

## spezial: biotechnologie mit system

ab seite 20

töten oder leben lassen –  
regulationsmechanismen  
von immunzellen

seite 8

40 jahre molekulargenetik –  
ein persönlicher rückblick

seite 20

synthetische biologie –  
neue werkzeuge  
nicht nur für biologen

seite 28

neue wege für eine  
nachhaltige biotechnologie

seite 44

wie blut entsteht – modellierung von  
differenzierungsdynamiken  
der blutbildung

seite 81

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



HELMHOLTZ  
| GEMEINSCHAFT



# systembiologie.de

Die Systembiologie ist eine junge und dynamische Disziplin mit dem Blick fürs Ganze. Als Teil der molekularen Lebenswissenschaften schlägt sie die Brücke zwischen ausgeklügeltem Laborexperiment und mathematischer Modellierung, zwischen hoch technisierter Erfassung von Messdaten und computergestützter Datenauswertung. Ihr Forschungsgegenstand sind die netzwerkartig verwobenen Abläufe der Signalübertragung und Stoffumwandlung in Zellen, Geweben, Organen und Organismen. Die systembiologische Forschung stellt sich dieser Komplexität, indem sie sich in fächerübergreifenden Netzwerken organisiert. Erfahren Sie im Magazin [systembiologie.de](http://systembiologie.de), wie dieser faszinierende und aufstrebende Wissenschaftszweig arbeitet und welche Antworten er auf die bislang ungelösten Fragen des menschlichen Lebens findet.



Titelbild: Wildtyp *Ralstonia eutropha* H16 mit PHB-Einschlüssen (Polyhydroxybuttersäure) zur Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen (siehe auch Artikel Seite 40 ff). ©Dr. Jens Kroll.

# grußwort

Liebe Leserinnen und Leser,



die Systembiologie erforscht, wie verschiedene Faktoren in unserer Umwelt zusammenspielen und ermöglicht so ein besseres Verständnis der biologischen Prozesse und Zusammenhänge. Systembiologische Forschung zeichnet ein Gesamtbild von den dynamischen Vorgängen des Lebens unter Einbeziehung sämtlicher Ebenen – vom Genom über das Proteom und die komplette Zelle bis hin zum vollständigen Organismus. Erkenntnisse der Systembiologie können so einen entscheidenden Beitrag zu Innovationen in den Lebenswissenschaften leisten.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat das Potenzial dieser jungen Fachrichtung rechtzeitig erkannt. Bereits vor rund zehn Jahren wurde der Förderschwerpunkt „Systeme des Lebens – Systembiologie“ aufgelegt. Seitdem haben wir mehr als 350 Millionen Euro in Fördermaßnahmen investiert und zu einer beispiellosen Entwicklung der Systembiologie in Deutschland beigetragen.

BMBF-Förderschwerpunkte wie „CancerSys“ und „GerontoSys“ leisten mit ihrem systemorientierten Forschungsansatz wertvolle Dienste in der Krebs- und Altersforschung. Das Pilotprojekt „HepatoSys“ sowie das seit 2010 bestehende Netzwerk „Virtuelle Leber“ finden international große Beachtung. Das Netzwerk „Virtuelle Leber“ ist weltweit einzigartig. Sein Ziel ist, die komplexen Entgiftungsprozesse dieses Organs zu untersuchen. Auch der Industrie bietet die Systembiologie interessante Verwendungsmöglichkeiten.

Die exzellente Forschungsinfrastruktur sowie neue Methoden verankern nachhaltig den systembiologischen Forschungsansatz in der lebenswissenschaftlichen Forschung in Deutschland. Durch internationale Koordinierungs- und Fördermaßnahmen ist Deutschland ein wichtiger Partner in grenzübergreifenden Netzwerken. Um die internationale Wettbewerbsfähigkeit dieser Forschungsbereiche in Deutschland zu stärken, setzt das BMBF auch in diesem Jahr die Förderung „e:Bio – Innovationswettbewerb Systembiologie“ fort.

Den Leserinnen und Lesern der fünften Ausgabe von systembiologie.de wünsche ich eine spannende Lektüre und interessante Einblicke in dieses faszinierende Forschungsfeld.

Prof. Dr. Annette Schavan, MdB  
Bundesministerin für Bildung und Forschung

# vorwort

## Wer nicht rackert, verдумmt!

Wer hätte schon gedacht, dass dieser fulminante Ausdruck das Leitmotiv unserer amtierenden Bundeskanzlerin, Dr. Angela Merkel, ist. Nun rackern wir schon seit gut zehn Jahren in der Systembiologie, aber sind wir wirklich grundlegend schlauer geworden? Hat die Systembiologie die immens großen Erwartungen, die an sie gerichtet wurden, erfüllen können?

Keine Frage: Das Feld der Systembiologie hat die Art und Weise, wie lebenswissenschaftliche Forschung betrieben wird, nachhaltig verändert. Sie hat vielzählige neue Einsichten in zelluläre und molekulare Mechanismen geliefert, die ohne eine enge Verknüpfung von Experiment und Theorie so nicht möglich gewesen wären. Aber wo steht die Systembiologie gut fünfzehn Jahre nach ihrer Begründung als eigenständige Disziplin und nach gut zehn Jahren intensiver Forschungsförderung in Deutschland, Europa, den USA und in Japan? Die Systembiologie entstand vor allem auf der Grundlage der Genomforschung, einer Nachbardisziplin, deren Technologieentwicklungen es damals erstmalig erlaubten, große Teile eines Systems auf Genom-, Transkriptom- und Proteomebene parallel zu beobachten. Die in der Genomforschung zunächst einsetzende Begeisterung wurde sehr schnell durch eine Welle der Frustration ersetzt, getrieben durch die nüchterne Erkenntnis, dass eine Beobachtung, z. B. der Expression zehntausender Gene in einem Experiment, nicht notwendigerweise einen Erkenntnisgewinn mit sich bringt.

Ein Verständnis der komplexen Regulation und Interaktion von Genen bedarf eines integrierten Ansatzes über Skalengrenzen hinweg und eben einer mathematischen Beschreibung dieser Interaktionen. Hier waren holistische Ansätze gefragt, die basierend auf einer möglichst umfassenden Datenbasis ein integriertes Modellverständnis von komplexen zellulären Abläufen ermöglicht. Erforderlich waren im Wesentlichen zwei Dinge: Zum einen die Entwicklung von Modellierungs- und Simulationsansätzen und zum anderen die Entwicklung von Technologien, die mit einem großen Durchsatz die parallele, quantitative Erfassung von zellulären Komponenten ermöglicht. Obschon gerade in Europa die modellbasierten Systembiologieansätze sich mit Macht ausgebreitet haben, basieren die quantitativen, experimentellen Messungen überwiegend noch auf Methoden, die bereits weit im letzten Jahrhundert den experimentellen Lebenswissenschaften zur Verfügung standen. Diese sich ständig ausweitende Kluft zwischen den immensen Möglichkeiten, die die Simulation großer zellulärer Systeme bietet, und den eklatant limitierten experimentellen Messmöglichkeiten, haben heute zu einem Punkt geführt, an dem bereits eine Systemkrise der Systembiologie diskutiert wird.

In vielerlei Hinsicht scheint die Zeit der Datensammler zurückgekommen zu sein. Mit den unfassbaren Möglichkeiten der Hochdurchsatzsequenzierung sind wir nun in der Lage, mit einem bislang ungeahnten Durchsatz das Genom oder Transkriptom eines Systems zu erfassen. Im Gegensatz zu den chipbasierten Transkriptionsanalysen zur Geburtsstunde der Systembiologie bringt die Hochdurchsatzsequenzierung nicht nur einen abermaligen Sprung in der Menge und Geschwindigkeit der Datenerhebung, sondern vielmehr erlaubt diese Technologie das absolute Zählen von Genom- oder Transkriptionsabschnitten. Somit bietet sich diese Technologie im Gegensatz zu den chipbasierten Ansätzen als Methode zur quantitativen Datenerfassung mit hohem Durchsatz an. Nur leider birgt diese Technologie auch ihre Tücken, denn nur wenige Labors auf dieser Welt sind derzeit in der Lage, mit den gewaltigen Datenmengen, die diese Technologie liefert, umzugehen. Zeitaufgelöste Studien basierend auf Hochdurchsatzsequenzierung sind daher bislang fast nicht zu finden, dafür stehen wir einer geradezu explodierenden Anzahl von Studien gegenüber, die auf Endpunkt- oder Gleichgewichts-Analysen beruhen. Die Bioinformatik ist hier als Disziplin gefragt wie selten zuvor. Die massiv-parallele Sequenzierung von Genomen in der Gesundheitsforschung stellt die Forschung in den Lebenswissenschaften vor grundlegende, bislang unbekannte Herausforderungen. Die Genomsequenzierung an einem weltweit führenden Zentrum erzeugt größenordnungs-



mäßig zehn Terabyte an Daten täglich und somit ebenso viele Daten wie die derzeitigen Datenweltmeister Twitter und Facebook global. Aber trotz all dieser Datenflut kann die ultimative Frage der Systembiologie, wie das räumlich und zeitlich fein abgestimmte Konzert der Gene, Transkripte und Proteine in komplexen zellulären Netzwerken funktioniert, nicht beantwortet werden, ohne dass die Systembiologie ihr theoretisches Systemverständnis dem gegenüberstellt.

Auch in den Bereich der Proteomik scheint Bewegung zu kommen: Nach Jahrzehnten von Immunoblotting als Standardmethode der Systembiologie für quantitative Proteinmessungen scheint sich die schrittweise Hochskalierung von massenspektrometrischen Ansätzen mehr und mehr durchzusetzen. Jedoch bietet auch dieser Ansatz nicht die Möglichkeit, die Zell-zu-Zellvariabilität oder die räumliche Verteilung von Molekülkonzentrationen in einzelnen Zellen zu erfassen. Hier sind bahnbrechend neue Technologien in der Mikroskopie wie die Lichtblatt-Mikroskopie in den letzten Jahren entwickelt worden, die in diesem für die Systembiologie so wichtigen Feld einen Durchbruch erhoffen lassen.

Trotz all dieser Fortschritte scheint die Gemeinschaft der Systembiologen noch immer weit von ihren Zielen, die sie in der Geburtsstunde der Systembiologie formuliert hat, entfernt zu sein. Nicht nur, dass wir grundlegend neue und gänzlich andere Einblicke in komplexe zelluläre Prozesse gewinnen wollten, vielmehr hat die Community schon damals einen Umbruch in der klinischen Medizin versprochen. Mit Hilfe systembiologischer Ansätze sollen grundsätzlich neue Wege zur Diagnose und Therapie von Patienten eingeschlagen werden. So postulierte vor knapp zehn Jahren bereits Thomas Paterson, technischer Vorstand von Entelos in den USA, dass die Systembiologie die Erfolgsrate von Clinical Trials in Phase II dramatisch erhöhen wird. Eine weitreichende Versprechung, die auch nach zehn Jahren rastloser Forschung und Entwicklung ihrer Einlösung harrt.

„Besessenheit ist der Motor – Verbissenheit ist die Bremse“, formulierte der russische Balletttänzer und Choreograf Rudolf Nurejew treffend in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts. Auch wir Systembiologen sind besessen von der Idee, dass ein strikt quantitativer und systemweiter Ansatz geradezu notwendige Voraussetzung ist, um die Ära der Datensammler und Jäger, die so sehr die Lebenswissenschaften in den letzten Jahrzehnten dominiert hat, abzulösen. Die Systembiologen sind aber gut beraten, dieses Dogma nicht mit Verbissenheit zu verfolgen, sondern vielmehr die parallel ablaufenden, technischen Neuerungen der Genomik und der Proteomik als bereichernden Segen aufzufassen. „Geniale Menschen beginnen große Werke, fleißige Menschen vollenden sie“. Diesen so wahren Ausspruch von Leonardo da Vinci sollten wir uns immer in Erinnerung rufen, wenn wir leichtfertig nach den schnellen Erfolgen der Systembiologie rufen. Fleiß und Besessenheit, ja auch gerne Genialität, sollten die drei Tugenden der Systembiologie sein – hier würde sicherlich auch unsere Kanzlerin nicht widersprechen wollen.



Ihr Roland Eils

Chefredakteur

# inhalt

<b>grußwort</b> Prof. Dr. Annette Schavan, MdB, Bundesministerin für Bildung und Forschung	3	
<b>vorwort</b> Prof. Dr. Roland Eils, Chefredakteur	4	
<b>töten oder leben lassen?</b> Mathematische Modelle ermöglichen Einblicke in die Regulationsmechanismen von Immunzellen von Doris Urlaub und Carsten Watzl	8	
<b>entschlüsselung von signalnetzwerken mittels transkriptom-sequenzierung</b> Wie mathematische Modelle helfen, die zelluläre Signalübertragung zu verstehen von Christina Falschlehner und Michael Boutros	12	
<b>SyBIT – systems biology IT</b> Software, Werkzeuge und IT-Infrastruktur für Systembiologie in der Schweiz von Peter Kunszt	16	
<b>spezial: biotechnologie mit system</b>		
<b>40 jahre molekulargenetik – ein rückblick aus persönlicher sicht</b> Interview mit Professor Dr. Alfred Pühler Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld	20	
<b>CeBiTec</b> Ein interdisziplinäres Zentrum für Biotechnologie an der Universität Bielefeld von Stefan Weidner und Thomas Noll	24	
<b>synthetische biologie</b> Neue Werkzeuge nicht nur für Biologen von Maximilian Hörner und Wilfried Weber	28	
<b>produktentwicklung für die bioökonomie</b> Neue Methoden zur biotechnologischen Herstellung von Feinchemikalien von Birgitta E. Ebert und Lars M. Blank	32	
<b><i>Corynebacterium glutamicum</i> als arbeitspferd und modell</b> Weiße Biotechnologie in Forschung und Anwendung von Volker F. Wendisch	36	
<b><i>Ralstonia eutropha</i> H16 und die systembiologie</b> Ein Bakterium mit kleinen Ansprüchen und großem biotechnologischem Potential von Katja Adames und Alexander Steinbüchel	40	
<b>neue wege für eine nachhaltige biotechnologie</b> Heterologe Genexpression in photosynthetischen Bakterien von Thomas Drepper, Achim Heck und Karl-Erich Jaeger	44	
<b>wasserstoff aus wasser – biologisch und ökonomisch?</b> Designzellen und Biobatterie-Modelle zur Entwicklung solarbetriebener Energiemodule von Matthias Rögner	50	

neugigkeiten aus dem BMBF	54	
neugigkeiten der helmholtz-allianz systembiologie	58	
direkt oder indirekt, das ist hier die frage! Die erweiterte Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors in der zellulären Signaltransduktion von Saskia Trump, Jacob J. Michaelson, Andreas Beyer und Irina Lehmann	62	
biotransformation von fremdstoffen in der leber Systembiologische Ansätze zur Vorhersage von Arzneimittelwirkungen von Ulrich Zanger, Maria Thomas, Reinhold Kerb, Ute Hofmann, Benjamin Kandel, Marcus Klein und Matthias Schwab	65	
die biologie hinter den daten sehen Analyse und Interpretation von Next Generation Sequencing Daten Firmenportrait Genomatix Software GmbH von Korbinian Grote	69	
HITS: daten über alles Das Heidelberger Institut für Theoretische Studien von Peter Saueressig	72	
dem posttranskriptionalen regulatorischen code auf der spur doRiNA: die BIMSB-Datenbank für posttranskriptionale Kontrollelemente von Markus Schüler und Christoph Dieterich	76	
wie blut entsteht Modellierung von Differenzierungsdynamiken der Blutbildung auf mehreren Skalen von Carsten Marr und Fabian J. Theis	81	
von der hepatischen sternzelle zum 3D-modell der leberregeneration von Iryna Ilkavets, Sonja Lukowski, Frank Herweck und Steven Dooley	86	
news	90	
events	94	
impressum	97	
wir über uns	98	
kontakt	99	

# töten oder leben lassen?

## Mathematische Modelle ermöglichen Einblicke in die Regulationsmechanismen von Immunzellen

von Doris Urlaub und Carsten Watzl

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind eine Population von Immunzellen, die in der Lage sind, andere Zellen durch direkten Kontakt zu töten. Dabei ergibt sich das generelle Problem, dass möglichst alle Zellen, die eine Gefahr für den Organismus darstellen, effektiv beseitigt werden sollen, ohne aber gesunde Zellen zu schädigen. Um dies zu erreichen, unterliegt die Aktivität der NK-Zellen einer strengen und komplexen Regulation. Obwohl über die möglichen Mechanismen dieser Regulation schon vieles bekannt ist, ist immer noch unklar, wie die NK-Zelle ihre Entscheidung trifft. Wir wählten daher eine Kombination aus einem mathematischen Modell und verschiedenen funktionellen Experimenten, um einen Einblick in diesen Prozess zu erhalten.

### Natürliche Killerzellen – eine erste Verteidigungslinie unseres Immunsystems

Das Immunsystem unseres Körpers besitzt eine Reihe von Möglichkeiten, sich gegen Krebszellen und durch von Viren verursachte Infektionen zu verteidigen. Die zu den Lymphozyten gehörenden natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind hier besonders wichtig für eine effektive und frühe Immunantwort (Vivier *et al.*, 2008). NK-Zellen werden oft als "geladene Waffen" bezeichnet, da sie ein potentiell Ziel, wie etwa eine Tumorzelle, sofort eliminieren können (Abb. 1). Darauf geht auch der Ausdruck "natürliche Killerzelle" zurück. Allerdings wurde nach ihrer Entdeckung bald klar, dass sie nicht nur Zellen töten können. Durch Produktion von Botenstoffen wie Zytokinen und Chemokinen und auch durch die direkte Interaktion mit anderen Immunzellen üben sie darüber hinaus wichtige regulatorische Funktionen aus.

Woher wissen NK-Zellen, wen sie eliminieren müssen und wen sie nicht schädigen dürfen? Um diese wichtige Entscheidung zu treffen, benötigt die NK-Zelle Signale von den Zellen in ihrer Umgebung. Um diese Signale zu empfangen, besitzen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche verschiedene aktivierende und inhibierende Rezeptoren (Lanier, 2008). Das Zusammenspiel der Signale, die

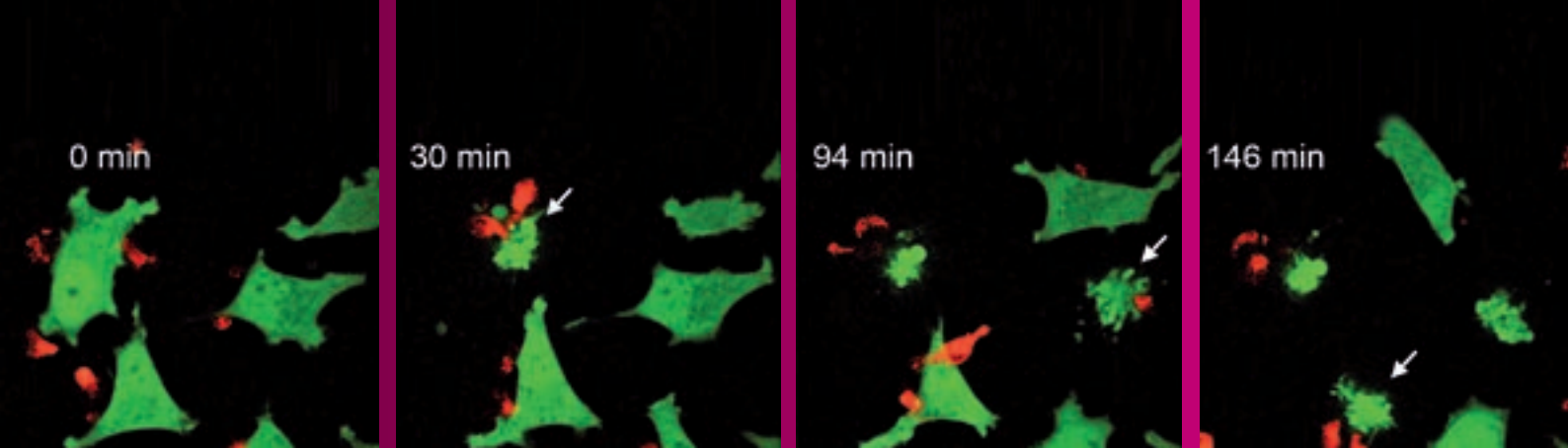
von diesen Rezeptoren ausgelöst werden, bestimmt letztendlich die Aktivität der NK-Zellen. Zu den inhibierenden Rezeptoren gehören unter anderem die sogenannten „killer cell Ig-like receptors (KIR)“. Diese erkennen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), der auf fast allen Zellen im Körper vorhanden ist. NK-Zellen benutzen den MHC daher als eine Art molekularen Ausweis, dessen Erkennung die NK-Zellen ruhig stellt. Interessanterweise wird die MHC I-Expression von einigen Viren und auch bei Krebszellen unterdrückt. Somit verlieren diese Zellen ihren molekularen Ausweis und damit die Fähigkeit, die NK-Zellen ruhig zu stellen. Zusätzlich besitzen NK-Zellen aktivierende Rezeptoren, die sehr heterogen sind und eine Vielzahl unterschiedlicher Liganden erkennen können. Einige dieser Liganden werden bei zellulärem Stress verstärkt auf der Oberfläche der betroffenen Zelle exprimiert, was zusätzlich zur Aktivierung der NK-Zellen beitragen kann.

Die verschiedenen Rezeptoren interagieren mit ihren Liganden in einem komplex ausgebildeten Kontaktbereich zwischen NK-Zelle und potentieller Zielzelle, den man immunologische Synapse nennt (Orange, 2008). Wenn MHC I auf der Zielzelle z. B. durch eine virale Infektion oder Transformation der Zelle herab reguliert wurde oder stressinduzierte aktivierende Liganden verstärkt exprimiert sind, kommt es zur Aktivierung der NK-Zelle. Daraufhin werden von der NK-Zelle zytotoxische Granula ausgeschüttet, die den Zelltod der Zielzelle auslösen können. Dies geschieht gerichtet, so dass nur die Zielzelle getötet wird, selbst wenn die NK-Zelle gleichzeitig auch noch Kontakt zu anderen Zellen hat.

### Ein molekularer Schalter reguliert die Balance aktivierender und inhibierender Signale

Vereinfacht ausgedrückt wird also die Stärke der aktivierenden und inhibierenden Signale in die Waagschale gelegt und anhand der Balance die Entscheidung getroffen, ob eine Zielzelle getötet wird oder nicht. Doch wie funktioniert diese Waage auf einer molekularen Ebene? Die Signale der verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren sind graduell, und doch müssen





**Abbildung 1: NK-Zellen in Aktion**

Unter dem Mikroskop kann man NK-Zellen (rot) beim schnellen und effizienten Töten der Tumorzellen (grün) beobachten. Die Zahlen in den Bildern geben den Zeitpunkt nach der Zugabe der NK-Zellen an, der Bildausschnitt ist zu jedem Zeitpunkt identisch. Weiße Pfeile zeigen auf die zu diesem Zeitpunkt sterbende Zelle (Bild: S.C. Hoffmann).

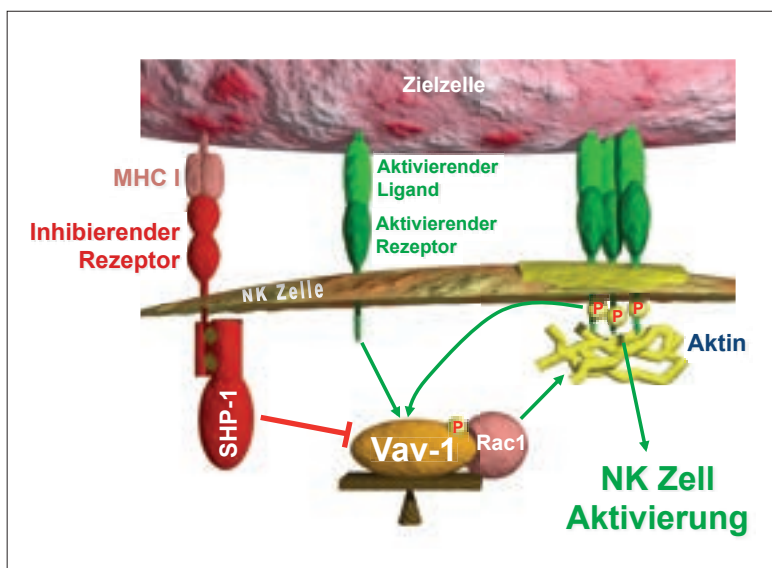
diese Signale in eine "ja oder nein" – töten oder nicht töten – Reaktion der NK-Zelle übersetzt werden. Viele verschiedene Wege der Signalweiterleitung von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren sind bekannt. Doch wie es der Zelle gelingt, diese Signale zu integrieren, um zu einer Entscheidung zu kommen, ist immer noch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass aktivierende und inhibierende Signale über eine Art molekularen Schalter miteinander verbunden sind. Diesen Schnitt- und möglicherweise Integrationspunkt der antagonistischen Signale stellt unserer Meinung nach das Signalmolekül Vav1 dar.

Die Stimulation aktivierender Rezeptoren bewirkt, dass Vav1 durch Kinasen der Src-Familie durch eine sogenannte Phosphorylierung aktiviert wird. Im Gegensatz dazu führen die Signale der inhibierenden Rezeptoren dazu, dass Vav1 durch die Phosphatase SHP-1 dephosphoryliert und somit inaktiviert wird (Stebbins *et al.*, 2003) (Abb. 2). Dadurch ist Vav1 der erste Schritt der aktivierenden Signalkaskade, der von inhibierenden Signalen beeinflusst werden kann. Phosphoryliertes Vav1 leitet eine Kas-

kade aktivierender Prozesse in der Zelle ein. Kleine GTPasen wie Rac1 werden aktiviert, es kommt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, aktivierende Rezeptoren und auch spezialisierte Membrandomänen werden in den Bereich der immunologischen Synapse gebracht. Diese Prozesse initiieren die Ausschüttung der zytotoxischen Granula, die die Zielzelle zerstören.

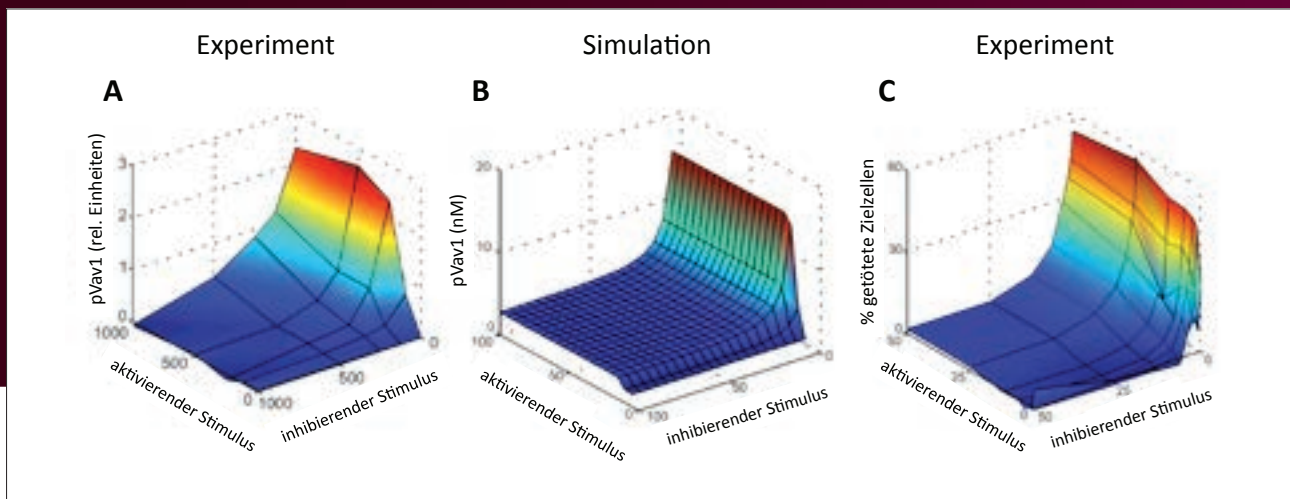
Unsere experimentellen Ergebnisse zeigten, dass zunehmende Stimulation der aktivierenden Rezeptoren einen rapiden Anstieg der Vav1-Phosphorylierung verursacht. Wenn gleichzeitig inhibierende Rezeptoren stimuliert werden, erfolgt eine Hemmung der Vav1-Phosphorylierung. Interessanterweise scheint diese Hemmung dominant gegenüber den Signalen der aktivierenden Rezeptoren zu sein. Zusätzlich haben wir beobachtet, dass nur kleine Veränderungen in der Signalstärke der verschiedenen Rezeptoren notwendig sind, um eine drastische Veränderung der Vav1-Phosphorylierung zu bewirken. Dies hat ein schalterartiges Verhalten zur Folge, bei dem Vav1 entweder minimal oder maximal phosphoryliert ist (Abb. 3A).

**Abbildung 2: Vav1 – ein Schnittpunkt aktivierender und inhibierender Signale**



Nach der Stimulation aktivierender Rezeptoren wird das Signalmolekül Vav1 phosphoryliert. Inhibierende Rezeptoren können mittels der Phosphatase SHP-1 diese Phosphorylierung wiederum entfernen. Phosphoryliertes, und somit aktives Vav1, leitet über die kleine GTPase Rac1 und eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts eine Signalkaskade ein, die zur Aktivierung der NK-Zelle führt. Somit könnte Vav1 eine Schalterfunktion übernehmen, die über die Aktivierung der NK-Zelle entscheidet.

(Bild: C. Watzl)



**Abbildung 3: Verhalten der NK-Zelle in Abhängigkeit von aktivierenden und inhibierenden Signalen**

**A:** Eine Zunahme des aktivierenden Stimulus bewirkt einen rapiden Anstieg der Vav1-Phosphorylierung (rot gefärbter Bereich), während Stimulation der inhibierenden Rezeptoren diese Phosphorylierung hemmt (blaue Fläche).

**B:** In der Simulation konnten wir das im Experiment beobachtete Verhalten der Vav1-Phosphorylierung reproduzieren. Voraussetzung dafür ist die Assoziation der Kinase mit dem aktivierenden Rezeptor.

**C:** Die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen zeigt das gleiche Verhalten wie die Vav1-Phosphorylierung. (Abbildung: C. Watzl, modifiziert nach Mesecke, S, *et al.* (2011). *Sci Signal*)

### Viele Reaktionen, viele Variablen, viele Modelle

Um einen Einblick in die Signalverarbeitung auf molekularer Ebene zu bekommen, haben wir in einer Kooperation mit den Bioinformatikern um Prof. Roland Eils vom DKFZ ein mathematisches Modell aufgestellt, das diese frühen Signalprozesse in NK-Zellen beschreiben kann (Mesecke *et al.*, 2011). Um verschiedene Möglichkeiten der Verschaltung und Regulation in Betracht ziehen zu können, wurde als Herangehensweise das sogenannte ‚ensemble modeling‘ gewählt. Auf diese Weise erhält man verschiedene Variationen eines Basismodells, in das einzelne Bausteine hinzugefügt und miteinander kombiniert werden können. In unserem Fall ergänzten wir das Basismodell mit sieben optionalen Reaktionen, die Konzepte beschreiben, die bei der Signaltransduktion der Rezeptoren eine Rolle spielen können (Abb. 4). Durch Kombination aller sinnvollen Alternativen erhielten wir insgesamt 72 verschiedene Modellvarianten, die wir für unsere Simulationen verwendeten.

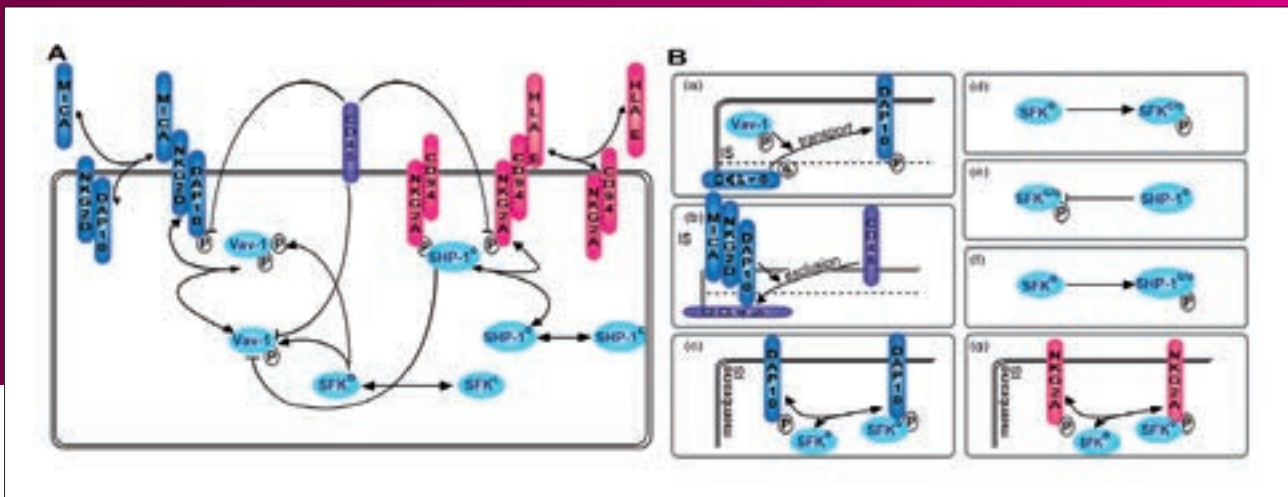
Um quantitative Simulationen mit unserem Modell durchführen zu können, benötigten wir verschiedenste Parameter. Während wir Faktoren, wie zum Beispiel die Größe der einzelnen Kompartimente und die Konzentrationen der beteiligten Moleküle experimentell bestimmen konnten, mussten wir uns für die kinetischen Parameter der verschiedenen Reaktionen zunächst auf Daten aus der Literatur verlassen. Aber gerade bei unklaren kinetischen Parametern hat sich die ‚ensemble modeling‘ Vorgehensweise als Vorteil erwiesen. Indem wir alle 72 Modelle mit unterschiedlichen Parametern simulierten, konnten wir bestimmen, welche Modelle Ergebnisse lieferten, die sich mit unseren experimentellen Daten deckten. Durch diesen Parameterscan zeigte sich, dass nur wenige Modelle überhaupt in der Lage waren, eine physiologische Reaktion der Vav1-Phosphorylierung

zu simulieren (Abb. 3B). Nur Modelle, bei denen eine Kinase direkt an die aktivierenden Rezeptoren binden konnte, lieferten ein korrektes Ergebnis. Andere Prinzipien der Signalverarbeitung, wie Segregation von Phosphatasen von der Synapse und Kinase-Autophosphorylierung, waren für eine physiologische Reaktion in unserem Modell entbehrlich, verschlechterten jedoch nicht das Ergebnis in Kombination mit der Assoziation von Kinase und Rezeptor. Diese Vorgänge könnten zum Beispiel für die zusätzliche Feinabstimmung der Entscheidung nötig sein.

Durch den Vergleich experimenteller Daten mit unseren Simulationsergebnissen ist es uns gelungen, aus der Vielfalt möglicher Regulationsprozesse einen Vorgang zu isolieren, der das Entscheidungsverhalten der NK-Zellen effizient erklären kann. Wir konnten durch das Modell unsere Suche nach dem verantwortlichen Prozess auf ein Konzept eingrenzen, ohne jede Option experimentell überprüfen zu müssen. Die vom Modell vorhergesagte Assoziation von Rezeptor und Kinase konnten wir auch experimentell für den aktivierenden NKG2D-Rezeptor nachweisen. Dies war bisher noch nicht bekannt. Durch diesen Prozess ergibt sich eine lokale Ansammlung der Kinase direkt an der Kontaktstelle zwischen NK und Zielzelle. Dies könnte erklären, warum eine NK-Zelle in der Lage ist, gezielt nur eine Zielzelle anzugreifen, obwohl sie unter Umständen auch noch Kontakte zu anderen Zellen haben kann.

### Vav1 – ein Schalter für die Zytotoxizität?

Wenn NK-Zellen durch eine Kombination aktivierender und inhibierender Signale stimuliert werden, zeigt ihre zytotoxische Aktivität das gleiche schalterartige Verhalten wie die Vav1-Phosphorylierung: Schon bei einem geringen aktivierenden Signal wird Vav1 rasch durch Phosphorylierung aktiviert und



**Abbildung 4: 'ensemble modeling' der Signalverarbeitung von NK-Zellen**

**A:** Das Basismodell unserer Simulation beinhaltet die Interaktionen der aktivierenden und inhibierenden Rezeptor-Liganden-Paare. Aktivierende Interaktionen führen zur Phosphorylierung von Vav1 durch Kinasen der Src-Familie (SFK), während inhibierende Interaktionen die Dephosphorylierung von Vav1 durch die Phosphatase SHP-1 bewirken.

**B:** Sieben weitere Konzepte der Signalverarbeitung können unserem Basismodell hinzugefügt werden.

(Abbildung aus: Mesecke, S, *et al.* (2011). *Sci Signal*)

die NK-Zelle in die Lage versetzt, die Zielzelle zu töten (Abb. 3A, C). Durch ein gleichzeitiges inhibierendes Signal wird jedoch die Vav1-Phosphorylierung effizient unterdrückt und die NK-Zell-Zytotoxizität verhindert. Vermutlich stellt Vav1 deshalb nicht nur einen Punkt der Signaltransduktion dar, bei dem die unterschiedlichen Signale zusammengeführt werden, sondern könnte auch die Schaltstelle sein, an der die Entscheidung getroffen wird, ob eine Zielzelle angegriffen wird oder nicht.

Die Kombination von gezielten Experimenten und mathematischen Simulationen ist für beide Seiten sehr gewinnbringend. Durch experimentelle Quantifizierung von Modellparametern können möglichst realistische Simulationen durchgeführt werden, während wiederum die Ergebnisse der Simulationen ein gezieltes Design der Experimente ermöglichen.

Unsere Ergebnisse aus diesem Vorgehen sprechen für eine zentrale Rolle von Vav1 bei der Entscheidungsfindung der NK-Zellen. Durch das mathematische Modell wird ein neuer Einblick in die Verarbeitung aktivierender und inhibierender Signale während der Aktivierung von Lymphozyten ermöglicht. Dieses Modell wird daher auch für unser weiteres Vorgehen sehr wichtig sein.

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Dieses Projekt wurde im Rahmen der Helmholtz-Allianz Systembiologie im Forschungsnetzwerk SBCancer gefördert (SBC-III.6 „Cellular Decisions in Natural Killer cells“).

**Projektpartner:** Carsten Watzl und Hauke Busch

### Referenzen:

- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502.
- Mesecke, S., Urlaub, D., Busch, H., Eils, R., and Watzl, C. (2011). Integration of activating and inhibitory receptor signaling by regulated phosphorylation of Vav1 in immune cells. *Science signaling* 4, ra36.
- Orange, J.S. (2008). Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8, 713-725.
- Stebbins, C.C., Watzl, C., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., Burshtyn, D.N., and Long, E.O. (2003). Vav1 Dephosphorylation by the Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Mechanism for Inhibition of Cellular Cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 23, 6291-6299.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.

### Kontakt:



**Prof. Dr. Carsten Watzl**

Leibniz Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfAdo)  
Projektgruppe Immunologie  
Dortmund  
Watzl@ifado.de



**Dr. Doris Urlaub**

Leibniz Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfAdo)  
Projektgruppe Immunologie  
Dortmund  
Urlaub@ifado.de

# entschlüsselung von signalnetzwerken mittels transkriptom-sequenzierung

## Wie mathematische Modelle helfen, die zelluläre Signalübertragung zu verstehen

von Christina Falschlehner und Michael Boutros

Wie integrieren Zellen Signale, die sie von ihrer Umwelt erhalten? Welche Signale entscheiden über Leben oder Tod? Im ApoNET-Projekt durchleuchten wir das Signalnetzwerk der sogenannten Todesrezeptoren und erstellen Modelle, um den Signalfluss in entarteten Zellen sowie gesundem Gewebe nachzuvollziehen. Diese Modelle könnten Angriffspunkte für neue Krebstherapien sein und Einblicke in die Entstehung behandlungsresistenter Tumore liefern.

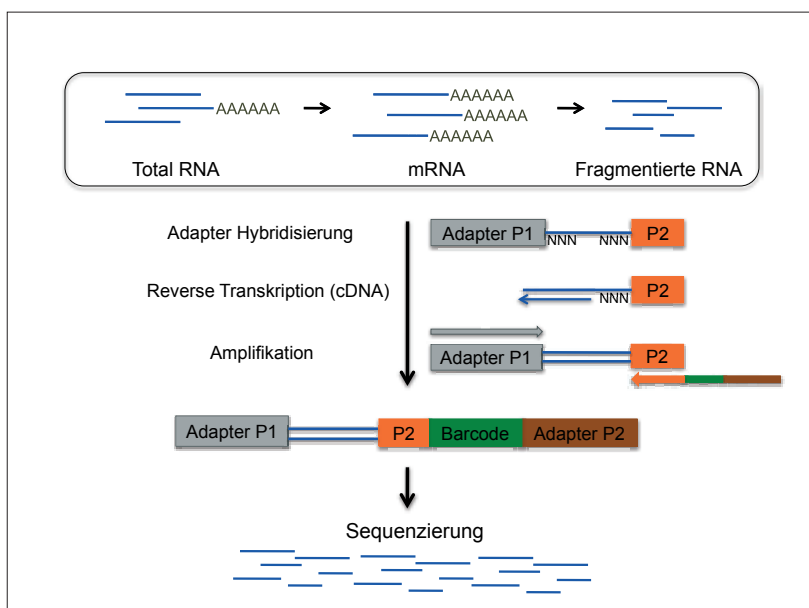
### RNA-Sequenzierung im Hochdurchsatz-Verfahren

Durch die Entwicklung neuer Hochdurchsatzverfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren können innerhalb kurzer Zeit die Erbinformation (DNA) sowie die abgelesenen Gen-Transkripte (RNA) einer Zelle entschlüsselt werden. Beim sogenannten „Next-Generation-Sequencing“ werden Millionen einzelner

DNA-Fragmente parallel sequenziert und unter Zuhilfenahme der Bioinformatik analysiert. Die Abfolge der Basenpaare gibt Aufschluss darüber, welche Geninformation in der Zelle vorhanden ist. Neben der Entschlüsselung von Mutationen kann auch die Gesamtheit der zellulären Transkripte bestimmt werden, das sogenannte Transkriptom. Bei der RNA-Sequenzierung (RNASeq) werden die messenger RNA-Moleküle (mRNA) quantifiziert, also jene Gene, die gerade in der Zelle abgelesen werden und als Vorlage für die Erstellung von Proteinen dienen (Abb. 1). Die Proteine wiederum sind an der zellulären Signalübertragung beteiligt und prägen das Erscheinungsbild der Zelle unter verschiedenen Umwelteinflüssen.

Um die Antwort der Zelle auf einen äußeren Stimulus möglichst genau und reproduzierbar zu messen, sind standardisierte und automatisierte Probenaufbereitungsprotokolle unerlässlich.

Abbildung 1: Transkriptom-Sequenzierung



Nach Isolierung der zellulären RNA wird die mRNA angereichert und fragmentiert. Danach erfolgt die reverse Transkription in cDNA. Adapter dienen zur Barcode-Generierung und Amplifizierung der cDNA-Bibliothek. Die anschließende Sequenzierung resultiert in Millionen von Sequenzfragmenten, die den ursprünglichen Transkripten entsprechen (Quelle: C. Falschlehner, S. Leible, DKFZ).

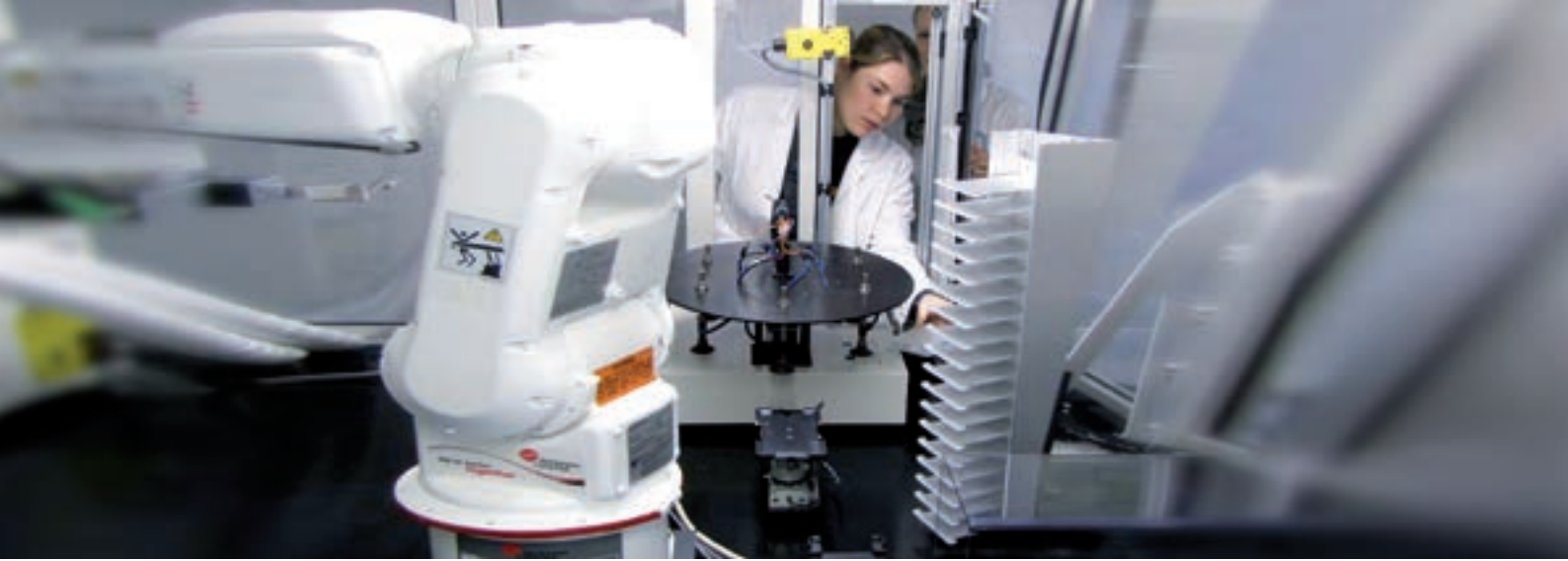


Abbildung 2: Verwendung von Robotertechnik zur automatisierten Probenaufbereitung  
(Quelle: C. Falschlehner, T. Miersch, DKFZ)

Für die Erstellung von Transkriptionsprofilen werden zunächst die mRNA-Moleküle der Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in DNA umgewandelt. Danach werden Multiplex-Bibliotheken für die Sequenzierung generiert. Der Einsatz von Multiplex-Markierungen (Barcodes) ermöglicht die Zusammenlegung von Proben und somit eine parallele Sequenzierung, die Zeit und Kosten spart. Bei der anschließenden Datenanalyse werden die Barcodes verwendet, um die Proben voneinander zu unterscheiden. Um einen hohen Probendurchsatz bei gleichbleibender Qualität und möglichst geringen Kosten zu gewährleisten, nutzen wir moderne Robotik zur Automatisierung der Prozessabläufe (Abb. 2).

Die dabei gewonnenen Datensätze erlauben es uns, Aussagen darüber zu treffen, welche Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle aktiviert sind. Diese Signaturen können wir nutzen, um zelluläre Signalnetzwerke systematisch zu analysieren.

### Analyse eines Signalnetzwerkes mittels Nested Effects Modelling

Jede Behandlung hinterlässt Spuren in der Zelle, die es uns erlauben, das zugrunde liegende Signalnetzwerk systematisch zu analysieren. Wird der Signalfluss einer Zelle gestört, beispielsweise durch die Wegnahme eines bestimmten Gens, hat das Auswirkungen auf die Expression vieler anderer Gene, die wir mittels RNA-Sequenzierung nachweisen. Diese Effekte können wir uns zu Nutze machen, um mathematische Signalwegmodelle zu erstellen und den Signalfluss von einem Molekül zum nächsten zu rekonstruieren.

Um die Signalübertragung einzelner Gene zu stören, nutzen wir eine Technologie namens RNA-Interferenz (RNAi). Durch

Einschleusen kurzer Sequenz-spezifischer doppelsträngiger RNA-Moleküle (short interfering RNAs, siRNAs) erreichen wir die Herunterregulation eines bestimmten Signalgens (S), welches somit für die Signaltransduktionskaskade nicht mehr zur Verfügung steht. Bestimmen wir nun mittels Transkriptionsanalyse die Auswirkungen vieler Signalgene auf die nachfolgenden Effektorgene (E), können wir mit Hilfe mathematischer Algorithmen, dem sogenannten „Nested Effects Modelling“, Signalnetzwerke rekonstruieren und dynamisch modellieren (Abb. 3). Anhand dieser Modelle kann die Reaktion einer Zelle auf eine veränderte Umweltbedingung simuliert werden.

### Leberkrebs und der programmierte Zelltod

Jeden Tag sterben in unserem Körper Millionen von Zellen während gleichzeitig neue Zellen gebildet werden. Der programmierte Zelltod, die sogenannte Apoptose, sorgt dafür, dass entartete Zellen im Körper entsorgt werden und keine Gefahr für den Organismus darstellen (Abb. 4). Ist dieser Mechanismus defekt, kann es zu unkontrolliertem Zellwachstum und somit zur Entstehung von Krebs kommen. Eine Krebsart, die sich häufig durch eine Resistenz gegenüber dem Einleiten der Apoptose auszeichnet, ist der Leberkrebs – auch Hepatozelluläres Karzinom (HCC) genannt. Wenn das Todesprogramm der Zellen blockiert ist, kann das Hepatozelluläre Karzinom mit konventionellen Therapien wie Chemo- oder Strahlentherapie kaum behandelt werden, ohne umgebendes gesundes Gewebe stark zu beschädigen. Ziel der Forschung ist es deshalb, gezielte Wirkstoffkombinationen zu identifizieren, die Krebszellen zerstören und dabei das normale Lebergewebe aber nicht beeinträchtigen („targeted therapy“).

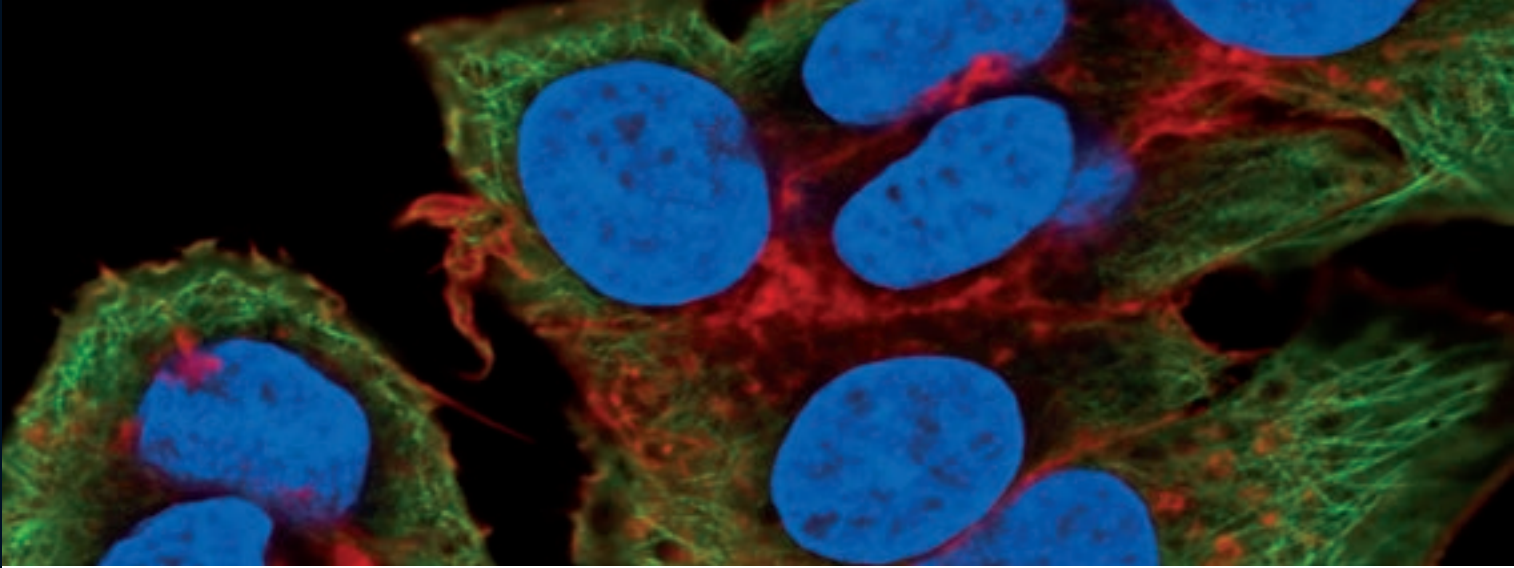
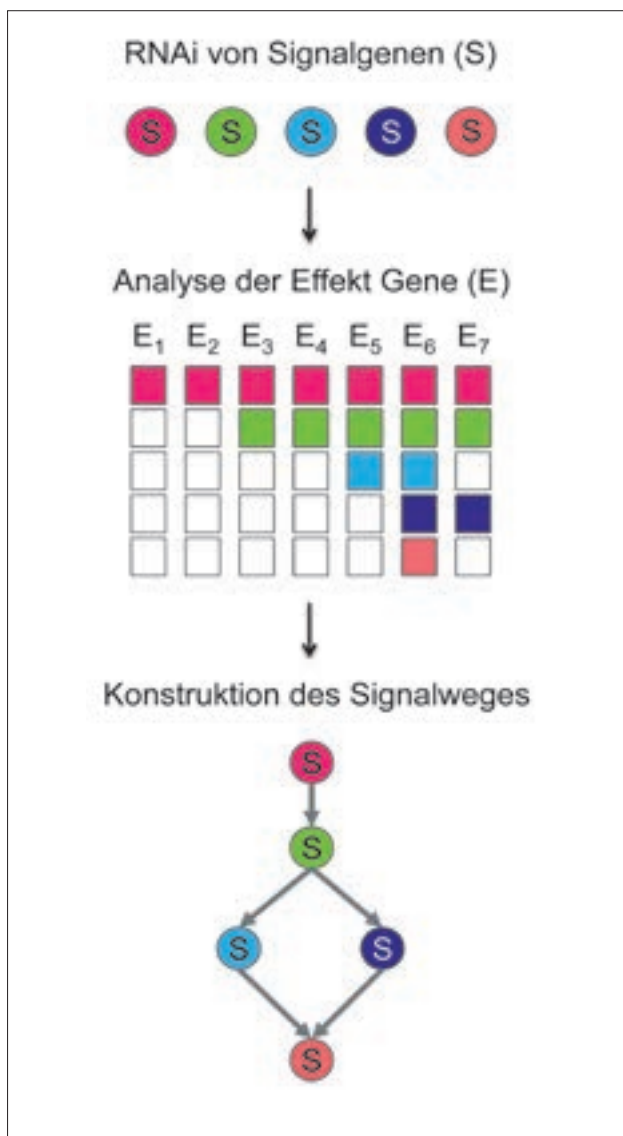


Abbildung 4: Der programmierte Zelltod

Lebende Leberkrebszellen (Quelle: C. Falschlehner, DKFZ (Konfokales Mikroskop: Leica TCS SP5)).

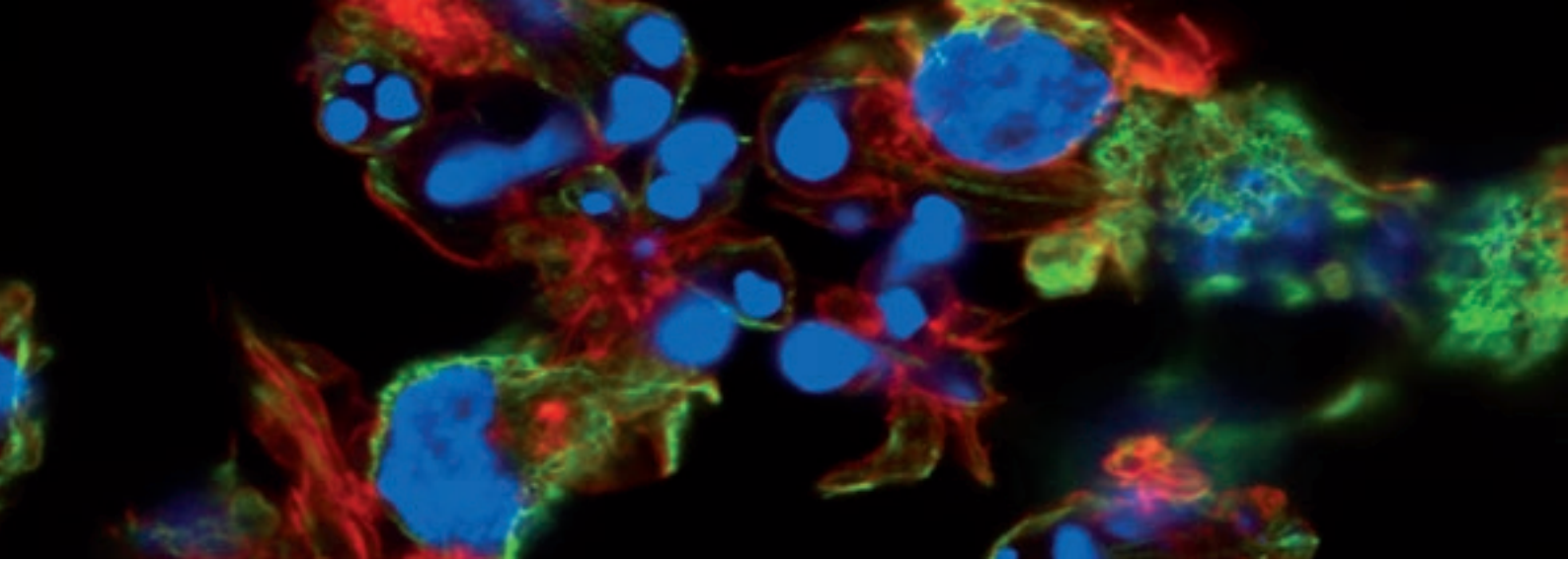
Abbildung 3: Rekonstruktion von Signalwegen mittels Nested Effects Modelling



Die Wegnahme von Signalgenen (S) mittels RNAi hat Auswirkungen auf die Expression vieler Effektorgene (E) (Quelle: C. Falschlehner, DKFZ; C. Hundsrucker, Universität Regensburg).

