen, wurden ausgefeilte experimentelle Instrumente zur Untersuchung der Zellproliferation und -differenzierung in vivo entwickelt. Parallel zu diesen experimentellen Fortschritten wurden datengesteuerte mathematische Methoden entwickelt, um die Eigenschaften der Zellproliferation und -differenzierung anhand dieser experimentellen Daten zu quantifizieren. Motiviert durch die Bedeutung der Zellproliferation für wichtige Homöostase- und Krankheitsprozesse bestand unser Hauptziel in diesem Projekt darin, die Geschwindigkeit der Zellteilung unter bestimmten Bedingungen und Signalen zu verstehen. Da die Zellteilungsrate in den meisten Fällen nicht durch kontinuierliche Beobachtung von Zellen im intakten Organismus gemessen werden kann, war unser Hauptziel die Entwicklung und Anwendung mathematischer Methoden zur Quantifizierung der Zellteilungsrate anhand von Zellmarkierungsdaten auf Populationsebene in vivo. Es gibt eine breite Palette von Markierungsmethoden für proliferierende Zellen, um das Proliferationsverhalten von Zellen in vivo zu untersuchen, wie z. B. DNA-Markierungsmethoden (z. B. BrdU und EdU) (Cavanagh et al. 2011) und Fluoreszenzfarbstoffe wie Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) und Cell Trace Violet (CTV) (Lyons et al., 2013). Mathematische Methoden zur Extraktion von Zellproliferationsraten aus diesen Daten wurden von vielen Gruppen entwickelt (de Boer und Perelson, 2013). Während diese Standardmethoden gut bekannt sind, gab es Bereiche, in denen Verbesserungen erforderlich waren, insbesondere in Bezug auf (i) die Gestaltung und Interpretation der DNA-Markierung durch Thymidin-Analoga und (ii) die Auswirkungen der Populationsheterogenität. Die Populationsheterogenität stellte eine Schwierigkeit bei der Analyse von CFSE-Markierungsdaten dar, da die Identifizierung einzelner Gattungen für die Ableitung von Vermehrungsraten von wesentlicher Bedeutung ist. Bei DNA-Markierungsexperimenten stützten sich die derzeitigen Methoden auf einen einzigen Farbstoff, der zwei oder mehr verschiedene Zeitpunkte während der Markie-

rung oder De-Markierung erfordert, um die Proliferationsraten zu bestimmen. In vivo bedeutet dies, dass die Proliferation bei einem einzelnen Tier nicht abgeschätzt werden kann. In diesem Projekt wollten wir mathematische Methoden entwickeln, um diese Unzulänglichkeiten zu beheben.

b. Planung und Ablauf des Vorhabens

Der Zeitplan der Arbeitspakete sind in Tabelle 1 dargestellt.

WP#	Meilenstein	01.04.2019 – 31.12.2019	01.01.2020 – 31.12.2020	01.01.2021 – 31.12.2021	01.01.2022 – 31.12.2022
WP TUM	Zellzyklus-Quantifizierung basierend auf DNA-Doppelmarkierung				
	Robustes Fitten von CFSE-Floureszenzintensitäts-verteilungen				
	Vorhersage des klinischen Ergebnisses basierend auf multimodalen Datensätzen				

Tabelle 1. Ablauf des Vorhabens.

c. die wesentlichen Ergebnisse sowie ggf. die Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Wir haben ODE-basierte Parameterschätzungswerkzeuge entwickelt, um Proliferationsraten aus Zellpopulationstests abzuleiten. Wir haben uns hauptsächlich auf zwei Arten von Proliferationsmarkern konzentriert: 1) duale Markierung von DNA und Thymidinanaloga und 2) generationsaufgelöste Markierung aus CFSE- und Cell Trace Violet (CTV)-Daten.

Bei CFSE- und CTV-Markierungsexperimenten werden die Daten in der Regel mittels Durchflusszytometrie gewonnen, was die Frage aufwirft, wo die "Tore" für markierungspositive und -negative Subpopulationen gesetzt werden sollten. Dies ist besonders wichtig, da durch die Verdünnung des Farbstoffs verschiedene Generationen in einer proliferierenden Zellpopulation nachgewiesen werden können. In diesem Projekt haben wir fortschrittliche mathematische Methoden entwickelt, um die Heterogenität der Population zu berücksichtigen und verschiedene Generationen in CFSE- und CTV-Profilen zu dekonvolvieren.

Bei den DNA-Markierungsexperimenten verwendeten wir eine duale DNA-Markierung - eine Kombination aus BrdU-Markierung (i.p.) und DNA-Quantifizierung mit 7-Aminoactinomycin - ähnlich wie in einer kürzlich durchgeführten Studie, in der die Kombination von BrdU und EdU zur Quantifizierung der Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen in Mäusen mit einer einzigen durchflusszytometrischen Messung verwendet wurde (Akinduro et al., 2018).

Wir haben eine mathematische Methode entwickelt, die die Zellproliferationsraten auf der Grundlage einer einzigen Zeitmessung in solchen Doppelfärbeexperimenten quantifiziert.

Bei diesem Projekt haben wir sehr von der Zusammenarbeit mit den Gruppen von Prof. Thomas Höfer, Dr. Carsten Marr, Prof. Dirk Busch, Dr. Veit Buchholz und Prof. Markus Gerhard profitiert.

II Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele und der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Das Hauptziel dieses Projekts war die Entwicklung mathematischer Methoden für die Ableitung von Zellproliferationsraten in vivo. Die wichtigsten Ergebnisse des Projekts werden im Folgenden in Form von drei Hauptabschnitten zusammengefasst.

1.1 Zellzyklus-Quantifizierung basierend auf DNA-Doppelmarkierung

In unseren Vorarbeiten hatten wir eine Näherungsformel für die Quantifizierung der Zellzykluslänge mit hoher Genauigkeit abgeleitet (vgl. Abschnitt "Eigene Vorarbeiten" der Projektbeschreibung):

$$p \approx 2 \lambda \Delta t - 2 p_{G2M},$$

In dieser Formel bezeichnet p den Anteil der DNA2N/BrdU+-Zellen (vgl. "Divided"-Gate in Abb. 1A), λ die Proliferationsrate, Δt das Zeitintervall zwischen der BrdU-Injektion und der DNA-Quantifizierung und p_{G2M} den Anteil der Zellen, die sich in der gleichgewichtigen G2- oder M-Phase des Zellzyklus befinden. Wir konnten einen Formalismus ableiten, um die erwarteten Anteile von Zellen in den jeweiligen DNA/BrdU-Quadranten (z. B. DNA2N/BrdU-, vgl. Abb. 1A) zu berechnen und somit die Mittelwerte der einzelnen Zellzyklusphasen für jedes beliebige DNA-Doppelmarkierungsexperiment zu quantifizieren (siehe Abb. 1A für ein Beispiel eines solchen Experiments). Um unseren abgeleiteten Formalismus zu validieren, haben wir Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt, um DNA-Doppelmarkierungsexperimente für gegebene experimentelle Parameter unter der Annahme realistischer Zellzyklusverteilungen zu simulieren. Diese Simulationen bestätigten die Annahmen, die unserem Formalismus zugrunde liegen, sowie die Genauigkeit der jeweiligen Zellzyklus-Quantifizierungen. Darüber hinaus konnten wir unsere Simulationen nutzen, um experimentelle Parameter zu optimieren (Abb. 1B).

Der Zelltod spielt eine wichtige Rolle bei der Ableitung korrekter Proliferationsraten. Daher untersuchten wir die Auswirkungen des Zelltods mit nicht-exponentiell verteilten Wartezeiten auf unser Quantifizierungsschema. Wir konnten zeigen, dass unsere Quantifizierungsergebnisse selbst bei stark nicht-exponentiellen Verteilungen der Wartezeiten für den Zelltod robust sind (Abb. 1C und D).

Als wichtige Anwendung unserer Methodik in der immunologischen Forschung haben wir unsere Methodik eingesetzt, um die Vermehrungsrate von T-Zellen während einer akuten

Infektion zu untersuchen. Wir untersuchten die Zellzyklusraten von zwei Phänotypen - zentralen Gedächtnis-T-Zellen (CMP) und Effektor-T-Zellen (non-CMP) - in Bezug auf zwei verschiedene Stimulationsbedingungen nach der Aktivierung. Während im Kontrollexperiment keine Intervention bezüglich des Antigenstimulus erfolgte, wurde der Stimulus in der Behandlungsgruppe nach einer gewissen Zeit unter Zugabe von Diphterietoxin (DTx) unterdrückt (Experimente: Arbeitsgruppe von Veit Buchholz). Mit unserer Methodik konnten wir zeigen, dass die Proliferationsrate der CMPs stärker von der Antigenverfügbarkeit abhängt als die Rate der Effektorzellen (Abb. 1E).

Da Zellpopulationen in ihren Zellteilungsgeschwindigkeiten heterogen sein können, haben wir untersucht, wie die Genauigkeit unseres Formalismus durch die Varianz in den Zwischenteilungszeiten und Zellzyklusphasenverteilungen beeinflusst wird.

Zu diesem Zweck wurde die ungefähre Beziehung zwischen der mittleren Wachstumsrate c und der zugrundeliegenden Interdivisionszeitverteilung $D(T_{\text{div}})$ ermittelt. Für Verteilungen, die starke Spitzenwerte um ihren Mittelwert aufweisen, ist diese Beziehung gegeben durch

$$c = \frac{\ln(2)}{D(T_{\text{div}})}.$$

Wir untersuchten, ob diese Beziehung auch für Verteilungen, die durch eine erhebliche Variabilität gekennzeichnet sind, näherungsweise gilt. Wir verwendeten beispielhafte Zellzyklusparameter, die einer In-vitro-Stimulation von OT-I T Zellen unterliegen und in (Dowling et al., 2014) geschätzt wurden. Anschließend testeten wir die Leistung unseres Formalismus, indem wir ihn mit der genauen Definition des Wachstumsfaktors verglichen. Abb. 2A zeigt den relativen Fehler einer solchen Analyse in Bezug auf die Variabilität der zugrundeliegenden Verteilung der Teilungszeit. Die Näherungsformel schneidet erstaunlich gut ab, selbst bei großen Lebensläufen nahe bei eins.