Leberkrebs wird häufig durch eine Entzündungsreaktion (Inflammation) ausgelöst, die mit dem Einleiten des Selbstmordprogramms konkurriert. Wir beschäftigen uns deshalb mit zwei Signalmolekülen, die mit der Krankheitsentstehung von Leberkrebs in Verbindung gebracht werden: Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) und der TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL). TNF und TRAIL sind sogenannte Todesliganden, die durch Bindung an ihren entsprechenden Oberflächenrezeptor einerseits ein inflammatorisches (Überlebens-)Signal und andererseits den Tod der Zelle auslösen können. In Leberzellen induziert TNF vorrangig Inflammation, während TRAIL überwiegend Apoptose hervorruft. Die Kommunikation zwischen den beiden Signalwegen kann über Leben und Tod von Leberkrebszellen entscheiden. Blockiert man beispielsweise mittels Inhibitoren das TNF-induzierte Entzündungssignal, dann können vormals TRAIL-resistente Leberkrebszellen mit TRAIL getötet werden, während normale Hepatozyten auch bei Anwendung dieser Kombinationstherapie nicht geschädigt werden.

Eine systematische Analyse des TNF/TRAIL-vermittelten Signalnetzwerks kann uns helfen, zu verstehen, warum Leberkrebszellen und primäre Hepatozyten unterschiedlich auf eine Behandlung reagieren und kann dadurch mögliche Knotenpunkte für neuartige Therapien aufzeigen und wichtige Einblicke in die Entstehung behandlungsresistenter Tumore liefern.



**Abbildung 4: Der programmierte Zelltod**

Apoptotische Leberkrebszellen mit typischen Charakteristika wie Schrumpfung der Zelle, blasenförmige Ausbuchtungen an der Zelloberfläche, Kondensation und Degradierung der DNA. Färbungen: Blau = DNA (Zellkern). Grün =  $\beta$ -Tubulin (Zytoskelett), Rot = Phalloidin (Aktinfilamente) (Quelle: C. Falschlehner, DKFZ (Konfokales Mikroskop: Leica TCS SP5)).

### Steckbrief Forschungsprojekt:

**Projektname:** ApoNET

**Förderinstitutionen:** EU-Förderinitiative ERASySBio+, BMBF – Bundesministerium für Bildung und Forschung, BBSRC – Biotechnology and Biological Science Research Council, U.K.  
**Beteiligte Partner:** Prof. Michael Boutros, Universität Heidelberg; Prof. Henning Walczak, Imperial College London; Prof. Rainer Spang, Universität Regensburg

### Referenzen:

Anchang, B., Sadeh, M.J., Jacob, J., Tresch, A., Vlad, M.O., Oefner, P.J., and Spang, R. (2009). Modeling the temporal interplay of molecular signaling and gene expression by using dynamic nested effects models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6447-6452.

Falschlehner, C., Ganten, T.M., Koschny, R., Schaefer, U., and Walczak, H. (2009). TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. *Adv Exp Med Biol* 647, 195-206.

Frohlich, H., Beissbarth, T., Tresch, A., Kostka, D., Jacob, J., Spang, R., and Markowetz, F. (2008). Analyzing gene perturbation screens with nested effects models in R and bioconductor. *Bioinformatics* 24, 2549-2550.

Horn, T., Sandmann, T., Fischer, B., Axelsson, E., Huber, W., and Boutros, M. (2011). Mapping of signaling networks through synthetic genetic interaction analysis by RNAi. *Nature methods* 8, 341-346.

Metzig, M., Nickles, D., Falschlehner, C., Lehmann-Koch, J., Straub, B.K., Roth, W., and Boutros, M. (2011). An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 607-618.

### Kontakt:



**Dr. Christina Falschlehner**

c.falschlehner@dkfz.de

Abt. Signalwege und Funktionelle Genomik  
 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
 Heidelberg



**Prof. Dr. Michael Boutros**

m.boutros@dkfz.de

Signalwege und Funktionelle Genomik  
 Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
 Heidelberg

Lehrstuhl für Zell- und Molekularbiologie  
 Medizinische Fakultät Mannheim  
 Universität Heidelberg

[www.apoptosis-networks.eu](http://www.apoptosis-networks.eu)

[www.zbio.org](http://www.zbio.org)

[www.dkfz.de/signaling](http://www.dkfz.de/signaling)

# SyBIT – systems biology IT

## Software, Werkzeuge und IT-Infrastruktur für Systembiologie in der Schweiz

von Peter Kunszt

Die Systembiologie befindet sich in einem „goldenen Zeitalter“, in dem eine immer größer werdende Zahl neuer Technologien zur Messung, Beobachtung und Erforschung biologischer Vorgänge verfügbar ist. Diese mehrheitlich digitalen Methoden produzieren häufig erhebliche Mengen an Daten, deren Verwaltung und Analyse eine große Herausforderung für Wissenschaftler darstellt. Besonders komplex wird diese Aufgabe bei der Zusammenarbeit mehrerer, geographisch verteilter Institutionen in größeren Konsortien. Im Rahmen der schweizerischen Systembiologieinitiative SystemsX.ch hilft das Projekt SyBIT den Forschungsprojekten als zentraler Dienstleister bei der Bewältigung dieser digitalen Datenflut.

### Nachhaltigkeit als Herausforderung

Trotz der bemerkenswerten wissenschaftlichen Fortschritte in der Systembiologie, sowohl auf experimenteller, als auch theoretischer Ebene, gibt es für die Bewältigung der sich ergebenden Datenflut noch nicht immer passende Lösungen. Beispielsweise sind Wissenschaftler nicht selten gezwungen, eigene Auswertungsprogramme zur Datenanalyse zu schreiben, Daten selbst zu verwalten und Speichermedien zu bewirtschaften. Hiervon sind insbesondere Studenten und Postdocs betroffen, die mit teilweise erheblichem Aufwand die notwendigen Entwicklungen vorantreiben.

Aber gerade jüngere Wissenschaftler sind besonders mobil und müssen ihren Arbeitsplatz gelegentlich wechseln. Sind dann Informationen zu Ort und Systematik der Speicherung nicht ausreichend dokumentiert, besteht das Risiko, dass Daten nach dem Weggang einer Person schlicht verloren gehen. Auswertungsprogramme wiederum werden als „black box“ benutzt, weil ihre genaue Funktionsweise nicht mehr bekannt ist. So kann es zur falschen Anwendung der Analysen kommen, ohne dass dies den Forschern bewusst ist. Wenn keine Dokumentation vorliegt und daher keine Änderungen mehr angebracht werden können, müssen die Programme letztlich neu geschrieben werden. Für die

Wissenschaftler bedeutet das einen Verlust an wertvoller Zeit, der wiederum zu Lasten der Forschung geht.

Umso wichtiger ist es, bei einer nationalen Initiative wie SystemsX.ch für Wissenschaftler gezielt gemeinsame Lösungen zu suchen und Unterstützung anzubieten. Ein entscheidender Schritt ist die Einführung und konsequente Einhaltung von Standards, um Redundanzen in der Entwicklung zu vermeiden und damit Geld und Zeit einzusparen. Die Festlegung auf standardisierte Methoden und Formate ist notwendig, damit Messergebnisse sicher und nachhaltig abgelegt und unter den zusammenarbeitenden Forschungsgruppen ausgetauscht und verglichen werden können.

Dazu muss eine ‚Werkzeugkiste‘ für Biologen und Bioinformatiker erstellt und gepflegt werden, zu der neue Werkzeuge ständig hinzugefügt und veraltete abgelöst werden. Darüber hinaus ist die notwendige Infrastruktur bereitzustellen, um die Werkzeuge überhaupt einsetzen zu können (Abb. 2).

### Aufgaben und Zusammensetzung von SyBIT

An dieser Stelle setzt das Projekt SyBIT mit seinen vielschichtigen Aufgaben an. Das Team hilft den Forschungsgruppen, die nötige Daten- und Recheninfrastruktur bereitzustellen sowie – wenn möglich – automatische Abläufe zu planen. SyBIT stellt standardisierte Software und Datenverwaltungsdienste zur Verfügung, nimmt selbstentwickelte Programme und schreibt diese bei Bedarf um oder verpackt sie in wiederverwendbare Bibliotheken.

Forschungsgruppen wird geholfen, ihre Algorithmen der breiten Wissenschaftsgemeinde in einer Form zur Verfügung zu stellen, in der sie leicht handhabbar sind. Dies gewährleistet eine bessere Sichtbarkeit, eine größere Akzeptanz und damit die breite Verwendung sowie Nachhaltigkeit. SyBIT verwaltet darüber hinaus die SystemsX.ch Wiki-Plattform, E-Mail-Listen und weitere, von der Gemeinschaft verwendete Web-basierte Dienste. Zusammen mit den Partner-Instituten stellt SyBIT Kurse zur Nutzung der verschiedenen Software und Dienstleistungen zusammen.





Abbildung 1: Die fünf Arbeitsschritte der Datenauswertung

Die Projektpartner von SyBIT sind meist Arbeitsgruppen, die an den einzelnen Universitäten und Forschungseinrichtungen in Basel, Lausanne und Zürich bereits vergleichbare Aufgaben wahrnehmen. Zur Unterstützung der an SystemsX.ch beteiligten Forschungsgruppen wird zudem vor Ort mit Mitteln des SyBIT-Projektes zusätzliches Personal angestellt sowie die nötige Infrastruktur bereitgestellt. In einzelnen Forschungsgruppen mit besonders anspruchsvollen Datenverwaltungsaufgaben ist Personal des SyBIT-Teams direkt in die Arbeitsgruppen integriert.

Die Zusammenarbeit ist eng koordiniert: So können Gruppen in Zürich auch von der spezifischen Expertise in Lausanne und Basel profitieren und umgekehrt. Gut funktionierende, bereits bestehende lokale Strukturen werden von SyBIT verstärkt. Wo diese Strukturen fehlen, erhalten die Arbeitsgruppen Unterstützung bei deren Aufbau.

Ein Vorteil dieser dezentralen Struktur liegt in der unmittelbaren Integration von Experten in die Forschungsgruppen vor Ort. Dort können sie für die Dauer der jeweiligen Projekte mit den wissenschaftlichen Anwendern zusammenarbeiten und Kommunikati-

onsprobleme leichter abbauen. Es wird versucht, dieses bereits in der Westschweiz als ‚embedded bioinformatician‘ etablierte Konzept für SystemsX.ch in der ganzen Schweiz anzuwenden. Zusätzlich unterstützt SyBIT ein Team an der Eidgenössischen Technischen Hochschule ETH in Basel, welches für längerfristige, strategische Entwicklungsarbeiten eingesetzt wird und effizient größere Softwareentwicklungsaufgaben erledigen kann.

### Datenauswertungsprozesse in der Systembiologie

Die mit SystemsX.ch verbundenen Investitionen in neue Geräte führen auch nicht zuletzt zu einem höheren Bedarf an IT-Infrastruktur. Große Fortschritte bei den Technologien der DNA-Sequenzierung, der Massenspektrometrie und in den bildgebenden Verfahren tragen dazu bei, dass in der Systembiologie mittlerweile ebenso viele oder sogar mehr Daten produziert werden, wie in der Physik oder der Chemie. Nicht alle Universitäten sind auf diese Datenflut aus der Biologie vorbereitet. Zusammen mit den Informatikdiensten, Rechenzentren und Datenzentren der Partner-Institutionen von SystemsX.ch werden Konzepte erarbeitet, um die neuen, erweiterten Bedürfnisse der Systembiologie abdecken zu können.

Abbildung 2: Die Systembiologie wird unterstützt durch drei Gruppen



Die Systembiologie wird unterstützt durch drei Gruppen: Die IT-Infrastruktur wird von zentralen und lokalen Dienstleistern aufgebaut, koordiniert und gewartet (rot); Algorithmen zur Datenanalyse der einzelnen Experimente werden als Teil der Forschung von den Forschenden selbst oder von SyBIT-Bioinformatikern geschrieben (blau); dazwischen stellt SyBIT sicher, dass die bereitgestellte Infrastruktur die Anforderungen der Forschung erfüllt, Standards eingehalten werden und neue Algorithmen in wiederverwendbare Software integriert werden. SyBIT nimmt eine wichtige Kommunikationsaufgabe wahr, um die Anforderungen der Forschung den Infrastrukturdienstleistern zu übergeben (Quelle: Peter Kunszt).

Für die Auswertung der erzeugten Daten ist eine gut funktionierende IT-Infrastruktur mit der entsprechenden Software notwendig. Um insbesondere auch die großen Datenmengen im Bereich von Gigabyte (z.B. konfokale Mikroskopie, FACS) bis Terabyte pro Monat (DNA Sequenzierung, hochauflösende „live imaging“ Verfahren) effizient bearbeiten zu können, müssen in jedem der fünf Arbeitsschritte bei der Auswertung viele Details beachtet werden (Abb. 1):

---

**1. Datenerfassung am Instrument:** Die Daten werden in einem speziellen, jeweils vom Instrumentenhersteller festgelegten Format erfasst und an dem angeschlossenen Geräterechner abgelegt.

---

**2. Validierung und Vorbereitung:** Um Einflüsse durch Verunreinigungen oder falsche Instrumentenhandhabung zu vermeiden, müssen die erfassten Daten auf Messfehler kontrolliert werden. Meist erfolgt nach der Validierung eine Umwandlung in standardisierte Datenformate, oft verbunden mit einer Komprimierung zur Vorbereitung für die nächsten Arbeitsschritte. Die Daten, nach diesem Arbeitsschritt Rohdaten genannt, werden auf sichere Speichermedien verschoben. Die Originaldaten werden vom Geräterechner gelöscht, um Platz für die nächste Akquisition zu schaffen.

---

**3. Automatische Auswertung:** Je nach Instrument erfolgt eine einfache oder zum Teil komplexe, aus vielen einzelnen Schritten bestehende, automatisierte Auswertung der Rohdaten. Diese können sehr rechenintensiv sein, längere Zeit in Anspruch nehmen und erfolgen entweder auf virtualisierten Rechnern oder auf größeren, zentralen Linux-basierten Clustern mit mehreren hundert parallelen Arbeitsschritten. Die Resultate dieser automatisierten Auswertung werden erneut auf sichere, langfristig verfügbare Speicher gelagert.

---

**4. Nachbearbeitung:** Aus diesen Daten werden interaktiv verschiedene Statistiken, Diagramme und Visualisierungen erstellt. Bei Bedarf schreiben Bioinformatiker spezielle Programme zur Auswertung bestimmter Experimente. Je nach Anforderung können die Ergebnisse durch den Wissenschaftler am Arbeitsplatz oder unter Verwendung eines Großrechners ermittelt werden.

---

**5. Publikation und Archivierung:** Die Ergebnisse müssen gesammelt und bei einer Publikation öffentlich in standardisierten Formaten zur Verfügung gestellt werden; die Rohdaten und bei der Auswertung verwendeten Arbeitsschritte werden in einem Archiv abgelegt, damit die Nachvollziehbarkeit der Resultate sichergestellt werden kann.

---

Die Erfahrung von SyBIT in den letzten Jahren zeigt, dass eine gut koordinierte Unterstützung nötig ist, um in Zukunft datenintensive Forschung in den Lebenswissenschaften konkurrenzfähig und nachhaltig zu betreiben. Die Herausforderungen können nicht durch einzelne Arbeitsgruppen und Entwicklerteams gelöst werden. Vielmehr ist es das enge Zusammenspiel aller Beteiligten, das den notwendigen Mehrwert erzeugt. Der Aufbau nachhaltiger Strukturen wird auch in Zukunft forschungspolitische Aufmerksamkeit erfordern.

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

SyBIT ist das IT- und Bioinformatik-Supportprojekt von SystemsX.ch, der schweizerischen Initiative für Systembiologie. Als Sonderprogramm der Eidgenossenschaft im Rahmen des Schweizerischen Nationalfonds dient SystemsX.ch gezielt der Förderung der Systembiologie in der Schweiz. SyBIT beschäftigt knapp 30 Mitarbeiter, verteilt in den Forschungsgruppen und lokalen Supporteinheiten folgender Institutionen: Die Eidgenössischen Technischen Hochschulen in Lausanne und Zürich (EPFL, ETHZ), die Universitäten von Basel, Bern, Genf und Zürich und das Friedrich Miescher Institut in Basel.

### Links:

<http://www.systemsx.ch>

<http://www.sybit.net>

<http://www.sci-bus.eu>

<http://wiki.systemsx.ch/display/sybit>

---

### Kontakt:



**Dr. Peter Kunszt**  
Projektleiter SyBIT  
ETH Zürich  
peter.kunszt@systemsx.ch

# 5th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer

11<sup>th</sup> - 13<sup>th</sup> December 2012 - DKFZ, Heidelberg

## PROGRAM OF MEDICAL GENOME RESEARCH

### Main Parts:

- International Program
- Main NGFN Member Program

### Main Projects:

- International Projects  
in Genome Research
- Genomics of Common Disease
- Functional Genomics
- Personalized Medicine

### Plus:

- Satellite Symposia
  - Small RNAs
  - Next-Generation Sequencing
- Poster Sessions
- Company Sessions  
& Exhibition



# 40 Jahre molekulargenetik – ein rückblick aus persönlicher sicht

Interview mit Professor Dr. Alfred Pühler

Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld

Mit der Entdeckung der DNA-Doppelhelix durch James Watson und Francis Crick im Jahr 1953 war die Molekulargenetik aus der Taufe gehoben. Ein weiterer Durchbruch ereignete sich rund ein Jahrzehnt später, als es gelang, den genetischen Code zu entziffern. In den 1970er Jahren schließlich zog die Gentechnik alle Aufmerksamkeit auf sich und wurde im gesellschaftlichen Umfeld kontrovers diskutiert. Für den wissenschaftlichen Bereich aber erwies sie sich als treibende Kraft, die viele Fragen zur Organisation und Funktion von Erbmolekülen beantwortete: Die Gentechnik war es, mit der die Molekulargenetik in Schwung kam.

Professor Alfred Pühler vom Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld gehört zu den Pionieren der modernen Gentechnik, Biotechnik und Genomforschung. Über vier Jahrzehnte lang hat Alfred Pühler die Entwicklung der Molekulargenetik begleitet und mit dazu beigetragen, dass sie sich zu einem der bedeutendsten Forschungsgebiete der Gegenwart entwickelte. Im Gespräch mit der Zeitschrift *systembiologie.de* blickt der renommierte Wissenschaftler zurück auf die Zeiten des Umbruchs und wagt einen Blick in die Zukunft.

**systembiologie.de:** *Herr Professor Pühler, Sie haben in den 1960er Jahren zunächst Physik studiert, dann im Fachbereich Mikrobiologie promoviert und schließlich in der Genetik habilitiert. Das sind interessante Fachwechsel in der Frühzeit Ihrer wissenschaftlichen Karriere.*

**Professor Dr. Alfred Pühler:** Für meine wissenschaftliche Karriere entscheidend war das Jahr 1968. Mein Physikstudium hatte ich ein Jahr zuvor an der Universität Erlangen abgeschlossen und war nun auf der Suche nach einem attraktiven Thema für meine Promotion. Eigentlich war das Fach dafür längst vorgezeichnet – da meine Diplomarbeit auf Experimenten an einem Tandembeschleuniger aufbaute, wollte ich in der Kernphysik promovieren. Kurzfristig verlagerten sich jedoch meine Interessen, und ich startete die Promotion auf dem Gebiet der Bakteriengenetik.

**Wie kam es zu diesem plötzlichen Umschwung?**

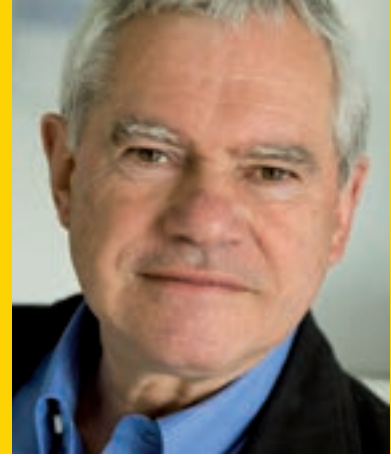
Auslöser waren zwei Fernsehsendungen, die über die Entschlüsselung des genetischen Codes berichteten. Den Wechsel von der Kernphysik über die Mikrobiologie zur Genetik habe ich nie bereut. Bis heute beschäftige ich mich kontinuierlich mit dem Wissensgebiet der Molekulargenetik.

**Was wählten Sie als Promotionsthema?**

Neben der Aufklärung eines Konjugationssystems bei einem Bodenbakterium widmete ich mich während der Promotion intensiv der Frage, welche Methoden geeignet sein könnten, das Erbmolekül DNA zu analysieren. Damals gerade im Entstehen war die Resistenzplasmid-Forschung. Sie trug entscheidend dazu bei, die Frage nach den DNA-Analysetechniken zu beantworten, da Plasmid-DNA über CsCl-Gradienten isoliert und anschließend mittels Elektronenmikroskopie dargestellt werden konnte. Die Plasmid-DNA wurde dazu auf dünnen Kohlefilmen gespreitet und dann elektronenmikroskopisch abgebildet. Es war faszinierend, erste DNA-Moleküle bakterieller Resistenzplasmide unter dem Mikroskop zu sehen und über Konturlängenmessung eine Vorstellung von der Größe dieser Moleküle zu erhalten. Die Elektronenmikroskopie war zur damaligen Zeit das einzige Verfahren, mit dem man DNA-Moleküle darstellen konnte. Meine Promotion schloss ich im Jahr 1971 am Institut für Mikrobiologie der Universität Erlangen ab; die Arbeiten über bakterielle Resistenzplasmide waren dann auch das Thema meiner Habilitationsschrift aus dem Jahr 1976.

**Das intensive Beschäftigen mit Plasmid-DNA erwies sich als zukunftsweisend.**

Ja, die erfolgreichen Arbeiten mit Plasmid-DNA sollten für meine Erlanger Arbeitsgruppe in den 1970er Jahren große Bedeutung haben. Ab dem Jahr 1972 erschien in der Zeitschrift *Proceedings of the National Academy of Sciences*, kurz *PNAS*, eine Reihe von Publikationen, die über die Entwicklung der bakteriellen Gentechnik auf der Basis von Resistenzplasmiden berichteten. Meine Gruppe war damals bereits geübt im Umgang mit Plasmid-DNA und um frühzeitig in die bakterielle Gentechnik einsteigen zu können, bemühten wir uns erfolgreich darum, das Restriktionsenzym *EcoRI* und das Ligaseenzym *T4* aus den USA nach Deutschland



Professor Alfred Pühler vom Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld (Bild: Universität Bielefeld)

einzuführen. Mit diesen beiden Enzymen war die Gentechnik quasi nur noch eine Fingerübung – mit dem Restriktionsenzym konnten wir Plasmid-DNA in Fragmente zerlegen und mit der Ligase wieder verbinden. Im Laufe dieser Arbeiten haben wir im Eigenbau auch die ersten Gelelektrophorese-Apparaturen entwickelt, mit denen man DNA-Restriktionsfragmente nach ihrer Größe auftrennen kann. Die bakterielle Gentechnik hat sich rasch als zusätzliche Methode auf dem Gebiet der Molekulargenetik etabliert. Es zeigte sich darüber hinaus, dass dieser Technik eine Schlüsselrolle zukommt, weil sich das molekulargenetische Wissen durch Klonierungsexperimente mit Bakterien enorm erweitern lässt. Es wurde beispielsweise möglich, Funktionsanalysen von DNA-Fragmenten mithilfe von Klonierungsexperimenten in großem Maßstab vorzunehmen.

**Sie waren maßgeblich an der Entschlüsselung des Genoms mehrerer Mikroorganismen beteiligt.**

Nach der Aufklärung der DNA-Struktur und des genetischen Codes war es das große Ziel der Molekulargenetik, die Basensequenz individueller DNA-Fragmente zu bestimmen. Der Durchbruch erfolgte im Jahre 1977. Damals wurde die chemische Degradationsmethode von Allan Maxam und Walter Gilbert sowie die Kettenabbruch-Methode nach Frederick Sanger im selben *PNAS*-Heft publiziert. Meine damalige Arbeitsgruppe engagierte sich daraufhin auf dem Sequenziergebiet und konnte die Maxam-Gilbert-Technologie bereits ein Jahr später erfolgreich an der Universität Erlangen etablieren.

**Wie verliefen die ersten Sequenzierungsarbeiten?**

Die ersten DNA-Sequenzierungen waren enorm aufwendig. Man arbeitete mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten, separierte die degradierten Fragmente auf selbst gegossenen Sequenziergelen, identifizierte die DNA-Banden mittels Autoradiographie und interpretierte die sichtbaren Banden per Auge. Wir waren mit der Etablierung der chemischen Degradationsmethode so erfolgreich, dass wir sie bereits im April 1979 in einem EMBO-Kurs an der Universität Erlangen mit dem Titel *Plasmids – a Course in*

*Advanced Techniques* anbieten konnten. Bis zur gezielten Sequenzierung von Genen und Genomabschnitten sollte allerdings noch einige Zeit vergehen.

**Was war zusätzlich erforderlich?**

Man muss das DNA-Molekül in handliche Stücke zerlegen, bevor man es einer Maxam-Gilbert-Sequenzierung unterziehen kann. Hier erwies sich die Gentechnik als Mittel der Wahl, weil man DNA-Fragmente mit gentechnischen Methoden in *Escherichia coli* klonieren kann, sodass sie in ausreichender Menge für eine Sequenzierung verfügbar sind. Ende des Jahres 1979 nahm ich den Ruf auf einen Lehrstuhl für Genetik der Universität Bielefeld an, was es möglich machte, ein großes Sequenzierlabor einzurichten. Wir etablierten in Bielefeld neben der Maxam-Gilbert-Methode kurz darauf auch die Sanger-Sequenzierung, die sich dann aufgrund ihres Automatisierungspotenzials in den nächsten Jahren gegenüber der Maxam-Gilbert-Methode durchsetzte.

**Wann wurden die ersten bakteriellen Genome in Ihrer Arbeitsgruppe analysiert?**

Es dauerte nahezu 20 Jahre, bis es technisch möglich wurde, komplette Bakteriengenome zu sequenzieren. Wir konzentrierten uns in Bielefeld auf die Genomsequenzierung des symbiotisch  $N_2$ -fixierenden Bodenbakteriums *Sinorhizobium meliloti* und des Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum*. Die Publikation des Genoms von *Sinorhizobium meliloti*, bestehend aus drei Replikons, erfolgte im Jahr 2001 in der Zeitschrift *Science*, wobei jedes einzelne Replikon noch in *PNAS* publiziert werden konnte. Die *Science*-Publikation ist bis heute nahezu 600mal zitiert worden. Das Genom von *Corynebacterium glutamicum* wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Degussa, heute Evonik, entschlüsselt (Abb. 1). Die *Corynebacterium glutamicum*-Sequenz stand 2001 zur Verfügung und konnte im Jahr 2003 im *Journal of Biotechnology* veröffentlicht werden. Auch diese Publikation weist in der Zwischenzeit einen Zitierungsstand von über 350 auf.

### Wie entwickelte sich die Genomforschung unter Ihrer Ägide in Bielefeld weiter?

Mit den beiden entzifferten Bakteriengenomen war für meinen Lehrstuhl in Bielefeld das Zeitalter der Genomsequenzierung eingeläutet. Zusammen mit meinen Kollegen Werner Goebel von der Universität Würzburg und Gerhard Gottschalk von der Universität Göttingen konnten wir das Bundesministerium für Bildung und Forschung davon überzeugen, in Deutschland ein größeres bakterielles Genomsequenzier-Programm aufzulegen. Die Grundidee war, die bakterielle Genomanalyse für interessierte deutsche Gruppen mittels weniger Sequenzierzentren zu fördern. Ein solches Zentrum wurde im Jahr 2001 in der Universität Bielefeld eingerichtet. Es kooperierte mit 26 Projektpartnern aus Universitäten, Forschungsinstituten und Industrieunternehmen auf dem Gebiet der Genomforschung an Bakterien für den Umweltschutz, die Landwirtschaft und die Biotechnologie. Dabei kristallisierte es sich heraus, dass die Genomforschung ohne eine umfangreiche Bioinformatik nicht denkbar ist. In Bielefeld wurde deshalb auch zügig mit dem Ausbau einer bioinformatischen Abteilung begonnen. Sie war zunächst zuständig für die Assemblierung, also die Zusammenführung von Nukleotidsequenzen zu längeren Fragmenten, dann für die Genidentifizierung, d. h. die Lokalisierung von Genen auf längeren DNA-Fragmenten und schließlich für die Annotation, dies bedeutet die Zuweisung von möglichen Funktionen zu identifizierten Genen mittels Sequenzvergleich.

### Welche Ergebnisse konnten dank des BMBF-Programmes erarbeitet werden?

Die Initiative des Bundesministeriums erwies sich als sehr erfolgreich, was die lange Liste der in Bielefeld erarbeiteten Bakteriengenome deutlich macht. Die Sequenzierung der bakteriellen

Genome erfolgte zunächst mit Kapillarsequenzierern. Dieses Verfahren wurde in den Jahren 2006 und 2007 von der sogenannten Next Generation Sequencing-Technologie abgelöst, die die Kapazität des Sequenziervorgangs um Zehnerpotenzen steigert. Millionen von Sequenzierklonen können damit parallel sequenziert werden. Diese neue Hochdurchsatztechnologie funktioniert, ohne dass man die zu sequenzierenden DNA-Fragmente zuvor klonieren muss. Am Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld wurde die Next Generation-Technologie ab 2007 für die Sequenzierung bakterieller Genome eingesetzt, und das Bundesministerium machte in einem Aufstockungsprogramm Mittel verfügbar, um weitere Genome biotechnologisch interessanter Bakterien analysieren zu können. Das Programm lief Ende des Jahres 2011 aus. Es hat wesentlich dazu beigetragen, dass die in Deutschland angesiedelte Biotechnologie-Forschung auf verlässliche bakterielle Genomsequenzen zurückgreifen kann.

### Sind die Verfahren zur Sequenzierung mit der Next-Generation-Technik abgeschlossen?

Blickt man nach vorn, ist die Sequenzieretechnologie noch lange nicht ausgereizt. Man erwartet als nächsten Schritt die zuverlässige Sequenzierung von DNA-Einzelmolekülen, die ohne PCR-Amplifizierung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente auskommt.

### Wann wurden Genom-basierte Analyseverfahren, also Omics-Technologien, in Bielefeld etabliert?

Mit der Möglichkeit, die Genomsequenzen beliebiger Organismen in kurzer Zeit zu bestimmen, rückten genombasierte Analyseverfahren in den Vordergrund. Allgemein versteht man darunter sogenannte Omics-Technologien, zu denen Transkriptomik, Proteomik und Metabolomik gezählt werden. Die Omics-Technologien wurden am Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld frühzeitig, bereits ab dem Jahr 2002, angesiedelt. Dazu gründeten wir zwei Institute – das Institut für Genomforschung mit einer Technologieplattform Genomik und das Institut für Bioinformatik mit einer Technologieplattform Bioinformatik. Beide Plattformen sind eng miteinander verbunden, wobei die Technologieplattform Genomik für das Erzeugen von Omics-Daten verantwortlich ist, die von der Technologieplattform Bioinformatik sodann erfasst, ausgewertet und gespeichert werden.

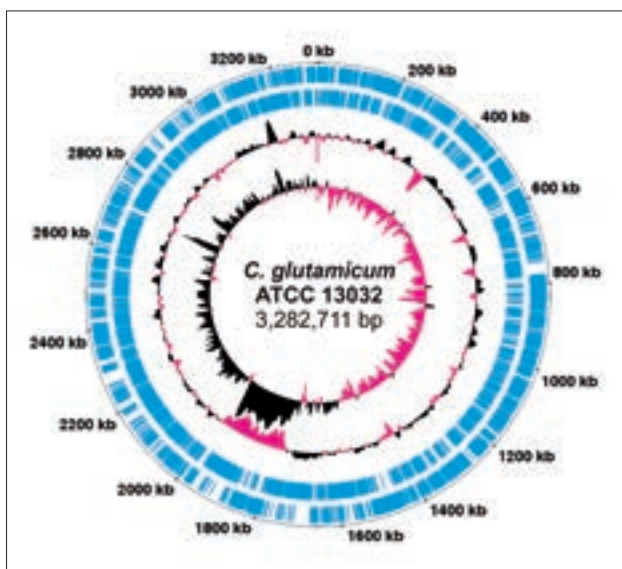
### Welchen Einfluss hatten die zahlreichen „Omics“ auf die Molekulargenetik?

Die Molekulargenetik hat mit der Genomforschung und den Omics-Analysen eine steile Entwicklung genommen, weil es zum ersten Mal möglich wurde, das zelluläre Geschehen in ausgewählten Organismen ganzheitlich zu beschreiben.

### Auf welche Weise soll diese Ganzheitlichkeit gelingen?

Mit der Genomforschung lassen sich mittlerweile alle Gene und

Abbildung 1: Das Genom des Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum*



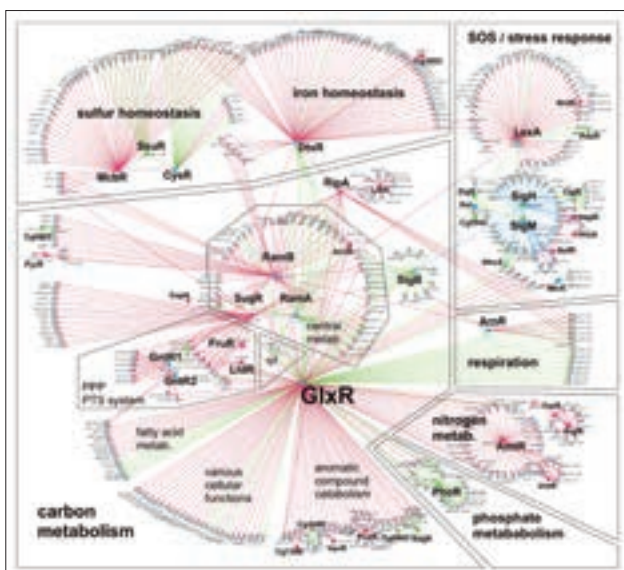
Grafik: J. Kalinowski, CeBITec, Univ. Bielefeld

regulatorischen Elemente einer Zelle erfassen. Die Transkriptomik schließt daran an und ermöglicht es mithilfe der Microarray-Technologie, die Menge der transkribierten Gene abhängig vom jeweiligen zellulären Zustand zu beschreiben. Mit der Proteomanalyse kann dann ein großer Teil der Proteine identifiziert werden, die in einer Zelle vorkommen. Die Metabolomik schließlich ist darauf ausgerichtet, die in einer Zelle existierenden Metabolite zu erfassen. Das Ergebnis all dieser Verfahren ist eine große Fülle von Einzeldaten, deren gegenseitige Abhängigkeit analysiert werden muss. Nur so lässt sich das zelluläre Geschehen auch tatsächlich ganzheitlich beschreiben. Hier kommt die genom-basierte Systembiologie ins Spiel, die sich zum Ziel gesetzt hat, den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Kategorien von Omics-Daten aufzuklären.

**Welchen systembiologischen Forschungsschwerpunkt setzt das Centrum für Biotechnologie in Bielefeld zurzeit?**

Unser Forschungsschwerpunkt auf dem Gebiet der Systembiologie ist die systematische Beschreibung des Transkriptionsgeschehens bei dem Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum* (Abb. 2). Von den schätzungsweise 128 Transkriptionsfaktoren, die dem Bakterium eigen sind, konnten zwischenzeitlich rund zwei Drittel einschließlich der Regulationsnetzwerke analysiert werden. Damit ist die Transkription in der *Corynebacterium glutamicum*-Zelle aber längst nicht umfassend beschrieben, haben sich doch neben den Transkriptionsfaktoren in jüngerer Zeit auch immer mehr regulatorische RNAs in den Vordergrund gespielt. Auch sie können mittlerweile über RNA-Sequenzierung mit den Next-Generation-Sequencing-Methoden gut identifiziert werden.

Abbildung 2: Die hierarchische Transkriptionsregulation des Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum*



Quelle: Kohli et al., J. Biotechnol. (2009) 143, 239-246.

**Im Jahr 2008 haben Sie Ihren Lehrstuhl für Genetik an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld nach nahezu drei Jahrzehnten verlassen. Haben Sie sich auch aus der Forschung zurückgezogen?**

Ich hatte das Glück, dass mir die Universität Bielefeld am Centrum für Biotechnologie eine Senior Research-Professur für Genomforschung an industriellen Mikroorganismen zur Verfügung stellte, die ich nutzen kann, um meine Forschungsinteressen fortzuführen. Das eröffnet mir die Möglichkeit, mich nach der Genomforschung, den Omics-Analysen und der Systembiologie mit einer neu entstehenden Forschungsrichtung, der sogenannten Synthetischen Biologie, zu beschäftigen. Die Synthetische Biologie ist meines Erachtens die unmittelbare Fortsetzung der Systembiologie. Sie nutzt das immense Wissenspotenzial der genom-basierten Systembiologie mit dem Ziel, synthetische Zellen zu entwickeln, die die interessantesten Eigenschaften unterschiedlicher Organismen in sich vereinen. Der Systembiologie kommt dabei im Vorfeld die entscheidende Rolle zu, über Modellbildung und Simulation die Funktionsfähigkeit synthetischer Zellen zu erfassen. Dieser ingenieurmäßige Ansatz ist der Grund dafür, dass die Synthetische Biologie als neue Technikwissenschaft gilt. Ich habe mich bereits ab dem Jahr 2009 intensiv mit der Synthetischen Biologie auseinandergesetzt. Damals arbeitete ich zusammen mit Kolleginnen und Kollegen an der DFG-acatech-Leopoldina-Studie zu Fragen der Synthetischen Biologie. Am Centrum für Biotechnologie der Universität Bielefeld waren es die Studenten aus den einschlägigen Masterstudiengängen, die sich mit Experimenten der Synthetischen Biologie beschäftigten und sich erfolgreich an den "International Genetically Engineered Machines (iGEM)"-Wettbewerben 2010 und 2011 beteiligten.

**Nach diesem Rückblick auf die Entwicklung der Molekulargenetik – was raten Sie den Studierenden heute?**

Es gibt zurzeit keinerlei Hinweise dafür, dass sich die molekular-genetische Entwicklung verlangsamen würde oder gar zum Stillstand kommen könnte. Man kann deshalb junge Studierende nur weiterhin dazu ermuntern, sich für dieses Gebiet zu begeistern und dessen Zukunft mitzugestalten.

Das Interview führte Claudia Eberhard-Metzger.

**Kontakt:**

**Prof. Dr. Alfred Pühler**  
 Centrum für Biotechnologie  
 Universität Bielefeld  
 puehler@CeBiTec.Uni-Bielefeld.de

## Ein interdisziplinäres Zentrum für Biotechnologie an der Universität Bielefeld

von Stefan Weidner und Thomas Noll

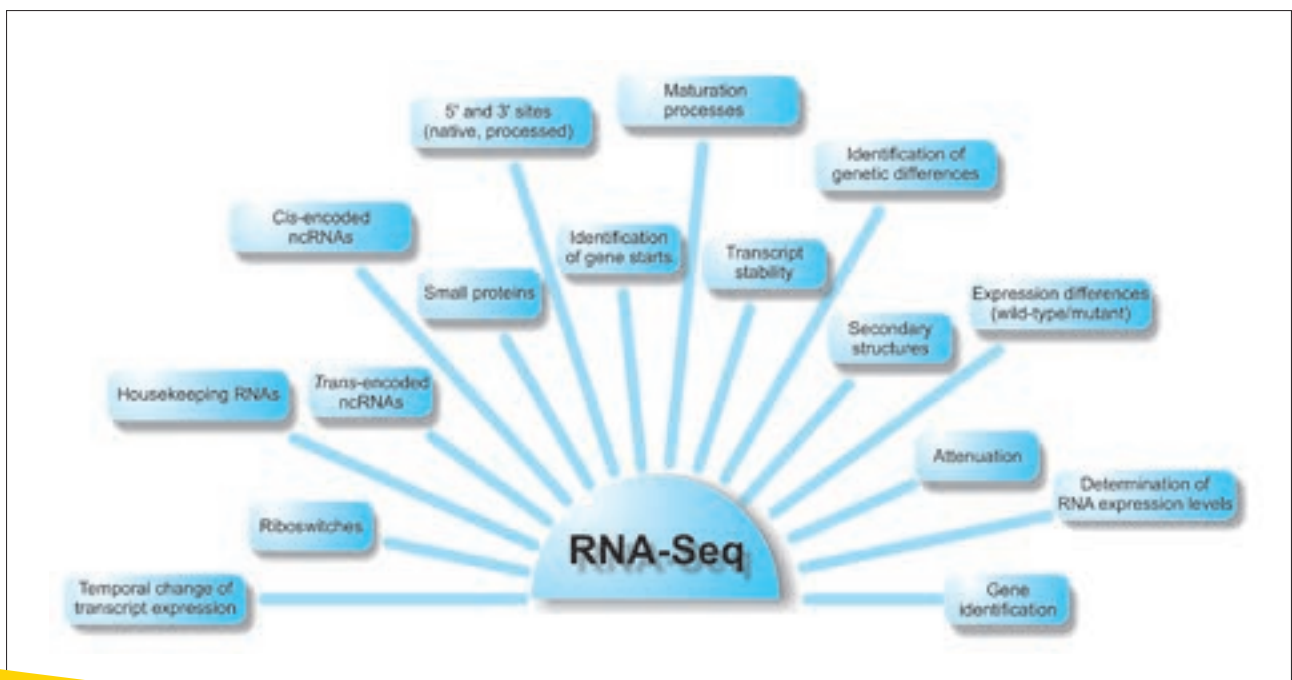
Das Centrum für Biotechnologie ist eine fakultätsübergreifende zentrale wissenschaftliche Einrichtung der Universität Bielefeld. Die Forschungsschwerpunkte liegen in der Genomforschung und Systembiologie von Mikroorganismen und von Pflanzen, in der medizinischen Biotechnologie und auf dem Gebiet der Bioenergieforschung. Von großer Bedeutung sind dafür die drei Technologie-Plattformen für Genomik, für Bioinformatik und für Fermentation und Bioenergie, die über eine moderne apparative Ausstattung und ein breites Methodenspektrum verfügen, wie sie für die Durchführung der Forschungsvorhaben unabdingbar sind.



### Fakultätsübergreifende Forschung an einem Ort

Die Universität Bielefeld zeichnet sich seit ihrer Gründung durch ihre interdisziplinäre Ausrichtung aus. Neben den Fakultäten wurden an der Universität verschiedene fakultätsübergreifende zentrale wissenschaftliche Einrichtungen gegründet, wovon das CeBiTec heute eine ihrer größten ist. Zu seinen Aufgaben zählte von Beginn an, die biotechnologischen Aktivitäten und Forschungsvorhaben an der Universität zu bündeln, eine Vernetzung von Techniken aus unterschiedlichen Forschungsgebieten zu fördern und innovative Projekte zu entwickeln. Seit seiner Gründung im Jahr 1998 ist das CeBiTec kontinuierlich gewachsen. Heute sind dort insgesamt 36 Arbeitsgruppen tätig, wovon die meisten zugleich Mitglied einer der naturwissenschaftlichen Fakultäten der Universität sind. Der Kernbereich des CeBiTec ist in einem eigenen, 2009 vollständig fertiggestellten Gebäude mit ca. 3.300 m<sup>2</sup> Hauptnutzfläche auf dem Campus der Universität untergebracht.

Abbildung 1: Forschungsbereiche und Fragestellungen, zu denen RNA-Seq Beiträge leisten kann



Quelle: Armin Neshat, CeBiTec





Vorbereitung eines Hochdurchsatz-Sequenziersystems in der Technologie-Plattform Genomik (Bild: CeBiTec)

## Forschungsfelder und Projekte

Einer der Schwerpunkte der Forschung liegt in der Genomforschung und der Systembiologie von Mikroorganismen. Insbesondere durch die Förderinitiative des BMBF, „Genomforschung an Mikroorganismen – GenoMik“, in dessen Rahmen das in Bielefeld angesiedelte Kompetenznetz „Genomforschung an Bakterien mit Bedeutung für Landwirtschaft, Umweltschutz und Biotechnologie“ eingerichtet wurde und durch die anschließende Förderinitiative „GenoMik-Plus“, konnte dieses Feld zwischen 2001 und 2009 intensiv ausgebaut werden. Im Fokus der Genom- und Postgenomforschung und der bioinformatischen Analyse stehen Bakterien mit außergewöhnlichen metabolischen Eigenschaften (z. B. Schneiker *et al.*, 2007). Die biotechnologische und industrielle Anwendung ist durch weiterführende Projekte, wie etwa die vom BMBF und vom Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung NRW geförderte Initiative „CLIB<sup>2021</sup> – Cluster Industrielle Biotechnologie“, weiter verstärkt worden. Die Entschlüsselung der Genome von Nutzpflanzen und die Aufklärung ihrer Funktionen mit Methoden der Postgenomforschung und Bioinformatik stellen einen weiteren Forschungsschwerpunkt dar. Dabei kommt den vom BMBF geförderten GABI – (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) Projekten eine zentrale Rolle zu (z. B. Kleinboelting *et al.*, 2012).

Auf dem Gebiet der medizinischen Biotechnologie werden sowohl Projekte, die sich mit der Genom- und Postgenomforschung von Säuger-Zelllinien (z. B. Becker *et al.*, 2011), als auch solche, die sich mit pathogenen Mikroorganismen und mit Antibiotikaresistenzen befassen, durchgeführt. Die Entwicklung und Optimierung von Methoden der funktionellen Genomforschung zur Untersuchung von Produktionszelllinien (CHO und human) unter Prozessbedingungen, wie sie z. B. in dem vom MIWF-NRW geförderten Projekt „ProCell – Innovative Plattformtechnologien für die integrierte Prozessentwicklung mit Zellkulturen“ durchgeführt werden, spielen dabei eine entscheidende Rolle. Die Entschlüsselung und Interpretation von Genomen pathogener Bakterien, beispielsweise der Gattung *Corynebacterium sp.*, aber auch die systematische Rekonstruktion transkriptioneller Regulationsnetzwerke dient dazu, Rückschlüsse auf ihre Lebensweise ziehen zu können.

Einen weiteren Forschungsschwerpunkt des CeBiTec bildet die Bioenergieforschung. Hierbei wird die Konversion von Sonnenenergie in Biomasse, Biokraftstoffe und hochwertige Produkte, vor allem durch Photosynthese in Mikroalgen, untersucht (z. B. Doebbe *et al.*, 2010). Zu nennen ist hier das von der EU geförderte Projekt „Towards a better sunlight to biomass conversion efficiency in microalgae – SUNBIOPATH“. Die Potentiale der Wasserstoffproduktion werden unter anderem in dem BMBF-geförderten Projekt „Bio-H<sub>2</sub> Production in Microalgae: From Systems Biology to Applied Solar Energy Conversion“ untersucht. Die Potentiale mikrobieller Gemeinschaften in der Umwelt werden beispielsweise in dem EU-Projekt „Metagenomics for bioexploration – tools and application – METAEXPLORE“ untersucht.

Der internationale Austausch und die Kooperationen auf den genannten Gebieten werden auch durch eine neue, erstmalig im September 2010 gestartete Konferenzserie mit der European Science Foundation (ESF) unterstützt. Die „ESF-Bielefeld-CeBiTec-Conference“ widmet sich im jährlichen Wechsel den drei Themenfeldern „Microbes and Industrial Biotechnology“, „Microorganisms for Bio-fuel Production from Sunlight“ und „Functional Genomics in Cell Culture Technology: From Sequence to Function and Application“.

## Technologie-Plattformen

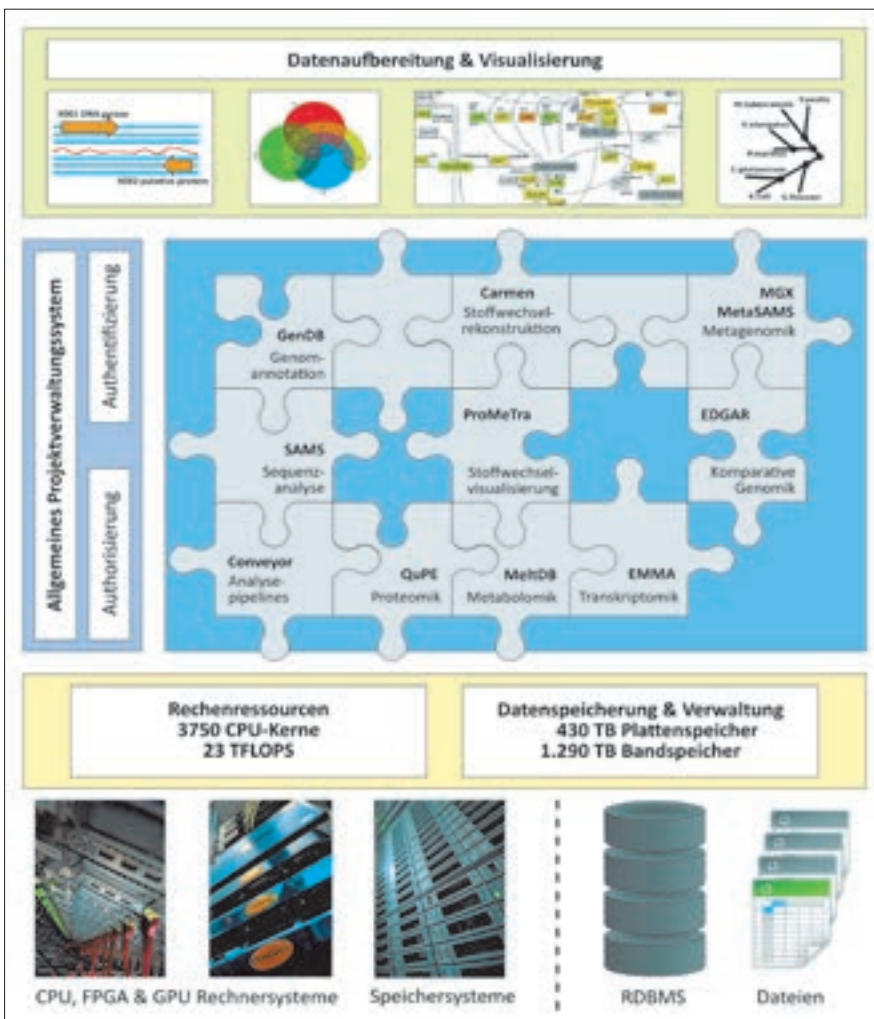
Ein wesentliches Strukturelement des CeBiTec sind seine Technologie-Plattformen. Die Genomik-Plattform verfügt über die Hochdurchsatz-Sequenziersysteme „454 Genome Sequencer flx+“ (Roche), „Ion Torrent Ion Personal Genome Machine“ (Life Technologies) und „Solexa Genome Analyzer GA IIX“ (Illumina), die für die Sequenzierung mikrobieller, aber auch größerer Genome wie etwa von Pflanzen, des Chinesischen Hamsters oder für komplexere DNA-Proben wie Metagenome eingesetzt werden. Transcriptomics-Techniken, wie Genexpressionsstudien mittels Microarrays, quantitative Real-Time RT-PCR oder die Sequenzierung von cDNA, die aus revers transkribierten Transkriptomproben generiert wird, werden vor allem bei Bakterien mit industrieller Bedeutung angewandt (Abb. 1). Auf dem Gebiet der Proteomics kommen Gel- und nicht Gel-basierte Techniken

zur Separation von Proteomen zum Einsatz. Die Identifikation von Proteinen erfolgt durch tryptische Fingerprints und MALDI-TOF-Massenspektrometrie am „ultrafleXtreme“ (Bruker), die Analyse von Proteinmodifikationen mittels MALDI-TOF-MS/MS oder durch LC-ESI-MS/MS (Bruker micrOTOF-Q). Der Bereich Metabolomics umfasst die Erstellung metabolischer Profile und Flux-Analysen durch Gaschromatographie oder Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS. Die Technologie-Plattform betreibt drei GC- bzw. GC×GC-Massenspektrometer. Für sehr hydrophile Moleküle kommt die LC-MS-Technik, die mit einem Quadrupol-TOF- und einem ESI Ionfallen-Massenspektrometer durchgeführt wird, zur Anwendung.

Hochspezialisierte Hard- und Software-Infrastruktur, die für das Management, die Prozessierung und Analyse experimentell ermittelter Daten, insbesondere aus den Hochdurchsatztechnologien, unabdingbar ist, wird in der Bioinformatik-Plattform bereitgestellt (Abb. 2). Neben flexibler, vielseitig einsetzbarer

Computer-Cluster, betreibt die Plattform verschiedene spezialisierte Systeme, z.B. für Hardware-beschleunigte Sequenz-Alignments und BLAST-Suchen oder GPU-Systeme für Mapping-Operationen kurzer Sequenzen. Die Ausstattung umfasst unter anderem 300 vielseitig einsetzbare Rechenknoten mit 3.750 CPU Cores und 8 Spezialsysteme mit einer Gesamtleistung von etwa 23 Tflop, sowie Plattenspeichersysteme mit ca. 430 TB und Bandbibliotheken mit einer Kapazität von 1.290 TB. Umfangreiche Software-Anwendungen für alle Omics-Technologien werden von der Plattform und den bioinformatisch ausgerichteten Arbeitsgruppen des CeBiTec entwickelt und bereitgestellt. Für die Annotation von Genomsequenzen kommt GenDB zum Einsatz. Für große Datensätze aus der Hochdurchsatz-Sequenzierung werden SAMS und MetaSAMS verwendet. Vergleichende Genomanalysen, wie die Identifikation orthologer Gene in unterschiedlichen Genomen und die Gen-Klassifizierung in „Core-Gene“ oder „Singletons“ wird durch EDGAR geboten. EMMA wurde für die systematische Speicherung und Auswer-

Abbildung 2:



Hardware- und Software-Architektur der Technologie-Plattform Bioinformatik am CeBiTec (Quelle: Alexander Goesmann u. Stefan Albaum, CeBiTec).

tung von Transkriptom-Daten entwickelt. Für experimentelle Daten aus der Protein-Massenspektrometrie kommt QuPE zum Einsatz und mit der MeltDB-Plattform werden Datensätze aus Metabolomics-Experimenten analysiert und annotiert. Basierend auf der funktionalen Annotation eines Genoms können mit CARMEN (Schneider *et al.*, 2010) Stoffwechselwege rekonstruiert und im standardisierten SBML-Format gespeichert werden. Mit Hilfe des Programms ProMeTra (Neuweger *et al.*, 2009) lassen sich dann die Messdaten aus korrelierenden Postgenomanalysen auf den entsprechenden Stoffwechselkarten visualisieren. Des Weiteren werden von der Plattform eine Vielzahl an Software-Tools und verschiedene eLearning-Medien durch den BiBiServ (<http://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de>) über das Internet bereitgestellt.

Die technische Ausstattung für die Kultivierung und Fermentation von Mikroorganismen und Zellkulturen unterschiedlichster Organismen, die Entwicklung und Optimierung von Prozessen und Verfahren der Produktgewinnung sowie für die Gewinnung von Bioenergie und Biomasse wird in der „Technologie-Plattform Fermentation und Bioenergie“ betrieben. Dazu stehen mehr als 30 Bioreaktoren unterschiedlicher Hersteller und Größe (bis zu 300 l für die Kultivierung von Mikroorganismen und bis zu 100 l für Säuger-Zelllinien) zur Verfügung. Spezielle Algen-Bioreaktoren werden für Arbeiten zur Wasserstoffproduktion eingesetzt, während die Biomethanproduktion in Biogas-Modellfermentern untersucht wird.

### Von der Schule bis zur Promotion: Biotechnologie-Ausbildung in Bielefeld

Die Postgraduierten-Ausbildung wird im Rahmen verschiedener Programme, die im Graduate Centre organisiert sind, gefördert, wobei das CLIB Graduate Cluster „Industrielle Biotechnologie“ mit 28 vergebenen Stipendien und weiteren assoziierten Doktorandinnen und Doktoranden das z. Zt. stärkste Programm bildet. Das CeBiTec betreibt gemeinsam mit der Fakultät für Biologie das sogenannte *teutolab* Biotechnologie und gibt dort Schülerinnen und Schülern weiterführender Schulen Einblicke in molekularbiologische und biotechnologische Arbeitsweisen. Mit maßgeblicher Unterstützung des CeBiTec nahmen in 2010 und 2011 Studierende der M.Sc.-Studiengänge „Genome-based Systems Biology“ und „Molekulare Biotechnologie“ sehr erfolgreich am iGEM-Wettbewerb (International Genetically Engineered Machine Competition) für Synthetische Biologie teil. In 2011 hat es das Bielefelder Team mit einem Biosensor, der das Umweltgift Bisphenol A in Lebensmittelbehältnissen nachweist, beim finalen Wettbewerb am Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Boston unter 160 Konkurrenten in die Gruppe der besten 16 und von den Europäischen Teams sogar unter die besten drei geschafft.

---

### Referenzen:

- Becker *et al.* (2011) Unraveling the Chinese hamster ovary cell line transcriptome by next-generation sequencing. *J Biotechnol.* 156:227–235.
- Doebbe *et al.* (2010). The interplay of proton, electron and metabolite supply for photosynthetic H<sub>2</sub> production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 285:30247–30260.
- Kleinboelting *et al.* (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Res.* 40:D1211–1215.
- Neuweger *et al.* (2009) Visualizing post genomics data-sets on customized pathway maps by ProMeTra – aeration-dependent gene expression and metabolism of *Corynebacterium glutamicum* as an example. *BMC Systems Biology* 3:82.
- Schneider *et al.* (2010) CARMEN – Comparative Analysis and *in silico* Reconstruction of organism-specific METabolic Networks. *Genet Mol Res* 9(3):1660–1672.
- Schneiker *et al.* (2007) Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat Biotechnol.* 25:1281–1289.

---

### Kontakt:

#### Dr. Stefan Weidner

Geschäftsführer des CeBiTec  
Universität Bielefeld  
[stefanw@cebitec.uni-bielefeld.de](mailto:stefanw@cebitec.uni-bielefeld.de)

#### Prof. Dr. Thomas Noll

Wissenschaftlicher Direktor des CeBiTec  
Universität Bielefeld  
[Thomas.Noll@uni-bielefeld.de](mailto:Thomas.Noll@uni-bielefeld.de)

[www.cebitec.uni-bielefeld.de](http://www.cebitec.uni-bielefeld.de)



Stefan Weidner (links) ist Geschäftsführer und Thomas Noll (rechts) Wissenschaftlicher Direktor des Centrums für Biotechnologie (Quelle: Kim-Christian Meyer, CeBiTec).

# synthetische biologie

## Neue Werkzeuge nicht nur für Biologen

von Maximilian Hörner und Wilfried Weber

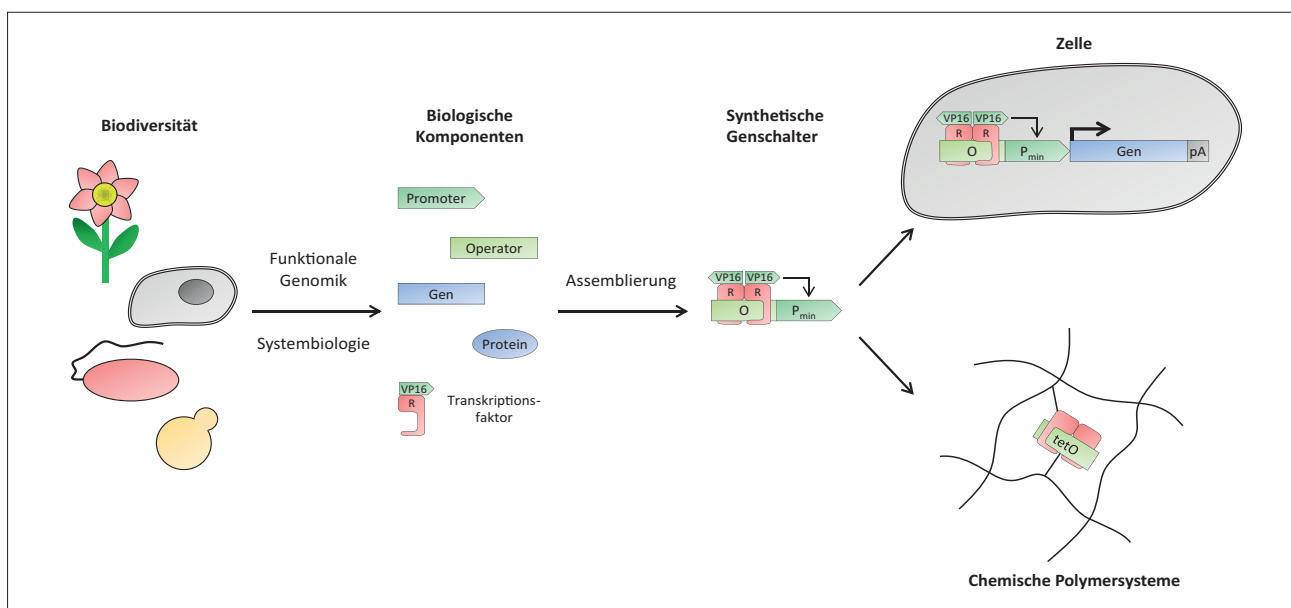
Die Synthetische Biologie verfolgt das Ziel, mit den Methoden der Ingenieurwissenschaften biologische Systeme mit gewünschten Eigenschaften herzustellen. Hierzu werden modulare biologische Komponenten zu komplexen Schaltkreisen kombiniert und anschließend zur Erfüllung der gestellten Aufgabe in eine Wirtszelle eingeführt. In diesem Beitrag zeigen wir auf, wie einzelne biologische Komponenten einerseits zu genetischen Schaltern in menschlichen Zellen kombiniert werden können, um damit neue Medikamente zu entdecken. Andererseits beschreiben wir, wie die gleichen biologischen Schalter in andere Disziplinen wie beispielsweise die Materialwissenschaften übertragen werden können, um dort neuartige biohybride Materialien für biomedizinische Anwendungen zu synthetisieren.

### Synthetische Biologie – Modulare Konstruktion biologischer Systeme

Um biologische Systeme mit gewünschten Eigenschaften herzustellen, verfolgen Bioingenieure in der aufstrebenden Disziplin der Synthetischen Biologie einen modularen Ansatz: Einzelne, gut charakterisierte Komponenten (Module) wie Promotoren, Transkriptionsfaktoren oder Enzyme werden zu genetischen oder metabolischen Schaltkreisen verknüpft. Diese Schaltkreise werden anschließend in Zellen transferiert und führen dort zur Ausbildung des gewünschten Phänotyps (Abb. 1).

Dieser modulare Konstruktionsansatz wurde bereits in verschiedenen Anwendungsbereichen erfolgreich umgesetzt. Beispiele hierfür sind Mikroorganismen zur Herstellung von Biotreibstoffen und Feinchemikalien oder zum Abbau von Umweltschadstoffen. Des Weiteren ermöglichte die Synthetische Biologie neuartige

Abbildung 1: Herangehensweise der Synthetischen Biologie



Durch die intensive Forschung in der funktionalen Genomik und der Systembiologie wurde eine Vielzahl biologischer Komponenten entdeckt und quantitativ charakterisiert. Diese modularen Komponenten können nun analog zur Vorgehensweise in den Ingenieurwissenschaften zu komplexen Schaltern und Schaltkreisen mit gewünschter Funktionalität kombiniert werden. Diese Schalter und Schaltkreise können einerseits in Zellen eingeführt werden, um den gewünschten Phänotyp zu erhalten. Andererseits können sie in chemische Polymersysteme integriert werden, um dort Materialien mit extern schaltbaren Eigenschaften zu synthetisieren. pA = Polyadenylierungssignal. (Grafik: Maximilian Hörner).



Die Arbeitsgruppe Synthetische Biologie der Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (von links nach rechts):

Dr. Natascha Sprossmann, Frauke Bartels-Burgahn, Kathrin Jakobus, Marc Würstlin, Dr. Erik Christen, Natascha Hotz, Maximilian Hörner, Sabrina Wend, Dr. Matias Zurbriggen, Raphael Gübeli, Maria Karlsson, Hanna Wischhusen, Balder Rebmann, Hannes Beyer, Beate Kaufmann, Prof. Wilfried Weber (Foto: Christian Geraths)

Forschungsansätze entlang der pharmazeutischen Wertschöpfungskette: So wurden dank synthetisch-biologischer Methoden (i) die molekularen Grundlagen von Krankheiten aufgeklärt, (ii) neue Ansätze zur Vorbeugung gegen Infektionskrankheiten entwickelt, (iii) pharmazeutische Wirkstoffe basierend auf genetischen und metabolischen Schaltkreisen entdeckt und effizient produziert. Des Weiteren zeigen synthetische genetische Schaltkreise in ersten Versuchen ein vielversprechendes Potential, um als „molekulare Prothesen“ defekte zelluläre Regulationsmechanismen zu ersetzen (Weber and Fussenegger, 2012).

### Synthetische genetische Schalter für pharmazeutische Anwendungen

Die am universellsten einsetzbaren Schalter in der Synthetischen Biologie beruhen auf Stimulus-sensitiven Protein-DNA-Interaktionen. In diesen Schaltern wird über einen externen Stimulus die Bindung eines Transkriptionsfaktors an einen Zielpromoter gesteuert, um somit die Aktivität eines Zielgens zu beeinflussen. So wurden Schalter entwickelt, die es ermöglichen, die Genexpression in tierischen Zellen mit Medikamenten oder Metaboliten zu steuern (Hörner and Weber, 2012).

Andererseits ermöglichen diese synthetischen Schalter auch die Entdeckung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe. Beispielsweise besitzt *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, eine intrinsische Resistenz gegen das Antibiotikum Ethionamid. Diese Resistenz wird durch EthR vermittelt, ein DNA-bindendes Regulatorprotein. Aufgrund des Resistenzmechanismus (Weber *et al.*, 2008) wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Inhibition der Bindung von EthR an seine DNA-Operatorsequenz  $O_{EthR}$  zu einer Abschwächung der Resistenz führen sollte. Potentielle Wirkstoffe müssen neben der Inhibition von EthR des Weiteren eine gute Verträglichkeit mit menschlichen Zellen aufweisen, sowie die Fähigkeit besitzen, in menschliche Zellen einzudringen, um die üblicherweise intrazellulär lebenden Tuberkulosebakterien zu erreichen. Um simultan nach Wirkstoffen zu filtern, die alle drei Bedingungen erfüllen (Inhibition von EthR, Zellverträglichkeit und Zellgängigkeit), wurde basierend auf der EthR- $O_{EthR}$ -Interaktion

ein synthetischer Schalter in menschlichen Zellen konstruiert. Der Schalter ist ein Fusionsprotein aus EthR und der *Herpes simplex*-abgeleiteten Aktivierungsdomäne VP16 plus einem chimären Promotor, bestehend aus  $O_{EthR}$ , fusioniert an einen Minimalpromotor  $P_{min}$  aus *Drosophila melanogaster* (Abb. 2a). Die Bindung von EthR-VP16 an  $O_{EthR}$ - $P_{min}$  führt zur Expression des Reportergens SEAP (sekretierte alkalische Phosphatase). Dieser Schalter wurde in menschliche HEK (Human Embryonic Kidney)-Zellen integriert und zur Entdeckung von Wirkstoffen verwendet. Nur wenn ein Wirkstoff die drei Bedingungen erfüllte, wurde eine spezifische Abschwächung der SEAP-Expression beobachtet. Mit diesem System wurden neue Wirkstoffe entdeckt, die effektiv in der Lage waren, die intrinsische Antibiotikaresistenz von *M. tuberculosis* gegenüber Ethionamid abzuschwächen (Abb. 2b). Verbesserte Derivate dieses zuerst entdeckten Wirkstoffes befinden sich zurzeit in präklinischen Studien der Firma BioVersys AG ([www.bioversys.com](http://www.bioversys.com)).

### Von synthetischen biologischen Schaltern zu schaltbaren biohybriden Materialien

In den oben erwähnten Beispielen wurden biologische Schalter in Zellen eingefügt, die daraufhin gewünschte Eigenschaften aufwiesen. Die Ansätze der Synthetischen Biologie sind jedoch nicht darauf beschränkt, Zellen neue Eigenschaften zu verleihen – vielmehr können die Bausteine und Konzepte der Synthetischen Biologie in andere Disziplinen wie beispielsweise die Materialwissenschaften übertragen werden.

In biomedizinischen Anwendungen finden häufig sogenannte Hydrogele Anwendung. Hydrogele bestehen aus chemisch oder physikalisch vernetzten wasserquellbaren Polymeren. Aufgrund des hohen Wasseranteils (> 95 %) in gequollenen Hydrogelen sowie der flexiblen Eigenschaften der polymeren Bausteine ähneln diese Materialien in ihren mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix von tierischen Zellen und besitzen eine exzellente Biokompatibilität. Hydrogele wurden bereits vielfach in biomedizinischen Anwendungen eingesetzt, z.B. *in vitro* als Matrix für Zellwachstum im Bereich Tissue Engineering oder *in*

vivo als Depot für therapeutische Proteine. Um trotz dynamisch wechselnder biologischer Erfordernisse stets optimale Materialeigenschaften sicherzustellen, ist es notwendig, die biologischen und mechanischen Eigenschaften der Hydrogele über die Zeit anzupassen. Hierzu eignen sich Hydrogele, deren Eigenschaften über einen extern applizierten Steuerimpuls gezielt gesteuert werden können. Die Synthese solcher Hydrogele für biologische Anwendungen erwies sich jedoch als schwierig, da die meisten verfügbaren Steuermechanismen wie pH oder Temperaturänderungen biologisch häufig inkompatibel sind.

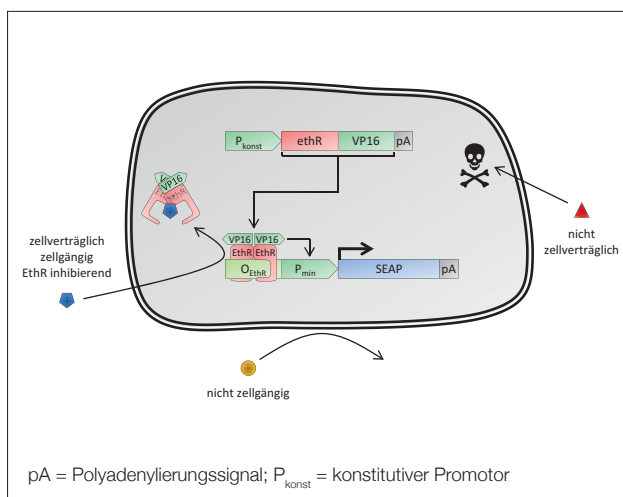
Eine Möglichkeit, diese Limitation zu überwinden, ist ein interdisziplinärer Ansatz aus der Synthetischen Biologie und den Materialwissenschaften: Führt man die Schalter und Schaltkreise aus der Synthetischen Biologie nicht in Zellen ein, sondern integriert sie funktional in Polymernetzwerke, dann eröffnet dies

die Möglichkeit, die Eigenschaften von Hydrogelen unter physiologischen Bedingungen über externe Signale zu steuern (Abb. 1). In dem folgenden Abschnitt wird diese Herangehensweise illustriert.

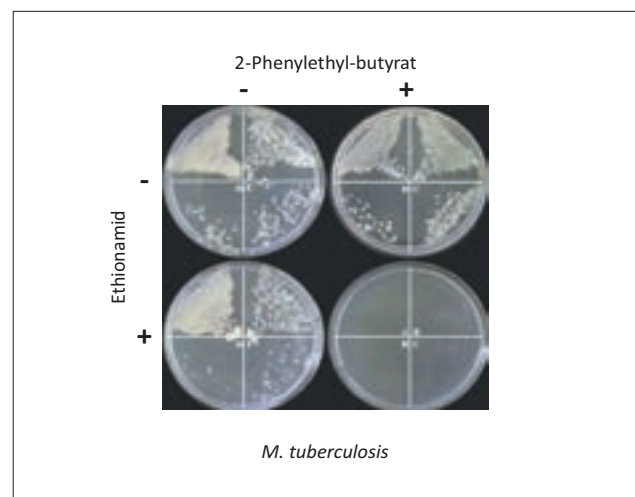
### Synthese eines biohybriden Materials zur induzierbaren Freisetzung von Wirkstoffen

Genetische Schalter beruhen mehrheitlich auf Stimulus-sensitiven DNA-Proteininteraktionen (Abb. 2a). Diese Interaktionen können verwendet werden, um Polymere zu einem Hydrogel zu vernetzen. Die Zugabe des entsprechenden Stimulsmoleküls moduliert somit den Vernetzungsgrad der Polymerketten, was zur Steuerung der Materialeigenschaften verwendet werden kann (Abb. 3). Dieses Konzept wurde kürzlich anhand des Tetrazyklin-Repressors TetR sowie seiner Operatorsequenz tetO realisiert (Christen *et al.*, 2011). TetR bindet an tetO, kann jedoch

Abbildung 2: Synthetischer genetischer Schalter zur Entdeckung von pharmazeutischen Wirkstoffen

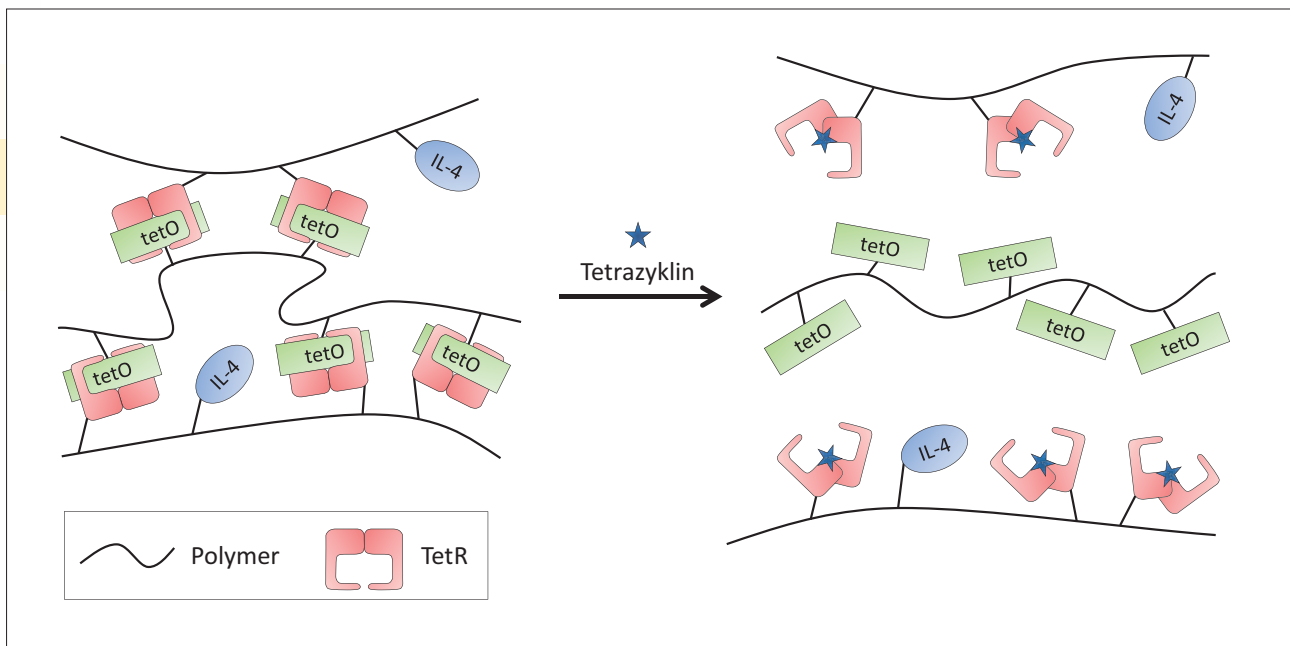


**(a)** Entdeckung von Wirkstoffen. Basierend auf den Resistenzregulatoren von *Mycobacterium tuberculosis* wurde ein synthetischer genetischer Schalter in menschlichen Zellen entwickelt. Dieser Schalter wurde zur Suche nach Substanzen eingesetzt, die spezifisch die Resistenz hemmen können: Nur in Gegenwart von Substanzen, die zellgängig sind, keinen toxischen Effekt auf die Zelle haben und die gleichzeitig den Resistenzregulator EthR hemmen, kann eine spezifische Änderung der Genexpression festgestellt werden.



**(b)** Validierung der entdeckten Substanzen. Der potentielle Wirkstoff 2-Phenylethyl-butyrate wurde in Kombination mit dem Antibiotikum Ethionamid auf seine Wirkung auf *M. tuberculosis* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der neu entdeckte Wirkstoff die Antibiotikaresistenz abschaltet und somit das Bakterium wieder sensitiv gegen das Antibiotikum macht.

Bilder angepasst aus (Weber *et al.*, 2008).



**Abbildung 3: Transfer von genetischen Schaltern aus der Synthetischen Biologie in die Materialwissenschaften**

Der Tetrazyklin-abhängige genetische Schalter wurde von der Biologie in die Materialwissenschaften übertragen. Hierzu wurde der Tetrazyklinrepressor TetR sowie seine Operatorsequenz tetO an lineares Polyacrylamid fusioniert. Durch die Protein-DNA-Interaktion wurden die Polymerketten zu einem Hydrogel quervernetzt. Durch Zugabe von Tetrazyklin konnte das Hydrogel dosisabhängig aufgelöst werden, was zur einstellbaren Freisetzung eines zuvor eingebetteten Therapeutikums (z.B. Interleukin-4, IL-4) verwendet werden kann (Grafik: Maximilian Hörner).

durch Tetrazyklingabe wieder losgelöst werden. Zur Synthese des Hydrogels wurde lineares Polyacrylamid synthetisiert und mit TetR und tetO funktionalisiert. Die Bindung von TetR an tetO führte zur Ausbildung eines stabilen Hydrogels. Als Modell-Therapeutikum wurde das Zytokin Interleukin-4 (IL-4) inkorporiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe steigender Tetrazyklinkonzentrationen zu einer graduellen Auflösung des Hydrogels und somit zu einer steuerbaren Freisetzung von bioaktivem Interleukin-4 führte (Christen *et al.*, 2011). Die vielversprechenden Ergebnisse aus dieser sowie aus verwandten Studien (Jakobus *et al.*, 2012) lassen das Potential dieser interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen Synthetischer Biologie und den Materialwissenschaften erkennen, nämlich die Herstellung neuer Materialien mit maßgeschneiderten Eigenschaften für zukünftige biomedizinische Anwendungen.

#### Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Forschungsprojekt zur Übertragung der Konzepte und Werkzeuge der Synthetischen Biologie in die Materialwissenschaften wird durch einen Starting Grant des European Research Council im Rahmen des 7. EU-Forschungsrahmenprogramms für 5 Jahre gefördert (ERC Grant agreement 259043-CompBioMat).

#### Referenzen:

- Christen, E.H., Karlsson, M., Kämpf, M.M., Schoenmakers, R., Gübeli, R.J., Wischhusen, H.M., Friedrich, C., Fussenegger, M., and Weber, W. (2011). Conditional DNA-protein interactions confer stimulus-sensing properties to biohybrid materials. *Adv Funct Mater* 21, 2861-2867.
- Hörner, M., and Weber, W. (2012). Molecular switches in animal cells. *FEBS Lett in press*.
- Jakobus, K., Wend, S., and Weber, W. (2012). Synthetic mammalian gene networks as a blueprint for the design of interactive biohybrid materials. *Chem Soc Rev* 41, 1000-1018.
- Weber, W., and Fussenegger, M. (2012). Emerging biomedical applications of synthetic biology. *Nature reviews Genetics* 13, 21-35.
- Weber, W., Schoenmakers, R., Keller, B., Gitzinger, M., Grau, T., Daoud-El Baba, M., Sander, P., and Fussenegger, M. (2008). A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9994-9998.

#### Kontakt:

##### Prof. Dr. Wilfried Weber

Zentrum für Biologische Signalstudien BIOSS und Spemann Graduate School of Biology and Medicine SGBM  
Fakultät für Biologie  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
wilfried.weber@biologie.uni-freiburg.de

# Produktentwicklung für die Bioökonomie

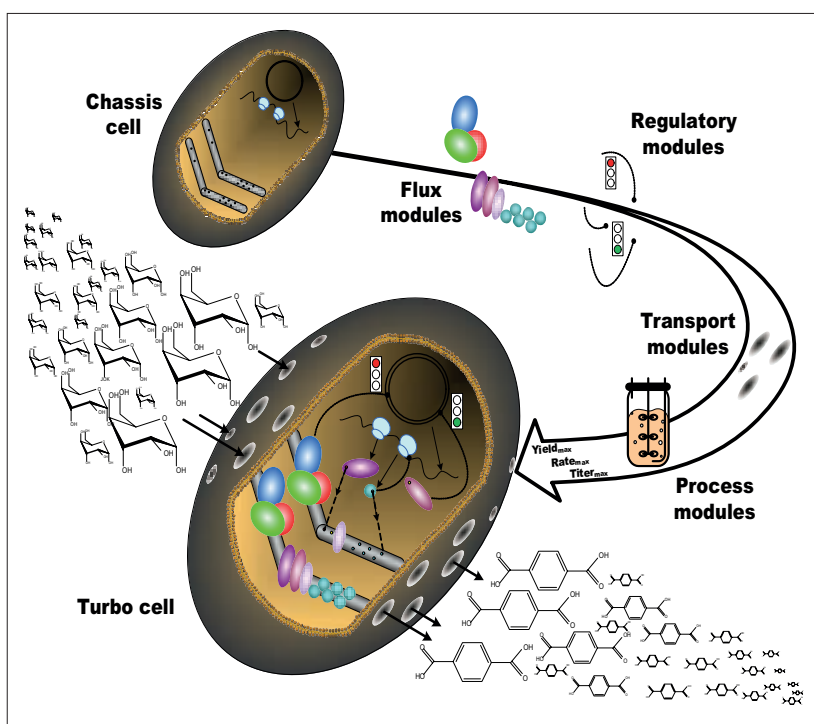
## Neue Methoden zur biotechnologischen Herstellung von Feinchemikalien

von Birgitta E. Ebert und Lars M. Blank

Mikroorganismen sind in der Lage, eine breite Palette hochwertiger Chemikalien und Produkte herzustellen. Dieses Potential wird immer stärker erkannt und in der industriellen Produktion von Chemikalien, Pharmazeutika, Kunst- und Treibstoffen ausgenutzt. Weiteren Schub gewinnen biobasierte Prozesse durch ihre oft bessere Ökobilanz im Vergleich zu traditionellen chemischen Verfahren und ihre Unabhängigkeit von knapper werdenden, nicht-nachwachsenden Rohstoffen. Knackpunkt bei der Implementierung biotechnologischer Prozesse ist jedoch häufig ihre geringe Effizienz, die eine ökonomische Produktion vereitelt. Die Effizienz eines Prozesses wird maßgeblich durch die Faktoren Produktivität, Produktausbeute und Endkonzentration sowie der Prozessstabilität bestimmt. Eine effektive Entwicklung biobasierter Prozesse sollte daher eine Optimierung dieser Faktoren anstreben.

Biologische Systeme können inzwischen immer perfekter modelliert und simuliert werden. Ermöglicht wird dies zum einen durch die immer umfangreichere quantitative „Vermessung“ von Zellen, zum anderen durch die Fortschritte in der systembiologischen Forschung und der Anwendung ingenieurwissenschaftlicher Methoden hinsichtlich Design und Konstruktion auf biologische Produktionssysteme (Synthetische Biologie). Dadurch ist heutzutage ein rationales Design biotechnologischer Verfahren möglich. Die Vision eines zukünftigen Produktionsstamm-Designs nach dem Lego- oder Baukastenprinzip ist in Abb. 1 dargestellt: Minimal ausgestattete Chassis-Zellen werden mit zusätzlichen Modulen erweitert, die die zur optimalen Produktivität erforderlichen Funktionen ermöglichen. Idealerweise verläuft die so konstruierte Produktsynthese entkoppelt und dadurch orthogonal zum komplexen regulatorischen Netzwerk des Wirtsorganismus, da dies wesentlich zur Stabilität und Robustheit des Prozesses beiträgt.

Abbildung 1: Ideales Design von hyper-produzierenden Ganzzellbiokatalysatoren



Eine minimal ausgestattete Chassis-Zelle wird mit geeigneten Modulen zur Regulierung der enzymatischen Reaktionen und Transportprozesse und zur Adaptation an die Bioprozessbedingungen aufgerüstet. Die finale Turbo-Zelle ist dann in der Lage, ausgehend von einfachen Kohlenstoffquellen, komplexe Moleküle (im Bild gezeigt ist die Umwandlung von Glucose in Terephthalat) mit optimaler Rate, Ausbeute und Titer herzustellen (Nachdruck aus Vickers *et al.* (2010) mit Zustimmung der Nature Publishing Group).



Wir stellen hier die rationale und integrierte Prozess- und Stammentwicklung am Beispiel der Rhamnolipidherstellung in nicht-pathogenen Pseudomonaden (Wittgens *et al.*, 2011) dar und diskutieren gegenwärtige Limitierungen und notwendige Fortschritte. Rhamnolipide besitzen aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften ein großes Potential, chemisch synthetisierte Tenside in der Waschmittel-, Kosmetik- und Lebensmittelindustrie zu ersetzen. Es wird erwartet, dass die Produktion biobasierter Tenside jährlich um 3,5% steigt und bis 2020 eine Jahresproduktion von 2,3 Millionen Tonnen aufweisen wird ([http://www.europe-innova.eu/web/guest/home/-/journal\\_content/56/10136/175899](http://www.europe-innova.eu/web/guest/home/-/journal_content/56/10136/175899)).

### Optimierung der Fermentationsbrühe: Steigerung des Produkttiters durch Wahl des Wirtsorganismus

Der Produkttiter, die Konzentration des Wertstoffes in der Fermentationsbrühe, ist ein wichtiger Parameter, der Aufwand und Kosten der folgenden Produktaufreinigung bestimmt. Die toxische Wirkung vieler industriell interessanter Chemikalien (z.B. Alkohole, organische Säuren, Biotenside) auf den Mikroorganismus verhindert oftmals das Erreichen hoher Produktkonzentrationen in fermentativen Prozessen. In diesen Fällen ist bei der Stammauswahl die Sensitivität des Wirtstammes hinsichtlich des Produktes ein wichtiges Auswahlkriterium. In der Entwicklung des Rhamnolipidprozesses wurde der Effekt erhöhter di-Rhamnolipidkonzentrationen auf das Wachstumsverhalten vier verschiedener Mikroorganismen getestet. Als besonders resistent zeigte sich hier der Stamm *Pseudomonas putida* KT2440: Rhamnolipidkonzentrationen bis zu 90 g/l führten nur zu einer marginalen Erniedrigung der exponentiellen Wachstumsrate, während beispielsweise das Wachstum des Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* bereits bei tausendfach niedrigeren Rhamnolipidkonzentrationen um 60% vermindert war.

### Bessere Ausbeute durch Metabolic Engineering

*P. putida* KT2440 ist kein natürlicher Rhamnolipidproduzent. Um die Synthese dieses Biotensids in *P. putida* zu gewährleisten, muss daher zunächst das enzymatische Inventar aufgestockt und das bestehende Netzwerk für die Produktsynthese optimiert werden.

Maximale Produktausbeuten werden erzielt, wenn der Produktsyntheseweg möglichst effizient ist, d.h., dass das Produkt mit dem minimalsten energetischen Aufwand und geringstem Kohlenstoffverlust (durch Bildung von CO<sub>2</sub> oder anderen Nebenprodukten) abläuft und kein Produktabbau stattfindet. Häufig ist die Prozessleistung durch die Verfügbarkeit an Energie oder durch die Kohlenstoffverfügbarkeit limitiert. So kann sich z.B. die Wahl einer stärker reduzierten Kohlenstoffquelle positiv auf einen energielimitierten Prozess auswirken, auch wenn dadurch die Kohlenstoffausbeute geringer ausfällt. Dies macht klar, dass zur Bestimmung des optimalen Stoffwechselweges jeweils die Gesamtbilanz, d.h. nicht nur die Kohlenstoff- sondern auch die Energie- und Redoxbilanz, betrachtet werden muss. Dies ist möglich durch stöchiometrische Modellierung des Gesamtsystems, d.h. des Wirtsmetabolismus plus des potentiell heterologen Stoffwechselweges. Stöchiometrische Modelle sind geeignet, um beispielsweise maximale Produktausbeuten und die hierzu nötigen Reaktionsraten zu berechnen.

Für die Implementierung komplexer und für das Design völlig neuer Stoffwechselwege stehen ausgereifte Software-Tools zur Verfügung (vorgestellt u.a. in Medema *et al.*, 2012). Das Ermöglichen der Rhamnolipidsynthese in *P. putida* KT2440 gestaltete sich jedoch sehr einfach: Da die Synthesewege der beiden Rhamnolipidvorstufen „aktivierte  $\beta$ -Hydroxyfettsäure“ und „aktivierte Rhamnose oder dTDP-L-Rhamnose“ vorhanden sind, ist zur Biotensidsynthese in diesem Stamm nur das Einbringen zweier Transferasen, die die Umsetzung der beiden Vorstufen zum mono-Rhamnolipid katalysieren, nötig (Abb. 2).

Erste Versuche mit dem genetisch modifizierten *P. putida* KT2440 resultierten in Rhamnolipidkonzentrationen von 0,22 g/l und entsprechen damit in etwa denen, die für rekombinante *Escherichia coli* berichtet wurden. Die Produktausbeute blieb jedoch stark hinter dem theoretischen Wert zurück. Aus diesem Grund wurden weitere metabolische Netzwerkanalysen durchgeführt und Strategien entwickelt, um den Freiheitsgrad der Zelle bezüglich der metabolischen Flüsse zu beschneiden und diese in Richtung einer optimalen Rhamnolipidsynthese zu lenken. Solche Optimierungen werden allgemein unter dem Begriff *Metabolic*

Engineering zusammengefasst. Der erste Schritt in diese Richtung war die Blockierung des Polyhydroxyalkanoat-Syntheseweges (Abb. 2). Die Verwendung eines *P. putida* Stammes, dem das für die Polyhydroxyalkanoate-Synthase codierende Gen *phaC1* fehlt, resultierte in einer erhöhten Verfügbarkeit an Fettsäuren und einer signifikanten Verbesserung der Rhamnolipidproduktion. Die Rhamnolipidkonzentration stieg auf 1,50 g/l, die Produktausbeute auf 0,23 Cmol<sub>Rhamnolipid</sub>/C-mol<sub>Glucose</sub>. Produktbildungsrate und Raum-Zeit-Ausbeute konnten ebenfalls deutlich verbessert werden, erreichten jedoch nicht die maximalen Werte, die für Wildtypstämme in der Literatur berichtet wurden.

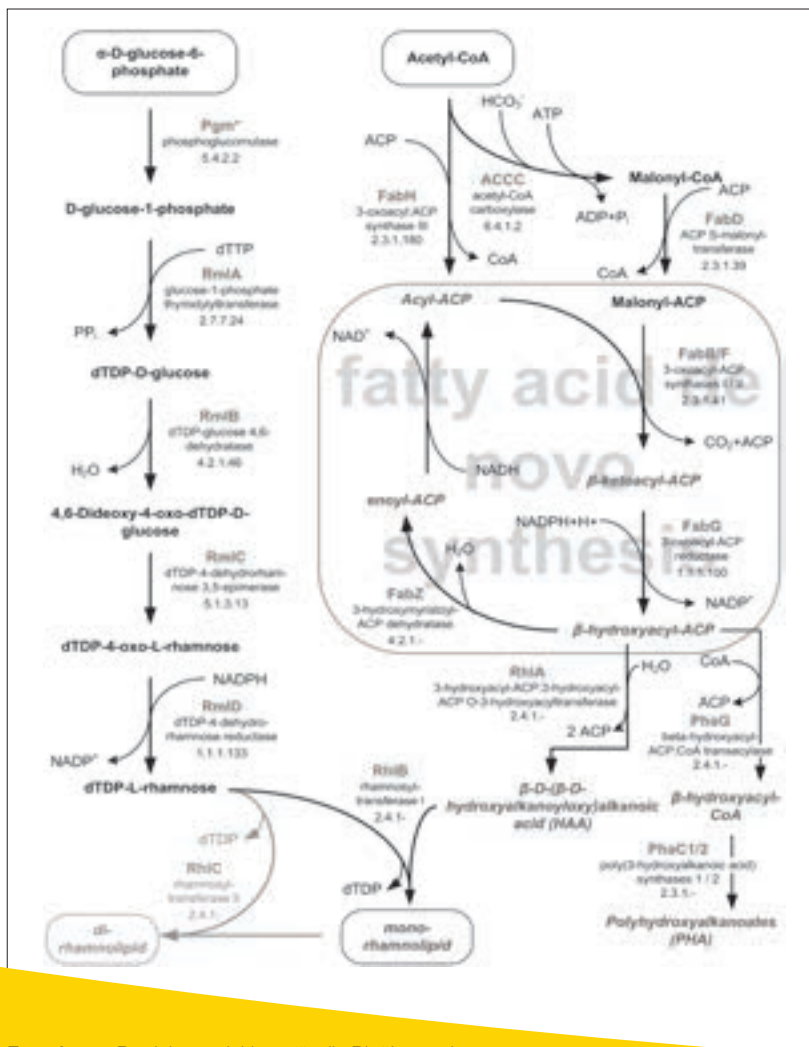
Die in dieser Studie verwendeten rein stöchiometrischen Modelle sind aufgrund der Vernachlässigung von Enzymkinetiken und regulatorischer Interaktionen nur bedingt aussagekräftig, so dass häufig *in silico*-Vorhersage und beobachtete *in vivo*-Antwort des Systems voneinander abweichen. Ziel des computergestützten *Metabolic Engineering* ist daher die Entwicklung detaillierter Modelle, die ein wirklich effektives Design von mikrobiellen Zellfabriken ermöglichen. Fehlende kinetische Daten als auch Modellierungsansätze für die komplexen biologischen Systeme erschweren derzeit allerdings noch die Konstruktion solcher Modelle.

## Gesamtheitliche Betrachtung notwendig: Ökonomie und Ökologie als Grundlage des Prozessdesigns

In Wildtypstämmen wird die Rhamnolipidproduktion stark durch das regulatorische Netzwerk kontrolliert und wird in *P. aeruginosa* beispielsweise durch Stickstofflimitierung aktiviert. Die Biotensidsynthese in dem entwickelten rekombinanten *Pseudomonas*-Stamm hingegen verläuft unabhängig von Prozessbedingungen und Wachstumseigenschaften mit einer konstanten spezifischen Produktionsrate über den gesamten Fermentationsverlauf (Abb. 3). Diese Orthogonalität der Produktbildung, also die Unabhängigkeit gegenüber Wachstumsphasen und Prozessbedingungen, ist für die Entwicklung effizienter und stabil laufender Prozesse von hoher Bedeutung.

Einen systembiotechnologischen Ansatz aus Analyse, Design und Synthese wurde von Kuhn *et al.* (2010) für die parallele Stamm- und Prozessentwicklung vorgeschlagen, wobei die ökologische und ökonomische Evaluation als weiteres Werkzeug für einen rationalen Ansatz mit aufgenommen wurde. In der Rhamnolipidproduktion ist die Produktaufreinigung, die klassisch über Extraktion mittels großer Mengen an organischen Lösungsmitteln abläuft, ein möglicher weiterer Ansatzpunkt, den Prozess deutlich

Abbildung 2: Rhamnolipid-Biosynthese in *P. putida* KT2440



Alle enzymatischen Schritte zur Synthese der Rhamnolipidvorstufen sind im *P. putida* KT2440-Wildtyp vorhanden. Rhamnolipidproduktion in diesem Stamm erfordert die rekombinante Synthese von RhlA und RhlB (Nachdruck aus Wittgens *et al.* (2011) mit Zustimmung von Microbial Cell Factories).

umweltfreundlicher zu gestalten. Hier wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wichmann (TU Dortmund) ein gezieltes Ausschäumen des Biotensids vorgeschlagen, welches eine einfache Aufkonzentration des Produktes um den Faktor 10 und mehr erlaubt und gleichzeitig eine stabile Fermentation, die nicht überschäumt, ermöglicht.

Erste Ideen, wie die Möglichkeiten der computerbasierten Analyse und Design von metabolischen Netzwerken mit Prozessmodellen verbunden werden können, sind veröffentlicht (z.B. Meadows *et al.* (2010)). Viele weitere Fortschritte der Systembio(techno)logie werden wichtige Beiträge zur rationalen Prozess- und Stammentwicklung liefern und somit die anvisierte Bioökonomie ermöglichen.

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Der Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie ist Teil des Instituts für Angewandte Mikrobiologie – iAMB in der Fachgruppe Aachener Biologie und Biotechnologie an der RWTH Aachen. Das Institut wird seit Juli 2011 von Prof. Lars M. Blank geleitet. Das Projekt „Entwicklung eines innovativen nachhaltigen Produktionsverfahrens zur Herstellung von Biotensiden in nicht-pathogenen Pseudomonaden“ wird durch die Bundesstiftung Umwelt (DBU) im Rahmen des Netzwerkes ChemBioTec gefördert, indem mehr als 90 Partner im In- und Ausland an nachhaltigen (Bio-) Produktionsprozessen forschen ([www.chembiotec.de](http://www.chembiotec.de)).

**Koordination:** Frank Rosenau (Universität Ulm).

**Akademische Partner:** Lars M. Blank (RWTH Aachen), Rudolf Hausmann, Christoph Sydatk (Karlsruher Institut für Technologie, KIT), Rolf Wichmann (TU Dortmund)

**Industrielle Partner:** m2p-labs GmbH, BASF AG, ECOVER Belgium NV, Evocatal GmbH

### Referenzen:

- Kuhn, D., Blank, L.M., Schmid, A., and Bühler, B. (2010). Systems biotechnology – Rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design. *Eng Life Sci* 10, 384-397.
- Meadows, A.L., Karnik, R., Lam, H., Forestell, S., and Snedecor, B. (2010). Application of dynamic flux balance analysis to an industrial *Escherichia coli* fermentation. *Metab Eng* 12, 150-160.
- Medema, M.H., van Raaphorst, R., Takano, E., and Breitling, R. (2012). Computational tools for the synthetic design of biochemical pathways. *Nat Rev Microbiol* 10, 191-202.
- Vickers, C.E., Blank, L.M., and Krömer, J.O. (2010). Grand challenge commentary: Chassis cells for industrial biochemical production. *Nat Chem Biol* 6, 875-877.
- Wittgens, A., Tiso, T., Arndt, T.T., Wenk, P., Hemmerich, J., Müller, C., Wichmann, R., Küpper, B., Zwick, M., Wilhelm, S., *et al.* (2011). Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440. *Microb Cell Fact* 10, 80.

### Kontakt:

**Prof. Dr. Lars M. Blank**

[lars.blank@rwth-aachen.de](mailto:lars.blank@rwth-aachen.de)

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, RWTH Aachen

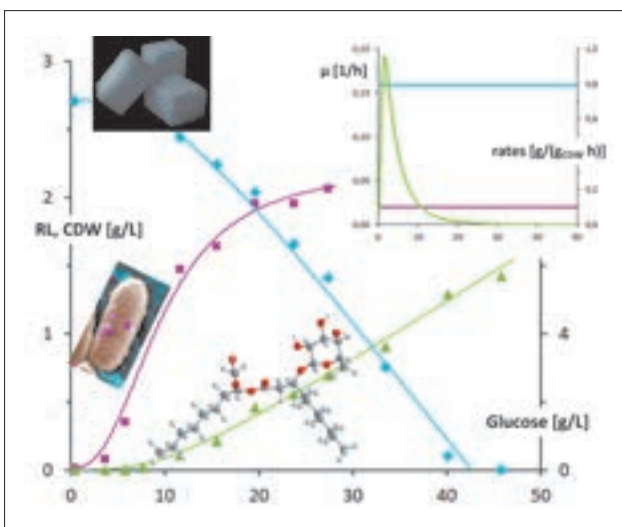
**Dr. Birgitta E. Ebert**

[birgitta.ebert@rwth-aachen.de](mailto:birgitta.ebert@rwth-aachen.de)

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, RWTH Aachen

<http://www.iamb.rwth-aachen.de/html/index.php>

Abbildung 3: Entkopplung von Zellwachstum und Produktbildung in *P. putida* während der Kultivierung in 50 ml Schüttelkolben



Großes Bild: Zellwachstum (■) und Verlauf der Rhamnolipid- (▲) und Glucose-Konzentrationen (●) sowie die jeweiligen simulierten Verläufe (durchgezogene Linien). Kleines Bild: Berechnete spezifische Wachstums- (violett), Glucoseaufnahme- (hellblau) und Rhamnolipidbildungsraten (grün) (Nachdruck aus Wittgens *et al.* (2011) mit Zustimmung von Microbial Cell Factories).

# Corynebacterium glutamicum als arbeitspferd und modell

## Weißer Biotechnologie in Forschung und Anwendung

von Volker F. Wendisch

Die Weiße Biotechnologie ermöglicht die Erschließung nachwachsender Rohstoffe und ihre Transformation in eine Vielzahl nachhaltiger Produkte von chemischen Grundstoffen über Energieträger bis hin zu pharmazeutischen Wirkstoffen. Die Weiße Biotechnologie konzentriert sich auf wenige Produktionsorganismen wie Hefen, *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum*, die zunehmend mithilfe der Systembiologie und der Synthetischen Biologie zur Prozessintensivierung und zur Entwicklung neuer Verfahren weiterentwickelt werden. Systembiologische Forschung zu *C. glutamicum* vertieft das physiologische Verständnis und erleichtert die Translation zu optimierten und neuen biotechnologischen Produkten.

### Am Anfang war...

***Corynebacterium glutamicum***. Dieses Bakterium wurde vor mehr als einem halben Jahrhundert als Aminosäuren ausscheidendes Bakterium entdeckt. Diese Entdeckung legte den Grundstein für die biotechnologische Aminosäureproduktion (Wendisch, 2007). Heute gilt *C. glutamicum* als eines der Arbeitspferde der Weißen Biotechnologie, werden doch mit ihm jährlich Millionen Tonnen Aminosäuren wie L-Glutamat oder L-Lysin hergestellt. Die mit diesem Bakterium produzierten Aminosäuren finden vor allem als Lebensmittelzusätze oder bei der Veredelung von Futtermitteln Verwendung. Der *generally recognized as safe*-Organismus *C. glutamicum* steht damit auch für eine mehr als 50-jährige Tradition erfolgreicher und sicherer Produktion in der Futter- und Lebensmittelindustrie.

Die Weiße Biotechnologie liefert entscheidende Beiträge für den Rohstoffwandel, der auch die chemische Industrie wesentlich verändern wird. Erdöl wird zunehmend teurer und auch der für die chemische Produktion wichtige kontinuierliche Zugang zu diesem Rohstoff wird sich aufgrund der begrenzten Ressourcen schwieriger gestalten. Außerdem erwarten Konsumenten heute immer mehr Produkte auf Basis nachhaltiger Rohstoffe. Als Konsequenz hat die Industrie selbst erklärt, ihre Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen mindern zu wollen. Hier eröffnet die

Weiße Biotechnologie Handlungsmöglichkeiten, indem sie nachwachsende Rohstoffe erschließt und deren Transformation in nachhaltige Produkte ermöglicht. Auf dem Weg in die von der Bundesregierung formulierte Vision einer Bioökonomie ist die Weiße Biotechnologie unverzichtbar.

### Synthetische Biologie für den Zugang zu alternativen Kohlenstoff- und Energiequellen

Zuckerhaltige Melassen oder Stärkehydrolysate dienen als Ausgangsstoffe für die Aminosäureproduktion (Abb. 1). Diese Ausgangsstoffe können aber auch als Nahrungsmittel verwendet werden. Es bedurfte synthetischer biologischer Ansätze, um *C. glutamicum* als alternative Kohlenstoff- und Energiequelle zu diesen Zuckern zu nutzen. Glycerin, das als Nebenprodukt der Biodieselproduktion entsteht, konnte von *C. glutamicum* erst nach Integration eines heterologen Stoffwechselweges für das Wachstum und die Aminosäureproduktion genutzt werden (Wendisch *et al.*, 2011). Damit gelang es prinzipiell, ein im Millionen-Tonnen-Maßstab anfallendes Nebenprodukt der Biodieselproduktion einem entsprechend starken Markt zugänglich zu machen (Abb. 1).

Auch Agrarabfälle können als alternative Substrate beispielsweise in Form von Hemicellulose-Hydrolysaten in der Weißen Biotechnologie Verwendung finden. In diesen Hydrolysaten finden sich neben Glucose aber auch Pentosen wie Xylose und Arabinose, die *C. glutamicum* nicht verwerten kann. Durch metabolisches Engineering und heterologe Expression synthetischer Operons gelang es, *C. glutamicum*-Stämme herzustellen, die effizient Glucose mit den Pentosen Arabinose und Xylose verstoffwechseln können. Als Besonderheit dieser *C. glutamicum*-Stämme ist dabei die simultane Verstoffwechslung aller Substrate hervorzuheben. Dadurch wurden Reisstroh-Hydrolysate zu effektiven Ausgangsmaterialien für die Produktion der Aminosäuren Lysin und Glutamat (Abb. 2) (Gopinath *et al.*, 2011).

### Maßgeschneiderte Stoffwechselwege für die Produktion von Diaminen

Polyamide lassen sich durch Ringöffnungspolymerisation von Lactamen herstellen oder durch Polykondensation von aliphatischen



Prof. Dr. Volker F. Wendisch (Foto: Kim-Christian Meyer, CeBITec, Bielefeld)

Dicarbonsäuren mit Diaminen. Der überwiegende Teil des Polyamid-Marktes basiert auf petrochemischen Intermediaten. Einige Vorläufer wie die Dicarbonsäure Sebacinsäure können aber auch biogen, beispielsweise durch Extraktion aus Rizinusöl, gewonnen werden. Für die biotechnologische Produktion von Polyamid-Vorläufern bietet sich das Aminosäuren produzierende *C. glutamicum* an (Schneider *et al.*, 2011). So wurden in Japan bereits 2007 Lysinproduzierende *C. glutamicum*-Stämme für die Produktion des Diamins Diaminopentan (Pentamethyldiamin, PMD oder Cadaverin) weiterentwickelt. In einem Schritt konnte Lysin zum Diaminopentan decarboxyliert werden, wenn man das Gen für eine Lysindecaboxylase heterolog in einem Lysinproduzenten exprimiert.

In Deutschland wurden *C. glutamicum*-Stämme für die biotechnologische Produktion des Diamins Diaminobutan konstruiert (Schneider *et al.*, 2010) (Abb. 1). Mithilfe der Synthetischen Biologie wurde ein endogener Stoffwechselweg optimiert und mit einer neuen Reaktion gekoppelt. Zunächst wurden Arginin- bzw. Ornithin-überproduzierende Stämme entwickelt und mit Varianten synthetischer Stoffwechselwege zum Diaminobutan kombiniert. Dabei zeigte sich, dass die direkte Decarboxylierung von Ornithin die höchsten Produktionsleistungen ermöglichte

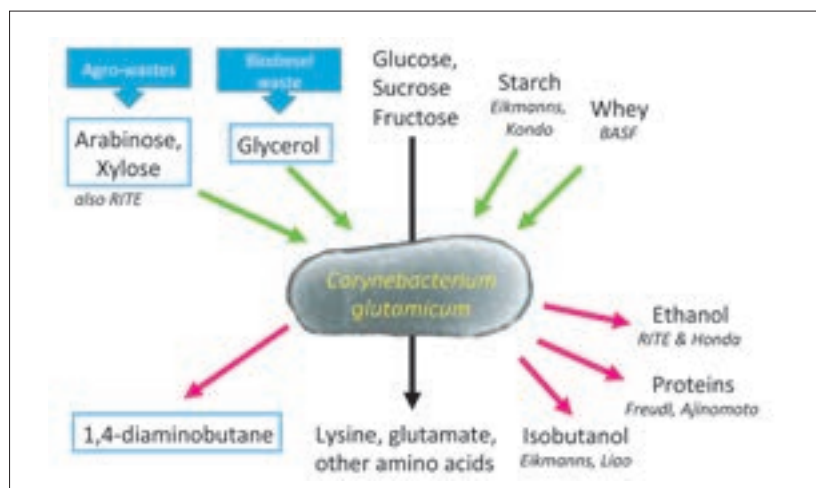
(Schneider *et al.*, 2010). Diaminobutan kann mit der Dicarbonsäure Adipinsäure zum high-performance-Polyamid Nylon-4,6 polykondensiert werden. Dieses high-performance-Polyamid findet eine breite Palette von Anwendungen in den Automobil- und Elektronikmärkten.

### Evaluation der Genomreduktion als Strategie der biotechnologischen Stammentwicklung

Bakterien kodieren aufgrund ihrer großen Anpassungsfähigkeit an sich ständig ändernde Umweltbedingungen in ihren Genomen eine Vielzahl metabolischer und regulatorischer Eigenschaften. Diese sind wahrscheinlich zu einem beträchtlichen Teil irrelevant oder gar hinderlich für den Einsatz in biotechnologischen Prozessen. Außerdem müssen die Mikroorganismen allein für die Aufrechterhaltung dieses genetischen Potentials nicht unerheblich Energie aufwenden. Für biotechnologisch relevante Mikroorganismen ist eine Reduktion des Genoms daher wünschenswert („Katalysator ohne Ballast“).

Vergleicht man die Genome von Bakterien in Habitaten mit konstanten Umweltbedingungen wie im offenen Ozean mit Bakterien, deren Habitate durch komplexe, sich ständig ändernde Umwelt-

Abbildung 1: Zugang von *C. glutamicum* zu alternativen Substraten (grüne Pfeile) und zu neuen Produkten (rote Pfeile) durch Synthetische Biologie



Eigene Beiträge sind als Kästen hervorgehoben. Die klassische Aminosäureproduktion ist mit schwarzen Pfeilen dargestellt (Grafik: V. Wendisch).



Mitglieder der Arbeitsgruppe Wendisch bei der Aminosäure-Analytik (Foto: Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld)

bedingungen gekennzeichnet sind, fällt auf, dass erstere deutlich kleinere Genome aufweisen. Solch eine natürliche Genomreduktion findet sich auch bei parasitären Bakterien, die beispielsweise innerhalb von Säugerzellen leben.

Will man eine Genomreduktion in der biotechnologischen Stammentwicklung realisieren, wird eine rationale, also Gen-genaue Genomreduktion angestrebt. Unterstützt durch Stoffwechselsimulationen, einem genom-weiten metabolischen Modell und auf bekannten experimentellen Befunden werden dazu nicht-essentielle Bereiche des Genoms deletiert. Nach experimenteller Bestätigung der Überlebensfähigkeit der generierten Stämme können in einem iterativen Prozess zunehmend größere Regionen des Genoms unter Beibehaltung einzelner, neu zu ordnender essentieller Gene deletiert werden.

Für *C. glutamicum* werden Stämme erstellt, die sich durch den Grad der Genomreduktion unterscheiden und anschließend in einem mehrstufigen Verfahren nicht nur auf Überlebensfähigkeit, sondern auch auf ihre biotechnologische Leistungsfähigkeit

evaluiert. Im Vordergrund stehen dabei die Aminosäureproduktion, aber auch die zu etablierende Dipeptidproduktion sowie die Eigenschaften bezüglich des Transports und der Verwertung von Kohlendioxid. Damit wird der Frage nachgegangen, ob eine Genomreduktion für biotechnologische Anwendungen generell vorteilhaft ist oder nur dann, wenn diese spezifisch auf den Prozess angepasst wurde.