Außerdem untersuchten wir die Gesamtgenauigkeit unserer Methode hinsichtlich der Gesamtvariabilität der Zellzyklus- und Phasenverteilungen. Basierend auf den zuvor erwähnten Parametern aus (Dowling et al., 2014) simulierten wir Daten für variierende CV in der Zeitverteilung zwischen den Teilungen und berechneten die zugrunde liegenden Parameter zurück. Der relative Fehler für die Mittelwerte der jeweiligen Zellzyklusphasen und die Gesamtlänge sind in Abb. 2B dargestellt. Während der Fehler für die S- und G2M-Phase bei großen Varianzen beträchtlich ist, liegt der Fehler für die Gesamtzellzykluslänge stets unter 20 %. Im Fall der quantifizierten Parameter einer lognormalverteilten Teilungszeit in (Dowling et al., 2014) kommen die Autoren auf einen CV von ca. 14 %. In diesem Regime liegen alle unsere Fehler unter 4 %. Es ist jedoch nicht klar, in welchem CV-Regime wir uns befinden, wenn wir mit In-vivo-Daten arbeiten.

Schließlich konnten wir unseren mathematischen Formalismus nutzen, um die Zellzyklusgeschwindigkeit von OT-I T Zellen während einer akuten *Listeria monocytogenes*-OVA-Infektion (L.m.-OVA) am Tag 4,5 und 8 nach der Infektion zu quantifizieren. Um den physiologischen Gegebenheiten der jeweiligen Zellpopulation Rechnung zu tragen, haben wir unsere Methode um das Vorhandensein ruhender Zellen korrigiert. Diese Fraktionen wurden durch FACS-Messungen des phosphorylierten Retinoblastom-Proteins (phospho-Rb) gewonnen, siehe (Gookin et al., 2017). Abb. 3 zeigt die Quantifizierungsergebnisse für zentrale Gedächtnisvorläuferzellen (CMP) und alle anderen Zellen (NCMP), einschließlich der Zellzykluszusammensetzung in Form der einzelnen Phasen. Es wird deutlich, dass sich die Zellen im Verlauf der Infektion verlangsamen.

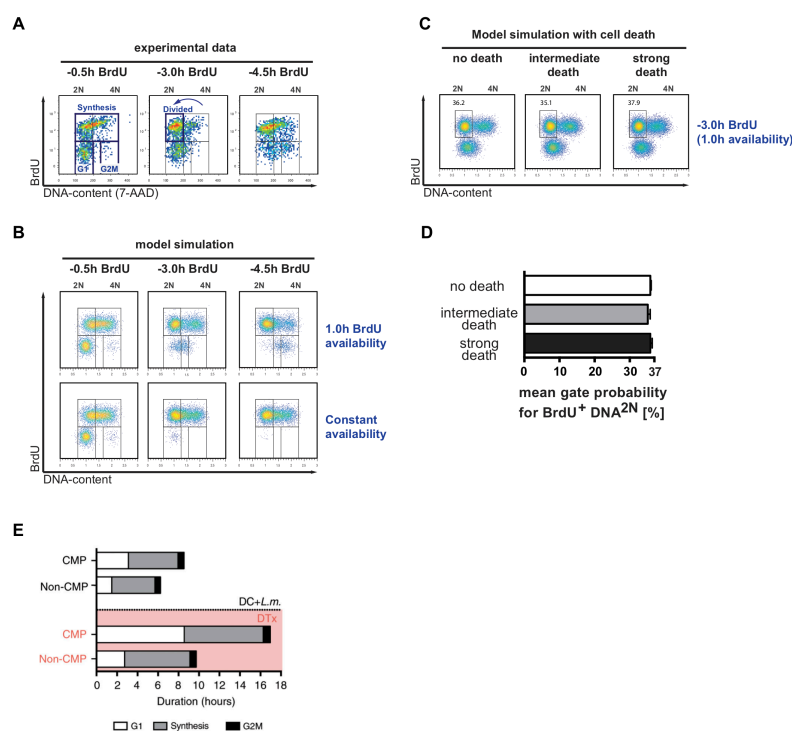


Abbildung 1. (A) Es wurden 50.000 naive OT1 T-Zellen in C57BL/6 Mäuse transferiert und diese mit *Listeria-Monocytogenes*-OVA infiziert (Arbeitsgruppe von Veit Buchholz). An Tag 4 nach Infektion wurde BrdU zu den angegebenen Zeitpunkten vor der Analyse verabreicht. Die Diagramme zeigen die BrdU/DNA-Profile der transferierten Zellen zum Zeitpunkt der Analyse. (B) Auf der Grundlage der experimentellen Messungen wurden Zellzyklusparameter berechnet. Die *in silico* generierten Diagramme zeigen den simulierten Zellzyklusverlauf unter der Annahme von 1.0 Stunden oder konstanter (4.5 Stunden) BrdU-Verfügbarkeit. (C) Durch Monte-Carlo-Simulationen gewonnene Diagramme mit zugrundeliegenden Teilungszeiten von 8.55 ± 0.95 Stunden, einer BrdU-Verfügbarkeit von einer Stunde und einem Analyse-Zeitpunkt von 3.0 Stunden. Die Simulationen wurden in Abwesenheit von Zelltod ("no death") und unter der Annahme log-normalverteilter Sterbezeitpunkte von 20 ± 4 Stunden ("intermediate death") oder 12 ± 3 Stunden ("strong

death") berechnet. (D) Balkendiagramm, welches für verschiedene Annahmen über Zellsterben die Wahrscheinlichkeit angibt, dass sich Zellen zum Zeitpunkt der Messung im DNA^{2N}/BrdU⁺-Quadranten befinden. Die Ergebnisse basieren auf Simulationen wie beschrieben in C. (E) Das Balkendiagramm stellt die berechneten durchschnittlichen Teilungszeiten und die jeweiligen Mittelwerte der Zellzyklusphasenlängen für den angegebenen Phänotyp (CMP: Central Memory Precursor) und die angegebene Stimulationsbedingung (Kontrolle vs. Diphtheria-Toxin (DTx)-Behandlung) dar. **Daten:** Michael Floßdorf, Jonas Mir, Lorenz Kretschmer und Veit Buchholz

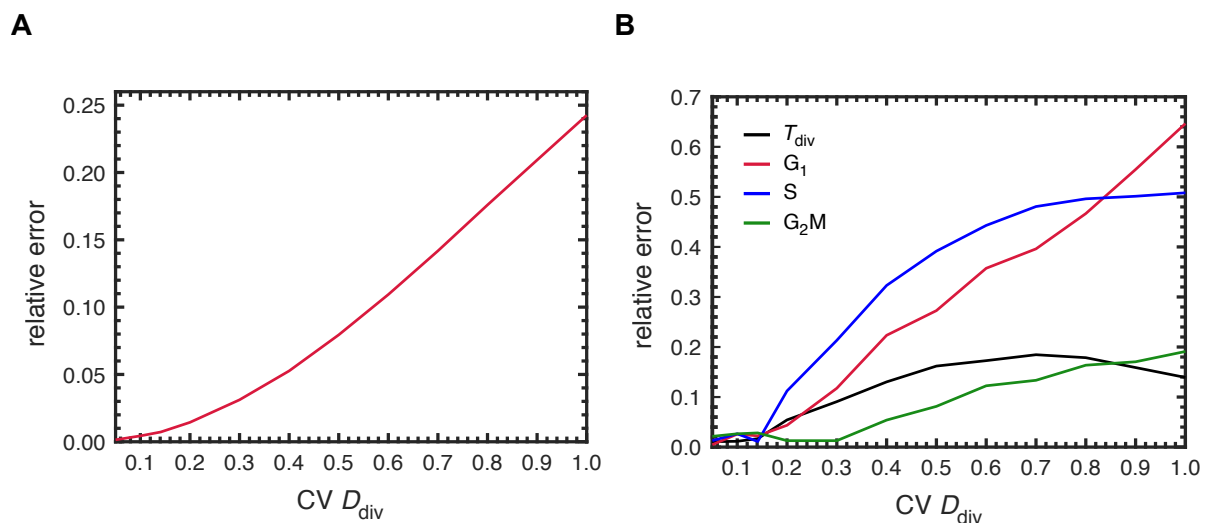


Abbildung 2. Stabilitätsanalyse in Bezug auf die Variabilität der Zellzykluslängenverteilung. (A) Relativer Fehler der approximativen Beziehung zwischen dem mittleren Wachstumsfaktor c und dem Mittelwert der Zellzykluslängenverteilung für verschiedene Variationskoeffizienten in der Verteilung der Teilungszeit. (B) Relativer Fehler der dargestellten geschätzten Zellzyklusparameter, basierend auf Rückrechnungen der simulierten Daten. **Daten/Analysen:** Jonas Mir, Michael Floßdorf

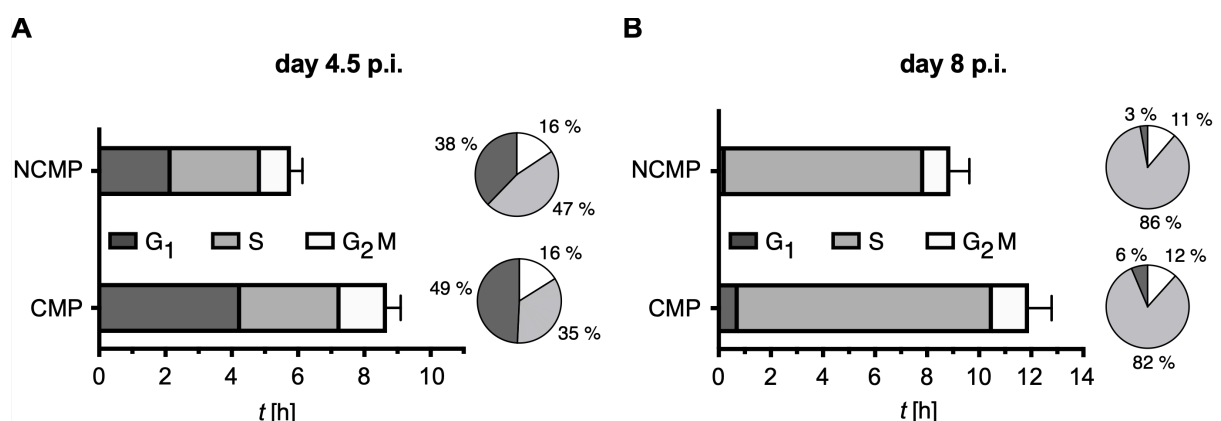


Abbildung 3. Ergebnisse der Zellzyklusquantifizierung am Tag 4,5 (A) und 8 (B) nach einer akuten *Listeria monocytogenes*-OVA-Infektion für zentrale Gedächtnisvorläuferzellen (CMP)

und den Rest der Zellen (NCMP). Die Tortendiagramme zeigen die durchschnittlichen Anteile der einzelnen Phasen im Verhältnis zur Gesamtzelllänge. Die Ergebnisse wurden um die ruhenden Zellen bereinigt. Von Tag 4,5 bis Tag 8 p.i. verlangsamten die Zellen ihre mittlere Teilungsrate. **Daten/Analysen:** Jonas Mir, Albulena Toska, Michael Floßdorf