### Systembiologische Charakterisierung des Energiehaushaltes von *C. glutamicum*

Ein systembiologisches Verständnis von *C. glutamicum* konnte ursprünglich von der funktionellen Genomanalyse ausgehend (Wendisch *et al.*, 2005) im Bereich des zentralen Kohlenstoffmetabolismus erarbeitet werden (Takors *et al.*, 2007). Der Energiehaushalt von *C. glutamicum* ist weniger verstanden und kann damit nicht so effizient optimiert werden wie der Kohlenstoffmetabolismus. Daher werden energetische Teilprozesse beispielsweise zur Bildung von Speicherstoffen sowie deren Mobilisierung experimentell charakterisiert und die gewonnenen Erkenntnisse fließen in ein genomweites Modell ein. In einem iterativen Prozess von

Abbildung 2: Herstellung und Nutzung hemicellulosischer Hydrolysate aus Reisstroh

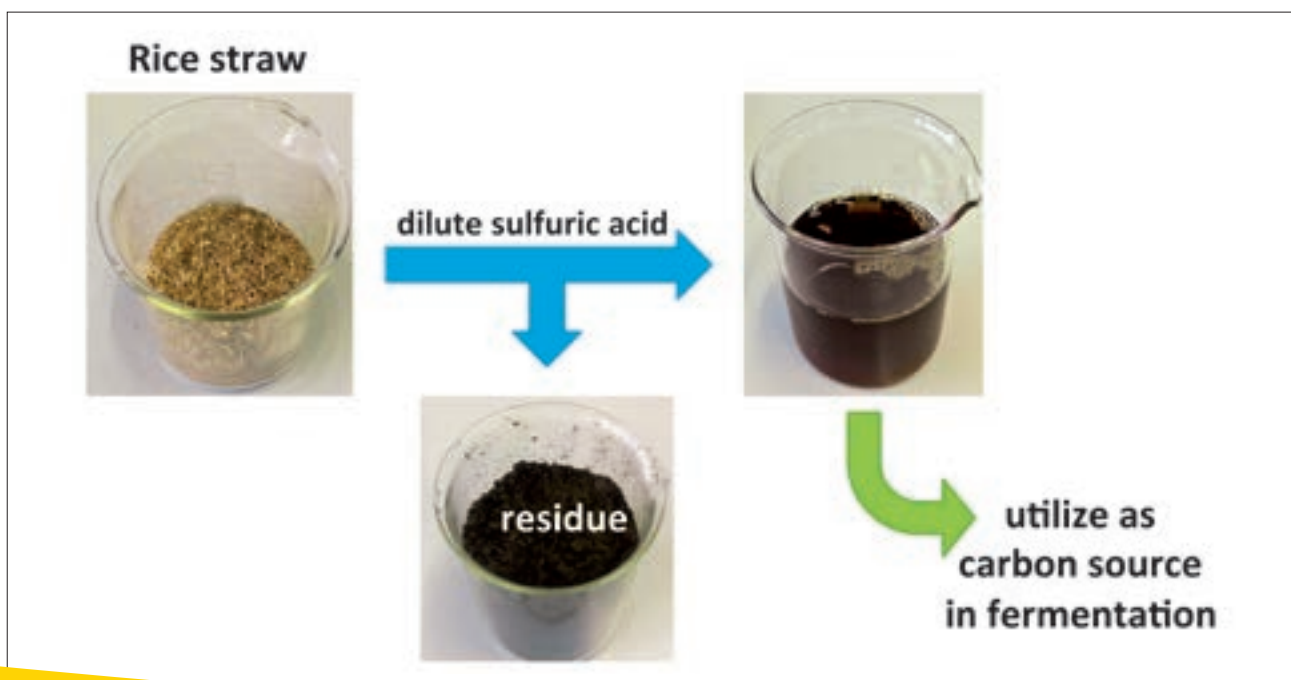


Bild: T. Meiswinkel

Simulation und experimenteller Verifikation/Falsifikation werden Strategien für das Metabolic Engineering beispielsweise der Substratstufenphosphorylierung oder der Elektronentransportketten abgeleitet. Diese Strategien werden für die rationale Verbesserung der energetisch besonders aufwändigen Produktion der Aminosäuren Arginin und Histidin eingesetzt und evaluiert.

### Chancen für die Weiße Biotechnologie

Die sich erschöpfenden Öl-Vorräte und die Nachfrage der Konsumenten nach nachwachsenden Rohstoffen treiben den Rohstoffwandel unserer Gesellschaft an. Aus der Vision einer Bioökonomie folgen Herausforderungen, aber vor allem beträchtliche Chancen für die Weiße Biotechnologie, den Rohstoffwandel in der chemischen Industrie mitzugestalten. Die Fokussierung der Weißen Biotechnologie auf wenige Produktionsorganismen wie *C. glutamicum* aufgrund regulatorischer und technischer Erwägungen macht ein systembiologisches Verständnis dieser Mikroorganismen unumgänglich. Der Weg zu neuen Produkten mit *C. glutamicum* und anderen Produktionsorganismen führt über die Synthetische Biologie. Die weitreichende Bedeutung und Vordringlichkeit des Rohstoffwandels sowie die wissenschaftliche Komplexität erfordern eine Intensivierung der Forschung in der Weißen Biotechnologie mit Ansätzen der System- und Synthetischen Biologie.

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Labor von Volker F. Wendisch ist an den BMBF-Verbundprojekten SysEnCor und FlexFit beteiligt und koordiniert das CLIB<sup>2021</sup>-BMBF-Verbundprojekt Genomreduktion. In **SysEnCor** thematisieren akademische Partner aus Bielefeld, Jülich, Köln und Ulm sowie industrielle Partner (Evonik, Insilico, GeneData) die Systembiologische Charakterisierung des Energiehaushaltes von *Corynebacterium glutamicum*. Im GenoMik-Transfer-Verbundprojekt **FlexFit** fokussieren die Forschungsarbeiten der akademischen Partner aus Bielefeld, Bochum, Erlangen, Jülich, Köln und Ulm sowie von Evonik auf die Flexibilität und Fitness von *Corynebacterium* für die industrielle Produktion. Das CLIB<sup>2021</sup>-BMBF-Verbundprojekt **Genomreduktion** mit akademischen Partnern aus Bielefeld, Jülich und Köln und den Unternehmen Evonik und Insilico bewertet die Genomreduktion als Strategie der biotechnologischen Stammentwicklung.

### Referenzen:

- Gopinath, V., Meiswinkel, T., Wendisch, V.F. and Nampoothiri, M.K. (2011) Amino acid production from rice straw and wheat bran hydrolysates by recombinant pentose-utilizing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 92, 985 - 996.
- Schneider, J., and Wendisch, V.F. (2010) Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 859 - 868.
- Schneider, J., and Wendisch, V.F. (2011) Biotechnological Production of Polyamines by Bacteria: Recent Achievements and Future Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 17 - 30.
- Takors, R., Bathe, B., Rieping, M., Hans, S., Kelle, R., and Huthmacher, K. (2007) Systems biology for industrial strains and fermentation processes--example: amino acids. *J Biotechnol* 129, 181-90.
- Wendisch, V.F., Bott, M., Kalinowski, J., Oldiges, M., and Wiechert, W. (2006) Emerging *Corynebacterium glutamicum* systems biology. *J Biotechnol* 124, 74-92.
- Wendisch, V.F. (2007) Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering. *Microbiology Monographs*, Vol. 5, Springer Heidelberg ISBN: 978-3-540-48595-7.
- Wendisch, V.F., Meiswinkel, T., and Lindner, S. (2011) Use of glycerol in biotechnological applications”, In: G. Montero, & M. Stoytcheva (Eds.), Rijeka, Croatia: InTech - Open Access Publisher, pp. 305 - 340.

### Kontakt:

**Prof. Dr. Volker F. Wendisch**

Lehrstuhl für Genetik der Prokaryonten

Fakultät für Biologie & CeBiTec, Universität Bielefeld

volker.wendisch@uni-bielefeld.de

[web.biologie.uni-bielefeld.de/genetik/](http://web.biologie.uni-bielefeld.de/genetik/)

[www.cebitec.uni-bielefeld.de/](http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/)

[www.clib2021.de/club2021/vorstand](http://www.clib2021.de/club2021/vorstand)

# Ralstonia eutropha H16 und die systembiologie

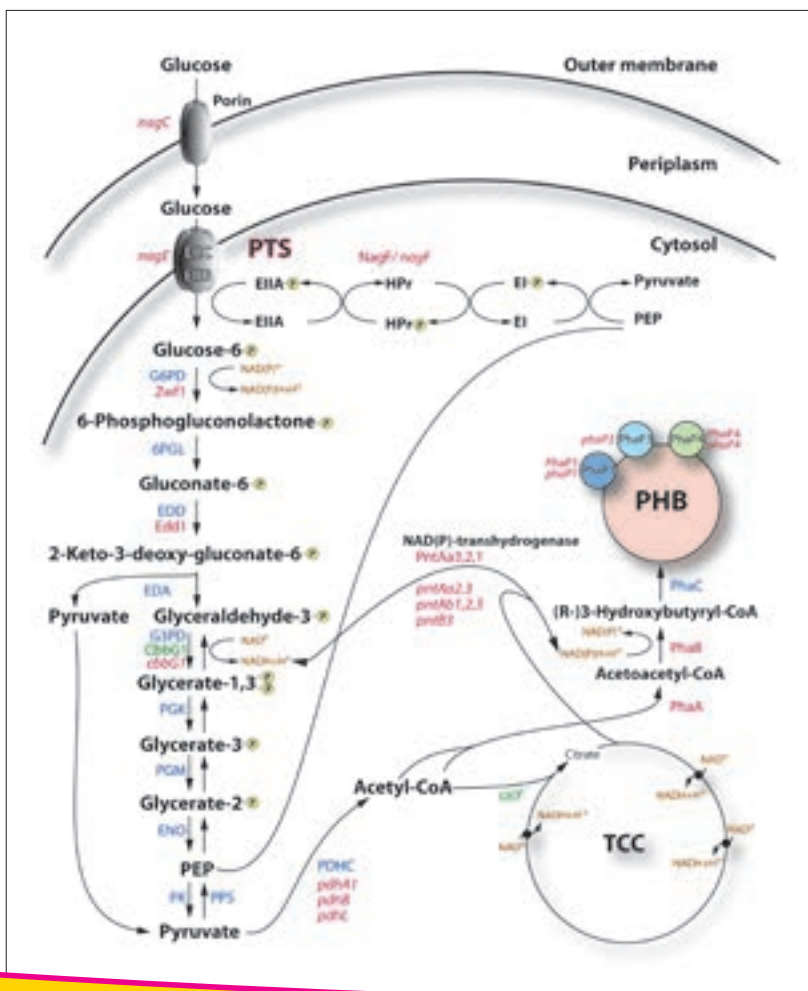
## Ein Bakterium mit kleinen Ansprüchen und großem biotechnologischem Potential

von Katja Adames und Alexander Steinbüchel

Das stäbchenförmige Bakterium *Ralstonia eutropha* H16 ist ein weit verbreitetes Boden- und Süßwasserbakterium. Es wurde 1959 aus einer Quelle in der Nähe von Göttingen isoliert und hat sich seit mittlerweile fünf Jahrzehnten als sogenanntes Knallgasbakterium einen festen Platz in der mikrobiologischen Forschung gesichert. Seine ungewöhnlich flexible Stoffwechselfähigkeit hat das Bakterium zu einem gut untersuchten Modellorganismus für die Forschung gemacht und damit ein beträchtliches biotechnologisches Interesse geweckt. Be-

reits in den 1970er Jahren war *R. eutropha* H16 ein Kandidat zur Produktion von Einzellerprotein für die Tierernährung. Seit den 1980er Jahren wird *R. eutropha* H16 zur industriellen Herstellung biologisch abbaubarer Kunststoffe intensiv erforscht und war hierfür vorübergehend als Produktionsorganismus etabliert. Aber auch für weitergehende biotechnologische Anwendungen bietet dieses Bakterium zahlreiche Perspektiven und ist ein vielversprechendes Forschungsobjekt in der Systembiologie.

Abbildung 1:



Schematische Darstellung des Nag-Transporters und Teilen des zentralen Stoffwechsels in *Ralstonia eutropha* H16 (Grafik: Raberg M, et al., Appl Environ Microbiol, 2011).





Abbildung 2a: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Ralstonia eutropha* mit PHA-Einschlüssen  
(Grafik: Pötter M, et al., Microbiology, 2002)

## Ein genügsamer Alleskönner

*R. eutropha* H16 gehört zur Gruppe der Knallgasbakterien. Zur Energiegewinnung und zum Aufbau organischer Zellbestandteile benötigt es lediglich Wasserstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid (Chemolithoautotrophie); es kann aber auch Zucker und andere organische Kohlenstoffquellen für sein Wachstum nutzen (Heterotrophie). Darüber hinaus ist es in der Lage, unter bestimmten Nährstoffbedingungen Polyhydroxyalkanoate (PHA) zu bilden, die in der Zelle in Form von Granula gespeichert werden und der Zelle als Reservestoffe dienen (Abb. 2). PHAs werden bereits industriell genutzt, um thermoplastisch verformbare Plastikmaterialien herzustellen, die sowohl als biologisch abbaubare Verpackungen als auch als resorbierbare Materialien in der Medizin, z. B. unter den Handelsnamen Biopol® und Mirel®, Verwendung finden.

## Von der mikrobiellen Genomforschung zum industriellen Produkt

Die enorme Stoffwechselvielfalt dieses Bakteriums bietet ein beträchtliches Potential für weitere biotechnologische Anwendungen und ist daher für die weiße Biotechnologie besonders interessant. Um die molekularbiologischen Grundlagen der physiologischen Vielfalt dieses Organismus zu erfassen, wurde im Jahre 2001 im Rahmen der Förderinitiative „Genomforschung an Mikroorganismen – GenoMik“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) in Kooperation zwischen den Arbeitsgruppen von Botho Bowien (Universität Göttingen), Bärbel Friedrich (Universität Berlin) sowie Alexander Steinbüchel (Universität Münster) und dem Göttinger Labor für Genomanalyse unter der Leitung von Gerhard Gottschalk die vollständige Genomsequenz von *R. eutropha* H16 entschlüsselt (Pohlmann et al., 2006). Das Genom des Stammes besteht aus drei unabhängigen Replikons: Den Chromosomen 1 und 2 sowie dem Megaplasmid pHG1 (Schwartz et al., 2003). Es ist mit einer Größe von insgesamt 7,45 Mbp fast doppelt so groß wie das von *Escherichia coli*, welches zu den weltweit am besten untersuchten Organismen zählt. Im *Ralstonia*-Genom befinden sich nahezu alle Gene mit essentiellen Funktionen auf Chromosom 1, während Chromosom 2 vor allem

zusätzliche Stoffwechselleistungen kodiert und zahlreiche Duplikationen von Genregionen der beiden anderen Replikons aufweist. Das Megaplasmid pHG1 ist für lithoautotrophes Wachstum mit Wasserstoff als Energiequelle essentiell, da es Hydrogenasen kodiert, die das Gas verstoffwechseln.

Ausgehend von den erzielten Erkenntnissen aus dem GenoMik-Programm, schloss sich 2006 das Nachfolgeprojekt „GenoMik-Plus“ an, welches ebenfalls vom BMBF gefördert wurde. Genomweite Transkriptions- und Proteomanalysen von *R. eutropha* lieferten umfassende Einblicke in genregulatorische Zusammenhänge ausgewählter Stoffwechselwege und die Vorhersage zahlreicher an der Regulation beteiligter Zielgene (Peplinski et al., 2010; Raberg et al., 2011). Diese Ergebnisse bilden die Basis derzeitiger weiterführender Forschungsarbeiten, um das Potential dieses Bakteriums durch gezieltes „Metabolic Engineering“, also einer gezielten Veränderung des Stoffwechsels, auszuschöpfen und um zu einem verbesserten Produktionsverfahren für bereits bekannte oder gar neue Polymere sowie für biotechnologisch interessante Metaboliten zu gelangen. Daran knüpft die aktuelle Förderinitiative des BMBF „GenoMik-Transfer“ an. Ziel ist es, die Arbeiten der Vorläuferinitiativen in enger Kollaboration mit Industriepartnern fortzusetzen, um Produkte bis hin zur Marktreife zu entwickeln.

## Erschließung alternativer Kohlenstoffquellen

Von großem Interesse für die biotechnologische Nutzung von Produktionsstämmen ist die Verwertung kostengünstiger und erneuerbarer Rohstoffe. Glucose in Form von Stärke und Zellulose ist in der Natur eine der am häufigsten vorkommenden Kohlenstoffverbindungen und somit als preisgünstige Kohlenstoffquelle für die Kultivierung von Mikroorganismen besonders interessant. Die Fähigkeit, Zucker als Kohlenstoffquelle zu nutzen, ist bei *R. eutropha* H16 auf Fructose und *N*-Acetylglucosamin, einem Derivat der Glucose, begrenzt. Vergleichende Transkriptom- und




Abbildung 2b: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Ralstonia eutropha* mit PHA-Einschlüssen  
(Grafik: Jens Kroll)

Proteomanalysen des Stammes H16 und einer Glucose verwerdenden Mutante führten zur Identifikation des Transkriptionsregulators NagR. Dieser Regulator kontrolliert die Expression des *nag*-Operons, eines Genclusters, das für ein Transportsystem für die Aufnahme von *N*-Acetylglucosamin in die Zelle kodiert. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Gensequenz dieses Regulators durch eine Mutation derart verändert ist, dass eine regulierte Kontrolle des *nag*-Operons nicht mehr möglich ist. Die daraus resultierende Überproduktion des Transportsystems führt zur unspezifischen Aufnahme von Glucose in die Zelle. Diese Hypothese wurde durch weitere Experimente im Labor bestätigt (Raberg *et al.*, 2011). Neben der Zuckeraufnahme konnten mit Hilfe eines systembiologischen Forschungsansatzes auch sekundäre Effekte der intrazellulären Glucose in Hinblick auf die PHA-Synthese aufgeklärt werden (Abb. 1).

### *Ralstonia eutropha* als Zellfabrik

Ein besonderes Augenmerk liegt derzeit auf der Produktion von Aminosäurepolymeren in *R. eutropha*. Cyanophycin ist ein nicht-ribosomal synthetisiertes Polyamid, bestehend aus den Aminosäuren Aspartat und Arginin (Abb. 3), dessen verschiedene Abbauprodukte zahlreiche Anwendungen insbesondere in der chemisch-pharmazeutischen Industrie als auch im medizinischen Bereich finden. Die Synthese von Cyanophycin in Zellen von *R. eutropha* wird durch die Expression von Fremdgenen erreicht. Um eine effiziente Stabilisierung von Fremd-DNA ohne externen Selektionsdruck wie zum Beispiel Antibiotika zu gewährleisten, werden Plasmid-Abhängigkeitssysteme entwickelt und eingesetzt (Kroll *et al.*, 2009). Diese Systeme werden in der weißen Biotechnologie aufgrund des unterbundenen Plasmidverlustes während der Wachstums- und Produktionsphase sowie des Entfallens teurer und prozessstörender Antibiotika bevorzugt eingesetzt. Proteom- und Metabolomanalysen bilden die Basis für gezieltes ‚*metabolic engineering*‘, um neue Variationen der Aminosäurepolymere zu erzeugen und die Ausbeute der gewünschten Produkte zu steigern. Dieser Ansatz soll in Kooperation mit dem Industriepartner Silantes GmbH unter der Leitung von Dr. Hermann Heumann zur Marktreife gebracht werden. Silantes ist auf die Herstellung isotopenmarkierter Biomoleküle spezialisiert, die unter anderem bei der Aufklärung dreidimensionaler Protein-

strukturen sowie bei metabolischen Untersuchungen in der Medizin zur Anwendung kommen. Die Möglichkeit, mit *R. eutropha* als lithoautotrophen Produktionsstamm isotopenmarkiertes Cyanophycin zu produzieren, ist von großem wirtschaftlichem Interesse.

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Ziel der vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungs- und Förderinitiativen „GenoMik“, „GenoMik-Plus“ und „GenoMik-Transfer“ ist die gezielte Nutzung des genetischen und metabolischen Potentials von Mikroorganismen mit Bedeutung für die Landwirtschaft, den Umweltschutz, die chemische Industrie, die Biotechnologie sowie für die menschliche Gesundheit. Dieses beinhaltet die Genomanalyse von Bakterien, die Aufklärung der Funktion interessanter Gene und schließlich die konkrete Anwendung der Ergebnisse und die Entwicklung von Produkten bis hin zur Marktreife ([www.genomik-transfer.de](http://www.genomik-transfer.de)).

#### Projektpartner:

Prof. Dr. Botho Bowien,  
Georg-August-Universität Göttingen  
Dr. Armin Ehrenreich,  
Technische Universität München  
Prof. Dr. Bärbel Friedrich,  
Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Gerhard Gottschalk,  
Georg-August-Universität Göttingen  
Prof. Dr. Michael Hecker,  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
Dr. Hermann Heumann,  
Silantes GmbH München  
Prof. Dr. Rudibert King,  
Technische Universität Berlin  
Prof. Dr. Alexander Steinbüchel,  
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

## Referenzen:

- Kroll, J., Steinle, A., Reichelt, R., Ewering, C. & Steinbüchel, A. (2009). Establishment of a novel anabolism-based addiction system with an artificially introduced mevalonate pathway: complete stabilization of plasmids as universal application in white biotechnology. *Metab Eng* 11, 168-177.
- Peplinski, K., Ehrenreich, A., Döring, C., Bömeke, M., Reinecke, F., Hutmacher, C. & Steinbüchel, A. (2010). Genome-wide transcriptome analyses of the "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism. *Microbiology (SGM)* 156, 2136-2152.
- Pötter, M., Madkour M. H., Mayer, F. & Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology (SGM)* 148, 2413-2426.
- Pohlmann, A., Fricke, W., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B. & Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing „Knallgas“ bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* 24, 1257-1262.
- Raberg, M., Peplinski, K., Heiss, S., Ehrenreich, A., Voigt, B., Döring, C., Bömeke, M., Hecker, M. & Steinbüchel, A. (2011). Proteomic and transcriptomic elucidation of the mutant *Ralstonia eutropha* G<sup>+</sup>1 with regard to glucose utilization. *Appl Environ Microbiol* 77, 2058-2070.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitinger, T., Friedrich, B. & Gottschalk, G. (2003). Complete nucleotide sequence of pHG1: a *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H<sub>2</sub>-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol* 332, 369-383.

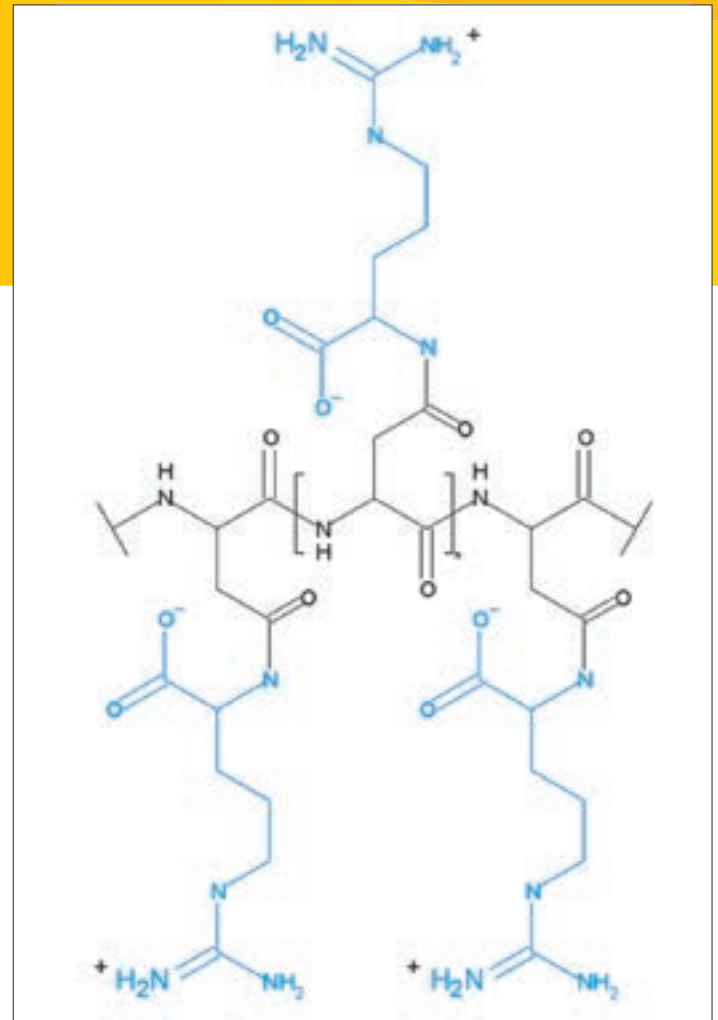


Abbildung 3:

Chemische Struktur von Cyanophycin. Das Rückgrat aus Polyaspartat ist in schwarz dargestellt, die Argininreste in blau (n = 90 - 400).

## Kontakt:



**Prof. Dr. Alexander Steinbüchel**

steinbu@uni-muenster.de

Institut für Molekulare Mikrobiologie und  
Biotechnologie

Westfälische Wilhelms-Universität Münster



**Dr. Katja Adames**

k\_pepl01@uni-muenster.de

Institut für Molekulare Mikrobiologie und  
Biotechnologie

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

[www.uni-muenster.de](http://www.uni-muenster.de)

# neue wege für eine nachhaltige biotechnologie

## Heterologe Genexpression in photosynthetischen Bakterien

von Thomas Drepper, Achim Heck und Karl-Erich Jaeger

Bakterien sind die Arbeitspferde der Biotechnologie. Sie werden eingesetzt für die Nahrungsmittelproduktion, die Herstellung von Chemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen, zur Beseitigung industrieller Abfälle, bei der Abwasserreinigung und in vielen anderen Bereichen. Neben dem Darmbakterium *Escherichia coli*, das als bestuntersuchtes und meist verwendetes Bakterium gilt, werden neuerdings alternativ auch Mikroorganismen mit besonderen physiologischen Eigenschaften, wie etwa thermophile oder photosynthetische Bakterien, für innovative biotechnologische Prozesse verwendet. Um jedoch Bakterien für industrielle Zwecke nutzen zu können, müssen diese zumeist für den jeweiligen biotechnologischen Prozess optimiert werden. Dies geschieht mit molekularbiologischen Methoden, und dabei spielt die funktionelle Expression wirtsfremder Gene eine Schlüsselrolle. Diese sogenannte heterologe Expression ermöglicht theoretisch die Synthese jedes gewünschten Proteins in einem lebenden Organismus. Bakterien lassen sich mit Hilfe der heterologen Expression geeigneter Gene, z. B. für die Produktion von Biokatalysatoren oder zur Herstellung industrieller Produkte wie Bulk- und Feinchemikalien, umprogrammieren.

### Das photosynthetische Bakterium *Rhodobacter capsulatus* als Licht-betriebene Zellfabrik

Einzellige Mikroorganismen wie Hefen oder heterotrophe Bakterien werden seit jeher für Prozesse der weißen Biotechnologie eingesetzt. Interessanterweise aber werden phototrophe Mikroorganismen trotz ihres vielseitigen Zellstoffwechsels und ihres großen Potentials bei zahlreichen biotechnologischen Anwendungen für industrielle Zwecke bislang kaum verwendet. Diese Bakterien bieten im Gegensatz zu den herkömmlichen Mikroorganismen einige Vorteile. So kann das fakultativ phototrophe Bakterium *R. capsulatus* unter photosynthetischen Wuchsbedingungen mit Licht als einziger Energiequelle wachsen. Um Sonnenlicht effizient absorbieren zu können, werden

die Farbstoffe Bakteriochlorophyll *a* und die Carotinoide Spheroiden und Spheroidenon an die Photosynthesekomplexe gebunden. Diese Photopigmente verleihen dem Organismus seine charakteristische Farbe (Abb. 1).

Unter phototrophen Kultivierungsbedingungen vereint das Bakterium auf hocheffiziente Weise energetische mit stofflichen Kreisläufen. Der Einsatz phototropher Bakterien wie *R. capsulatus* für biotechnologische Anwendungen ähnelt damit dem herkömmlicher Nutzpflanzen in der Landwirtschaft: Elementare Stoffwechselleistungen wie die Photosynthese und die CO<sub>2</sub>-Fixierung werden hier eingesetzt, um Biomasse energiesparend und CO<sub>2</sub>-neutral zu erzeugen. *R. capsulatus* bietet gegenüber Pflanzen und Algen sogar noch einen zusätzlichen Vorteil, denn es kann Luftstickstoff (N<sub>2</sub>) biologisch fixieren. Demnach ist das Bakterium ein idealer Kandidat für die photobiotechnologische Produktion von Biokatalysatoren sowie Spezial- und Feinchemikalien.

### Neue *Rhodobacter*-basierte Expressionssysteme für die effiziente Produktion von Proteinen

Im Zeitalter der Genom- und Metagenomforschung besteht eine der großen Herausforderungen darin, dass in den Datenbanken zwar Millionen von DNA-Sequenzen hinterlegt sind, deren biologische Bedeutung und biotechnologisches Potential aber ungeklärt bleibt. Der Hauptgrund hierfür liegt darin, dass die meisten putativen Gene in herkömmlichen mikrobiellen Expressionswirten wie *E. coli* nicht funktionell exprimiert werden, also in die entsprechenden funktionellen Proteine überführt werden können. Gerade die Synthese biotechnologisch oder pharmazeutisch relevanter Proteine wie die von Membranproteinen und Enzymen mit Metall-Kofaktoren stellt eine besondere Herausforderung dar und macht die Entwicklung neuer und innovativer Expressionssysteme unumgänglich. Aufgrund seiner besonderen Physiologie weist *R. capsulatus* gegenüber anderen mikrobiellen Expressionswirten hier einige entscheidende Vorteile auf, welche die Überexpression der genannten Problemproteine in aktiver Form prinzipiell ermöglichen (Katzke *et al.*, 2010; Katzke *et al.*, 2012): Unter phototrophen



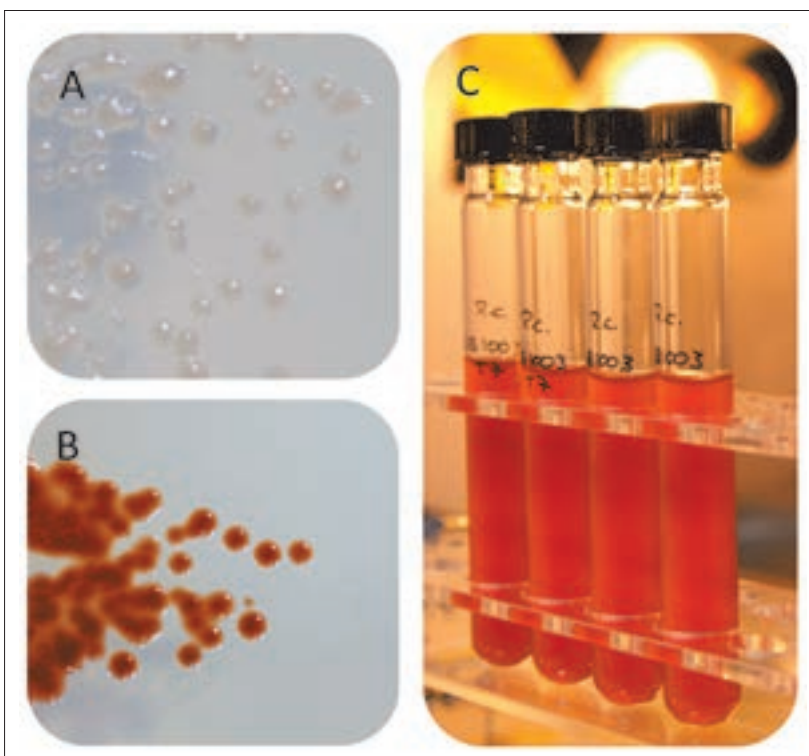
Die Autoren (von links nach rechts): Thomas Drepper, Karl-Erich Jaeger, Achim Heck (Foto: Institut für Molekulare Enzymtechnologie)

Wuchsbedingungen bildet *R. capsulatus* ein enorm vergrößertes vesikuläres Membransystem aus, welches die membranständigen Photosysteme beherbergt und somit eine hohe intrinsische Aufnahmekapazität für Membranproteine aufweist. Darüber hinaus ist das Bakterium unter diesen Bedingungen in der Lage, nahezu alle beschriebenen Metall-Kofaktoren in großen Mengen zu synthetisieren und auch in entsprechende heterologe Proteine einzubauen.

Zur effizienten Überexpression in *R. capsulatus* haben wir maßgeschneiderte Überexpressionsvektoren mit verschiedenen Promotoren sowie optimierte Expressionsstämme konstruiert. Für die Produktion von heterologen Zielproteinen wurde ein *R. capsulatus*-Expressionssystem erzeugt, das funktionell auf der DNA-abhängigen RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 basiert (Katzke *et al.*, 2010). Das Expressionssystem besteht dabei aus zwei Funktionselementen, dem Expressionsstamm *R. capsulatus*

B10S-T7 und dem Expressionsvektor pRhotHi-2 (Abb. 2). Das T7-RNA-Polymerase-Gen ist in das Chromosom des *Rhodobacter* T7-Expressionsstamms integriert und steht unter der Kontrolle eines Fruktose-induzierbaren Promotors. Nach Induktion der T7-Polymerase-Expression bindet die Polymerase spezifisch an den Zielpromotor des pRho-Vektors (Abb. 2, P<sub>T7</sub>), wodurch die Expression des Ziel-Gens eingeleitet wird. Expressionsstudien mit dem gelb-fluoreszierenden Protein YFP (*yellow fluorescent protein*) ergaben, dass mit dem *R. capsulatus*-T7-Expressionssystem unter photosynthetischen Bedingungen lösliche Proteine mit sehr hohen Proteinausbeuten von bis zu 90 mg/L Bakterienkultur erreicht werden können, vergleichbar mit den Ausbeuten in *E. coli* T7-Expressionsstämmen mit identischen Expressionsvektoren. Derzeit untersuchen wir im Rahmen des BMBF-geförderten Verbundprojekts ExpresSys – „A Platform of Novel Expression Systems for Industrially Relevant Genes“, inwieweit die *Rhodobacter*-Expressionstoolbox gezielt für die Expression

Abbildung 1: Das fakultativ phototrophe Bakterium *R. capsulatus*



Aufnahmen von *R. capsulatus* Einzelkolonien, die unter chemoheterotrophen (A) und phototrophen Bedingungen (B) angezogen wurden. Unter phototrophen Kultivierungsbedingungen bildet der Organismus deutlich sichtbar Photopigmente aus, wie in Flüssigkulturen von *R. capsulatus* zu sehen ist (C) (Quelle: Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich).

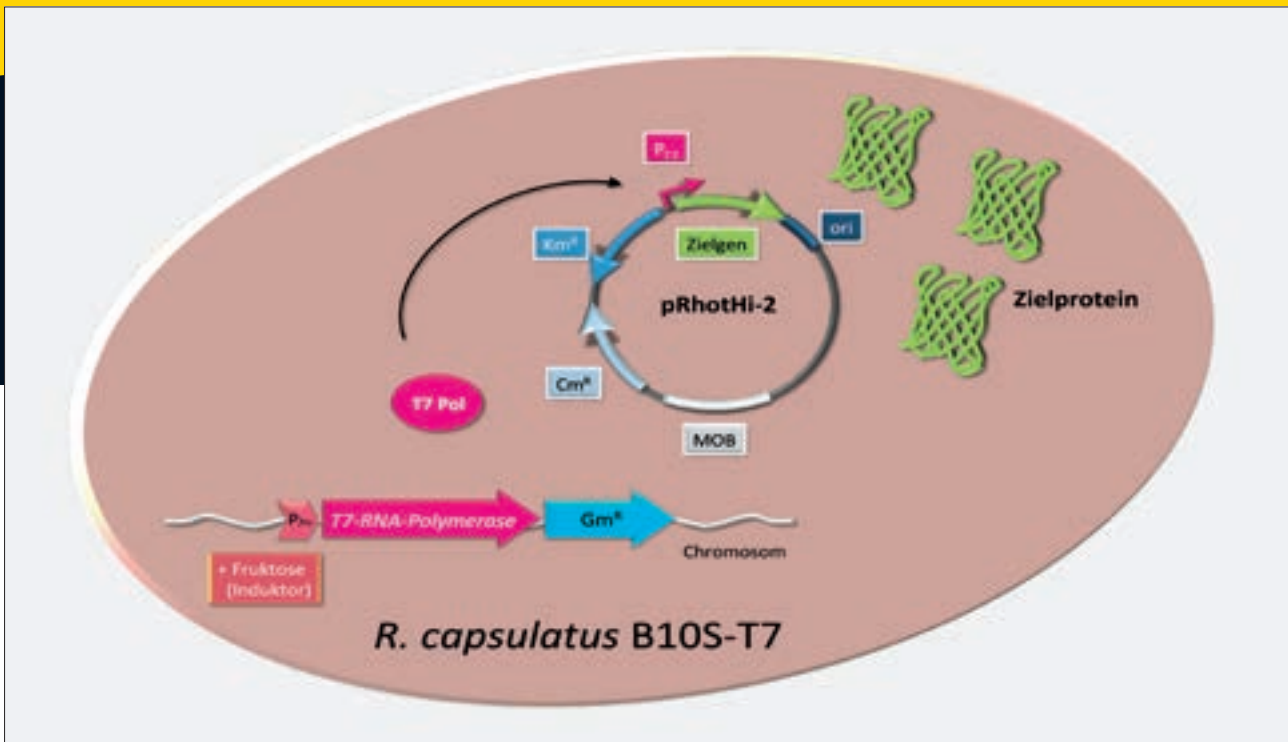


Abbildung 2: Das *R. capsulatus* T7-Expressionssystem

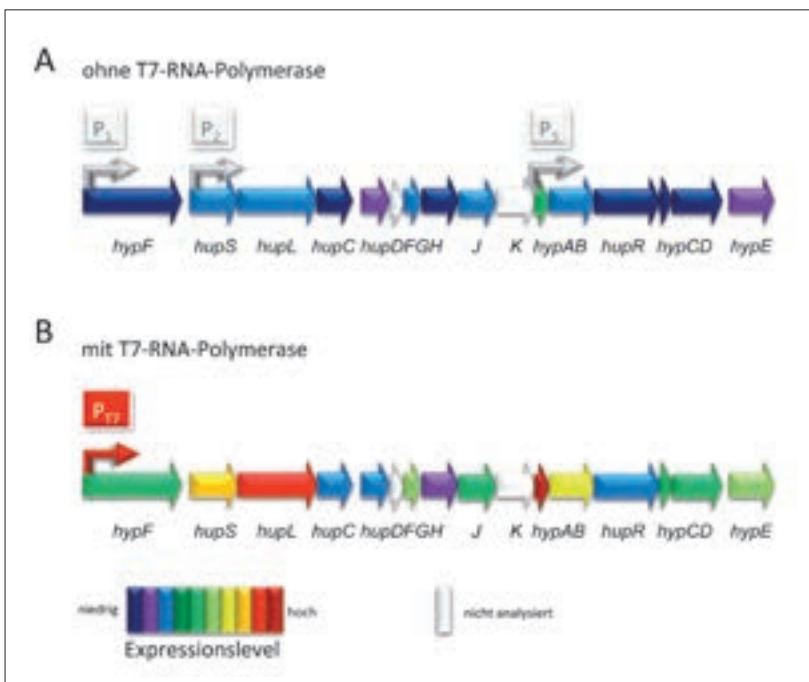
Das System besteht aus dem Expressionsstamm *R. capsulatus* B10S-T7 und dem Expressionsplasmid pRhotHi-2. In das Chromosom des Bakterienstamms sind das T7-RNA-Polymerase-Gen unter Kontrolle des Fruktose-induzierbaren Promotors  $P_{fru}$  sowie ein Gentamicin-Resistenzgen ( $Gm^r$ ) integriert. Das Plasmid trägt die Gene für die Resistenz gegen die Antibiotika Chloramphenicol ( $Cm^r$ ) und Kanamycin ( $Km^r$ ) sowie einen Replikationsursprung ( $ori$ ) und den T7-Polymerase-spezifischen Promotor ( $P_{T7}$ ) (Quelle: Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich).

von schwer exprimierbaren Proteinen wie etwa heterologen Membranproteinen sowie für das Screening von Metagenom-Banken genutzt und optimiert werden kann. Die Eignung der *Rhodobacter*-Toolbox speziell für die Expression von humanen Membranproteinen wird derzeit in einem weiteren Projekt untersucht, das wir gemeinsam mit der Firma Protagen AG (Dortmund) durchführen.

### Funktionelle Expression vollständiger Biosynthesewege

*Rhodobacter* ist prinzipiell geeignet, um mit Hilfe von Nitrogenasen und Hydrogenasen aus Sonnenenergie Biowasserstoff als alternative Energiequelle zu erzeugen. Um die Effizienz solcher Prozesse zu erhöhen, muss die Expression entsprechender Enzymgene zum einen deutlich gesteigert, zum anderen aber auch von regulatorischen Prozessen entkoppelt werden. Hierbei ist jedoch

Abbildung 3: T7-RNA-Polymerase-abhängige Überexpression der *R. capsulatus* Hydrogenasegene



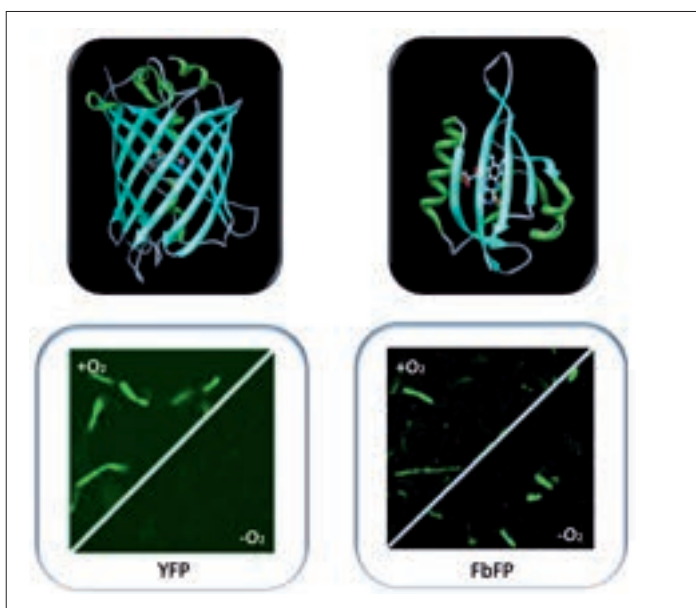
In *R. capsulatus* liegen die 16 Gene der Hydrogenase in einem gemeinsamen Gencluster vor. Die Expression der Gene wird im Wildtyp durch drei Promotoren ( $P_1$ - $P_3$ ) kontrolliert (A). Durch das neue T7-RNA-Polymerase-System kann der Expressionslevel aller Gene des Hydrogenase-Genclusters signifikant erhöht werden (B). Die Farben der Gene symbolisieren die Expressionsstärke der jeweiligen Hydrogenasegene in den entsprechenden *Rhodobacter*-Stämmen (Quelle: Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich).

zu beachten, dass Enzymkomplexe wie die Nitrogenase oder die Hydrogenase von einer Vielzahl verschiedener Gene kodiert werden, die neben den Enzymstruktur-Genen auch sog. akzessorische Gene umfassen, die für die Synthese von spezifischen Kofaktoren sowie für die Enzym-Assemblierung notwendig sind. Dieser Umstand macht die funktionelle Expression, also die konzertierte Koexpression aller Gene, mit herkömmlichen Expressionssystemen nahezu unmöglich. Um solch komplexe Enzymsysteme dennoch funktionell exprimieren zu können, haben wir kürzlich eine neue Methode entwickelt, die es erstmals ermöglicht, geclusterte Gene koordiniert im Zielwirt zu exprimieren (Arvani *et al.*, 2012): Für die Etablierung dieser Methode wurde das Hydrogenase-Gencluster aus *R. capsulatus* als „Proof of Concept“ verwendet. Das Cluster besteht aus 16 Genen, die in drei Transkriptionseinheiten organisiert sind (Abb. 3). Wir konnten hier erstmals zeigen, dass die T7-RNA-Polymerase für eine vollständige und ungehinderte Transkription von Genen einer Chromosomenregion verwendet werden kann, wohingegen bakterielle RNA-Polymerasen für solche Zwecke ungeeignet sind. Diese Methode kann zukünftig sowohl für die Stammoptimierung als auch für die koordinierte Expression aller Gene eines gewünschten Biosynthesewegs eingesetzt werden.

### Neue Fluoreszenzreporter für quantitative Expressionsanalysen in lebenden Zellen

Fluoreszenzproteine (FP), wie das grün fluoreszierende Protein GFP, sind als molekulare Reporter für die Molekular- und Zellbiologie, für die Echtzeitanalysen der Genexpression, die Validierung von neuen Expressionssystemen sowie für die Überwachung biotechnologischer Produktionsprozesse unverzichtbar geworden. Grundsätzlich wird die Verwendbarkeit dieser FP jedoch durch lokale Faktoren beeinflusst. So hat bei allen FP der GFP-Familie Sauerstoffmangel einen unmittelbaren Effekt auf die autokatalytische Synthese des Fluorophors: Bei niedrigen  $O_2$ -Konzentrationen kann der fluoreszenzaktive Chromophor aufgrund eines Sauerstoff-abhängigen Katalyseschritts nicht gebildet werden (Tsien, 1998). Um  $O_2$ -limitierte Prozesse dennoch mit Hilfe von FP untersuchen zu können, wurde in unserer Gruppe eine völlig neue Klasse fluoreszierender Reporterproteine entwickelt, die Flavinmononukleotid (FMN) als Chromophor binden und daher als FMN-bindende Fluoreszenzproteine (FbFP) bezeichnet werden (Drepper *et al.*, 2007). In zahlreichen *in vivo*-Expressionstudien konnte gezeigt werden, dass diese FbFP im Gegensatz zu GFP auch in Abwesenheit von  $O_2$  eine helle Fluores-

Abbildung 4: Vorteile des FMN-bindenden Fluoreszenzproteins



Oben: Strukturmodelle von EGFP und FbFP; hellgrün:  $\beta$ -Faltblätter, dunkelgrün:  $\alpha$ -Helices, die jeweiligen Chromophore sind als „ball-and-stick“ Modelle dargestellt. Unten: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einzelner Zellen von *R. capsulatus* nach Expression von YFP and FbFP bei Anzucht unter aeroben ( $+O_2$ ) und anaeroben ( $-O_2$ ) Kultivierungsbedingungen (Quelle: Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich).

zenz zeigen. In Abbildung 4 sind exemplarisch die Struktur eines FbFP- und GFP-Vertreters sowie die Ergebnisse vergleichender Expressionsstudien mit FbFP und YFP unter aeroben und anaeroben Bedingungen dargestellt. Wie klar zu erkennen ist, führt nur die Expression von FbFP in lebenden *R. capsulatus* Zellen unter anaeroben Bedingungen zu einer nachweisbaren Fluoreszenz, wohingegen YFP in Abwesenheit von O<sub>2</sub> nicht fluoresziert. Die neuen Fluoreszenzreporter können also sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von O<sub>2</sub> als *in vivo*-Reporter für quantitative Analysen eingesetzt werden (Drepper *et al.*, 2007; Drepper *et al.*, 2010). Mit Hilfe der FbFP werden damit erstmals Untersuchungen bio(techno)logischer Prozesse in fakultativ und strikt anaeroben Mikroorganismen mit mikroskopischen und spektroskopischen Verfahren möglich (Choi *et al.*, 2011; Huber *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2011; Piekarski *et al.*, 2009; Tielker *et al.*, 2009).

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Ein Forschungsschwerpunkt im Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am Forschungszentrum Jülich ist die Charakterisierung bestehender und die Entwicklung neuer bakterieller Expressionssysteme. Die Arbeitsgruppe „Bakterielle Photobiotechnologie“ beschäftigt sich dabei vorrangig mit der Entwicklung neuer Expressionstechnologien mit dem phototrophen Bakterium *R. capsulatus* sowie der Entwicklung und Charakterisierung neuer Fluoreszenzreporter.

Das IMET koordiniert zahlreiche Forschungsprojekte, die sich mit der Entwicklung und Anwendung neuer Expressionssysteme befassen. Dazu gehören das von der EU geförderte Projekt MAMBA, das sich mit mariner Metagenomik beschäftigt; die vom Land NRW im Rahmen des Clusters für Industrielle Biotechnologie CLIB<sup>2021</sup> geförderte Technologie-Plattform *ExpressO*, sowie die vom BMBF geförderten Verbundprojekte *ExpresSys*, *MiPro* und *HT-ENZ*, die sich mit Proteinexpression in den Bakterien *E. coli*, *R. capsulatus* und *B. glumae* befassen. Einige der am IMET neu entwickelten Expressionssysteme und Fluoreszenzreporter werden in enger Zusammenarbeit mit der Firma *evocatal GmbH* in Düsseldorf (<http://www.evocatal.com/>) kommerzialisiert.

---

### Referenzen

Arvani, S., Markert, A., Loeschcke, A., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012). A T7 RNA polymerase-based toolkit for the concerted expression of clustered genes. *J Biotechnol* 159, 162-171.

Choi, C. H., DeGuzman, J. V., Lamont, R. J. & Yilmaz, O. (2011). Genetic transformation of an obligate anaerobe, *P. gingivalis* for FMN-green fluorescent protein expression in studying host-microbe interaction. *PLoS One* 6, e18499.

Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F. & other authors (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* 25, 443-445.

Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A. K., Büchs, J. & Jaeger, K.-E. (2010). Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* 76, 5990-5994.

Huber, R., Ritter, D., Hering, T., Hillmer, A. K., Kensy, F., Müller, C., Wang, L. & Büchs, J. (2009). Robo-Lector - a novel platform for automated high-throughput cultivations in microtiter plates with high information content. *Microb Cell Fact* 8, 42.

Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A. & Drepper, T. (2010). A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Protein Expr Purif* 69, 137-146.

Katzke, N., Bergmann, R., Jaeger, K.-E. & Drepper, T. (2012). Heterologous high-level gene expression in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Methods Mol Biol* 824, 251-269.

Lobo, L. A., Smith, C. J. & Rocha, E. R. (2011). Flavin mononucleotide (FMN)-based fluorescent protein (FbFP) as reporter for gene expression in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 317, 67-74.

Piekarski, T., Buchholz, I., Drepper, T., Schobert, M., Wagner-Doebler, I., Tielen, P. & Jahn, D. (2009). Genetic tools for the investigation of *Roseobacter* clade bacteria. *BMC Microbiol* 9, 265.

Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K.-E. & Ernst, J. F. (2009). Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 8, 913-915.

Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544.

---

### Kontakt:

**Dr. Thomas Drepper**  
t.drepper@fz-juelich.de

**Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger**  
karl-erich.jaeger@fz-juelich.de

Institut für Molekulare Enzymtechnologie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Forschungszentrum Jülich





EMBO Conference Series

# From Functional Genomics to Systems Biology

17–20 November 2012

EMBL Advanced Training Centre  
Heidelberg, Germany

## Confirmed Speakers

### Karen Adelman

National Institute of Environmental  
Health Sciences, USA

### Rudolf Aebersold

Swiss Federal Institute of  
Technology Zurich, Switzerland

### Patrick Aloy

Institute for Research in Biomedicine,  
Spain

### Brenda Andrews

University of Toronto, Canada

### Jürg Bähler

University College London, UK

### Peer Bork

EMBL Heidelberg, Germany

### Søren Brunak

Technical University of Denmark  
and University of Copenhagen,  
Denmark

### Frank Buchholz

Max Planck Institute of Molecular  
Cell Biology and Genetics, Germany

### Wouter de Laat

Hubrecht Institute, The Netherlands

### Anne-Claude Gavin

EMBL Heidelberg, Germany

### Nevan J. Krogan

University of California,  
San Francisco, USA

### Dana Pe'er

Columbia University, USA

### Norbert Perrimon

Howard Hughes Medical  
Institute, USA

### Yitzhak Pilpel

Weizmann Institute of Science,  
Israel

### Frank Pugh

Penn State University, USA

### Nikolaus Rajewsky

Max Delbrück Center for  
Molecular Medicine,  
Germany

### Mitunori Saitou

Kyoto University, Japan

### Pamela A. Silver

Harvard Medical School, USA

### Athanasios Typas

EMBL Heidelberg, Germany

### Hiroki R. Ueda

RIKEN Center for Developmental  
Biology, Japan

### Alexander van Oudenaarden

Hubrecht Institute, The Netherlands

### Bas van Steensel

The Netherlands Cancer Institute, The Netherlands

### Marian Walhout

University of Massachusetts Medical School, USA

### Gregory A. Wray

Duke University, USA

### Michael B. Yaffe

Massachusetts Institute of Technology, USA

### Richard A. Young

Whitehead Institute for Biomedical Research, USA

### Gaël Yvert

École Normale Supérieure de Lyon, France

## Organisers

### Eileen Furlong

EMBL Heidelberg, Germany

### Frank Holstege

University Medical Center Utrecht,  
The Netherlands

### Lucas Pelkmans

University of Zurich, Switzerland

## ONLINE REGISTRATION ONLY

[www.embl.de/training/events/2012/OMX12-01](http://www.embl.de/training/events/2012/OMX12-01)

Registration is on a first-come, first-served basis.  
Short talks will be selected from abstracts.

## Registration

and abstract deadline is 6 September 2012

## Registration fees

Academia	425 EUR
PhD Student	375 EUR
Industry	650 EUR

## Contact

European Molecular Biology Laboratory  
[events@embl.de](mailto:events@embl.de)

Co-funded by the EMBL Corporate Partnership Programme

[www.embl.org](http://www.embl.org)



# wasserstoff aus wasser – biologisch und ökonomisch?

## Designzellen und Biobatterie-Modelle zur Entwicklung solargetriebener Energiemodule

von Matthias Rögner

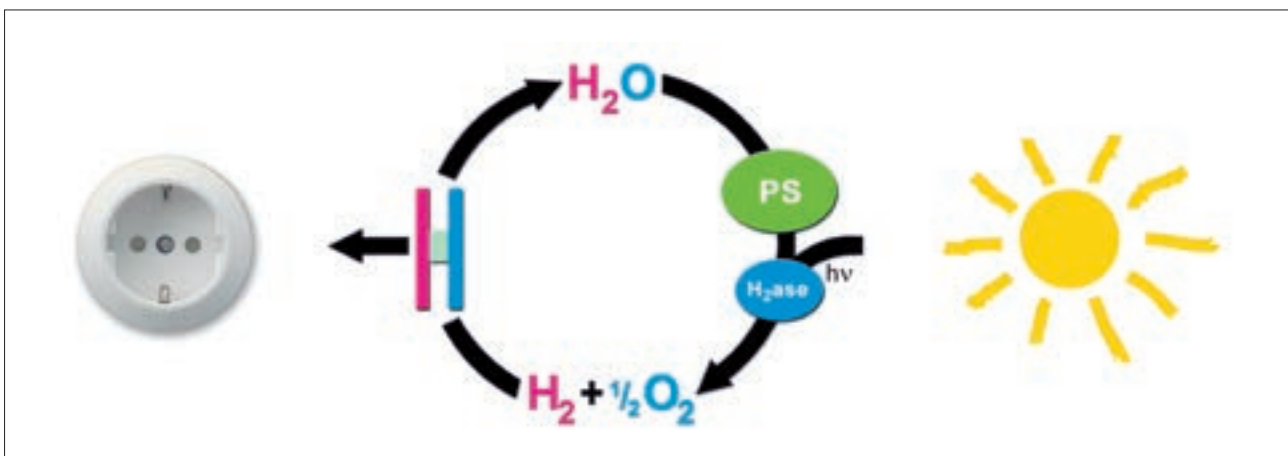
Photosynthese ist Ursprung und Triebkraft (fast) allen Lebens auf der Erde. Allerdings wird ein Großteil dieser umgewandelten Sonnenenergie in den Aufbau von „grüner“ Biomasse oder die Synthese langfristiger Speicherstoffe investiert. Hierbei geht bekanntlich – bezogen auf die ursprünglich absorbierte Solarenergie – mehr als 95% der Energie verloren. Nachhaltige und effiziente Energieernte kann deshalb nur erzielt werden, wenn die energieliefernden Prozesse so direkt wie möglich an die Primärreaktionen der Photosynthese gekoppelt werden, die mit einer (Quanten-)Effizienz von bis zu 99% ablaufen. Wasserstoff wäre ein idealer Energieträger für diese Kopplung, da er  $\text{CO}_2$ -neutral ist, eine hohe Energiedichte besitzt und – im Gegensatz zu den in der Photosynthese primär gebildeten energiereichen Intermediaten – langfristig speicherbar ist. Seine Energie kann z. B. in Brennstoffzellen ohne Umwege direkt freigesetzt und verwertet werden. Gelänge es,

die für die Wasserstoffherzeugung benötigten Elektronen mit Hilfe der photosynthetischen Wasserspaltung direkt aus Wasser, das an vielen Stellen der Welt im Überfluss vorhanden ist (neben Süßwasser sind auch Meer- bzw. Salzwasser nutzbar), zu beziehen und hierfür die kostenlose Energie der Sonne zu nutzen, hätte man einen äußerst umweltfreundlichen energieerzeugenden Prozess, der im  $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2$ -Zyklus mit der Brennstoffzelle als einziges „Abfallprodukt“ wieder die Ausgangskomponente Wasser erzeugt (Abb. 1).

### Die Strategie

Da natürliche photosynthetische Zellen – sofern sie das für die  $\text{H}_2$ -Erzeugung notwendige Enzym „Hydrogenase“ ( $\text{H}_2$ ase) überhaupt besitzen (nur Cyanobakterien und Grünalgen) – in der Regel Wasserstoffherzeugung nur als „Notventil“ unter ungünstigen Umweltbedingungen „anschalten“ und entsprechend ineffizient sind, muss der Energiemetabolismus der ganzen photosyntheti-

Abbildung 1:



Energiekreislauf von Wasserstoff und Wasser, in welchem Solarenergie mit Hilfe der natürlichen Katalysatoren Photosystem 2 (PS2) und Hydrogenase ( $\text{H}_2$ ase) in Wasserstoff umgewandelt wird, dessen Energie dann wieder in einer Brennstoffzelle freigesetzt und verwertet werden kann, wobei als „Abfallprodukt“ wieder Wasser entsteht (Quelle: Matthias Rögner).