1.2 Robustes Fitten von CFSE-Fluoreszenzintensitätsverteilungen

In unserer Vorarbeit hatten wir einen Algorithmus entwickelt, um CFSE-Profile zu analysieren und daraus auf die Zellteilungsgeschwindigkeit zu schließen. Im Rahmen dieses Projekts haben wir diesen Mix-Ture-Model-Ansatz erweitert, um die Robustheit und Genauigkeit der Inferenzmethode zu erhöhen. Erstens haben wir den Effekt der Hintergrundfluoreszenzintensität korrigiert, indem wir die einzelnen Modellverteilungen des Mischmodells mit der Hintergrundverteilung gefaltet haben. Zweitens haben wir ein gründliches Schema implementiert, um plausible Positionen für die Verteilung der ungeteilten Zellpopulation in ausreichend engen Intervallen vorzuschlagen: Für jede vorgeschlagene Position wurde eine optimale Anpassung an die Daten durchgeführt. Dieses Optimierungsverfahren wurde gleichzeitig für mehrere CFSE-Profile durchgeführt, um die Genauigkeit der vorgeschlagenen Positionen zu erhöhen. Dies ist besonders nützlich für CFSE-Profile, die mit der gleichen Verteilung verbunden sind und sich nur in Bezug auf die Anzahl der Zellen pro Generation unterscheiden. In diesem Fall kann man auf die Optimierung einzelner Positionen zurückgreifen und so eine für alle Profile gemeinsame Position definieren.

Um das Vertrauensniveau unserer Inferenzergebnisse zu quantifizieren, haben wir ein Verfahren zur Schätzung der Unsicherheit bei der Bestimmung der Positionen und der relativen Häufigkeit von Zellen in verschiedenen Generationen mit Hilfe eines Bootstrap-Ansatzes entwickelt (Abb. 4). Mit Hilfe dieses Bootstrap-Ansatzes konnten wir auch Korrelationen zwischen den geschätzten Parametern berechnen (Abb. 5). Diese Information ist besonders wichtig für die Verwendung der geschätzten Parameter - nach der Anpassung der CFSE-Profile - zur weiteren Kalibrierung der mathematischen Modelle, da sie eine Überschätzung der in den Parametern enthaltenen Informationen verhindert.