Matthias Rögner vor dem Prototyp eines 100 L-Flachbett-Photobioreaktors, welcher zusammen mit der Fa. KSD (Hattingen) entwickelt wurde (Foto: Dieter Wunsch)

schen Zelle umgestellt werden. Nur so kann Wasserstoff in ausreichenden Mengen und unter Bedingungen erzeugt werden, die eine spätere ökonomische Nutzung sinnvoll und aussichtsreich erscheinen lassen. Schätzungen gehen von einer notwendigen Optimierung der  $H_2$ -Erzeugungsrates der besten bisher verfügbaren „natürlichen“ Grünalgenzellen (*Chlamydomonas reinhardtii*) um einen Faktor 100 aus (Abschätzung Prof. H.-J. Wagner, LEE, RUB). Dies kann durch Proteindesign von  $H_2$ asen und Expression in Designerorganismen gelingen, mithilfe dessen die volle Aktivität der  $H_2$ asen unter aeroben (statt anaeroben) Bedingungen zur Verfügung steht. Fast alle  $H_2$ asen sind nämlich extrem sauerstoffempfindlich. Zweiter wichtiger Schritt ist die optimale, d. h. energetisch günstigste Kopplung von Photosynthese und Wasserstoffherzeugung, um die Elektronen auf möglichst direktem Weg von der Wasserspaltung in PS2 auf die  $H_2$ ase zu leiten. Hierbei handelt es sich um einen iterativen Prozess, bei welchem in vielen Einzelschritten Mutanten der zentralen Proteine (s. „Designproteine“ in Abb. 2) erzeugt und charakterisiert werden müssen. Als Ausgangsorganismus für diese „Designzelle“ nutzen wir das Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803, da es der einfachste, am besten charakterisierte und am schnellsten genetisch modifizierbare Organismus für diesen Zweck ist.

Grundsätzliche Fragestellungen zur Optimierung von Elektronentransfer und Protein-Protein-Interaktion sowie zur energetischen Effizienzabschätzung klären wir parallel hierzu mit einem semiartificialen Modellsystem, welches lediglich die isolierten und aufgereinigten Hauptkomponenten enthält, die auf Goldelektroden immobilisiert werden („Biobatterie“ in Abb. 2). Zu dieser „Machbarkeitsstudie“ gehört auch die Entwicklung und Optimierung spezieller Photobioreaktoren einschließlich der Steuerungssysteme zum kontinuierlichen Betrieb. Diese sind sowohl für die Standardisierung des Verfahrens, die Optimierung des Ertrags als auch als verknüpfbare Module für eine spätere Massenanzucht der photosynthetischen Designzellen unabdingbar. Zusätzlich muß der Preis dieser Photobioreaktoren erheblich reduziert werden, um einen kompetitiven Endpreis für den zukünftigen Biowasserstoff zu erzielen.

### Die Realisierung (1): „Biobatterie“

Mithilfe dieses Ansatzes soll die Effizienz der Kopplung der photobiologischen Wasserspaltung am PS2 an die biologische Wasserstoffherzeugung mittels  $H_2$ ase in einem möglichst einfachen Modellsystem als „Proof of Principle“ optimiert werden. Die einfachste Möglichkeit ist die Isolierung der hierzu benötigten Enzyme/Elektronencarrier und deren Zusammenführung in einem semiartificialen „Minimalsystem“. Größtes Hindernis ist die Hydrogenase. Das mit Abstand aktivste Enzym, die Fe-Fe-Hydrogenase aus Grünalgen oder Clostridien, ist extrem sauerstoffempfindlich. Dieses Enzym empfängt in Organismen wie der Grünalge *Chlamydomonas* seine Elektronen über Ferredoxin (Fd) von Photosystem 1 (PS1) – allerdings nur unter anaeroben Bedingungen. Diese sind nur zu realisieren, wenn die  $O_2$  erzeugende Wasserspaltung auf ca. 5% reduziert wird. Um die volle Kapazität von sowohl Wasserspaltung als auch  $H_2$ -Erzeugung unter optimalen Bedingungen simulieren zu können, werden beide Prozesse in der „Biobatterie“ in einen aeroben und einen anaeroben Bereich getrennt (Abb. 3). Im aeroben Bereich wird thermostabiles isoliertes PS2 auf Goldelektroden immobilisiert, im anaeroben Bereich thermostabiles PS1. In beiden Fällen wird der leitende Kontakt zur Elektrodenoberfläche durch ein e-leitendes Osmium-Polymer hergestellt, welches sowohl die Lebenszeit der Photosysteme deutlich verlängert als auch die mit Abstand höchsten bisher gemessenen Photoströme ermöglicht (Badura *et al.* 2011). Wenn jetzt noch die optimale Ankopplung der  $H_2$ ase an PS1 gelingt, haben wir eine perfekte „Biobatterie“ realisiert, welche ähnlich der Elektrolyse aber mit biologischen Katalysatoren Sauerstoff und Wasserstoff erzeugt. Nach Optimierung aller Komponenten ähnlich einem Baukastenprinzip, können mit dieser „Biobatterie“ die maximale Leistungsfähigkeit dieses Systems simuliert und wertvolle Erkenntnisse für die natürliche „Designzelle“ gewonnen werden. Aufgrund der zeitlich beschränkten Lebensdauer insbesondere von PS2, handelt es sich jedoch hier eindeutig um ein Modellsystem zum Testen der einzelnen Komponenten und ihres Potentials.

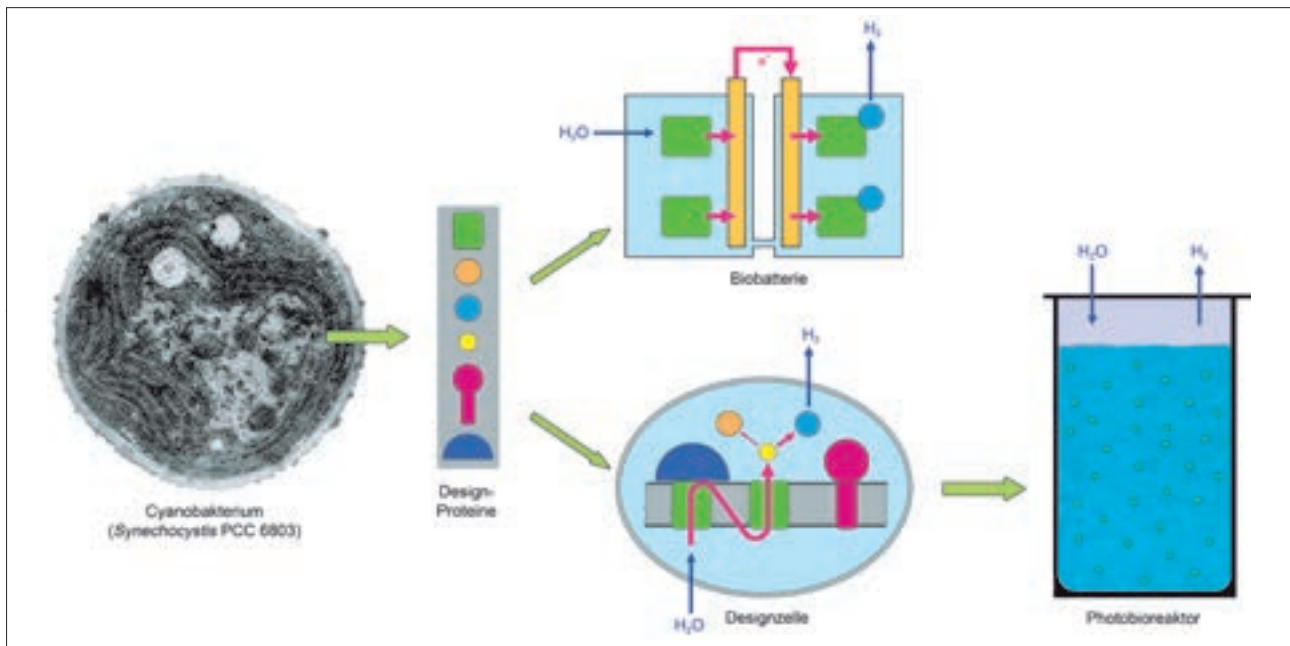


Abbildung 2:

Strategie zur Erzeugung einer wasserstoffproduzierenden „Designzelle“ mit potentieller Anwendung: Zentrale Proteine der Wildtyp-Zelle von *Synechocystis* PCC 6803 werden im Hinblick auf eine optimale Verknüpfung von biologischer Wasserspaltung und Wasserstoffproduktion genetisch verändert und sowohl in einem semiartificialen Minimal-Modellsystem als auch in der schrittweise erzeugten „Designzelle“ getestet und optimiert. Gleichzeitig werden preisgünstige Flachbett-Photobioreaktorsysteme entwickelt, die das Potential für ein Up-scaling zu Großreaktoren haben (Quelle: Matthias Rögner).

## Die Realisierung (2): Designzellen & Photobioreaktor

Unser langfristiges Ziel ist die Herstellung einer natürlichen „Designzelle“, die sich selbständig repariert, repliziert und in Massenkultur in geschlossenen Photobioreaktorsystemen gehalten werden kann (Waschewski *et al.* 2010). Abgesehen von Aufwand und Kosten für die „Bibatterie“, ist die Designzelle insbesondere wegen PS2 erforderlich, das eine durchschnittliche Halbwertszeit von nur 30 min hat und ständig „repariert“ werden muss. Dies ist in einem semiartificialen System wie der Bibatterie nicht realisierbar. Das von uns ausgewählte Cyanobakterium *Synechocystis* 6803 muss aus mehreren Gründen für die H<sub>2</sub>-Erzeugung (mittels der O<sub>2</sub>-resistenten Fremdhydrogenase) metabolisch angepasst werden:

- Das System hat zu viele Lichtsammelantennen: Durch Deletion der Cyanobakterien-typischen Phycobilisomen kann eine wesentlich höhere Zelldichte im Photobioreaktor erzielt und das PS2/PS1-Verhältnis sowie der lineare ET um das bis zu 7-fache erhöht werden (Bernat *et al.* 2009).
- Der lineare ET, welcher für die spätere H<sub>2</sub>-Produktion entscheidend ist, kann durch die Verwendung einer ATPase-Mutante mit partieller Entkoppelung verdoppelt werden (Imashimizu *et al.* 2011), ohne dass die Zellen Schaden nehmen.
- Ferredoxin stellt die für die „importierte“ H<sub>2</sub>ase benötigten Elektronen zur Verfügung. Durch Erzeugung von FNR-Mutanten mit deutlich geringerer Affinität zu Fd kann ein Großteil der Elektronen – schätzungsweise 75% sind möglich – von Fd auf die H<sub>2</sub>ase „umgeleitet“ werden (s. Abb. 4, Fd), was zur Zeit getestet wird.

Diese Beispiele sollen verdeutlichen, dass die zukünftige Designzelle ein großes Potential zur Erhöhung der H<sub>2</sub>-Produktion hat. Einen wesentlichen Anteil hieran (Faktor 10-20) wird die Hydrogenase haben, deren Sauerstofftoleranz z. Zt. über High-Throughput-Screening in Kombination mit „directed evolution“ und anderen genetischen Methoden erhöht wird (AG Photobiotechnologie von Prof. Thomas Happe, s. Abb. 4, H<sub>2</sub>ase).

Ein weiterer zentraler Faktor ist das Design und die Herstellung kostengünstiger Photobioreaktoren und deren kontinuierlicher Betrieb unter konstanten Bedingungen. In Zusammenarbeit mit der Fa. KSD (Hattingen) konnten wir einen 5 L-Flachbettreaktor entwickeln, der sich durch optimalen Lichteintrag und geringe Herstellungskosten auszeichnet. Ein hierfür entwickeltes automatisches Steuersystem ermöglichte bereits ein über 9-monatiges kontinuierliches Wachstum einer Kultur unter gleichbleibenden Bedingungen.

## Ausblick & Potenzial

Das Potenzial des Flachbett-PBR, verbunden mit dem kontinuierlichen Verfahren, wurde inzwischen auf einen 100 L-Flachbettreaktor übertragen, der sich in der Erprobung befindet. Die iterative Verbesserung von Designzelle, PBR und Prozesssteuerung wird zeigen, ob wir unser ehrgeiziges Ziel erreichen, Biowasserstoff zu einem marktfähigen Preis herzustellen. Parallel hierzu eröffnen unsere Untersuchungen wichtige prinzipielle Einsichten

in die „Systembiologie der biologischen Energieerzeugung“, etwa in die Frage, ob Bakterien als direkte Energielieferanten ohne den energetisch verlustreichen Umweg über die Biomasse dienen können und wie die Stoff- und Energiebilanz phototropher Zellen aussieht, wenn man ihnen durch Dauerbelichtung langfristig die Nachtruhe raubt.

### Steckbrief Forschungsprojekt:

**Projektname:** Design natürlicher Systeme zur lichtgetriebenen  $H_2$ -Produktion: Von molekularen zu Massenfermentationssystemen (Akronym: „ $H_2$ -Designzellen“).

**Koordinator:** Matthias Rögner

### Referenzen:

Badura, A., Kothe, T., Schuhmann, W. & Rögner, M. (2011) Wiring photosynthetic enzymes to electrodes; *Energy Environ. Sci.* 4, 3263-3274

Bernat, G., Waschewski, N. & Rögner, M. (2009) Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803;

*Photosynth. Res.* 99, 205-216

Imashimizu, M., Bernát, G., Isato, K., Broekmans, M., Konno, H., Sunamura, E.-I., Rögner, M., Hisabori, T. (2011) Regulation of  $F_0F_1$ -ATPase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the  $\gamma$  and  $\epsilon$  subunits is significant for light/dark adaptation; *J. Biol. Chem.* 286, 26595-26602

Waschewski, N., Bernat, G. & Rögner, M. (2010) Engineering photosynthesis for  $H_2$  production from  $H_2O$ : Cyanobacteria as design organisms; in: „*Biomass to Biofuels - Strategies for Global Industries*“ (Vertes, A., Qureshi, N., Yukawa, H., Blaschek, H.P. eds.) John Wiley & Sons, Chichester, UK, p. 387-401

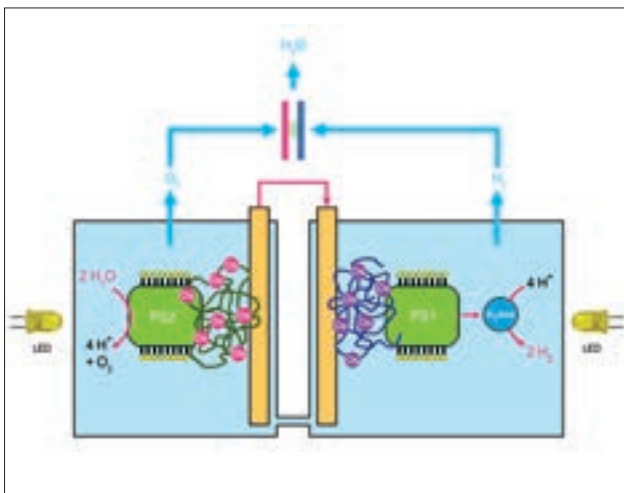
### Kontakt:

**Prof. Dr. Matthias Rögner**

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen  
Fakultät für Biologie & Biotechnologie  
Ruhr-Universität Bochum  
matthias.roegner@rub.de

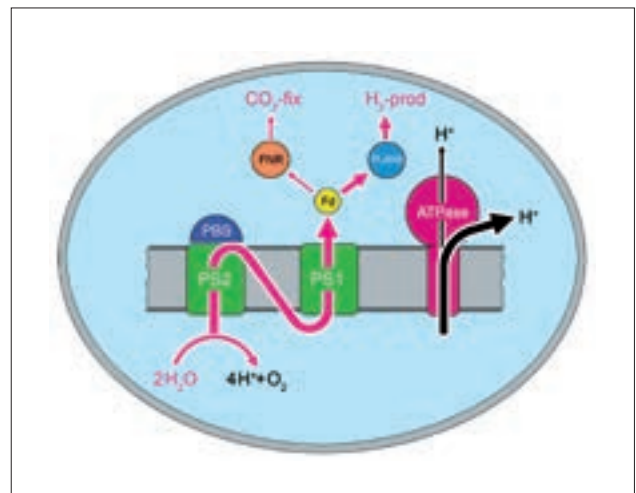
[www.bpf.ruhr-uni-bochum.de](http://www.bpf.ruhr-uni-bochum.de)

Abbildung 3:



„Biobatterie“ als semiautonomes Minimalsystem zur Optimierung der Elektronentransportprozesse der zukünftigen „Designzelle“: Der wasserspaltende, sauerstoffentwickelnde Bereich mit PS2 (linke Halbzelle, aerobe Bedingungen) ist räumlich getrennt vom wasserstoffproduzierenden, sauerstoffempfindlichen Teil mit der Hydrogenase (rechte Halbzelle, anaerober Bereich). Der optimale Kontakt der beiden Photosysteme zur Goldelektrode wird durch leitende Osmiumpolymere in beiden Halbzellen erreicht (Quelle: Matthias Rögner).

Abbildung 4:



Zukünftige „Designzelle“ mit Komponenten, die im Hinblick auf eine erhöhte Biowasserstoffproduktion angepasst werden müssen: Mengenverhältnis der Photosysteme (PS1, PS2), Phycobilisomenantenne (PBS), partielle Entkopplung der ATPase, Elektronenübertragung von Ferredoxin (Fd) auf die Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase (FNR) sowie die Hydrogenase ( $H_2ase$ ) (Quelle: Matthias Rögner).

## Neuigkeiten aus dem BMBF



Auftakt des Wissenschaftsjahres mit den Bundesministern Annette Schavan und Norbert Röttgen sowie Vertreterinnen und Vertretern der an der ZukunftswerkStadt teilnehmenden Städte und Landkreise sowie Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern ©BMBF

### Wissenschaftsjahr 2012 – Zukunftsprojekt ERDE

Wie wollen wir leben, um unseren Planeten zu erhalten? Wie müssen wir wirtschaften, um unseren Kindern eine Zukunft sichern zu können? Und wie können wir unsere Umwelt bewahren, um diese Lebensgrundlagen zu schützen? Das sind Fragen, die im Wissenschaftsjahr 2012 „Zukunftsprojekt ERDE“ gestellt werden.

Ein nachhaltiger Umgang mit unserer Umwelt und ihren Ressourcen findet in Gesellschaft und Wissenschaft immer mehr die notwendige Beachtung. Im „Zukunftsprojekt ERDE“ möchte das BMBF die Wirksamkeit moderner Nachhaltigkeitsforschung aufzeigen, deren Verdienst unter anderem erhebliche Effizienzsteigerungen der deutschen Wirtschaft im Energie- und Materialverbrauch sind.

Entscheidende Akteure für die Entwicklung einer nachhaltigen Lebensweise sind die Städte und Kommunen. Sie spielen daher eine zentrale Rolle im Wissenschaftsjahr, das Bundesforschungsministerin Annette Schavan Anfang Februar gemeinsam mit Bundesumweltminister Norbert Röttgen sowie 25 Vertretern von Städten, Gemein-

den und Landkreisen in Berlin eröffnet hat. Teil des Wissenschaftsjahres ist die mit 3,5 Millionen Euro geförderte Initiative „ZukunftswerkStadt“, in der Diskussionsforen von Bürgern und Wissenschaftlern Perspektiven zur Nachhaltigkeit ausloten und Ideen für den Umbau von Kommunen liefern werden. „Forschung und Wissenschaft sind der Schlüssel für die nachhaltige Entwicklung von Städten und Gemeinden. Wissenschaftler aus Universitäten und Forschungsinstituten werden die Bürger als Partner dabei unterstützen, ihre Gemeinden nachhaltig zu gestalten“, sagte Schavan. Auf den Ergebnissen der „ZukunftswerkStadt“ soll noch 2012 eine Förderinitiative zur „CO<sub>2</sub>-neutralen, energieeffizienten und klimaangepassten Stadt“ aufbauen, mit deren Hilfe sich Städte ab 2020 CO<sub>2</sub>-neutral entwickeln können.

Weitere Informationen unter:  
<http://www.bmbf.de/de/17858.php>





Bild: © Johanna Mühlbauer – Fotolia.com

## Energietechnologien für die Zukunft

Nicht erst seit den tragischen Ereignissen von Fukushima ist die Energiewende ein wichtiges Thema. Die damit verbundenen großen Herausforderungen an Politik, Wirtschaft, Wissenschaft und Technik werden in der Öffentlichkeit kontrovers diskutiert, da die Bürger den Wandel im Alltag mittragen müssen.

In Deutschland sind Wasserkraft, Windenergie, Photovoltaik und Bioanlagen inzwischen eine nicht mehr wegzudenkende Säule der Energiewirtschaft. Der Anteil erneuerbarer Energien an der Stromerzeugung hat sich in Deutschland in den vergangenen zehn Jahren annähernd von 4,5 auf heute etwa 17 Prozent vervierfacht. Nach den Plänen der Bundesregierung wird dieser Trend anhalten, so dass 2030 der Anteil erneuerbarer Energien bei 50 Prozent, 2040 bereits bei 60 Prozent und 2050 sogar bei 80 Prozent liegen wird.

Im Bürgerdialog „Energietechnologien für die Zukunft“ wurden erste Schritte für eine aktive Zusammenarbeit von Gesellschaft und Staat für nachhaltige Entwicklung gefördert. „Jetzt ist wichtig, die Ergebnisse dieses Bürgerdialogs in die Gremien einzubringen, die sich mit der Gestaltung

der Energiewende beschäftigen – in der Politik, in der Wissenschaft, in der Wirtschaft, in der Zivilgesellschaft“, sagte Schavan bei der Überreichung konkreter Empfehlungen für die Gestaltung der Energiewende.

Weitere Informationen unter:  
<http://www.bmbf.de/de/16753.php>

## Deutschland ist führender Innovationsstandort

„Die Hightech-Strategie der Bundesregierung zeigt Wirkung“, stellte Bundesforschungsministerin Schavan anlässlich der Übergabe des fünften Gutachtens zu Forschung, Innovation und technologischer Leistungsfähigkeit fest. Die Expertenkommission Forschung und Innovation (EFI), die seit 2007 die Bundesregierung berät, begrüßt in ihrem jährlichen Gutachten, dass Deutschland in den vergangenen Jahren die öffentlichen und privatwirtschaftlichen FuE-Investitionen systematisch steigern konnte. 2010 sind die Aufwendungen in diesen Bereichen mit knapp 70 Milliarden Euro auf den Rekordwert von 2,82 Prozent des Bruttoinlandsproduktes gestiegen. Davon entfielen 46,9 Milliarden Euro auf die Wirtschaft und 12,8 Milliarden auf den Bund. Deutschland ist damit international erneut „führender Wirtschafts- und Innovationsstandort“.

Nach Einschätzung der EFI tragen zu dieser Position nicht nur deutschlandweite Maßnahmen wie die positiv bewertete Exzellenzinitiative, der „Hochschulpakt 2020“, der „Pakt für Forschung und Innovation“, der Spitzenclusterwettbewerb oder die Initiative „Forschungscampus – öffentlich private Partnerschaften für Innovationen“ bei. Die Expertenkommission begrüßt auch die bildungs- und forschungspolitischen Kooperationen des Bundesministeriums für Bildung und Forschung mit China. Bundesministerin Schavan kündigte an, dass die Bundesregierung das Gutachten sorgfältig prüfen und im Sommer im Bundesbericht Forschung und Innovation 2012 dazu Stellung nehmen werde.

Weitere Informationen unter:  
<http://www.bmbf.de/press/3242.php>



Bild: © Thomas Nattermann – Fotolia.com

### **Forschung für die zivile Sicherheit**

Sicherheit ist eines der höchsten Güter einer Gesellschaft und sowohl die Basis eines freien Lebens als auch ein wichtiger Faktor des wirtschaftlichen Wohlstandes. Im Rahmen der Globalisierung steht der Schutz der zivilen Sicherheit vor neuen Herausforderungen. Zunehmende Extremwetterereignisse, weltweit operierender Terrorismus, aber auch freier Handel, Reisen und Kommunikation erzeugen Gefahrenpotentiale, die nach innovativen Lösungen verlangen.

Das neue Rahmenprogramm „Forschung für die zivile Sicherheit“ 2012-2017 baut auf der im Jahr 2007 gestarteten ersten Programmphase auf. Im Mittelpunkt stehen Lösungen, die den Schutz der Bevölkerung und der kritischen Infrastrukturen vor Bedrohungen durch Terrorismus, Sabotage, organisierter Kriminalität, Piraterie, aber auch vor den Folgen von Naturkatastrophen und Großunfällen gewährleisten und einen Beitrag zum Schutz unseres freiheitlichen Lebensstils leisten. Die fünf Handlungsfelder zielen dabei auf die Sicherheit kritischer Infrastrukturen, der Wirtschaft und des Cyberraums.

Das BMBF kooperiert hierzu mit den für die jeweiligen Politikbereiche verantwortlichen Ressorts. Forschung, Gesetzgebung, Standardsetzung, internationale Kooperation und Beschaffung im Bereich der zivilen Sicherheit werden auf diese Weise im Gesamtkontext betrachtet. In den Projekten werden alle Akteure der Innovationskette, wie etwa Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben sowie Betreiber von Infrastrukturen, einbezogen, um gemeinsam innovative Technologien und effizientere Organisationsformen zu schaffen.

Weitere Informationen unter:

<http://www.bmbf.de/de/6293.php> und

<http://www.bmbf.de/de/11773.php>

### **Den demografischen Wandel aktiv gestalten**

Die Veränderung der Altersstruktur unserer Gesellschaft ist in den vergangenen Jahren immer deutlicher geworden. Während die durchschnittliche Lebenserwartung in Deutschland heute so hoch ist wie nie zuvor, sinkt die Bevölkerungszahl aufgrund einer anhaltend niedrigen Geburtenrate. Laut Prognose des Statistischen Bundesamtes wird im Jahr





2030 etwa die Hälfte der Menschen hierzulande über 50 und fast jede dritte Person älter als 65 Jahre sein. Bereits heute sind beispielsweise an Schulen erste Folgen dieser Veränderungen sichtbar.

Mit der im November 2011 vom Bundeskabinett verabschiedeten „Forschungsagenda für den demographischen Wandel: Das Alter hat Zukunft“ adressieren erstmals mehrere Ressorts übergreifend dieses Thema. Im Fokus der Agenda stehen insbesondere ältere Menschen, die sich in den letzten Jahren ihres Berufslebens befinden oder bereits aus dem Berufsleben ausgeschieden sind.

„Wir wollen durch Forschung die Entwicklung von neuen Lösungen, Produkten und Dienstleistungen vorantreiben, die die Lebensqualität und gesellschaftliche Teilhabe älterer Menschen verbessern. Wir wollen dadurch zum Wohle aller Generationen bislang verborgene Schätze einer Gesellschaft des längeren Lebens heben“, sagte Schavan anlässlich der Bekanntgabe der Agenda. Insgesamt sechs Handlungsfelder werden als Ziel der Forschung benannt: Grundsatzfragen einer Gesellschaft des längeren Lebens, Kompetenzen und Erfahrungen älterer Menschen für Wirtschaft und Gesellschaft nutzen, älter werden bei guter Gesundheit, gesellschaftliche Teilhabe: Mobil in Verbindung bleiben, sicher und unabhängig Wohnen sowie mit guter Pflege zu mehr Lebensqualität.

Weitere Informationen unter:  
<http://www.bmbf.de/de/4657.php>

### **Anerkennungsgesetz**

Wirtschaftlicher Aufschwung und demographischer Wandel führen in Deutschland zu einem immer intensiveren Wettbewerb um die begrenzte Zahl von Fachkräften. Neben der Aktivierung und Nutzung inländischer Potenziale soll auch die qualifizierte Zuwanderung attraktiver werden. Das am 01. April 2012 in Kraft getretene „Gesetz zur Verbesserung der Feststellung und Anerkennung im Ausland erworbener Berufsqualifikationen“ erleichtert daher die Anerkennung im Ausland erworbener Berufsqualifikationen.

Durch die Neuregelung wird erreicht, dass künftig für Anerkennungssuchende, Arbeitgeber und Betriebe nachvollziehbare und bundesweit möglichst einheitliche Bewertungen zu beruflichen Auslandsqualifikationen zur Verfügung stehen. Das Anerkennungsgesetz umfasst ein neues Bundesgesetz, das sogenannte Berufsqualifikationsfeststellungsgesetz, sowie Anpassungen in bereits bestehenden Regelungen zur Anerkennung von Berufsqualifikationen in rund 60 auf Bundesebene geregelten Berufsgesetzen und Verordnungen für die reglementierten Berufe, also z.B. für die akademischen und nichtakademischen Heilberufe und die Handwerksmeister. Die Länder haben angekündigt, die berufsrechtlichen Regelungen in ihrem Zuständigkeitsbereich (beispielsweise Lehrer, Ingenieure, Erzieher) ebenfalls zu ändern, um auch für diese Berufe die Anerkennungsverfahren zu verbessern.

Der bislang stark begrenzte Personenkreis, dem die Anerkennung ausländischer beruflicher Qualifikationen offenstand, wird durch das Gesetz erheblich erweitert. Es gibt nun für 350 nicht reglementierte Berufe (Ausbildungsberufe im dualen System nach dem Berufsbildungsgesetz und im Handwerk) einen Rechtsanspruch auf das Bewertungsverfahren. Das Gesetz schafft zudem die Kopplung an die deutsche bzw. EU-Staatsangehörigkeit weitgehend ab. Ausschlaggebend sind in den meisten Berufen künftig nur der Inhalt und die Qualität der Berufsqualifikationen, nicht aber die Staatsangehörigkeit oder Herkunft.

Weitere Informationen unter:  
<http://www.bmbf.de/de/15644.php>

### **Kontakt**

Informationen zu diesen und anderen interessanten Themen zur Hightech-Strategie für Deutschland finden Sie unter [www.hightech-strategie.de](http://www.hightech-strategie.de)

## MEHR POWER FÜR GEHIRN-SIMULATIONEN

### Simulation Laboratory Neuroscience in Jülich gegründet

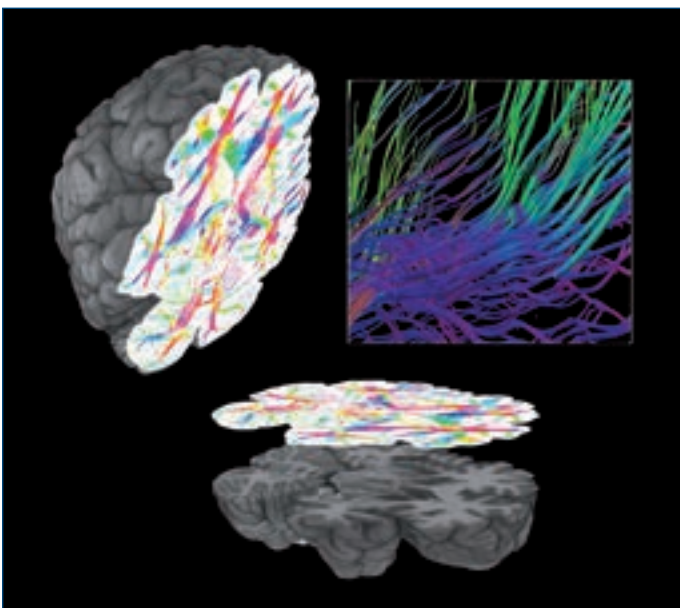
Mit Supercomputern das Gehirn verstehen – das ist das Ziel des neuen Simulation Laboratory Neuroscience am Forschungszentrum Jülich, welches durch die Helmholtz-Gemeinschaft gegründet wurde. Im Rahmen der neuen Institution wird die „Bernstein Facility Simulations- und Datenbanktechnologie“ eingerichtet, die dem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Nationalen Bernstein Netzwerk Computational Neuroscience angeschlossen ist. Sie wird dessen Wissenschaftler beratend unterstützen und dadurch eine optimale Verzahnung mit dem Feld der Computational Neuroscience in Deutschland herstellen.

Computer-Simulationen und theoretische Modelle werden immer wichtigere Werkzeuge, um die komplexen Prozesse unseres Gehirns zu verstehen. Das Simulation Laboratory unterstützt Neurowissen-

schaftler aus ganz Europa bei der optimalen Nutzung der Jülicher Hochleistungscomputer. Außerdem wird es die Weiterentwicklung und Standardisierung theoretischer Modelle im Bereich der Hirnforschung vorantreiben.

Der leistungsstärkste Computer der Welt sitzt in unserem Kopf. Etwa 100 Milliarden Nervenzellen wirken im Gehirn zusammen. Nach welchen Regeln die Zellen und Hirnareale miteinander kommunizieren und was bei neurologischen Erkrankungen verändert ist, untersuchen Wissenschaftler immer häufiger in Simulationen. Doch je realistischer diese werden, desto rechenintensiver sind sie auch. Zudem gewinnen in den Neurowissenschaften Verfahren an Bedeutung, bei denen innerhalb kurzer Zeit sehr große Datenmengen gesammelt werden können. So werden z. B. bei der Analyse von Faserbahnen durch Bildgebung mit polarisiertem Licht (3D-PLI) bereits jetzt Datensätze erzeugt, die mehrere Hundert TByte für nur ein einziges Gehirn betragen. Derartige Datenmengen erfordern neue Wege in der Datenverarbeitung. Die Forscher am Jülich Supercomputing Centre (JSC), einem der führenden Supercomputer-Zentren in Europa, werden darum Methoden weiterentwickeln, welche die Analyse immer größerer neurowissenschaftlicher Datensätze ermöglichen.

### Computermodelle integrieren die räumliche Verteilung der Nervenfaserbahnen im menschlichen Gehirn



Die im Institut für Neurowissenschaften und Medizin, INM-1, entwickelte dreidimensionale Bildgebung mit polarisiertem Licht (3D-Polarized Light Imaging, 3D-PLI) ermöglicht die räumliche Darstellung von Nervenfaserbahnen im menschlichen Gehirn mit einer Auflösung von bis zu einem tausendstel Millimeter. So können selbst kleinste Faserverbindungen (hier dargestellt als dreidimensionale Röhren oder „tubes“) mit bislang unerreichtem Detailreichtum sichtbar gemacht werden.

Quelle: Katrin Amunts, Markus Axer, Forschungszentrum Jülich

Um die Leistung der Jülicher Supercomputer wie JUGENE voll ausnutzen zu können, müssen Simulationen von Hirnprozessen erst auf deren speziellen Anforderungen und Möglichkeiten angepasst werden. „Heutige Supercomputer bestehen aus hunderttausenden von Rechenkernen. Um eine Simulation effizient über diese Prozessoren zu verteilen, benötigen wir völlig neue Datenstrukturen und Kommunikationsalgorithmen im Vergleich zu denen, die wir auf kleineren Systemen eingesetzt haben“, erklärt Markus Diesmann, Professor für Computational Neuroscience am Forschungszentrum Jülich und Leiter des Netzwerks zur Modellierung des menschlichen Gehirns in der Helmholtz-Allianz Systembiologie. Aufgaben wie diese sind Bestandteil des Helmholtz-Portfolioprojektes „Supercomputing and Modelling for the Human Brain“ (Sprecher: Katrin Amunts, Thomas Lippert). Gemeinsam werden hier Experten für Computational Neuroscience, Datenanalyse, den experimentellen Neurowissenschaften, Virtuelle Realität und Supercomputing daran arbeiten, ihre Programme anzupassen und zu optimieren. Durch eine verbesserte Standardisierung der Modellbeschreibung erhoffen sich die Forscher sowohl eine bessere Vergleichbarkeit als auch eine vereinfachte Kombination unterschiedlicher Teilmodelle. Durch Zusammenarbeit mit Kolleginnen und Kollegen in der Helmholtz-Allianz Systembiologie sollen die



Der vom Jülich Supercomputing Centre betriebene Supercomputer JUGENE sowie sein Nachfolger und andere Spezialrechner werden im Rahmen der neuen Einrichtung vermehrt für Simulationen zur Aufklärung der Gehirnfunktion eingesetzt werden.

Quelle: Forschungszentrum Jülich

gewonnen Erkenntnisse und Methoden auf andere biologische Prozesse, etwa zur Simulation der Kommunikation von Tumorzellen mit ihrer Umgebung und untereinander übertragen werden.

Als Teil des Nationalen Bernstein Netzwerks Computational Neuroscience ist die neue Einrichtung von Beginn an hervorragend in die neurowissenschaftliche Forschungslandschaft in Deutschland eingebunden. Im Bernstein Netzwerk, das sich innerhalb weniger Jahre eine international führende Rolle erarbeitet hat, sind über 200

wissenschaftliche Arbeitsgruppen miteinander vernetzt. Hier werden große Mengen relevanter neurobiologischer Daten gesammelt und komplexe Modelle und Simulationen eingesetzt, die eine langfristige Verfügbarkeit und Weiterentwicklung von Simulations-Software erfordern und sich zum Teil erst mit den Jülicher Supercomputern rechnen lassen. Die Zusammenarbeit mit dem Bernstein Netzwerk ist ein gelungenes Beispiel dafür, wie sich langfristige institutionelle Förderung der Helmholtz Gemeinschaft und Projektförderung des BMBF ergänzen können – für ein gemeinsames Ziel: Das Verständnis des Gehirns.

Quelle: Pressemitteilung Forschungszentrum Jülich

## Das Bernstein Netzwerk Computational Neuroscience



Das Bernstein Netzwerk Computational Neuroscience verknüpft die nationalen Forschungseinrichtungen und Projekte auf dem Gebiet der Computational Neuroscience. Das Forschungszentrum Jülich betreibt nun die Bernstein Facility Simulations- und Datenbanktechnologie.

Quelle: Bernstein Netzwerk Computational Neuroscience

### WEITERE INFORMATIONEN UND KONTAKT:

**Jülich Supercomputing Centre (JSC)**  
<http://www.fz-juelich.de/ias/jsc>  
 Direktor: Prof. Dr. Dr. Thomas Lippert

**Institut für Neurowissenschaften und Medizin, Bereich Strukturelle und Funktionelle Organisation des Gehirns (INM-1)**  
<http://www.fz-juelich.de/inm/inm-1>  
 Direktorin: Prof. Dr. Katrin Amunts

**Institut für Neurowissenschaften und Medizin, Bereich Computational and Systems Neuroscience (INM-6)**  
<http://www.csn.fz-juelich.de>  
 Direktor: Prof. Dr. Markus Diesmann

**Bernstein Netzwerk Computational Neuroscience**  
<http://www.nncn.de/>

**Simulation Laboratory Neuroscience – Bernstein Facility Simulation and Database Technology**  
<http://www.fz-juelich.de/bfsd>

### ANSPRECHPARTNER:

**Prof. Dr. Markus Diesmann**  
 Forschungszentrum Jülich  
[diesmann@fz-juelich.de](mailto:diesmann@fz-juelich.de)

## NEUE ANSÄTZE FÜR DIE KREBSFORSCHUNG:

### Drei neue Systembiologieprojekte am DKFZ gestartet

Seit dem Jahr 2007 erforscht das SBCancer-Netzwerk der Helmholtz-Allianz Systembiologie Störungen in Signalwegen, die bei vielen Krebsarten entscheidend für die Entstehung und den Verlauf der Krankheit sind. Dabei arbeiten Forscher des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) eng zusammen mit Partnern an Universitäten und anderen Einrichtungen. Auf Grundlage der im Rahmen der Helmholtz-Allianz gewonnenen Erkenntnisse wurden jetzt drei am DKFZ koordinierte Forschungsverbände für eine Förderung im Rahmen des „Systembiologie in der Krebsforschung – CancerSys“ -Programms des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) ausgewählt. Die im Frühjahr 2012 gestarteten Verbände werden dabei für drei Jahre mit insgesamt neun Millionen Euro gefördert. Die Verbände *LungSys II*, *CancerEpiSys* und *MYC-NET* kombinieren experimentelle Messverfahren mit mathematischen Modellen, um die komplexen molekularen Vorgänge bei der Krebsentstehung aufzuklären. Dazu arbeiten die Wissenschaftler des DKFZ eng mit Forschern an den Universitätskliniken in Heidelberg und Ulm und mit Unternehmen wie etwa Roche zusammen.

#### Resistenz von Krebszellen erforschen

Im Verbundprojekt *MYC-NET* untersucht ein Forscherteam des DKFZ und der Universität Heidelberg um Dr. Frank Westermann, Prof. Dr. Thomas Höfer und Prof. Dr. Stefan Pfister die molekularen Mechanismen, die Krebszellen kindlicher Tumoren des Nervensystems widerstandsfähig gegen Chemo- oder Strahlentherapie machen. Bei einer Vielzahl von Patienten lösen diese Therapien jedoch Mutationen aus, die Krebszellen zur Resistenz gegen die Therapie verhelfen. Um zu verstehen, wie die Mutationen die normalerweise fein abgestimmte Balance zwischen Zelltod und Zellteilung beeinflussen, kombinieren die Wissenschaftler genetische, biochemische, systembiologische und mathematische Ansätze. Insbesondere wollen sie zum ersten Mal unter dem Mikroskop beobachten, wie Krebszellen auf eine Chemotherapie reagieren, um die Variabilität des Zellverhaltens und die Selektion therapieresistenter Krebszellen auf Einzelzellebene zu charakterisieren

#### Auch die Verpackung spielt eine Rolle

Wie lässt sich eine der häufigsten Blutkrebsarten der westlichen Welt, die chronisch lymphatische Leukämie, wirkungsvoller behandeln? Dieser Frage gehen Wissenschaftler im Forschungsnetzwerk *CancerEpiSys* nach.

Dass sich Krebszellen anders verhalten als gesunde Zellen, liegt nicht nur an Veränderungen der Erbinformation selbst, sondern

auch an ihrer „Verpackung“. Veränderungen in diesem Bereich können dazu führen, dass die Erbinformation nicht richtig gelesen wird. Dadurch kann eine kranke Zelle z. B. Gene ausschalten, die die Krebsentstehung normalerweise verhindern. Mit den vielfältigen Wechselwirkungen von „Verpackung“ und Erbinformation befasst sich die Epigenetik. „Wir wollen epigenetische Zusammenhänge herausfiltern, die für die Entstehung und Bekämpfung der chronischen lymphatischen Leukämie entscheidend sind“, erläutern Dr. Karsten Rippe vom DKFZ und Dr. Daniel Mertens von der Ulmer Universitätsklinik für Innere Medizin III, die das neue Forschungsnetzwerk koordinieren. Gleichzeitig wollen die Forscher herausfinden, wie epigenetisch wirksame Krebsmedikamente auf diese Faktoren Einfluss nehmen.

#### Optimale Behandlung von fortgeschrittenem Lungenkrebs

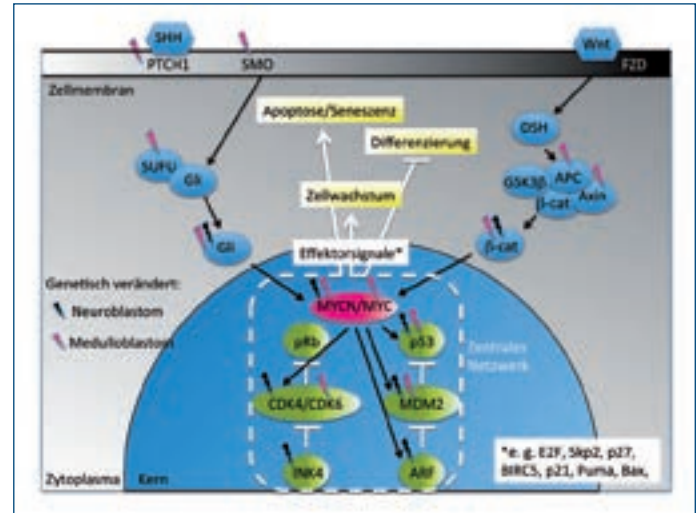
In Deutschland ist Lungenkrebs bei Männern die häufigste, bei Frauen die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache. Das Fehlen von Symptomen während der frühen Stadien der Krankheit und die frühe Metastasierung sind die häufigsten Ursachen dafür, dass diese Krebsart oft erst sehr spät und in fortgeschrittenen Stadien erkannt wird. Nur 2% der Patienten mit metastasiertem Lungenkrebs leben noch 5 Jahre nach der Diagnose.

Das Konsortium *LungSys II – Systembiologie des Lungenkrebs – Dynamische Eigenschaften der frühen Metastasierung und therapeutische Optionen* adressiert ein zentrales Problem des Lungenkrebs, die frühe systemische Ausbreitung von Tumorzellen unabhängig von der Tumorgroße. Innerhalb des *LungSys II* Konsortiums, das von Prof. Dr. Ursula Klingmüller und Prof. Dr. Thomas Höfer koordiniert wird, arbeiten Partner aus unterschiedlichen Disziplinen eng mit der Thoraxklinik in Heidelberg und der pharmazeutischen Industrie (Roche Diagnostics und Merrimack) zusammen, um die komplexen Mechanismen, die frühe Metastasierung im Lungenkrebs begünstigen, zu verstehen. Bisher zeigen Therapien mit niedermolekularen Inhibitoren oder therapeutischen Antikörpern auf Grund von Sekundärmutationen oft nur vorübergehende Effekte, da umfangreiche Interaktionen zwischen Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren und anderen Signalwegen existieren. Die integrative mathematische Modellierung ermöglicht es, das komplexe dynamische Zusammenspiel der verschiedenen Systemkomponenten quantitativ zu erfassen und die Auswirkung von Störungen auch z. B. von Kombinationstherapien vorherzusagen. Dieser Ansatz birgt das Potential, sowohl Therapiemöglichkeiten zu optimieren als auch für die individuelle Konstellation in Patienten anzupassen und wird daher einen wesentlichen Beitrag zur Personalisierten Medizin leisten.

Quelle: Pressemitteilung DKFZ Heidelberg

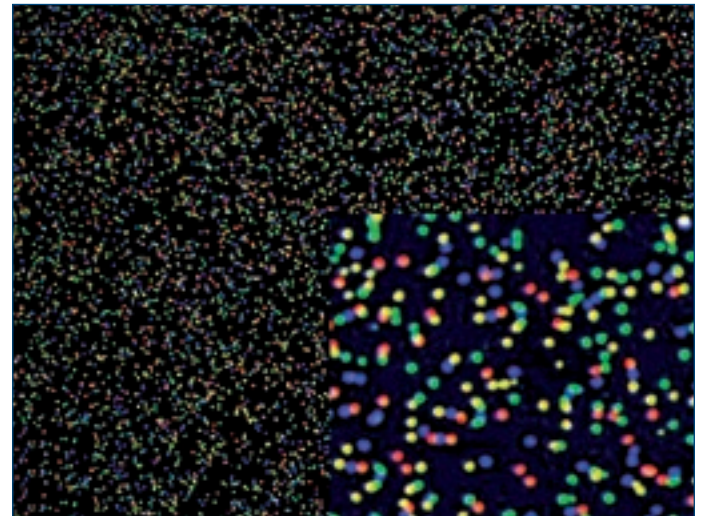
## MYC-NET

Das *MYC-NET* Konsortium untersucht Resistenzmechanismen von Krebszellen, beim Neuroblastom und dem Medulloblastom. Das Onkogen MYCN stellt hier ein Schlüsselmolekül dar. MYCN interagiert mit weiteren zellulären Signalmolekülen, die gemeinsam das Wachstum und die Differenzierung der Zelle kontrollieren. Veränderungen in diesen Molekülen durch MYCN-getriebene Überexpression und Mutationen spielen eine wichtige Rolle bei Krebs. Das Zusammenwirken dieser genetischen Veränderungen wird im Rahmen von *MYC-NET* untersucht. MYC-Onkogene sind auch bei ca. 70% aller humanen Tumore verändert, so dass *MYC-NET* prinzipielle Einsichten in die Mechanismen der Therapieresistenz von Tumoren liefern soll.



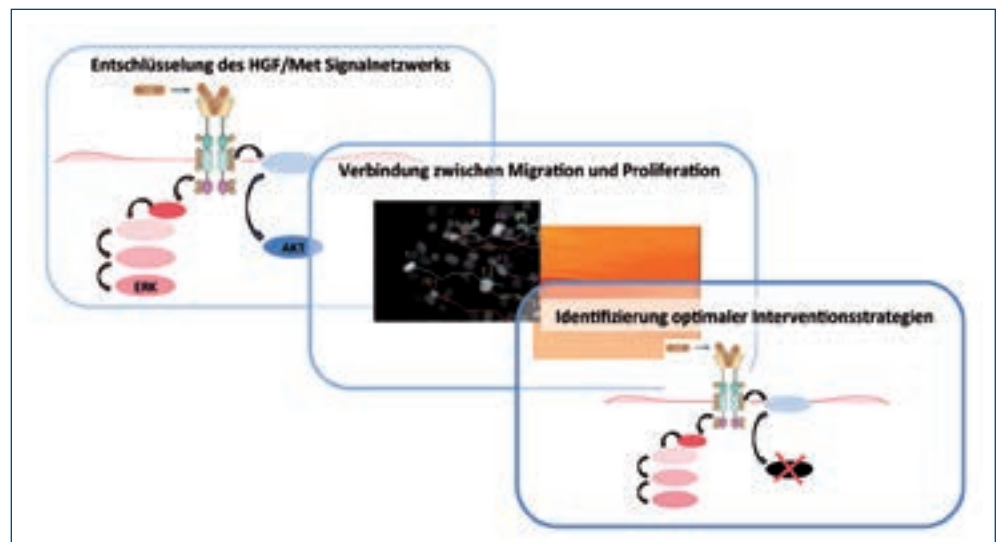
## CancerEpiSys

Durch Hochdurchsatz-Genomsequenzierungen können selbst kleinste Veränderungen im Erbgut und seiner Verpackung in Tumorzellen identifiziert werden. Für kurze Bruchstücke des Genoms wird die DNA-Sequenzabfolge durch aufeinanderfolgende Reaktionen mit vier verschiedenen Farbstoffen (rot, gelb, grün und blau) sichtbar gemacht, die die vier Buchstaben der DNA repräsentieren. So entstehenden nach jedem Reaktionsschritt Farbmuster, wie sie auf der Abbildung gezeigt sind. Aus diesen Mustern werden für das gesamte Genom die DNA-Sequenzen bestimmt, die in den Tumorzellen epigenetische Veränderungen zeigen, die Thema des Verbundes *CancerEpiSys* sind.



## LungSys II

Der Hepatocyte Growth Factor HGF ist ein kritischer Faktor für die Regulation der Zellmigration bei der Metastasierung von Lungenkrebs. Im Rahmen von *LungSys II* soll seine Rolle besser untersucht und neue Strategien zur Intervention entwickelt werden. Dabei soll zunächst auf molekularer Ebene das Signalnetzwerk entschlüsselt werden, welches dann das Verhalten der Zellen bestimmt. Daraus sollen dann neue Behandlungsstrategien abgeleitet werden.



# direkt oder indirekt, das ist hier die frage!

## Die erweiterte Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors in der zellulären Signaltransduktion

von Saskia Trump, Jacob J. Michaelson, Andreas Beyer und Irina Lehmann

Zellen sind die kleinsten Bausteine unseres Körpers. In jeder dieser Zellen laufen komplexe Prozesse ab, die unter normalen Umständen dafür sorgen, dass die Gesundheit unseres Körpers aufrechterhalten werden kann. Werden nun aber die dafür verantwortlichen Prozesse durch äußere Faktoren wie beispielsweise durch den Kontakt mit Chemikalien beeinflusst, kann dieses sensible Prozessgleichgewicht gestört werden. Ein umfangreiches Verständnis der Konsequenzen dieser „Gleichgewichtsstörungen“ bildet die Grundlage für eine sichere Vorhersage von toxischen Effekten sowie für mögliches therapeutisches Einwirken auf Krankheitsprozesse, die durch äußere Exposition hervorgerufen werden.

### Entgiftung, was sonst?

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor), ein intrazelluläres Protein, das in der Lage ist, die Genantwort spezifisch zu regulieren, ist ein bekannter Angriffspunkt für solche Chemikalien. Die Aufgabe dieses Rezeptors besteht unter anderem darin, die Entgiftung von schädlichen Xenobiotika (Chemikalien oder auch Therapeutika) zu aktivieren und deren Ausscheidung aus der Zelle zu vereinfachen. Kommt eine Zelle mit Chemikalien in Kontakt, binden diese an den Ah-Rezeptor, wodurch dieser aktiviert wird. In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor beeinflusst er dann spezifisch die Genantwort der Zelle, wodurch zum Beispiel Gene aktiviert werden, die für den Entgiftungsprozess verantwortlich sind. Beim Versuch der Zelle, die für sie schädlichen Chemikalien zu eliminieren, können allerdings giftige Abbauprodukte entstehen, die selbst auf die Genregulation einwirken können. Betrachtet man nun den Effekt einer Chemikalie auf die gesamte Genantwort, ist diese eine Mischung unterschiedlicher Prozesse: Von direkten über den Ah-Rezeptor ausgelösten Effekten zum Schutz der Zelle und von durch Abbauprodukten verursachten indirekten, oftmals toxischen Effekten (Abb. 1). Will man vorhersehen, ob eine Chemikalie toxische Effekte hervorrufen kann und diesen entgegenwirken, muss man diese Prozesse voneinander unterscheiden können.

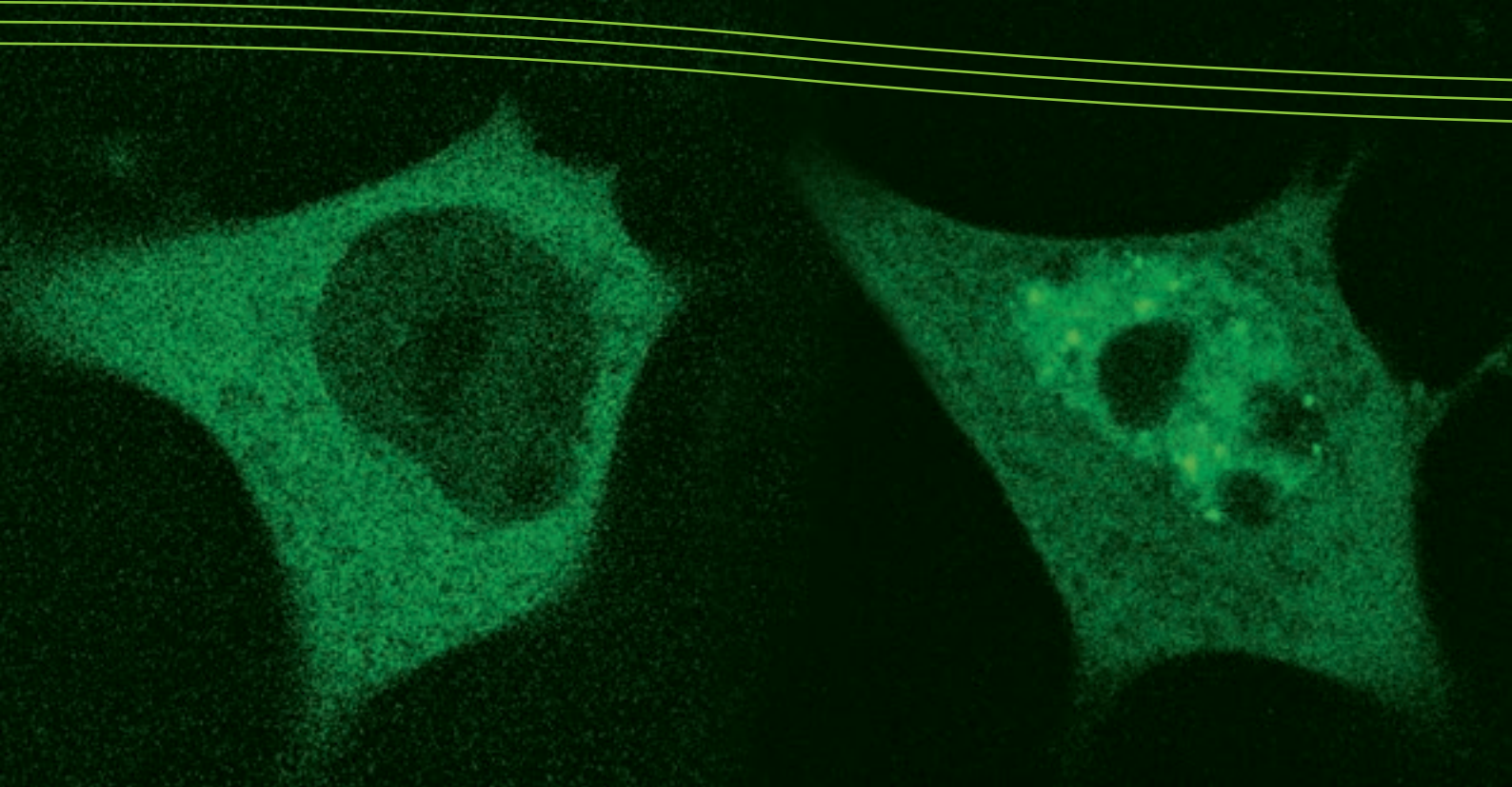
### Lernen und Klassifizieren

Dies ist uns durch die Verwendung eines sogenannten **Random Forest**, eines maschinellen Lernverfahrens, gelungen. Dieses Klassifikationsverfahren beruht auf während des Lernprozesses zufällig gewachsenen Entscheidungsbäumen, die dem Verfahren ihren Namen gaben. Das Computerprogramm wird mit Genexpressionsdaten von Chemikalien mit bekannten toxischen oder nichttoxischen Effekten trainiert und kann dann in einem unbekanntem Genexpressionsdatensatz direkte, Ah-Rezeptor-spezifische, von indirekten, toxischen Effekten, die durch Abbauprodukte von Chemikalien verursacht werden, trennen. Unter Verwendung dieses Verfahrens konnten wir nach Aktivierung des Rezeptors durch Benzo[a]pyren, einem sehr häufig in der Umwelt vorkommenden Schadstoff, 81 direkte Zielgene des Ah-Rezeptors identifizieren und 1.308 Gene, die durch indirekte, toxische Effekte reguliert werden (Michaelson *et al.*, 2011) (Abb. 2).

### Endogene Signalwege beeinflussen

Unter den Genen, die als direkt durch Ah-Rezeptor beeinflusst identifiziert werden, sind solche, die selbst Transkriptionsfaktoren sind, also ebenfalls direkt die Regulation anderer Gene steuern können. Somit ist die Aktivierung des Ah-Rezeptors der initiale Schritt in einer Transkriptionskaskade, in der nacheinander Transkriptionsfaktoren angeschaltet und deren entsprechende Zielgene aktiviert werden. Durch die Identifizierung dieses durch den Ah-Rezeptor regulierten Transkriptionsnetzwerks haben wir Hinweise darauf gefunden, dass der Ah-Rezeptor neben Entgiftungsprozessen auch weitere wichtige physiologische Prozesse der Zelle steuert und damit wahrscheinlich eine viel stärkere Krankheitsrelevanz besitzt als bisher vermutet.

Es war lange angenommen worden, dass die Aufgabe dieses Rezeptors allein darin besteht, die Entgiftung von schädlichen Chemikalien zu vermitteln. Diese Sicht auf die Rolle des Ah-Rezeptors beginnt sich nunmehr zu verändern. Unsere Daten deuten ebenso wie die Ergebnisse aus weiteren unlängst erschienenen



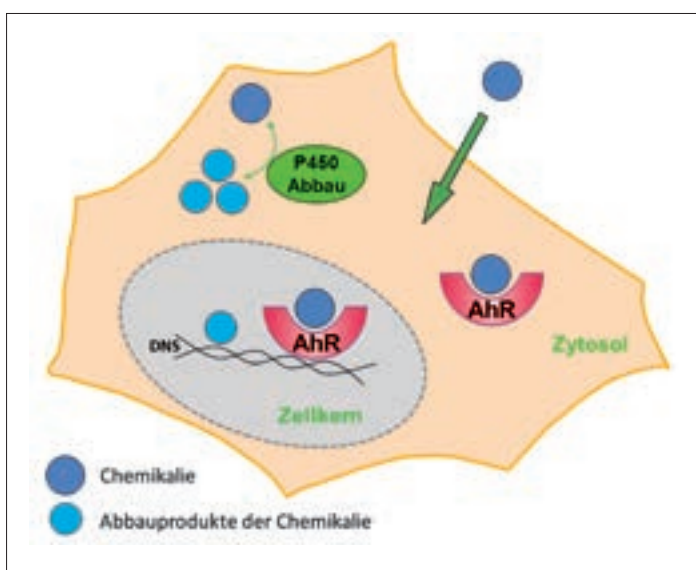
Die Aktivierung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (Ahr) durch einen seiner Liganden führt zur Translokation des Rezeptors in den Zellkern. Dies ist ein essentieller Schritt, der der Modulation der Genantwort vorausgeht. Durch die Markierung des Ahr mit einem grün fluoreszierenden Protein kann diese Lokalisationsveränderung auf Einzelzellebene beobachtet werden (Bild: Saskia Trump).

Studien darauf hin, dass Signale, die durch die Aktivierung dieses Rezeptors ausgelöst werden, auf zelluläre Entscheidungsprozesse einwirken und so auch eine wichtige Rolle in der Krankheitsentstehung spielen können. So konnte im vergangenen Jahr erstmals eine Beteiligung des Ah-Rezeptors an der Entstehung von Gehirntumoren nachgewiesen werden. Dabei bedienen sich Tumorzellen eines Tricks, um sich gegen Immunzellen zu schützen, die sie bekämpfen wollen: Sie produzieren eine Substanz namens Kynurenin, die von T-Lymphozyten (Immunzellen), die eigentlich den Tumor abwehren sollen, aufgenommen wird

und durch die Aktivierung des Ah-Rezeptors deren Aktivität hemmt (Opitz *et al.*, 2011).

Die Identifizierung des durch den Ah-Rezeptor induzierten genregulatorischen Netzwerkes, das für die Reaktion einer Zelle auf eine Chemikalie verantwortlich ist, wird nicht nur dabei helfen, toxische Effekte von Chemikalien besser vorherzusagen. Es ist auch die Grundlage für die gezielte Beeinflussung von durch den Ah-Rezeptor fehlgesteuerten Prozessen in der Zelle.

Abbildung 1: Kommen Zellen mit Chemikalien in Kontakt, wird ein komplexer Prozess ausgelöst



Tritt eine Chemikalie in eine Zelle ein, kann diese an ein Protein binden, das als Ah-Rezeptor (AhR) bekannt ist. In seiner Rolle als Transkriptionsfaktor aktiviert der AhR spezifische Zielgene (direkter Effekt), die unter anderem zum Abbau der Chemikalie führen (P450 Abbau). Die so entstehenden Abbauprodukte können jedoch ebenfalls schädlich für die Zelle sein und selbst auf die Genregulation einwirken (indirekter oder toxischer Effekt) (Bild: Saskia Trump).

### Steckbrief Forschungsprojekt:

**Projektname:** „From contaminant molecules to cellular response: Quantitative and predictive development“. Das Projekt wird im Rahmen der Helmholtz-Allianz Systembiologie gefördert.

### Referenzen:

Michaelson, J., Trump, S., Rudzok, S., Gräbsch, C., Madureira, D.J., Dautel, F., Mai, J., Attinger, S., Schirmer, K., Bergen, M. von, Lehmann, I., Beyer, A. (2011). Transcriptional signatures of regulatory and toxic responses to benzo-[a]-pyrene exposure. BMC Genomics 12:502.

Opitz, C.A., Litzenger, U.M., Sahn, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G.J., Miller, C.L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., Deimling, A. von, Wick, W., Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature 478 (7368), 197-203.

### Kontakt:



**Dr. Irina Lehmann**

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung –  
UFZ ,Leipzig  
irina.lehmann@ufz.de



**Dr. Saskia Trump**

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung –  
UFZ, Leipzig  
saskia.trump@ufz.de

[www.ufz.de/systembiologie](http://www.ufz.de/systembiologie)



**Dr. Andreas Beyer**

Biotec- TU Dresden, Dresden  
andreas.beyer@biotec.tu-dresden.de

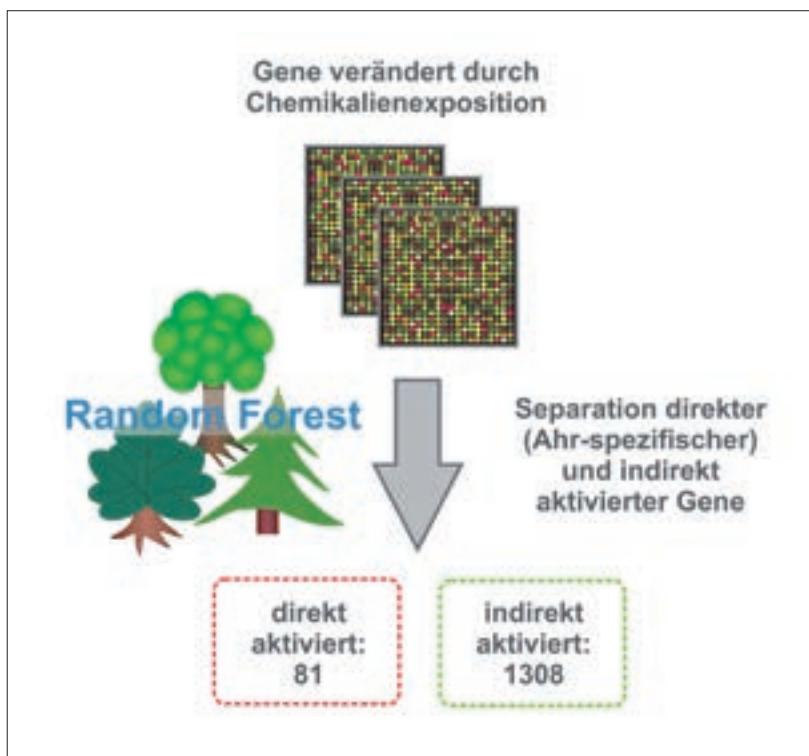


**Dr. Jacob J. Michaelson**

Biotec- TU Dresden, Dresden  
jacob.michaelson@biotec.tu-dresden.de

[www.biotec.tu-dresden.de/research/beyer](http://www.biotec.tu-dresden.de/research/beyer)

Abbildung 2: Trennung von direkten (Ah-Rezeptor spezifischen) und toxischen (indirekten) Effekten einer Chemikalie



Ein maschinelles Lernverfahren (Random Forest) erkennt die charakteristischen Merkmale in der zeitabhängigen Genantwort und kann so die verschiedenen Klassen identifizieren (Bild: Saskia Trump).



# biotransformation von fremdstoffen in der leber

## Systembiologische Ansätze zur Vorhersage von Arzneimittelwirkungen

von Ulrich Zanger, Maria Thomas, Reinhold Kerb, Ute Hofmann, Benjamin Kandel, Marcus Klein und Matthias Schwab

Unser Organismus nimmt permanent eine Vielzahl von Fremdstoffen auf, zu denen unter anderem Nahrungsstoffe, Arzneimittel oder Umweltgifte zählen. Die Aufgabe, diese Substanzen unschädlich zu machen und für die Ausscheidung vorzubereiten, ist eine lebenswichtige Funktion der Leber. Dieser Prozess, der hauptsächlich in den Hepatozyten abläuft, besteht aus einer komplexen Abfolge von Reaktionsschritten, die von einem umfangreichen Arsenal von Proteinen katalysiert werden, zu dem Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP), verschiedene Konjugationsenzyme sowie Transportproteine gehören (gemeinsam ADME Gene genannt, da sie an *absorption*, *distribution*, *metabolism* and *excretion* von Fremdstoffen beteiligt sind). Eine typische Systemeigenschaft dieses Biotransformationssystems, welches durch die breiten und überlappenden Substratspezifitäten der einzelnen Enzyme und Transporter entsteht, ist Robustheit gegenüber exogenen oder endogenen Störungen. Allerdings reicht diese nicht immer aus, so dass – bedingt durch Variationen im Erbgut (genetische Polymorphismen), Krankheit oder Umweltfaktoren – ein eingenommenes Medikament nicht mehr hinreichend abgebaut oder aktiviert wird. Die Folge sind Überreaktion, Toxizität oder Therapieversagen. Das Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart (Leiter: M. Schwab), eine Einrichtung der Robert Bosch Stiftung, erforscht seit vielen Jahren die komplexen Mechanismen, welche zu unerwarteten Arzneimittelwirkungen (UAW) führen oder eine fehlende Wirksamkeit erklären. An diesen sind oft genetische Polymorphismen beteiligt (Zanger *et al.*, 2008), aber auch Regulationsprozesse, die zu veränderter Expression der beteiligten Enzyme und Transporter führen, spielen eine wesentliche Rolle. Systembiologische Ansätze sollen helfen, die kom-

plexen Vorgänge der Biotransformation besser zu verstehen und Modelle zur Vorhersage der Arzneimittelwirkung zu entwickeln. Bereits in den BMBF geförderten HepatoSys-Netzwerken wurden die Robustheit des Arzneimittelmetabolismus sowie die cholesterinsenkenden Statine mittels systembiologischer Methoden untersucht (Bucher *et al.*, 2011; Schröder *et al.*, 2011). Im Kompetenznetzwerk Virtuelle Leber koordiniert das IKP Stuttgart drei Projekte, die sich mit der Regulation durch nukleäre Rezeptoren, den Einfluss entzündlicher Prozesse, sowie die Translation von Forschungsergebnissen in die Klinik befassen.

### Nukleäre Rezeptoren: Interface zwischen endogenem und Fremdstoffmetabolismus

Die nukleären Rezeptoren (NR) bilden eine beim Menschen aus 48 Mitgliedern bestehende Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase eine wichtige Rolle spielen. Viele dieser Proteine sind ligandenaktivierbare Transkriptionsfaktoren, deren Hauptaufgabe es ist, die Transkription von Zielgenen in Abhängigkeit eines endogenen oder exogenen Liganden zu regulieren. In den Hepatozyten koordinieren mehrere NR, wie z. B. die durch Peroxisomen Proliferatoren aktivierten Rezeptoren (PPAR), der Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) oder der Glukokortikoidrezeptor (GR) den Energiehaushalt, den Lipid- und Glukosestoffwechsel, Entzündungs- sowie weitere physiologische Prozesse. Die klassischen Xenorezeptoren PXR und CAR koordinieren dagegen hauptsächlich die Regulation vieler ADME Gene durch Fremdstoffliganden (Abb. 1). Allerdings gibt es zwischen endogenem Stoffwechsel und Fremdstoffmetabolismus auch regulatorische Verbindungen. In unserer Gruppe haben wir vor kurzem einen unerwartet deutlichen Einfluss von PPAR $\alpha$ , einem Hauptregulator des Lipid- und Energiestoff-



Die beteiligten Partner am IKP Stuttgart : v.l.n.r.: Marcus Klein, Maria Thomas, Benjamin Kandel, Matthias Schwab, Uli Zanger, Ute Hofmann; nicht im Bild: Reinhold Kerb, Kathrin Klein und Jessica Rieger (Foto: Bern Borstel).

wechsels, auf den CYP-vermittelten Arzneimittel-Metabolismus gezeigt (Klein *et al.*, 2012). Umgekehrt weisen jüngste Ergebnisse auf eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels durch PXR und CAR hin. Wir interpretieren diese neuen Ergebnisse dahingehend, dass funktionelle Redundanz auch auf der Ebene der Genregulation die Robustheit des Systems gegenüber endogenen und exogenen Störfaktoren erhöht.

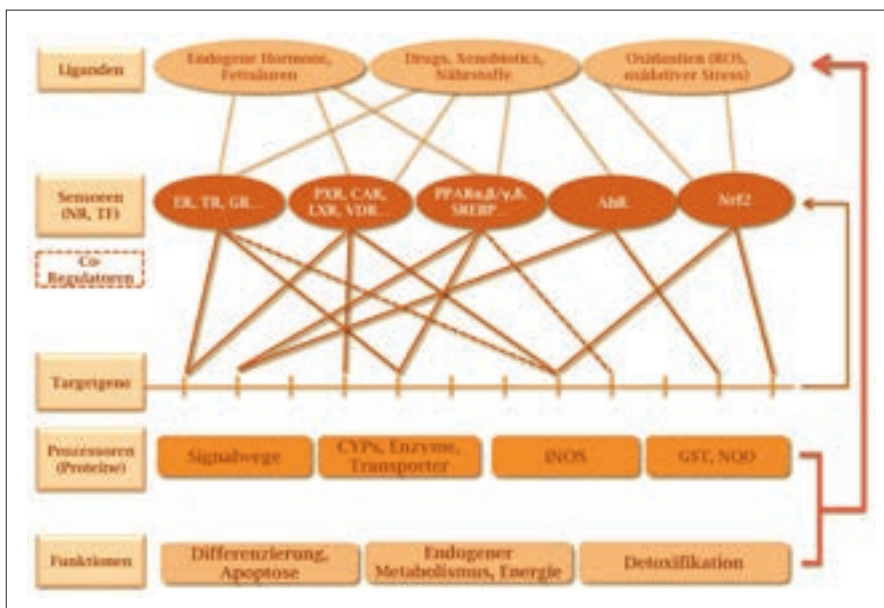
Um diese Systemeigenschaften weiter zu charakterisieren, untersuchen wir den Einfluss der hepatischen nukleären Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion auf den endogenen und exogenen Stoffwechsel mittels Nasslabor aber auch mittels Computermodellierung. Hierzu haben wir einen experimentellen Workflow zur Generierung zeitaufgelöster Proben für quantitatives Transkriptom-Profilierung, LC-MS/MS-Metabolomik (Lipide, Gallensäuren, Metaboliten des Zentralstoffwechsels und Arzneimittelstoffwechsel), sowie für Proteomik- und Phosphoproteomik-Analysen unserer Partner am Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut

Reutlingen entwickelt (Abb. 2). Die Transkriptom-, Proteom- und Metabolomdaten werden von Andreas Dräger und Andreas Zell vom ZBIT (Zentrum für Bioinformatik Tübingen) zur Erstellung von dynamischen mathematischen Modellen der NR-Signaltransduktion verwendet, die dann in einer iterierenden Abfolge von Modellierung und experimenteller Überprüfung verfeinert werden.

### Der Einfluss von Zytokinen: Wenn die Leber Wichtiges zu tun hat

Während einer bakteriellen Infektion signalisieren von Makrophagen produzierte pro-inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  und IL-6 den Hepatozyten, dass sie schnellstmöglich Akutphaseproteine (z. B. C-reaktives Protein) synthetisieren müssen, die zur Initiierung der Immunabwehr benötigt werden. Offenbar nimmt diese überlebenswichtige Funktion die Hepatozyten so in Anspruch, dass sie momentan verzichtbare Funktionen wie den Fremdstoffmetabolismus abschalten. Für den Patienten kann das allerdings unangenehme Folgen haben, zum Beispiel wenn dadurch

Abbildung 1: Schematisches Diagramm Ligand-abhängiger, cytosolischer Signaltransduktionswege in Hepatozyten



iNOS: induzierbare Nitricoxid Synthase, GST: Glutathione S-Transferase, NQO: NAD(P)H: Quinone Oxidoreduktase (adaptiert von Nakata *et al.* 2006, Drug Metab Pharmacokinet. 21:437-457).

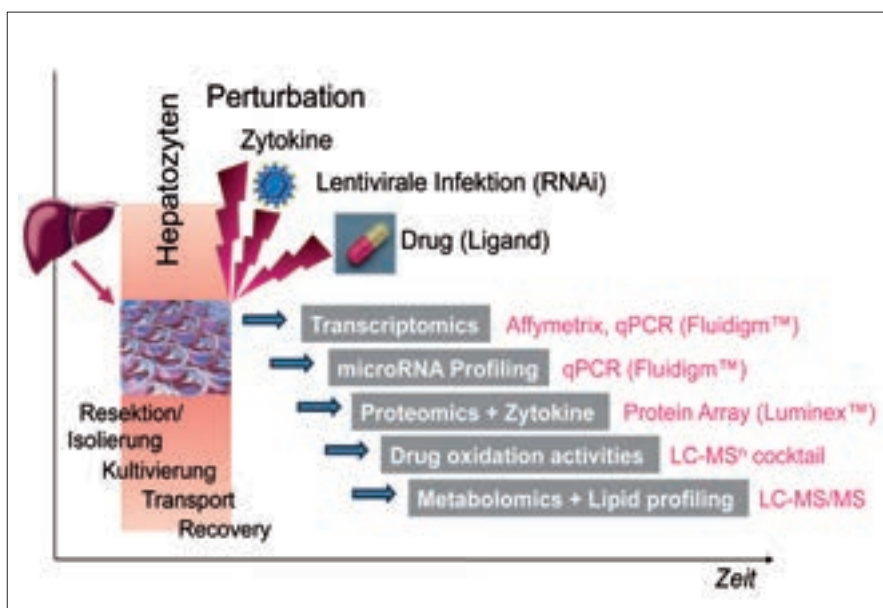
die Konzentration eines verabreichten Medikaments höher als erwartet ausfällt und aufgrund dessen Nebenwirkungen auftreten. Wie die Signalübertragung vom Zytokin bis zur Transkription der ADME-Gene abläuft, ist erst in Umrissen bekannt.

Mehrere Mechanismen einschließlich der JAK/STAT-, MAPK-, C/EBP- und PI3K/Akt-Signalwege wurden vorgeschlagen, um eine Downregulation von CYPs und anderen ADME-Enzymen auf transkriptioneller Ebene zu erklären. Die Rolle der einzelnen Signalkaskaden und ihre Spezifitäten sind bisher allerdings ungeklärt. Um diese Frage zu beantworten, verwenden wir zum Beispiel chemische Inhibitoren oder shRNA-kodierende Lentiviren gegen Schlüssel-Moleküle der oben genannten Signalwege in primären humanen Hepatozyten. Ähnlich dem in Abbildung 2 gezeigten Workflow werden dann Hochdurchsatzdaten generiert, die wiederum der Erstellung systembiologischer Modelle durch die Tübinger Partner dienen.

### Vom Labor zum Patienten: Bestimmung der individuellen Entgiftungskapazität der Leber

*In vivo* wird der Abbau von Arzneimitteln im wesentlichen durch die drei Prozesse Leberdurchblutung, Arzneimitteltransport und Arzneimittelmetabolismus bestimmt. Transport und Metabolismus von Arzneimitteln können im Menschen gemessen werden, in dem spezifische Testmedikamente verabreicht werden, von denen die Transport- und Abbauege bekannt sind. Aus den pharmakokinetischen Parametern (z. B. Halbwertszeit, Arzneimittel-Clearance) und dem Metabolitenprofil lassen sich so die entsprechenden Abbaue- und Transportwege modellieren. Die Phänotypisierung mit einem sogenannten „Cocktail“ von Testmedikamenten ist eine auch in der Arzneimittelentwicklung etablierte Methode, die Entgiftungskapazität der Leber funktionell im Menschen zu charakterisieren. So können z. B. Arzneimittelwechselwirkungen oder die Auswirkungen von Lebererkrankung oder genetischen Polymorphismen auf die Leberfunktion quantifiziert werden (Kerb und Schwab, 2010). Der speziell für das „Virtual Liver“-Projekt

Abbildung 2: Experimenteller Workflow zur Generierung zeitaufgelöster Proben für quantitatives Transkriptom-, (Phospho)Proteom- und Metabolom-Profilung



Humane Hepatozytenkulturen werden nach unterschiedlichen Perturbationen für die simultane Analyse dynamischer Genexpressionsprozesse aufgearbeitet. Die Erstellung von Transkriptom-Profilen erfolgt mittels Fluidigm™ Plattform (IKP), die Analyse von (Phospho)Proteomics mit Hilfe von Reverse-Protein-Arrays (NMI), und die Messung von Metabolomik durch LC-MS/MS (IKP) (Grafik: Ulrich Zanger).

zusammengestellte „Cocktail“ besteht aus Medikamenten, die die wichtigsten Transportproteine und Enzyme gezielt testen: Co-dein für CYP2D6, Talinolol für die Efflux-Transporter ABCB1 und ABCC2, Koffein für CYP1A2 und NAT2, Midazolam für CYP3A4/5, sowie Torasemide für CYP2C9 und den Aufnahme-Transporter OATP1B1. Auch die Leberdurchblutung kann durch den Einsatz modernster bildgebender Verfahren im Menschen nicht-invasiv gemessen werden. Die Kernspintomographie erlaubt es, die Blutflüsse in der Leber und am Herzen zu quantifizieren und gleichzeitig noch Information zur Lebergröße und gegebenenfalls pathologische Veränderungen zu erfassen.

In diesem klinischen Teilprojekt wird derzeit eine repräsentative Anzahl von gesunden Freiwilligen (n=120) systematisch mit pharmakologischen und bildgebenden Verfahren hinsichtlich der metabolischen Kapazität ihrer Leber umfassend phänotypisiert. Von allen Probanden wird zudem ein pharmakogenetisches Profil aller wichtigen Genpolymorphismen erstellt. Damit entsteht erstmals ein systembiologisches Gesamtbild mit im Projekt abgestimmten Daten zur Leberfunktion von der molekularen Ebene über die Organebene bis zum gesamten Menschen innerhalb einer homogenen Population. Anhand dieser Daten erstellen unsere Projektpartner Lars Küpfer und Jörg Lippert von Bayer Technology Services (Leverkusen) vertikal integrierte Modelle. Die dabei verwendete Modellierungstechnologie PBPK (physiology-based pharmacokinetics) ermöglicht neben der Berücksichtigung physiologischer Daten auch die Verwendung molekularer Parameter wie Enzymexpression und Genotyp-Phänotyp Korrelationen, die zusätzlich aus Untersuchungen von Gewebeprobe einer großen humanen Leberbank des IKP integriert werden.

Diese unter Verwendung umfassender *in-vivo* und *in-vitro* Daten neu entwickelten systembiologischen Modelle sollen zukünftig eine Vorhersage der individuellen Entgiftungskapazität der Leber vor Therapiebeginn ermöglichen und damit einen Beitrag zur personalisierten Medizin leisten. In gleicher Weise sind diese Modelle auch für die Arzneimittelentwicklung von Bedeutung. Es ist zu erwarten, dass Modelle mit valider Vorhersagekraft präzisere Fragestellungen in Prüfstudien am Menschen erlauben und letztlich eine Reduktion klinischer Prüfstudien ermöglicht.

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Die Forschungsprojekte sind Teilprojekte des BMBF-geförderten Projektes Virtuelle Leber, einem Netzwerk aus siebzig Forschergruppen, die sich zum Ziel gesetzt haben, ein dynamisches, mehrskaliges Modell der menschlichen Leber zu erstellen. An den vorgestellten Projekten sind folgende Institute und Personen beteiligt:

Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart (Ute Hofmann, Benjamin Kandel, Reinhold Kerb, Kathrin Klein, Marcus Klein, Jessica Rieger, Matthias Schwab, Maria Thomas, Ulrich Zanger); Zentrum für Bioinformatik (ZBIT) der Universität Tübingen (Roland Keller, Stefanie Tschernack, Andreas Dräger, Andreas Zell); Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut Reutlingen (Ute Metzger, Markus Templin, Thomas Joos); Bayer Technology Services Leverkusen (Lars Küpfer, Jörg Lippert).

---

### Referenzen:

- Bucher, J., Riedmaier, S., Schnabel, A., Marcus, K., Vacun, G., Weiss, T.S., Thasler, W.E., Nüssler, A.K., Zanger, U.M., Reuss, M. (2011) A systems biology approach to dynamic modeling and inter-subject variability of statin pharmacokinetics in human hepatocytes. *BMC Syst Biol* 5, 66.
- Kerb, R., Schwab, M. (2010) Impact of pharmacogenetics on drug-drug interactions. In: Pang SK, Rodrigues DA, Peter RM (Ed.) *Enzymatic- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions: Progress and Future Challenges*. Springer Verlag, Seite 51-74.
- Klein, K., Thomas, M., Winter, S., Nussler, A.K., Niemi, M., Schwab, M., Zanger, U.M. (2012) PPARA: A Novel Genetic Determinant of CYP3A4 In Vitro and In Vivo. *Clin Pharmacol Ther.* doi: 10.1038/clpt.2011.336. [Epub ahead of print]
- Schröder, A., Wollnik, J., Wrzodek, C., Dräger, A., Bonin, M., Burk, O., Thomas, M., Thasler, W.E., Zanger, U.M., Zell, A. (2011) Inferring statin-induced gene regulatory relationships in primary human hepatocytes. *Bioinformatics* 27, 2473–2477.
- Zanger, U.M., Turpeinen, M., Klein, K., Schwab, M. (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392, 1093–1108.

---

### Kontakt:

**Prof. Dr. Ulrich M. Zanger**

Stellv. Institutsleiter und Leiter des Bereichs Molekular- und Zellbiologie

Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie  
Stuttgart

uli.zanger@ikp-stuttgart.de

[www.ikp-stuttgart.de](http://www.ikp-stuttgart.de)

# die biologie hinter den daten sehen

## Analyse und Interpretation von Next Generation Sequencing Daten Firmenportrait Genomatix Software GmbH

von Korbinian Grote

„Revolution“, „Paradigmenwechsel“, „Durchbruch“... Es gibt viele Möglichkeiten, den technologischen Umbruch, den wir in der Molekularbiologie gerade erleben, zu beschreiben. Tatsache ist, dass sich durch die innerhalb der letzten vier Jahre etablierten „Next Generation Sequencing“-Methoden schneller und besser Einblicke in die molekularen Prozesse eines Organismus gewinnen lassen, als das irgendjemand zum Jahrtausendwechsel für möglich gehalten hätte. Heute kann man Genome und Transkriptomene einzelner Individuen innerhalb weniger Tage – in naher Zukunft innerhalb weniger Stunden – entschlüsseln, in großem Maßstab die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA erfassen oder Einblicke in die individuellen Modifikationen des Genoms durch Methylierung oder andere epigenetische Veränderungen finden. Soweit die Theorie.

In der Praxis ergeben sich durch die anfallenden enormen Datenmengen eine Reihe von Herausforderungen, nicht nur im Bereich der Speicherung und Handhabung, sondern insbesondere bei der Analyse und Interpretation. Die von den Sequenzierern gelieferten Rohdaten („reads“) müssen zunächst auf Referenzgenomen oder -transkriptomen verortet werden, anschließend müssen die gefundenen Positionen in Bezug zu bereits bekannten funktionellen Einheiten (Gene, Transkripte, Promotoren, etc.) gesetzt werden. Erst dann können über die Assoziation mit genregulatorischen Netzwerken, Funktionen, Prozessen und Krankheiten, bekanntes Wissen verifiziert oder neue Hypothesen generiert werden. Der große Vorteil der neuen Sequenzertechnologien ist, dass sie gleichzeitig Beobachtungen sowohl im großen Maßstab (z.B. die Analyse aller Gene eines Organismus) als auch im Detail (z.B. die Identifikation der Fusion zweier Transkripte) ermöglichen. Mit zunehmendem Einzug in klinische Applikationen treten zudem Standardisierungs- und Zertifizierungsaspekte in den Vordergrund, die adressiert werden müssen.

Die Genomatix Software GmbH aus München bietet integrierte Lösungen und Dienstleistungen an, mit denen sich alle diese Möglichkeiten ausschöpfen lassen. Die ganze Analysestrecke, vom Positionieren der reads auf eine Referenz über die Identifikation „interessanter“ Regionen oder Gene bis zur Visualisierung, lässt sich dabei mit Hilfe intuitiv zu bedienender Benutzeroberflächen abarbeiten. Dies ermöglicht schnelle und unkomplizierte Datenanalysen und die anschließende Interpretation im Kontext mit umfangreichen Annotationsdaten wie Netzwerken, Funktionen oder Krankheiten – eben im Lichte der Systembiologie. Forscher können sich so auf die interessanten biologischen Aspekte ihres Experiments konzentrieren, ohne sich mit technischen Problemen wie Datentransfer oder -konvertierung auseinandersetzen zu müssen. Darüberhinaus lassen sich die Ergebnisse verschiedener Experimente miteinander verknüpfen. So können z.B. Daten, die von verschiedenen Patienten stammen, zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben wurden oder durch unterschiedliche Beeinflussung des untersuchten Organismus generiert wurden, miteinander verglichen werden. Für systembiologische Fragestellungen ist insbesondere die Möglichkeit interessant, verschiedene Experimenttypen zu kombinieren: Mit der RNA-Seq-Methode gewonnene Expressionsdaten, die alle RNA-Transkripte der Zellen erfasst, lassen sich z.B. mit ChIP-Seq-Daten, die die Bindestellen von Transkriptionsfaktoren bestimmen, überlagern und so target-Gene identifiziert oder Abläufe in genregulatorischen Netzwerken veranschaulicht werden. Auch Methylierungsdaten und Histonmodifikationen können für die Untersuchung epigenetischer Fragestellungen mit einbezogen werden. Der hohe Integrationsgrad ist dabei nicht nur aus Anwendersicht ein Vorteil, sondern auch wesentliche Grundlage für Standardisierungsprozesse für klinische Applikationen.

Die Kunden von Genomatix können dabei wählen, ob sie sich für ein Komplettpaket aus Hard- und Software („Genomatix Mining Station“ und „Genomatix Genome Analyzer“) für die Installation vor Ort entscheiden, eine Cloud-Lösung mit ausgelagerter IT-Infrastruktur bevorzugen oder die Erfahrung des Genomatix-Teams im Rahmen einer Full-Service Betreuung in Anspruch nehmen.

Zur fortwährenden Weiterentwicklung der eingesetzten Technologien arbeiten bei Genomatix Bioinformatiker, Mathematiker und Biologen Hand in Hand, um möglichst schnell neue Antworten und Lösungen für die sich ändernden Anforderungen der Kunden liefern zu können. Die dabei gewonnene Expertise setzt die Firma als aktiver Partner auch in verschiedenen nationalen und internationalen Forschungsprojekten ein. Im SYNERGY-Teilprojekt der ERASysBio+-Initiative werden z.B. Abläufe der Genregulation untersucht, bei denen der Östrogen-Rezeptor involviert ist. Im BLUEPRINT-Projekt der EU sollen zunächst in großem Maßstab epigenetische Hintergrunddaten erzeugt werden. Anhand der Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Individuen lassen sich dann Bluterkrankungen wie Leukämie oder Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ 1 untersuchen, um epigenetische Marker zu finden, die zu besseren Diagnosen und individuelleren Behandlungen führen sollen.

Die innovativen Visualisierungen der Software von Genomatix wurden 2011 mit dem „iDEA Challenge Award – most creative visualization“ der Firma Illumina ausgezeichnet, der Genomatix Genome Analyzer mit dem Industriepreis 2012 in der Kategorie „Biotechnologie“ ([www.industriepreis.de](http://www.industriepreis.de)). Das ist Bestätigung und Ansporn zugleich. Denn es gibt noch viele Ideen, wie man die stetig zunehmende Datenflut in der Biologie so analysieren und interpretieren kann, dass aus den Daten letztendlich biologisches und biomedizinisches Wissen entsteht.

---

### Steckbrief Genomatix Software GmbH:

Die Genomatix Software GmbH ist 1997 als Ausgründung aus der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (heute Helmholtz Zentrum München – Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt) entstanden.



Mitglieder des Genomatix-Teams bei der Verleihung des INDUSTRIE-  
PREISES auf der Hannover Messe im April 2012.

V.l.n.r.: Klaus May, Martin Seifert, Korbinian Grote und Matthias Scherf

(Bild: Huber Verlag für Neue Medien GmbH).

Genomatix ist ein weltweit führender Anbieter von Analysetechnologien zur Auswertung und Interpretation genomischer Daten. Unsere Hard- und Softwarelösungen helfen bei der Analyse von Next Generation Sequencing Daten, Microarray-Experimenten und Fragestellungen aus der Systembiologie. Dafür nutzen wir die Methode der integrierten Meta-Analyse nach dem Multilayer-Prinzip: Statt einzelne Informationen isoliert zu betrachten, greifen wir auf eine außergewöhnlich große Datenmenge zurück, die aus zahlreichen Quellen stammt und ständig weiter wächst. Diese Meta-Analyse führt zu relevanteren Ergebnissen, differenzierten wissenschaftlichen Expertisen und besseren Chancen, molekulare Zusammenhänge in der Genregulation und -expression sichtbar zu machen. Wir vereinen Sequenz- und Promotoranalysen, proprietäre Genomannotation, vergleichende Genomik, Literatur-, Pathway- und Netzwerkdaten, Expressionsprofile und NGS-Daten in Anwendungen und Pipelines. Gegründet und bis heute geführt von einem engagierten Forscherteam, arbeiten wir eng vernetzt mit allen relevanten Marktteilnehmern zusammen.

Unser Ziel ist es, wissenschaftliches Know-how ständig weiter zu verfeinern und für Innovationen in der molekularbiologischen und biomedizinischen Forschung nutzbar zu machen.

---

### Referenzen:

DeRosa, C. A., Furusato, B., Shaheduzzaman, S., Srikantan, V., Wang, Z., Chen, Y., Seifert, M., Ravindranath, L., Young, D., Nau, M., *et al.* (2011). Elevated osteonectin/SPARC expression in primary prostate cancer predicts metastatic progression. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 1-7.

---

### Weiterführende Literatur::

Grote K, Werner T (2011). Multidimensional Context of Sequence Tags: Biological Data Integration. In Tag-based Next Generation Sequencing, Matthias Harbers, Guenter Kahl ed. Wiley VCH, (ISBN: 3-527-32819-X), pp. 407-15

Mah, N., Wang, Y., Liao, M.-C., Prigione, A., Jozefczuk, J., Lichtner, B., Wolfrum, K., Haltmeier, M., Flöttmann, M., Schaefer, M., *et al.* (2011). Molecular Insights into Reprogramming-Initiation Events Mediated by the OSKM Gene Regulatory Network. *PLoS ONE* 6, 17.

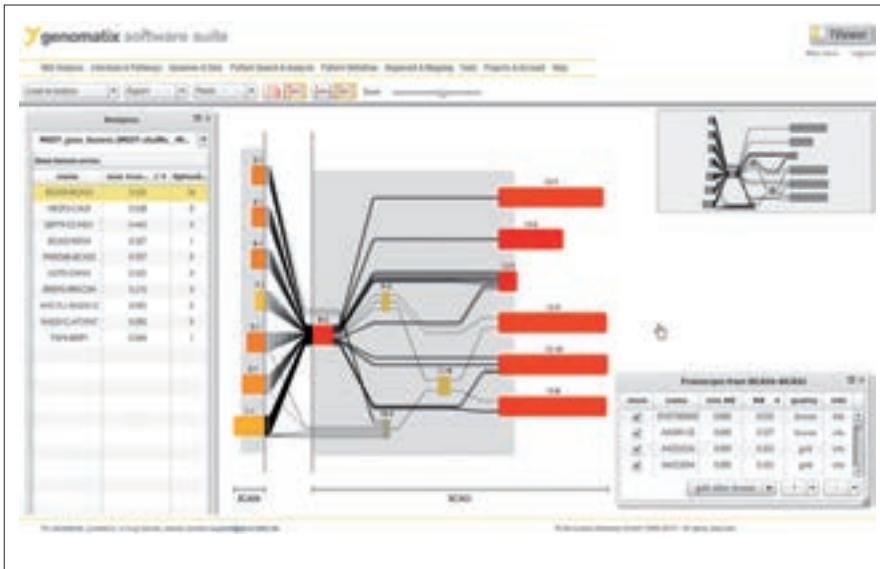
---

### Kontakt:

**Dr. Korbinian Grote**  
Genomatix Software GmbH  
München  
[grote@genomatix.de](mailto:grote@genomatix.de)

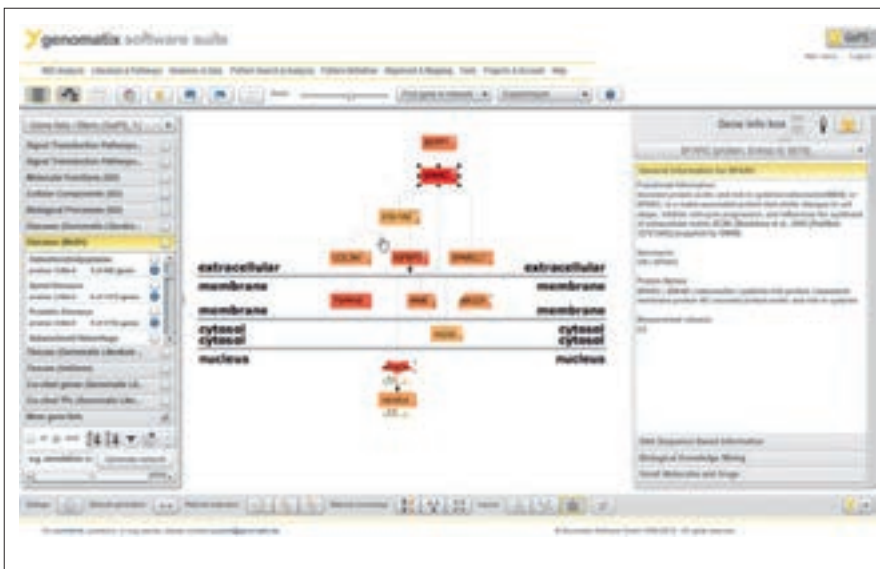
[www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)

## Visualisierung biologischer Daten auf dem Genomatix Genome Analyzer



### Visualisierung von Varianten bei der Genexpression

Im Transcriptome Viewer können Benutzer die Expression alternativer Transkripte eines Gens visualisieren. Auch Genfusionen, d.h. Zusammenschlüsse mehrerer Gene, die insbesondere bei Krebserkrankungen eine Rolle spielen können, lassen sich genauer untersuchen. Dargestellt ist eine Genfusion aus zwei Brustkrebs-assoziierten Genen (BCAS4 und BCAS3), die in MCF7-Zellen (einer Brustkrebszelllinie) gefunden wurde (Bild: Genomatix).



### Darstellung von genregulatorischen Netzwerken ermöglicht neue Einsichten

In diesem Screenshot aus dem Genomatix Pathway System (GePS) sieht man ein genregulatorisches Netzwerk aus 12 Genen, die in bestimmten Prostata-Tumoren aktiv sind. Das SPARC Gen kann als Indikator für ein erhöhtes Metastasierungs-Risiko dienen (DeRosa *et al.*, 2011). Wissenschaftler können sich mit GePS schnell einen Überblick über das Zusammenspiel von Genen und Wirkstoffen verschaffen und herausfinden, mit welchen Geweben, Funktionen oder Krankheiten eine Verknüpfung besteht. Eigene experimentelle Daten können dabei mit bestehendem Wissen überlagert werden und erlauben so die schnelle Interpretation systembiologischer Zusammenhänge (Bild: Genomatix).



### Der Genome Browser ermöglicht Einblicke in Veränderungen des Genoms durch Integration von verschiedenen Datenebenen

Die Visualisierung der mit Hilfe der NGS-Technologien erzeugten Daten steht heute im Mittelpunkt vieler Analysen. Im Genomatix Genome Browser lassen sich verschiedenste experimentelle Daten in ihrem genomischen Kontext abbilden. Forscher können die Darstellung ihren Wünschen entsprechend anpassen, Daten überlagern, für Detailansichten hinein- oder für den Überblick herauszoomen. Dargestellt ist das FOX Gen zusammen mit aus dem SYNERGY Projekt Daten für 2 verschiedene Zeitpunkte. Die Unterschiede bei Genexpression (blau), Methylierung (grün), Polymerase-II Bindung (schwarz) und den Histonmodifikationen (grau und rot) lassen Rückschlüsse auf eine geänderte Genexpression zu (Bild: Genomatix).

# HITS: daten über alles

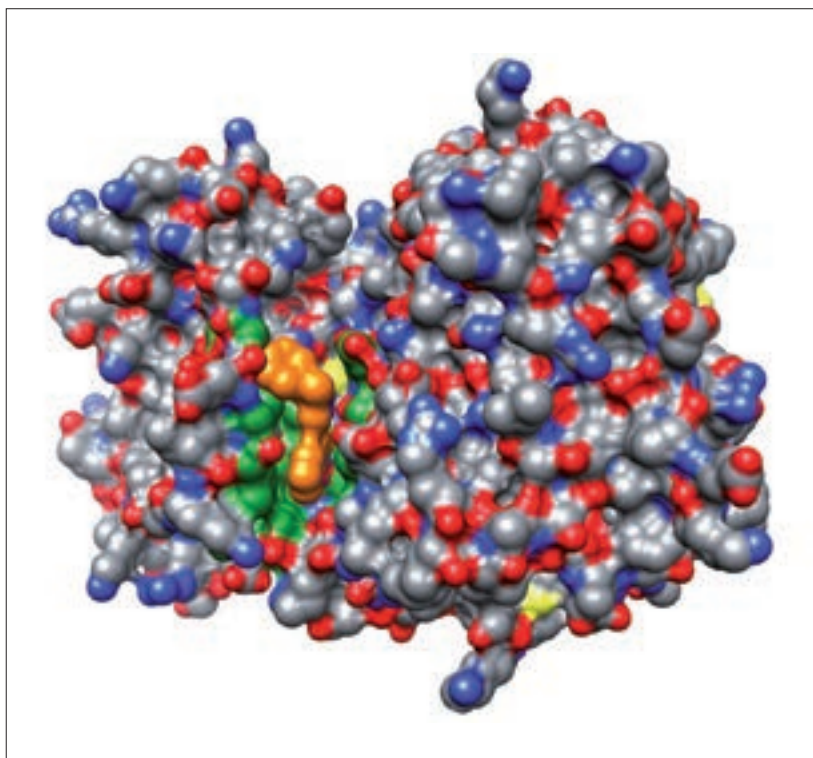
## Das Heidelberger Institut für Theoretische Studien

von Peter Saueressig

Auf den ersten Blick scheinen theoretische Biochemie und theoretische Astrophysik überhaupt nicht zusammenzupassen. Man muss schon genauer hinschauen: In beiden Feldern produzieren die Forscher große Datenmengen und werten sie aus. Sie verwenden ähnliche Methoden, erstellen mathematische Modelle und Computersimulationen. Und sie greifen auf die gleichen Hochleistungsrechner zu. Angesichts der exponentiell wachsenden Datenmenge in der Wissenschaft gilt das für eine Reihe von Fachbereichen. Von diesen Gedanken geleitet rief der Stifter und Wissenschaftsmäzen Klaus Tschira im Jahr 2010 das Heidelberger Institut für Theoretische Studien (HITS) ins Leben.

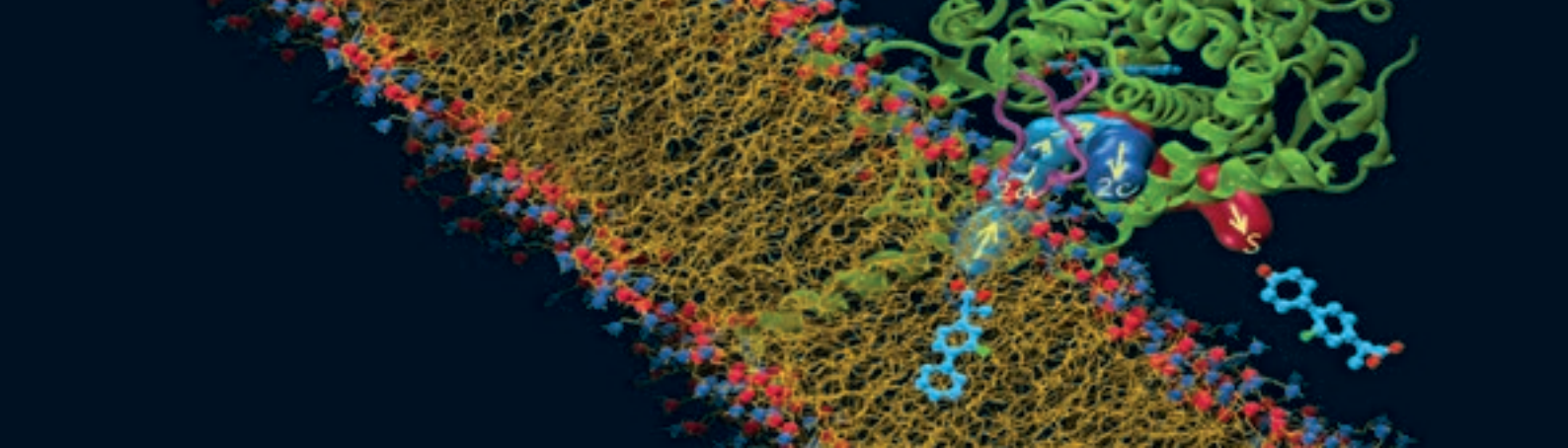
Am HITS forschen Biologen Seite an Seite mit Informatikern, Computerlinguisten, Chemikern und Physikern. Klaus Tschira erwartet „dass sich in diesem Bereich viele algorithmische Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Wissenschaftsbereichen ergeben werden.“ Als gemeinnütziges Forschungsinstitut der Klaus Tschira Stiftung betreibt das HITS Grundlagenforschung mit dem Schwerpunkt auf Theorie- und Modellbildung. Dabei spielen rechnergestützte Simulationen und Datenerschließung eine große Rolle. Sie ziehen sich wie ein roter Faden durch die Arbeit der sechs Forschergruppen. Auf dem HITS-Campus am Schloss-Wolfsbrunnenweg arbeiten aktuell rund 100 Wissenschaftler aus 15 Ländern. Viele davon forschen in der Systembiologie, denn die Lebenswissenschaften bilden einen Schwerpunkt der HITS-Forschung.

Abbildung 1: Protein mit transientser Bindungstasche



Die Software TRAPP (TRAnsient Pockets in Proteins) ermittelt mögliche Variationen der räumlichen und chemischen Eigenschaften der Bindungstasche, die durch Konformationsänderungen im Protein entstehen. So können neue Bindungstaschen identifiziert werden, die für potentielle Wirkstoffmoleküle geeignet sind. Das Verfahren läuft in zwei Stufen: große Konformationsänderungen im Protein werden durch rechnerische Verfahren simuliert. Dann werden die meisten konservierten und transienten Regionen der Bindungstasche durch eine Analyse der Dynamik des Proteinhohlraums identifiziert, und die Ähnlichkeit zwischen Bindungstaschen der verschiedenen Proteinkonformationen wird ermittelt (Bild: HITS).





**Abbildung 2: Ein Modell des vollständigen membrangebundenen Cytochrom P450 2C9** Das Enzym ist unerlässlich für den Medikamentenmetabolismus in der menschlichen Leber. Forscher aus der Gruppe von Rebecca Wade erstellten das Modell mit einem Ansatz, der grobkörnige Simulationen mit Simulation in atomarer Auflösung kombiniert (Cojocaru *et al.*, 2011) (Bild: Vlad Cojocaru).

Das HITS unterhält enge Kontakte zu den Heidelberger Großforschungseinrichtungen DKFZ und EMBL und zur Universität Heidelberg. Seit einigen Jahren existiert ein Rahmenabkommen zwischen HITS und Universität. Es umfasst unter anderem auch gemeinsame Berufungen. So lehren der Astrophysiker Volker Springel, der Computerlinguist Michael Strube und der Informatiker und HITS-Geschäftsführer Andreas Reuter als Professoren an der Ruperto Carola. Im Januar 2012 erhielt die Biophysikerin Rebecca Wade die Professur „Computational Structural Biology“ an der Fakultät für Biowissenschaft.

Rebecca Wade ist mit ihrer Forschungsgruppe Molecular and Cellular Modeling (MCM) an dem vom BMBF finanzierten BioRN Spitzencluster „Zellbasierte & Molekulare Medizin in der Metropolregion Rhein-Neckar“ beteiligt. Zusammen mit dem Industriepartner Merck entwickelt sie eine neuartige Methode, Bindungstaschen an Molekülen zu identifizieren, die nur temporär auftreten. Damit schaffen die HITS-Forscher neue Ansätze für die Medikamentenentwicklung (Abb. 1).

### Computational Biology: Wissen, was in der Zelle steckt

Die MCM-Gruppe beschäftigt sich mit der Interaktion von Biomolekülen. Es geht dabei um Fragen wie: Wie finden Moleküle ihre Bindungspartner? Was bestimmt beim Zusammenspiel von Medikament und Rezeptor die spezifische und selektive Wirkung? Wie können sich Proteine in einem Komplex ansammeln, und welche Form kann dieser Komplex annehmen? Biomolekulare Erkennung ist ein anspruchsvolles Problem, das modernste rechnergestützte Methoden aus den verschiedenen Fachgebieten erfordert. Die MCM-Forscher verwenden Techniken, die ein breites Spektrum abdecken – von interaktiven, webbasierten Visualisierungs-Tools bis zu atomgenauen Molekularsimulationen.

Ihre Expertise bringen sie zum Beispiel in SysMO-LAB2 ein, einem Projekt, das eine vergleichende Biologie der Milchsäurebakterien betreibt. Es ist Teil der europäischen Initiative „Systems Biology of Microorganisms“, die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) koordiniert wird. Die MCM-Gruppe steuert hier Modelle und Analysen von Proteinstrukturen bei, um die vergleichende Modellierung und Simulation von Stoffwechselwegen zu unterstützen.

Die HITS-Forscher arbeiten auch beim nationalen „Netzwerk Systembiologie der Leber“ (Virtual Liver Network) mit, das vom BMBF initiiert wurde und finanziert wird. Sie entwickeln und wenden in einem Teilprojekt Simulationsmethoden an, die es ermöglichen, das Zusammenspiel zwischen Signalübertragungswegen und der sogenannten Endozytose zu untersuchen. Unter Endozytose versteht man einen Vorgang, bei dem sich eine Zelle kleinere Nahrungspartikel oder andere Substanzen einverleibt. Der Schwerpunkt der Simulationen liegt dabei auf der Wechselwirkung von Proteinen und Protein-Membransystemen (Abb. 2, Cojocaru *et al.*, 2011; Mereghetti *et al.* 2011).

### Wissenschaftliche Datenbanken: Kurzer Weg zu wichtigen Daten

Ebenfalls beim „Virtual Liver Network“ (VLN) ist die HITS-Forschungsgruppe Scientific Databases and Visualization (SDBV) aktiv. Unter der Leitung von PD Dr. Wolfgang Müller betreut sie zwei Teilprojekte im Datenmanagement. Die HITS-Datenbankspezialisten bauen eine Plattform auf, die Daten, Modelle und Arbeitsabläufe aus den Projekten des Forschungsverbundes verwalten soll. Alle am VLN beteiligten Wissenschaftler können auf diese Plattform zugreifen. In einem zweiten Projekt arbeitet die



Das HITS befindet sich oberhalb des Heidelberger Schlosses, in direkter Nachbarschaft zur Villa Bosch, dem Sitz der Klaus Tschira Stiftung.  
(Foto: HITS)

SDBV-Gruppe zusammen mit der MCM-Gruppe an weiterführenden Lösungen zur Speicherung, Abfrage und Analyse von kinetischen Daten. Sie steuert dabei ihr Know-how aus SABIO-RK bei, einer weltweit genutzten Datenbank mit Informationen zur Reaktionskinetik, die am HITS entwickelt wurde (Wittig *et al.*, 2012) und unter anderem vom BMBF gefördert wird. Der Ausbau von SABIO-RK ist auch Gegenstand des Teilprojekts. Wolfgang Müller ist überdies Koordinator des Arbeitspakets „Datenmanagement“, eines von insgesamt neun Arbeitspaketen des interdisziplinären Forschungsverbundes.

Die SDBV-Gruppe arbeitet auch in der „SysMO“-Initiative mit und ist dort seit einigen Jahren Partner von SysMO-DB: Dort werden gemeinsame Konzepte erstellt, um die Forschungsdaten zu sichern und zu verwalten und den Austausch von Daten und Modellen zu verbessern. Die Resultate fließen direkt in die Arbeiten des VLN ein.

Generell unterstützen die HITS-Forscher Systembiologen durch die Einrichtung und Pflege spezieller Datenbanken. Die Daten werden nicht nur gesammelt und verwaltet, sondern auch standardisiert und miteinander in Beziehung gesetzt. Die Datenbank SABIO-RK enthält aufbereitete Angaben zu Stoffwechselwegen. So genannte Biokuratoren sorgen hier dafür, dass Gleiches gleich gespeichert wird. Außerdem vereinheitlicht SABIO-RK die Bezeichnungen der entsprechenden Stoffe und Reaktionen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Standards entwickelt, die jeweils Teilbereiche der Systembiologie abdecken. Bisher wurden diese Standards aber weitgehend unabhängig voneinander erstellt, was eine Orientierung für Wissenschaftler erschwerte und eine Vereinheitlichung der Standards erforderlich machte. Das ist auch das Ziel der internationalen Initiative „Computational Modeling in Biology Network“ (COMBINE), an der das HITS beteiligt ist. Sie will kompatible Beschreibungsstandards der Systembiologie weiterentwickeln und bereits bestehende Standards aufeinander abstimmen. Das zweite COMBINE-Treffen fand letzten Herbst am HITS in Heidelberg statt.

## Molekulare Mechanismen und gigantische Galaxien

Die Wissenschaftler am HITS beschäftigen sich mit Größenordnungen von  $10^{-9}$  bis  $10^{12}$  Meter Länge, oder anders ausgedrückt: Von Nanometern bis Lichtjahren. So will die Molecular Biomechanics (MBM) Gruppe unter Leitung von Dr. Frauke Gräter das Zusammenspiel von mechanischer Kraft und biochemischen Prozessen untersuchen. Die Biomechaniker wollen herausfinden, wie Proteine – die Hauptakteure in diesem Spiel – auf die mechanischen Kräfte reagieren, wie sie in gespannten Muskelzellen, Seidenfasern oder Spinnenseide vorkommen.

Durch computergestützte Simulationen ergründen die HITS-Forscher beispielsweise, wie das VWF (Von-Willebrand-Faktor)-Protein auf der atomaren Ebene funktioniert. So deckten sie erstmals einen molekularen Mechanismus bei der Blutgerinnung auf, der mit dem Scherfluss im Blut zusammenhängt (Zhou *et al.*, 2011). Frauke Gräter ist auch Mit-Koordinatorin der neuen DFG-Forschergruppe SHENC („Shear Flow Regulation of Hemostasis“), in der theoretische Forscher Schulter an Schulter mit Medizinern arbeiten. Gemeinsam verfolgen sie das Ziel, langfristig Diagnostik und Therapien von angeborenen Blutgerinnungsstörungen, akuten Thrombosen und Schlaganfällen voranzubringen.