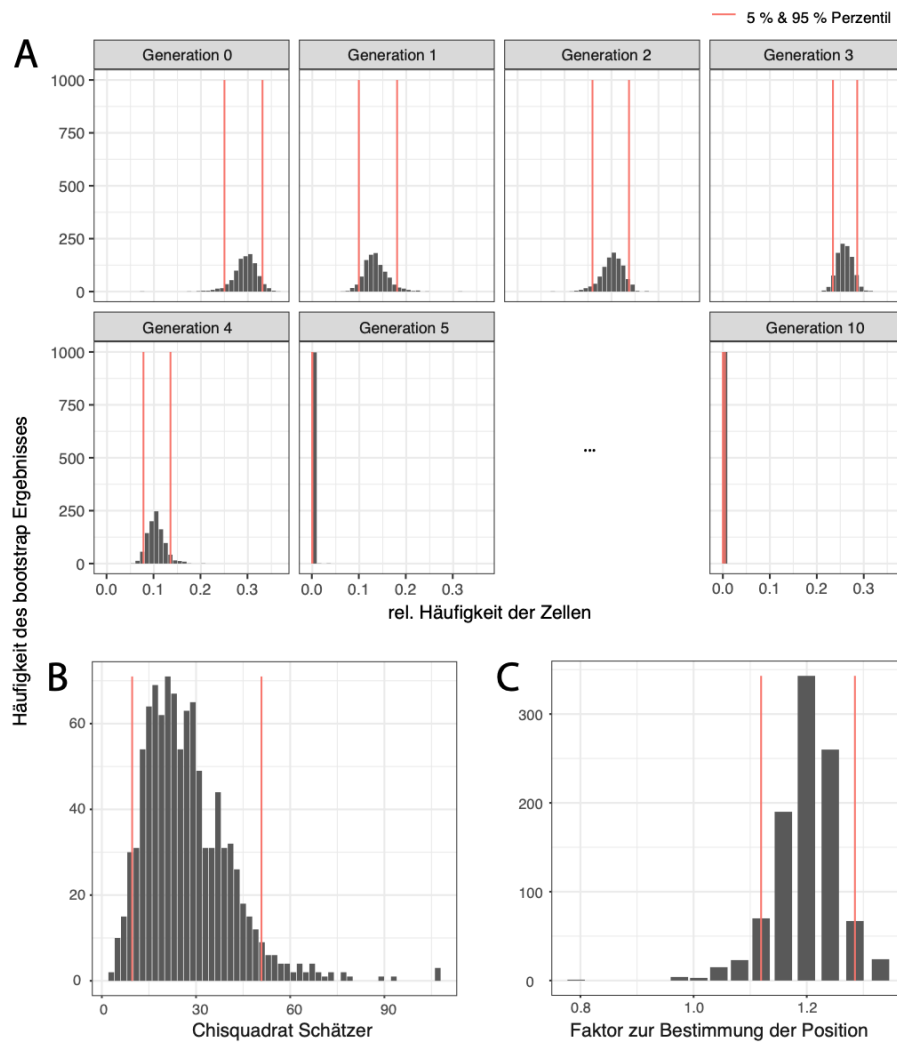


Abbildung 4. Geschätzte Häufigkeit der Zellen (A), Ergebnisse für den Chi-Quadrat-Schätzer (B) und geschätzter Faktor (C), durch den die absolute Helligkeit, d. h. die Helligkeit, der ungeteilten Modellverteilung bestimmt wird. **Daten/Analysen:** Lena Appel, Michael Floßdorf

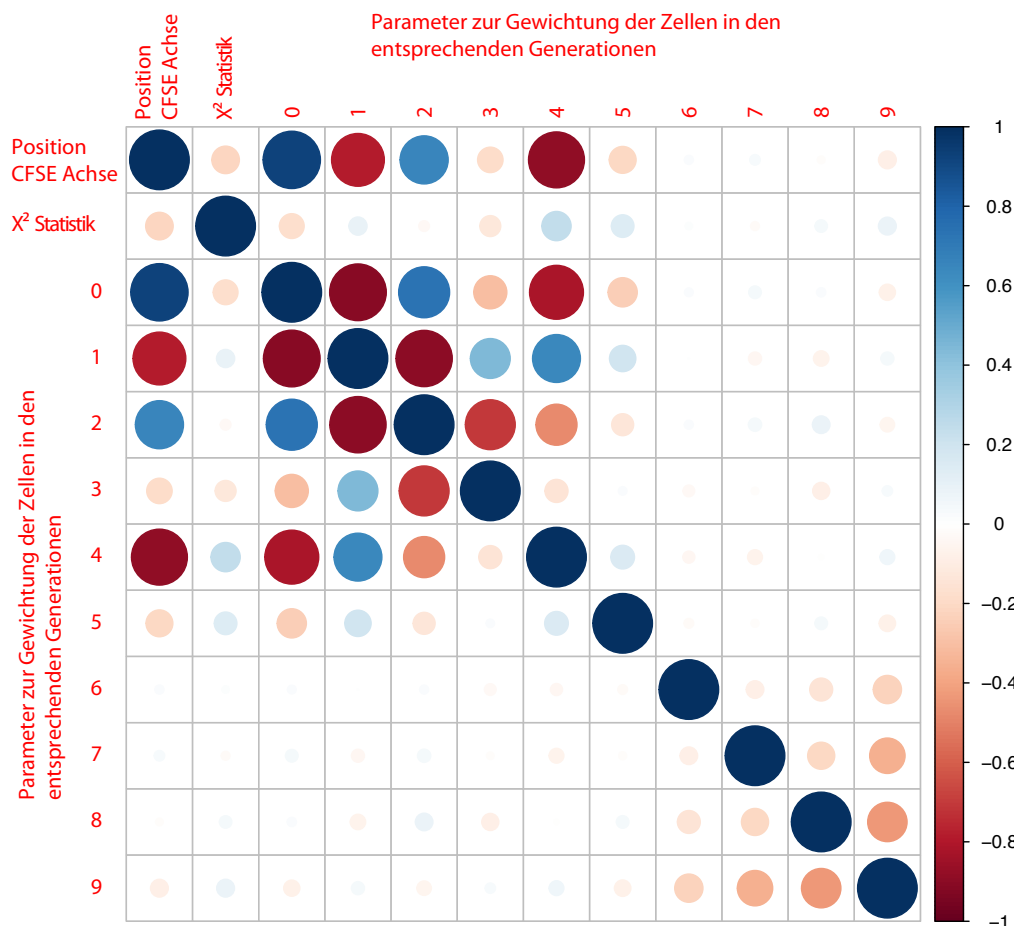


Abbildung 5. Korrelation zwischen den geschätzten Parametern. **Daten/Analysen:** Lena Appel, Michael Floßdorf

1.3 Vorhersage des klinischen Ergebnisses basierend auf multimodalen Datensätzen

In unserer Projektbeschreibung war ursprünglich vorgesehen, dass wir eine Open-Source-Software für die Quantifizierung von Proliferationsraten entwickeln und veröffentlichen. Aufgrund der Pandemie kam es jedoch zu einer sehr langen Verzögerung bei der Einstellung eines PhD-Studenten. Diese Verzögerung führte dazu, dass die Entwicklung der Software für die Forschungsgemeinschaft nicht von großer Bedeutung war, da zu diesem Zeitpunkt bereits andere Methoden oder Tools für die Quantifizierung der Vermehrungsraten zur Verfügung standen. Stattdessen bot unsere Zusammenarbeit innerhalb des MIH-Instituts eine

neue, hochmoderne Möglichkeit, an einem verwandten Thema zu arbeiten, das zum Zeitpunkt des Projektantrags noch unbekannt war. Bei dieser Forschungsmöglichkeit ging es um die Analyse heterogener Zellpopulationen in vivo unter Verwendung ähnlicher und reichhaltigerer In-vivo-Datensätze (Flow Cytometry, scRNAseq, usw.).

In dieser Arbeit haben wir Methoden des maschinellen Lernens und der künstlichen Intelligenz angewandt, um multimodale Datensätze (einschließlich klinischer Daten, RNA-Sequenzierung, Flow Cytometry und histologischer Daten) zu integrieren, um das klinische Ergebnis bei der Krebsentwicklung vorherzusagen. Dieses Projekt wurde von der Gruppe von Prof. Markus Gerhard am MIH konzipiert und geleitet. Die gesamte experimentelle Planung und Arbeit wurden ebenfalls von dieser Gruppe durchgeführt. Wir haben zu diesem Projekt mit einer teilweisen Data-Analyse beigetragen. Mithilfe von Methoden des maschinellen Lernens und der künstlichen Intelligenz konnten wir die wichtigsten zellulären Merkmale, insbesondere aus RNA-Sequenzierungsdaten, identifizieren, die für die Vorhersage der Schwere des Krebsfortschritts bei Mäusen entscheidend sind.

2. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Bedeutung der Zellproliferation für wichtige Homöostase- und Krankheitsprozesse (Abschnitt 1 dieses Berichts) sowie die Unzulänglichkeiten der bisherigen Forschung (Abschnitt 4.1 dieses Berichts) begründeten die Notwendigkeit unserer Arbeit. Die Arbeiten in diesem Projekt zielten darauf ab, diese Mängel zu beheben und grundlegende Fragen zu beantworten, die für das Verständnis der Zellproliferation und ihrer Verbindung zur Zelldifferenzierung und anderen biologischen Prozessen von wesentlicher Bedeutung sind. Da DNA-Markierungsexperimente und CFSE weit verbreitete Methoden zur Untersuchung der Zellproliferation in vivo sind, ist es wichtig, über Quantifizierungsmethoden zu verfügen, die genaue Rückschlüsse auf die Zellteilungsgeschwindigkeit auf der Grundlage dieser Experimente ermöglichen. Die Quantifizierungsverfahren, die wir in diesem Projekt entwickelt haben, sind in dieser Hinsicht von großem Nutzen, da sie 1) robuste und genaue Rückschlüsse auf die Zellteilungsgeschwindigkeiten unter verschiedenen Bedingungen ermöglichen und 2) eine Möglichkeit bieten, die Unsicherheit bei der Ableitung von Zellteilungsgeschwindigkeiten zu bewerten. Letzteres ermöglicht die Bewertung des Vertrauensniveaus nachfolgender Implikationen, wie z. B. vorgeschlagene Therapiedesigns.

3. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Angesichts unserer Ergebnisse zur Quantifizierung der Zellzyklusgeschwindigkeit für proliferierende Zellpopulationen und der Verbindung zur Differenzierung erwarten wir, dass

wir die weitere Erforschung der miteinander verflochtenen Mechanismen von Zellzyklusgeschwindigkeit und zellulärer Differenzierung vorantreiben werden; dies wird zu einem besseren Verständnis der regulatorischen Prozesse in schnell zyklierenden Zellen, beispielsweise im Immunsystem, führen. Unsere für die Quantifizierung von Zellteilungszeiten entwickelten Inferenzmethoden werden allen Forschern, die dynamische und sich entwickelnde Zellpopulationen untersuchen, eine Hilfe sein.

Hauptanwendungsgebiete werden die Krebsforschung und die Immuntherapie sein, da sowohl das Immunsystem als auch Krebs durch proliferierende, heterogene und dynamische Zellpopulationen gekennzeichnet sind.

In dieser Hinsicht wirft die Anwendung unserer Berechnungsmethoden auf In-vitro- und In-vivo-T-Zellpopulationen ein neues Licht auf die dynamische Regulierung von CD8+-T-Zellantworten und kann wichtige Auswirkungen auf die Entwicklung künftiger Impfstoffe und Immuntherapien haben.

4. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Arbeit von Akinduro und Kollegen (Akinduro et al., Nature Communications 2018) beschreibt wie eine Kombination von BrdU zusammen mit einem zweiten Thymidinanalogon, 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU), dazu verwendet werden kann, die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen auf der Grundlage einer einzigen durchflusszytometrischen Messung zu quantifizieren: Auf eine erste Injektion von EdU folgt zwei Stunden später ein zweiter Puls BrdU. Unter der Annahme, dass EdU sofort abgebaut würde, identifizieren die Autoren den Anteil der BrdU⁺/EdU⁻ Zellen mit dem Anteil der Zellen, die innerhalb der zwei Stunden zwischen den beiden Injektionen in die S-Phase eingetreten sind; diese Fraktion entspricht dann ungefähr der doppelten Proliferationsrate. Die Abbaukinetik von EdU untersuchen die Autoren nicht; tatsächlich finden wir in unseren Experimenten, dass sowohl EdU als auch BrdU vermutlich etwa eine Stunde lang verfügbar ist.

Eine Arbeit von Chao und Kollegen (Chao et al. Molecular Systems Biology, 2019) untersucht die Verteilung von Zellzyklusphasen während der Zellteilung. Die Autoren zeigen, dass die einzelnen Zellzyklusphasen unabhängig voneinander verteilt sind und durch eine Erlang-Verteilung beschrieben werden können. Im Gegensatz zum „Stretched Cell Cycle Model“ (Dowling et al., PNAS, 2014), das eine Proportionalität der Zellzykluslängen postuliert, ist dieses Ergebnis im Einklang mit den Grundannahmen unseres Modells zur Quantifizierung des Zellzykluses in vivo.

5. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Zurzeit noch keine Veröffentlichungen. Die Arbeiten zur ML/KI-basierten Vorhersage des klinischen Ergebnisses unter Verwendung multimodaler Datensätze (Abschnitt 1.3 dieses Berichts) werden derzeit zur Veröffentlichung vorbereitet.

References:

1. Akinduro O, Weber TS, Ang H, Haltalli MLR, Ruivo N, Duarte D, Rashidi NM, Hawkins ED, Duffy KR, Lo Celso C (2018) Proliferation dynamics of acute myeloid leukaemia and haematopoietic progenitors competing for bone marrow space. *Nat Commun.* 9(1):519.
2. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya AC (2011) Thymidine analogues for tracking DNA synthesis. *Molecules* 16, 7980–7993.
3. Chao HX, Fakhreddin RI, Shimerov HK, Kedziora KM, Kumar RJ, Perez J, Limas JC, Grant GD, Cook JG, Gupta GP, Purvis JE. Evidence that the human cell cycle is a series of uncoupled, memoryless phases. *Mol Syst Biol.* 2019 Mar 18;15(3):e8604. doi: 10.15252/msb.20188604. PMID: 30886052; PMCID: PMC6423720.
4. de Boer, R.J., and Perelson, A.S. (2013). Quantifying T lymphocyte turnover. *J Theor Biol* 327, 45–87.
5. Dowling, M.R., Kan, A., Heinzl, S., Zhou, J.H.S., Marchingo, J.M., Wellard, C.J., Markham, J.F., and Hodgkin, P.D. (2014). Stretched cell cycle model for proliferating lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, 6377–6382.
6. Gookin S, Min M, Phadke H, Chung M, Moser J, Miller I, Carter D, Spencer SL. A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLoS Biol.* 2017 Sep 11;15(9):e2003268. doi: 10.1371/journal.pbio.2003268. PMID: 28892491; PMCID: PMC5608403.
7. Lyons AB, Blake SJ, Doherty KV (2013) Flow cytometric analysis of cell division by dilution of CFSE and related dyes. *Curr Protoc Cytom.* Chapter 9.
8. Matiašová, A., Sevc, J., Mikeš, J., Jendželovský, R., Daxnerová, Z., and Fedoročko, P. (2014). Flow cytometric determination of 5-bromo-2'-deoxyuridine pharmacokinetics in blood serum after intraperitoneal administration to rats and mice. *Histochem. Cell Biol.* 142, 703–712.
9. Schaniel C, Moore KA (2009) Genetic models to study quiescent stem cells and their niches. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1176, 26–35.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht		
3. Titel Schlussbericht für e:Bio – Computational Life Science: TIDY – Toolbox für die Inferenz zellulärer Dynamik in Geweben – Teilprojekt C			
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Kazeroonian, Atefeh		5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2022	
		6. Veröffentlichungsdatum -	
		7. Form der Publikation Bericht	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Technische Universität München - Fakultät für Medizin - Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene Trogerstraße 30 81675 München		9. Ber.-Nr. Durchführende Institution	
		10. Förderkennzeichen 031L0170C	
		11. Seitenzahl 15	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn		13. Literaturangaben 9	
		14. Tabellen 1	
		15. Abbildungen 5	
16. DOI (Digital Object Identifier) -			
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -			
18. Kurzfassung Zellproliferation und -differenzierung sind wichtige Prozesse, die bei der Aufrechterhaltung des Gewebes, der Alterung, der Reaktion auf Umwelteinflüsse und dem Fortschreiten von Krankheiten gesteuert werden. Um diese Prozesse besser zu verstehen, wurden hochentwickelte experimentelle Instrumente entwickelt, um die Zellproliferation und -differenzierung in vivo zu untersuchen. Parallel zu diesen experimentellen Fortschritten werden datengesteuerte mathematische Methoden benötigt, um aus diesen experimentellen Daten genaue Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zellproliferation und -differenzierung zu ziehen. Zu diesem Zweck haben wir ODE-basierte Parameterschätzungsmethoden entwickelt, um aus Zellpopulationstests auf die Proliferationsraten zu schließen. Wir konzentrierten uns hauptsächlich auf die Entwicklung von Methoden zur Ableitung von zwei Arten von Proliferationsmarkern: 1) Genaue Rückschlüsse aus der Doppelmarkierung von DNA und Thymidinanaloga und 2) Generationsaufgelöste Rückschlüsse aus CFSE- und Cell Trace Violet-Daten.			
19. Schlagwörter Zellproliferation, CFSE, DNA-Markierung, Parameterschätzung und Inferenz			
20. Verlag -		21. Preis Kostenlos	

Entwurf