Während die Molekularbiologen im Computer an winzigen Molekülen ziehen, lassen die HITS-Astrophysiker gleich ganze Galaxien kollidieren. Auch sie nutzen Supercomputer zur Berechnung ihrer Modelle und Simulationen, denn in ihrem Forschungsgebiet sind Versuche nicht möglich. Prof. Volker Springel untersucht mit seiner Gruppe die Entstehung von Galaxien und Sternen, um die mysteriöse „dunkle Materie“ ans Licht zu bringen. So hat er beispielsweise die „Millennium XXL“-Simulation mit 300 Milliarden Teilchen berechnet, die weltweit größte kosmologische Simulation.



Die Molecular Cellular Modeling (MCM) Group unter der Leitung von Rebecca Wade (Fünfte v.r.) (Foto: HITS)



Die Scientific Databases and Visualization (SDBV) Group unter der Leitung von Wolfgang Müller (ganz links) (Foto: HITS)

## Blumen, Bienen und Wikipedia

Wie Informatiker Biologen helfen können, zeigt sich am Beispiel der Scientific Computing Gruppe unter Leitung von Dr. Alexandros Stamatakis. Er hat das Computerprogramm RAxML (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) entwickelt. Damit kann anhand von Gendaten ein evolutionärer Stammbaum der verschiedenen Organismen berechnet werden. So gelang es den HITS-Forschern, den bisher größten Stammbaum der Pflanzen mit rund 55.000 Arten zu berechnen (Smith *et al.*, 2011).

Was für Blumen funktioniert, lässt sich auch auf Bienen anwenden: Im Forschungsprojekt „1KITE“ (1K Insect Transcriptome Evolution) arbeiten Experten aus sieben Ländern zusammen. Stamatakis ist einer der Koordinatoren des Netzwerks, das die Transkriptome von 1000 Insektenarten untersucht, um herauszufinden, wie sich diese so erfolgreich entwickeln konnten.

Last but not least ist auch die Sprache ein Forschungsgegenstand am HITS: Die HITS-Computerlinguisten wollen den Computer zu einem nützlichen Hilfsmittel beim täglichen Umgang mit Sprache und Texten machen, vor allem bei der Informationsschließung aus dem WWW und aus digitalen Bibliotheken. Deshalb entwickelte der Computerlinguist Prof. Michael Strube mit seiner Gruppe ein Verfahren zur Extraktion eines semantischen Netzwerkes aus Wikipedia.

Alle genannten Forschungsbereiche stehen gleichermaßen vor der Herausforderung, dass sie riesige Datenmengen sinnvoll und effizient bearbeiten müssen. Beim Umgang mit dieser Problematik können die verschiedenen Fächer voneinander profitieren. Die „HITS-Köpfe“ verfolgen das Ziel, langfristig Methoden und Algorithmen aus unterschiedlichen Fachbereichen zu bündeln – nicht nur in der Systembiologie.

## Referenzen:

- Cojocaru, V., Balali-Mood, K., Sansom, M. S. P., and Wade, R. C. (2011). Structure and dynamics of the membrane-bound cytochrome p450 2c9. *PLoS Comput. Biol.*, 7(8):e1002152.
- Mereghetti, P., Wade, R. C. (2011). Diffusion of hydrophobin proteins in solution and interactions with a graphite surface. *BMC Biophysics*, 4:9.
- Smith, S.A., Beaulieu, J.M., Stamatakis, A., and Donoghue, M.J. (2011). Understanding angiosperm diversification using small and large phylogenetic trees. *American Journal of Botany*, 98(3):404-414.
- Wittig, U., Kania, R., Golebiewski, M., Rey, M., Shi, L., Jong, L., Algae, E., Weidemann, A. Sauer-Danzwith, H., Mir, S., Krebs, O., Bittkowski, M., Wetsch, E., Rojas, I., and Müller, W. (2012). SABIO-RK – database for biochemical reaction kinetics. *Nucleic Acids Res*, 40(D1):D790-6.
- Zhou, M., Dong, X., Baldauf, C., Chen, H., Zhou, Y., Springer, T.A., Luo, X., Zhong, C., Gräter, F., and Ding, J. (2011). A novel calcium-binding site of von willebrand factor a2 domain regulates its cleavage by adamts13. *Blood.*, 117(5):4623-4631.

## Kontakt:

**Dr. Peter Saueressig**

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit

HITS gGmbH

Heidelsberger Institut für Theoretische Studien

Heidelberg

saueressig@h-its.org

[www.h-its.org](http://www.h-its.org)

# dem posttranskriptionalen regulatorischen code auf der spur

## doRiNA: die BIMSB-Datenbank für posttranskriptionale Kontrollelemente

von Markus Schüler und Christoph Dieterich

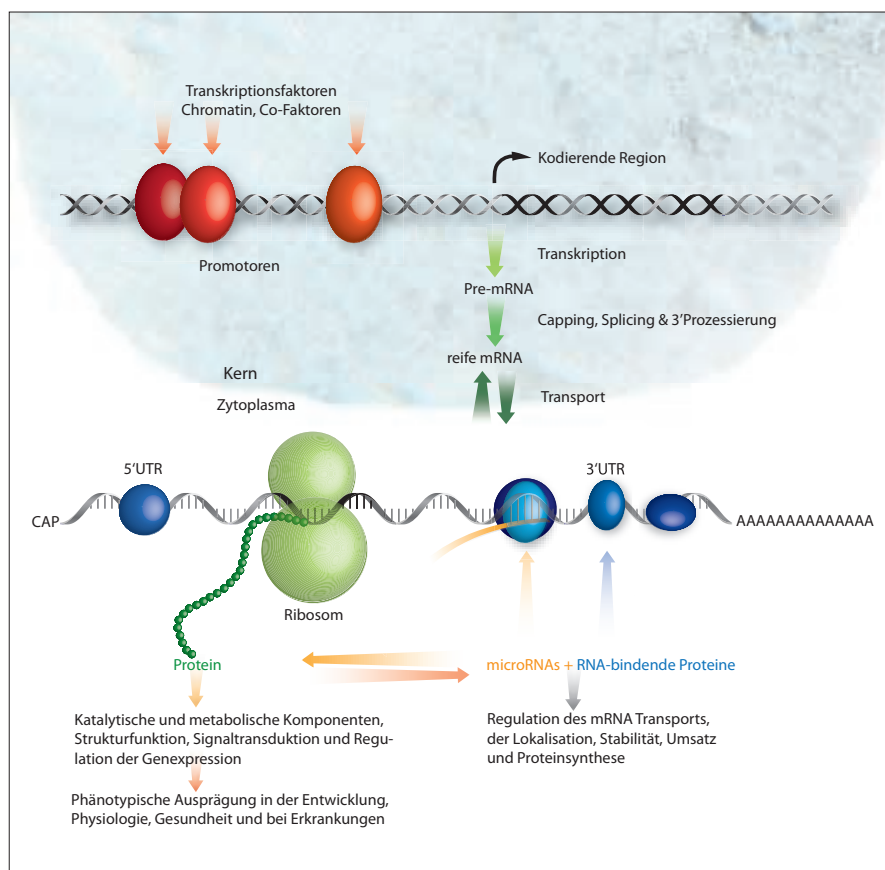
Das Genom, der Bauplan des Lebens, muss immer wieder neu ausgelesen und interpretiert werden, um unseren Organismus an die Herausforderungen einer sich wandelnden Umwelt anzupassen. Die genetische Information wird im Zellkern gespeichert und abgelesen, prozessiert und als Botenmoleküle (mRNAs) in das Cytoplasma exportiert. Dort dienen die mRNAs als Vorlage für die Synthese von Proteinen. mRNAs sind auf ihrem Weg zu den Protein-fabriken vielen Kontroll- und Verarbeitungsschritten unterworfen. Die „doRiNA“-Datenbank (Anders *et al.*,

2012) des Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB) ermöglicht nun erstmals eine umfassende Untersuchung dieser Vorgänge, die unter dem Namen „Posttranskriptionale Genregulation“ zusammengefasst werden.

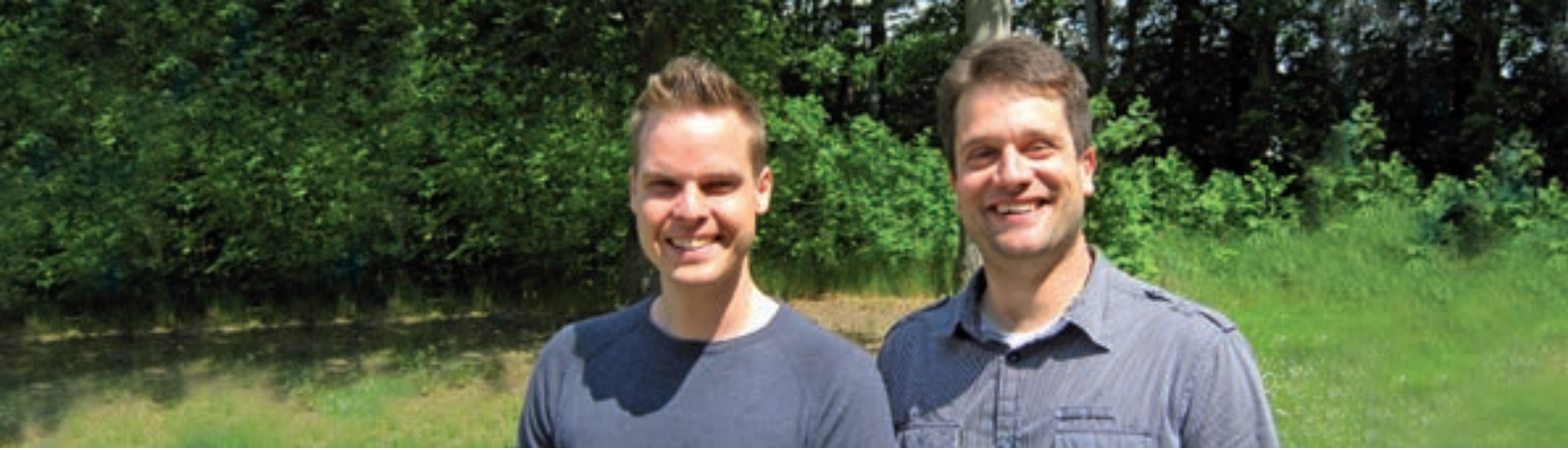
### Posttranskriptionale Genregulation: Ein Code aus Buchstaben, Molekülen und Interaktionen

Die Aktivität unserer Gene wird an spezifischen Stellen gesteuert und kontrolliert. Getreu dem zentralen Dogma der Molekularbiologie werden Gene kontextabhängig ausgelesen

Abbildung 1: Lebenslauf einer mRNA



Nach Transkription der genetischen Information in RNA durchläuft diese mehrere Modifizierungsschritte zur finalen mRNA. Diese wird wiederum von Ribosomen in Proteine translatiert. All diese Schritte werden durch das Zusammenspiel von RNA-bindenden Proteinen und microRNAs reguliert (© BIMSB/MDC).



Markus Schüler (links) und Christoph Dieterich (rechts) aus der BIMSB Bioinformatics/Mathematical Modelling-Gruppe am MDC Berlin (Foto: Martin Siegert)

(Transkription), d. h. von der DNA- auf die RNA-Ebene überführt. Diese RNA-Abschriften werden prozessiert und nach einem „Reifungsprozess“ als mRNA aus dem Zellkern exportiert. Die diverse Population von mRNA-Molekülen kann nun in den Proteinfabriken der Zelle, den Ribosomen, in Proteine überführt werden (Translation), die dann wiederum beispielsweise als Enzyme stoffwechselrelevante Funktionen wahrnehmen. Das Forschungsfeld der posttranskriptionalen Genregulation untersucht all jene Regulationsschritte, die zwischen der Transkription des Gens und der Translation der mRNA in ein Protein stattfinden. Praktisch alle Vielzeller im Tier- und Pflanzenreich verfügen über umfangreiche Kontrollmechanismen auf posttranskriptionaler Ebene. Diese steuern die Verfügbarkeit von mRNA für die Translation im Raum (also die Lokalisierung der mRNA in der Zelle), als auch in der Zeit (also wann eine mRNA in ein Protein übersetzt wird). Einen Gesamtüberblick über den Lebenslauf einer mRNA gibt die Abbildung 1. Die Lebensdauer, der Transport sowie die Bevorratung und Translation von mRNAs wird durch ihre Wechselwirkung mit RNA-bindenden Proteinen (RBPs) und anderen RNAs bestimmt. Zu diesen RNAs gehören vor allem die microRNAs, kleine nicht kodierende RNAs mit einer Länge von durchschnittlich 22 Nukleotiden, die eine entscheidende Rolle bei der posttranskriptionalen Genregulation spielen, indem sie zum Abbau bestimmter mRNAs oder der Unterbindung der Translation führen.

Als RBPs werden all jene Proteine bezeichnet, die RNA binden können. Diese Bindung kann ursächlich zu einer Reaktion des Proteins mit der RNA führen oder aber Teil einer zuvor beschriebenen Kontrollfunktion sein. Vielfach untersuchte Beispiele sind die Interaktion zwischen microRNAs und Argonautenproteinen, evolutionär stark konservierte Proteine, die eine wichtige Rolle in der Prozessierung von mRNAs spielen. Die Kombination aus Argonautproteinen, microRNAs und gegebenenfalls weiterer Kofaktoren bindet spezifisch an vorhandenen

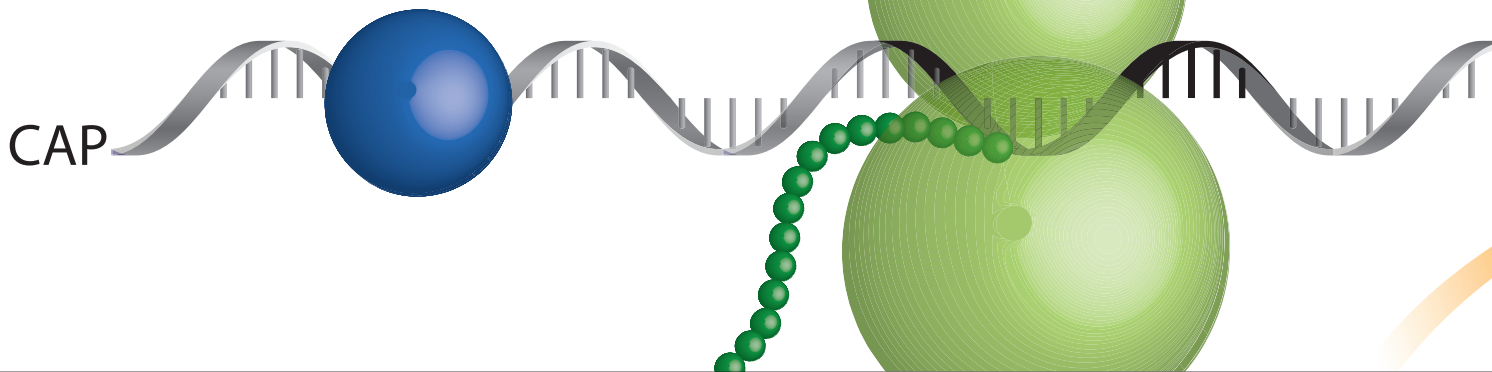
mRNAs und führt zu deren Abbau oder zu einer Unterbindung der Translation (Bartel, 2009). Viele Wissenschaftler gehen heute von einem generellen Zusammenspiel der Bindung von RBPs und microRNAs aus, um die richtige Menge Protein zur richtigen Zeit und am richtigen Ort zu synthetisieren. Dieses Zusammenspiel, oft auch als der „posttranskriptionale regulatorische Code“ (Keene 2007) bezeichnet, steht im Fokus der Forschung vieler Arbeitsgruppen weltweit.

Die Arbeitsgruppe Dieterich am Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB) hat nun vor kurzem in Kooperation mit den Arbeitsgruppen Landthaler und Rajewsky eine umfassende Webapplikations- und Datenbanklösung präsentiert, die die Ergebnisse aus diesen Forschungsanstrengungen bündelt und so einen umfassenderen Blick bei der Suche nach dem regulatorischen Code ermöglicht: Die „database of RNA interactions in post-transcriptional regulation“, kurz doRiNA (<http://dorina.mdc-berlin.de>). Die doRiNA-Datenbank führt Informationen über spezifische miRNA- und RBP-Bindungsstellen aus verschiedenen experimentellen und computergestützten Ansätzen zusammen. Momentan stehen Daten aus der Zellkultur (Maus und Mensch) sowie Modellorganismen wie dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) zur Verfügung. Weitere Organismen und Datensätze werden folgen. Über die Zeit entsteht so eine immer dichter werdende Karte des posttranskriptionalen Netzwerks.

### doRiNA, die BIMSB-Datenbank für posttranskriptionale regulatorische Elemente

Das Ziel bei der Entwicklung von doRiNA war größtmögliche Flexibilität bei komfortabler Benutzbarkeit und gleichzeitig hoher Geschwindigkeit. Zu diesem Zweck wurde doRiNA aus zwei Komponenten aufgebaut, die eng miteinander verknüpft sind.

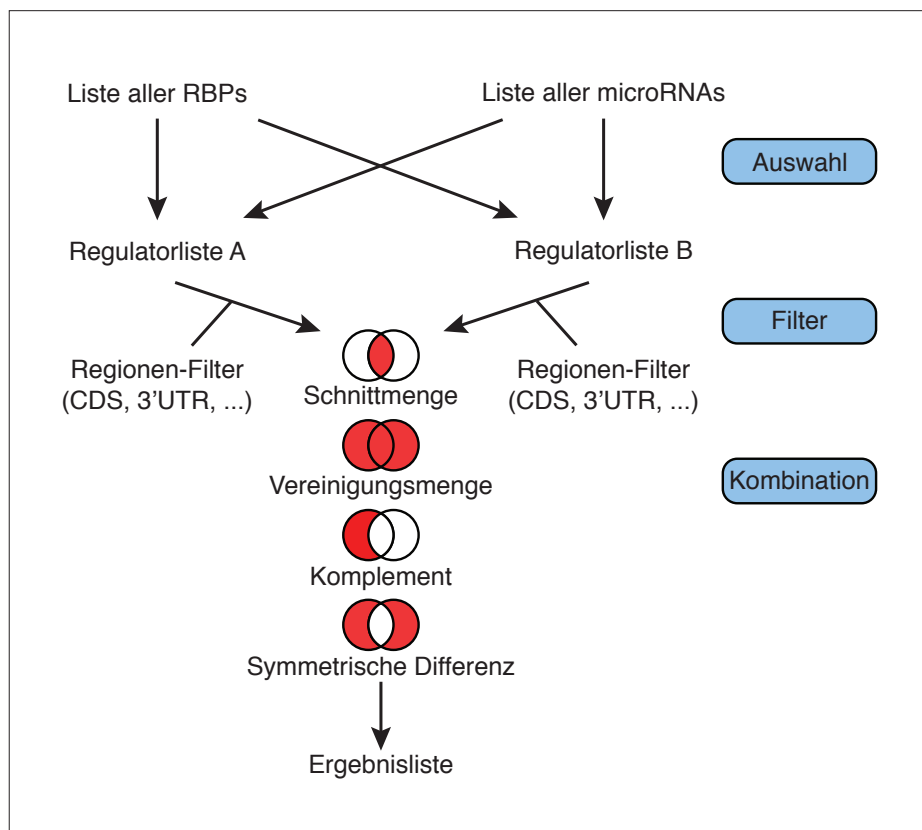
Auf der einen Seite steht die Webapplikation, also der Teil, den man im Browser sehen kann. Dieser ermöglicht es dem



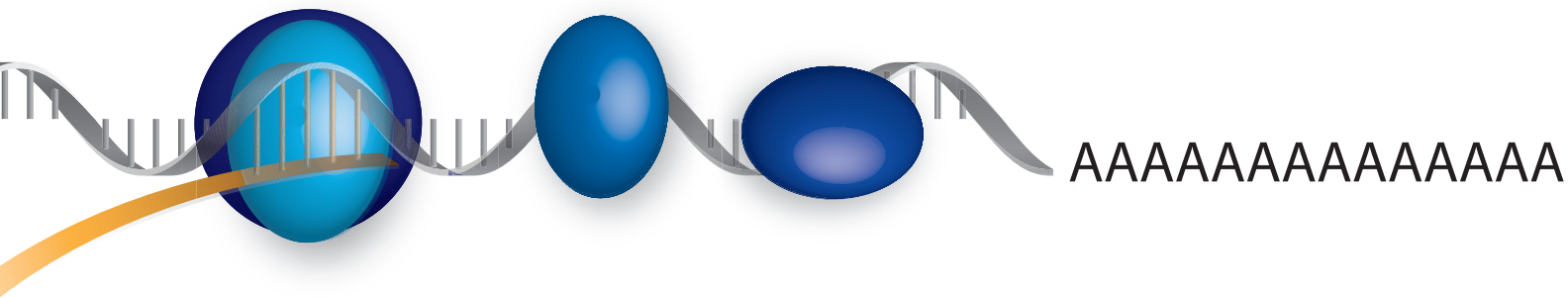
Benutzer, seine Suche auf jenen Teil des regulatorischen Netzwerkes einzuschränken, der ihn interessiert. Hierzu gibt es die Möglichkeit, Anfragen aus der Perspektive der mRNA zu stellen („Welche microRNAs/RBPs binden an eine spezifische mRNA?“) sowie aus der Sicht der Regulatoren („Welche mRNAs werden von einer bestimmten microRNA oder einem bestimmten RBP reguliert?“). Um dies so einfach wie möglich zu gestalten und trotzdem auch komplexere Abfragen zu ermöglichen, wurde die Oberfläche in einen vereinfachten „Simple search“-Bereich mit eingeschränkter Wahlmöglichkeit sowie einen erweiterten „Combinatorial search“-Bereich mit vollständiger Funktionalität unterteilt. Ersterer nimmt dem Benutzer die meisten Entschei-

dungen ab und erlaubt damit einen unkomplizierten Einstieg in die Analyse, während die komplexe Suche weitere Möglichkeiten bietet, den Suchraum noch genauer zu bestimmen. Hierzu gehört die Beschränkung auf Bindungsstellen in spezifischen Bereichen der mRNA (z. B. die kodierende Sequenz, Introns, 3'UTRs und 5'UTRs) sowie die Verknüpfung zweier unabhängiger Suchanfragen mittels verschiedener Mengenoperationen. Abbildung 2 zeigt eine Veranschaulichung der vielfachen Anfragemöglichkeiten, die mit der komplexen Suche möglich sind. Die Formulierung einzelner Anfragen wird zusätzlich unterstützt durch fortgeschrittene Web2.0-Merkmale wie der automatische Vervollständigung bei der Eingabe, der Prüfung der korrekten Schreibwei-

Abbildung 2: Diagramm der Einstellungsmöglichkeiten der komplexen Suche



Ausgehend von der kompletten Liste an RBPs und microRNAs definiert der Benutzer zwei Submengen von Regulatoren. Diese können durch zusätzliches Filtern auf Bindungsstellen in bestimmten Bereichen der mRNA reduziert werden. Als letzten Schritt werden die beiden Mengen mittels vom Benutzer gewählter Mengenoperation miteinander verrechnet und das Ergebnis ausgegeben (Bild: Aus Anders *et al.*, 2012, Nucleic Acids Res., Oxford University Press).



se, der eingabespezifischen Aktivierung von Schaltflächen sowie einer umfangreichen Hilfefunktion. Nur Anfragen, die als korrekt erkannt worden sind, werden schließlich auch ausgeführt.

Die zweite an die Webapplikation angekoppelte Komponente von doRiNA ist die zugrundeliegende Datenbank und der Webserver. Geschwindigkeit wird hier vor allem durch die Integration schneller Computersysteme erreicht, jedoch auch durch ein speziell auf die Daten zugeschnittenes Abfragesystem, welches einen optimierten Zugriff auf die Daten erlaubt, um auch lange Ergebnislisten und komplexe Anfragen schnell bearbeiten zu können. Die Ausgabe, die für den Benutzer generiert wird, ist schließlich eine Liste der gebundenen mRNAs bzw. der Regulatoren einer oder mehrerer mRNAs. Diese Listen beinhalten eine Vielzahl von Informationen, wie den Namen der zu den mRNAs zugehörigen Genen, deren Regulatoren, die genaue Positionen der Bindungsstellen, usw. Der Benutzer kann die Tabelle nach all diesen Kriterien sortieren, um so die für ihn wichtigen Ergebnisse sofort angezeigt zu bekommen. Zur weiteren Analyse der Ergebnisse ist doRiNA vollständig mit einer lokalen Kopie des UCSC-Genome-Browsers (<http://genome.ucsc.edu>) verknüpft. Der UCSC-Genome-Browser ermöglicht eine hochauflösende Darstellung einzelner Bindungsstellen und ihres genomischen Kontexts (Abb. 3). Der UCSC-Genome-Browser ist unter Biologen auf der ganzen Welt aufgrund seiner einfachen Bedienbarkeit hoch geschätzt.

Der Vorteil, der durch die Vernetzung doRiNAs mit dem UCSC-Genome-Browser erreicht wird, ist vor allem, dass Biologen sich nicht an ein neues System gewöhnen müssen, was die Akzeptanz erhöht. Gleichzeitig können die Daten zur posttranskriptionalen Regulation aus doRiNA in einen größeren Kontext gestellt werden, da der UCSC-Genome-Browser bereits viele öffentlich zugängliche Datensätze enthält (z. B. Einzelnukleotid-Polymorphismen oder SNPs, Bindemotive, Expressionsdaten usw.). Für Benutzer, die ihre Ergebnisse darüber hinaus selbstständig weitergehend analysieren wollen, besteht zudem die Möglichkeit, diese als Tabellen auf den eigenen Rechner zu laden.

### Keine Datenbank ohne Daten

Eine wichtige Frage, die bisher noch nicht angesprochen wurde, ist die nach dem Ursprung der in doRiNA integrierten Bindungsstellen. Hierbei muss zwischen RBP- und microRNA- Bindungsstellen unterschieden werden.

Die in doRiNA integrierten RBP-Bindungsstellen basieren alle auf „Cross-Linking-Immunopräzipitations“- oder kurz „CLIP“-Experimenten. Bei dieser Technik wird das RNA-bindende Protein chemisch an die mRNA gebunden. Danach werden die gebundenen mRNA-Fragmente in cDNA überführt und sequenziert. Über den Sequenzierungsschritt können die Bindungsstellen von RBPs kartiert werden. Eine neue Variante von CLIP-Experimenten, die sog. „Photoaktivierbaren Ribonukleosid-verbesserten CLIPs“ (PAR-CLIPs, Hafner *et al.*, 2010), ermöglichen dabei eine noch genauere Bestimmung von einzelnen Bindungsstellen. Dies wird durch den Einsatz von „photoaktivierbarer Ribonukleoside“ erreicht. Diese werden in die mRNA integriert und führen dort zu charakteristischen Mutationen bei der Sequenzierung. Die Einlagerung des Moleküls „4-Thiouridin“ führt überall dort zum Austausch von T- zu C-Basen, wo das untersuchte RBP bindet. Durch diese charakteristische Mutation kann die Sequenz einer Bindungsstelle leicht von Sequenzen anderen Ursprungs unterschieden werden. Die zurzeit in doRiNA integrierten Datensätze basieren vor allem auf am BIMSMB generierten PAR-CLIP Experimente. Publierte Datensätze werden sukzessive eingepflegt.

Im Gegensatz zu RBPs gibt es für microRNAs bisher noch keine effiziente *in vivo*-Methode zur experimentellen Bestimmung von Bindungsstellen. Allerdings lassen sich einige wesentliche Eigenschaften von microRNAs zur computergestützten Vorhersage von Bindungsstellen nutzen. In doRiNA wurde das von der Arbeitsgruppe Rajewsky entwickelte Programm „PicTar 2.0“ (Lall *et al.*, 2006) integriert. Das Programm nutzt beispielsweise die mRNA-Sequenzen vom Menschen und vergleicht diese mit anderen nah und weiter entfernt verwandten Organismen, um falsch-positive Vorhersagen herauszufiltern. Damit der Nutzer selber entscheiden kann, wie sehr er sich auf diesen Vergleich

verlassen möchte, stellt doRiNA die Möglichkeit bereit, die maximale evolutionäre Distanz zu wählen (Vergleiche innerhalb der Säugetiergenome, bis zum Hühnergenom oder sogar bis zu den Fischen). Das Ergebnis ist wiederum eine Liste von vorhergesagten Bindungsstellen, die der Benutzer durchsuchen oder im UCSC-Genome-Browser betrachten kann.

DoRiNA ist als Komplettlösung für die Untersuchung posttranskriptionaler Experimente im Kontext eines regulatorischen Codes gedacht. Schon jetzt fungiert doRiNA als Knotenpunkt zur Integration der Ergebnisse der verschiedenen BIMS-Arbeitsgruppen. Um die Aktualität der Daten zu gewährleisten, werden zukünftig eine Vielzahl weiterer Experimente sowohl von BIMS Forschern als auch externer Forschungsgruppen in die Datenbank aufgenommen werden. Ziel ist mit den so bereitgestellten Daten sowie der Entwicklung weiterer Verbesserungen, z.B. einer direkten Visualisierung der regulatorischen Netzwerke, unser Wissen über das Zusammenspiel von RNA-bindenden Proteinen und microRNAs weiter auszubauen und die Grundlage für neue Erkenntnisse im Bereich der posttranskriptionalen Genregulation zu schaffen.

### Steckbrief Forschungsprojekt:

DoRiNA, die Datenbank für posttranskriptionale regulatorische Elemente, wird entwickelt am Berlin Institute of Medical Systems Biology (BIMS) durch die Gruppen „Bioinformatics in Quantitative Biology“ (Gruppenleiter: Christoph Dieterich) in Zusammenarbeit mit Markus Landthaler (PAR-CLIP-Experimente) und Nikolaus Rajewsky (PAR-CLIP-Analyseprogramme, PicTar). Das Projekt wird durch Zuwendungen vom MDC Systems Biology Network (MSBN) als Teil der Helmholtz-Allianz für

Systembiologie, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und dem Senat von Berlin gefördert (0315362A).

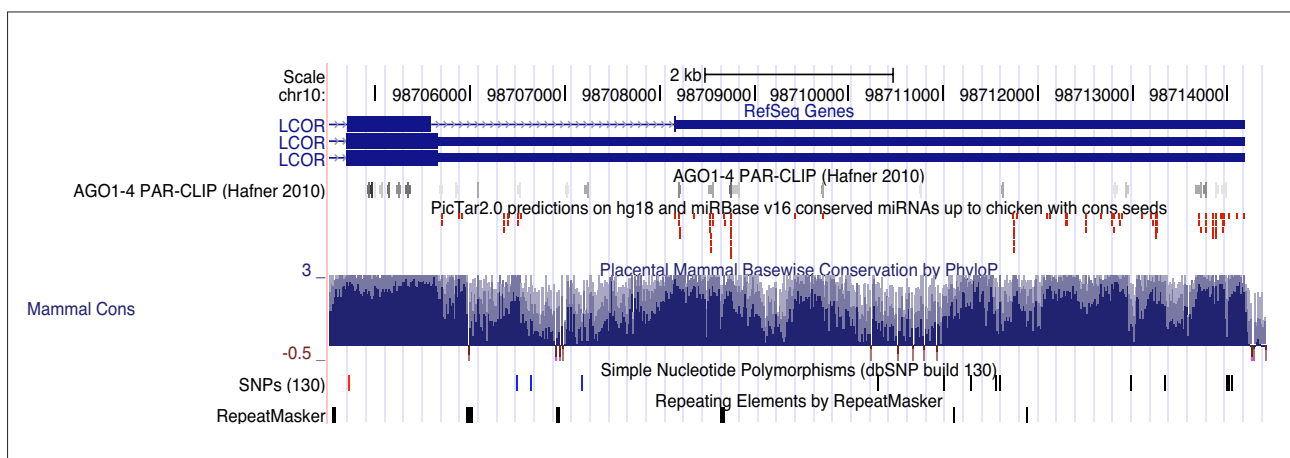
### Referenzen:

- Anders, G., Mackowiak, S.D., Jens, M., Maaskola, J., Kuntzagk, A., Rajewsky, N., Landthaler, M., Dieterich, C. (2012). doRiNA: a database of RNA interactions in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, D180-D186
- Bartel, DP. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.-C., Munschauer, M., *et al.* (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 141, 129–141.
- Keene, J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 8, 533–543.
- Lall, S., Grün, D., Krek, A., Chen, K., Wang, Y.-L., Dewey, C.N., Sood, P., Colombo, T., Bray, N., Macmenamin, P., *et al.* (2006). A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 16, 460–471.

### Kontakt:

**Dr. Markus Schöler und Dr. Christoph Dieterich**  
 Bioinformatics in Quantitative Biology / Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMS)  
 Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC)  
 Berlin-Buch  
 christoph.dieterich@mdc-berlin.de

Abbildung 3: Ausgabe einer doRiNA-Abfrage mit dem UCSC-Genome-Browser



Das Bild zeigt den 3'UTR-Bereich des Gens „LCOR“ sowie die experimentell verifizierten Bindungsstellen der Argonautenproteine 1-4 („AGO 1-4“) und bioinformatische Vorhersagen von microRNA-Bindungsstellen („PicTar2.0“). Zusätzlich sind weitere Annotationen gezeigt, wie das Auftreten von SNPs, DNA-Konservierung („Mammal Cons“) und repetitiven Regionen („RepeatMasker“) (Bild: www.genome.ucsc.edu).



# wie blut entsteht

## Modellierung von Differenzierungsdynamiken der Blutbildung auf mehreren Skalen

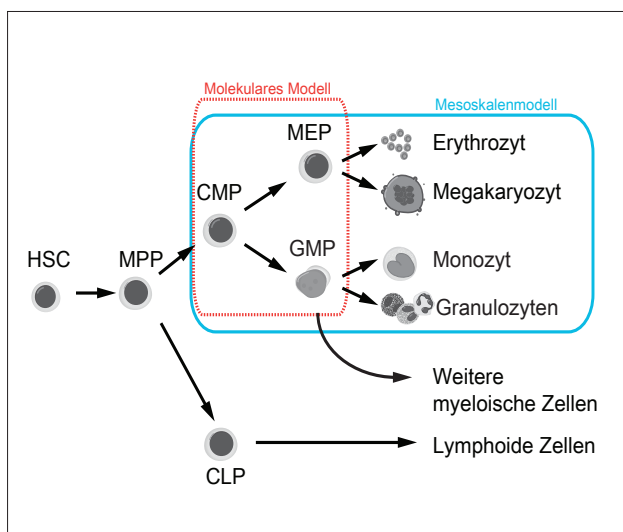
von Carsten Marr und Fabian J. Theis

In einem gesunden Erwachsenen werden täglich fast eine Billion Blutzellen produziert. Welche Prozesse ermöglichen die robuste Erneuerung des Blutes, ohne dass es zu kritischen Ungleichgewichten zwischen den mehr als 20 bekannten Blutzelltypen kommt? Die adäquate Beschreibung solcher Zellentscheidungen auf molekularer Ebene ist eine große offene Frage der Wissenschaft, deren Beantwortung stark von der räumlich-zeitlichen Skala, den möglichen Beobachtungsgrößen und natürlich den Zielen eines systembiologischen Modelles abhängt. Wir interessieren uns hier für Zelldifferenzierungsprozesse, die typischerweise Stunden bis Tagen dauern. Dazu wählen wir einen Zugang, der einerseits auf das genregulatorische Netzwerk (GRN) mehrerer Zelldifferenzierungsstufen führt, und andererseits die molekulare Dynamik einzelner Zellen während einer Linienentscheidung beschreibt.

### Die Blutbildung (Hämatopoese): Dynamik und Gleichgewicht vereint in Perfektion

Unser Blut befindet sich in einem erstaunlich stabilen dynamischen Gleichgewicht. Ständig werden alte Zellen durch neue ersetzt, wobei das Zahlenverhältnis der reifen Zellen zueinander gewahrt bleibt. Gleichzeitig ist das System flexibel, um auf Veränderungen wie große körperliche Anstrengung oder eine Infektion angemessen zu reagieren. Wie entsteht dieses stabile Gleichgewicht? Einen Erklärungsansatz bietet ein hierarchisches Entscheidungsmodell (Orkin und Zon, 2008), das Paradigma der Blutstammzellendifferenzierung (siehe Abb. 1). Schrittweise spezifiziert sich demnach eine Stammzelle über mehrere Differenzierungsschritte und Vorläuferstadien (MPP, CLP, CMP, MEP, GMP in Abb. 1) hinweg bis hin zu den reifen Zellen des Blutesystems. So kann sich eine myeloische Vorläuferzelle (CMP) in die im Knochenmark reifenden Erythrozyten, Makrophagen, Monozyten und Granulozyten ausdifferenzieren. Ist das Gleichgewicht der Entscheidungen durch veränderte Eigenschaften der Vorläuferzellen gestört, sind Erkrankungen des Blutesystems, eine Leukämie oder Anämie, die Folge.

Abbildung 1: Das hierarchische Entscheidungsmodell der Blutstammzellendifferenzierung



Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) entstehen über mehrere Vorläufer-Zellstadien (MPP: multipotent progenitor, CLP: common lymphoid progenitor, CMP: common myeloid progenitor, MEP: megakaryocytic and erythroid progenitor, GMP: granulocyte macrophage progenitor) alle reifen Zellen des Blutesystems. Je tiefer im Differenzierungsbaum sich ein Zelltyp befindet, desto eingeschränkter ist sein Potential, sich in verschiedene Zelltypen auszuprägen. Die Zellen der myeloischen Linie (Erythrozyten, Makrophagen, Monozyten und Granulozyten) werden im Knochenmark gebildet und haben eine gemeinsame Vorläuferzelle (CMP). Wir betrachten verschiedene Aspekte der Differenzierung auf zwei Beschreibungsskalen: Die Stabilität des myeloischen Teilbaums mit einem Mesoskalenmodell und die Details einer einzelnen Linienentscheidung mit einem molekularen Modell.

(Quelle: Carsten Marr & Fabian Theis, verändert nach

A. Rad/Wikimedia unter Lizenz CC BY-SA 3.0)

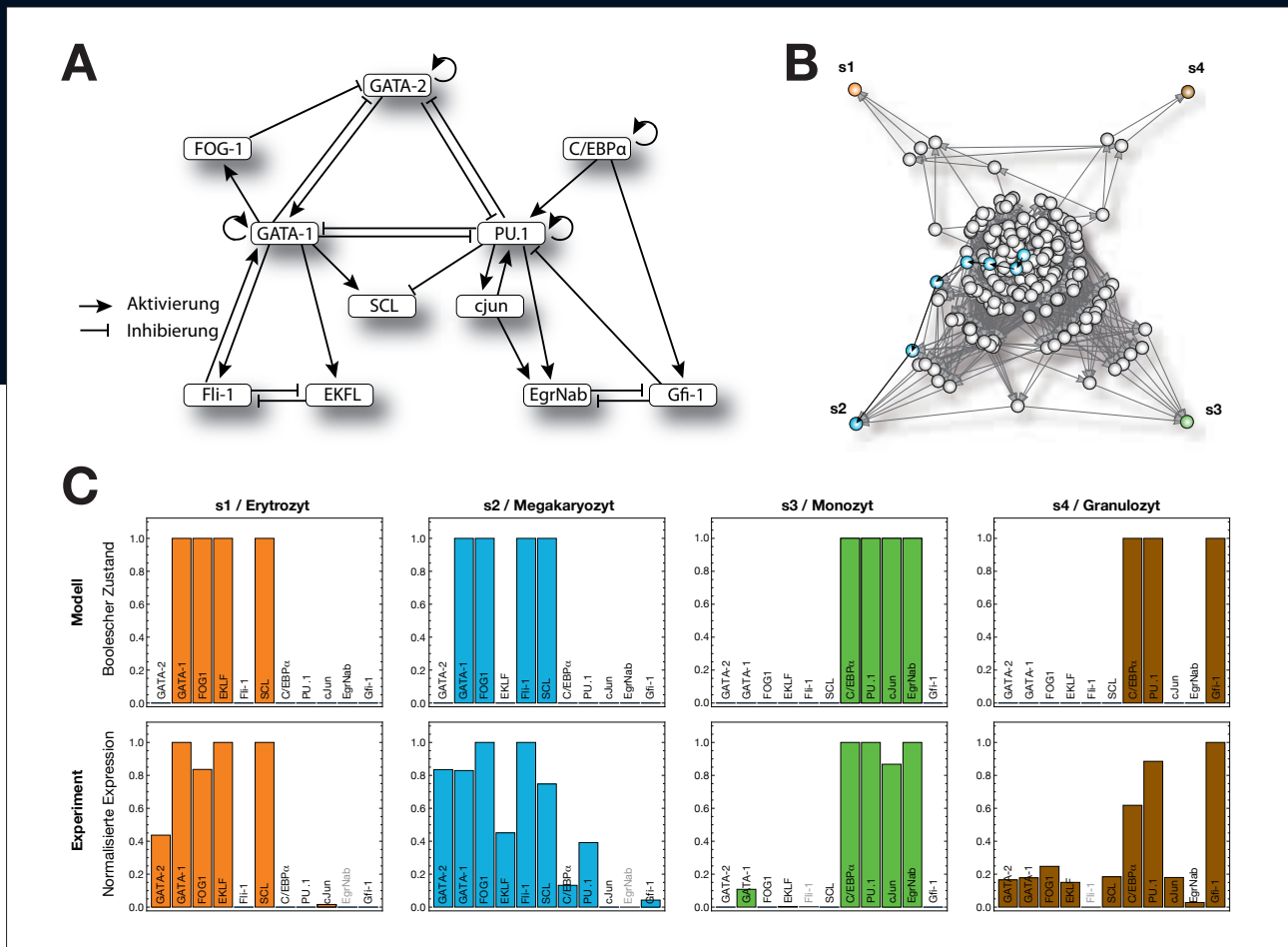


Abbildung 2: Mesoskalenmodell der myeloischen Differenzierung

(A) Genregulatorisches Netzwerk (GRN) von elf Transkriptionsfaktoren, die an der myeloischen Differenzierung beteiligt sind. Auswahl der Faktoren und ihre gegenseitige Regulation (Aktivierung oder Inhibierung) basiert auf Literatur, Meta-Datenbanken, und biologischer Expertise. (B) Das Zustandsnetzwerk des GRNs ergibt sich durch Implementierung einer Booleschen Dynamik mit einem Anfangszustand, der einer myeloischen Vorläuferzelle (CMP in Abb. 1) entspricht. Eine mögliche Trajektorie des Systems ist farblich hervorgehoben. (C) Die Booleschen Zustände (0 oder 1) der 11 Faktoren in den vier Attraktoren des Zustandsnetzwerks entsprechen den mRNA Profilen aus zwei Expressionsstudien (Quelle: Krumsiek *et al.*, 2011).

## Erfassung der Differenzierung über ein Mesoskalenmodell

Mit einem Mesoskalenmodell, also einem Modell, das zwischen 10 und 100 Komponenten umfasst, versuchen wir die Stabilität des myeloischen Teils des Differenzierungsbaus in Abb. 1 zu verstehen. Wir fragen uns dabei, welches regulatorische Netzwerk zur Ausprägung der genau vier reifen Zelltypen der myeloischen Linie führt.

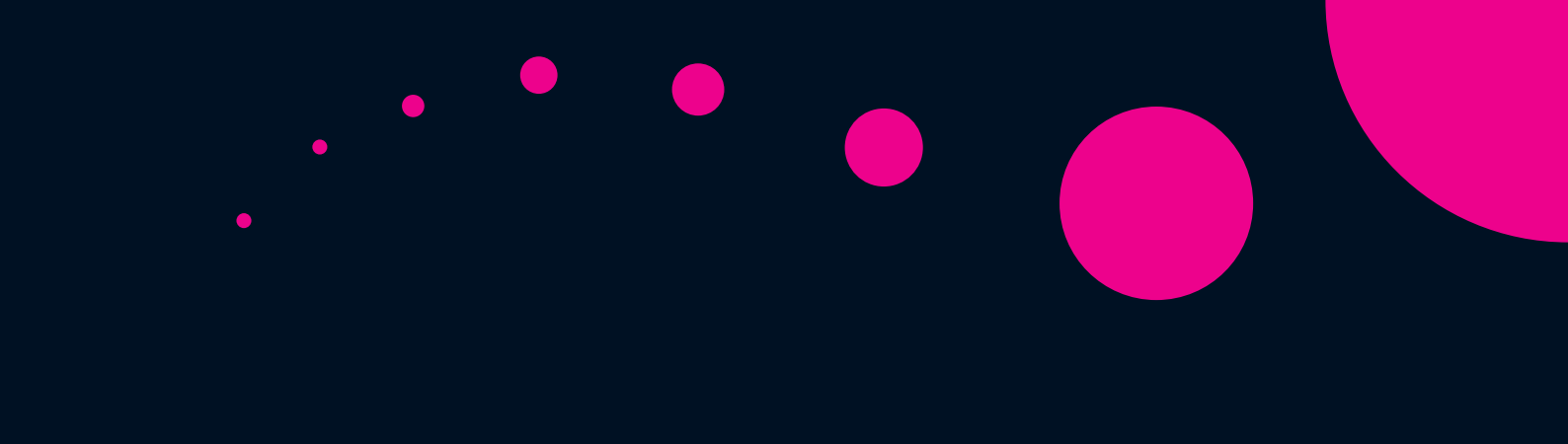
Ein Netzwerk besteht aus Knoten und Kanten. Die Knoten sind in unserem Fall Transkriptionsfaktoren, also Proteine, die an die DNA anderer Gene binden und so deren Genexpression aktivieren oder inhibieren. Reguliert ein Transkriptionsfaktor die Expression eines anderen, entsteht im GRN eine Kante.

Welche Transkriptionsfaktoren sind an der myeloischen Differenzierung beteiligt? Und wie regulieren sie sich gegenseitig? Um diese beiden Fragen zu beantworten haben wir, basierend auf existierenden Forschungsarbeiten, Meta-Datenbanken und der Expertise unserer biologischen Partner, elf Transkriptionsfaktoren ausgewählt, die bekanntermaßen in Differenzierungspro-

zessen im myeloischen Teilbaum beteiligt sind. Die gegenseitige Regulation der Faktoren wurde ebenfalls aus der Literatur abgeleitet und so das GRN der myeloischen Differenzierung konstruiert (Abb. 2A).

Um zu testen, ob dieses Netzwerk imstande ist, die vier reifen Zelltypen der myeloischen Linie zu erzeugen, müssen wir eine Dynamik auf dem Netzwerk implementieren, die der realen Differenzierung ähnelt. In unserer Arbeit haben wir uns für eine Boolesche Dynamik entschieden. Dabei werden die Zustände eines Faktors mit aktiv/inaktiv (oder 0/1) beschrieben. Dies erlaubt eine grobkörnige Beschreibung des System, die uns aus zwei Gründen angemessen erscheint: Zum einen entspricht dies dem biologischen Wissen über die Aktivität vieler Faktoren („Gen *x* ist aktiv in Zelltyp *y*“), zum anderen ist unser Modell damit bis auf die Bestimmung der Booleschen Regeln, die wir wieder aus der Literatur ableiten, parameterfrei.

Wir starten die Boolesche Dynamik in einem Zustand, der dem der myeloischen Vorläuferzelle (CMP in Abb. 1) entspricht. In jedem Zeitschritt kann sich dieser in einen anderen Zustand



gemäß der Booleschen Regeln verändern. Da wir jeden Knoten einzeln aktualisieren, ergeben sich für jeden Zustand mehrere mögliche Folgezustände. Wenn wir nun die Zustände des Systems mit Knoten und die Übergänge mit Kanten visualisieren, entsteht wiederum ein Netzwerk, das Zustandsnetzwerk unseres Modells (Abb. 2B). Dieses Netzwerk hat zwei bemerkenswerte Eigenschaften. Zum einen besitzt es genau vier Attraktoren, also Zustände ohne Folgezustände. Zum anderen ist es azyklisch, d.h. jede Dynamik landet schließlich immer in einem der vier Attraktoren. Eine exemplarische Trajektorie ist in Abb. 2B farblich hervorgehoben. Um unser Modell zu validieren, haben wir die Booleschen Zustände unserer Faktoren in den Attraktoren mit den mRNA-Profilen der vier reifen myeloischen Zelltypen verglichen. Abb. 2C zeigt die sehr gute Entsprechung der Modellvorhersage mit den Daten.

Unser Mesoskalenmodell kann also das Differenzierungspotential einer myeloischen Vorläuferzelle rekonstruieren. Verwenden können wir es, um den Einfluss dysfunktionaler Faktoren vorherzusagen und um Transdifferenzierungsstrategien (also die gezielte Verwandlung eines Zelltyps in einen anderen) zu simulieren (Krumnsiek *et al.*, 2011).

### Ein molekulares Modell erklärt das Funktionsprinzip von Genschaltern

Neben der Stabilität der Differenzierungsdynamik interessiert uns der molekulare Mechanismus, der zu einer Linienentscheidung führt. Das zentrale Motiv für diese Entscheidung ist die gegenseitige Inhibition zweier Transkriptionsfaktoren, welches auch als Genschalter bezeichnet wird. Dieses Motiv taucht in unserem Mesoskalenmodell gleich viermal auf (siehe z.B. PU.1 vs. GATA-1 in Abb. 2A). Wollen wir die Dynamik eines solchen Schalters im Detail verstehen, müssen wir die Beschreibungsskala ändern: Von dem grobkörnigen Booleschen Netzwerk zu einem Modell, das die Expressionsstärke der einzelnen Gene einbezieht. Wir haben für das molekulare Modell eines Genschalters eine stochastische Beschreibung gewählt, in dem der Einfluss der Abfolge der Einzelreaktionen berücksichtigt wird (Strasser *et al.*, 2012). Motiviert wird diese Wahl zum einen von Arbeiten, die zeigen, dass die Zufälligkeit der Einzelreaktionen

die beobachteten Proteinzahlen besser beschreiben kann als kontinuierliche Modelle, zum anderen durch die Beobachtung kleiner mRNA Zahlen, wodurch der Einfluss der Zufälligkeit der Reaktionsabfolge steigt.

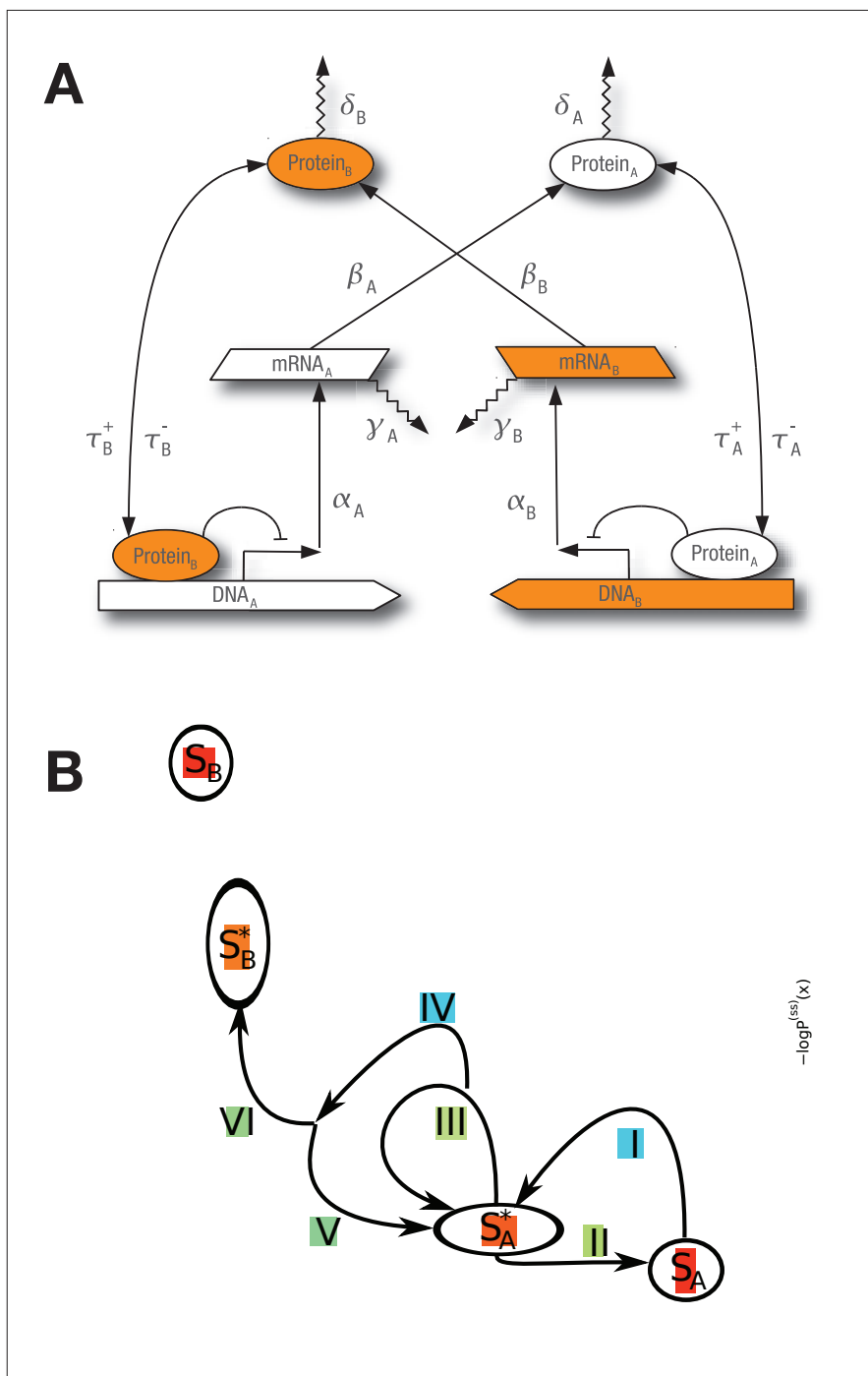
Unser molekulares Schaltermodell ist in Abb. 3A dargestellt: Es berücksichtigt Transkription, Translation, Zerfall und Proteinbindung als einzelne Reaktionen, die jeweils durch einen Parameter, die Reaktionsrate, charakterisiert sind. Neu an unserer Beschreibung ist die Einbeziehung der mRNA, die in den bisherigen Modellen ignoriert wurde. Abb. 3B zeigt den Zustandsraum des Modells, wobei auf den beiden Achsen die Menge der Proteine der beiden sich gegenseitig inhibierenden Faktoren angetragen ist. Man erkennt farblich kodiert vier Bereiche mit großen Aufenthaltswahrscheinlichkeiten des Systems, die wir in Analogie zum Mesoskalenmodell als Attraktoren bezeichnen. Starten wir unser System in einem beliebigen Anfangszustand, so wird es nach einiger Zeit in einem der vier Attraktoren landen. Im Gegensatz zu bisherigen Modellen zeigt unser Modell eine Attraktorstruktur, die sich mit dem biologischen Konzept des „Lineage priming“, also der Vorbestimmung von Vorläuferzellen in eine bestimmte Differenzierungsrichtung, deckt. Befindet sich das System in einem der beiden vorbestimmten Zustände  $S_A^*$  oder  $S_B^*$  mit relativ kleinen Proteinzahlen, so entspricht dies einer noch unentschiedenen Vorläuferzelle mit einer Tendenz in eine bestimmte Differenzierungsrichtung. Erst durch den Übergang in einen der Attraktoren mit großen Proteinzahlen ( $S_A$  oder  $S_B$ ) entscheidet sich die Vorläuferzelle endgültig für eine bestimmte Richtung. Die Entscheidung, so nehmen wir an, wird dann durch die Aktivierung von linienspezifischen Genen stabilisiert, die durch die große Zahl der Proteine des Schalters aktiviert werden.

### Ausblick: Anpassung der Modelle an die natürliche Komplexität

Die Modellierung der myeloischen Differenzierungsentscheidung auf verschiedenen Skalen ermöglicht unterschiedliche Einblicke in die jeweiligen molekularen Prozesse. Mit dem Mesoskalenmodell können wir einerseits versuchen, generelle Architekturprinzipien solcher genregulatorischer Netzwerke (GRN) zu entdecken und eventuell zu verallgemeinern. Offensichtlich ist nicht nur die tatsächliche Differenzierung, sondern auch das zugrunde liegende Netzwerk hierarchisch aufgebaut:

Das Modell koppelt zunächst den PU.1 vs. GATA-1 Schalter mit zwei detaillierteren Schaltern in einer tieferen Schicht. Gegenwärtig simulieren wir ein großes Ensemble von möglichen Netzwerken mit vier stabilen Zuständen, um zu verstehen, welche Robustheitseigenschaften eines solchen hierarchischen Systems notwendig waren, um einen evolutionären Vorteil zu gewinnen. Außerdem wollen wir unser Modell um weitere myeloische Zellen und den lymphoiden Ast der Hämatopoese erweitern, um krankhafte Veränderungen des Gesamtsystems umfassend zu beschreiben.

Abbildung 3: Das molekulare Modell eines Genschalters



**(A)** Wir beschreiben die gegenseitige Inhibition zweier Faktoren mit einem zweistufigen Genexpressionsmodell: Die DNA des Faktors A wird in eine mRNA abgelesen, die zerfallen oder in ein Protein A übersetzt werden kann. Auch das Protein zerfällt mit einer gewissen Rate, es kann aber auch an die DNA des Gegenspielers B binden und dort die Transkription hemmen. Die Prozesse sind spiegelbildlich für den Faktor B, was zu einem Genschalter führt: Entweder das eine oder das andere Protein wird produziert und unterdrückt seinen Gegenspieler (Quelle: Strasser *et al.*, 2012).

**(B)** Der Zustandsraum des Modells zeigt vier Bereiche erhöhter Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Diese Bereiche lassen sich biologisch als Zustände der Vorläuferzelle mit bestimmter Linientendenz ( $S_A^*$  und  $S_B^*$ ) bzw. als entschiedene Zustände mit weiter eingeschränktem Differenzierungspotential ( $S_A$  oder  $S_B$ ) deuten (Quelle: Strasser *et al.*, 2012).

Das Kernmotiv des oben beschriebenen GRNs ist der Gen-schalter. Dieses regulatorische Motiv haben wir auf molekularer Ebene durch ein stochastisches System beschrieben und analysiert. Wir konnten sehen, dass kleine mRNA-Zahlen zu vorentschiedenen Zuständen führen. In echten Stammzell-differenzierungsbäumen, die wir aus zeitaufgelöster Mikroskopie in enger Zusammenarbeit mit der experimentellen Gruppe von Timm Schroeder am Helmholtz Zentrum München erheben und quantifizieren, bestätigen sich solche Eigenschaften – in der Tat beobachten wir häufig eine äußerst frühe Entscheidung, die dann zu homogenen Bäumen einzelner Zelltypen führt (Marr *et al.*, 2012). In der Zukunft werden wir solche Entscheidungsprozesse über mehrere Zellzyklen hinweg in unsere Modelle einbauen, um die gemessenen Differenzierungsbäume adäquat zu beschreiben.

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Projekt ist im Rahmen des Netzwerks CoReNe (Control of Regulatory Networks) der Helmholtz-Allianz Systembiologie entstanden und wird durch das Schwerpunktprogramm 1356 (Pluripotency and Cellular Reprogramming) der DFG unterstützt.

#### Weitere Informationen:

<http://cmb.helmholtz-muenchen.de>

<http://www.helmholtz-muenchen.de/en/scd>

#### Beteiligte Partner:

Felix Buggenthin, Jan Krumsiek, Philipp Hoppe, Timm Schroeder, Michael Schwarzfischer, Michael Strasser

#### Beteiligte Institute:

Institut für Bioinformatik und Systembiologie & Research Unit Stem Cell Dynamics, Helmholtz Zentrum München

---

### Referenzen:

Krumsiek, J., Marr, C., Schroeder, T., and Theis, F. J. (2011). Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. *PLoS ONE*, 6(8):e22649.

Marr, C., Strasser, M., Schwarzfischer, M., Schroeder, T., and Theis, F. J. (2012) Multi-scale modeling of GMP differentiation based on single-cell genealogies. *FEBS Journal*, ICSB 2011 edition, In press.

Orkin, S. H. and Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4):631–644.

Strasser, M., Theis, F. J., and Marr, C. (2012). Stability and multi-attractor dynamics of a toggle switch based on a two-stage model of stochastic gene expression. *Biophysical Journal*, 102(1):19–29.

---

### Kontakt:



#### Prof. Dr. Dr. Fabian Theis

Leiter der Arbeitsgruppe „Computational Modeling in Biology“

Institut für Bioinformatik und Systembiologie  
Helmholtz Zentrum München &  
Professor für Mathematik und  
Systembiologie  
TU München  
fabian.theis@helmholtz-muenchen.de



#### Dr. Carsten Marr

Arbeitsgruppe „Computational Modeling in Biology“

Institut für Bioinformatik und Systembiologie  
Helmholtz Zentrum München  
carsten.marr@helmholtz-muenchen.de

# von der hepatischen sternzelle zum 3D-modell der leberregeneration

von Iryna Ilkavets, Sonja Lukowski, Frank Herweck und Steven Dooley

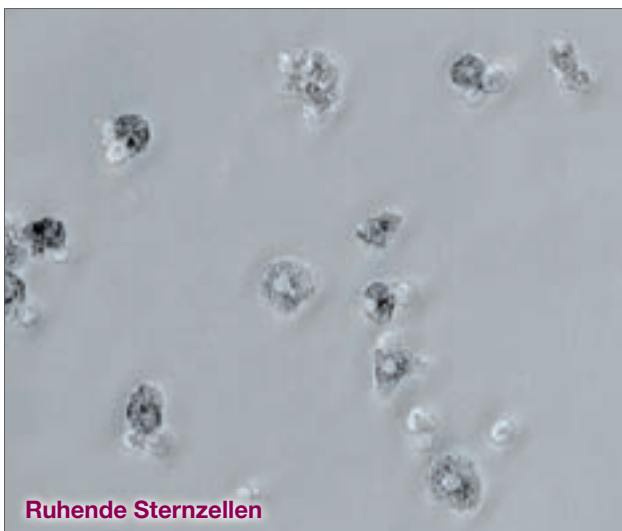
Exakte Zellanalyse und bahnbrechende 3D-Modelle werden in Zukunft helfen, die Komplexität des Leberstoffwechsels besser zu verstehen. Dazu lokalisiert das Team um Dr. Iryna Ilkavets aus der Forschergruppe von Prof. Steven Dooley am Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg mit modernen Mikroskopieverfahren Sternzellen in der Leber. Aus den erstellten Bildanalysen werden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen um Prof. Jan Hengstler und PD Dr. Dirk Drasdo dreidimensionale Modelle erstellt, die die Vorgänge in gesunden und geschädigten Lebern simulieren können. Die interdisziplinäre Arbeit ist Teil des bundesweiten Forschungsverbundes *Virtual Liver Network* und man erhofft sich neue Erkenntnisse zur Funktion der Sternzellen

während eines Leberschadens (Holzhütter *et al.*, 2012). Das erweiterte Verständnis der Leberregeneration weist dann die Richtung für verbesserte Therapien.

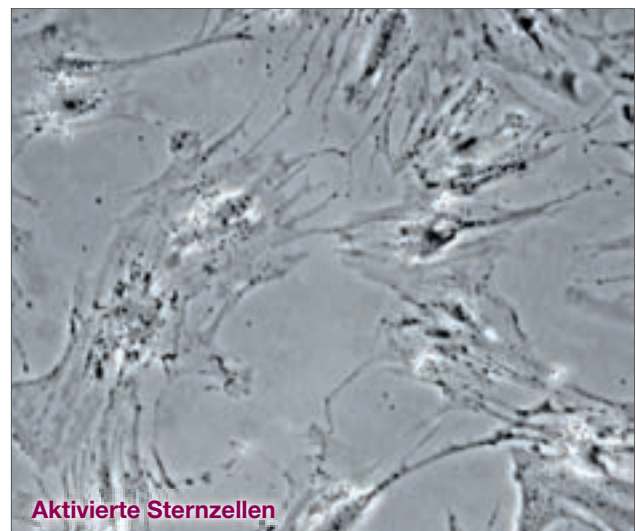
## Das Rätsel der Leberregeneration und die Rolle von Sternzellen

Die Fähigkeit der Leber, sich nach Schädigungen wieder nahezu vollständig zu regenerieren, gibt den Forschern immer noch Rätsel auf. „Im Grunde geht es uns darum, die zellulären Vorgänge in der erkrankten Leber – und hier insbesondere die Rolle der Sternzellen – auf molekularer und Gewebeebene zu verstehen, diese Prozesse während der Leberregeneration zu verfolgen und die beobachteten Resultate mathematisch zu erfassen,“ erklärt Dr. Ilkavets.

Abbildung 1: Lichtmikroskopische Bilder von ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen *in vitro*



Ruhende Sternzellen



Aktivierte Sternzellen

Die unterschiedliche Morphologie der Sternzellen wird durch ihren physiologischen Zustand bestimmt. Die Sternzellen wurden aus Mausebern isoliert und auf der Plastikoberfläche der Kulturplatten während 2 (ruhende HSCs) oder 7 Tagen (aktivierte Sternzellen) gezüchtet (Bilder: I. Ilkavets).

Obwohl Sternzellen nur einen äußerst geringen Anteil des gesunden Lebervolumens ausmachen, sind sie von fundamentaler Bedeutung. Unter anderem speichern sie über Dreiviertel des Vitamin A im Körper und sind an der Wundheilung essentiell beteiligt. Den heutzutage gängigen Namen „Sternzelle“ verdanken sie ihrer typischen Form. „Ein 3D-Modell der Sternzellen hatte Karl W. von Kupffer mit Sicherheit noch nicht vor Augen, als er 1876 die Sternzellen entdeckte und erstmals beschrieb,“ meint Dr. Ilkavets. „Doch befinden wir uns heute auf dem besten Weg dahin.“

### Von der Zelle zum Computermodell

Bereits vor einigen Jahren entwickelten Wissenschaftler des HepatoSys-Verbundes in den Arbeitsgruppen von PD Dr. Dirk Drasdo (IZBI, Universität Leipzig & INRIA Paris) und Prof. Jan Hengstler (IFADO, TU Dortmund) ein hervorragendes 3D-Modell des Leberlappens (Hoehme *et al.*, 2010). Dieses bildete sowohl Prozesse in der gesunden Leber als auch nach Vergiftungen mit Tetrachlorkohlenstoff (CCL<sub>4</sub>) ab (vgl. [systembiologie.de](http://systembiologie.de) 2011/3, S. 35-38).

Anhand von experimentellen Daten wurden Parameter definiert, die die Anordnung und das Verhalten der Hepatozyten wiedergeben. Hepatozyten in vergifteten Regionen sterben nach gängiger Lehrmeinung aufgrund der toxischen Wirkung von CCL<sub>4</sub> nach und nach ab, bis der regenerative Prozess einsetzt und die abgestorbenen Bereiche durch die Bildung neuer Zellen verschlossen werden. Darauf aufbauend konzentrieren die Forscher der Mannheimer Arbeitsgruppe ihre Aufmerksamkeit auf die Sternzellen, die an Wundheilung und Leberregeneration beteiligt sind. Aktuell verfolgtes Ziel ist die Erweiterung und somit Verbesserung des vorstehend erwähnten bestehenden mathematischen Modells der Leberregeneration um die Sternzellen.

Dazu wurden experimentelle Daten generiert. Dies geschah sowohl *in vitro* mit kultivierten primären Mauszellen, als auch *in vivo* unter Verwendung verschiedener Mausmodelle (Dooley

*et al.*, 2008). Für die *in vitro* erzeugten Daten wurden die Sternzellen aus der Mausleber isoliert und in Plastik-Kulturschalen kultiviert (Abb. 1). Zur Generierung von *in vivo*-Daten wird den Mäusen CCL<sub>4</sub> gespritzt, und die dadurch geschädigten Lebern werden über einen Zeitraum von einer Woche analysiert.

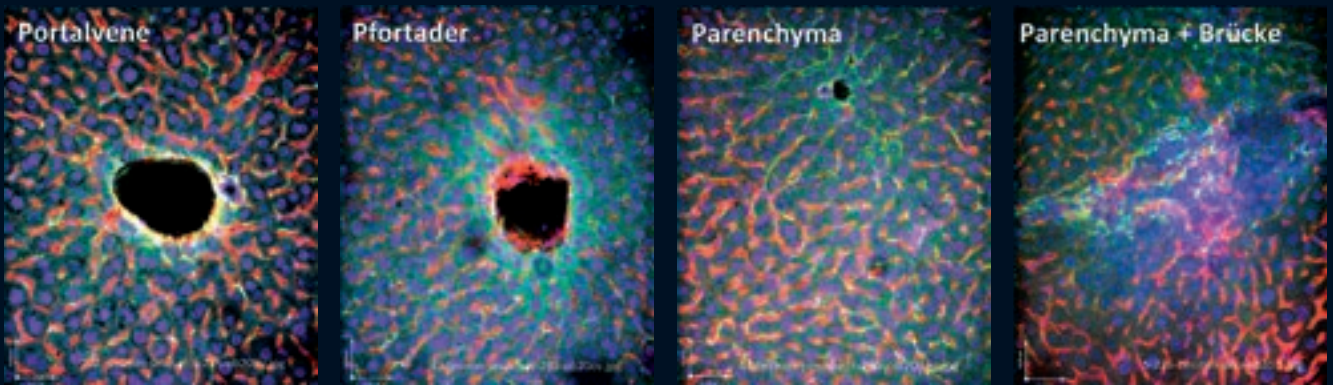
### Hepatische Sternzellen und Hepatozyten stehen in ständiger Kommunikation miteinander

Sternzellen haben sowohl die Möglichkeiten über direkten Kontakt (beispielsweise durch Notch-Jag1 und Connexin 43) als auch indirekt (über sekretierte Moleküle) mit Hepatozyten zu kommunizieren (Friedman 2008). Nach einem Leberschaden wirken die abgestorbenen Zellreste und die freigesetzten Zytoplasmabestandteile der Hepatozyten im Gegenzug aktivierend auf die Sternzellen. Nach Aktivierung verlieren die Sternzellen Vitamin A und beginnen im hohen Maße Zytokine und Chemokine wie TGF $\alpha$  TGF- $\beta$ , PDGF, HGF und EGF auszuschütten. Diese wirken als Wachstumsfaktoren und starten die Vermehrung der Hepatozyten. Wurden genügend neue Zellen gebildet, um die „Hepatozytenlücken“ zu schließen, werden wiederum TGF- $\beta$  und Aktivin ausgeschüttet, um die Wachstumsrate zu bremsen.

Die aktivierten Sternzellen kehren zeitgleich in ihren deaktivierten Zustand zurück, wobei der Wirkungsmechanismus bisher noch nicht ausreichend erklärt werden konnte. Genaue Zeit- und Konzentrationsreihen der ausgeschütteten Zytokine werden mit modernen quantitativen Methoden wie Luminex- und ELISA ermittelt und anschließend mit dem mathematischen Modell abgespielt und simuliert.

### Lokalisation der Sternzellen *in vivo*

Zur Modellierung ist es erforderlich, genau zu bestimmen, wo sich die Sternzellen im Zellzusammenschluss der Leber befinden. Sie müssen also als solche nachgewiesen, das heißt visualisiert werden. Man macht sich dabei zunutze, dass bestimmte zelltypische Marker nur in den Sternzellen und in keinem anderen Zelltyp der Leber zu finden sind. Mit Immunhistochemie an



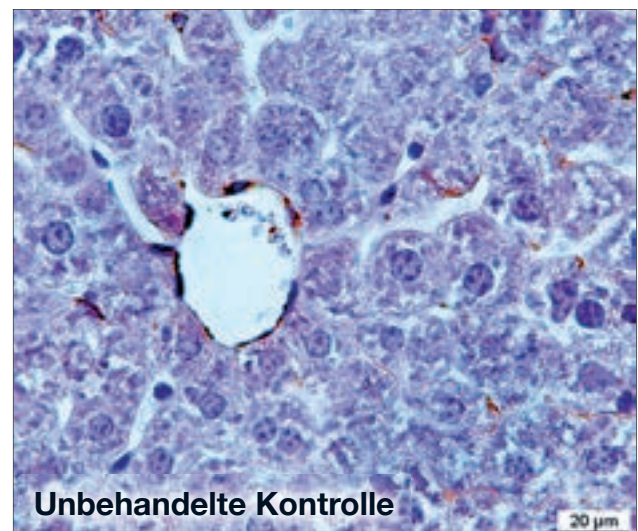
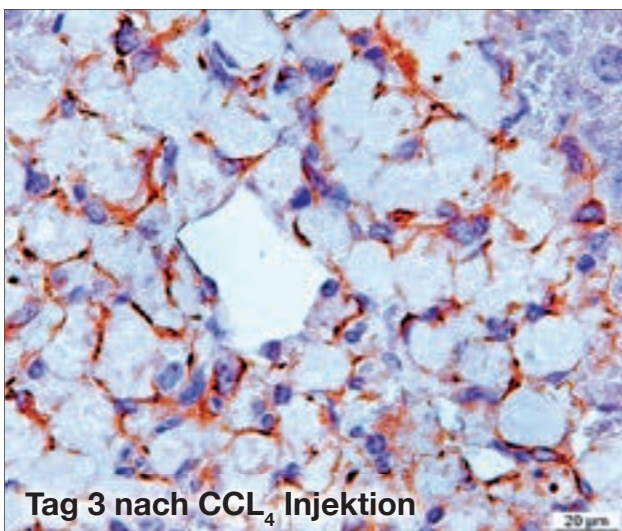
**Abbildung 2: Sternzellen *in vivo* und Gewebearchitektur im Bereich der Portalvene, der Pfortader und des Parenchyms**

Mausleber wurde in 100 µm dicke Stücke geschnitten und mit Fluoreszenz-Immunohistochemie gefärbt. Bilder wurden mit konfokaler Mikroskopie aufgenommen. Die Sternzellen wurden mit Antikörpern gegen Desmin nachgewiesen (grün), das sinusoidale Netzwerk ist rot und die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau) (Bilder: I. Ilkavets).

Leberschnitten nutzen die Wissenschaftler Desmin-Färbungen zur Bestimmung aller, d.h. sowohl aktiver als auch ruhender Sternzellen, wohingegen die  $\alpha$ -SMA-Färbungen nur die aktivierte Form der Sternzellen detektiert. Die Forscher benutzen hierbei zwei Sorten der Immunohistochemie mit anschließender Mikroskopie: (i) konventionelle Immunohistochemie an 3-4 µm dicken Leberschnitten mit Lichtmikroskopie (Abb. 3) und *whole slide imaging*, oder (ii) immunfluoreszente Immunhistochemie an 100 µm dicken Leberschnitten und anschließender konfokaler Mikroskopie (Abb. 2). Während die erste Methode für die spezifische Färbung eines Markers und die Färbung des gesamten Lebergewebes herangezogen wird, dient die zweite Methode der

gleichzeitigen Färbung von bis zu vier verschiedenen Markern. Die Färbungen werden in letzterem Fall mit 3D-Mikroskopie analysiert. Die Forscher erhalten als Ergebnis sogenannte aus bis zu 100 aufeinanderfolgenden Bildern bestehende 3D-stacks, die in einem Abstand von 0.1-0.2 µm aufgenommen wurden. Die Bilder geben unter anderem die Färbungen von Sternzellen, Gallengangnetzwerken, das Sinusoidnetzwerk und Zellkerne wieder. Anhand dieser Bilder-sets kann die Zelltopologie in Regionen der Zentralvene, der Pfortader und des Parenchyms experimentell quantifiziert und nachfolgend simuliert werden. Anschließend folgt wiederum die Einbindung der Zelltopologien in die mathematischen Modelle.

**Abbildung 3: Sternzellen *in vivo* beim Leberschaden mit der hepatotoxischen Substanz  $CCL_4$  in der Region um die Zentralvene**



Immunohistochemische Färbung gegen Desmin (Sternzellen-Marker) und Lichtmikroskopie. Wurde die Maus zuvor mit  $CCL_4$  behandelt, sind die Hepatozyten um die Zentralvene herum geschädigt (hellblau). In diesen Bereichen befinden sich am Tag 3 nach Schädigung vermehrt hepatische Sternzellen (braun). In der ungeschädigten Leber sind diese Sternzellen nur vereinzelt in der sinusoidalen Region zu finden (Bilder: I. Ilkavets).



## Die Morphologie der Sternzellen *in vivo*

Für die Modellierung ist die exakt definierte Morphologie der Sternzellen wichtig. Das bestehende Modell beschreibt zwar bereits die Morphologie der Hepatozyten, diese ist allerdings nicht einfach auf Sternzellen übertragbar. Denn, während Hepatozyten eine verhältnismäßig einfache Morphologie aufweisen und sich dicht aneinanderreihen, befinden sich die Sternzellen in den Zwischenräumen der Hepatozyten in einem losen Netzwerk und ändern ihre Morphologie abhängig von ihrem physiologischen Zustand. Diese Informationen wurden aus *in vitro*-Zellkulturdaten mit Fluoreszenz-/konfokaler Mikroskopie oder aus *in vivo*-Daten mit Elektronenmikroskopie gewonnen. Im ruhenden Zustand besitzen die runden Sternzellen mit einem Durchmesser von 5-7 µm Vitamin A/Lipid-Speichertropfen. Im aktivierten Zustand hingegen sind nur wenige Vitamin A/Lipid-Tropfen in den protrusionierten Sternzellen (Durchmesser von 20 µm) vorhanden.

## Zusammenfassung

Mit Maus-Modellen und verschiedenen Mikroskopieverfahren stellt das Forscherteam um Dr. Iryna Ilkavets wichtige Parameter bereit, die zur 3D-Rekonstruktion der Leberarchitektur dienen. Die Form der Sternzellen, deren Anzahl und Lokalisation helfen dabei, die räumliche und zeitliche Dynamik eines Leberschadens und die anschließende Regeneration genauer zu erfassen. Das Verständnis der Funktion der Sternzellen bei diesem Prozess trägt dazu bei, nach und nach das Rätsel der Leberregeneration zu lösen.

## Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Sternzellen-Projekt ist ein Teil des bundesweiten interdisziplinären Forschungsverbundes *Virtual Liver Network*. Das Projekt umfasst die detaillierte Beschreibung der Physiologie und Pathophysiologie von hepatischen Sternzellen unter Verwendung von experimentellen Analysen und mathematischer Modelle.

## Referenzen:

Dooley S, Hamzavi J, Ciuculan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A, Breitkopf K, Weng H, Mertens PR. (2008). Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* Aug;135(2):642-59.

Friedman SL. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews* 88: 125-172.

Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Bedawy, E., Schormann, W., Gebhardt, R., Zellmer, S., Schwarz, M., Bockamp, E., Timmel, T.,

G. Hengstler, J.G., and Drasdo, D. (2010). Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 107(23), 10371-10376.

Holzhütter HG, Drasdo D, Preusser T, Lippert J, Henney AM. (2012). The virtual liver: a multidisciplinary, multilevel challenge for systems biology. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2012 May;4(3):221-35.

## Kontakt:



### Dr. Iryna Ilkavets

AG Prof. Steven Dooley  
Molecular Hepatology - Alcohol Associated Diseases  
Medizinische Fakultät Mannheim  
(der Universität Heidelberg)  
Mannheim  
iryna.ilkavets@medma.uni-heidelberg.de



### Sonja Lukowski

sonja.lukowski@medma.uni-heidelberg.de



### Frank Herweck

frank.herweck@medma.uni-heidelberg.de



### Prof. Dr. Steven Dooley

steven.dooley@medma.uni-heidelberg.de

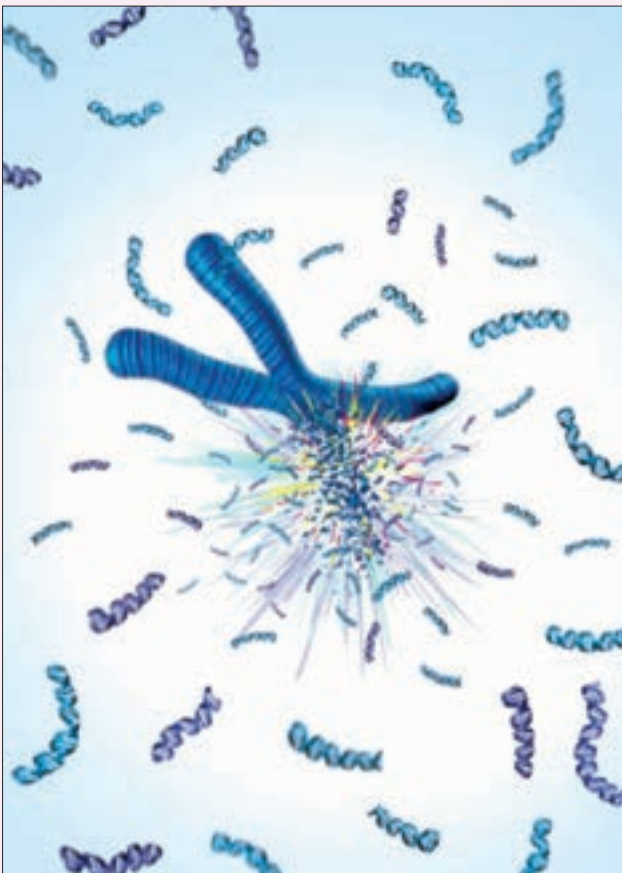
[www.umm.de](http://www.umm.de)

# news

## Explosion im Erbgut verursacht Hirntumoren

**Erbliche Defekte im Gen für das Protein p53 können zur explosionsartigen Umlagerung großer Teile des Erbguts führen, was Zellen offenbar besonders leicht zu Krebszellen entarten lässt. Heidelberger Forscher entdeckten dies an einem äußerst aggressiven Hirntumor bei Kindern.**

Menschen mit ererbten Defekten im Gen p53 durchleben oft eine jahrzehntelange Leidensgeschichte: Häufig erkranken sie im Laufe ihres Lebens an mehreren verschiedenen Krebsarten. Ihnen mangelt es an intaktem p53-Protein, dem sogenannten „Wächter des Genoms“, welches nach Erbgutschädigung die Zellteilung aufhält, damit die Zelle die DNA-Defekte reparieren kann. Sind die Schäden irreparabel, dann sorgt p53 für die Einleitung des Zelltods (Apoptose).



Eine erbliche Veränderung im p53, dem „Wächter des Genoms“, ist möglicherweise die Ursache für explosionsartige Umlagerungen im Erbgut (© EMBL/P. Riedinger).

Wissenschaftler um Prof. Peter Lichter (DKFZ), Dr. Stefan Pfister (DKFZ und Universitätsklinikum Heidelberg) und Dr. Jan Korbel (EMBL Heidelberg) entzifferten das Erbgut eines Mädchens mit einem besonders aggressiven Hirntumor, dem SHH-Medulloblastom. Sie wurden von einer erblichen p53-Mutation gepaart mit einem beispiellosen Chaos überrascht: Abschnitte einzelner Chromosomen waren an unzähligen Stellen zerbrochen und regelwidrig wieder zusammengebaut worden, so dass ganze Erbgutabschnitte fehlten, andere dagegen vervielfältigt oder in falscher Orientierung eingebaut waren. Dieses Desaster im Erbgut unterscheidet sich von allen bisher bekannten Erbgutdefekten in Tumorzellen und wird als Chromothripsis bezeichnet. Chromothripsis entsteht vermutlich durch ein einzelnes Ereignis in der Zelle, das die Chromosomen geradezu explodieren lässt, denn eine allmähliche Anhäufung einzelner Mutationen, wie man sie von den meisten Krebserkrankungen kennt, kann ein solches Durcheinander nicht erklären.

Eine derartige Häufung von Chromothripsis bei einer einzelnen Krebsart war bislang nicht bekannt, ebenso wenig ein Zusammenhang zwischen Chromothripsis und einem bestimmten Gendefekt. „Wir prüfen daher, ob wir nicht in Zukunft bei allen Patienten mit SHH-Medulloblastomen nach erblichen p53-Mutationen suchen sollen“, sagt Stefan Pfister. Liegt eine solche Mutation vor, so haben die Betroffenen, möglicherweise auch deren Angehörige, ein besonders hohes Krebsrisiko. Entdecken wir einen erblichen p53-Defekt, so können wir engmaschige Früherkennungsuntersuchungen empfehlen, um mögliche Tumoren rechtzeitig in einem besser behandelbaren Stadium zu entdecken.“

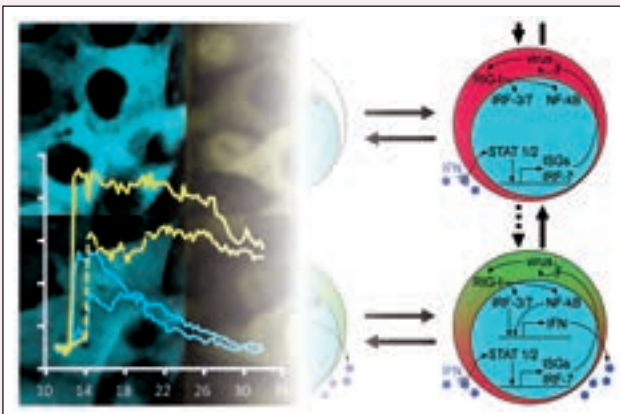
Zudem ist in diesem Fall besondere Vorsicht bei der Wahl der Behandlungsmethoden geboten, denn sowohl Strahlentherapie als auch einige Zytostatika bewirken Erbgutschädigungen. Da bei Menschen mit ererbtem p53-Defekt die DNA-Reparatur jedoch in allen Körperzellen beeinträchtigt ist, könnten therapiebedingte DNA-Schädigungen leicht zu weiteren Krebserkrankungen führen.

**Originalpublikation:** Rausch *et al.* (2012). Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* 148, 59-71.

**Quelle:** Pressemitteilung DKFZ

## Virusabwehr durch Interferon – gezielt oder zufällig?

Menschliche Zellen wehren sich gegen eindringende Viren, indem sie Gefahrensignale, die Interferone, produzieren und ausscheiden. Sezerniertes Interferon aktiviert in den Produzenten sowie in Nachbarzellen die Bildung von Proteinen, welche die Virusvermehrung verhindern. Wissenschaftler um Hansjörg Hauser sowie Mario Köster am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig und Thomas Höfer am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg haben die antivirale Interferonantwort in Einzelzellen sichtbar gemacht. Erstmals haben sie dazu den Weg von der Viruserkennung über das Ablesen der Interferongene bis hin zur Reaktion auf sezerniertes Interferon mit Hilfe von fluoreszenten Reporterproteinen verfolgt und mathematisch modelliert. Ein überraschendes Ergebnis dieser Studie ist, dass alle beobachteten Teilabschnitte dieser Wirkkette wie zufällige Schalter funktionieren. Ob und wann ein Schalter in einzelnen Zellen umgelegt wird, erfolgt trotz der lebenswichtigen Funktion keineswegs zuverlässig – sondern zufällig. Das mathematische Modell sagt allerdings vorher, dass eine schlagkräftige Virusabwehr erzielt werden kann, wenn das Interferonsignal sehr viele umliegende Zellen erreicht. Diese Prognose konnte anschließend im Experiment bestätigt werden. Da humanpathogene Viren das Interferonsystem unterdrücken können, haben diese Ergebnisse grundlegende Bedeutung für das Verständnis viraler Infektionskrankheiten. Die Wissenschaftler wollen nun den Wettlauf zwischen der Interferonantwort und der Ausbreitung eines Virus im infizierten Gewebe untersuchen.



Mittels fluoreszenten Reporterproteinen wurden Signaltransduktion und Genexpression von Einzelzellen gemessen (links) und mit einem mathematischen Modell simuliert (rechts) (Grafik: aus Rand *et al.*, 2012).

**Originalpublikation:** Rand, U., Rinas, M., Schwerk, J., Nöhren, G., Kröger, A., Kály-Kullai, K., Flossdorf, M., Hauser, H., Höfer, T. and Köster, M. (2012) Multi-layered cellular stochasticity and paracrine amplification shape the type-I interferon response. *Mol. Syst. Biol.* 8: 584.

## Neues Systembiologie-Zentrum in Dresden gegründet

Mit Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF), der Klaus Tschira Stiftung und der Max-Planck-Förderstiftung gründet die Max-Planck-Gesellschaft in Dresden ein Zentrum für Systembiologie. Als Direktor des Zentrums wurde Eugene W. Myers berufen, der gleichzeitig eine Abteilung am Max-Planck-Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden und eine Nachwuchsarbeitsgruppe am HITS, dem Heidelberger Institut für Theoretische Studien, leiten wird.



Gene Myers, Direktor des neuen Systembiologie-Zentrums der Max-Planck-Gesellschaft in Dresden (© MPG, Myers)

Gene Myers (58) gehört zu den Pionieren der Bioinformatik und hat maßgeblich bei der Entschlüsselung des menschlichen Genoms mitgewirkt. Mit seinen Arbeiten hat er die Informatik mit der Biologie untrennbar verknüpft. Mit den von ihm entwickelten Algorithmen können Wissenschaftler im „shot-gun“-Verfahren die bei der Genomanalyse entstehenden unzähligen kleinen DNA-Schnipsel zu einem zusammenhängenden Genom

zusammensetzen. Auf diese Weise wurde die Entschlüsselung des Genoms der Fruchtfliege *Drosophila*, der Maus und eben des Menschen deutlich beschleunigt. Dafür erhielt er 2004 den Max-Planck-Forschungspreis.

Da bei der Analyse von Vorgängen innerhalb von Zellen etliche Terrabytes an Bilddaten anfallen, die nur noch mithilfe von extrem leistungsfähiger Software ausgewertet werden können, will Myers an dem neuen Dresdner Zentrum möglichst viel Information aus diesen Bilddaten holen. Dazu plant er, Mikroskopieverfahren und die dazugehörige Bilderkennungs- und Analyse-Software so weiterzuentwickeln, dass der gesamte Entwicklungsablauf biologischer Systeme digital erfasst werden kann. Mit neuer Software sollen die Rohdaten dann in 3D-Modelle umgerechnet und Beobachtungen der molekularen Ebene virtuell abgebildet werden. „Wir sind sicher, dass solche Datensammlungen der Weg der Zukunft sind, mit ihrer Hilfe wird man bald mehr über die Aufgabe ganzer Genom-Abschnitte erfahren können, als das bisher mit allen gängigen Ansätzen möglich ist“, so Myers.

Quelle: Pressemitteilung Max-Planck-Gesellschaft

### Erster DFG-NSF Workshop zur Synthetischen Biologie in Heidelberg

Am 15. und 16. Mai 2012 organisierten die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und ihre US-amerikanische Partnerorganisation National Science Foundation (NSF) im BioQuant Zentrum in Heidelberg einen Workshop zum Thema „Synthetische Biologie“ und gaben damit 30 amerikanischen und deutschen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler eine Plattform, um die Probleme und Perspektiven dieses sich neu entwickelnden Forschungsgebiets zu diskutieren.

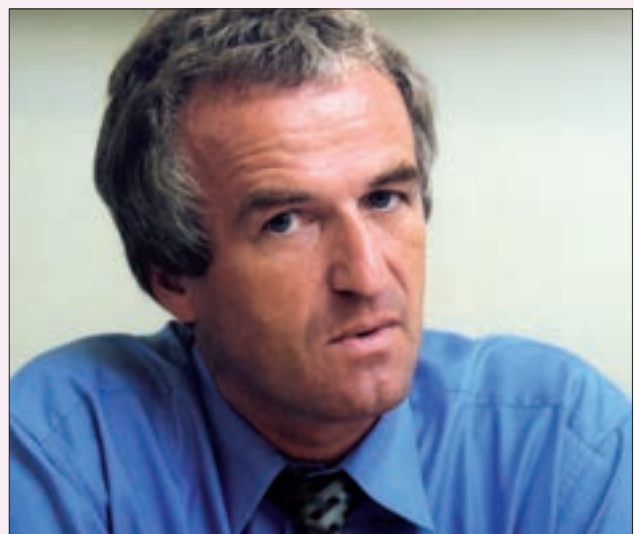
Deutlich wurde dabei, dass die dort anwesenden amerikanischen Wissenschaftler einen stärkeren ingenieurwissenschaftlichen Ansatz gezeigt haben, wohingegen die Deutschen einen stärker anwendungsbezogenen lebenswissenschaftlichen Ansatz verfolgten. Einig waren sich die Wissenschaftler darin, dass die Komplexität des Lebens sehr viel mehr Rätsel aufgibt als erwartet und die Synthetische Biologie ein notwendiges Werkzeug zum Verständnis dieser Strukturen ist. Der Ethiker Peter Dabrock von

der Universität Erlangen appellierte eindringlich daran, in diesen Fragen kontinuierlich mit der Öffentlichkeit im Gespräch zu bleiben. Das Wichtigste zur Akzeptanz dieses Wissenschaftsgebietes sei es, Vertrauen aufzubauen. Um das Themenfeld weiter zu verfolgen, wurde ein mögliches Folgetreffen allgemein befürwortet.

Quelle: Pressemitteilung Deutsche Forschungsgemeinschaft

### Ausgezeichnet für sein Lebenswerk! Peter Lichter erhält den Preis der European Society of Human Genetics 2012

Die *European Society of Human Genetics* hat am 26. Juni 2012 ihren ESHG Award an Prof. Peter Lichter, Leiter der Abteilung Molekulare Genetik am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, verliehen. Mit dem Preis wurde Peter Lichter für sein Lebenswerk und seine bahnbrechenden Erkenntnisse auf den Gebieten der Molekularen Zytogenetik und der Struktur von Genomen sowie für die Entwicklung neuer Technologien, die grundlegende Mechanismen der Krebsgenese aufdecken, geehrt.



Professor Peter Lichter (Foto: DKFZ Heidelberg)

Zu seinen herausragenden Leistungen gehören die maßgebliche Entwicklung sowohl des Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsverfahrens (FISH) zum Nachweis von DNA und RNA in Zellkernen als auch

das Array-CGH-Verfahren (comparative genomic hybridization) zur hochauflösenden Bestimmung von DNA-Gewinnen und -Verlusten. Beide Methoden haben sich in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren zu unverzichtbaren Werkzeugen in der medizinischen Genetik und in der Krebsforschung entwickelt. Bei seiner Forschung hat Peter Lichter immer auch die Anwendung dieser Methoden im klinischen Alltag und zum Nutzen der Patienten vorangetrieben.

Peter Lichter studierte Biologie in Heidelberg und ging als Postdoktorand zu Prof. D.C. Ward an die Yale Universität nach New Haven, USA. Seit 1990 forscht er am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg auf dem Gebiet der molekularen Genetik und ist seit 2000 Professor an der Universität Heidelberg.

Quelle: Pressemitteilung Pressemitteilung ESHG

### Schülerteam aus Heidelberg gewinnt den „iGEM 2012 Highschool Jamboree“ in den USA

Fünf Schüler des Heidelberger Life-Science Labs, einer Einrichtung am DKFZ zur Förderung naturwissenschaftlich begabter Schülerinnen und Schüler, haben beim iGEM-Highschool-Wettbewerb in Indiana, USA, mit ihrem Projekt „Unveiling the Invisible – Enthüllung des Unsichtbaren“ den 1. Platz belegt und sich damit erfolgreich gegen 16 internationale Highschool-Teams durchgesetzt. Das deutsche Schülerteam aus Karlsruhe, Wiesbaden und Künzelsau unter der Betreuung von PhD- und Masterstudenten am DKFZ entwickelte ein Messgerät zur genauen Quantifizierung von UV-Strahlung und radioaktiver Strahlung. Sowohl UV-Strahlung als auch Radioaktivität sind natürliche Strahlungen, die uns täglich begegnen. In geringen Dosen sind diese Strahlungen harmlos, für manche Organismen sogar lebenswichtig. Eine Dosis-Überschreitung kann jedoch zu schweren Zellschädigungen führen, die wiederum beim Menschen Erkrankungen wie Krebs hervorrufen können. Das iGEM-Team des Heidelberger Life-Science Labs hat einen synthetischen Werkzeugsatz entwickelt, der eine präzise Messung von UV- und radioaktiver Strahlung im Alltag ermöglicht. Von der UV-Messung beim Sonnenbaden bis hin zu radioaktiven Messungen in Hochrisikogebieten, bieten die bakteriellen Strahlensensoren eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten.

„Damit die Leute unseren Strahlendetektor immer gern bei sich tragen, z. B. beim Sonnenbaden, entwickelten wir neben der wissen-

schaftlichen Projektarbeit eine exklusive Schmuckkollektion, in die wir unseren Strahlensensor integriert haben“, erklärt Teammitglied Charlotte Bunne den besonderen Clou ihres lebenden Detektors.

Mit diesem Produkt möchte das Schülerteam die Öffentlichkeit auf diese unsichtbare, permanent anwesende Gefahr hinweisen und die enormen Anwendungsmöglichkeiten der Synthetischen Biologie für unser tägliches Leben aufzeigen.



Von links nach rechts: Katharina Genreith (Betreuerin), Stefan Holderbach, Mariam Harmouche, Tim Heinemann (Betreuer), Charlotte Bunne, Jakob Kreft, Anna Huhn und Dominik Niopek (Betreuer)

iGEM (international genetically engineered machine competition) ist ein internationaler, nicht kommerzieller Wettbewerb für Synthetische Biologie, der seit 2003 vom Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Boston veranstaltet wird und sich an Bachelor- und Masterstudenten richtet. Der daraus entstandene iGEM Highschool Jamboree versucht seit 2011 Schüler für die Biowissenschaften zu begeistern.

**Mehr Informationen finden Sie unter:**

[http://2012hs.igem.org/Main\\_Page](http://2012hs.igem.org/Main_Page)

# events

## International Conference on Systems Medicine – ICSM 2012

9.-12. September 2012, Dublin, Irland



Die Forschungsinitiative Systems Biology Ireland (SBI) veranstaltet im September 2012 und 2014 in Dublin die International Conference on Systems Medicine. Die Konferenzserie wird unterbrochen von begleitenden Workshops für junge Kliniker und Forscher in den Jahren 2013 und 2015, die im LCSB – Luxembourg Centre for Systems Biomedicine stattfinden werden. Diese Serie will neueste Entwicklungen und Technologien präsentieren sowie Herausforderungen medizinischer Problemstellungen wahrnehmen. Die Konferenz richtet sich gleichermaßen an Kliniker und Forscher, die sich mit der Erforschung von Krankheiten beschäftigen und möchte damit die Kommunikation innerhalb des Gesundheitswesens fördern. Die erste ICSM findet am 9.-12. September 2012 im Kildare Carton House außerhalb von Dublin statt.

### Koordinatoren:

Konferenzen: Prof. Walter Kolch, Director, Systems Biology Ireland

Workshops: Prof. Rudi Balling, Director, Luxembourg Centre of Systems Biomedicine.

### Weitere Informationen unter:

[www.sysmed2012.eu](http://www.sysmed2012.eu)

## 8. Workshop Molecular Interactions – From Molecules to Product Innovation

12.-14. September 2012, Berlin

Der Einsatz und die Entwicklung moderner Technologien im Bereich der Lebenswissenschaften sind von essentieller Bedeutung für das menschliche Leben geworden. Dabei steht der Begriff „Biotechnologie“ als Sammelbegriff für eine Vielzahl von Verfahren, Produkten und Methoden. Die Komplexität dieses Forschungsgebiets erfordert daher ein hohes Maß an Spezialwissen, eine enge Verknüpfung verschiedener Forschungsgebiete und eine kontinuierliche, sorgfältige Weitergabe von Fachwissen. Die

Intension des seit acht Jahren stattfindenden Workshops „Molecular Interactions“ ist es deshalb, den wissenschaftlichen Nachwuchs über die neuesten Trends, Technologien und analytischen Ansätze in der Biotechnologie zu informieren, sie für die Forschung und Entwicklung zu begeistern und ihnen Kontakte zu Experten aus Universitäten, Forschungseinrichtungen sowie nationalen und internationalen Unternehmen zu vermitteln.

Nach den Begrüßungsworten von Bundesminister a. D. Dr. Heinz Riesenhuber MdB und der Eröffnungsrede von Professor Dieter Söll (Yale University, USA) werden insgesamt 28 renommierte Wissenschaftler aus der ganzen Welt zum diesjährigen Thema „From Molecules to Product Innovation“ über die neuesten Entwicklungen in ihren Forschungsgebieten berichten und mit den Teilnehmern diskutieren.

### Mehr Informationen und Anmeldung unter:

[www.molecularinteractions.de](http://www.molecularinteractions.de)

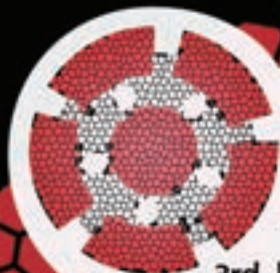
## MiCom 2012 – 3rd International Conference on Microbial Communication

5.-8. November 2012, Jena

Mikroorganismen sind wichtige Komponenten der Biosphäre, und mikrobielle Kommunikation ist ein wichtiger Antrieb des Ökosystems Erde. Die jährlich stattfindende Konferenz für Mikrobielle Kommunikation (MiCom) versucht, ein neues Verständnis für die möglichen Interaktionen und die daraus entstehenden vielen Konsequenzen sowohl auf molekularer als auch globaler Ebene zu entwickeln.

Von Studenten für Studenten: Die Jenaer School for Microbial Communication (JSMC) freut sich daher, zur 3. Internationalen Konferenz für Mikrobielle Kommunikation vom 5. bis 8. November 2012 in Jena einladen zu können. Die Konferenz wird von Studenten der JSMC organisiert und richtet sich speziell an PhD-Studenten.

„Meet the experts“ – Informelle Diskussionsrunden mit den international renommierten Hauptrednern sowie renommierten Wissenschaftlern aus Jena werden eine optimale Kommunikation unter den Teilnehmern ermöglichen.



# MiCom 2012

3rd International Conference Microbial Communication

November 5<sup>th</sup> - 8<sup>th</sup> 2012 **Jena, Germany**

## Session and keynote speakers

### Microbe-host Interactions: Symbiosis

**Prof. Martin Parniske**  
Ludwig-Maximilians University,  
Munich, Germany

### Molecular Communication

**Dr. Sigal Ben-Yehuda**  
The Hebrew University,  
Jerusalem, Israel

### Microbes in the Environment

**Prof. George Kowalchuk**  
Netherlands Institute of Ecology,  
Wageningen, The Netherlands

### Microbe-host Interactions: Pathogenesis

**Prof. Karl Kuchler**  
Medical University, Vienna, Austria

### Models and Methods

**Prof. Judith Armitage**  
University of Oxford, Oxford, UK



## Attractions

- **Keynote** addresses by leading, world-renowned researchers to serve as overviews for each session.
- **Roundtable discussions** with the keynote speakers as well as internationally renowned scientists from Jena to foster further communication.
- Thematic **poster sessions** to allow one-on-one communication.
- **Conference dinner**, city tours, pub crawling and many more **social activities** in and around Jena.

## Important Dates

Registration begins: June 2<sup>nd</sup>, 2012

**Early registration** deadline: September 2<sup>nd</sup>, 2012

**Late registration** deadline: September 30<sup>th</sup>, 2012

Abstract submission Deadline: September 30<sup>th</sup>, 2012

## Conference Fees

Early bird fees:

25€ (ISMC), 50€ (non-ISMC)

Late fees:

35€ (ISMC), 60€ (non-ISMC)



More information available here  
[micom-conference.de](http://micom-conference.de)

Follow us on



Friedrich - Schiller Universität Jena

Themen werden sein: Mikroben und Umwelt, Mikrobe-Wirt-Interaktion: Pathogenität und Symbiose, Molekulare Kommunikation, Mikroben in Modellen und Methoden. Beiträge in Form von Vorträgen oder Postern sind herzlich willkommen.

**Anmeldung, Posterbewerbungen und weitere Informationen unter:**

[www.micom-conference.de](http://www.micom-conference.de)

---

**BIOTEC FORUM 2012 –  
Bioinformatics and Computational Biology**  
6.-7. Dezember 2012, Dresden

Das BIOTEC FORUM 2012 – Bioinformatics and Computational Biology führt internationale, nationale und lokale Experten dieses Fachgebiets zusammen, um die neuesten Entwicklungen in den Bereichen Imaging, Modellierung in der Systembiologie,

Sequenzanalyse und Genomics, strukturelle Bioinformatik, Protein-Interaktionsnetzwerke sowie Hochdurchsatz-Verfahren zu diskutieren.

Seit 2007 hat sich das BIOTEC FORUM zu einer jährlich stattfindenden, offenen Veranstaltung entwickelt, die die aktuellsten Themen eines oder mehrerer Forschungsgebiete des BIOTEC-Zentrums Dresden repräsentiert. Das Format des Meetings besteht aus international renommierten Sprechern, die führend auf ihren Fachgebieten sind und über neueste wissenschaftliche Errungenschaften berichten werden. Die Veranstaltung ist offen für alle interessierten Wissenschaftler, es werden keine Konferenzgebühren erhoben. Es können eigene Beiträge in Form eines Posters während der Postersession präsentiert werden.

**Mehr Informationen finden Sie unter:**

[www.biotec.tu-dresden.de/biotec-forum](http://www.biotec.tu-dresden.de/biotec-forum)

**BIOTEC FORUM**  
„Bioinformatics and  
Computational Biology“  
December 6 - 7, 2012  
Dresden

**Speakers:**  
<external>  
Rolf Backofen/Phil Bourne/Roland Ellis/Sui Huang  
Wolfgang Huber/Markus Loeffler/Baldomero Olivera/Rob  
Russell/Chris Sander  
<local>  
Andreas Beyer/Andreas Deutsch/Michael Hille  
Lars Kaderali/Gene Myers/Ingo Roeder/Ivo  
Spalzarini/Michael Schroeder/Pavel Tomandak

[www.biotec.tu-dresden.de/biotec-forum](http://www.biotec.tu-dresden.de/biotec-forum)



## Indo-German Symposium on Systems Biology

27. - 29. November 2012, Hyderabad, Indien

Das Bioquant-Zentrum der Universität Heidelberg, das Heidelberg Zentrum Südasiens und die School of Life Sciences der Central University of Hyderabad veranstalten gemeinsam in der Universität Hyderabad, Indien, das 1. Indo-German Symposium on Systems Biology 2012. Um Kooperationen in Forschung und Lehre zu fördern, werden Wissenschaftler aus Deutschland und Indien die aktuellsten Forschungsthemen im Fachgebiet Systembiologie diskutieren. Die Schwerpunkte werden in den Bereichen Synthetische Biologie, Infektionsbiologie, Krebsforschung, Signaltransduktion, Mikroarray-Techniken, Drugdesign und der Modellierung von Stoffwechselwegen liegen.

Das Symposium möchte Wissenschaftlern aus den verschiedensten Fachdisziplinen wie Mathematik, Statistik, Physik, Chemie und Biologie eine Plattform bieten, Ideen auszutauschen und Kollaborationen ins Leben zu rufen. Die Veranstaltung richtet sich gleichermaßen an Doktoranden und Post-Doktoranden sowie Dozenten und interessierte Fachkollegen.

### Weitere Informationen unter:

[www.hcsa.uni-heidelberg.de](http://www.hcsa.uni-heidelberg.de) und [www.uohyd.ac.in](http://www.uohyd.ac.in)



Foto: davidevason – fotolia.com

## systembiologie.de

### Das Magazin für systembiologische Forschung in Deutschland – Ausgabe 05, Juli 2012

systembiologie.de ist ein halbjährlich erscheinendes Magazin mit Informationen aus der deutschen Systembiologieforschung.

**ISSN 2191-2505**

#### Herausgeber:

systembiologie.de wird herausgegeben von den Geschäftsstellen der Forschungsnetzwerke „Helmholtz-Allianz Systembiologie“ und „Virtual Liver Network“ sowie dem „Projekträger Jülich“.

#### Redaktion:

**Chefredakteur:** Prof. Dr. Roland Eils (DKFZ/Universität Heidelberg)

**Redaktionelle Koordination:** Ulrike Conrad (Helmholtz-Allianz Systembiologie, DKFZ)

#### Redaktion:

Johannes Bausch (Virtual Liver Network, Universität Freiburg), Ulrike Conrad (Helmholtz-Allianz Systembiologie, DKFZ), Dr. Jan Eufinger (Helmholtz-Allianz Systembiologie, DKFZ), Dr. Bernhard Gilleßen (PtJ), PD Dr. Klaus-Peter Michel (PtJ), Dr. Gisela Miczka (PtJ), Dr. Angela Oberthür (BioQuant, Universität Heidelberg), Dr. Yvonne Pfeiffenschneider (PtJ) und Stephanie Werner-Ried (DKFZ).

#### Anschrift:

Redaktion systembiologie.de  
c/o Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Abteilung Theoretische Bioinformatik - B080  
Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg

Der Inhalt von namentlich gekennzeichneten Artikeln liegt in der Verantwortung der jeweiligen Autoren. Wenn nicht anders genannt, liegen die Bildrechte der in den Artikeln abgedruckten Bilder und Abbildungen bei den Autoren der Artikel. Die Redaktion trägt keinerlei weitergehende Verantwortung für die Inhalte der von den Autoren in ihren Artikeln zitierten URLs.

#### Gestalterische Konzeption und Umsetzung:

LANG EundPFLANZ Werbeagentur GmbH, Speyer ([www.LPsp.de](http://www.LPsp.de))

#### Druck:

Werbedruck GmbH Horst Schreckhase, Spangenberg ([www.schreckhase.de](http://www.schreckhase.de))



#### PEFC zertifiziert

Dieses Produkt stammt aus nachhaltig bewirtschafteten Wäldern und kontrollierten Quellen  
[www.pefc.de](http://www.pefc.de)

#### Aboservice:

Das Magazin wird aus Mitteln der Helmholtz-Gemeinschaft und des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Diese Veröffentlichung ist Teil der Öffentlichkeitsarbeit der unter Herausgeber genannten Initiativen. Sie wird kostenlos abgegeben und ist nicht zum Verkauf bestimmt.

#### Wenn Sie das Magazin abonnieren möchten, füllen Sie bitte das Formular auf [www.systembiologie.de](http://www.systembiologie.de) aus oder wenden sich an:

Redaktion systembiologie.de, c/o Abteilung Theoretische Bioinformatik B080  
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Im Neuenheimer Feld 580, D-69120 Heidelberg  
[abo@systembiologie.de](mailto:abo@systembiologie.de)

# wir über uns

## die systembiologie.de-Redaktion stellt sich vor

**systembiologie.de** möchte die Erfolge der deutschen Systembiologie auf anschauliche Weise einem breiten Publikum zugänglich machen. Erstellt wird das zunächst zweimal jährlich erscheinende Heft gemeinsam durch die Geschäftsstellen der bundesweiten Systembiologienetzwerke Helmholtz-Allianz Systembiologie und Virtual Liver Network sowie dem Projektträger Jülich. Finanziert wird das Heft aus Mitteln der über den Impuls- und Vernetzungs-

fonds der Helmholtz-Gemeinschaft getragenen Helmholtz-Allianz Systembiologie und aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

---

### Die Redaktionsmitglieder von systembiologie.de (v. links n. rechts):

Ulrike Conrad (Helmholtz-Allianz Systembiologie), Klaus-Peter Michel (PtJ), Yvonne Pfeiffenschneider (PtJ), Kai Ludwig (LANGEundPFLANZ), Roland Eils (Helmholtz-Allianz Systembiologie), Jan Eufinger (Helmholtz-Allianz Systembiologie), Angela Oberthür (BioQuant), Johannes Bausch (Virtual Liver Network), Gisela Miczka (PtJ), nicht im Bild: Bernhard Gilleßen (PtJ) und Stephanie Werner-Ried (DKFZ).



# kontakt

## **Helmholtz-Allianz Systembiologie**

Koordination: Prof. Dr. Roland Eils  
Wissenschaftliches Projektmanagement: Dr. Jan Eufinger, Ulrike Conrad  
c/o Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg  
Abteilung Theoretische Bioinformatik – B080  
Im Neuenheimer Feld 580; D-69120 Heidelberg  
Email: [j.eufinger@dkfz.de](mailto:j.eufinger@dkfz.de), [u.conrad@dkfz.de](mailto:u.conrad@dkfz.de)  
[www.helmholtz.de/systemsbiology](http://www.helmholtz.de/systemsbiology)



Alliance on Systems Biology

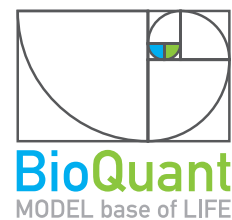
## **Virtual Liver Network**

Programmdirektor: Dr. Adriano Henney  
Wissenschaftliches Projektmanagement: Johannes Bausch  
Universität Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 327, R. 203; D-69120 Heidelberg  
Email: [johannes.bausch@virtual-liver.de](mailto:johannes.bausch@virtual-liver.de)  
[www.virtual-liver.de](http://www.virtual-liver.de)



## **BioQuant – Universität Heidelberg**

Direktorium: Prof. Dr. Roland Eils, Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich,  
Prof. Dr. Victor Sourjik  
Geschäftsleitung: Dr. Angela Oberthür  
Im Neuenheimer Feld 267; D-69120 Heidelberg  
Email: [angela.oberthuer@bioquant.uni-heidelberg.de](mailto:angela.oberthuer@bioquant.uni-heidelberg.de)  
[www.bioquant.uni-heidelberg.de](http://www.bioquant.uni-heidelberg.de)



## **Projekträger im Forschungszentrum Jülich GmbH – PtJ**

Abteilung BIO5  
Ansprechpartner: Dr. Gisela Miczka, Dr. Yvonne Pfeiffenschneider  
Email: [g.miczka@fz-juelich.de](mailto:g.miczka@fz-juelich.de), [y.pfeiffenschneider@fz-juelich.de](mailto:y.pfeiffenschneider@fz-juelich.de)  
Abteilung BIO3  
Ansprechpartner: Dr. Klaus-Peter Michel  
Email: [k.michel@fz-juelich.de](mailto:k.michel@fz-juelich.de)  
Wilhelm-Johnen-Straße; D-52425 Jülich  
[www.fz-juelich.de/ptj](http://www.fz-juelich.de/ptj)



# INTERNATIONAL CONFERENCE on the SYSTEMS BIOLOGY OF HUMAN DISEASE

## JUNE 12-14, 2013

ORGANIZED BY

**Roland Eils** – DKFZ and Heidelberg University

**Peter Sorger** – Harvard Medical School Boston

GERMAN CANCER RESEARCH CENTER (DKFZ)  
COMMUNICATION CENTER  
IM NEUENHEIMER FELD 280  
D-69120 HEIDELBERG, GERMANY

See Details @

[www.sbhd2013.org](http://www.sbhd2013.org)

Supported by:

