

spezial: imaging ab seite 8

die beugungsgrenze überwunden

neue hochauflösende mikroskopische
verfahren für die biomedizin **seite 52**

interview mit josef alfons käs

zellen sind ein musterbeispiel für
weiche materie **seite 24**

simulierte leberregeneration

wie computerprogramme biologische
prozesse in lebendem gewebe
vorhersagen **seite 35**

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 neuen Magazin systembiologie.de, wie dieser faszinierende und aufstrebende Wissenschaftszweig arbeitet und welche Antworten er auf die bislang ungelösten Fragen des menschlichen Lebens findet.



Titelbild: Collage aus Abbildungen der 3. Ausgabe systembiologie.de
(Bildrechte: siehe jeweilige Artikel)

grußwort

Liebe Leserinnen und Leser,



biologische Prozesse in ihrer Gesamtheit zu verstehen, ist Aufgabe der Systembiologie. Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten dieses einzigartigen Forschungsansatzes machen ihn zu einem Schlüsselbereich der Lebenswissenschaften. Die Systembiologie vereint die Stärken von Bio- und Informationstechnologie, erzeugt interdisziplinäre Synergien und schafft zukunftsfähige Lösungen für globale Herausforderungen.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung hat diesen Forschungszweig in den vergangenen sechs Jahren intensiv gefördert. Heute zählt Deutschland in der Systembiologie zu den weltweit führenden Standorten. Das Verständnis von Lebensprozessen und die Entwicklung prädiktiver mathematischer Modelle geben Impulse für Ideen und Innovationen in Gesundheitsforschung und Bioökonomie. Von der Systembiologie erwarten wir uns in der Zukunft insbesondere Beiträge zur Entwicklung von Medikamenten, neuen pharmakologisch und diagnostisch relevanten Biomarkern sowie individuellen Therapieansätzen. Neben medizinischen Erkenntnissen liegt ein Schwerpunkt auch auf der Lösung drängender Fragen zur Energieversorgung mit nachwachsenden Rohstoffen.

Die Erhebung der experimentellen Daten wird dabei im Wesentlichen durch die Entwicklung und Optimierung neuer Methoden und Technologien beschleunigt. Um beispielsweise die quantitative Auswertung kompletter Gewebeschnitte zu erleichtern, müssen wir den Übergang von den heute üblicherweise eingesetzten semiquantitativen mikroskopischen Verfahren zu neuen bildgestützten Verfahren schaffen. Besonderes Augenmerk erfahren deshalb bildgebende Verfahren, die eine Abbildung von Molekülen in ihrer natürlichen Umgebung und im intakten Gewebe ermöglichen.

Die vorliegende dritte Ausgabe der Zeitschrift systembiologie.de gibt einen Einblick in die Entwicklung bildgebender Verfahren und ihrer Anwendungen und stellt die aktuellen Beiträge deutscher Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler zu diesem Forschungsfeld vor. Ich wünsche den Leserinnen und Lesern viele interessante Erkenntnisse und wichtige Hinweise zur Zukunft der Systembiologie.

Ihnen allen wünsche ich eine anregende Lektüre!

Prof. Dr. Annette Schavan, MdB

Bundesministerin für Bildung und Forschung

grußwort

Liebe Leserinnen und Leser,



die Mission der Helmholtz-Gemeinschaft besteht darin, sich den großen und drängenden Fragen der Gesellschaft zu widmen. Dazu gehört auch, dass wir uns regelmäßig die Frage stellen, ob wir das Richtige tun und ob wir diese Dinge auch richtig angehen. Diesen Prozess begleiten wir in der Gemeinschaft unter anderem durch den Helmholtz Think Tank, dem einige unserer besten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler angehören. Ihre Aufgabe ist es, wichtige Zukunftsthemen aus den Bereichen Strategie und Wissenschaft zu identifizieren, kritisch zu diskutieren und mit Blick auf eine zukünftige Rolle für die Gemeinschaft zu hinterfragen.

Als eines der ersten Themen für eine intensive Diskussion hat der Think Tank die Synthetische Biologie, ein Spin-off der Systembiologie, ausgewählt und als ein potientes bereichsübergreifendes Forschungsthema identifiziert. Die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Biologen, Chemikern und Ingenieuren in dieser jungen Disziplin könnte es künftig ermöglichen, Moleküle und Zellen gezielt zu designen und dadurch vollkommen neue Anwendungs- und Einsatzmöglichkeiten zu erschließen. Um eine breite Diskussion der Chancen und Risiken zu ermöglichen, hat der Think Tank einen Workshop initiiert, an dem neben Vertretern aus den Helmholtz-Forschungsbereichen Gesundheit, Erde und Umwelt, Schlüsseltechnologien und Energie auch internationale Spezialisten aus diesem Gebiet teilnahmen.

Durch eine detaillierte Analyse des Potentials der synthetischen Biologie für die einzelnen Forschungsbereiche und das Forschungsportfolio der Helmholtz-Gemeinschaft insgesamt wurden erste Empfehlungen für Themen und geeignete Mittel zur Integration des Forschungsfeldes erarbeitet.

Eines der wichtigsten Ergebnisse des Workshops ist die Erkenntnis, dass die synthetische Biologie entscheidende Beiträge und Impulse in allen genannten Forschungsbereichen leisten kann und damit als bereichsübergreifende Initiative hervorragend das Portfolio der Helmholtz-Gemeinschaft ergänzen würde. Eine faszinierende Möglichkeit dieser Zukunftstechnologie ist beispielsweise die effiziente Herstellung von Ethanol mit Hilfe speziell entwickelter Mikroorganismen. Dadurch wird weniger wertvolle Ackerfläche für die Herstellung von Biokraftstoffen benötigt. Ein anderes Einsatzgebiet etabliert sich derzeit in der Medizin im Bereich der Optogenetik, in der Licht als Schalter für genetische Prozesse eingesetzt wird. Dies eröffnet vollkommen neue Möglichkeiten in der gezielten Steuerung molekularer Prozesse in einzelnen Zellen.

Ich wünsche Ihnen viel Vergnügen bei der Lektüre dieser Ausgabe von systembiologie.de!

A handwritten signature in blue ink that reads "Jürgen Mlynek". The signature is fluid and cursive.

Ihr Jürgen Mlynek

Präsident der Helmholtz-Gemeinschaft

vorwort

Zwischen den Zeilen...



müssen Sie, liebe Leserinnen und Leser, in dieser Ausgabe der *systembiologie.de* nicht lesen, um die Bedeutung der Bildlichkeit in der Systembiologie zu verstehen. Wenn man in diesem Heft auch keine neuen Vor-Bilder in der Systembiologie findet, gewährt dieses Heft vielfältige Einsichten in die faszinierende Welt der bildgebenden Verfahren. Diese haben in den letzten beiden Jahrzehnten einen stürmenden Einzug in die quantitative Biologie gehalten. Sie werden die Lebenswissenschaften langfristig mehr beeinflussen als die heute hochgepriesenen, molekularen Hochdurchsatztechnologien. Diese Wunderwaffen der Molekularbiologie erzeugen eine Flut von Daten, die sich jedoch einer intuitiven Interpretation entziehen. Bildgebende Verfahren liefern zwar *per se* keine Erkenntnis, jedoch generieren sie Bilder, die einer intuitiven Interpretation sehr viel näher sind als unendlich lange Buchstaben- oder Zahlenketten.

Gottfried Böhm, Ordinarius für Neuere Kunstgeschichte an der Universität Basel und Herausgeber maßgeblicher Bücher zur Bildtheorie, spricht von einem tief verankerten Bedürfnis im Menschen nach dem Bildlichen. Die Frage, was ein Bild ist und welche Bedeutung das Bildliche hat, sei schließlich so alt wie unsere Kulturgeschichte. Der *homo pictor*, der Höhlenmaler, steht geschichtlich vor dem *zoon logon echon*, dem in Begriffen denkenden, vernunftbegabten Wesen. Das Bild, bei Platon noch unter Generalverdacht, ist längst zu einem bedeutenden Werkzeug der modernen Natur- und Lebenswissenschaften geworden und bestimmt unser Alltags- und Wissenschaftsleben in stetig steigendem Maße.

So überrascht nicht, dass die Systembiologie, jene Disziplin, die sich definitionsgemäß mit komplexen Begrifflichkeiten und Zusammenhängen beschäftigt, sich immer mehr der Bildlichkeit bedient. Ganz im Sinne von Platon in seinem Werk *Sophistes*, der das Sehen-Lassen als „etwas zu seinem Sein führen“ bezeichnet, dienen hier Bilder dazu, biologische Formen sichtbar zu machen, ja förmlich ins Leben, ins Sein zu berufen.

Beim Vorstoß in den Mikrokosmos der Zellen und die Nanowelt von Molekülen sehen sich die Pioniere bildgebender Verfahren mit großen technischen Herausforderungen konfrontiert. Ein hohes Maß an Beharrlichkeit, Erfindergeist und Ingenieurskunst haben die hochauflösende Lichtmikroskopie revolutioniert. Fast eineinhalb Jahrhunderte lang galt ein zentrales Theorem der Optik zur räumlichen Auflösungsgrenze als unüberwindbar. Pfiffige Ideen gepaart mit theoretischen Überlegungen haben jedoch zur Überwindung jener fest zementiert geglaubten Auflösungsgrenzen in der Lichtmikroskopie geführt (siehe Artikel v. Stefan Hell, Seite 52). Wir können zu Recht stolz darauf sein, dass diese Entwicklungen von Forschern im Land der Dichter und Denker, aber auch der Tüftler und Erfinder, vorangetrieben wurde. Verspielter Geist, den man sonst hauptsächlich Kindern attestiert, weht allerorten im Land der Systembiologie. Dieser Erfindungsgeist erschließt faszinierende, neue Anwendungsfelder der Systembiologie, von der Stammzellenforschung bis hin zur Biomechanik von Tumorzellen.

Zur anthropologischen Frage, was ein Bild sei, bemerkt Böhm, dass jedes Bild seine Bestimmungskraft aus der Liaison mit dem Unbestimmten ziehe. Das Unbestimmte und Potenzielle sei der tragende Grund für das Bildliche. So ziehen die Bilder in der Systembiologie ihre Faszination aus dem Versprechen, Unsichtbares sichtbar und Unverständliches verständlich zu machen.

Willkommen in der schönen, neuen Welt der Bilder der Systembiologie!

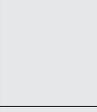
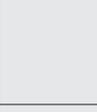
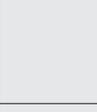
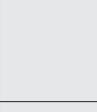
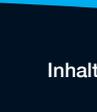


Ihr Roland Eils

Chefredakteur

inhalt

grußwort Bundesministerin für Bildung und Forschung, Prof. Dr. Annette Schavan, MdB	3	
grußwort Prof. Dr. Jürgen Mlynek	4	
vorwort Prof. Dr. Roland Eils	5	
das potenzial von bildanalysen für die systembiologie von Marino Zerial und Yannis Kalaidzidis	8	
die entscheidung zwischen leben und tod verstehen <i>Quantitative Studien des Zelltods</i> von Nathan Brady	12	
ein fadenwurm bereichert die systembiologie <i>Caenorhabditis elegans ist einer der elegantesten Modellorganismen</i> von Marlon Stoeckius	16	
fluoreszenznanoskopie mit schaltbaren fluoreszenzsonden <i>Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie und Einzelmoleküldetektion ermöglichen neue Einblicke in zelluläre Prozesse</i> von Sebastian Malkusch, Ulrike Endesfelder, Meike Heidbreder und Mike Heilemann	20	
porträt: josef alfons käs Zellen sind ein Musterbeispiel für weiche Materie von Stefanie Reinberger	24	
interaktionen zwischen hirnarealen bestimmen, was wir tun <i>Modellbildungen tragen zum Verständnis der Hirnfunktion bei</i> von Simon B. Eickhoff und Karl Zilles	26	
die funktionsweise der netzhaut <i>Neue Erkenntnisse durch die Systembiologie</i> von Stephan Meding und Axel Walch	31	
simulierte leberregeneration <i>Wie Computerprogramme biologische Prozesse in lebendem Gewebe vorhersagen</i> von Dirk Drasdo, Stefan Hoehme und Jan G. Hengstler	35	
aus wie vielen zellen besteht die leber? <i>Neue Bildanalyseverfahren ermöglichen die quantitative Auswertung von kompletten Gewebeschnitten</i> von André Homeyer, Andrea Schenk, Uta Dahmen, Michael Schwier, Tobias Preusser und Olaf Dirsch	39	
neuigkeiten aus dem BMBF	44	
neuigkeiten der helmholtz-allianz systembiologie	48	
die beugungsgrenze überwunden <i>Neue hochauflösende mikroskopische Verfahren für die Biomedizin</i> von Stefan Hell	52	

was bewegt zellen? Aktivitätssensoren geben Einblick in die Kontrolle der Zelldynamik von Perihan Nalbant	56	
die dynamik des zellskeletts Wie molekulare „Speckles“ die Bausteine der Zelle sichtbar machen von Leif Dehmelt	59	
porträt: timm schroeder Der Mann, der Licht ins Dunkel der Blackbox bringt von Stefanie Reinberger	62	
BioQuant Interdisziplinäres Zentrum für Systembiologie an der Universität Heidelberg von Angela Oberthür und Roland Eils	64	
das nikon imaging center der universität heidelberg Kollaboration zwischen Forschung und Industrie im Bereich der modernen Lichtmikroskopie von Peter Bankhead und Ulrike Engel	68	
mikroskopie auf höchstem level Das Life Imaging Center (LIC) im Zentrum für Biosystemanalyse (ZBSA) der Universität Freiburg von Roland Nitschke	74	
auf den spuren des pflanzenwachstums Neue Mikroskopietechnik macht molekulare Prozesse der Wurzelbildung sichtbar von Klaus Palme, Bingshan Wang, Franck Ditengou, Roland Nitschke, Alexander Dovzhenko, Rainer Uhl und Olaf Ronneberger	76	
verteilung therapeutischer antikörper im tumorgewebe Räumlich-zeitliche Multiskalenverfahren zur Modellierung und Simulation von Tumorthapien von Holger Perfahl und Matthias Reuss	80	
firmenporträt: till photonics gmbh Innovative Techniken der Lichtmikroskopie von Frank Lison	84	
wo hochleistungslichtmikroskope nicht nur genutzt, sondern konzipiert werden Das BioImaging Zentrum (BIZ) der Ludwig-Maximilians-Universität München von Rainer Uhl	86	
genome-based systems biology Deutschlands erster Master-Studiengang zur Systembiologie an der Universität Bielefeld von Frank-Jörg Vorhölter, Alf Pühler und Karsten Niehaus	88	
gegen altersblindheit ist ein moos gewachsen Freiburger Systembiologen entwickeln ein Medikament gegen die Altersbedingte Makuladegeneration von Ralf Reski, Eva Decker und Sabine Stebel	91	
GerontoSys Neue Wege in der Altersforschung von Petra Boukamp, Jürgen Sühnel, Heinz D. Osiewacz und Björn Dreesen	95	
heidelberg und mannheim werden zum mekka für systembiologen Die 12. Internationale Konferenz für Systembiologie (ICSB) 2011 – 28. August – 01. September 2011 von Klaus-Peter Michel, Jan Eufinger, Ulrike Conrad, Angela Oberthür und Roland Eils	98	
news	101	
events	106	
impressum, wir über uns und kontakt	109	

das potenzial von bildanalysen für die systembiologie

von Marino Zerial und Yannis Kalaidzidis

Ziel der Systembiologie ist es, zu verstehen, wie die vielen verschiedenen Moleküle beim Aufbau der Zellen, Organe und schließlich des gesamten Organismus zusammenwirken. Das systembiologische Verständnis eines biologischen Systems hat auch für die Wirtschaft ein riesiges Potenzial, da es uns ermöglicht, die Auswirkungen einer Störung (Krankheit oder Arzneimittel) vorauszusagen. In Anerkennung dieses Potenzials hat das BMBF in die Erforschung eines Multiskalenmodells der Leber (Virtual Liver Network, Kompetenznetzwerk „Die Virtuelle Leber“, VLN) erhebliche Investitionen getätigt. Im VLN stellen Bildgebungsverfahren eine Schlüsseltechnologie zur Erfassung systembiologischer Daten dar. Neueste Entwicklungen in der Lichtmikroskopie und der Bildanalyse haben den Wissenschaftlern völlig neue Wege eröffnet, biologische Systeme zu betrachten und deren Strukturen zu enträtseln.

Was, wann und wo – Fragen von Bedeutung für die Systembiologie

In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat die Genomsequenzierung in Kombination mit analytischen Technologien die systematische Untersuchung zellulärer Komponenten ermöglicht. Die funktional-genomischen Verfahren dienen der Untersuchung der Funktion einzelner Gene in bestimmten Zellprozessen (Collinet *et al.*, 2010; Rink *et al.*, 2005). Das Katalogisieren verschiedener, in einer Zelle exprimierter Moleküle ist jedoch nicht ausreichend, um die Mechanismen zu rekonstruieren, mit deren Hilfe die einzelnen Moleküle über Signal- oder Stoffwechselwegen interagieren oder sich als Organellen zusammenfinden, um Zellen und Gewebe zu bilden. Es ist ebenso erforderlich, Informationen über die räumlich-zeitlichen Muster solcher Moleküle zu erhalten, wo und wann sie sich in ein bestimmtes intrazelluläres oder extrazelluläres Kompartiment eingrenzen. Einer der Gründe, warum diese Fragestellung noch ungelöst bleibt, ist der Mangel an präzisen Informationen über die interzelluläre Verteilung und Quantität der Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Funktion in der Zelle bzw. dem Gewebe.

Die Lichtmikroskopie ist die Hauptquelle für genaue Informationen über die räumliche und zeitliche Organisation biologischer Systeme vom Einzelmolekül über subzelluläre Strukturen bis hin zum Organ. In den letzten Jahren wurden die lichtmikroskopischen Verfahren derart weiterentwickelt, dass sie heute in der Lage sind, eine Auflösung, einen dynamischen Bereich und Durchsatz in bisher unerreichten Dimensionen bei der Bildgebung und Analyse biologischer Proben zu bieten. Zum Beispiel wurden verschiedene mikroskopische Technologien (STED, PALM-STORM) entwickelt, womit die Auflösungsgrenze der Strahlenbeugung überwunden wurde – was mehr als 100 Jahre unmöglich erschien. Mit diesen Technologien ist es möglich, zelluläre Strukturen bis zur Größe von 20–30 nm sichtbar zu machen, das ist eine etwa zehnfach höhere Auflösung als bei konventionellen lichtmikroskopischen Technologien. Eine weitere Verbesserung stellt die Entwicklung der SPIM-Mikroskopie dar (Selective Plane Illumination Microscopy), mit der 3D-Bilder von dickeren Proben wie Organen und Organismen erstellt werden können. Innovative Lösungen haben zur Steigerung der Empfindlichkeit und Erweiterung des dynamischen Detektionsbereichs (sub)zellulärer Strukturen beigetragen. Dies ist ein wichtiger Punkt, insbesondere bei der hochfrequenten Bilderfassung einer lebenden Zelle (mit bis zu tausend Bildern pro Sekunde) mit langen Beobachtungszeiten (oft mehrere Tage lang). Rechnergestützte Mikroskope wurden entwickelt, die automatisch hunderttausende hochauflösende, mehrfarbige Bildaufnahmen pro Tag machen können. Diese Beispiele geben einen Eindruck der derzeit stattfindenden Revolution in der Lichtmikroskopie, welche verspricht, der Systembiologie bisher unerreichte Datenqualitäten zur Verfügung zu stellen.

Wenn die bildliche Darstellung von Zellen und Geweben ein unerlässlicher Schritt für die Untersuchung von biologischen Prozessen ist, ist es jedoch erforderlich, dass mechanistische Informationen aus diesen Bildern unverzerrt und fehlerfrei extrahiert werden können. Ein Beispiel für detailreiche Bilder von primären Leberzellen (Hepatozyten), die *in vitro* gewachsen sind, ist in Abbildung 1 dargestellt. Im Bild sind subzelluläre Organellen (Endosome) als punktförmige Gebilde zu sehen, in denen Nährstoffe



Prof. Marino Zerial und Dr. Yannis Kalaidzidis entwickelten eine innovative multidisziplinäre Strategie, die viele Technologien zu einem großen Analysesystem verbindet: Hochdurchsatz-funktionelle Studien, automatische, hochauflösende Mikroskopie, quantitative Bildanalyse und Rechenpower.

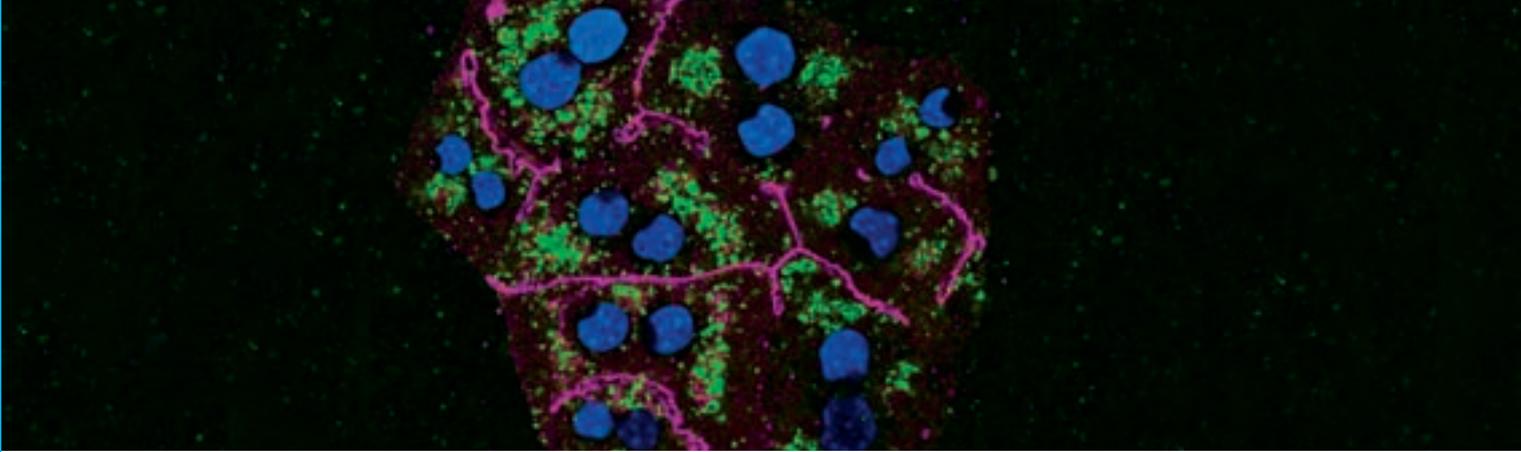
und Signalmoleküle, die selektiv aus der Umgebung in die Zelle eingeschleust wurden, konzentriert und verteilt werden. Dieser Aufnahmeprozess (Endozytose) ist für unsere Zellen lebenswichtig (Schenk *et al.*, 2008). Es ist leicht nachzuvollziehen, warum solche Prozesse auf der mechanistischen Ebene verdeutlicht werden müssen, damit ein systemisches Verständnis der Zell- und Gewebeorganisation und der Organfunktion insgesamt entstehen kann. Dennoch wurde bisher im Arbeitsfeld der Signaltransduktion die räumliche und zeitliche Verteilung der Signalmoleküle außer Acht gelassen. Demzufolge entstand die Notwendigkeit für ein Kompetenznetzwerk in der Leberforschung (VLN), das den Prozess der Endozytose mit den Mechanismen der Stoffwechsel- und Signalübertragungswege sowie der Zellpolarität und Gewebebildung zu integrieren versucht.

Hochmoderne Bildanalysetechnologie zur Darstellung von Endosomen in Leberzellen

Die bildliche Darstellung und Quantifizierung zellulärer Organellen (z. B. Endosomen) ist eine große Herausforderung. Die Größe von Endosomen variiert zwischen 100 nm und 1–2 μm (Abb. 1) und die Anzahl spezifischer molekularer Bestandteile kann um das Zwei- bis Dreifache schwanken (Ohya *et al.*, 2009). Eine rechnergestützte Herangehensweise ist erforderlich für die unverzerrte, präzise und quantitative Schätzung der Vielzahl der abgebildeten Strukturen und deren molekularer Zusammensetzung. Obwohl die rechnerische Bildverarbeitung in der Biologie teilweise schon genutzt wird, sind die meisten verwendeten Verfahren unzureichend, um quantitative Parameter aus Bilddaten zu extrahieren. Pixel-basierte Algorithmen, deren Anwendung in kommerziellen und akademischen Softwareprogrammen verbreitet ist, sind anfällig dafür, entweder ein Großteil der blassen Strukturen zu übergehen oder hell erleuchtete Strukturen zu Klumpen zu verschmelzen. Gleichzeitig sind diese Algorithmen für eine quantitative Schätzung individueller Strukturparameter zu ungenau, wenn die Größe der Struktur sich der Strahlenbeugungsgrenze konventioneller Mikroskope annähert.

Um dieses Problem zu lösen, haben wir uns für die Segmentation als Herangehensweise entschieden, die traditionell zur Darstellung einzelner Moleküle angewendet wird und eine Annäherung der Fluoreszenzintensität über eine Basisfunktion, d. h. die Punktspreadsfunktion des Mikroskops beinhaltet. Wir haben die Anpassung durch Summierung der Basisfunktionen erweitert, um eine genaue Beschreibung der „Freiform“-Objekte liefern zu können. Diese Herangehensweise wurde bereits bei vielen (hundert bis tausenden) Objekten mit dem MotionTracking/Kalamoscope-Softwareprogramm umgesetzt. Die Software kann für jede in einem Bild dargestellte Zelle genaue statistische Daten über die Anzahl der Strukturen und deren Größe, die Konzentration von Markermolekülen sowie die intrazelluläre Verteilung im Verhältnis zur Zell- und Gewebeorganisation liefern. Diese Bildanalyse-Plattform kombiniert mit mathematischer Modellierung ermöglichte die Beschreibung grundlegender Bauprinzipien der Endozytose (Del Conte-Zerial *et al.*, 2008). Das Programm wurde zusätzlich erweitert, um hoch präzise Schätzungen des Zellumfangs, der Zellform und der Zell-Zell-Kontakte durchführen zu können. Diese Funktionalitäten sind für die dreidimensionale Darstellung der Organisation des Lebergewebes äußerst wichtig.

In einem multidisziplinären Ansatz für Hochdurchsatz-Bildanalyse wurde die prinzipielle Machbarkeit der Analyse solcher molekularer Mechanismen, die den endosomalen Transport und die Zellform regulieren (Collinet *et al.*, 2010), nachgewiesen. Wir haben Grundsätze für den Aufbau des endozytischen Systems abgeleitet, um die Funktion einiger neuer Gene vorauszuberechnen. Interessanterweise hat diese systemische Untersuchung erstmals aufdecken können, dass Zellen die Verteilung der Signalmolekülfracht innerhalb der Endosome sehr genau steuern. Dies steht im Einklang mit der Auffassung, dass die Signaltransmission von der Zelloberfläche zum Zellkern vom endosomalen System mittels neuartiger Mechanismen und Strukturgrundsätze gesteuert wird. Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit der räumlichen und zeitlichen Beurteilung der zellulären Bestandteile für ein systemisches Verständnis der Zellorganisation und der Bildung eines Gewebes.



Primäre Hepatozyten nach 6 Tagen im 3D Kollagen-Sandwich-Kultur-System, gefärbt mit dem lysosomalen Marker Lamp1 (grün), Tight Junction Marker ZO1 (rot, lässt die Gallenkanälchen erkennen) und mit einem Marker des Zellkerns (blau).

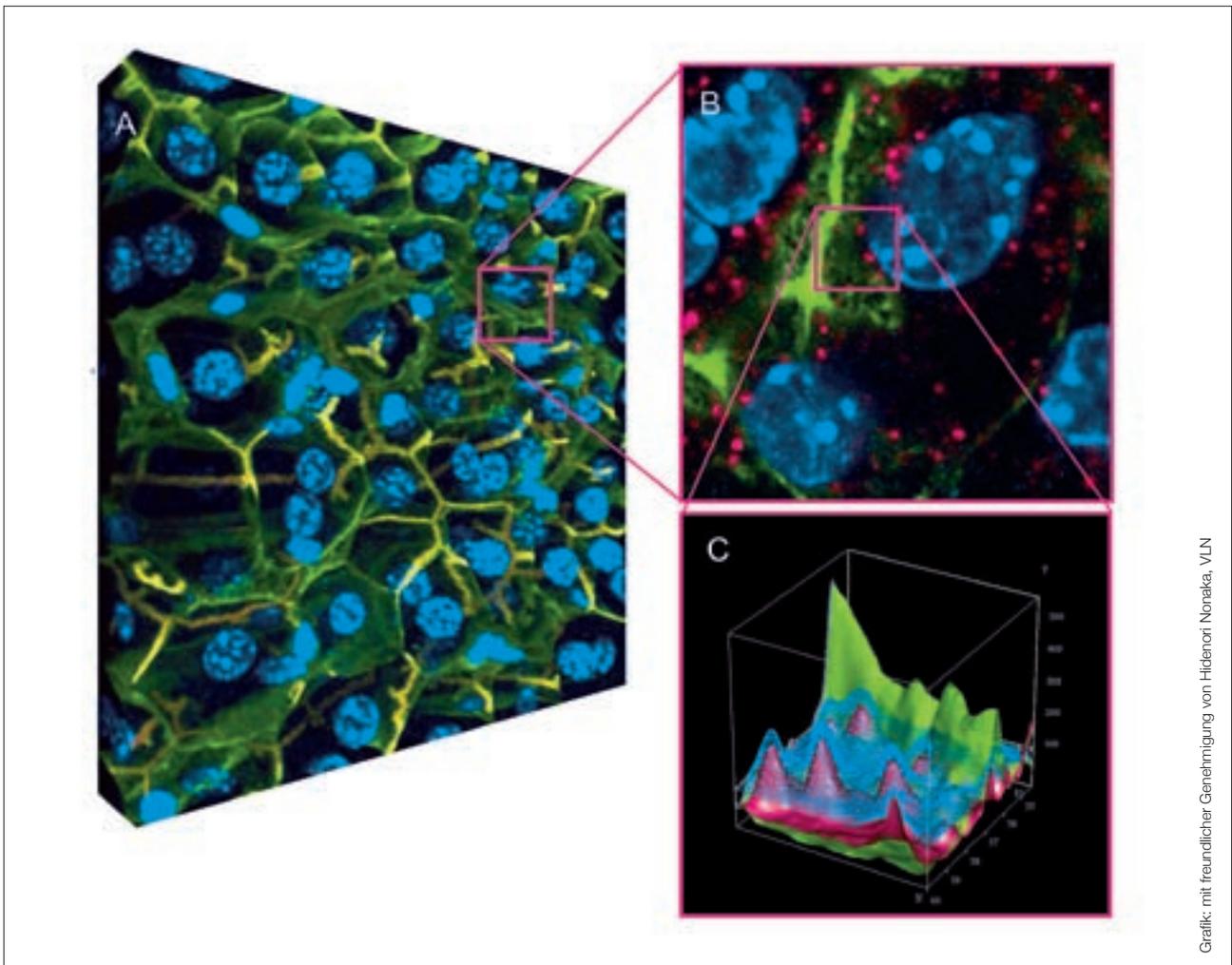
Bildanalyse und die Entwicklung neuer Therapien

Die moderne Mikroskopie bietet einen neuen Weg zur Gewinnung funktioneller Informationen aus Bildern. Störungen, verursacht durch genetische Mutationen, Chemikalien oder pathogene Keime (Viren, Bakterien), können unter Ausnutzung der verfügbaren multidimensionalen Daten untersucht

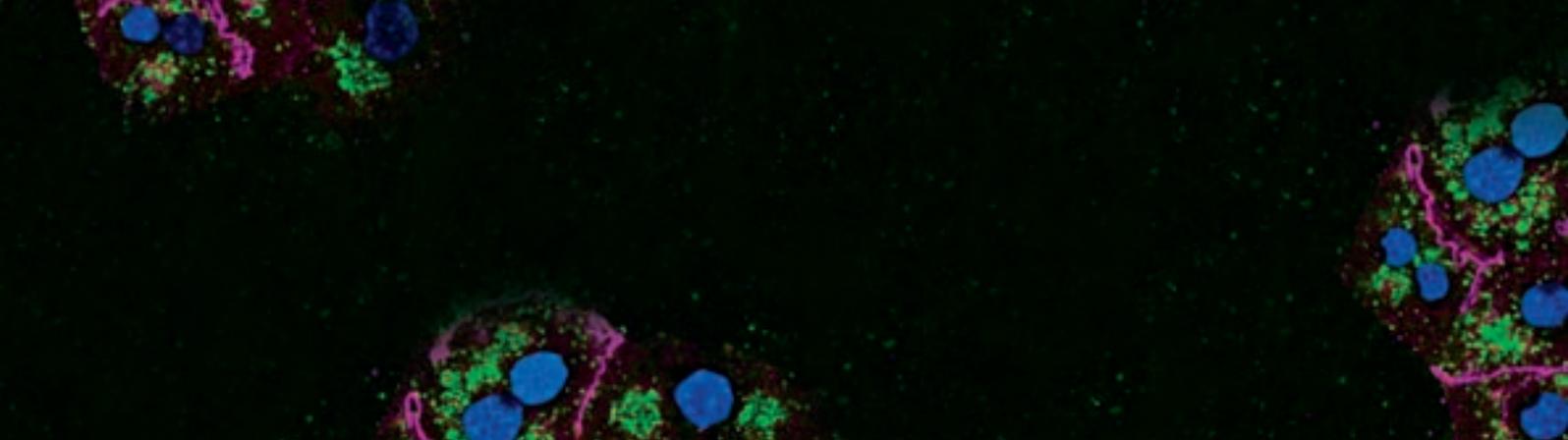
werden. Aufgrund der quantitativen Daten können wir mathematische Modelle zur Beschreibung der beobachteten Prozesse erzeugen. Im Hochdurchsatz bietet diese Technologie die Möglichkeit, die Komplexität zellulärer Netzwerke zu erforschen und zwischen möglichen mathematischen Modellen zu unterscheiden. Die quantitative Bildanalyse kann Inno-

Abbildung 1: 3D-Rekonstruktion eines Leberschnittes

Die Zellen wurden mit 4 Farben markiert: Zellkerne - blau (DAPI), Actinfilamente - grün (Phalloidin), apikale Zellmembran (Gallenkanälchen) - gelb (CD3), Endosome - rot (EEA1). In den Einsatzfenstern sind zu sehen 1) eine höhere Vergrößerung der Zellen und Organellen und 2) die Bildanalyse der Fluoreszenzsignale mit Darstellung der ursprünglichen Intensität des Actinfilamentmarkers (grün) und des Endosommarkers (EEA1, rot). Das blaue Netz zeigt die Approximation der Markerverteilung auf den Endosomen, erstellt mit einem Satz von Basisfunktionen.



Grafik: mit freundlicher Genehmigung von Hidenori Nonaka, VLN



vationen bei der Entwicklung von Arzneimitteln einbringen, weil es damit nicht nur möglich ist, die Eigenschaften neuer bioaktiver Wirkstoffe prädiktiv zu erfassen, sondern auch deren mögliche Nebenwirkungen auf Zell- oder Organebene zu beurteilen. Dies ist besonders wichtig im Zusammenhang mit Leberentgiftung und stellt somit ein wichtiges Ziel des Kompetenznetzwerkes VLN mit hoher Relevanz für die pharmazeutische Industrie dar.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Kompetenznetz „Die Virtuelle Leber“ (Virtual Liver Network) ist eine nationale Initiative, die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert wird. Zum Netzwerk Virtuelle Leber gehören siebzig Forschungsgruppen, die über ganz Deutschland verteilt sind. Zur Unterstützung der eigenen Arbeiten baut das Netzwerk Verbindungen zu anderen Forschungsgruppen und internationalen Initiativen auf. Die Virtuelle Leber strebt ein dynamisches Modell an, das Physiologie, Morphologie und Funktion der menschlichen Leber zwar nicht vollständig nachbildet, jedoch modellhaft abbildet. Dabei werden quantitative Daten aus allen Organisationsstufen der Leber in das Modell integriert. Programmdirektor ist Adriano Henney.

www.virtual-liver.de

Internet-Homepage der Arbeitsgruppe:

<http://www.mpi-cbg.de/research/research-groups/marino-zerial.html>

Referenzen:

Collinet, C., Stöter, M., Bradshaw, C.R., Samusik, N., Rink, J.C., Keniski, D., Habermann, B., Buchholz, F., Henschel, R., Mueller, M.S., Nagel, W.E., Fava, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2010) System Survey of Endocytosis by Functional Genomics and Quantitative Multi-Parametric Image Analysis. *Nature* 464 (7286), 243-9.

Del Conte-Zerial, P., Bruschi, L., Rink, J.C., Collinet, C., Kalaidzidis, Y., Zerial, M., and Deutsch, A. (2008). Membrane identity and GTPase cascades regulated by toggle and cut-out switches. *Mol. Syst. Biol.* 4, 206.

Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, U., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2009) Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature* 459, 1091-7.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122(5), 735-49.

Schenck, A., Goto-Silva, L., Collinet, C., Rhinn, M., Giner, A., Habermann, B., Brand, M., and Zerial, M. (2008) The Endosomal Protein Appl1 Mediates Akt Substrate Specificity and Cell Survival in Vertebrate Development. *Cell* 133, 486-97.

Kontakt:

Prof. Dr. Marino Zerial

Geschäftsführender Direktor

zerial@mpi-cbg.de

Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik
Dresden

Dr. Yannis Kalaidzidis

kalaidzi@mpi-cbg.de

Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik
Dresden

die entscheidung zwischen leben und tod verstehen

Quantitative Studien des Zelltods Die Forschungsgruppe „Translationale Systembiologie“ in Heidelberg

von Nathan Brady

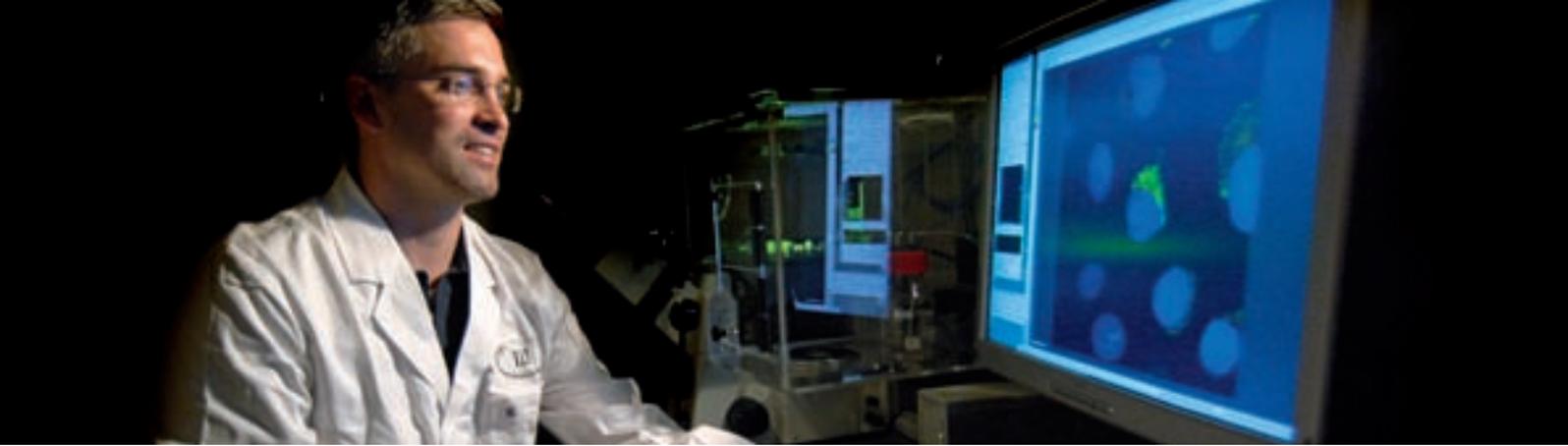
Damit mehrzellige Organismen, ausgehend von einfachen Schleimpilzen bis hin zum Menschen, überleben können, müssen bestimmte Zellen im Körper sterben. Dieser für unzählige Prozesse kritische Mechanismus wird als programmierter Zelltod bezeichnet. Fehler im Entscheidungsprozess zwischen Leben und Tod hängen mit dem Entstehen zahlreicher Krankheiten zusammen. Ungleichgewichte zwischen Todes- und Überlebenssignalen in Krebszellen sind ein Hauptgrund für die Entwicklung von Tumoren und dem Mangel an effektiven Therapien. Um diese zu verbessern, sind ein besseres Verständnis dieser Fehler und das Wissen, wie diese Wege des programmierten Zelltodes beeinflusst werden können, notwendig. Eine wichtige Herausforderung zum Verständnis dieser fundamentalen Prozesse ist die Fähigkeit hochkomplexe Prozesse, die nicht nur in isolierten Zellen sondern auch in Zellpopulationen und Geweben passieren, detailliert zu beschreiben. Mithilfe der hochauflösenden Mikroskopie sind wir in der einmaligen Lage, die Maschinerie zu beobachten, die für die zellulären Entscheidungen zwischen Leben und Tod verantwortlich ist. Die mathematische Modellierung hilft dann bei der Generierung neuer Hypothesen. Mit diesen Methoden wollen wir dazu beitragen, optimale Behandlungsstrategien zu finden, die entweder Krebszellen wieder sensitiv gegenüber Todessignalen machen oder den Zelltod in anormalen Zellen induzieren können.

Alle Zellen in unserem Körper enthalten alternative Mechanismen, um potent verschiedene programmierte Formen des Zelltods auszulösen. Ein Verlust der Regulation des Zelltods ist der Auslöser zahlreicher Krankheiten. Ungewünschter Zelltod führt in chronischen wie in akuten Krankheiten wie Herzversagen oder Neurodegeneration zum Verlust von unersetzlichen Zellen. Im Gegensatz dazu ist bei Krebs die unkontrollierte Vermehrung von Zellen teilweise Folge des Ausfalls der Zelltodmechanismen.

Daher stellt die Erforschung des programmierten Zelltodes eine fundamentale Herausforderung in der Biologie dar. Unsere neue Forschungsgruppe „Translationale Systembiologie“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg konzentriert sich auf Zelltodmechanismen in Krebszellen aus dem Pankreas, der Brust und dem Nervensystem. Durch eine Fusion von quantitativen experimentellen und theoretischen Herangehensweisen möchte unser Labor ein detailliertes Verständnis der dem programmierten Zelltod zugrundeliegenden Mechanismen und der Folgen von Störungen bei der Krebsentstehung schaffen. Dadurch hoffen wir, auch neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Mitochondrien können zu Auslösern des Zelltods werden

Die Apoptose, der bestuntersuchte Modus des programmierten Zelltods, kann über zwei Wege aktiviert werden. Der extrinsische Weg wird durch extrazelluläre Signalmoleküle ausgelöst, die sogenannte Todesrezeptoren auf der Zellmembran aktivieren. Der intrinsische (mitochondrielle) Weg stellt einen internen Mechanismus dar, der Zellen mit schweren Störungen in den Selbstmord treibt (s. Abb. 1). Dadurch wird sichergestellt, dass sich diese Zellen nicht vermehren können. Beide Wege werden durch Caspasen, Protein-abbauende Enzyme aus der Cystein-Protease-Familie, aktiviert, die die Zellbestandteile auseinander nehmen und die Zelle schließlich töten. Mitochondrien, die unter normalen Bedingungen den Großteil des ATP, der zellulären Energiewährung, herstellen, spielen bei diesem Prozess eine Schlüsselrolle. Ihre Rolle während des programmierten Zelltodes ist unser Hauptforschungsgebiet. In Stresssituationen durchlaufen sie einen Prozess des Funktionsverlustes ihrer äußeren Membran, der auch mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) genannt wird. MOMP führt zu einer Leckage von Proteinen aus den Mitochondrien in den sonst separierten Zellrest. Dieser Prozess macht Mitochondrien zu Vollstreckern des programmierten Zelltodes. Er wird bestimmt durch die sogenannte Bcl-2-Proteinfamilie, die sowohl Apoptose-stimulierende wie auch Proteine, die das Überleben der Zelle sicherstellen können, beinhalten.



Nathan Brady erforscht Mechanismen des Zelltods unter Einsatz von hochauflösenden optischen Verfahren (Bild: DKFZ).

Wenn Zellen sich selbst auffressen

Die Betrachtung der Apoptose spiegelt allerdings nur einen Teil des Gesamtbildes des programmierten Zelltodes wider. In den letzten Jahren hat es sich gezeigt, dass die Autophagozytose oder Autophagie („Selbst-Essen“) einen wichtigen Gegenpart zur Apoptose darstellt. Während der Autophagie werden intrazelluläre Bestandteile in Autophagosomen abgesondert, die dann mit Lysosomen fusionieren und durch diese abgebaut werden. Der Autophagie-Abbauweg dient dabei neben dem Proteasom als ein kritischer Modulator des Proteingleichgewichts, er beeinflusst aber auch die Lipid- und Organellenzusammensetzung. Obwohl die Autophagie einst als allgemeingültige Alternative des Zelltods angesehen wurde, schreibt man ihr inzwischen eine präzise und potente Rolle auch bei überlebensfördernden Signalen zu (s. Abb. 3).

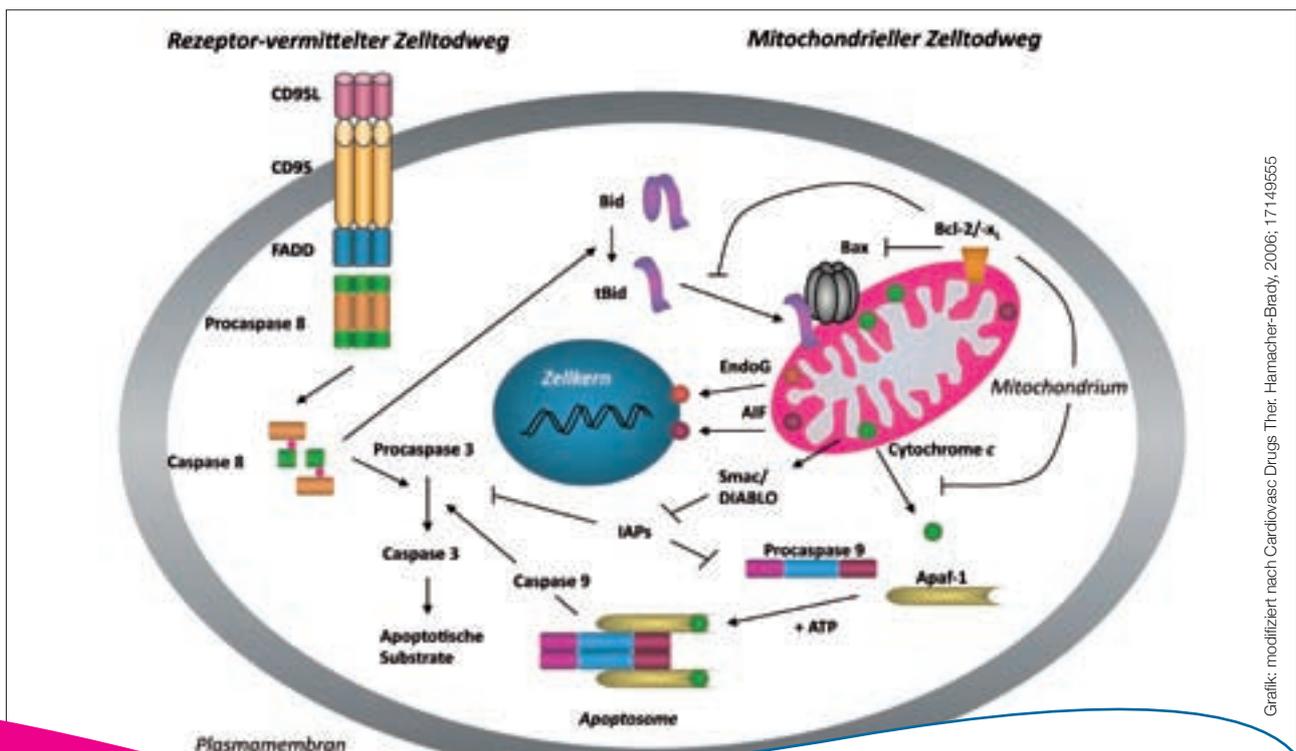
Krebszellen mögen es nicht, beim Fressen gestört zu werden

Die verschiedenen Funktionseinheiten des Zelltodes arbeiten nicht isoliert voneinander. Vielmehr sind sie in komplizierten Netzwerken verknüpft (s. Abb. 1&3). Unsere Arbeitshypothese besagt, dass der „Crosstalk“, die Kommunikation zwischen diesen Systemen, auf der Ebene von Lipiden, Ionen, Proteinen und Organellen, aber auch zwischen klassischen Wegen von Überleben und Tod, ein attraktives Ziel für die Induktion des Zelltods darstellt. Da die Autophagie einen potenten Überlebensmechanismus darstellt, suchen wir intensiv nach Stoffen, die verschiedene Aspekte der Autophagie beeinflussen.

Abbildung 1: Schema des Todesrezeptor und des mitochondrialen Apoptoseweges

Die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie können in drei Unterfamilien eingeteilt werden: die anti-apoptischen / überlebensfördernden Proteine (z.B. Bcl-2 und Bcl-xL), die Multidomänen pro-apoptischer Proteine (z.B. Bax und Bak) und die BH3-only Proteine, die als vorgeschaltete Sensoren für zellulären Stress dienen. Letztere hemmen die anti-apoptischen Bcl-2 Mitglieder, die normalerweise durch Heterodimerisierung mit Bax/Bak deren pro-apoptische Rolle unterdrücken. Nach Aktivierung initiieren Bax/Bak die Permeabilisierung der Mitochondrien („MOMP“), woraufhin freigesetztes Cytochrom c den Zelltod über Caspasen auslöst.

Aus: Cardiovasc Drugs Ther. Hamacher-Brady, 2006; 17149555.



Grafik: modifiziert nach Cardiovasc Drugs Ther. Hamacher-Brady, 2006; 17149555

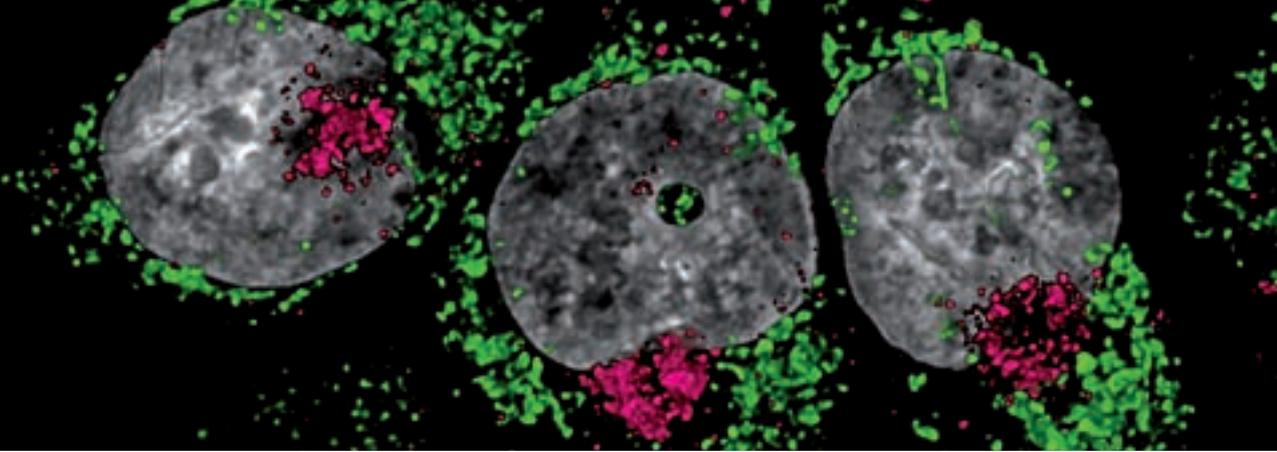


Abbildung 2: Dreidimensionales Abbild von Mitochondrien (grün), Lysosomen (rot) und Zellkernen (grau). Nach Zugabe von Artesunat sammeln sich die Lysosomen asymmetrisch im Bereich des Zellkerns. Signale aus den Lysosomen führen zu einer Fragmentierung der Mitochondrien und machen diese über eine Freisetzung von Cytochrom c zu Auslösern des Zelltodes (Bild: Nathan Brady).

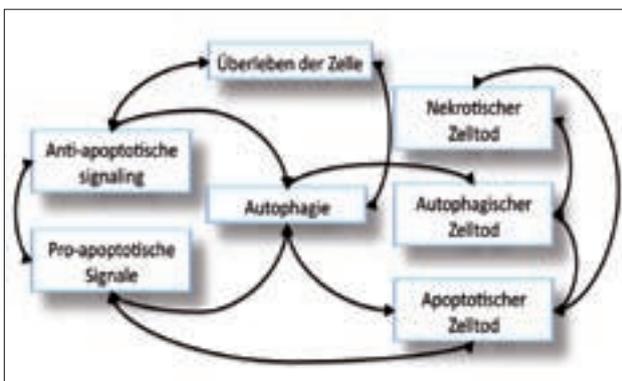
Malariamedikament wirkt auch auf Krebszellen: Eisen spielt dabei eine entscheidende Rolle

In einem gemeinsamen Projekt mit der Gruppe um Roland Eils beschäftigten wir uns mit Artesunat, einem Arzneistoff aus der Gruppe der Artemisinine, die aus der Pflanze *Artemisia annua* gewonnen und häufig zur Behandlung der Malaria eingesetzt werden. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Artesunat auch in der Lage ist Krebszellen abzutöten. Interessanterweise wirkt es bei Malaria auf die Nahrungsvakuole des einzelligen Parasiten, die den Lysosomen der Säugerzellen ähnelt. Lysosomen sind kleine Vesikel, die mit hochaktiven Enzymen gefüllt sind, die Proteine, Lipide und andere Stoffe in ihrem Inneren abbauen.

Dies motivierte uns, zu untersuchen, ob der Effekt von Artesunat bei Krebszellen ebenfalls die Lysosomen betrifft. Dazu behandelten wir verschiedene Brustkrebs- und normale Zelllinien mit dem Medikament und untersuchten den Effekt auf verschiedenen Organellen, darunter Endosomen, Lysosomen und Mitochondrien. Auffallend war, dass die Behandlung nicht nur zu auffälligen Veränderungen bei Lysosomen, sondern auch bei Mitochondrien und den Zellkernen führte (Abb. 2). Durch das Artesunat generierten die Lysosomen reaktive Sauerstoffspezies – hoch reaktive und toxische Moleküle. Im Rahmen eines bis

dato unbekanntem Mechanismus führten diese reaktiven Moleküle zu einer Freisetzung von Cytochrom c durch die Mitochondrien und in der Folge zur mitochondrialen Apoptose. Durch einen systematischen Vergleich verschiedener Zelllinien fanden wir heraus, dass verschiedene Brustkrebs-Zelllinien stärker auf Artesunat reagierten als nicht-tumorigene Epithelzellen aus der Brust. Faszinierenderweise konnte diese Sensitivität noch verstärkt werden, indem die Krebszellen zuvor mit erhöhten Eisenkonzentrationen versorgt wurden. Eine Reduktion des Eisengehaltes durch sogenannte Chelatoren führte hingegen zu einer Resistenz der Zellen gegen das Medikament. Dies zeigt, dass der lysosomale Eisengehalt die Zellen anfällig für das Medikament macht. Diese Erkenntnis hat wichtige Auswirkungen für einen späteren Einsatz in der Klinik: Krebszellen besitzen eine höhere metabolische Aktivität als normale Körperzellen und benötigen daher höhere Eisenmengen. Dies führt anscheinend auch zu höheren Eisenkonzentrationen in den Lysosomen. Das lysosomale Eisen bietet sich daher als günstiges Ziel einer Bekämpfung von Krebszellen an (Hamacher-Brady *et al.*, 2011). In der Zwischenzeit konnten wir auch zeigen, dass dieser Signalweg auch in Krebszellen aus dem Pankreas aktiv ist, und wir untersuchen jetzt die Identität des Mechanismus, der das Todessignal zwischen den Lysosomen und den Mitochondrien überträgt.

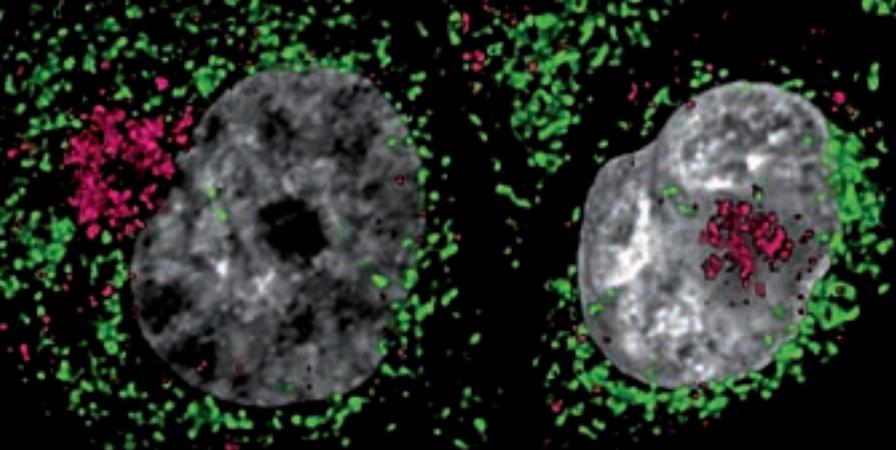
Abbildung 3:



Bei den Entscheidungen zum Schicksal der Zelle findet ein extensiver und multi-direktionaler Austausch zwischen pro-apoptotischen, anti-apoptotischen und Autophagie Prozessen statt (Bild: Nathan Brady).

Das Abbild einer sterbenden Zelle

Eine künftige klinische Anwendung zum Wohle des Patienten ist das Ziel vieler Forschungsansätze – so auch im Falle des zuvor beschriebenen. Allerdings erfordert eine wirkliche Verbesserung der Abtötung von Krebszellen eine Integration von verschiedenartigen quantitativen und qualitativen Daten. Dabei kann die mathematische Modellierung helfen, ein tieferes Verständnis zu erlangen und bis dahin verborgene Verbindungen aufzudecken. Tatsächlich hat die Forschung der letzten Jahrzehnte gezeigt, dass eine Vielzahl von hochkomplexen Prozessen den programmierten Zelltod beeinflusst – und obwohl über 200.000 wissenschaftliche Arbeiten sich mit dem Thema befassen, sind uns immer noch wichtige Aspekte unbekannt. Zum Beispiel nimmt man an, dass die Autophagie Zellen schützt. Trotzdem konnten wir in einer früheren Arbeit (Brady *et al.*, 2007) zeigen, dass das Bcl-2-



Protein, das eigentlich das Überleben fördert, die Autophagie unterdrückt. Noch komplizierter wird das Ganze durch die Beobachtung, dass die pro-apoptotische BH3-only Proteine als Reaktion auf zelluläre Todessignale Mitochondrien zur Degradation via Autophagie vorsehen (Hamacher-Brady *et al.*, 2007).

Die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie bildet den Schlüssel unserer Forschungen. Durch die Kopplung fluoreszierender Proteine wie dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) an Schlüsselproteine können subzelluläre Ereignisse, darunter Protein-Protein-Interaktionen, Abbauprozesse, Translokationen und Organellbewegungen, nicht nur beobachtet, sondern sogar quantifiziert werden. Dies ist vor allem deswegen wichtig, da viele bisherige Studien von Molekülen und Signalwegen des programmierten Zelltods bisher auf einer kleinen Anzahl von Schnappschuss-Bildern basierten. Häufig geben diese keine reale Repräsentation dieser hoch komplexen Prozesse wieder – in Analogie könnte man versuchen, das Ende des Kinofilms „Inception“ auf Grundlage einiger weniger dunkler Bilder einer Handycamera vorherzusagen.

Obwohl wir wahrscheinlich den Wissensmangel über grundlegende Mechanismen nie ganz überwinden können, suchen wir doch nach einem tieferen Verständnis der inneren Struktur der Zelle. Dazu verlassen wir uns auf exakte, zeitlich aufgelöste Bildgebung. Wir inspizieren subzelluläre Ereignisse, die durch spezifische (und eher unspezifische) Perturbationen ausgelöst werden. Dadurch decken wir die Regeln des programmierten Zelltods auf. Überraschenderweise erfahren wir immer wieder, dass die beobachteten Antworten nie aus einem einfachen AN oder AUS bestehen. Es ist sogar davon auszugehen, dass solche binären Antworten in Säugerzellen gar nicht vorkommen – wenn man denn genau genug hinschaut. Eine zelluläre Antwort ist immer durch Heterogenität bestimmt – sei es in einer Population von Zellen, aber auch von Organellen oder Proteinen. Eine weitere wichtige Entdeckung für uns ist, dass wir durch quantitative Bildgebung schnell mit Informationen gesättigt werden, die nur durch Zuhilfenahme der mathematischen Modellierung bewältigt werden können. Experimentell können wir einzelne Regeln bestimmen, das mathematische Modell stellt aber das Mittel zur Erfassung und zum Verständnis des gesamten Regelwerks des programmierten Zelltods bereit. Mit dieser Kombination aus Ex-

periment und Theorie hoffen wir, einen Beitrag zur Entwicklung eines rationelleren Designs von therapeutischen Strategien zur Optimierung des programmierten Zelltods zu leisten.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Die Nachwuchsgruppe „Translationale Systembiologie“ wird durch Dr. Nathan R. Brady geleitet. Die Gruppe ist Teil des Deutschen Krebsforschungszentrums und der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg (Abteilung Prof. Büchler) und Mitglied in der Helmholtz-Allianz Systembiologie. Angesiedelt ist die Gruppe am Systembiologiezentrum BioQuant der Universität Heidelberg.

Literatur:

- Brady, N.R., Hamacher-Brady, A., Yuan, H., and Gottlieb, R.A. (2007). The autophagic response to nutrient deprivation in the h1-1 cardiac myocyte is modulated by Bcl-2 and sarco/endoplasmic reticulum calcium stores. *The FEBS journal* 274, 3184-3197.
- Hamacher-Brady, A., Brady, N.R., Logue, S.E., Sayen, M.R., Jinno, M., Kirshenbaum, L.A., Gottlieb, R.A., and Gustafsson, A.B. (2007). Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 14, 146-157.
- Hamacher-Brady, A., Stein, H.A., Turschner, S., Toegel, I., Mora, R., Jennewein, N., Efferth, T., Eils, R., and Brady, N.R. (2011). Artesunate Activates Mitochondrial Apoptosis in Breast Cancer Cells via Iron-catalyzed Lysosomal Reactive Oxygen Species Production. *J Biol Chem* 286, 6587-6601.
- Hundeshagen, P., Hamacher-Brady, A., Eils, R., and Brady, N.R. (2011). Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC Biology* *accepted*.

Kontakt:

Dr. Nathan R. Brady

Nachwuchsgruppe Translationale Systembiologie (B170)
Deutsches Krebsforschungszentrum, Medizinische Fakultät und
BioQuant-Zentrum der Universität Heidelberg
n.brady@dkfz.de

www.dkfz.de/en/systembiologie-zelltod-mechanismen

ein fadenwurm bereichert die systembiologie

Caenorhabditis elegans ist einer der elegantesten Modellorganismen

von Marlon Stoeckius

Caenorhabditis elegans ist ein etwa 1 Millimeter langer, transparenter, im Boden vorkommender Fadenwurm (Abb.1). Er wurde in den 60er Jahren vom Biologen Sydney Brenner anfangs als Modell zur Erforschung der Nervenentwicklung genutzt. In den darauffolgenden Jahren etablierte sich *C. elegans* als ein Modellsystem für die Zellteilung und die Embryonalentwicklung. Viele grundlegende Mechanismen funktionieren im Wurm sehr ähnlich wie im Menschen. So ist er heute einer der beliebtesten Modellorganismen für Entwicklungsbiologen und ebenso ein weit verbreitetes Modellsystem für die Erforschung der molekularen Grundlagen von vielen Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Diabetes, Parkinson und Alzheimer. Ein weiteres und eher junges Forschungsfeld ist die Funktion von kleinen RNAs, wie zum Beispiel microRNAs, die in *C. elegans* erstmals entdeckt wurden. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung des Wurms sind sehr gut etabliert und bieten den Forschern viele Ansätze, grundlegende Phänomene und Mechanismen zu analysieren. Dies führte nicht zuletzt dazu, dass für Entdeckungen in *C. elegans* bereits drei Nobelpreise vergeben wurden.

Randvoller Werkzeugkasten für Systembiologen

Auch aus der Systembiologie ist *C. elegans* seit jüngster Zeit nicht mehr wegzudenken. Der Hauptgrund dafür ist, dass sein molekularbiologischer und biochemischer Werkzeugkasten üppig ausgestattet ist. Die Grundsteine legte ein Konsortium von Wissenschaftlern, das 1998 das Erbgut (Genom) des Wurms als ersten vielzelligen Organismus vollständig entschlüsselte (Sequencing Consortium, 1998). Noch heute, auch 10 Jahre nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, ist das vergleichsweise kleine Genom des Wurms (etwa 100 Megabasen) das am besten kartierte Genom eines Vielzellers. Das Erbgut des Wurms kann mit modernen Methoden relativ einfach manipuliert werden. So können fremde oder veränderte Gene zielgenau in das Genom eingebaut werden (MosSCI; Frøkjær-Jensen *et al.*, 2008). Für die Veränderung von Genen können sich Wurmforscher ‚Genbanken‘ zunutze machen, in denen fast alle Gene (ORFeome; Lamesch *et al.*, 2004) und regulatorischer Elemente (Promoterome; Dupuy *et al.*, 2004, 3'UTRome; F. Piano Labor) aus dem Genom des Wurms isoliert wurden. Diese können dann wie in einem Baukasten frei kombiniert werden. Gene können in *C. elegans* durch Fütterung mit speziellen Bakterien vergleichsweise einfach ausgeschaltet werden (RNAi feeding; Boutros and Ahringer, 2008). Darüber hinaus können ebenfalls spezifische Regionen aus dem Genom gelöscht werden (MosDEL; Frøkjær-Jensen *et al.*, 2010). Der Wurm

Abbildung 1: *Caenorhabditis elegans*



Der ein Millimeter große Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein beliebter Modellorganismus.



Marlon Stoeckius nutzt den Fadenwurm für die Erforschung der molekularen Grundlagen der frühen Embryonalentwicklung (Photo: Alexander Baltz @ BIMSB).

kann auf Agarplatten mit bis zu 384 Kammern, wie in separaten Lebensräumen, kultiviert werden. Das erlaubt die Durchführung von parallelisierten automatisierten Hochdurchsatzscreens, in denen etwa jedes Gen des Wurms im Zeitraum von nur einer Woche einzeln ausgeschaltet wird. Sowohl der Embryo als auch der erwachsene Wurm ist bei *C. elegans* transparent, und seine Entwicklung verläuft immer stereotyp. Das erlaubt die Beobachtung einzelner Zellen im lebenden Embryo und Wurm unter dem Mikroskop. So ist der Ursprung und das Schicksal einer jeden Zelle, vom Einzell-Stadium zur schlüpfenden Larve mit 558 Zellen bis zum erwachsenen Wurm mit 959 somatischen Zellen, beschrieben (Sulston *et al.*, 1983). Heute kann die Embryonalentwicklung mithilfe bildgebender Verfahren automatisiert überwacht werden. In Kombination mit dem Ausschalten von bestimmten Genen im Embryo können Veränderungen der charakteristischen Zellteilungsmuster automatisch erkannt werden. Damit können Hypothesen zur Funktion des Gens aufgestellt werden. Über 13.000 genetisch manipulierte Würmer (CGC, März 2011) wurden in den vergangenen Jahrzehnten von Wissenschaftlern generiert, in denen einzelne Gene gelöscht, mutiert oder mit einem Fluoreszenzmarker markiert wurden. Dadurch ist eine enorme Ressource entstanden, die nach dem 'open-access' Prinzip unter den Wissenschaftlern geteilt wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Modellorganismen können diese Würmer einfach im Tiefkühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Neben den Ressourcen an Labor-Methoden stehen mittlerweile auch hunderte von Datensätzen aus Hochdurchsatzexperimenten in Datenbanken zur Verfügung. Ein kürzlich beendetes Projekt für die systematische Kartierung von regulatorischen Elementen im Genom hat neben der Etablierung neuer Methoden auch mehrere Terabytes an Daten produziert, die nun frei zur Verfügung stehen (ModENCODE; Gerstein *et al.*, 2010). Zusammen genommen machen diese Ressourcen *C. elegans* zu einem idealen vielzelligen Modell für die Systembiologie.

Woran es fehlt(e)

Moderne DNA-Sequenzieretechnologien erlauben quantitative Analysen von allen eingeschalteten Genen (RNA-Expression) in sämtlichen Organismen. Das quantitative Erfassen von Proteinen, wie es seit einigen Jahren in der Zellkultur genutzt wird (SILAC; Ong *et al.*, 2002),

kann bislang in den meisten Modellorganismen noch nicht angewendet werden. So wurden bislang Hypothesen über die Funktion von bestimmten Genen nur durch mikroskopische Veränderungen am Wurm, durch RNA-Expressionsänderung und durch die Messung von einzelnen wenigen ausgewählten Proteinen aufgestellt.

Letztendlich müssen für das Verständnis von biologischen Prozessen auch die Menge, die Identität und die Dynamik der Stoffwechselprodukte in einem Organismus quantitativ bestimmt werden. Der Stoffwechsel ist sowohl in einzelligen als auch in vielzelligen Modellsystemen ein unzureichend erschlossenes Forschungsgebiet. (Metabolomics; Oliver, 2006). Hochdurchsatz-Forschungsprojekte in *C. elegans* erfordern hier sowohl die Optimierung der Methoden als auch eine neuartige Herangehensweise an die Datenanalyse. Nachdem der Wurm geschlüpft ist, kann er über seinen Lebenszyklus hinweg synchron in großen Mengen kultiviert werden, wodurch genug Untersuchungsmaterial (z.B. RNA und Proteine) für Analysen von gleichalten Würmern zur Verfügung steht. Quantitative Analysen beruhen bisher allerdings überwiegend auf Messungen des kompletten Wurms, was zu einem Vermischen der verschiedenen Gewebe führt. So ist es beispielsweise schwer, auseinanderzuhalten, welche Gene spezifisch in Muskeln oder Nerven eingeschaltet sind. In Zukunft werden Methoden etabliert werden müssen, die Hochdurchsatzmessungen gezielt in den einzelnen Geweben und Zellen erlauben.

Ähnliche Hürden müssen für die Erforschung der Embryonalentwicklung überwunden werden. Der erwachsene Wurm trägt Embryonen unterschiedlichen Alters in sich – von der einzelligen Zygote bis zur schlüpfenden Larve mit 558 Zellen. Materialintensive Messungen beruhen stets auf heterogenen Populationen von Embryonen unterschiedlicher Zellstadien. Für genauere Untersuchungen der Abfolge von zeitlichen Ereignissen während der Embryonalentwicklung mussten bisher Embryonen nach Alter unter dem Mikroskop sortiert werden. Bei diesem zeitaufwendigen manuellen Sortieren können nicht die Mengen an Embryonen isoliert werden, die für Analysen der RNA-Expression oder Proteinexpression benötigt werden. Mit einer ruhigen Hand können etwa 500 Embryonen am Tag gesammelt werden, moderne Hochdurchsatzanalysen benötigen jedoch über 100.000 Embryonen.

Einzellige *C. elegans* Embryonen.

Automatisiertes Sortieren von Embryonen gleichen Alters

Wir haben eine Methode entwickelt, mit der zehntausende Embryonen gleichen Entwicklungsstadiums innerhalb kurzer Zeit mithilfe eines klassischen Zellsortierers (FACS) isoliert werden können (Abb. 2). Grundvoraussetzung für das Verfahren, welches wir eFACS taufte, ist ein Wurmstamm, der ein fluoreszierendes Protein in nur einem bestimmten Zellstadium spezifisch produziert. Die Fluoreszenz dient dann als Marker für das gewünschte Stadium und wird vom Zellsortierer spezifisch erkannt. Wir nutzen diese Methode, um große Mengen von einzelligen und zweizelligen Embryonen sortieren zu können. Grundsätzlich kann die Methode aber für die Isolierung von Embryonen jedes beliebigen Entwicklungsstadiums eingesetzt werden. Dadurch eröffnet eFACS das Tor zur systematischen Erforschung der Embryonalentwicklung mit modernen Hochdurchsatzmethoden in *C. elegans* (Stoeckius *et al.*, 2009).

Quantifizieren von tausenden Proteinen

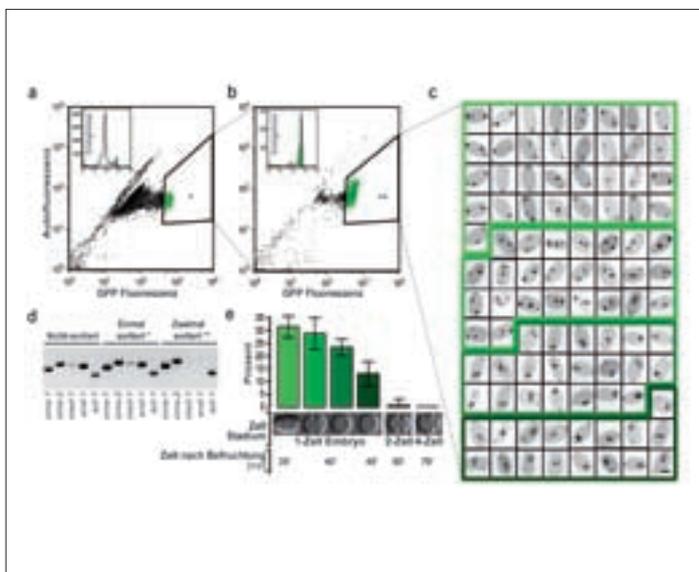
In Zusammenarbeit mit dem Labor von Matthias Selbach (MDC Berlin) haben wir im Labor von Nikolaus Rajewsky (BIMSB@MDC) eine neue Methode entwickelt, die es erlaubt, die Aktivität und

Menge tausender Proteine im Vergleich zweier *C. elegans*-Proben zu quantifizieren (Thierfelder *et al.*, in Vorbereitung). Dies eröffnet erstmalig Einblicke in Mengenveränderungen von Tausenden von Proteinen und erlaubt dadurch Rückschlüsse auf deren Funktion im lebenden Organismus. So kann nun untersucht werden, wie sich die Proteinmengen während der Entwicklung des Wurms verändern und wie sich gewisse Proteine verhalten, wenn ein bestimmtes Gen ausgeschaltet wird. Die Methode ermöglicht außerdem, die durch Signalketten aktivierten Proteine quantitativ zu messen (Phosphoproteom) und die Sensitivität von anderen im Wurm verwendeten Methoden zu verbessern (z.B. Co-IP).

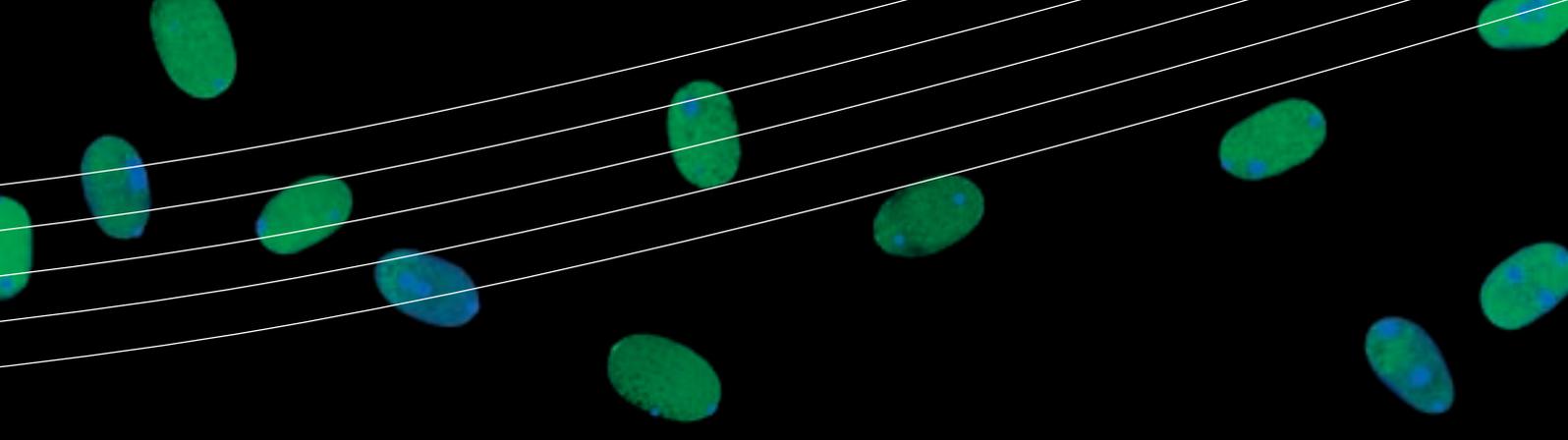
Wie wird aus Spermium und Eizelle ein Embryo?

Die Fusion von zwei hochspezialisierten Zellen - Spermium und Eizelle - führt in kurzer Zeit zur Entstehung einer sich teilenden Zelle - der Zygote - aus der ein vollständiger Organismus hervorgeht. Es ist weitgehend unverstanden, wie dieser fundamentale Prozess in der Entwicklung jedes Lebewesens funktioniert. Zwar sind viele essentielle Faktoren bekannt, beispielsweise sind etwa 600 Gene für die Embryonalentwicklung von *C. elegans* essentiell (Sönnichsen *et al.*, 2005), die globalen Vorgänge bleiben hingegen

Abbildung 2: eFACS



Wir nutzen eFACS, um große Mengen von ein- und zweizelligen Embryonen zu sortieren. Dafür nutzen wir einen Wurmstamm, der ein Gen exprimiert, welches spezifisch für den einzelligen Embryo ist und an einen Fluoreszenzmarker (OMA-1-GFP) gekoppelt wurde. Die Methode hat routinemäßig eine Ausbeute von mehreren zehntausend Embryonen mit einer Reinheit größer als 98% (a). Der Scatterplot zeigt den ersten Sortierungsschritt von einzelligen OMA-1-GFP-Embryonen. Die GFP-positive Population (~3-5% einzellige Embryonen) wird selektiert und sortiert (b). Die GFP-positive Population hat nach der ersten Sortierung eine Reinheit von etwa 70% und muss erneut sortiert werden. Die Reinheit der zweifach sortierten GFP-positiven Population wird dann durch mikroskopische Untersuchung (c und e) und RT-PCRs (d) untersucht. Diese bestätigen eine Reinheit von mehr als 98% einzelliger Embryonen. (Bild aus Stoeckius *et al.*, 2009. Copyright Nature Methods).



ungeklärt. Interessanterweise werden diese 'frühen' Prozesse in allen studierten Lebewesen von Faktoren kontrolliert, die bereits vor der Befruchtung in Eizelle und Spermium vorhanden sind. Das wirft die Frage auf, wie groß bzw. wie essentiell der Anteil der Genprodukte von Eizelle und Spermium ist.

Im Labor von Nikolaus Rajewsky (BIMSB@MDC) nutzen wir *C. elegans* und die hier etablierten Methoden, um im genomweiten Ansatz Aufschluss über diese fundamentalen Reorganisations- und Reprogrammierungsprozesse zu bekommen. Für dieses Projekt messen wir sowohl kodierende- als auch nicht-kodierende RNAs und Proteine in Eizellen, Spermien, einzelligen und zweizelligen Embryonen. Die Daten geben uns nie dagewesene Einblicke in ein Zeitfenster der ersten Minuten in der frühen Embryonalentwicklung. Wir beobachten dynamische Mengenänderungen von RNAs und knapp 5.000 Proteinen. RNAs und Proteine verhalten sich sehr unterschiedlich, was auf ein großes Maß an posttranskriptioneller Genregulation schließen lässt. Darüber hinaus beobachten wir dynamische Veränderungen innerhalb und zwischen allen bekannten kleinen nicht-kodierenden RNA-Klassen (miRNAs, 21U-RNAs, 22G-RNAs, 26G-RNAs, und andere endo-siRNAs). Die Daten lassen die Hypothese zu, dass eine große Anzahl von kleinen RNAs, mRNAs und Proteinen im Embryo vermeintlich aus dem Spermium stammen. Dies weist auf einen unerforschten väterlichen Beitrag zur frühen Embryonalentwicklung hin. Außerdem legen die Daten den Schluss nahe, dass der einzellige *C. elegans*-Embryo möglicherweise schon transkriptionell aktiv ist. Die riesigen Datensätze werden zurzeit ausgewertet und in unabhängigen Versuchen validiert.

Steckbrief Forschungsprojekt:

„Hochdurchsatzuntersuchungen des Proteoms und Transkriptom während der Reprogrammierung von Eizelle zur Zygote und der frühen Embryonalentwicklung von *C. elegans*“ in der Gruppe von Nikolaus Rajewsky, BIMSB Berlin. Förderung seit 2009 durch das BIMSB/NYU-PhD Austauschprogramm (www.mdc-berlin.de/en/bimbs/index.html). Diese Arbeit ist Teil einer langjährigen Kollaboration mit Fabio Piano (NYU, USA).

Danksagung:

Dieses Projekt ist Teil meiner Promotion im Labor von Nikolaus

Rajewsky. Ich danke meinen Kollegen Jonas Maaskola (Co-Erstautor der Nature Methods Publikation) und Dominic Grün (Co-Erstautor der in Vorbereitung befindlichen Publikation) für alle bioinformatischen und statistischen Analysen.

Referenzen:

- Boutros M, and Ahringer J (2008) The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 9, 554-66.
- Dupuy D, *et al.* (2004) A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. *Genome Research*, 14, 69-75.
- Frøkjær-Jensen C, *et al.* (2010) Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision. *Nature Methods*, 7, 451-53.
- Frøkjær-Jensen C, *et al.* (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, 40, 1375-83.
- Gerstein MB *et al.* (2010) Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science*, 307, 1775-87.
- Lamesch P *et al.* (2004) *C. elegans* ORFeome version 3.1: increasing the coverage of ORFeome resources with improved gene predictions. *Genome Research* 14, 2064-9.
- Oliver SG (2006) From genomes to systems: the path with yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 361, 477-82.
- Ong SE *et al.* (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, silac, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cellular Proteomics*, 1, 376-86.
- Sönnichsen B *et al.* (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434, 462-69.
- Stoeckius M *et al.* (2009) Large-scale sorting of *C. elegans* embryos reveals the dynamics of small RNA expression. *Nature Methods*, 6, 745-51.
- Sulston JE *et al.* (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64-119.

Kontakt:

Marlon Stoeckius

Berlin Institute for Medical Systems Biology

MDC-Berlin

marlon.stoeckius@mdc-berlin.de

www.mdc-berlin.de/en/bimbs

fluoreszenznanoskopie mit schaltbaren fluoreszenzsonden

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie und Einzelmolekül-detektion ermöglichen neue Einblicke in zelluläre Prozesse

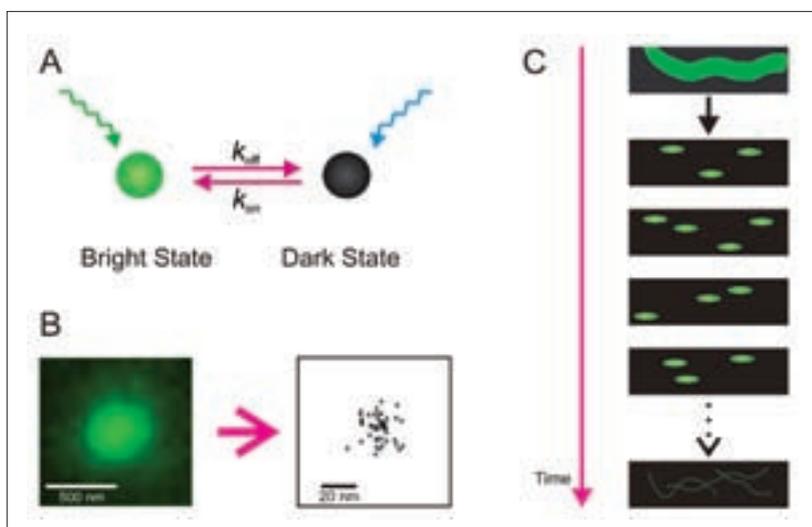
von Sebastian Malkusch, Ulrike Endesfelder, Meike Heidbreder und Mike Heilemann

Bildgebende Methoden ermöglichen die Beobachtung von biologischen Präparaten unterschiedlicher Art. Insbesondere die Fluoreszenzmikroskopie ist hier von besonderer Bedeutung. Selektive Markierungstechniken, eine große Bandbreite an Fluoreszenzsonden, die Kompatibilität mit Experimenten in lebenden Zellen und eine hohe Sensitivität bis zur Beobachtung einzelner Moleküle machen diese „Toolbox“ besonders wertvoll. Neueste Entwicklungen im Bereich der Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie unter Einsatz photoschaltbarer Fluoreszenzsonden ermöglichen es, spezifisch markierte Biomoleküle sehr genau zu lokalisieren, Bilder mit einer nahezu molekularen Auflösung zu generieren und quantitative Aussagen zu treffen. Darüber hinaus kann hiermit die Dynamik von Biomolekülen in lebenden Zellen über längere Zeit beobachtet sowie deren Veränderung und Reaktion auf einen externen Stimulus untersucht werden.

In der Fluoreszenzmikroskopie werden biologisch interessante Zielmoleküle mit fluoreszierenden Sonden, das sind beispielsweise organische Farbstoffmoleküle oder fluoreszierende Proteine, markiert und beobachtet. Hierzu stehen verschiedene Techniken zur Verfügung, die eine gezielte Markierung eines bestimmten Biomoleküls ermöglichen, bspw. durch eine spezifische chemische Reaktion. Da die meisten Substanzen in der Natur nicht-fluoreszierend sind, erreicht die Fluoreszenzmikroskopie einen hohen Kontrast und ermöglicht sogar die Beobachtung einzelner fluoreszierender Moleküle. Darüber hinaus ist die Fluoreszenzmikroskopie eine nicht-invasive Methode, d.h. zur Erzeugung eines Bildes ist lediglich die Bestrahlung einer Probe mit Licht erforderlich und die Bildgebung lebender Zellen und sogar ganzer Organismen ist möglich.

Die räumliche Auflösung jeder lichtmikroskopischen Methode ist jedoch aufgrund der Welleneigenschaften des Lichts auf etwa 200 nm in der Bildebene und >500 nm entlang der optischen Achse begrenzt. Vergleicht man diese Zahlen mit den biomolekularen Größenskalen, so ist es also nicht möglich, kleinere

Abbildung 1: Prinzip der Lokalisationsmikroskopie



Photoschaltbare Sonden (A) können gezielt zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht-fluoreszierenden Zustand geschaltet werden. In Verbindung mit der Nanometer-genauen Ortslokalisierung einzelner Moleküle (B) und der zeitlichen Trennung des Fluoreszenzsignals (C) können hochauflösende Bilder aus einer großen Anzahl an Einzelmoleküllokalisationen rekonstruiert werden.

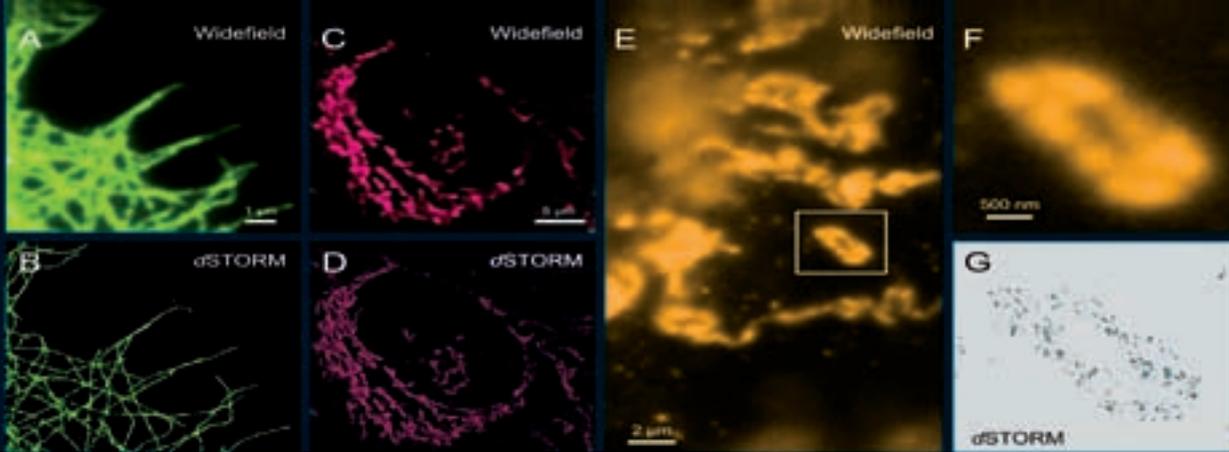


Abbildung 2: direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) zellulärer Strukturen.

Sowohl zelluläre Strukturen (Mikrotubulin (A, B), Endoplasmatisches Retikulum (C, D)) als auch die Verteilung von Proteinen (Mitochondrien (E-G)) (van de Linde *et al.*, J. Struct. Biol. 2008) können mit der dSTORM-Methode hochaufgelöst abgebildet werden. Die Markierung der Proben erfolgt mittels Immunofluoreszenz und unter Verwendung kommerziell erhältlicher farbstoffmarkierter Antikörper (Bild: Ulrike Endesfelder, Julius-Maximilians-Universität Würzburg).

zelluläre und subzelluläre Strukturen, Viren, die Zusammensetzung molekularer Maschinen oder die genaue räumliche Anordnung von Biomolekülen aufzulösen. Dies erklärt die hohe Motivation mikroskopisch-interessierter und arbeitender Forschungsgruppen, neue Verfahren zu entwickeln, die eine höhere räumliche Auflösung als die bisheriger Verfahren ermöglichen.

Unter den verschiedenen Verfahren zur hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie nimmt die Lokalisationsmikroskopie mit schaltbaren Fluoreszenzsonden eine besondere Stellung ein. Die experimentelle Durchführung ist vergleichsweise einfach. Die erreichbare räumliche Auflösung liegt bei ~20 nm, und eine große Bandbreite an geeigneten Fluoreszenzsonden und Markierungstechniken steht zur Verfügung. Als Einzelmolekültechnik liefert dieses Verfahren ein hohes Maß an quantitativer Information. Darüber wird durch die Beobachtung einzelner Ereignisse eine Mittelung experimenteller Parameter vermieden. Mehrfarbenmessungen sowie die Beobachtung von dynamischen Prozessen in lebenden Zellen sind ebenso möglich. Schließlich sind die mit diesen Verfahren gewonnenen Daten, z. B. genaue räumliche und zeitliche Koordinaten für jedes einzelne fluoreszierende Molekül, auch über die Darstellung von hochaufgelösten Bildern hinaus sehr nützlich, beispielsweise zur Bestimmung räumlicher Verteilungen („biomolecular mapping“) oder zur Aufstellung topologischer Netzwerke.

Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie mit photoschaltbaren Sonden

Die Lokalisationsmikroskopie vereinbart drei grundlegende Prinzipien:

- 1. der Einsatz von photoaktivierbaren oder photoschaltbaren Fluoreszenzsonden,
- 2. die präzise Lokalisation einzelner Fluoreszenzfarbstoffe mit einer Genauigkeit von wenigen Nanometern, und
- 3. die zeitliche Trennung des gesamten Fluoreszenzsignals einer Probe in einzelne Bilder (Abb. 1).

In einer zunächst „dunklen“ Probe, d. h. dass alle Sonden in einem nicht-fluoreszierenden Zustand bzw. ausgeschaltet vorliegen, werden in einem ersten Schritt wenige Sonden aktiviert (angeschaltet). Dabei wird darauf geachtet, dass diese als einzelne Moleküle voneinander räumlich getrennt detektiert werden. Von jedem dieser Moleküle wird nun in einem zweiten Schritt die genaue Position bestimmt. Dies geschieht durch Annäherung einer geeigneten mathematischen Funktion an die Abbildung des einzelnen Moleküls, und zwar umso genauer, je mehr Photonen detektiert wurden. Bei der Detektion von 1.000 Photonen liegt diese Genauigkeit <10 nm. Diese beiden Schritte werden nun wiederholt, und die Gesamtheit der gesammelten Koordinaten zur Rekonstruktion eines hochaufgelösten Bildes genutzt. Durch die stochastische Aktivierung werden bei hinreichend langer Messzeit alle Moleküle ausgelesen, z. B. 4.000 Bilder à 20 ms für eine dichte zweidimensionale Struktur, oder 100 Bilder für eindimensionale Filamente.

Geeignete Fluoreszenzsonden müssen zwischen einem fluoreszierenden („hell“) und einem nicht-fluoreszierenden Zustand („dunkel“) geschaltet werden können. Dies kann z. B. durch die Bestrahlung mit Licht oder mithilfe von intrinsischen photophysikalischen Prozessen oder photochemischen Reaktionen bewerkstelligt werden. Hierzu zählen zum einen fluoreszierende Proteine, die durch Bestrahlung mit UV-Licht photoaktiviert (bspw. das „photoactivatable GFP“, paGFP) oder photokonvertiert werden. Eine zweite wichtige Gruppe stellen die organischen Fluoreszenzfarbstoffe dar, welche durch photophysikalische oder photochemische Prozesse zwischen einem „dunklen“ und einem „hellen“ Zustand geschaltet werden können. Das Verfahren der „direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy“ (dSTORM) hat das Spektrum an geeigneten Sonden erheblich verbreitert und auf konventionelle und seit langem in der Zellbiologie eingesetzten Farbstoffe erweitert. Mittels dSTORM können zelluläre Strukturen in fixierten Zellen sichtbar gemacht werden (Abb. 2 A-D), die räumliche Verteilung von Proteinen kartographiert werden (Abb. 2 E-G), die Dynamik von einzelnen Filamenten *in vitro* mit einer zeitlichen Auflösung von 1 Hz verfolgt und Prozesse im Inneren von lebenden Zellen verfolgt werden.



Entscheidend für Lokalisationsverfahren sind sowohl geeignet schaltbare Fluoreszenzsonden, als auch Markierungstechniken. Während fluoreszierende Proteine genetisch an ein Zielmolekül angebracht werden können, benötigen organische Farbstoffe spezifische Markierungstechniken. Hierzu zählen die Markierung mit Antikörpern oder der Einsatz spezifischer Moleküle (z. B. Phalloidin zur Markierung von Actin) in fixierten Zellen, sowie eine Vielzahl an spezifischen Tag-Technologien, die eine gezielte Markierung von Biomolekülen mit organischen Farbstoffen ermöglichen.

Lokalisation einzelner Moleküle: Mehr als Bilder

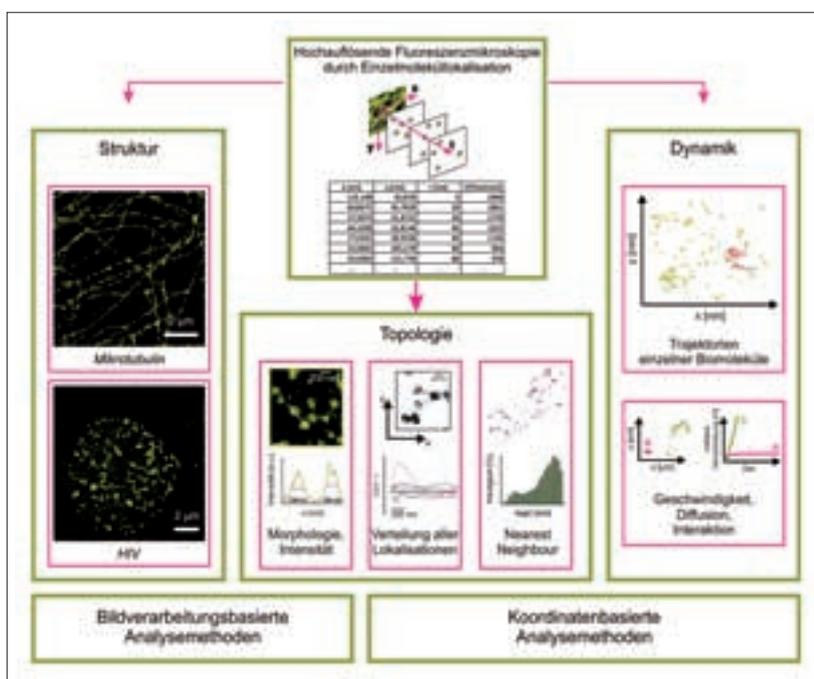
Unter den hochauflösenden Mikroskopieverfahren nimmt die Lokalisationsmikroskopie eine Sonderstellung ein, da im Experiment zunächst von jedem einzelnen Fluoreszenzfarbstoff sowohl die zeitlichen als auch die Nanometer-genauen räumlichen Koordinaten bestimmt werden. Aus diesen primären Daten können nun hochaufgelöste Bilder durch Rekonstruktion erzeugt werden (Abb. 2). Darüber hinaus können Einzelmolekül-Lokalisierungen

mit verschiedenen Algorithmen auf ihren zeitlichen oder räumlichen Abstand analysiert werden und somit beispielsweise biomolekulare Cluster oder Bewegungspfade einzelner Moleküle errechnet werden (Abb. 3).

Photoschaltbare Sonden und Single-Particle Tracking

Die Untersuchung der Dynamik und Mobilität von Biomolekülen als auch intermolekularer Wechselwirkungen kann wertvolle experimentelle Daten für die Erstellung oder Überprüfung systembiologischer Modelle liefern. Ein interessanter und neuer Ansatz hierfür ist der Einsatz photoschaltbarer Sonden in Kombination mit Single-Particle Tracking (SPT). Der entscheidende Vorteil gegenüber den „klassischen“ Verfahren ist, dass ein großer Vorrat an nicht-aktivierten Sonden vorhanden ist, aus welchem zu jeder Zeit nur ein kleiner Teil aktiviert und als einzelne Moleküle verfolgt wird. Auf diese Weise kann ein Experiment an einer lebenden Zelle über eine lange Zeit (viele Minuten) durchgeführt werden, mit einer Zeitauflösung im Bereich weniger Millisekunden.

Abbildung 3: Einzelmolekül-Lokalisationsdaten



Neben der Generierung hochauflösender Bilder (links) können Einzelmolekül-Lokalisationsdaten auch mit topologischen und morphologischen Algorithmen verarbeitet werden (unten), und auf diese Weise biomolekulare Assemblierungen oder Cluster quantifiziert werden. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Beobachtung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen (rechts) über Einzelmolekültrajektorien.

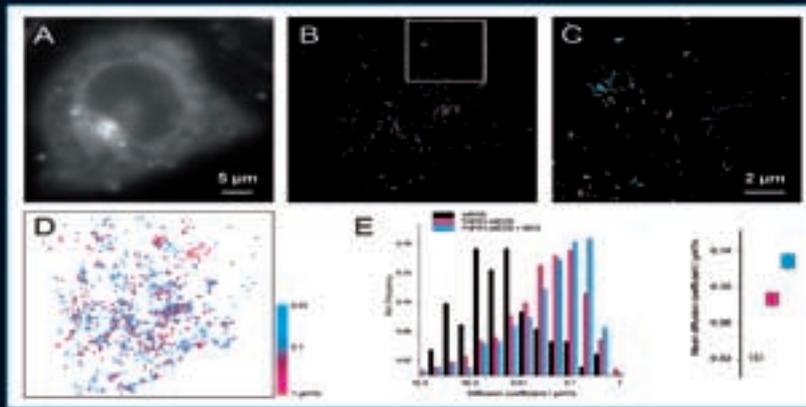


Abbildung 4: Photoschaltbare Sonden in Verbindung mit Single-Particle-Tracking

Biomoleküle, die mit photoaktivierbaren Sonden markiert wurden (A), TNF Rezeptor 1 markiert mit dem fluoreszierenden Protein tdEOS), können selektiv aktiviert und ihre Trajektorien in lebenden Zellen verfolgt werden (B, C). Aus den einzelnen Trajektorien können dynamische Parameter wie beispielsweise Diffusionskoeffizienten errechnet werden (D, E), welche Informationen zu Interaktionen, Aggregation und Heterogenität liefern (MCD = Methylcyclodextrin). (Bild: Meike Heidbreder, Julius-Maximilians-Universität Würzburg).

den (ms) und einer Ortsgenauigkeit weniger Nanometer (nm). So kann beispielsweise die Mobilität eines Membranrezeptors vor und nach Aktivierung durch ein Signalmolekül untersucht und Rückschlüsse auf Multimerisierung oder Internalisierung getroffen werden. Ferner können Protein-Protein-Wechselwirkungen als auch die Abhängigkeit von der Membran-Heterogenität untersucht und die Mobilität von Biomolekülen bspw. auf Membranen „kartographiert“ werden (Abb. 4).

Ausblick: Auf dem Weg zu molekularer Auflösung

Die Entwicklung neuartiger mikroskopischer Verfahren ermöglicht bereits heute einen neuen Blick auf zelluläre Strukturen und Interaktionen. Hochauflösende Verfahren in Verbindung mit Einzelmolekülmethode können hier eine neue Qualität an quantitativen Daten bieten, zum Studium zellulärer Strukturen und Dynamiken sowie biomolekularer Wechselwirkungen. So ist es bereits gelungen, diese Techniken zur Beobachtung und Quantifizierung einzelner Schritte zellulärer Signalkaskaden einzusetzen. Die hierbei entwickelten experimentellen und analytischen Ansätze können in Zukunft auf ähnliche Prozesse angewendet werden, und ermöglichen eine Verfeinerung bisheriger systembiologischer Modelle sowie die Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Regulation zellulärer Prozesse.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Projektname: FORSYS-PARTNER Nachwuchsgruppe „Fluorescence Techniques for Quantitative Studies of Virus-Cell Interactions“

Beteiligte Partner:

ViroQuant, Universität Heidelberg

Kooperationen:

Prof. Christian Kaltschmidt, Prof. Barbara Kaltschmidt,

Dr. Darius Widera,

Universität Bielefeld;

Dr. Jean-Baptiste Sibarita, Dr. Deepak Nair, Prof. Daniel Choquet,

Universität Bordeaux;

Prof. Hans-Georg Kräusslich, PD Dr. Walter Muranyi,

Universitätsklinikum Heidelberg.

Referenzen:

- Endesfelder, U.; van de Linde, S.; Wolter, S.; Sauer, M & Heilemann, M. (2010) Subdiffraction-Resolution Fluorescence Microscopy of Myosin-Actin Motility. *ChemPhysChem*, 11, 836-840.
- Heilemann, M. (2010). Fluorescence microscopy beyond the diffraction limit. *J. Biotech* 149, 243-251.
- Heilemann, M.; van de Linde, S.; Schüttelpelz, M.; Kasper, R.; Seefeldt, B.; Mukherjee, A.; Tinnefeld, P. & Sauer, M. (2008). Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angew. Chemie* 47, 6172-6176.
- van de Linde, S.; Sauer, M. & Heilemann, M. (2008) Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging of Proteins in the Mitochondrial Inner Membrane with Photoswitchable Fluorophores. *Journal of Structural Biology* 164, 250-254.
- Wombacher, R.; Heidbreder, M.; van de Linde, S.; Sheetz, M. P.; Heilemann, M.; Cornish, V. W. & Sauer, M. (2010) Live-cell super-resolution imaging of core histones with trimethoprim conjugates. *Nature Methods* 7, 717-719.

Kontakt:

Sebastian Malkusch (Dipl. Biophysik),

Ulrike Endesfelder (Dipl. Physik),

Meike Heidbreder (M. Sc. Biologie),

Prof. Dr. Mike Heilemann

Single-Molecule Biology

Department of Biotechnology & Biophysics

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Internet-Homepage der Nachwuchsgruppe:

www.physik.uni-bielefeld.de/mh

zellen sind ein musterbeispiel für weiche materie

Porträt Josef Alfons Käs

In biologischen Zellen sieht Josef Alfons Käs vor allem eines: Weiche Materie. Aber Zellen sind für den Physiker, der an der Universität Leipzig forscht, auch spannende Systeme und eine echte Herausforderung. Mit Messmethoden aus der Physik spürt er ihren biomechanischen Eigenschaften nach, um zu lernen, was verschiedene Gewebetypen voneinander unterscheidet. Warum das sinnvoll ist, und was uns die Biomechanik von Zellen über Krebs lehren kann, erklärt er im Interview mit systembiologie.de. Und er erzählt, warum Forschung für ihn ein toller Spielplatz zum Austoben ist.

Herr Käs, was brachte Sie als Physiker dazu, Zellen zu untersuchen, also biologische Systeme?

Ich komme traditionell aus einem Fach, das sich Physik der weichen Materie nennt. Das hat viel mit Polymerphysik und Flüssigkristallphysik zu tun. Und biologische Zellen sind ein Musterbeispiel für weiche Materie. Ich hatte ursprünglich begonnen, mich mit Lipidmembranen und Vesikeln zu beschäftigen und dann sehr schnell mitbekommen, dass eine Zelle deutlich mehr ist als ihre Membran. Darunter liegt das Zytoskelett. Das interessierte mich und ich untersuchte zunächst die polymeren Eigenschaften einzelner Aktinfilamente. Mein Mentor, der Physik-Nobelpreisträger Pierre-Gilles de Gennes, meinte dann, wenn ich schon Biophysik mache, müsse ich einen medizinischen Aspekt aufgreifen. Das habe ich sehr ernst genommen und mich zur Tumorbiologie hinorientiert.

Wie haben Sie sich in die Molekularbiologie eingefunden?

Ich habe ganz klassisch Physik studiert. Später war ich an der Harvard Medical School in einem medizinisch geprägten Umfeld tätig. Dort habe ich zusätzlich Molekularbiologie studiert. Anschließend ging ich nach Austin, an die University of Texas, wo ich zwei Professuren hatte: eine für Physik und eine für Molekularbiologie. Trotzdem sehe ich mich nicht als Molekularbiologe. Es gibt exzellente Wissenschaftler auf diesem Gebiet. Ich will die Biologie verstehen, aber einen Beitrag aus einer physikalischen Perspektive leisten.

Wie sieht Ihr Beitrag als Physiker aus?

Das molekularbiologische Bild von dem, was in Zellen vorgeht, wird immer besser. Aber ich finde so ein biologisches Netzwerk, in dem mehr als 140 Moleküle miteinander verbunden sind, extrem unübersichtlich. Überspitzt formuliert: Würde ich nur Verbindungen zwischen einzelnen Komponenten herstellen, müsste ich bei einem Autoschlussfolgern, dass der Türgriff der wichtigste Teil des Motors ist. Wenn ich das Auto nicht öffnen kann, kann ich im Normalfall den Motor nicht starten. Funktionell gesehen, haben aber beide nichts miteinander zu tun. Daher definiert man in der Systembiologie funktionelle Einheiten und untersucht diese Module. Das bringt Struktur in die Sache. Das Modul, das uns interessiert, ist die Biomechanik einer Zelle, ihre Materialeigenschaften. Wie steif ist sie und welchen Einfluss hat das darauf, wie gut sie sich teilen oder fortbewegen kann?

Warum braucht man überhaupt einen biomechanischen Ansatz?

Biomechanik klingt sexy nach „nano“ und „Lasermanipulation“, aber darum geht es nicht. Der zentrale Punkt ist: Kleine Veränderungen im Zytoskelett haben eine große Wirkung auf die Zelle, weil sie sich nichtlinear verstärken. Daher können wir Effekte beobachten, die sich auf der Proteinebene nicht oder nur schwer erfassen lassen.

Wie messen Sie diese Effekte?

Wir haben einen optischen Zellstrecker entwickelt, ein ganz tolles Physikerspielzeug: Wir schießen mit zwei Laserstrahlen auf eine Zelle, die dadurch auseinandergezogen wird. So bestimmen wir ihre Elastizität. Und das Ganze ist auch noch selbstjustiert, weil Zellen dielektrisch sind. Sie mögen elektrische Felder und richten sich sehr schnell im elektrischen Feld des Laserlichts aus. Auf diese Weise haben wir einen relativ hohen Durchsatz von wenigstens 30 Zellen pro Minute und vermessen mit etwas Geduld genügend Zellen, um aussagekräftige Daten zu bekommen.

Was sagt die Zellelastizität aus?

Verschiedene Zellen zeichnen sich durch unterschiedliche Elastizitäten aus. Stammzellen sind zum Beispiel undifferenziert und haben fast kein Zytoskelett, sind also besonders weich. In einem



Josef Alfons Käs (Bild: Stefanie Reinberger).

Projekt hier an der Universität Leipzig geht es darum, Knorpelmaterial im Bioreaktor zu züchten. Dabei hilft die Zellelastizität, um Aussagen über das Differenzierungsstadium von Zellen zu machen und die richtigen für weitere Schritte auszuwählen. Unser Hauptinteresse gilt aber Krebszellen. Wir wollen wissen, wie sich ihre Biomechanik verändert, wenn sich ein Tumor entwickelt und voranschreitet. Zwar gibt es viele verschiedene Tumorarten, doch das Krankheitsprinzip ist immer ähnlich: Es beginnt mit unkontrollierter Proliferation. Dann müssen die Zellen invasiv gegen das umliegende Gewebe anwachsen. Und schließlich müssen sie in der Lage sein, den Tumor zu verlassen, um Metastasen zu bilden. Und bei all diesen Punkten spielt es eine wichtige Rolle, wie weich oder hart eine Zelle ist. Wir haben ganz charakteristische biomechanische Merkmale gefunden, die jeder solide Tumor benötigt, um diese drei Anforderungen zu erfüllen.

Welche sind das?

Zellpopulationen, die stark proliferieren, sind weich und lassen sich bei geringem Druck leicht verformen, weil sie bei der Teilung ihren Aktinkortex auflösen. Aber bei größerem Gegendruck versteifen sich Tumorzellen. Sie versteifen sich besonders gut und verdrängen dadurch das weichere normale Gewebe. Und schließlich finden wir bei weit fortgeschrittenen Tumoren Zellen, die sich im optischen Strecker nicht auseinander ziehen lassen. Sie ziehen sich statt dessen zusammen, weil sie sehr mechanosensitiv sind. Dadurch verkleinern sie ihre Oberflächen und werden weniger adhäsiv. Und sehr wahrscheinlich sind sie es, die den Tumor verlassen und Metastasen bilden.

Wie profitiert die Krebsforschung von diesen Erkenntnissen?

Es gibt gute Diagnosemethoden, und da wäre es lächerlich, wenn ich als Physiker ankäme und sagen würde, dafür braucht man jetzt ein Lasergerät. Aber wir können einen Beitrag zu einer differenzierteren Diagnostik leisten. Derzeit laufen zwei klinische Studien bei Brust- und Gebärmutterhalskrebs. Es sieht ganz gut aus, dass wir metastasierende Zellen identifizieren können – ohne dafür Lymphknoten zu entfernen. Und dann lässt sich die Biomechanik zur Früherkennung nutzen, etwa für Tumore in Mund- und Rachenraum. Hier besteht großes Interesse in China und Indien, wo diese Krebsarten mit steigendem Wohlstand stark zunehmen.

Wie finden Biomechanik und Molekularbiologie von Tumorzellen zusammen?

Gemeinsam mit Roland Eils im Krebsforschungszentrum in Heidelberg haben wir im Herbst 2010 einen großen Screeningansatz gestartet, um nach Genen und Schlüsselstellen zu suchen, die wichtig sind für die Veränderung der biomechanischen Eigenschaften. In ein paar Jahren kann ich dazu mehr sagen. Im Moment ist es einfach viel Arbeit.

Was bedeutet interdisziplinäres Arbeiten für Sie?

Hier in der Abteilung arbeiten neben Physikern auch Mediziner und Tiermediziner und natürlich gute Techniker – leider zur Zeit keine Biologen. Wie haben molekularbiologische Labore und machen daher Grundlegendes selbst. Wenn es aber richtig in die Tiefe gehen soll, wie zum Beispiel bei dem großen Screening, brauchen wir Fachleute, die auch die notwendige Ausstattung für so etwas haben, Roboterstraßen und so weiter. Das Tolle an einer solchen Zusammenarbeit ist, dass man nicht überall Fachmann sein muss. Ich darf aber auch dumme Fragen stellen und kann vielleicht gerade dadurch neue Aspekte aufzeigen. Die Biologie ist sehr offen für Impulse aus anderen Disziplinen.

Was brauchen Sie sonst noch, um kreativ zu arbeiten?

Freiheit um meinem Spieltrieb nachzugehen. Ich bin im Prinzip ein kleiner Junge geblieben, der wahnsinnig gerne tüfelt. Zum Beispiel lese ich nie Bedienungsanleitungen von Geräten, sondern probiere immer, ob ich selbst rauskriege wie es geht. So ähnlich ist es auch mit meiner Arbeit. Ich möchte wissen wie etwas funktioniert und experimentiere bis ich dahinter komme. Und dann brauche ich Menschen, die mir widersprechen, die andere Vorstellungen und Ideen haben. Denn nur so kommt es zu einem fruchtbaren Austausch.

Das Interview führte Stefanie Reinberger.

Kontakt:

Prof. Dr. J. A. Käs

Institut für Experimentelle Physik I

Universität Leipzig

jkaes@physik.uni-leipzig.de

www.softmatterphysics.com

interaktionen zwischen hirnarealen bestimmen, was wir tun

Modellbildungen tragen zum Verständnis der Hirnfunktion bei

von Simon B. Eickhoff und Karl Zilles

Wie können wir die Organisation und vernetzten Systeme eines so komplexen Organs wie des Gehirns verstehen? Die Beantwortung dieser Frage ist für die Grundlagenforschung und auch für die Diagnose und Behandlung neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen essentiell. Ein besseres Verständnis der Ursachen und Besonderheiten krankheitsbedingter Veränderungen setzt dabei voraus, dass wir die Organisation des gesunden Gehirns als System und nicht nur als Ansammlung isolierter Strukturen und Mechanismen begreifen. Um mehr über die Funktion des Gehirns zu erfahren, kombiniert das Institut für Neurowissenschaften und Medizin (INM) am Forschungszentrum Jülich gemeinsam mit Partnern im Human-Brain-Model Netzwerk der Helmholtz-Allianz Systembiologie und in der Jülich-Aachener Forschungsallianz

JARA-Brain, nicht-invasive Methoden zur Messung der menschlichen Hirnaktivität mit systembiologischen Methoden zur Modellierung der Funktionsweise.

Konzepte zur Organisation des menschlichen Gehirns – Wie wirken Hirnareale zusammen?

Seit langer Zeit existieren zwei grundsätzliche Konzepte über die Organisation des Gehirns, *Segregation* und *Integration*. Mit *Segregation* wird die Spezialisierung des Gehirns, insbesondere der Großhirnrinde, in einzelne Module oder Areale bezeichnet, welche sich voneinander in ihrer Struktur und Funktion unterscheiden. *Integration* hingegen bezeichnet die Interaktion verschiedener Bereiche, also die gegenseitige Beeinflussung und das Zusammenspiel einzelner Komponenten. Die Forschungen der letzten Jahrzehnte zeigen, dass motorische oder kognitive Leistungen nicht in einer einzigen Region, Zelle oder Molekül

Abbildung 1: Übersicht über Dynamic Causal Modelling (DCM)

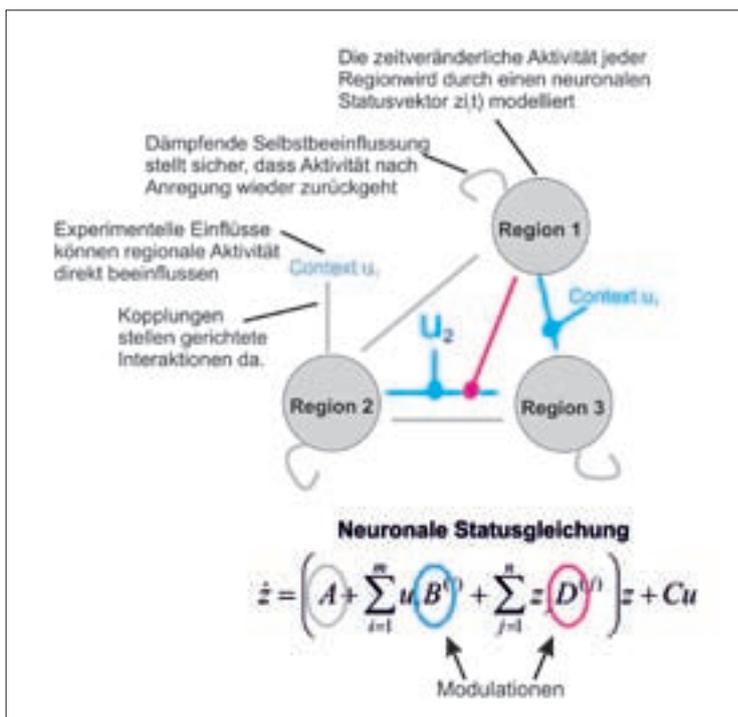


Bild: Simon B. Eickhoff

Dynamic Causal Modelling beruht auf einem nicht-linearen, deterministischen Systemmodell der Interaktion neuronaler Areale. Die Dynamik des Systems ist dabei eine Funktion des momentanen Zustandes (repräsentiert über den neuronalen Statusvektor z), externer Einflüsse u und der (neuronalen) Systemparameter (intrinsische oder endogene Konnektivität: A , kontext-abhängige Modulation: B , direkte Effekte experimenteller Einflüsse: C und nicht-lineare Interaktionseffekte: D).



Abbildung 2a: Das mikroskopisch definierte Broca-Areal (Brodmann-Areal BA44)

Ein Areal, viele Funktionen? Das Brodmann Areal (BA) 44, dessen anatomische Lage im oberen Bild in Rot angezeigt ist, wird oft mit einem Teil der Broca'schen Sprachregion gleichgesetzt. Neben der Sprache zeigt es bei vielen anderen Aufgaben Aktivitäten in funktionellen Bildgebungsstudien. Die Broca'sche Sprachregion enthält daher Hirnrindengebiete, die eine simplifizierende Gleichsetzung der Funktion dieser Region mit der Steuerung der Sprachmotorik verbieten. Dies legt die Notwendigkeit einer systemischen Betrachtung nahe, in der kognitive Prozesse und Verhalten als Interaktionen zwischen verschiedenen Regionen erklärt werden (Bild: Simon B. Eickhoff).

lokalisiert sind. Vielmehr entstehen sie in einem komplexen Netzwerk und auf sehr unterschiedlichen Skalenebenen, – von molekularen Botenstoffen, über Neuronen bis hin zu Hirnarealen – durch dynamischen Austausch von Informationen. Das Konzept der Integration setzt dabei eine regionale Segregation von Hirnstrukturen und Mechanismen voraus, da es die Interaktion von spezialisierten Teilleistungen erfordert. Ein Verständnis der komplexen Struktur und Funktion des Gehirns ist daher ohne eine systembiologische Analyse nicht erreichbar.

Mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRT) sowie der Positronenemissionstomographie (PET) können die neuronalen Aktivitäten, die kognitiven Prozessen zugrunde liegen, nicht-invasiv im Gehirn des Menschen lokalisiert werden. Dies führte dazu, dass die Lokalisation immer spezialisierterer neuropsychologischer Vorgänge zum dominierenden Paradigma wurde. Neue Ansätze zur mikrostrukturellen Kartierung der menschlichen Großhirnrinde (Zilles and Amunts, 2010) erlauben darüber hinaus, Fragen nach der Korrespondenz zwischen Anatomie und Funktion im Gehirn zu untersuchen. Werden aber funktionelle Bildgebungsbefunde mit populationsbasierten Wahrscheinlichkeitskarten z. B. zur Lage und Ausdehnung der mikrostrukturell (zytoarchitektonisch) definierten Areale in der Hirnrinde verglichen, so zeigen sich zwei zunächst widersprüchliche Phänomene: Einerseits lässt sich eine gute Korrespondenz zwischen Arealen und Funktion nachweisen, die es erlaubt, benachbarten Arealen unterschiedliche Funktionen zuzuordnen. Andererseits zeigt sich auch, dass dasselbe Areal in verschiedenen Kontexten aktiviert werden kann. Dem „Broca'schen Sprachareal“, einer spezialisierten Region der Großhirnrinde, werden z. B. eine Reihe differenzierter linguistischer Funktionen zugeschrieben, welche sich auch in Systemmodellen abbilden lassen. Interessanterweise werden im selben Areal aber auch Aktivitäten bei Handlungsbeobachtung und -steuerung, sowie bei Aufgaben des Arbeitsgedächtnisses oder der visuellen Suche beobachtet (Abb. 2). Das Areal

ist also neben der ihm zugeschriebenen Hauptaufgabe der Sprachbildung noch an zahlreichen anderen Aufgaben beteiligt (Caspers *et al.* 2010).

Dieser scheinbare Widerspruch zwischen Segregation und Integration verdeutlicht die Notwendigkeit einer systemischen Betrachtung des Gehirns, in der kognitive Prozesse und Verhalten als strukturelle und funktionelle Interaktionen zwischen einzelnen Regionen erklärt und mithilfe von Computermodellen interpretiert werden. Dieses Vorgehen stellt eine deutliche Abkehr von dem in Experimentalpsychologie und Medizin vorherrschenden Ansatz dar, ein Problem in kleinste Einheiten und Mechanismen zu unterteilen und diese isoliert zu untersuchen. Nur systembiologische Ansätze erlauben, die Funktionsweise aus seiner dynamischen Netzwerkstruktur zu erklären. Das Ganze ist – wie so oft – mehr als die Summe seiner Teile. Der systembiologischen Modellbildung kommt auch deshalb eine entscheidende Rolle zu, da Gehirnaktivität und Interaktionen zwischen Arealen mit den heutigen Verfahren oft nicht direkt gemessen werden können. Vielmehr spiegeln funktionelle MRT-Messungen (fMRT) lediglich die durch neuronale Aktivität induzierten Änderungen des lokalen Blutflusses wieder. Über ein Systemmodell der gemessenen Daten entsteht aber ein Zugang zur Charakterisierung der nicht direkt messbaren neuronalen Aktivitäten und der kausalen Wechselwirkungen der beteiligten Regionen.

Dynamic Causal Modelling: Ein Systemmodell des Gehirns

Der wichtigste Ansatz zur mathematischen Beschreibung von funktionellen Netzwerken ist das „Dynamic Causal Modelling (DCM)“, welches das Gehirn als ein dynamisches Input-Output System beschreibt (Friston *et al.* 2003). Die Elemente dieses Systems sind zum einen (i) einzelne Gehirnregionen, (ii) Inputs (Einflüsse) – experimentelle Manipulationen, wie die Darbietung eines Stimulus oder die Aufforderung eine Hand zu bewegen

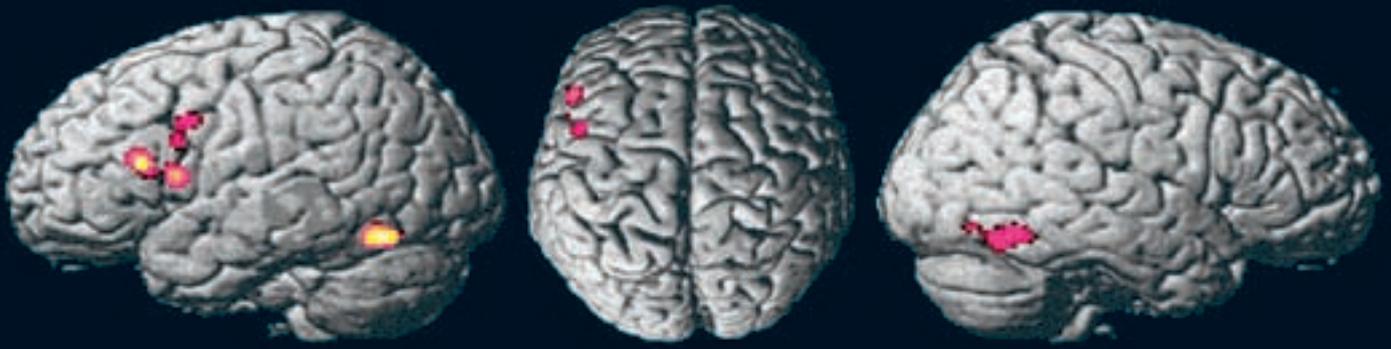


Abbildung 2b: Funktionelle Aktivierung bei vorgestellten Handlungen.

– und schließlich (iii) Outputs – die (indirekt) gemessene Hirnaktivität. Das Modell besitzt eine neuronale und eine hämodynamische (den Blutfluss betreffende) Ebene. Entscheidend für das Verständnis funktioneller Integration ist die neuronale Ebene, in der die Aktivität jeder Region durch eine Statusvariable $z_i(t)$ repräsentiert wird. Diese repräsentiert dabei keinen direkten physiologischen Zustand des Gehirns, sondern dient als Gesamtmaß für die Aktivität des repräsentierten Areals. Die Netzwerkdynamik wird durch die Interaktionen zwischen Regionen sowie die experimentellen Einflüsse bestimmt. Letztere können dabei das System beeinflussen, indem sie direkt Aktivität in einem Areal hervorrufen. Andererseits können sie auch die Interaktionen zwischen Regionen modulieren. Im Rahmen von DCM wird die Dynamik des Systems als Funktion der neuronalen Zustände (also des momentanen Statusvektors z), der modellierten Einflüsse u und der Interaktionen zwischen den Regionen abgebildet (Abb. 1).

Das neuronale Modell wird dann mit dem hämodynamischen Vorwärtsmodell gekoppelt, welches den Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und Messwerten beschreibt. Die Validität eines Systemmodells wie DCM hängt natürlich von seinen Annahmen ab, wobei es in der Praxis nur schwer möglich ist, eine Verbindung zwischen zwei Regionen oder deren Modulation definitiv anzunehmen oder auszuschließen. Vielmehr sind in der Regel mehrere neurobiologisch plausible Modelle möglich, die Alternativhypothesen über die Struktur und Dynamik des untersuchten Netzwerkes darstellen. Über den in DCM verwendeten Ansatz können dabei nicht nur die Parameter des Modells, sondern dessen eigene *a posteriori* Wahrscheinlichkeit geschätzt werden. Dies erlaubt es, jenes Model zu identifizieren, welches den besten Kompromiss zwischen Genauigkeit und Komplexität darstellt und so zwischen alternativen Hypothesen zu entscheiden.

Abbildung 3: Systemmodell der Handbewegung

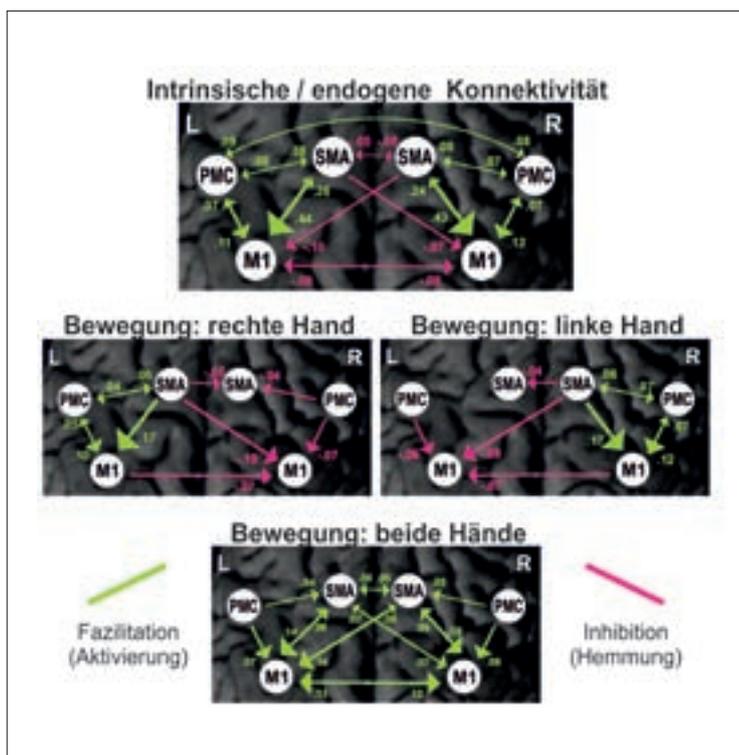


Bild: Simon B. Eickhoff

Das DCM verdeutlicht die hohe Bedeutung der hemisphärischen Spezialisierung sowie der Interaktion zwischen beiden Gehirnhälften. Die intrinsische Konnektivität ist symmetrisch organisiert mit jeweils bidirektionalen positiven Kopplungen (grüne Pfeile) innerhalb jeder Hemisphäre und überwiegend hemmenden interhemisphärischen Verbindungen (rote Pfeile). Dieses dynamische Gleichgewicht wird durch Bewegung nur einer Hand deutlich moduliert. Es kommt dabei zu einer Zunahme der Konnektivität zwischen allen Arealen der kontralateralen Gehirnhälfte, während alle Verbindungen zum primären Motorkortex, der die momentan nicht bewegte Hand kontrolliert, negativ moduliert werden. Dieses Muster findet sich spiegelbildlich für beide Hände. Bei gleichzeitiger Bewegung beider Hände kommt es hingegen zu einer positiven Kopplung, also einer Interaktion zwischen den Gehirnhälften.

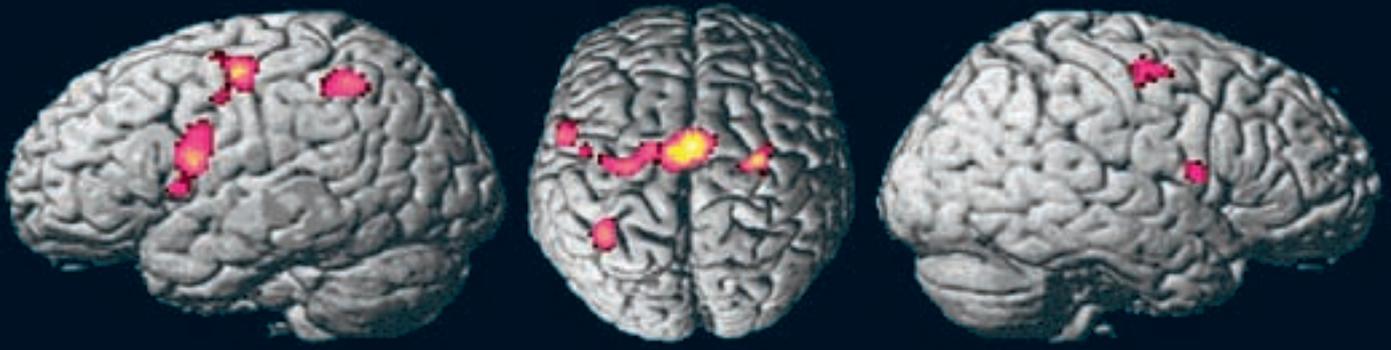


Abbildung 2c: Funktionelle Aktivierung beim Benennen von Bildern.

Dynamische Interaktionen steuern die Handbewegungen

Der Nutzen einer Modellierung neuronaler Systeme für das Verständnis effektiver Konnektivität lässt sich sehr gut am motorischen System demonstrieren. So ist bei Bewegung einer Hand der primäre motorische Kortex (M1) auf der entgegengesetzten Hirnseite aktiviert und sendet die Befehle zur Muskelkontraktion an die entsprechenden motorischen Neurone des Rückenmarks. Durch funktionelle Bildgebungsstudien konnte gezeigt werden, dass weitere Regionen im motorischen System die Ausführung von Bewegungen kontrollieren. So wirken der prämotorische Kortex (PMC) und das supplementär-motorische Areal (SMA), ebenfalls auf der entgegengesetzten Seite, bei der Kontrolle bzw. Steuerung von Bewegungen mit. Jedoch ist sehr wenig darüber bekannt, welche Interaktionen zwischen diesen Regionen ablaufen und welche Rolle die Verbindungen zwischen den beiden Gehirnhälften spielen. Gerade diesem Zusammenwirken wird aber eine entscheidende Rolle in den Reorganisationsprozessen nach einem Schlaganfall oder einer peripheren Schädigung des Bewegungsapparates zugesprochen. Systembiologische Untersuchungen mittels DCM können entscheidend dazu beitragen, ein tieferes Verständnis dieser Interaktionen zu erhalten. Zu diesem Zweck führten wir Untersuchungen an gesunden Probanden und nachfolgend auch verschiedenen Patientengruppen durch (Grefkes *et al.* 2008; Eickhoff *et al.* 2008). Hierbei lagen die Probanden im fMRT-Scanner und wurden über einen Bildschirm instruiert, entweder nur die linke, nur die rechte oder beide Hände gleichzeitig zu bewegen. Die hervorgerufene Gehirnaktivität wurde während des Experiments kontinuierlich aufgenommen. Hierbei fand man signifikant erhöhte Aktivität bei der aktiven Bewegung in der jeweils der bewegten Hand gegenüber liegenden Gehirnhälfte.

Modelliert man mittels DCM die Interaktionen im motorischen System, so zeigt sich im wahrscheinlichsten Modell die hohe Bedeutung der hemisphärischen Spezialisierung und der Interaktion zwischen beiden Gehirnhälften (Abb. 3). Die intrinsische oder endogene Konnektivität, zeigt ein höchst symmetrisches Bild aus positiver Kopplung von Arealen einer Hemisphäre (M1, PMC, SMA) und hemmenden interhemisphärischen Verbindungen

(z. B. M1-M1). Eine Zunahme der Aktivität auf einer Hemisphäre bewirkt also eine Reduzierung des Aktivitätsniveaus der Gegenseite. Wird nun entweder die rechte oder die linke Hand bewegt, so kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Konnektivität zwischen allen Arealen der gegenüberliegenden Gehirnhälfte. Im Gegensatz dazu werden alle Verbindungen in Richtung des primären Motorkortex, der die momentan nicht bewegte Hand kontrolliert, negativ moduliert. Das Gehirn konzentriert also gewissermaßen seine Aufmerksamkeit auf die einseitige Bewegung. Eine völlig andere Interaktion ergibt sich bei der gleichzeitigen Bewegung beider Hände. Es kommt zu einer Umkehr der interhemisphärischen Kopplungen, so dass nun eine positive Interaktion zwischen den Gehirnhälften auftritt. Mit anderen Worten, während beide Seiten des Gehirns normalerweise in einem gegenseitig hemmenden Gleichgewicht sind, die sich bei Bedarf an einseitiger Steuerung noch verstärkt, kommt es bei koordinierter Bewegung beider Hände auch zur verstärkten Kooperation zwischen den Gehirnhälften (Grefkes *et al.* 2008).

Diesen dynamischen Vorgängen im Gehirn müssen natürlich strukturelle Organisationen als – je nach Bedarf – mehr oder weniger genutzte Informationsbahnen zugrunde liegen. Im Gehirn des Menschen waren diese Faserbahnen lange Zeit nur in groben Umrissen bekannt. Neue bildgebende Methoden wie das MRT-basierte Diffusions-Tensor-Imaging oder die hochauflösende Bildgebung der Faserbahnen mit der Polarisationsmikroskopie liefern gegenwärtig immer detailliertere Informationen über die Grundlage dieser neuronaler Interaktionen.

Zusammen werden diese strukturellen und funktionellen Daten und Modelle unserem Verständnis der Organisation des gesunden und erkrankten Gehirns neue Perspektiven eröffnen, die Diagnose und Therapie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen auf einer wissenschaftlichen Grundlage ermöglichen. Momentan konzentrieren sich die Arbeiten dabei auf zwei entscheidende Fragestellungen: Wie können verschiedene Aspekte der Konnektivität im Gehirn zu gemeinsamen Modellen integriert werden und wie können krankhafte Prozesse von der normalen Varianz oder den Veränderungen beim gesunden Altern abgegrenzt werden.



Abbildung 2d: Funktionelle Aktivierung bei Arbeitsgedächtnisaufgaben.

Steckbrief:

Im Rahmen der Kooperation JARA-BRAIN arbeiten Wissenschaftler und Ärzte des Forschungszentrums Jülich und des Universitätsklinikums Aachen an neuen Strategien zur Vorbeugung, Diagnose und Therapie psychischer und neurologischer Hirnerkrankungen. Grundlagenforschung, klinische Forschung und technisch-methodische Kompetenz werden dabei eng miteinander verknüpft.

Das Netzwerk „The Human Brain Model“ in der Helmholtz Allianz Systembiologie untersucht am Forschungszentrum Jülich die Struktur-Funktionsbeziehungen im menschlichen Gehirn und die Integration zwischen Gehirnleistungen, um durch einen solchen interdisziplinären Ansatz die Organisation dieses komplexen Systems zu verstehen und in Modellen zu beschreiben.

Referenzen:

- Caspers, S., Zilles, K., Laird, A.R. & Eickhoff, S.B. (2010). ALE meta-analysis of action observation and imitation in the human brain. *Neuroimage*.
- Eickhoff, S.B., Stephan, K.E., Mohlberg, H., Grefkes, C., Fink, G.R., Amunts, K. & Zilles, K. (2005). A new SPM toolbox for combining probabilistic cytoarchitectonic maps and functional imaging data. *Neuroimage* 25(4):1325-1335.
- Friston, K.J., Harrison, L. & Penny, W. (2003). Dynamic causal modelling. *Neuroimage* 19(4):1273-1302.
- Grefkes, C., Eickhoff, S.B., Nowak, D.A., Dafotakis, M. & Fink, G.R. (2008). Dynamic intra- and interhemispheric interactions during unilateral and bilateral hand movements assessed with fMRI and DCM. *Neuroimage* 41(4):1382-1394.
- Zilles, K. & Amunts, K. (2010). Centenary of Brodmann's map-conception and fate. *Nat.Rev.Neurosci.* 11(2):139-145.

Kontakt:

Prof. Dr. Simon Eickhoff
 Institut für Neurowissenschaften und Medizin,
 Forschungszentrum Jülich,
 Klinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychosomatik
 Universitätsklinikum Aachen
 S.Eickhoff@fz-juelich.de



Prof. Dr. Karl Zilles

Institut für Neurowissenschaften und Medizin,
 Forschungszentrum Jülich,
 C & O Institut für Hirnforschung
 Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
 K.Zilles@fz-juelich.de



www2.fz-juelich.de/inm/inm-2/index.php?index=319

die funktionsweise der netzhaut

Neue Erkenntnisse durch die Systembiologie

von Stephan Meding und Axel Walch

Trotz jahrzehntelanger Erforschung der Netzhaut, dem für das Sehen verantwortlichen Teil des Auges, wissen wir bis heute wenig über ihre Funktionsweise. Daher gibt es nur wenige, theoretische Modelle zu ihrer Funktionsweise, die zudem nicht auf Experimenten, die das intakte Gewebe betrachten, beruhen. Der Verbund „IMAGING – Multimodale proteomische Bildgebung: Zugang zur Biomedizinischen Systembiologie von Geweben“ hat das Ziel, die Netzhaut als Modellsystem gewebsbasiert *in vitro* und *in vivo* zu beschreiben. Dabei wird die Schichtstruktur der Netzhaut zur Entwicklung und Verknüpfung neuer, bildgebender Methoden für die systembiologische Beschreibung komplexer Gewebeszustände genutzt. Diese innovativen Methoden werden durch automatisierte Bildanalyse unterstützt.

In den letzten gut hundert Jahren wurde die Netzhaut detailliert beschrieben, ihr Aufbau, ihre zellulären Bestandteile, die Funktionen der einzelnen Zelltypen und deren Wechselspiel. Dennoch können solch scheinbar einfache, alltägliche Prozesse wie die An-

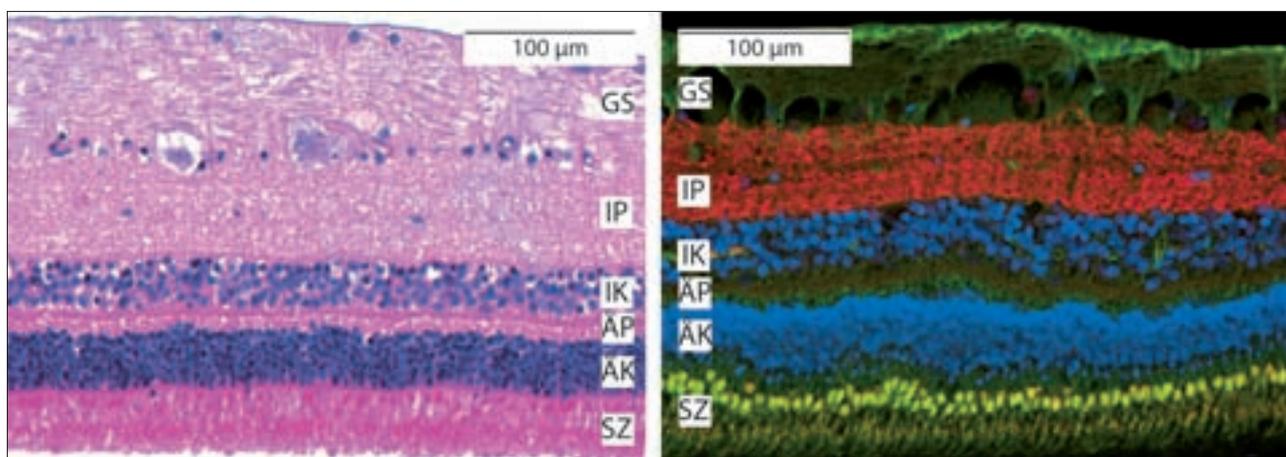
passung an die Lichtintensität, die Hell- und Dunkeladaptation, nicht auf Ebene des Gewebes beschrieben werden. Zwar sind die einzelnen biochemischen Prozesse erforscht, aber der Gesamtzusammenhang ist bis heute nicht verstanden.

Die Adaptation der Netzhaut – Ein ideales Modell für die Systembiologie

Die Netzhaut ist für die Umwandlung von Licht in Nervensignale und die korrekte Weiterleitung an das Gehirn verantwortlich. Die klare Schichtstruktur der Netzhaut macht sie zu einem idealen Forschungsobjekt und Modellsystem für die Entwicklung neuer gewebsbasierter Ansätze in der Systembiologie. In der Stäbchen- und Zapfenschicht findet die Umwandlung von Licht in Nervensignale statt, darüber liegen mehrere Schichten, die für die Signalverschaltung und die Weiterleitung ans Gehirn zuständig sind (Abb. 1). Die Adaptation findet hauptsächlich in der Stäbchen- und Zapfenschicht statt.

Es gibt viele Limitierungen, die es bisher erschwert haben, die Hell- und Dunkeladaptation auf der Ebene des Gewebes zu verstehen. Vor allem die für diese Fragestellung nur eingeschränkt

Abbildung 1: Die Netzhaut



Durchlichtmikroskopische (links) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (rechts) einer Netzhaut. Die einzelnen Schichten der Retina sind deutlich zu erkennen. Die klare Schichtstruktur macht die Netzhaut zu einem idealen Modellsystem für systembiologische Gewebeanalysen. (GS: Ganglienzellschicht, IP: Innere plexiforme Schicht, IK: Innere Körnerschicht, AP: Äußere plexiforme Schicht, AK: Äußere Körnerschicht, SZ: Stäbchen und Zapfenschicht - Hauptort der Adaptation).

Bild: Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München

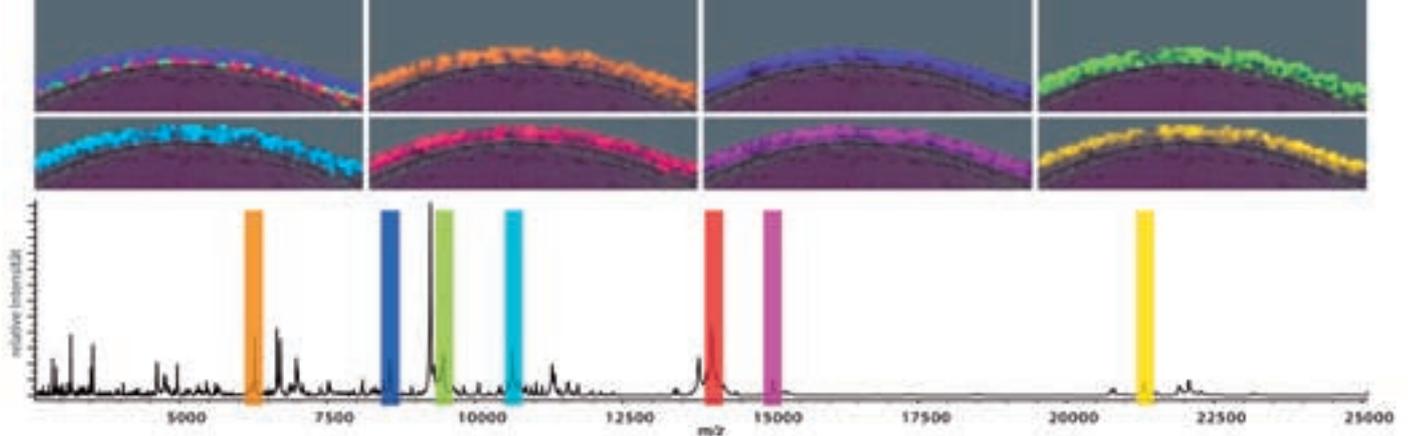


Abbildung 2: Bildgebende Massenspektrometrie an der Netzhaut

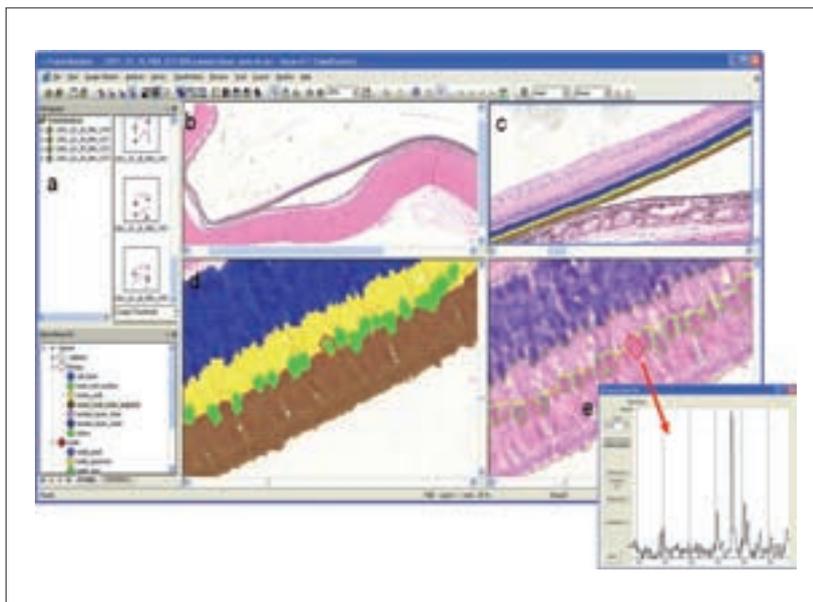
Bildgebende Massenspektrometrie ermöglicht es, komplexe Proteinmuster in der Netzhaut zu visualisieren und damit Proteine einzelnen Schichten der Netzhaut zuzuordnen. Beispielhaft dafür ist eine Klassifikation der Spektren (oben links) und die Verteilung von sieben Proteinen in der Netzhaut, sowie das entsprechende Massenspektrum (unten). (Bild: Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München)

geeigneten Zellsystems, die suboptimalen Messmethoden und die noch fehlenden Modellierungsansätze, haben ein Verständnis des Gesamtzusammenhangs verhindert. Enorme methodische Fortschritte wurden in den letzten Jahren gemacht, aber trotzdem resultierte daraus noch kein umfassendes theoretisches Modell der Adaptation. Der Hauptgrund liegt in der Herangehensweise. Man versuchte bisher vom molekularen Detail auf die nächsthöhere Ebene zu schließen. Dadurch war es aber nicht möglich, Gesamtbetrachtungen von Geweben, wie die der Netzhaut, anzustellen. Die Systembiologie verfolgt einen anderen Ansatz. Man geht ganzheitlich an das Problem heran, in diesem Fall von der Ebene des Gewebes ausgehend. Erst dieser Ansatz ermöglicht ein systembiologisches Verstehen der Adaptation, wobei hier vor allem bildgebende Verfahren eine zentrale Rolle spielen. Erst wenn man die Netzhaut als Gewebe begreift und in ihrer Gesamtheit analysiert, ist ein ganzheitliches Verständnis der Adaptation möglich. Dieses Vorgehen war bislang wegen fehlender Methoden nicht möglich. Durch die Kombination von molekularen und bildgebenden Verfahren kann jetzt die Netzhaut auf

Einzelzellebene untersucht werden. Dies ermöglicht erstmals eine ganzheitliche Betrachtung und systembiologische Analyse.

Neben eines systembiologischen, integrativen Ansatzes, der verschiedenste, sich methodisch ergänzende, molekulare und bildgebende Verfahren vereint, braucht es eine enge Zusammenarbeit mit Modellierungsspezialisten, sowohl bei der Planung der Experimente als auch bei der anschließenden mathematischen Modellierung. Diese Voraussetzungen sind erstmals im Verbundprojekt „IMAGING – Multimodale proteomische Bildgebung: Zugang zur biomedizinischen Systembiologie von Geweben“ der SysTec-Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gegeben. Das Verbundprojekt vereint vier Forschungsinstitute des Helmholtz Zentrums München (die Abteilung für Proteinanalytik, das Institut für Pathologie, das Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung und das Institut für Biomathematik und Biometrie) und zwei Partner aus der Industrie (die Definiens AG aus München, und die Bruker Daltonik GmbH aus Bremen). Gemeinsam ist es nun möglich, die Adaptation der Netzhaut mit

Abbildung 3: Definiens Software Plattform zur Verwaltung und Analyse insbesondere von Bilddaten



Zu sehen sind a) Projektverwaltung für die einzelnen Präparate der Netzhaut; b) Ansicht eines histologischen Schnitts der Netzhaut; c) automatisch identifizierte Schichten der Netzhaut (blau, gelb, braun); d) Detailansicht von automatisch identifizierten Strukturen (grün) in der Stäbchen- und Zapfenschicht; e) Darstellung eines zugeordneten Spektrums einer bildgebenden Massenspektrometriemessung.

Bild: Definiens AG, München

verschiedenen Methoden *in vitro* und auch *in vivo* zu untersuchen und anhand der experimentellen Ergebnisse ein theoretisches Modell zu erzeugen und zu validieren.

Bildgebende Massenspektrometrie als Schlüsseltechnologie

Die bildgebende Massenspektrometrie, im Englischen MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) Imaging Mass Spectrometry, vereint Mikroskopie und Massenspektrometrie und stellt in diesem Verbundprojekt eine Schlüsselmethode dar. Sie erweitert die Histologie, das heißt die mikroskopische Untersuchung des Gewebes, um eine komplexe, molekulare Dimension. Dadurch kann in Geweben die Verteilung von Proteinen mit zellulärer Auflösung sichtbar gemacht werden. Dies ermöglicht eine detaillierte und exakte Analyse von Geweben (Walch *et al.*, 2008). Die Präparation für die massenspektrometrische Messung erfolgt in mehreren, einfachen Schritten. Gewebeschnitte werden mit einer Matrix behandelt. Dies überführt die im Gewebe vorhandenen Proteine ortsaufgelöst in die Matrix. Mit Hilfe eines Lasers wird dann das Matrix-Protein-Gemisch punktwise verdampft und anschließend die Proteinzusammensetzung jedes einzelnen Messpunktes bestimmt. Nach der Messung wird die Matrix entfernt und das Gewebe, das durch die Messung nicht beschädigt wurde, histologisch gefärbt. Im letzten Schritt wird das ortsaufgelöste Proteilmuster mit einem hochauflösenden Mikroskopbild des histologischen Schnitts am Computer überlagert, so dass gleichzeitig die Morphologie und die Verteilung der einzelnen Proteine im Gewebe betrachtet werden können (Abb. 2). Bislang war die Auflösung bei kommerziell erhältlichen Massenspektrometern auf 100 – 200 µm begrenzt, durch methodische und technische Weiterentwicklung (federführend durch die Bruker Daltonik GmbH) ist nun eine zelluläre Auflösung möglich (20 µm) (Lagarrigue *et al.*, 2010). Die bildgebende Massenspektrometrie ermöglicht nun die bislang entscheidende Limitierung in der Proteinanalytik von Geweben zu überwinden. Mit dieser Methode ist es jetzt erstmals möglich die einzelnen Proteine und Proteilmuster bestimmten Zelltypen zuzuordnen. Dies ist im Falle der Netzhaut von größter Bedeutung. Ohne eine Einzelzellauflösung ist es unmöglich die während der Adaptation ablaufenden Prozesse, welche hauptsächlich in der Stäbchen- und Zapfenschicht stattfinden, den einzelnen Schichten zuzuweisen.

Synergismus aus bildgebenden und proteomischen Verfahren

Komplementiert wird die bildgebende Massenspektrometrie durch weitere bildgebende Verfahren und bildbasierte Analysemethoden, sowie durch die umfassende proteomische Analyse der licht- und dunkeladaptierten Netzhaut. Dafür finden moderne, proteomische Methoden Anwendung. Alle Proteine der Netzhaut und ihre jeweiligen Modifikationen werden nach entsprechender Adaptation identifiziert und vergleichend quantifiziert (Hauck *et al.*, 2010). Im Sinne der systembiologischen Analyse können nun erstmals diese proteomischen Signaturen mit der bildgebenden Massenspektrometrie kombiniert werden und so die Adaptation in molekularer, ortsaufgelöster Form abgebildet werden. Gezielte immunhistologische Färbungen von Geweben (*in situ*) komplettieren diese Analysen auf molekularer Ebene und können durch vergleichende Bildanalysen quantifiziert werden. Um die Adaptation in ihrer Dynamik untersuchen zu können, werden den *in vitro* Erkenntnissen *in vivo* Experimente gegenübergestellt. Das Verständnis der Netzhaut kann dadurch um dynamische und ortsspezifische Parameter erweitert werden. In diesem Projekt werden augenmedizinische Untersuchungstechniken genutzt und mit multispektralen Methoden zur molekularen Bildgebung verknüpft, die es ermöglichen mehrere Fluoreszenzmarker simultan zu messen (Themelis *et al.*, 2008). Das Ziel dabei ist es, mit Fluoreszenzmolekülen markierte Proteine über längere Zeiträume zu verfolgen, um damit deren räumliche und zeitliche Dynamik zu beschreiben. Zur qualitativen Verbesserung der Messergebnisse wird die automatische Bildanalyse von Mikroskopbildern genutzt. Durch computerbasierte, automatische Identifizierung der einzelnen Schichten der Netzhaut können schichtspezifische Proteilmuster mit hoher Genauigkeit für weitere Modellierungen bestimmt werden. Um alle im Verlauf des Projekts anfallenden Bild- und Massenspektrometriedaten analysieren und kombinieren zu können, wird eine Softwareplattform der Definiens AG (Abb. 3) verwendet. Dabei sollen Schnittstellen zwischen den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden hergestellt und genutzt werden, um ein möglichst leistungsstarkes und aussagekräftiges systembiologisches Modell der Netzhaut zu erstellen.



Die beteiligten Partner

Ralf Schönmeier, Axel Walch, Alice Ly, Stephan Meding, Karin Radrich, Marius Ueffing, Günter Schmidt, Detlev Suckau, Sandra Rauser, Stefanie Hauck, Laurent Demaret, Vasilis Ntziachristos, Martin Storath (von links nach rechts). (Bild: Die Partner des IMAGING Verbundes)

Medizinischer Nutzen und klinische Relevanz der molekularen Bildgebung

Das Verständnis des normalen, gesunden Zustands der Netzhaut ist Grundvoraussetzung für das Verständnis von Erkrankungen der Netzhaut. Nach der Erforschung der Adaptation wird sich der IMAGING Verbund deshalb den Erkrankungen der Netzhaut zuwenden. Wenn man die Mechanismen hinter krankhaften Veränderungen der Netzhaut besser versteht, so können diese Erkenntnisse neue Behandlungswege eröffnen oder eine wirksame Prävention ermöglichen.

Systembiologie durch eine Integration verschiedener bildgebender Verfahren von Geweben ist nicht nur auf die Untersuchung der Netzhaut beschränkt. Die entwickelten Modelle und wissenschaftlichen Herangehensweisen lassen sich auch auf andere Gewebe wie beispielsweise Tumorgewebe und Entzündungsreaktionen übertragen. Dies erlaubt den Brückenschlag zwischen der molekularen Forschung und der klinischen Anwendung, insbesondere im Hinblick auf die personalisierte Medizin.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Projektname:

IMAGING - Multimodale proteomische Bildgebung: Zugang zur biomedizinischen Systembiologie von Geweben im Rahmen der SysTec-Initiative

Förderinstitution:

BMBF – Bundesministerium für Bildung und Forschung

Projektpartner:

- (1) Abteilung für Proteinanalytik, Helmholtz Zentrum München: Prof. Dr. Marius Ueffing (Koordinator des Verbundprojektes), Dr. Stefanie Hauck, Dr. Alice Ly
- (2) Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München: Prof. Dr. Axel Walch, Prof. Dr. Heinz Höfler, Dr. Sandra Rauser, Stephan Meding
- (3) Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung, Helmholtz Zentrum München: Prof. Dr. Vasilis Ntziachristos, Karin Radrich

(4) Institut für Biomathematik und Biometrie, Helmholtz Zentrum München: Prof. Dr. Rupert Lasser, Dr. Laurent Demaret, Martin Storath

(5) Definiens AG, München: Dr. Günter Schmidt, Dr. Ralf Schönmeier

(6) Bruker Daltonik GmbH, Bremen: Dr. Detlev Suckau

Referenzen:

- Hauck, S.M., Dietter, J., Kramer, R.L., Hofmaier, F., Zipplies, J.K., Amann, B., Feuchtinger, A., Deeg, C.A., and Ueffing, M. (2010). Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 9, 2292-2305.
- Lagarrigue, M., Becker, M., Lavigne, R., Deininger, S.O., Walch, A., Aubry, F., Suckau, D., and Pineau, C. (2010). Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20 μ m resolution. *Mol Cell Proteomics*.
- Themelis, G., Yoo, J.S., and Ntziachristos, V. (2008). Multispectral imaging using multiple-bandpass filters. *Opt Lett* 33, 1023-1025.
- Walch, A., Rauser, S., Deininger, S.O., and Höfler, H. (2008). MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol* 130, 421-434.

Kontakt:

Prof. Dr. Axel Walch

Institut für Pathologie
Helmholtz Zentrum München
axel.walch@helmholtz-muenchen.de

simulierte leberregeneration

Wie Computerprogramme biologische Prozesse in lebendem Gewebe vorhersagen

von Dirk Drasdo, Stefan Hoehme und Jan G. Hengstler

Modelle identifizieren einen bislang unbekanntem Mechanismus

Welche Prozesse laufen in lebendem Gewebe ab? Wie bewerkstelligen es die einzelnen Zellen eines Gewebes, sich zu funktionellen Einheiten zusammenzuschließen? Schon seit mehr als hundert Jahren gehen Biologen dieser Fragestellung nach. Die Kenntnis der komplexen Gewebearchitektur und des Zusammenwirkens innerhalb von Zellverbänden ist wichtig für das Verständnis von Krankheiten. Vor kurzem haben wir eine Technik etabliert, mit der man die Architektur eines Gewebeverbands quantitativ erfassen und Entwicklungen simulieren kann. Am Beispiel der Leberregeneration konnten wir zeigen, wie mit dieser Technik die komplexen Mechanismen des Zusammenspiels von Hepatozyten, dem Hauptzelltyp der Leber, und den Endothelzellen, den kleinen Leberblutgefäßen, besser verstanden werden können. In ständigem Dialog von Experimentatoren und Modellierern entdeckten wir einen zuvor unbekanntem Ordnungsmechanismus, welcher der Leber hilft, sich nach einer Vergiftung zu regenerieren (Hoehme *et al.*, 2010).

Die Leber

In der griechischen Mythologie wurde Prometheus von Zeus dadurch bestraft, dass ein Adler jeden Tag von seiner Leber fraß und sich diese anschließend wieder erneuerte, nur um am nächsten Tag abermals angefressen zu werden. Tatsächlich verfügt die Leber über eine bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit: Bis zu dreiviertel der Lebermasse kann der menschliche Körper nach einer Schädigung wiederherstellen.

Die Leber – als größtes inneres Organ des Menschen – spielt eine wichtige Rolle für den gesamten Stoffwechsel. Sie ist nicht nur für die Aufnahme von Nährstoffen zuständig, sondern entgiftet auch das Blut.

Aufgebaut ist die menschliche Leber aus Lappen, die wiederum aus etwa 500.000 Leberläppchen zu funktionalen Grundeinheiten zusammengesetzt sind. Insgesamt haben wir etwa eine Million dieser Leberläppchen, die von sauerstoff- und nährstoffreichem Blut durchflossen werden. Die spezielle Architektur des Leberläppchens stellt den optimalen Stoffaustausch zwischen Blut und den Hepatozyten, den „Arbeitstieren“ der Leber, sicher.

Medizinische Relevanz

Die Herausforderung für die regenerierende Leber besteht darin, dass eine äußerst komplexe Gewebearchitektur wiederhergestellt werden muss. Leberschäden entstehen durch Virusinfekte, Alkohol oder bestimmte Medikamente. Beispielsweise gehört eine Überdosis des Schmerzmittels Paracetamol (auch bekannt als Acetaminophen) zu den häufigsten Ursachen für akutes Lebersversagen. Die Substanz verursacht ein charakteristisches Schädigungsmuster, bei dem speziell das Zentrum der Leberläppchen betroffen ist.

Als Experimentalsubstanz für unsere Versuche mit Mäusen nutzen wir Tetrachlorkohlenstoff, da das Schädigungsmuster dem von Paracetamol sehr ähnelt. Bereits nach einer Woche hatten die Labortiere ihre Lebermasse vollständig regeneriert. Auch die Funktion war schnell wiederhergestellt. Unser Interesse galt der Frage, wie die Leber diese Leistung bewerkstelligt? Dazu entwickelten wir zunächst aus Experimenten, Bildanalysen und Computersimulationen eine Prozesskette, die uns eine quantitative Analyse des Regenerationsprozesses erlaubte.

Vom Experiment zum Modell

Bevor wir beginnen konnten, benötigten wir zunächst die Ausgangssituation vor der Leberschädigung als Referenzzustand. Dazu wurde die Mikroarchitektur der ungeschädigten Mausleber

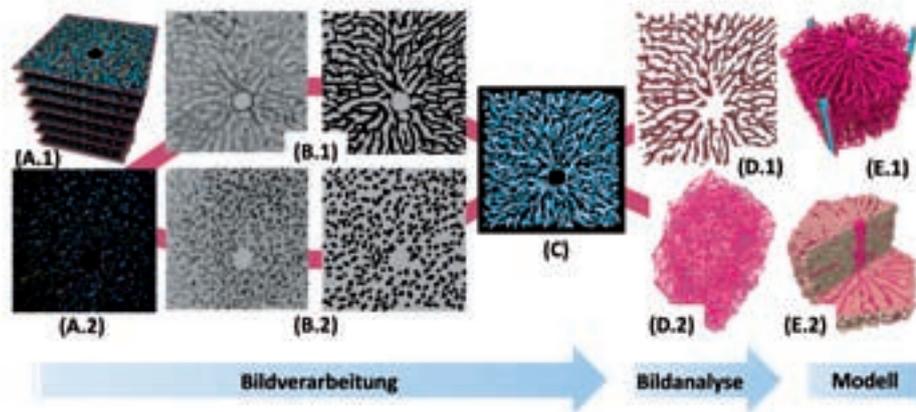


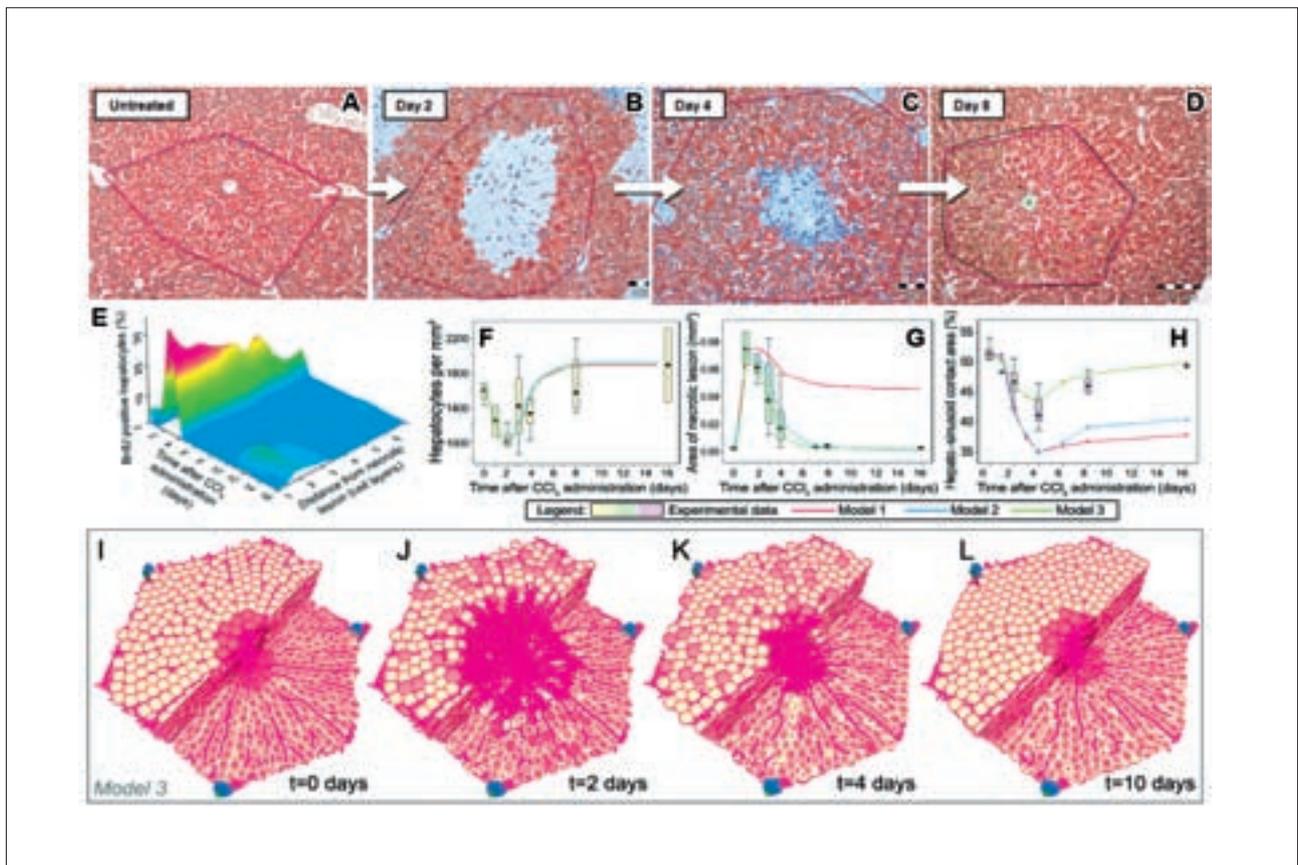
Abbildung 1: Vom Originalbild zum mathematischen Modell.

(A.1) zeigt einen Konfokalmildstapel. Dabei markiert die blaue Färbung die Zellkerne, grün die Sinusoide (Blutgefäße im Leberläppchen) sowie Gallekanäle und rot die Sinusoide und Endothelzellen. Die Überlagerung des roten und grünen Kanals (gelb) markiert die Sinusoide allein. (A.2) ist ein typisches Original-Schnittbild vor der Bildverarbeitung. Die B-Bilder zeigen die Trennung der gelb und blau gefärbten Bildpunkte (B.1: Sinusoide, B.2: Zellkerne), welche in Bildverarbeitungsketten aufgearbeitet und in (C) zu einem drei-dimensionalen Bild des Leberläppchens im Computer wieder zusammengesetzt wurden, das dann zur Quantifizierung der Bildinformation in Bildanalyseschritten weiterverarbeitet wurde (D), um ein repräsentatives Läppchen als Startzustand für das mathematische Modell zu konstruieren (E). (modifiziert aus: Hoehme *et. al.*, 2010)

anhand von optischen Schnittbildern mit einem Konfokalmikroskop vermessen (Abb. 1 A). Um einzelne Strukturen sichtbar zu machen, setzten wir spezielle Fluoreszenzfarbstoffe zur selektiven Färbung ein (Abb. 1 A.1), welche im Computer anschließend mittels einer Bildverarbeitungs- und Analyseketten (Abb. 1 B) zu einem dreidimensionalen Bild zusammensetzt wurde (Abb. 1 C).

Die im Bild enthaltene Information quantifizierten wir durch Weiterverarbeitung der Lage, Position, Dichte und Form der Zellen, sowie der Architektur der Blutgefäße in Zahlen (Abb. 1 D). Als Endprodukt der Bildverarbeitung entstand ein repräsentatives Läppchen, das als Startkonfiguration für die anschließende Computersimulation diente (Abb. 1 E).

Abbildung 2: Schnitt durch das Leberläppchen



Schnitt durch das Leberläppchen (vor Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (A), sowie zwei, vier und acht Tage danach (B-D)). (E-H) Quantitative Charakterisierung des Regenerationsprozesses durch Prozessparameter (Details siehe Text). Die Symbole bezeichnen die experimentellen Ergebnisse nach Bildverarbeitung, die Kurven Simulationsergebnisse mit unterschiedlichen Computermodellen (siehe Legende). (I-L) Regenerationsprozess in der Computersimulation für das Modell, dessen Ergebnisse in F-H mit der grünen Kurve bezeichnet sind. (modifiziert aus: Hoehme *et. al.*, 2010)



Dirk Drasdo

Der Regenerationsprozess in Zahlen

Etwa eine Woche nach der Vergiftung war die Läppchenmasse wieder vollständig hergestellt. Abbildung 2 zeigt einen direkten Vergleich des Regenerationsprozesses im Experiment (obere Reihe) mit der Computersimulation (untere Reihe). Um eine Vergleichbarkeit zwischen biologischer Realität und Modell herstellen zu können, haben wir vier repräsentative Parameter identifizieren können: das Zellteilungsmuster im Läppchen, die Anzahl der Zellen pro Fläche, die Fläche des abgestorbenen Gewebes und die Kontaktfläche zwischen Hepatozyten und Blutgefäßen. Anhand der Werte ist deutlich zu erkennen, dass die Regeneration der Masse der Regeneration der Architektur vorausgeht. Letztere ist erst nach zwei Wochen abgeschlossen.

Der Regenerationsprozess im Computermodell

Das Computermodell erfasst sowohl jeden einzelnen Hepatozyten als auch die Blutgefäße (Sinusoide) als Netzwerk dehnbarer, schlauchförmiger Objekte. Jeder Hepatozyt wird dabei durch eine Bewegungsgleichung beschrieben, mit der zu jeder Zeit seine genaue Position berechnet werden kann. Diese erfasst mathematisch die aktive Eigenbewegung des Hepatozyten sowie alle Kräfte, die auf den Hepatozyten wirken: Die Kraft durch andere Hepatozyten und durch Sinusoide und diejenige, die durch die extrazelluläre Matrix in den kleinen Leerräumen zwischen den Zellen und Sinusoiden auf den Hepatozyten ausgeübt wird. Die Zellparameter im Modell sind im Prinzip alle messbar. Eine der Zelle äquivalente Bewegungsgleichung wurde auch für die Sinusoide aufgestellt.

Um sicherzugehen, dass das Modell auch die Wirklichkeit widerspiegelt, haben wir die Computerdaten immer wieder mit den Messungen der Biologen abgeglichen. Wie wichtig die Rückkopplung mit den Laborexperimenten ist, zeigt die fortlaufende Weiterentwicklung des Modells in drei Schritten. In der ersten Version des Modells fand die Zellteilung in zufälliger Richtung statt und auch die Zellwanderung geschah ungerichtet. Die Erklärungskraft des Modells war gering, da lediglich die Anzahl der regenerierten Leberzellen korrekt beschrieben wurde (rote Kurve in Abb. 2 D).

Ein genaueres Studium der Mikroskopieschnitte zeigte, dass die Hepatozyten am Rand der abgestorbenen Regionen füschenartige Ausläufer in das tote Gewebe hineinstreckten. Könnten die Zellen vielleicht kollektiv gerichtet wandern – obwohl isolierte Hepatozyten in toten Leberteilen nicht nachzuweisen waren? Nachdem wir gerichtete Zellbewegungen in der zweiten Version des Modells berücksichtigten, führte dies zu einer erheblichen Verbesserung der Computervorhersage. Mit Modell 2 ließ sich auch das Schließen der toten Zone korrekt beschreiben (blaue Kurve in Abb. 2 G). Trotzdem versagte das Modell weiterhin, wenn es um die Architektur ging (Abb. 2 H). Diese erfordert nämlich ein hohes Maß an Ordnung: Die Hepatozyten mussten sich wie Perlen auf einer Schnur an den Sinusoiden entlang schlängeln, um ihre Kontaktfläche zu maximieren. Tatsächlich gelang der Durchbruch, als im Modell 3 angenommen wurde, dass sich die Hepatozyten bei ihrer Teilung entlang der Sinusoide ausrichten. Dieser Mechanismus konnte alle Prozessparameter korrekt erklären (grün in Abb. 2 E-H). Aber entspricht die Erklärung des Modells auch der Wirklichkeit in lebendem Gewebe?

Unsere Vorhersage bestätigt sich: HSA ist ein Ordnungsmechanismus

In einem letzten Experiment haben wir in drei Dimensionen den Winkel zwischen den beiden Tochterzellen nach ihrer Teilung und dem nächstgelegenen Sinusoid bestimmt. Das Ergebnis entsprach den theoretisch von Modell 3 vorhergesagten Werten. Damit war bestätigt, dass sich Hepatozyten an den Sinusoiden ausrichten. Ohne diesen Ordnungsmechanismus, den wir HSA (Hepatocyte-Sinusoid Alignment) taufte, kann eine korrekte Regeneration der Leberläppchenarchitektur nicht stattfinden.

Mit dieser Arbeit konnten wir beispielhaft zeigen, wie Bildinformationen aus histologischen Präparaten genutzt werden können, um Modelle zur Vorhersage von räumlich-zeitlichen Organisationsprozessen im Gewebe aufzustellen. Das Prinzip

unseres Verfahrens kann leicht übertragen werden und ist vielseitig anwendbar: Es wird derzeit etwa zum Verständnis von Leber- und Lungenkrebs, sowie anderen Erkrankungen dieser Organe eingesetzt. Ebenso hilft die Arbeit beim Verständnis der Leberregeneration nach einer operativen Teilentfernung, die bei Krebserkrankungen nötig sein kann.

Da das Modell jede einzelne Zelle abbildet, können auch molekulare Regulationsmechanismen innerhalb der Zellen mit einbezogen werden (Ramis-Conde *et al.*, 2008). Wenn verschiedene biologische Ebenen, wie hier das Verhalten der einzelnen Zelle und ihrer inneren molekularen Abläufe, mathematisch miteinander verknüpft werden, spricht man von Multiskalen-Modellen. Eben solche übergreifende Modelle der Leber werden derzeit innerhalb des Verbundprojekts *Virtuelle Leber* entwickelt. Dabei bilden unsere Modelle die Grenzfläche zwischen molekularen und Ganzgewebe-Modellen. Langfristig wird es möglich sein, Veränderungen von Zellmasse und Gewebsarchitektur bei molekularen Veränderungen vorherzusagen.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Das Projekt ist aus Kollaborationen innerhalb des deutschen HepatoSys-Netzwerks, sowie den EU-Förderinitiativen PASSPORT und CancerSys entstanden.

Weitere Informationen:

www.pnas.org/content/early/2010/05/13/0909374107.abstract
www.msysbio.com
www.ifado.de/forschung_praxis/projektgruppen/susceptibility/index.php

Beteiligte Partner:

Marc Brulport, Essam Bedawy, Wiebke Schormann, Matthias Hermes, Verena Puppe, Rolf Gebhardt, Sebastian Zellmer, Michael Schwarz, Ernesto Bockamp, Tobias Timmel

Beteiligte Institute:

Department für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Toxikologie, Universität Tübingen; Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig; Institut für Toxikologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz; Labor für Biofluidmechanik, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Referenzen:

- 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.
- Ramis-Conde I., Drasdo D., Anderson ARA, Chaplain MA J. (2008). Modeling the influence of the E-cadherin-beta-catenin pathway in cancer cell invasion: a multiscale approach. *Biophys. J.* 95 , 155-165.

Kontakt:

Dr. habil. Dirk Drasdo

Directeur de Recherche
INRIA (French National Institute for Research in Computer Science and Control)
Paris - Rocquencourt
&
Leiter AG „Multizelluläre Systembiologie“
IZBI, Universität Leipzig
dirk.drasdo@inria.fr



Dr. Stefan Hoehme

AG „Multizelluläre Systembiologie“
Interdisziplinäres Zentrum für
Bioinformatik (IZBI)
Universität Leipzig
hoehme@izbi.uni-leipzig.de



Prof. Dr. Jan G. Hengstler

Leiter der Projektgruppe
„Systemtoxikologie“
Leibniz Research Centre for
Working Environment and Human
Factors (IfADo), Dortmund
hengstler@ifado.de

aus wie vielen zellen besteht die leber?

Neue Bildanalyseverfahren ermöglichen die quantitative Auswertung von kompletten Gewebeschnitten

von André Homeyer, Andrea Schenk, Uta Dahmen, Michael Schwier, Tobias Preusser und Olaf Dirsch

Ihr Kind fühlt sich krank und Sie legen die Hand an seine Stirn. Fieber? Zur Vorsicht fühlt Ihr Partner nochmal. Das Kind scheint gesund zu sein! Gewissheit bringt aber nur das Thermometer.

Ohne technische Hilfsmittel sind diagnostisch wichtige Größen oft nur grob bestimmbar. Dies gilt in besonderem Maße für die Quantifizierung von Gewebeeigenschaften in der Pathologie. Deshalb entwickelt Fraunhofer MEVIS in enger Zusammenarbeit mit Medizinern des Universitätsklinikum Jena innovative Verfahren, um ganze Gewebeschnitte automatisch auszuwerten. Die resultierende Technologie hat das Potential, die Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen zu revolutionieren und die klinische Diagnostik deutlich zu verbessern.

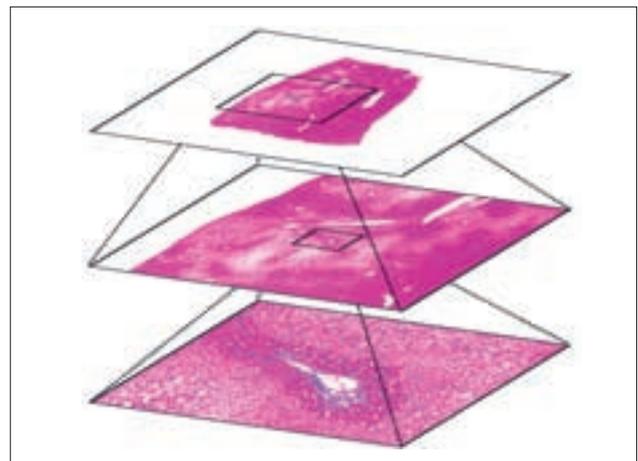
Mit der Histologie, d.h. der mikroskopischen Untersuchung von Geweben, werden umfangreiche, räumlich aufgelöste Informationen über Gewebestrukturen und die zugrunde liegenden zellulären Prozesse gewonnen, die kein anderes Bildgebungsverfahren liefern kann. Der Pathologe nutzt diese Informationen zusammen mit den klinischen Angaben für die Erstellung seiner Diagnose. Im Gegensatz zu anderen bildbasierten Gebieten der Medizin, wie beispielsweise der Radiologie, wird die Histologie noch weitgehend ohne Computerunterstützung praktiziert. Durch die Entwicklung neuartiger, digitaler Slide-Scanner steht die histologische Diagnostik jedoch vor einem Innovationsschub, der die Effizienz und Qualität dieses diagnostischen Verfahrens nachhaltig verbessern wird. Einen wesentlichen Beitrag hierzu werden automatische Bildanalysemethoden leisten, die Gewebeeigenschaften schnell, genau und reproduzierbar messen.

Von lokaler Auswertung zu globaler Analyse

Mit konventionellen Methoden war es bisher nur möglich, Gewebeeigenschaften in wenigen, kleinen Ausschnitten zu messen und die Ergebnisse dann auf das gesamte Organ zu verallgemei-

nern. Berücksichtigt man jedoch, dass viele Gewebeeigenschaften räumlich ungleichmäßig verteilt sind, kann diese Vereinfachung zu einem großen Fehler führen. Durch die Entwicklung neuartiger Scanner, die ganze Objektträger mit hoher Vergrößerung digitalisieren und als virtuelle Objektträger im Computer verfügbar machen, ist es nun zum ersten Mal möglich, Auswertungen auf dem gesamten Gewebeschnitt durchzuführen. Für die automatische Bildanalyse birgt die Technologie jedoch neue Herausforderungen. Da viele relevante Details nur bei starker Vergrößerung zu erkennen sind, müssen Objektträger komplett auf dieser Vergrößerung digitalisiert werden. Des Weiteren sind pathologische Untersuchungen auf den schnellen Wechsel zwischen verschiedenen Vergrößerungen angewiesen. Daher müssen virtuelle Objektträger auf vielen Vergrößerungen gespeichert werden (Abb. 1). Ein

Abbildung 1: Virtuelle Objektträger



Virtuelle Objektträger werden auf höchster Vergrößerung digitalisiert und auf mehreren Vergrößerungen gespeichert. Daraus resultieren Gigabyte-große Dateien, die besondere Herausforderungen an die Verarbeitung stellen (Bild: Fraunhofer MEVIS / U. Dahmen & O. Dirsch, Exp TxChir Jena).

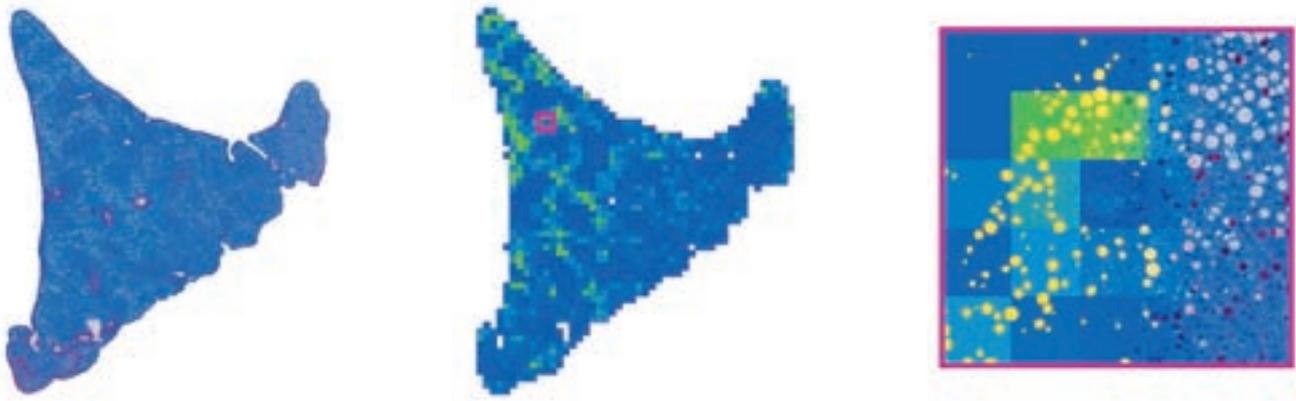


Abbildung 2: Bildanalyse in ganzen Gewebeschnitten

Fraunhofer MEVIS entwickelt automatische Bildanalysemethoden, um mikroskopische Gewebeeigenschaften, wie die Verfettung einzelner Zellen, in ganzen Gewebeschnitten zu messen und räumlich darzustellen (Bild: Fraunhofer MEVIS / U. Dahmen & O. Dirsch, Exp TxChir Jena).

einzig virtueller Objektträger umfasst somit bis zu 25 Gigapixel, das heißt genauso viel wie 2.500 Bilder einer modernen Digitalkamera. Ein ganzer Satz digitaler Objektträger füllt schnell eine Terabyte-große Festplatte.

Mit herkömmlichen Verfahren kann die Analyse von virtuellen Objektträgern mehrere Tage in Anspruch nehmen. Daher beschränken sich die meisten verfügbaren Bildanalysemethoden nach wie vor auf die Auswertung weniger kleiner Bildausschnitte und ignorieren dabei das Potential der neuen Technik. Fraunhofer MEVIS hat sich dagegen von Anfang an auf die Auswertung ganzer virtueller Objektträger spezialisiert (Abb. 2). Während alternative Ansätze versuchen, den enormen Datenmengen durch eine Steigerung der Rechenleistung Herr zu werden, entwickelt Fraunhofer MEVIS intelligente Strategien, mit denen die „Riesenbilder“ auch auf handelsüblichen Computern schnell verarbeitet werden können.

Die Idee: Genau wie ein Pathologe, sucht der Computer zunächst nach relevanten Bildausschnitten auf niedriger Vergrößerung und wechselt nur dann auf höhere Vergrößerungen, wenn er

detaillierte Informationen über diese Bildausschnitte benötigt.

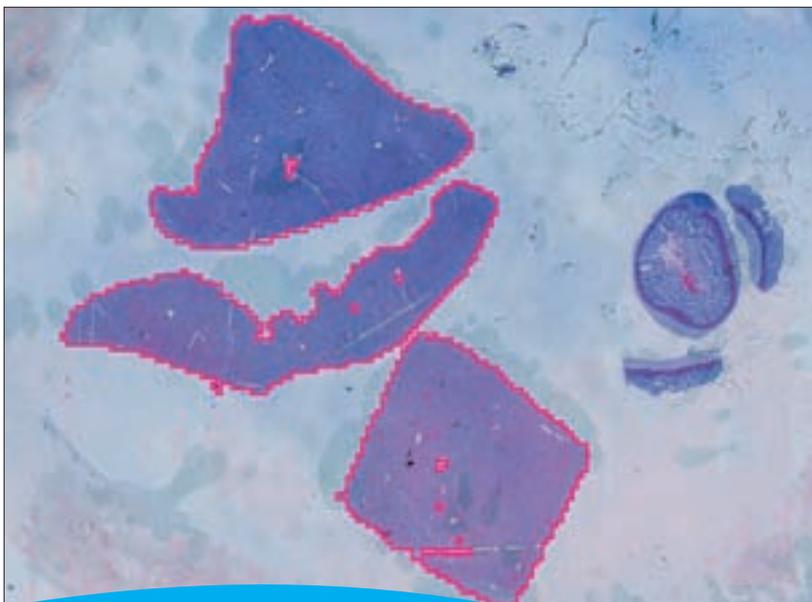
Im Vergleich zu einer kompletten Auswertung auf höchster Auflösung, verursachen solche mehrskaligen Analysen deutlich weniger Rechenaufwand.

Digitale Histologie in der medizinischen Forschung

Erste praktische Anwendungen der neuen Bildanalysetechnik ermöglichen die automatische Unterscheidung zwischen lebendem und totem Gewebe in histologischen Leberschnitten. Mit weiteren Applikationen lassen sich verschiedene Zelltypen und Zellstrukturen auszählen, um Rückschlüsse auf die Regenerationsaktivität oder den Verfettungsgrad der Leber zu ziehen. Jeder dieser Parameter wird vollautomatisch pro Gewebeschnitt berechnet - auch dann, wenn sich mehrere Gewebeschnitte unterschiedlichen Typs oder Verschmutzungen auf dem Objektträger befinden (Abb. 3). Im Rahmen des Projekts *Virtuelle Leber* werden diese Verfahren kontinuierlich erweitert und verbessert.

Die Besonderheit der neuen Analyseverfahren ist, dass sie Gewebeeigenschaften nicht nur in winzigen Gewebesausschnitten, sondern im gesamten virtuellen Schnitt quantifizieren. Der so

Abbildung 3: Automatische Erkennung von Gewebeschnitten



Die entwickelten Bildanalysemethoden funktionieren auch dann, wenn sich mehrere Gewebeschnitte unterschiedlichen Typs oder Verschmutzungen auf dem Objektträger befinden. Das Bild zeigt die automatische Erkennung von Rattenleberschnitten auf einem Objektträger, der zusätzlich noch Darmschnitte und Verunreinigungen enthält (Bild: Fraunhofer MEVIS / U. Dahmen & O. Dirsch, Exp TxChir Jena).



„Experimentelle Transplantationschirurgie“

an der Klinik für Allgemeine, Viszerale und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena (v.l.n.r.: Anding Liu, Olaf Dirsch, Uta Dahmen, Haoshu Fang, Hao Jin, Jian Sun, Wei Dong).

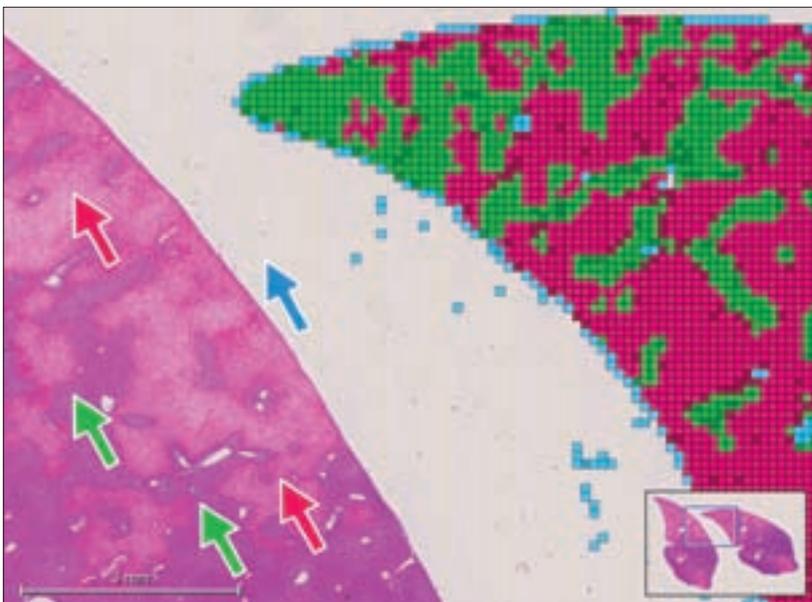
deutlich vergrößerte Stichprobenumfang führt zu einer verbesserten statistischen Aussagekraft der ermittelten Größen. Darüber hinaus können die ermittelten Größen nicht nur in numerischer Form ausgegeben, sondern auch als farbliche Überlagerung auf den Gewebeschnitten visualisiert werden. Auf diese Weise offenbaren sich häufig strukturelle Muster, die bei rein quantitativen Analysen verborgen bleiben. Erste Validierungsversuche haben bestätigt, dass die untersuchten Gewebeeigenschaften nicht gleichmäßig über die Schnitte verteilt sind, sondern sich beispielsweise am Verlauf von Gefäßstrukturen orientieren. Eine besondere Herausforderung in der histologischen Bildanalyse ist die große Variabilität zwischen den aufgenommenen Bildern. Schon kleine Unterschiede bei der Präparation der Objektträger können das digitale Bild so stark beeinflussen, dass statische Mustererkennungsmethoden nicht mehr funktionieren. Aus diesem Grund hat Fraunhofer MEVIS den Computer lernfähig gemacht. Um einen Algorithmus auf neue Färbereigenschaften anzupassen, muss der Benutzer lediglich Beispiele für die relevanten Gewebetypen aufzeigen (Abb. 4). Der Computer stellt sich dann selbstständig ein und klassifiziert weitere Objektträger mit ähnlichen Färbereigenschaften automatisch.

3D-Histologie

Histologische Auswertungen waren bisher auf zwei räumliche Dimensionen beschränkt. Für viele neue Fragestellungen, wie z. B. die Modellierung der Leberregeneration oder der Blutflussregulation innerhalb des Forschungsnetzwerks *Virtuellen Leber*, muss das Gewebe jedoch in seinem tatsächlichen dreidimensionalen Kontext betrachtet werden. Deshalb forscht Fraunhofer MEVIS im interdisziplinären Diskurs mit experimentellen Chirurgen, Pathologen und Radiologen an innovativen Bildverarbeitungsmethoden, welche die Stärken der Computertomographie und der Histologie kombinieren.

In einer ersten Anwendung wird ein umfassendes räumliches Modell der Restleber nach einer operativen Resektion erstellt. Dafür werden die Gefäße einer Mausleber mit Röntgenkontrastmittel angefüllt und einer CT-Untersuchung unterzogen, sodass ein dreidimensionales Abbild der Organstruktur und des Gefäßbaumes entsteht. Anschließend werden histologische Serien- oder Stufenschnitte des gesamten Organes hergestellt, um verschiedene Gewebeeigenschaften bzw. die Expression verschiedener molekularer Marker zu bestimmen. Fraunhofer MEVIS entwickelt in diesem Zu-

Abbildung 4: Einfache und intuitive Benutzerschnittstelle



Die entwickelten Analysemethoden können über eine einfache Benutzerschnittstelle schnell an unterschiedliche Bildeigenschaften angepasst werden. Dafür muss der Benutzer lediglich Beispiele der relevanten Gewebetypen auswählen (Pfeile) (Bild: Fraunhofer MEVIS / U. Dahmen & O. Dirsch, Exp TxChir Jena).



„VirtualLiver-Bildverarbeitungsgruppe“

am Fraunhofer MEVIS (v.l.n.r.: Michael Schwier, Tobias Preusser, André Homeyer, Andrea Schenk).

sammenhang Bildanalysealgorithmen, welche die radiologischen und histologischen Informationen zu einem dreidimensionalen Organmodell integrieren (Abb. 5). Im Rahmen des Projekts *Virtuelle Leber* wird diese neue Art der 3D-Histologie einen wichtigen Beitrag zum ganzheitlichen Verständnis der Lebermorphologie und -funktion leisten.

Abbildung 5: 3D-Histologie



Ein aktuelles Forschungsthema ist die dreidimensionale räumliche Korrelation von verschiedenen Gewebeeigenschaften. Dazu werden histologische Serienschritte abwechselnd auf verschiedene Weise gefärbt, digitalisiert und mit neuen Bildverarbeitungsmethoden in ihre ursprüngliche räumlichen Anordnung zurückversetzt (Bild: Fraunhofer MEVIS / U. Dahmen & O. Dirsch, Exp TxChir Jena).

Steckbrief Forschungsprojekt:

Das BMBF-geförderte Projekt *Virtuelle Leber* ist ein Netzwerk aus sieben Forschergruppen, die sich zum Ziel gesetzt haben, ein dynamisches, mehrskaliges Modell der menschlichen Leber zu erstellen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Experimentelle Transplantationschirurgie“ und dem Leber- und Gefäßpathologen des Universitätsklinikums Jena entwickelt Fraunhofer MEVIS makroskopische Modelle der Lebermorphologie und Methoden für die automatische Messung von Gewebeeigenschaften in experimentellen Bilddaten. Dabei profitiert Fraunhofer MEVIS von mehr als 15 Jahren Erfahrung in der medizinischen Bildverarbeitung und Modellierung.

Weiterführende Literatur:

- Diamond, J., and McCleary, D. (2009). Virtual Microscopy. In *Advanced Techniques in Diagnostic Cellular Pathology*, M. Hannon-Fletcher, and P. Maxwell, ed. (West Sussex, UK: John Wiley & Sons), pp. 1–36.
- Madabhushi, A. (2009). Digital pathology image analysis: opportunities and challenges. *Imaging in Medicine* 1 (1): 7–10.
- May, M. (2010). A Better Lens on Disease. *Scientific American Magazine* 302 (5): 74–77.

Kontakt:

André Homeyer
Fraunhofer MEVIS
Institut für Bildgestützte Medizin, Bremen
andre.homeyer@mevis.fraunhofer.de

INTERNATIONAL CONFERENCE on the SYSTEMS BIOLOGY OF HUMAN DISEASE

Special Focus on Systems Pharmacology

Introduced by William Chin, M.D.
Executive Dean for Research, Harvard Medical School

JUNE 22-24, 2011

THE JOSEPH B. MARTIN CONFERENCE CENTER
HARVARD MEDICAL SCHOOL
77 AVENUE LOUIS PASTEUR
BOSTON, MA 02115

Speakers include:

Patrick Aloy – Institute for Research in Biomedicine, Barcelona
Philippe Bastiaens – Max Planck Institute, Dortmund
Frank Buchholz – Max Planck Institute, Dresden
Hui Ge – Proteostasis Therapeutics
Bart Hendriks – Merrimack Pharmaceuticals
Tim Hucho – Max Planck Institute, Berlin
Arthur Lander – University of California, Irvine
Anthony Letai – Dana Farber Cancer Institute
Andre Levchenko – Johns Hopkins University
Susan Lindquist – Massachusetts Institute of Technology
Avi Ma'ayan – Mount Sinai School of Medicine
Matthew Meyerson – Dana Farber Cancer Institute
James Orth – Harvard Medical School
Chris Sander – Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Aravind Subramanian – Broad Institute
Marius Ueffing – Helmholtz Zentrum München
Alexander van Oudenaarden – Massachusetts Institute of Technology
John Wambaugh – EPA National Center for Computational Toxicology
Ralph Weissleder – Massachusetts General Hospital
Michael White – University of Liverpool
Michael Yaffe – Massachusetts Institute of Technology

Registration and details at:

www.csb2.org

Early registration deadline: May 16, 2011
Late registration available: June 20, 2011
Onsite registration available

Poster abstract deadline: May 16, 2011

- Student and postdoc poster session on June 22 & 23, 2011
- Additional presentations will be chosen from submitted poster abstracts

Sponsored by:



Neuigkeiten aus dem BMBF

„Das Wissenschaftsjahr 2011 – Forschen für unsere Gesundheit“

Wissen ist die beste Medizin – unter diesem Motto wurde im Januar das „Wissenschaftsjahr 2011 – Forschung für unsere Gesundheit“ in Berlin eröffnet. Eine Vielzahl von Ausstellungen, Wettbewerben und Diskussionsveranstaltungen bieten Einblicke in aktuelle Herausforderungen und Forschungsergebnisse. Gleichzeitig dient das Wissenschaftsjahr als Forum zum Dialog zwischen Wissenschaft und Bürgerinnen und Bürgern. Neben seltenen Krankheiten und individualisierter Medizin stehen die großen Volkskrankheiten sowie der Prävention durch Ernährung und Bewegung im Mittelpunkt des Wissenschaftsjahres. „Es ist unser Ziel, neue Ergebnisse und Erkenntnisse so rasch wie möglich in die ärztliche Praxis einfließen zu lassen“, sagte Bundesforschungsministerin Schavan zur Eröffnung.



Eine Initiative des Bundesministeriums für Bildung und Forschung

Durch die Einbindung neuer Medien wie Youtube, Twitter oder Facebook sollen vor allem jüngere Menschen erreicht werden. Schulklassen können im Rahmen der Forschungsbörse (www.forschungsboerse.de) Wissenschaftler in ihr Klassenzimmer einladen oder diese an ihrem Arbeitsplatz besuchen.

Weitere Informationen unter:
www.forschungsboerse.de

Rahmenprogramm zur Gesundheitsforschung

In der Gesundheitsforschung werden neue oder bessere Diagnoseverfahren und Therapien entwickelt, um kranken Menschen effektiver zu helfen. Neue Ansätze und Wege zur Prävention werden gesucht, die dazu beitragen, Krankheiten gar nicht erst entstehen zu lassen. Das Ziel der durch die Bundesregierung geförderten Gesundheitsforschung ist, dass alle Menschen von aktuellen Forschungsergebnissen profitieren können. Hierzu verabschiedete das Kabinett das neue Rahmenprogramm Gesundheitsforschung der Bundesregierung. Es definiert die strategische Ausrichtung der medizinischen Forschung für die kommenden Jahre und ist die Grundlage der Finanzierung medizinischer Forschung an Hochschulen, Universitätskliniken, außeruniversitären Forschungseinrichtungen und in der Wirtschaft.

Neben dem Aufbau der Deutschen Zentren für Gesundheitsforschung, die sich den Volkskrankheiten widmen, stehen fünf weitere Aktionsfelder im Mittelpunkt des Rahmenprogramms: (i) die Forschung zur individualisierte Medizin, (ii) die Präventions- und Ernährungsforschung, (iii) die Versorgungsforschung, (iv) die Forschung zur Optimierung der Gesundheitswirtschaft und (v) die Gesundheitsforschung in globaler Kooperation.

Das BMBF fördert die Gesundheitsforschung im Jahr 2011 mit der Rekordsumme von mehr als einer Milliarde Euro.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/de/gesundheitsforschung.php
www.bmbf.de/press/3014.php

Bundshaushalt 2011

Deutschlands Zukunft liegt in der exzellenten Ausbildung seiner Bürgerinnen und Bürger auf breiter Basis. „Die Qualität des deutschen Forschungs- und Innovationssystems entscheidet maßgeblich über unsere internationale Wettbewerbsfähigkeit“, sagte Bundesforschungsministerin Annette Schavan. Nur mit exzellenter Aus- und Weiterbildung



Wollen die BioÖkonomie vorantreiben: Reinhard Hüttl, Thomas Rachel, Robert Kloos, Holger Zinke, Helmut Born (v.l.)
(Quelle: BIOCOM)

wird Deutschland seine Spitzenposition in der Welt beibehalten und weiter ausbauen können. Diese Aussagen spiegeln sich auch im Haushalt des BMBF für 2011 wieder, der gegenüber dem Vorjahr um rund 782 Millionen Euro auf insgesamt 11,646 Milliarden Euro angewachsen ist. „Mit der klaren Prioritätensetzung auf Zukunftsinvestitionen steht Deutschland heute einzigartig da“, sagt Bundesministerin Annette Schavan, „in seiner Geschichte, wie auch im internationalen Vergleich.“

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/press/3001.php

BioÖkonomie 2030 – Stärkung der bio-basierten Wirtschaft

Als BioÖkonomie wird die wirtschaftlich ausgerichtete nachhaltige Nutzung biologischer Ressourcen wie Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen verstanden. Sie ist dabei sehr breit aufgestellt und umfasst eine Vielzahl von Branchen im Rohstoff- und Lebensmittelbereich, im Maschinen- und Anlagenbau, in der Automobilindustrie, in der Umwelttechnologie, in der Bauwirtschaft sowie in zahlreichen Dienstleistungsbranchen. Mit der „Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“ legt die Bundesregierung die Grundlagen

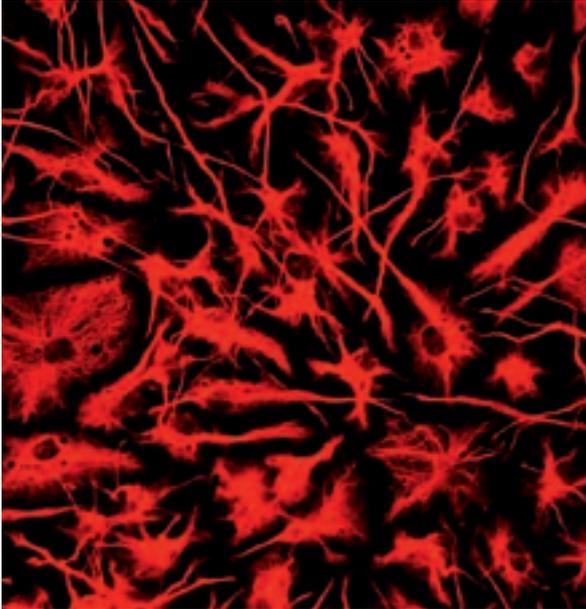
für die Vision einer nachhaltigen bio-basierten Wirtschaft bis zum Jahr 2030, deren vielfältiges Angebot die Welt ausreichend und gesund ernährt sowie mit hochwertigen Produkten aus nachwachsenden Rohstoffen versorgt.

Die Fördersumme beläuft sich auf mehr als 2 Milliarden Euro in den nächsten sechs Jahren. Eine Innovationsinitiative zur weißen Biotechnologie wird dabei eine der ersten Maßnahmen sein. Für die Förderung von Verbänden aus Wirtschaft und Wissenschaft stellt das BMBF bis zu 100 Millionen Euro über fünf bis zehn Jahre bereit.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/de/1024.php
www.bmbf.de/press/2991.php

BMBF fördert die deutsch-amerikanische Stammzellforschung

Für neurodegenerative Erkrankungen, aber auch Diabetes oder Krebs entwickelt sich die regenerative Medizin zu einem universellen Hoffnungsträger. Wissenschaftler erforschen spezielle Eigenschaften von Stammzellen, mit denen die Selbstheilungskräfte des Körpers aktiviert und die Züchtung von Gewebe außerhalb des Körpers ermöglicht werden.



Astrozyten, entstanden aus embryonalen Stammzellen
(Quelle: Bundesinstitut für Risikobewertung, ZEBET)

„Nur durch Kooperation der besten Forscherinnen und Forscher können Therapien mit Stammzellen Wirklichkeit werden“, sagt Bundesforschungsministerin Annette Schavan. Dieser Maxime folgend unterstützt das BMBF eine Kooperation deutscher und amerikanischer Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler mit bis zu 12 Millionen Euro. Dadurch können sich deutsche Forscher seit diesem Jahr an Ausschreibungen des auf Stammzellforschung spezialisierten kalifornischen Instituts für Regenerative Medizin (CIRM) beteiligen.

In der aktuellen Ausschreibung wurden drei Teams mit deutscher Beteiligung für eine Förderung ausgewählt: Das Team um Prof. Oliver Brüstle (Universität Bonn) entwickelt eine Therapie für Patienten mit der neurodegenerativen Erkrankung Canavan. Am zweiten Projekt ist Dr. José Tomás Egana (TU München) beteiligt, dessen Forschung die häufig problematische Wundheilung bei Diabetes-Patienten beschleunigen soll. Die Wissenschaftler um Prof. Andreas Hochhaus (Universitätsklinikum Jena) haben im dritten Projekt Krebsstammzellen im Fokus.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/press/2995.php

Landnutzung nachhaltig gestalten

Für den Menschen ist die Landoberfläche der primäre Lebensraum, den er seit Jahrhunderten beeinflusst und als wichtigste Grundlage seines Lebens gestaltet. Der globale Wandel und die wachsende Weltbevölkerung verstärken die Konkurrenz um die Landnutzung weltweit. „Wir müssen Lösungen finden, um auch künftig sowohl die Versorgung mit Nahrungsmitteln als auch mit Energie zu sichern und urbanen Lebensraum ebenso wie eine intakte Umwelt zu erhalten“, sagt Dr. Georg Schütte, Staatssekretär im Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Im Rahmen des BMBF-Rahmenprogramms „Forschung für nachhaltige Entwicklungen“ adressiert die Fördermaßnahme „Nachhaltiges Landmanagement“ Aspekte rund um eine optimale Landbewirtschaftung. Dabei sind die Projekte auf beispielhafte Regionen fokussiert, da die Auswirkungen des globalen Wandels auf Lebensverhältnisse gerade auf regionaler Ebene deutlich spürbar sind. Hierzu stellt das Ministerium bis 2015 Forschungsmittel in Höhe von 100 Millionen Euro zur Verfügung. Die weltweiten Projekte vereinen die Expertisen von Ingenieuren, Sozial- und Naturwissenschaftlern sowie Vertretern von Behörden, Regionen und Kommunen.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/press/2992.php

Die europäische Spallationsquelle ESS – ein Supermikroskop für einzigartige Einblicke in die Materie

Forschern den Einblick in kleinste Ebenen verschaffen – das ermöglicht die einzigartige europäische Spallationsquelle ESS. Durch den Beschuss von Materialien mit den winzigen, ungeladenen Neutronen kann die innere Struktur der Stoffe oder die Bewegung von Teilchen untersucht werden. So ist zukünftig auch die Bewegung von Proteinen oder andere Abläufe in Zellen für die Wissenschaftler sichtbar.



GeoEn bündelt die hervorragenden Kompetenzen dieser drei großen Forschungseinrichtungen in den Geowissenschaften und der Energieforschung (Quelle: Laurence Gough - Fotolia)

Unter Beteiligung 16 europäischer Partnerländer wird im schwedischen Lund die neue Neutronenquelle ab 2013 errichtet. Nach Fertigstellung im Jahr 2018 werden voraussichtlich 2025 die ersten Neutronen in der ESS fließen. Wissenschaftler aus dem Forschungszentrum Jülich koordinieren das Projekt, an dem mit dem Deutschen Elektronen-Synchrotron DESY, dem Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, dem HZI Berlin für Materialien und Energie, dem HZI Geesthacht, dem Karlsruher Institut für Technologie auch weitere Helmholtz-Zentren (HZI) beteiligt sind. Als Partner ist auch die TU München eingebunden.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/press/3000.php
www.weltderphysik.de/ess
www.youtube.com/watch?v=5hi7zXj3xug
<http://ec.europa.eu/research/esfri>

GeoEN – klimafreundliche Energieversorgungsforschung in Potsdam und Cottbus

Eine der globalen Herausforderungen unserer Zeit ist die flächendeckende Energieversorgung. Auch Georessourcen in Deutschland spielen bei der Suche nach umwelt- und klimaschonenden Konzepten der Energiegewinnung eine wichtige Rolle. Mit

dem Projekt GeoEn widmet sich ein Forschungsverbund aus Brandenburg den wichtigen Aspekten Geothermie, Erschließung unkonventioneller Erdgasvorkommen und der Abscheidung, dem Transport sowie der Speicherung (CCS-Technologie) von CO₂ aus fossilen Kraftwerken. An den mit 5,77 Millionen Euro geförderten Arbeiten beteiligt sind das Deutsche Geoforschungszentrum Potsdam, die Brandenburgische Technische Universität Cottbus und die Universität Potsdam. „GeoEn bündelt die hervorragenden Kompetenzen dieser drei großen Forschungseinrichtungen in den Geowissenschaften und der Energieforschung. Mit dem zweiten Förderbescheid stellt das BMBF den weiteren Ausbau von GeoEn zu einem leistungsfähigen regionalen Forschungsnetzwerk sicher“, sagte der Parlamentarische Staatssekretär im BMBF Dr. Helge Braun in Cottbus.

Weitere Informationen unter:
www.bmbf.de/press/3024.php

Kontakt

Informationen zu diesen und anderen interessanten Themen zur Hightech-Strategie für Deutschland finden Sie unter www.hightech-strategie.de

WAS LÖSEN SCHADSTOFFE IN UNSEREN ZELLEN AUS –

Das Netzwerk des Helmholtz Zentrum für Umweltforschung - UFZ

Im Alltag kommen wir mit einer Vielzahl von Schadstoffen in Berührung. Deren Einflüsse auf unseren Organismus sind bisher nur unvollständig verstanden. Dringt ein Schadstoff in eine Zelle ein, wird ein komplexes Netzwerk von Prozessen ausgelöst. Ein Schlüsselement dabei ist der sogenannte Arylhydrocarbon (Ah) Rezeptor, der mit einer Vielzahl von Umweltschadstoffen interagiert. Nach Aktivierung durch Bindung eines Schadstoffes kann das zytoplasmatische Rezeptorprotein als Transkriptionsfaktor wirken und eine Vielzahl von Genen regulieren. Als Konsequenz werden wichtige Zellfunktionen gestört – bis hin zum Untergang der Zelle. Ob jede Chemikalie die gleichen Effekte bewirkt und welche Konzentrationen für welche Effekte verantwortlich sind, kann bisher nicht vorhergesagt werden. Simulationsmodelle sollen helfen, die Antwort einer Zelle auf eine Chemikalie besser zu verstehen und vorherzusagen.

Das vom Helmholtz Zentrum für Umweltforschung - UFZ koordinierte Netzwerk „Vom Umweltschadstoff zur zellulären Antwort“ der Helmholtz-Allianz Systembiologie entwickelt deshalb Modelle, die ein besseres Verständnis der zellulären Abläufe unter Chemikalienexposition und Vorhersagen der zu erwartenden Effekte ermöglichen sollen. Langfristig lassen sich mit derartigen Vorhersagemodellen nicht nur die

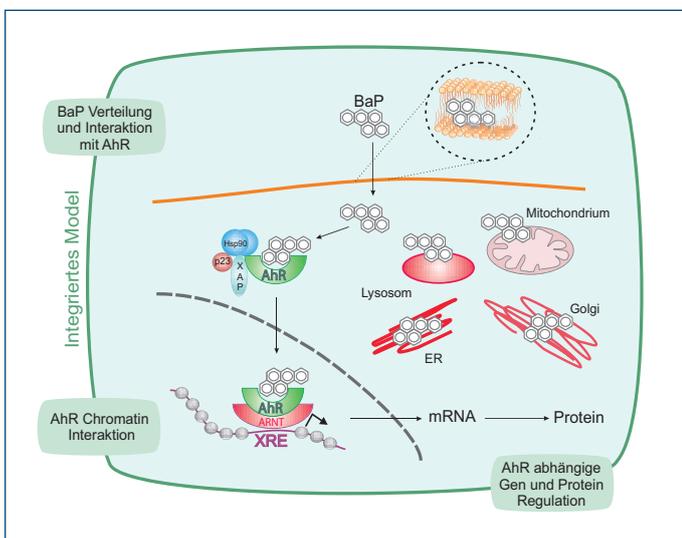
jetzt noch notwendigen experimentellen Testserien zur Risikobeurteilung solcher Schadstoffe einschränken, es werden auch weniger Tierversuche nötig sein. Außerdem sollen aus diesen Modellen auch Möglichkeiten, die negativen Auswirkungen abzuwenden abgeleitet werden.

Bei der Entwicklung der Vorhersagemodelle gehen wir von der Annahme aus, dass in Abhängigkeit von der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe, die den Zellkern erreichen und an die DNA binden eine differenziell abgestufte Beeinflussung der Genregulation und damit Schädigung einer Zelle erfolgt. Die Verteilung der Chemikalie (Ligand) in der Zelle und deren Wechselwirkungen mit dem Ah-Rezeptor spielen dabei eine entscheidende Rolle. Um diese Parameter in den finalen Vorhersagemodellen berücksichtigen und mit den Informationen zur Gen- und Proteinregulation koppeln zu können, müssen zunächst die relevanten Parameter für die Verteilung von Chemikalie und Rezeptor in der Zelle und deren Interaktion bestimmt werden (Abb. 1). Dies erfolgt auf der Basis von Fluoreszenzmikroskopiedaten.

Wie sich Moleküle in der Zelle verteilen

Die modernen Mikroskopieverfahren ermöglichen die Visualisierung von Prozessen auf zellulärer Ebene. So können durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie in unserem Modellsystem sowohl der Ah-Rezeptor, als auch der aktivierende Schadstoff (in unserem Fall Benzo(a)pyren, BaP) in der lebenden Zelle räumlich- und zeitlich aufgelöst untersucht werden. Der polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoff BaP, der z.B. in Abgasen vorkommt, dient dabei als Modellchemikalie für eine ganze Klasse von anderen Schadstoffen. Mit dem sogenannten FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)-Verfahren (Abb. 2) werden Daten gewonnen, aus denen mit Hilfe mathematischer Modelle die relevanten Parameter für die Bewegung und Verteilung von Schadstoff und Rezeptor in der Zelle und deren Interaktion abgeleitet werden können (Mai *et al.*, 2011). Zusätzlich ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie die Visualisierung von zellulären Strukturen, aus denen reale dreidimensionale Modelle der Zelle erstellt werden. Werden nun die mathematischen Rekonstruktionen der realen Zellen mit den Parametern der BaP/AhR Interaktion vereinigt, kann in Simulationen die Dynamik dieser Interaktion nachvollzogen bzw. vorhergesagt werden (Abb. 3).

Abbildung 1: Ein integriertes Modell der zellulären Antwort auf eine Schadstoffexposition



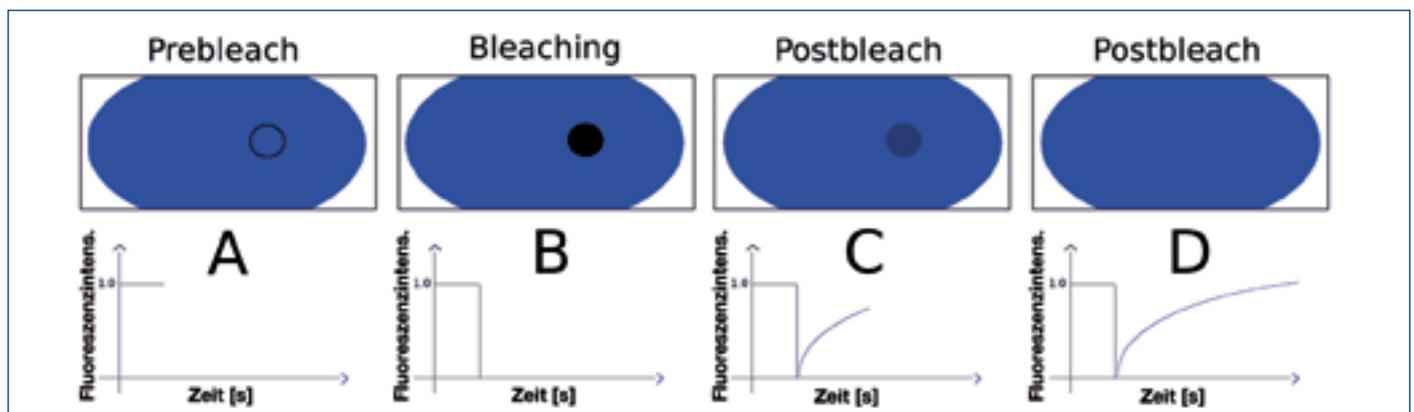
In einem integrierten Modell soll die zelluläre Antwort auf eine Schadstoffexposition erklärt und vorhersagbar gemacht werden. Dazu werden sowohl Schadstoff (BaP) und Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) Interaktion und Verteilung, sowie deren Auswirkungen auf der Gen- und Proteinebene untersucht. Bild: UFZ

Welche Parameter eignen sich zur Vorhersage?

Ein Schadstoff kann in einer Zelle eine komplexe Reaktion auslösen, die sich aus verschiedenen Aspekten zusammensetzt. Die resultierende Änderung des Phänotyps einer Zelle ist dabei nicht das



Abbildung 2: Lasermikroskopie zur Messung von Teilchenbewegungen in der Zelle



Schematische Darstellung eines „Fluoreszenz Recovery After Photobleaching“ (FRAP) Experiments. Zu Beginn des Experiments wird in einem lokalisierten Bereich die Fluoreszenz der beobachteten Teilchen durch einen Hochintensitätslaserstrahl unwiederbringlich zerstört. Die in diesem Bereich über die Zeit wieder zunehmende Fluoreszenz gibt Aufschluß über die Bewegungs- und Reaktionseigenschaften der beobachteten fluoreszenten Teilchen. Bild: UFZ

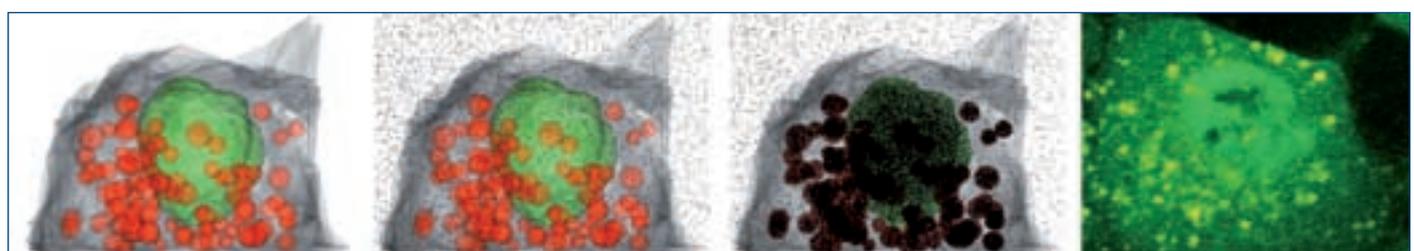
Resultat der Beeinflussung eines Signalweges, sondern basiert immer auf der Beeinflussung mehrerer Signalwege. Welche Folgen hat die Bindung des Rezeptor-Ligand-Komplexes an der DNA auf die Gen- und Proteinregulation? Welche Signalwege werden dadurch beeinflusst? Welche Folgen hat das für den Phänotyp der Zelle? Mit molekularbiologischen Verfahren werden zunächst genomweit die Bindungsstellen des Rezeptors an der DNA und deren Strukturveränderungen detektiert. Kombiniert mit den Informationen über die differenziell regulierten Gene und Proteine sowie einem speziellen Phänotyp (z. B. Adhäsionsverlust oder Zelltod) liefert dies die Grundlage für die Extraktion der essentiellen Komponenten zur Beschreibung und Vorhersage der zellulären Antwort. Wie aber sind diese einzelnen Bestandteile miteinander verbunden? Um diese Frage zu beantworten kann eine neu entwickelte Methode zur Modellierung von

Gen- und Proteinnetzwerken basierend auf Zhegalkin Polynomen verwendet werden (Faisal *et al.*, 2010). Diese spezielle Art von Polynomen ermöglicht die Anwendung kontinuierlicher Optimierungsmethoden auch bei diskreten Daten, wie beispielsweise Gen- und Proteinexpressionskinetiken.

Modelintegration macht Effektivvorhersage möglich

Ausgehend von den Informationen der dynamischen Schadstoff/Rezeptor Interaktion, sowie der Identifikation der essentiellen Komponenten auf Gen- und Proteinebene kann nun ein integriertes Vorhersagemodell aufgebaut werden, das konzentrations- und zeitabhängige Effekte auf zellulärer Ebene vorhersagt. Da nicht nur Umweltchemikalien sondern auch endogene Metabolite, die

Abbildung 3: Modell und Beobachtung im Einklang



Simulationen in dreidimensionalen realen Zellgeometrien veranschaulichen die Aufnahme und Verteilung des Schadstoffes und dessen Interaktion mit dem Arylhydrocarbon Rezeptor (A-C), wie sie in lebenden Zellen beobachtet werden können (D). Rekonstruierte Zelle mit Zellkern und schadstoffaufnehmenden intrazellulären Strukturen (A), Simulation unmittelbar nach Schadstoffzugabe (B), nach 1 stündiger Schadstoffexposition (C), übereinstimmend mit der Situation in reale Zelle nach 1 stündiger Benzo(a)pyren Exposition (gelb), Arylhydrocarbon Rezeptor (grün) (D). Bild: UFZ

bedeutsam für Immunantworten im Rahmen von Sepsis, Asthma oder Tumorentstehung sind, und Medikamente ihre Effekte über den Ah-Rezeptor vermitteln, können diese Modelle nicht nur bedeutsam für die Voraussage toxischer Effekte sein. Die Vorhersage der relevanten therapeutischen Dosis ist dabei nur eine mögliche Anwendung.

Nachwuchsförderung

Im Rahmen der Graduiertenschule HIGRADE am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung – UFZ wurde ein Einführungskurs in die Systembiologie etabliert, der sowohl experimentelle als auch theoretische Grundlagen vermittelt und auch regen Zuspruch von Teilnehmern aus anderen Helmholtz Zentren findet.



Dr. Irina Lehmann



Prof. Dr. Sabine Attinger



Dr. Saskia Trump

KONTAKT:

Dr. Irina Lehmann, Prof. Dr. Sabine Attinger, Dr. Saskia Trump
Helmholtz Zentrum für Umweltforschung – UFZ
Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig

irina.lehmann@ufz.de
sabine.attinger@ufz.de
saskia.trump@ufz.de

Referenzen

- Dautel, F., Kalkhof, S., Trump, S., Michaelson, J., Beyer, A., Lehmann, I., and von Bergen, M. (2011). DIGE-based protein expression analysis of B[a]P-exposed hepatoma cells reveals a complex stress response including alterations in oxidative stress, cell cycle control, and cytoskeleton motility at toxic and subacute concentrations. *Journal of proteome research* 10, 379-393.
- Faisal, S., Lichtenberg, G., Trump, S., and Attinger, S. (2010). Structural properties of continuous representations of Boolean functions for gene network modelling. *Automatica* 46, 2047-2052.
- Mai, J., Trump, S., Ali, R., Schiltz, R.L., Hager, G., Hanke, T., Lehmann, I., and Attinger, S. (2011). Are assumptions about the model type necessary in reaction-diffusion modeling? A FRAP application. *Biophysical Journal* 100, 1178-1188.

BETEILIGTE PARTNER:

Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ)

- Department Umweltimmunologie:
Irina Lehmann, Saskia Trump und Susanne Rudzok
- Department für Hydrosystemmodellierung:
Sabine Attinger, Juliane Mai und Saadia Faisal
- Departments für Proteomics und Metabolomics:
Martin von Bergen, Franziska Dautel und Stefan Kalkhof

Technische Universität Dresden

- BIOTEC:
Andreas Beyer und Jacob Michaelson
- Max Bergmann Zentrum:
Thomas Hanke und Rizwan Ali

Eidgenössische Technische Hochschule (ETH)

- EAWAG:
Kristin Schirmer und Danielle Madureira

Weitere Kooperationspartner:

- Helmholtz Zentrum München (HMGU):
Fabian Theis
- Goethe Centre for Scientific Computing (G-CSC):
Gabriel Wittum und Gillian Queisser
- National Institutes of Health/National Cancer Institute (NIH/NCI):
Gordon L. Hager und Sam John
- Universität Leipzig, Interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik:
Hans Binder und Henry Wirth

HELMHOLTZ-GEMEINSCHAFT FÖRDERT OPEN ACCESS

Durch einen Beschluss ihrer Mitgliederversammlung aus dem Jahr 2004 fördert die Helmholtz-Gemeinschaft einen offenen Zugang zu Forschungsergebnissen und ermutigt ihre Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler, ihre Ergebnisse entsprechend den Prinzipien des „Open Access“ zu publizieren.

Für Textpublikationen gibt es dafür zwei Möglichkeiten. Im so genannten „Goldenen Weg“ zu Open Access werden Forschungsergebnisse in originären Open-Access-Zeitschriften veröffentlicht, in der Systembiologie z. B. *Molecular Systems Biology*¹ oder *BMC Systems Biology*². Die eingereichten Manuskripte werden nach einer Qualitätsprüfung im Peer-Review-Verfahren von der Zeitschrift frei zugänglich elektronisch veröffentlicht, meist gegen Zahlung einer Publikationsgebühr. Viele Verlage gestatten außerdem die Zweitveröffentlichung von Publikationen aus subscriptionsbasierten Zeitschriften³. In diesem „Grünen Weg“ zu Open Access können Autoren ein Manuskript ihrer Veröffentlichung in einem Online-Repository deponieren und damit ebenfalls frei zugänglich machen. Insgesamt steigert Open Access die Sichtbarkeit der Forschung und erleichtert eine rasche Diskussion aktueller Ergebnisse.

Das Helmholtz Open Access Projekt⁴ unterstützt die Umsetzung von Open Access durch Information und Beratung. Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler der Helmholtz-Gemeinschaft engagieren sich als Autoren oder Herausgeber von Open-Access-Zeitschriften. Die

Mehrzahl der 17 Helmholtz-Zentren betreibt institutionelle Repositorien zur Zweitveröffentlichung. Einen weiteren Arbeitsschwerpunkt des Projektes bildet der offene Zugang zu Forschungsdaten, der gerade in der Systembiologie bei der Integration vieler Datensätze und unterschiedlicher Datentypen besondere Bedeutung hat.



Weiterführender Link zum Thema:
Informationsplattform Open Access
<http://open-access.net/>

¹<http://www.nature.com/msb/>

²<http://www.biomedcentral.com/bmcsystbiol/>

³Siehe SHERPA/RoMEO-Liste, <http://www.sherpa.ac.uk/romeo/>

⁴<http://oa.helmholtz.de/>



die beugungsgrenze überwunden

Neue hochauflösende mikroskopische Verfahren für die Biomedizin

von Stefan Hell

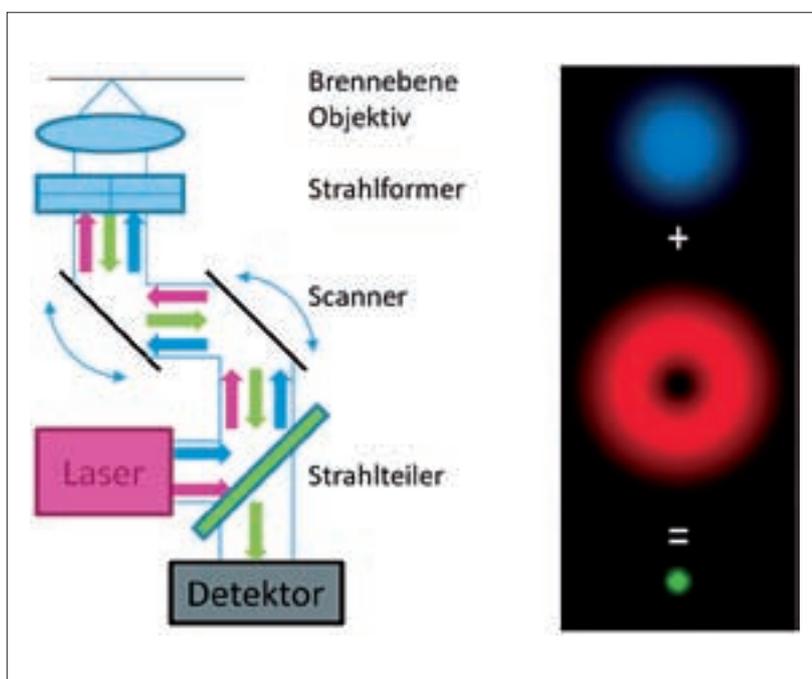
Bildgebende Verfahren gehören zu den wichtigsten Datenquellen für ein tieferes Verständnis von Lebensprozessen. Eine quantitative Beschreibung von komplexen biologischen Systemen ist jedoch nur möglich, wenn auch die dynamischen Aspekte dieser Systeme innerhalb der Zelle berücksichtigt werden. Hierfür sind hochauflösende mikroskopische Verfahren notwendig, mit denen es möglich ist, zelluläre Prozesse genau zu lokalisieren und zu verfolgen. Erst die genaue räumliche und zeitliche Beschreibung zellulärer Systeme ermöglicht eine realitätsnahe, mathematische Modellierung dieser Prozesse. Das Lichtmikroskop war nicht zuletzt deshalb in den Biowissenschaften schon immer eines der wichtigsten Forschungsinstrumente gewesen und das, obwohl die Beugung bis vor kurzem noch präzise Einblicke auf der Nanoskala

verhinderte. Jedoch sind hier neueste Entwicklungen dabei, die Leistungsfähigkeit dieses Schlüsselinstrumente der Biowissenschaften zu revolutionieren. Die Forschergruppe um Prof. Dr. Stefan W. Hell erforscht an den beiden Standorten Göttingen (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) und Heidelberg (Deutsches Krebsforschungszentrum & BioQuant) neue Verfahren zur beugungsunbegrenzten optischen Fernfeldmikroskopie, die es ermöglichen, zelluläre Strukturen und Prozesse im Nanometer-Bereich zu untersuchen.

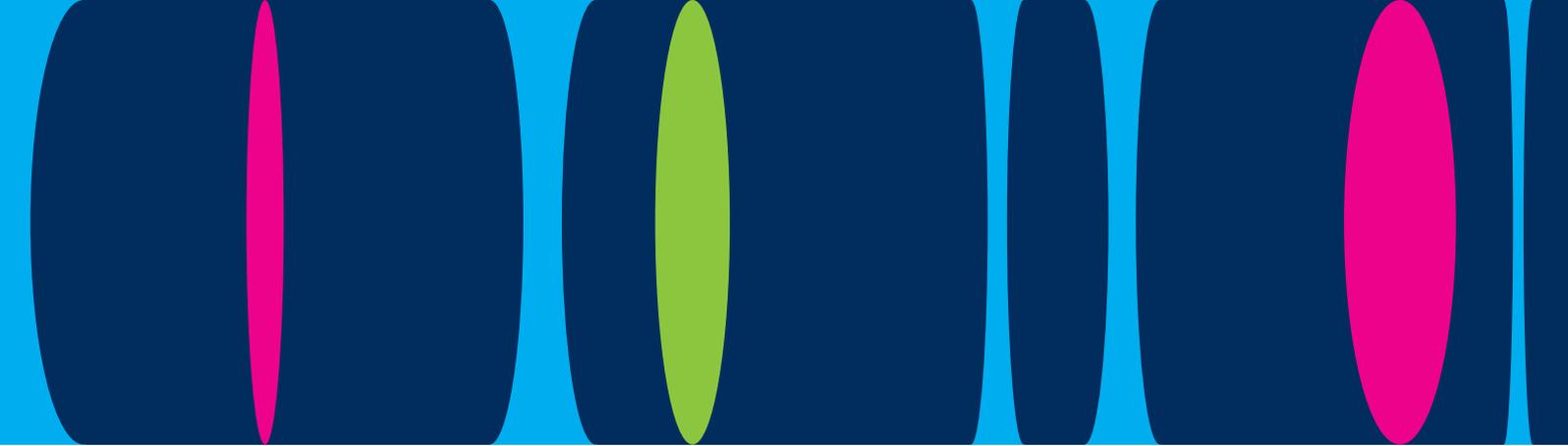
Beugung begrenzt die Sicht auf zelluläre Strukturen

Keine Frage: die Beugung von Wellen ist ein fundamentales physikalisches Phänomen. Über 100 Jahre hielt sich daher das Dogma, dass die Beugung die lichtmikroskopische Auflösung fundamental

Abbildung 1: Das STED Prinzip



Ein Lasersystem liefert einen Anregungsstrahl (blau) zur Fluoreszenzanregung sowie einen Stimulationsstrahl (rot) zum Ausschalten der Fluoreszenz. Diese werden über einen Farbstrahlteiler und einen Scanner durch einen farbabhängigen Strahlformer geführt und mit dem Objektiv auf das Objekt in der Brennebene fokussiert. Der Strahlformer verändert selektiv nur das rote Ausschaltlicht so, dass es in der Brennebene ringförmig um den blauen Brennfleck verteilt wird. Dieses ringförmige Ausschaltlicht schaltet die Fluoreszenz am Rand des beugungsbegrenzten Anregungsflecks aus, sodass Moleküle nur noch in einem viel kleineren zentralen Bereich leuchten (grüner Bereich). Das Fluoreszenzlicht (grün) wird vom Objektiv gesammelt, passiert den Farbstrahlteiler und wird im Detektor nachgewiesen. Der Scanner rastert die Strahlen über das Objekt und erzeugt somit ein hoch aufgelöstes Abbild des Objekts.



begrenzt. Ernst Abbe hatte die Zusammenhänge der optischen Auflösung im Mikroskop vor etwa 150 Jahren systematisch erkannt und die in jedem Physik- und Biologielehrbuch festgehaltene Formel

$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)}$$

für die beugungsbegrenzte Auflösung aufgestellt. Dabei steht d für den minimalen Abstand, den zwei gleichartige Objektdetails voneinander haben müssen, um im Mikroskop getrennt zu werden. n ist die Brechzahl des Mediums und α der Öffnungswinkel des Objektivs.

Das Problem...

Ein Lichtstrahl kann demzufolge nicht auf einen kleineren Fleck fokussiert werden als etwa 200 nm, was dazu führt, dass alle Fluoreszenzmoleküle in diesem Fleck gleichzeitig aufleuchten. Zudem wird ein auch noch so kleines Objekt als ein beugungsbegrenzt großer Leuchtfleck von etwa 200 nm im Bild wiedergegeben.

Wie kann es nun gelingen, trotz dieses allgegenwärtigen Phänomens der Beugung, enger benachbarte gleichartige Objektdetails getrennt wahrzunehmen, das heißt aufzulösen?

...und dessen Lösung

Die Antwort darauf scheint einfach: Man muss, mit welchem Mechanismus auch immer, dafür sorgen, dass die einzelnen Objektdetails innerhalb eines beugungsbegrenzten Flecks nicht mehr gleichzeitig, sondern nacheinander aufleuchten, damit sie getrennt detektiert werden können. Trotz dieses einfach klingenden Lösungsansatzes gelang die Realisierung erstmals 1994 mit dem von Stefan Hell entwickelten STED-Mikroskopie Verfahren. STED steht für „Stimulated Emission Depletion“ (Hell, 2007 und 2008), was bedeutet, dass man den angeregten Zustand eines Fluoreszenzmoleküls nicht zulässt (depletion = engl. für Löschen). Dies geschieht, indem man das Molekül mit Licht bestrahlt, so dass es nach der Anregung sofort wieder in den Grundzustand versetzt wird.

Abbildung 2: Konfokale Abbildung aus dem Hippocampus eines Mäusehirns

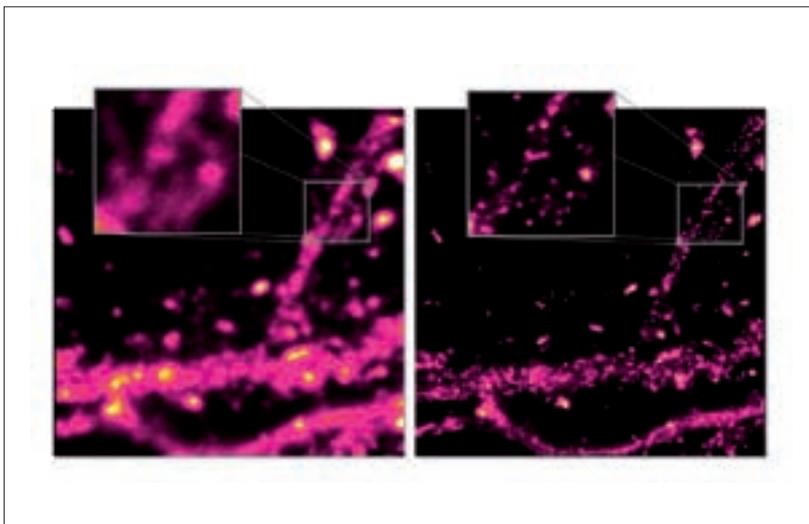


Bild: Dr. M. Reuss, DKFZ

Links ist eine konfokale Abbildung (10x10 µm) einer Probe (T. Dresbach, Universität Heidelberg) aus dem Hippocampus eines Mäusehirns dargestellt. Das prä-synaptische Protein Bassoon wurde mit dem Farbstoff ATTO565 gefärbt. Für die rechte Abbildung wurde der STED Strahl eingeschaltet. Insbesondere die Ausschnittsvergrößerung zeigt deutlich, dass mit dem STED-Verfahren viel feinere Strukturen und zelluläre Details der Synapsen aufgelöst werden können.

Ein zur Fluoreszenz angeregtes Molekül wird aktiv in seinen Grundzustand zurückgeführt - und somit gelöscht - wenn es von einem ausreichend intensiven Lichtstrahl mit einer Wellenlänge im Emissionsspektrum des Farbstoffes beleuchtet wird. Die überschüssige Energie wird als ein weiteres Lichtteilchen im Strahl mitgenommen, was uns hier nicht zu interessieren braucht. Das Entscheidende ist aber, dass das Fluoreszenzmolekül dann nicht mehr fluoreszieren kann, auch wenn es von einem Anregungsstrahl beleuchtet wird. Das heißt, man kann so die Fähigkeit des Farbstoffmoleküls, zu fluoreszieren, mit dem Stimulationsstrahl gezielt ausschalten. Um damit eine Auflösungserhöhung im Fluoreszenzmikroskop zu erhalten, wird dieser Ausschaltstrahl ringförmig um den beugungsbegrenzten Fleck gelegt. Dieser Stimulationsring schaltet die Fluoreszenzmoleküle im Außenbereich des beugungsbegrenzten Flecks aus, sodass nur noch Moleküle ganz im Zentrum leuchten können. Das Gespann von Anregungs- und Stimulationsstrahl muss also nur noch rasterförmig über das Objekt geführt werden, um nacheinander die Fluoreszenzmoleküle auszulesen. Das liefert automatisch ein höher aufgelöstes Abbild der Probe (Abb. 1). Zur quantitativen Beschreibung der neuen Auflösung muss Abbe's Formel um einen Wurzelterm ergänzt

werden, der die Intensität des Abschaltlichtes I und die Sättigungsintensität I_s enthält, bei der der Abschaltstrahl die Hälfte der Fluoreszenzmoleküle ausschaltet. Die neue Formel

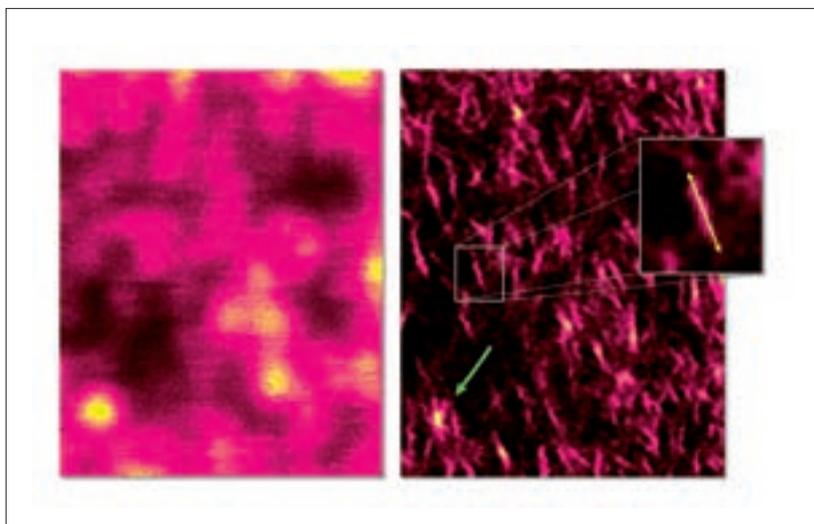
$$d \approx \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha) \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}}$$

zeigt, dass die Auflösung im STED-Mikroskop mit I einstellbar ist und keine Grenze mehr hat.

Die Anwendung

Derzeit wird mit STED bereits eine Auflösung erreicht, die in biologischen Proben 10-fach besser als die des herkömmlichen Lichtmikroskops ist. Das Verfahren wird schon vielfach zur Darstellung von Zellkernstrukturen sowie Mikrotubuli, Vesikel, aber auch von Viren und Rezeptoren verwendet. STED trägt dazu bei, Proteinverteilungen für die Klärung neurologischer Fragestellungen, virale Infektionspfade und viele weitere Untersuchungen aufzuschlüsseln, bei denen die herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie mangels Auflösung versagt. Abbildung 2 zeigt beispielhaft den Auflösungsgewinn. Durch die höhere Schärfe wird es

Abbildung 3: Die Molekülorientierung sichtbar gemacht



Mit MOM (Molecular Orientation Microscopy) STED (rechts) werden die Dipole der einzelnen Moleküle als kleine Striche abgebildet und zeigen damit die Orientierung der Moleküle an (gelber Pfeil). Sind mehrere Moleküle nahe beieinander (grüner Pfeil), so erscheinen sie wegen ihrer unterschiedlichen Orientierung sternförmig. Im konfokalen Bild (links) dagegen sind die einzelnen Moleküle weder auflösbar, noch kann man darin deren Orientierung ablesen.

Bild: Dr. M. Reuss, DKFZ



möglich, kleinere Objekte getrennt darzustellen, zu zählen und zu quantifizieren. In Mehrfarbenwendungen können Kollokationen von Stoffen so auf derzeit bis zu 20 nm hinunter direkt nachgewiesen beziehungsweise sicher ausgeschlossen werden. Einige Fragestellungen lassen sich damit sogar durch die direkte Beobachtung der molekularen Akteure schneller und sicherer klären, als über indirekte biochemische Schlussfolgerungen.

STED kann jedoch noch mehr. Mit den neuen am BioQuant-Zentrum entwickelten weiteren Strahlformverfahren (Abb. 3) kann zum Beispiel auch die Orientierung von Farbstoffmolekülen direkt angezeigt werden (Reuss *et al.*, 2010).

Die Zukunft

Neueste Entwicklungen der Forschergruppe Hell am BioQuant-Zentrum zeigen, dass die ursprünglich noch komplexen optischen Systeme für STED praktisch ohne Leistungseinbußen wesentlich einfacher aufgebaut werden können - ein entscheidender Schritt für die Routinefähigkeit dieses neuen Verfahrens und eine Voraussetzung für die weltweite Verbreitung und Verfügbarkeit für viele Wissenschaftler zur Klärung drängender Fragen in der Biomedizin.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Prof. Dr. Stefan W. Hell ist Direktor am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen und leitet dort die Abteilung NanoBiophotonics. Seit dem Jahr 2003 leitet er ebenfalls die Kooperationseinheit Optische Nanoskopie zwischen der Max-Planck Gesellschaft und dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Stefan Hell ist der Erfinder des STED-Verfahrens. Die von ihm und seinen Mitarbeitern entwickelten optischen Verfahren zur hochauflösenden Abbildung von zellulären und subzellulären Strukturen lieferten erstmals lichtmikroskopische Bilder mit Auflösungen von wenigen 10 nm aus dem Inneren von Zellen.

Referenzen:

- Hell, S. W. (2007). Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* 316, 1153 - 1158.
- Hell, S. W. (2008). Microscopy and its focal switch. *Nature Meth.* 6 (1), 24 - 32, Perspective, Special Feature, See Method of the year 2008.
- Reuss, M., J. Engelhardt, S. W. Hell (2010). Birefringent device converts a standard scanning microscope into a STED microscope that also maps molecular orientation. *Opt. Exp.* 18 (2), 1049 - 1058.

Kontakt:

Prof. Dr. Stefan Hell

Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Göttingen
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
(DKFZ) & BioQuant-Zentrum
shell@gwdg.de



Prof. Stefan W. Hell ist Direktor am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie und zudem Leiter der Abteilung „Optische Nanoskopie“ am DKFZ in Heidelberg, die im BioQuant-Zentrum beheimatet ist.

was bewegt zellen?

Aktivitätssensoren geben Einblick in die Kontrolle der Zelldynamik

von Perihan Nalbant

Eine Vielzahl physiologischer Vorgänge, wie etwa die Organentwicklung im Embryo oder Wundheilungsprozesse, erfordern die Reorganisation und Migration von Zellpopulationen. Für die präzise und effektive Organisation des Migrationsprogramms sind insbesondere dynamische Bewegungen auf der Ebene von einzelnen Zellen ausschlaggebend. Eine Fehlregulation der zeitlichen und räumlichen Koordination dieser Dynamik kann zu unkontrollierter pathologischer Migration, wie etwa bei der Metastasierung von Tumoren, führen (Yilmaz und Christofori 2009).

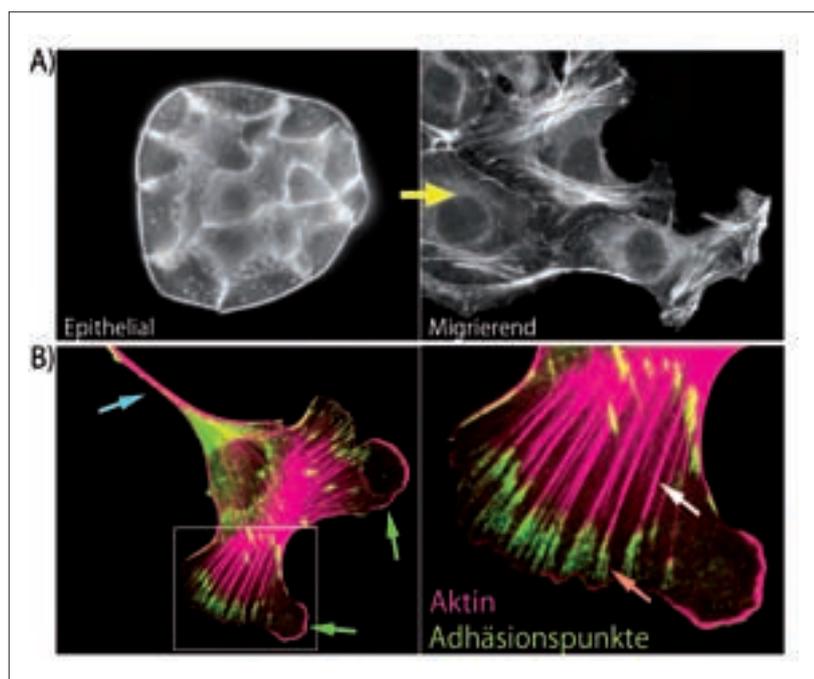
Beim Übergang von einem quasi bewegungslosen (epithelialen) in einen migrativen Zustand durchlaufen die Zellen dramatische Formänderungen (Abb. 1A). Eine entscheidende Rolle bei dieser Änderung der Zellform nimmt das Aktinzytoskelett ein – ein Polymersystem, welches kontinuierlich dynamischen Veränderungen unterliegt und unterschiedliche übergeordnete Strukturen aus-

bilden kann. So entwickelt der frontale Bereich migrierender Zellen Membranausstülpungen zur aktiven Vergrößerung der Zellfläche, wohingegen kontraktile Aktinfasern im hinteren Bereich den Zellkörper in Migrationsrichtung ziehen. Gleichzeitig ist die Zelle über spezialisierte Verknüpfungspunkte mit der 3-dimensionalen Umgebung verankert (Abb. 1B). Durch den kontrollierten Auf- und Abbau dieser Verankerungen kann die Zelle während der Migration die polarisierte Zellform aufrecht erhalten und gleichzeitig die Richtung der Migration kontrollieren (Yilmaz und Christofori 2009).

Rho-GTPasen: Masterregulatoren der Zellmigration

Unsere Arbeit befasst sich mit der Frage, wie die dynamischen Zellstrukturen während der Migration durch zellinterne Signalkaskaden koordiniert werden. Insbesondere stehen die Proteine der Rho-GTPasen Familie Rac1, RhoA und Cdc42 im Fokus, da sie als Masterregulatoren das generelle Verhalten von Aktin-basierten Zellstrukturen beeinflussen (Yilmaz und Christofori 2009): Im einzelnen reguliert Rac1 Zellausstül-

Abbildung 1: Die Organisation des Zytoskeletts in migrierenden Zellen



A) Durch externe Signale, wie etwa Wachstumsfaktoren, können in einem Zellverbund eingebettete Epithelzellen zur Migration stimuliert werden. Angefärbt ist das Aktinzytoskelett.

B) Migrierende Zellen (links) bilden eine polarisierte Form, mit dynamischen Ausstülpungen in dem vorderen Bereich (grüne Pfeile) und einen kontraktilen hinteren Bereich (türkiser Pfeil). Zugkräfte werden in langen Aktinfasern (weißer Pfeil) generiert und über spezialisierte Ankerregionen (oranjer Pfeil) auf das Zellsubstrat übertragen (rechts).

Bild: Perihan Nalbant



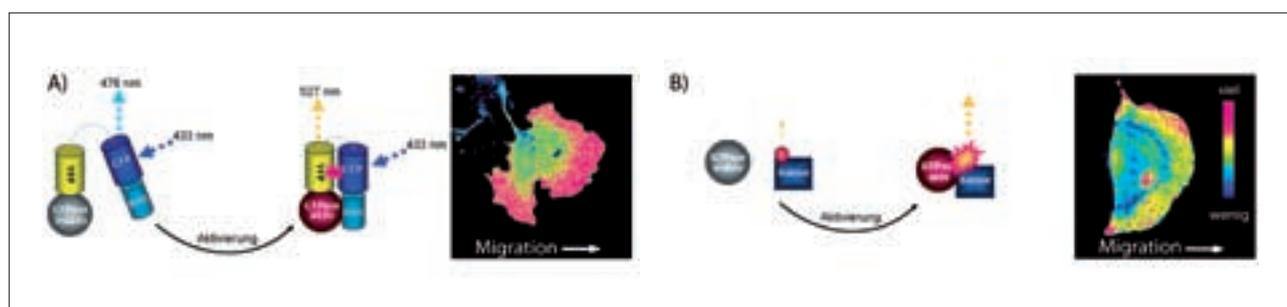
AG Nalbant. Von links nach rechts: Diana Moser, Nina Schulze, Olga Müller, Perihan Nalbant, Vera Schultz, Melanie Gräßl, Johannes Koch, Bettina Wagner (Foto: Perihan Nalbant).

pungen, wohingegen RhoA für die Bildung und Organisation der kontraktilen Aktinfasern und somit für den Aufbau von Zugkräften essentiell ist. Cdc42 wird schließlich mit der Generierung von antennenartigen Ausstülpungen, den sogenannten Filopodia, in Verbindung gebracht und ist für die Richtungsfindung während der Migration essentiell. Die Rho-GTPasen selbst sind in der Zelle nicht permanent und überall aktiv: Vielmehr können sie wie molekulare Schalter ein- oder ausgeschaltet vorliegen. Dabei wird die räumliche und zeitliche Aktivierung dieser Schalterproteine wiederum durch ein komplexes Zusammenspiel anderer übergeordneter Proteine und eine fein abgestimmte gegenseitige Kontrolle der drei Rho-GTPasen untereinander definiert. Die Mechanismen, die diese wechselseitigen Interaktionen die Dynamik der Zellmigration koordinieren, sind jedoch nicht bekannt.

Messung und Manipulation der Aktivität von Rho-GTPasen

Zum besseren Verständnis der molekularen Zusammenhänge haben wir und unsere Kooperationspartner Fluoreszenz-basierte Biosensoren entwickelt, welche die Visualisierung der zellulären Verteilung von aktivierten Rho-GTPasen in einzelnen lebenden Zellen erlauben (Kraynov *et al.*, 2000; Nalbant *et al.*, 2004, Pertz *et al.*, 2006). Die Funktionsweise dieser Biosensoren basiert im Wesentlichen auf der lokalen Änderung von Fluoreszenzsignalen in Abhängigkeit von der vorhandenen Menge an aktivem Protein (Abb. 2). Die präzise Messbarkeit solcher lokalen Aktivitäten in der Zelle erlaubt die zeitliche und räumliche Korrelation der betrachteten Proteinfunktionalitäten mit dem dynamischen Auf- und Abbau von zellulären Strukturen während des Migrationsvorgangs (Machacek *et al.* 2009, Nalbant *et al.*, 2009).

Abbildung 2: Zwei unterschiedliche Prinzipien von Biosensoren zur Visualisierung von aktiven Rho-GTPasen in lebenden Zellen



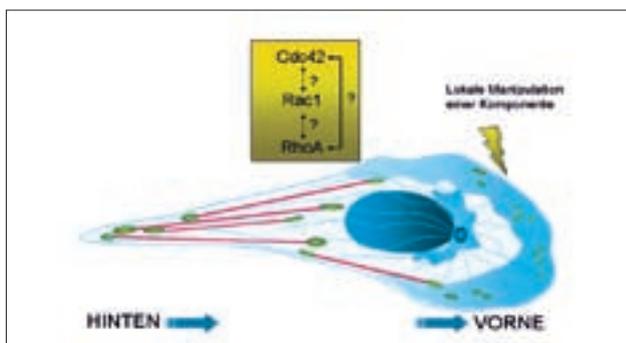
A) Dieser Biosensor basiert auf dem photophysikalischen Prozess des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET): Zur Detektion wird unter dem Mikroskop blaues Licht (458 nm) auf die Probe eingestrahlt. Die Energie dieses Lichtes wird von einem Teil des Moleküls aufgenommen (CFP). Im inaktiven Zustand der Rho-GTPase wird die aufgenommene Energie hauptsächlich in Form von türkisfarbenem Licht (476 nm) wieder abgeben. Wenn das Rho-Protein aktiv ist, verändert sich die Gesamtstruktur des Sensors. Durch diese Strukturänderung kommen sich die beiden Fluorophore (CFP und YFP) im Sensor näher. In Abhängigkeit von diesem Abstand kann Energie zwischen den Fluorophoren übertragen werden, wodurch Licht der Wellenlänge 527 nm generiert wird (gelbes Licht). Durch die mikroskopische Aufnahme der Zelle und Messung von Licht dieser Wellenlängen kann die räumliche und zeitliche Verteilung des aktiven Rho-Proteins in der Zelle gemessen werden (Pertz *et al.*, 2006). Die Aktivität ist in Falschfarben dargestellt: Wärmere Farben repräsentieren erhöhte Aktivierung.

B) Der Biosensor zur Messung der Cdc42-Aktivität besteht aus einem Proteinfragment, welches nur die aktive GTPase binden kann. Das Fragment ist mit einem Fluorophor gekoppelt, welches bei einer Interaktion mit der aktiven GTPase auf die Änderung seines Milieus mit einer starken Veränderung seiner Fluoreszenzintensität reagiert. Die mikroskopische Messung der Fluoreszenzmenge in unterschiedlichen Zellbereichen, erlaubt somit die Visualisierung der korrespondierenden Menge und Verteilung des aktiven Cdc42 Proteins (Nalbant *et al.*, 2004).

Die Messung derartiger Wechselbeziehungen kann bereits wichtige Hinweise auf die Rolle der Rho-GTPasen in der Koordination der Zellform geben. Um den Einfluss einzelner Rho-Proteine als Bestandteil eines komplexen Signalnetzwerks direkter zu untersuchen, stehen seit neuestem photoaktivierbare und photoinaktivierbare Varianten einzelner Rho-Proteine zur Verfügung. Diese Varianten können gezielt durch Licht ein- oder ausgeschaltet werden und erlauben hierdurch die kontrollierte Manipulation der räumlich-zeitlichen Verteilung der aktivierten Form (Wu *et al.*, 2009). In Kombination mit computergestützter Modellierung erlaubt eine derart direkte experimentelle Strategie die Entschlüsselung von Signalnetzwerken, welche die räumlich-zeitliche Regulierung der Rho-GTPasen sowie das dynamische Verhalten von Zellen bestimmen (skizziert in Abb. 3).

Ein solches tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Signalnetzwerke in der Zellmigration bildet letztlich die Grundlage für neue therapeutische Ansätze in der Medizin, wie etwa zur Behandlung von Krebserkrankungen.

Abbildung 3: Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle



Zur Bildung und Aufrechterhaltung der polarisierten Zellform und einer gerichteten Vorwärtsbewegung müssen mehrere zelluläre Reaktionen koordiniert werden. Die gegenseitige Kontrolle der Rho-GTPasen untereinander erlaubt die räumliche und zeitliche Kontrolle dynamischer Strukturen während dieser Migrationsbewegung. Durch die lokale Manipulation von ausgesuchten GTPasen kann die Logik von komplexen räumlich-zeitlich organisierten Rho-GTPase Netzwerken untersucht werden (Bild: Perihan Nalbant).

Steckbrief Forschungsprojekt:

Perihan Nalbant ist Juniorprofessorin am Zentrum für Medizinische Biotechnologie an der Universität Duisburg-Essen. Ihre Forschungsgruppe beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen, welche die Migration von Zellen regulieren.

Referenzen:

- Kraynov, V. S., Chamberlain, C., Bokoch, G. M., Schwartz, M. A., Slabaugh, S., and Hahn, K. M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290(5490), 333-337.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461(7260), 99-103.
- Nalbant, P., Chang, Y. C., Birkenfeld, J., Chang, Z. F., Bokoch, G. M. (2009). Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell* 20(18), 4070-4082.
- Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A., Hahn, K. M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* 305(5690), 1615-1619.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R. L., and Hahn, K. M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440(7087), 1069-1072.
- Wu, Y. I., Frey, D., Lungu, O. I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlmann, B., and Hahn, K. M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461(7260), 104-108.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28(1-2), 15-33.

Kontakt:

Prof. Dr. Perihan Nalbant

Arbeitsgruppenleiterin, Molekulare Zellbiologie

Universität Duisburg-Essen

Zentrum für Medizinische Biotechnologie

perihan.nalbant@uni-due.de

die dynamik des zellskeletts

Wie molekulare „Speckles“ die Bausteine der Zelle sichtbar machen

von Leif Dehmelt

Die Entwicklung mehrzelliger Organismen, also auch von Menschen, wird durch zahlreiche Formänderungen einzelner Zellen geprägt. Diese Formänderungen werden durch ein zelluläres Skelett, das sogenannte Zytoskelett, möglich. Im Unterschied zum starren, makroskopischen Skelett von Tieren, ist das Zytoskelett sehr flexibel und dynamisch. Es besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher, faserartiger Strukturen, welche in der Zelle durch Polymerisation und Depolymerisation von löslichen Einzelbausteinen auf- bzw. abgebaut werden (Abb. 1, oben).

Eine besonders wichtige Rolle spielen hierbei Aktinfilamente und Mikrotubuli, welche aus den Proteinbausteinen G-Aktin und Tubulin aufgebaut sind. Diese Filamentarten haben eine asymmetrische Struktur, an welcher direktonaler Transport durch molekulare Motorproteine stattfindet. Solche Transportprozesse bilden zum einen die Grundlage für die räumliche Organisation des Zellinneren, zum anderen kann die Bewegung dieser Motorproteine Kräfte erzeugen, welche das Zytoskelett entlang anderer Zellbestandteile verschieben und hierdurch Änderungen in der Zellform bewirken. In den letzten Jahrzehnten wurden viele

mechanistische Details zur Regulation einzelner Komponenten des Zytoskeletts entschlüsselt. Die übergeordneten Mechanismen, wie sich unterschiedliche Komponenten des Zytoskeletts gegenseitig beeinflussen und wie sich dadurch diese faserartigen Strukturen in der Zelle organisieren und die Zellform beeinflussen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Bezüglich dieser Fragestellung ist die Entwicklung von Nervenzellen (Abb. 1, unten) aufgrund der hierbei beobachteten dramatischen Änderungen der Zellform besonders interessant.

Die Vermessung der Dynamik des Zytoskeletts

In unserer Arbeitsgruppe verfolgen wir einen modernen systembiologischen Ansatz, welcher quantitative experimentelle Untersuchungen mit computergestützter Modellierung kombiniert, um ein tieferes Verständnis zellulärer Prozesse zu erhalten. Die Qualität solcher Modelle ist durch die messbaren experimentellen Daten limitiert, welche typischerweise zelluläre chemische Reaktionen oder einzelne Protein-Interaktionen repräsentieren. Die Erforschung von Zellformänderungen erfordert zusätzlich genaue Messungen von mechanischen Prozessen, welche durch den dynamischen Auf- und Abbau des Zytoskeletts und dessen Verschiebung durch Interaktionen mit

Abbildung 1: Die räumliche Organisation des Skeletts von Nervenzellen in frühen Entwicklungsstadien

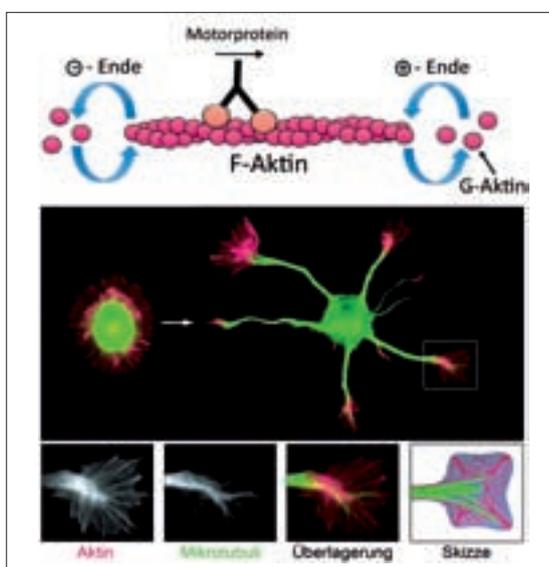


Bild: Leif Dehmelt

Oben: Schematische Darstellung eines asymmetrischen Aktinfilaments (F-Aktin), welches durch Polymerisation aus G-Aktin-Einzelbausteinen gebildet wird. Die asymmetrische Struktur des Filaments ermöglicht directionalen Transport über Motorproteine. Unten: Zwei Arten von Zytoskelettfilamenten sind in einer entwickelnden Nervenzelle angefärbt: Aktin (rot) und Mikrotubuli (grün). Eine Struktur im peripheren Bereich der Zelle, in einem sogenannten Wachstumskegel, ist vergrößert dargestellt (reproduziert aus Dehmelt *et al.* 2003 mit Erlaubnis von The Society for Neuroscience).

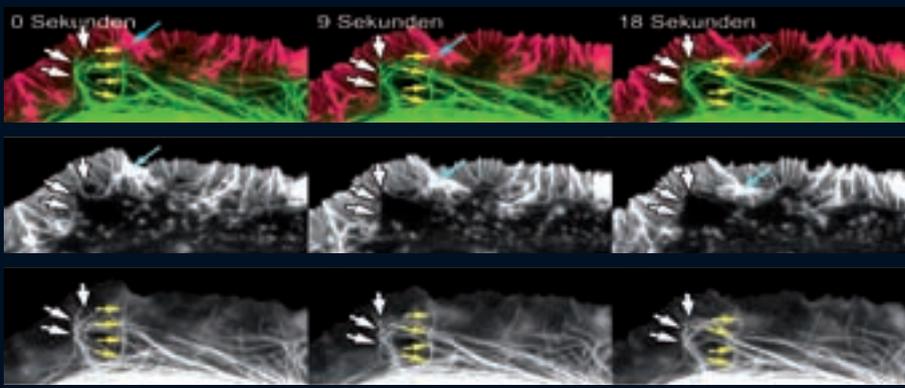


Abbildung 3: Wechselseitiger Einfluss von Zytoskelettkomponenten in Zellen

Aktinfilamente (rot) unterliegen einem ständigen Fluss (türkisfarbene Pfeile), welcher auch Mikrotubulifilamente (grün) in Richtung des Zellzentrums verschiebt. Die Mikrotubuli werden oft unter dem Einfluss dieser Kraft aus dem Aktinzytoskelett gebeugt (gelbe Pfeile). Eine größere Ansammlung von Mikrotubulifilamenten (weiße Pfeile) kann allerdings dieser Kraft entgegenwirken, limitiert hierdurch die räumliche Anordnung des Aktinzytoskeletts und beeinflusst somit indirekt die Zellform (Dehmelt *et al.* 2003). Die komplette Filmsequenz kann über den Internetlink www.mpi-dortmund.mpg.de/forschungProjekte/AGs/Dehmelt/forschung/index.html eingesehen werden (Bild: Leif Dehmelt).

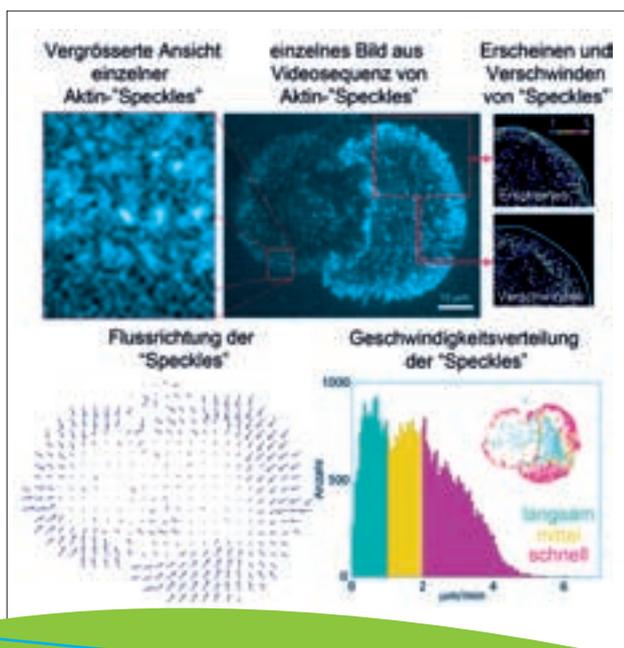
molekularen „Motoren“ angetrieben werden. Zur experimentellen Charakterisierung dieser dynamischen Eigenschaften des Zytoskeletts wird häufig eine spezielle mikroskopische Technik, die sogenannte „Speckle“-Mikroskopie, verwendet (Danuser and Waterman-Storer, 2006). In diesem Verfahren wird eine sehr geringe Menge von Filamenteinzelbausteinen in Zellen eingebracht, welche mit einem Farbstoff – in diesem Fall das Grün fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* – markiert sind. Diese markierten Einzelbausteine bilden in Zellen winzige „Farbkleckse“ (engl. „Speckles“). Solange diese Bausteine in gelöster Form vorliegen, bewegen sie sich sehr schnell durch typische Molekularbewegungen (Diffusion) und werden daher in der „Speckle“-Mikroskopie nicht als einzelne Moleküle abgebildet. Wenn diese Einzelbausteine jedoch in dynamisch reorganisierende Zytoskelettfilamente eingebaut werden, ist deren Motilität aufgrund der Größe der Zytoskelettstrukturen stark reduziert, wodurch sie leichter detektiert werden können. In Zytoskelettfilamenten können durch sensitive mikroskopische Analyse sogar einzelne, markierte Filamenteinzelbausteine

in lebenden Zellen verfolgt werden (Watanabe and Mitchison, 2002). Das plötzliche Erscheinen eines solchen Speckles entspricht daher dem Einbau (Polymerisation), das Verschwinden eines Speckles dem Abbau (Depolymerisation) eines Filament-segments. Verschiebungen der einzelnen Speckles beruhen auf Bewegungen innerhalb der Zytoskelettstruktur, welche durch herkömmliche Techniken oft nicht genau messbar sind. Abb. 2 zeigt exemplarisch am Beispiel des Aktinzytoskeletts, wie mit dieser Technik ein kontinuierlicher Fluss der Zytoskelettkomponenten in lebenden Zellen vermessen werden kann.

Prinzipien in der Organisation des Zytoskeletts: Modelle zur Integration von experimentellen Daten

Um die räumlich-zeitliche Organisation des Zytoskeletts besser zu verstehen, ist es allerdings nicht ausreichend nur die dynamischen Eigenschaften einer einzelnen Zytoskelettkomponente, wie z. B. von Aktinfilamenten, zu vermessen, da diese mit einer Vielzahl weiterer Komponenten über komplexe mechanische und chemische Mechanismen kommuniziert (Dehmelt and Bastiaens 2010).

Abbildung 2: Vermessung der Filamentdynamik durch „Speckle“-Mikroskopie



Das Aktinzytoskelett wurde in neuronalen Vorläuferzellen mit einzelnen molekularen Speckles markiert. Durch die computergestützte Analyse der dynamischen Eigenschaften dieser Speckles in Filmsequenzen kann die räumliche Verteilung der Polymerisation, Depolymerisation sowie die Verschiebungen von Aktinfilamenten verfolgt und quantifiziert werden (Bild: Leif Dehmelt, Tomáš Mazel).



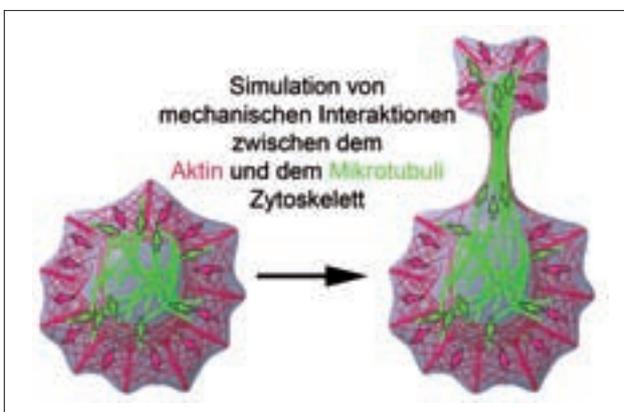
AG Dehmelt: (von links nach rechts und von oben nach unten) Leif Dehmelt, Nicolas Brauckhoff, Julia Arens, Melanie Grässl, Olga Müller, Tomáš Mazel, Johannes Koch, Anja Biesemann, Silke Gandor, Pia Jeggle, Magda Krejczy, Verena Hannak.



Das Max-Planck Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund.

Abb. 3 zeigt wie Mikrotubuli- und Aktin-vermittelte Kräfte durch ihren gegenseitigen Einfluss die Zytoskelettstruktur und somit die Zellform beeinflussen (Dehmelt *et al.*, 2003; Dehmelt *et al.*, 2006). Leider ist die Anzahl der Komponenten, welche simultan in einer einzelnen Zelle verfolgt werden können, durch die Anzahl verfügbarer unterscheidbarer Farbstoffe begrenzt. Daher können nicht alle möglichen Interaktionen gleichzeitig gemessen werden. Um die mechanistische Grundlage dieser wechselseitigen Interaktionen dennoch zu entschlüsseln, integrieren wir Beobachtungen aus unterschiedlichen Experimenten in dynamischen, mathematischen Modellen der zentralen Komponenten des Zytoskeletts (skizziert in Abb. 4). Die Vorhersagen aus solchen Modellen bezüglich der Zelldynamik werden durch gezielte experimentelle Manipulationen überprüft. Durch ein enges Zusammenspiel zwischen Theorie und Experiment entschlüsseln wir somit die grundlegenden Prinzipien, auf welche Weise sich die Struktur des Zytoskeletts durch mechanische und chemische Interaktionen mit anderen Zellkomponenten selbst organisiert und wie

Abbildung 4: Schema eines einfachen Modells zur Simulation von Formänderungen in Zellen



Drei Komponenten, Aktin (rot), Mikrotubuli (grün) und die Plasmamembran (grau), beeinflussen sich gegenseitig über mechanische Kräfte und bilden spontan einen Auswuchs. Zahlreiche weitere Komponenten, welche die beteiligten Kräfte produzieren und die chemischen und mechanischen Eigenschaften der Zytoskelettfilamente regulieren, sind zur Vereinfachung nicht aufgeführt (Bild: Leif Dehmelt).

diese Prozesse zu Zellformänderungen, wie beispielsweise der Bildung von Zellfortsätzen in Nervenzellen, führen. Die direkte Beobachtung von molekularen Speckles hilft uns hierbei Licht ins Dunkel dieser komplexen zellbiologischen Vorgänge zu bringen.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Die Arbeiten wurden von der FORSYS Partner Initiative des BMBF unter dem Titel „Interaktionen von zellulären Systemen in der Entwicklung von Nervenzellen“ gefördert und in der Abteilung für Systemische Zellbiologie im Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der TU Dortmund durchgeführt.

Referenzen:

- Danuser, G., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Quantitative fluorescent speckle microscopy of cytoskeleton dynamics. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 35, 361-387.
- Dehmelt, L., Smart, F.M., Ozer, R.S., and Halpain, S. (2003). The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci* 23, 9479-9490.
- Dehmelt, L., Nalbant, P., Steffen, W., and Halpain, S. (2006). A microtubule-based, dynein-dependent force induces local cell protrusions: Implications for neurite initiation. *Brain Cell Biology* 35, 39-56.
- Dehmelt, L., and Bastiaens, P.I. (2010). Spatial organization of intracellular communication: insights from imaging. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 440-452
- Watanabe, N., and Mitchison, T.J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295, 1083-1086.

Kontakt:

Dr. Leif Dehmelt

Arbeitsgruppenleiter Abteilung Systemische Zellbiologie
TU Dortmund und Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
leif.dehmelt@mpi-dortmund.mpg.de

der mann, der licht ins dunkel der blackbox bringt

Porträt Timm Schroeder

Timm Schroeder ist rumgekommen – nicht nur auf dem Globus. Auch in den vielfältigen Methodenfeldern, die er für seine Arbeit benötigt, bewegt er sich wie ein Weltenbummler, der sich an vielen Orten wohl fühlen kann. Der gebürtige Südafrikaner ist hauptsächlich in Erlangen und München aufgewachsen. An beiden Orten hat er auch studiert. Seine Forscherkarriere brachte ihn später nach Boston, USA, an die Harvard Medical School, und immer wieder nach Japan. Mehrmals war er als Doktorand und als junger Postdoc in Kyoto, später nochmals für zwei Jahre in Kobe.

Das Land der aufgehenden Sonne scheint es ihm besonders angehtan zu haben. Auch wenn er dort oftmals auf Zehenspitzen durchs Labor tippeln musste, weil ihm die vorgeschriebenen Sicherheitsschuhe zu klein waren und sich größere vor Ort nicht organisieren ließen. Vielleicht war es der Reiz des Fremden und des Neuen, der den Wissenschaftler in seinen Bann zog. „In Japan ist schon der Weg zur Arbeit ein Abenteuer – man kann Nichts lesen und muss sich auf die Hilfe anderer verlassen und darauf, dass schon alles irgendwie klappen wird,“ erinnert sich Schroeder, der die japanische Sprache immerhin soweit gelernt hat, dass er sich in den wichtigsten Lebensbereichen verständigen kann.

Von seiner Begeisterung für Nippon zeugen auch Kalligraphien und Fotos, die in seinem neuen Büro im Helmholtz Zentrum München darauf warten, an die Wand gehängt zu werden. Hier leitet der Vierzigjährige seit 2004 eine unabhängige Gruppe im Institut für Stammzellforschung. Sein Ziel: Die Hämatopoese, also die Entstehung unserer vielfältigen Blutzellen zu verstehen. Klassische Molekular- und Zellbiologie reichen ihm dafür aber nicht. Für ihn müssen es schon Computertechnik und ausgeklügelte moderne Verfahren zur Bildgebung sein.

Das Thema an sich beschäftigte den Wissenschaftler schon während seiner Doktorarbeit. Sein Fokus lag damals auf der Rolle des so genannten Notch-Signalwegs, der für verschiedene Entwicklungsvorgänge eine entscheidende Rolle spielt. „Ursprünglich kannte man Notch aus der Taufliege *Drosophila*, wo das Pro-

tein die Differenzierung blockiert“, erklärt Schröder. „Aber wir haben damals festgestellt, dass der Faktor bei der Entwicklung von Blutzellen das Gegenteil bewirken kann.“

Was damals einer Revolution gleich kam, ist heute längst anerkannt und gilt zum Beispiel auch für Haut- und Nervenzellen. Schroeder zog aber noch eine ganz andere Lehre daraus: „Ich hab eigentlich immer das Gegenteil von dem gefunden, was alle erwartet haben“, sagt er. Dann habe er erkannt, dass die Messdaten der Kollegen seinen eigenen oft verblüffend ähnlich waren. „Das liegt daran, dass in der traditionellen biologischen Herangehensweise oftmals ein Ausgangspunkt beschrieben wird und dann wieder ein Endpunkt.“ Alle Schritte dazwischen verschwänden quasi in einer Blackbox, und die lasse unglaublich viel Spielraum für Interpretationen.

Schroeder gibt ein Beispiel: „Wenn wir am Ausgangspunkt eine einzelne Zelle haben und nach einigen Tagen später, zum nächsten Messpunkt, sind es vier Zellen, was ist dann wohl passiert?“ Sehr wahrscheinlich sind zwei Teilungsschritte vonstatten gegangen. Sicher wissen kann das aber niemand. „Es könnten ja auch drei oder vier Teilungen sein, und ein paar Zellen sind abgestorben. Oder die Ausgangszelle hat sich selbst gar nicht vermehrt, dafür sind andere ins Untersuchungsfeld gewandert“, sagt der Wissenschaftler. Das Gleiche gilt für molekulare Vorgänge. Statt Anfangs- und Endpunkte zu bewerten, will er daher Prozesse kontinuierlich beobachten. Und zwar auf Einzelzellbasis. Nur so lasse sich die Blackbox mit Wissen füllen. Und nur so erhalte man letztendlich qualitativ hochwertigen Daten, die sich später sinnvoll für systembiologische Modelle verwenden lassen.

„Im Knochenmark kommt auf 50.000 Zellen gerade mal eine Blutstammzelle, beobachtet man da die ganze Population, lernt man nichts über die Stammzellen“, sagt Schroeder. Stattdessen nimmt er über einen längeren Zeitraum einzelne Zellen im Mikroskop ins Visier und verfolgt, wie sie sich verändern, wann sie etwa charakteristische Merkmale ausbilden oder welche Rolle verschiedene Moleküle dabei spielen. Das bedarf einer guten Bildverarbeitung – auch mal über einen Zeitraum von zwei Wochen hinweg.



Timm Schroeder (Bild: Helmholtz Zentrum München).

Schnell musste Schroeder allerdings feststellen, dass gängige Computertools dieser Aufgabe nicht gewachsen waren. Der Biologe machte sich also selbst ans Programmieren. Das Know-how dazu hatte er bereits nebenher während seines Studiums erworben – angetrieben vom Reiz des Neuen und der Lust am Lernen. Timm's Tracking Tool heißt das Ergebnis. Der Name, über den der blonde Forscher selbst schmunzeln muss, entstand aus der Notwendigkeit, eine Dreibuchstaben-Erweiterung für die Bezeichnung der Dateien zu finden: ttt. „Das war ja zuerst nur laborintern, und dann ist es eben dabei geblieben.“ Mittlerweile stellt Schroeder die Software über die Homepage der Gruppe auch anderen Forschergruppen zur Verfügung.

Bei allem fachübergreifenden Können, das Schroeder mitbringt, arbeitet er bei manchen Fragestellungen natürlich auch mit Spezialisten aus anderen Gebieten zusammen. „Ich kann zwar programmieren, aber wenn wir etwa auf Basis unserer Daten mathematische Modelle generieren wollen, brauchen wir dafür schon Bioinformatiker und Mathematiker“, schränkt er ein. Im Rahmen der Helmholtz-Allianz Systembiologie arbeitet er beispielsweise mit Fabian Theis zusammen. Der Mathematiker und Physiker leitet im Institut für Bioinformatik und Systembiologie des Helmholtz Zentrums München eine Gruppe für Computational Modeling und hat an der Technischen Universität München eine Professur für Mathematik der Systembiologie inne. Mit ihm forscht Schroeder quasi Tür an Tür. „Die räumliche Nähe ist ein unglaublicher Vorteil, weil unsere Mitarbeiter so ständig in engem Austausch stehen – nicht nur per Telefon und E-Mail, sondern auch bei gemeinsamen Seminaren oder beim Mittagessen.“ Das findet er wichtig, denn eine gemeinsame Sprache zu finden sei beim interdisziplinären Forschen nicht der einzige Stolperstein. Auch unterschiedliche Publikationskulturen wollen berücksichtigt werden. „Da ist es gut, wenn man im direkten Kontakt ist und solche Dinge besprechen kann.“

Dass Schroeder Wissenschaftler werden sollte zeichnete sich übrigens schon früh ab in seinem Leben. Seine Mutter habe ihm mal ein altes Bild aus dem Kunstunterricht in die Hand gedrückt. Aufgabe war damals: Male Deinen Berufswunsch. „Ich sitze auf dem Bild im Wald und erforsche irgendwas,“ erinnert

er sich lachend. Spätestens zu Abiturzeiten stand die Richtung fest, und bereits seinen Zivildienst absolvierte Schroeder im Labor. Dort lernte er viel Praktisches. Als Student legte er dann vor allem Wert darauf, die Sachverhalte und Zusammenhänge zu verstehen.

Das Schlimmste während seiner Studiums: „Ich hatte den Eindruck immer gebremst zu werden, wenn ich mehr machen wollte als nötig – wenn ich zum Beispiel nach einem Praktikumsplatz fragte, wurde ich oft abgewiesen, weil niemand Verwendung für einen Studi aus den unteren Semestern hatte.“ Schroeder hat darum immer eine offene Tür für den Nachwuchs. Praktikanten sind genauso willkommen wie Informatikstudenten, die einen Job als Hilfwissenschaftler suchen. „Jeder, der motiviert ist, kann mit seinen Fähigkeiten etwas beitragen“, lautet das Credo des Wissenschaftlers.

Von Anfang an war Schroeder's Laufbahn auf molekulare Zellbiologie und moderne Technologien ausgerichtet. Trotzdem gönnte er sich während seines Grundstudiums einen Ausflug in die klassische Biologie: „Ich war mal während der Semesterferien auf einer Walbeobachtungsstation in Kanada. Das war ein irres Erlebnis, aber trotzdem habe ich meine Zukunft nicht in diesem Feld gesehen.“ Die Liebe zur Natur ist ihm aber geblieben. Die lebt er aus, wenn er gemeinsam mit seiner Frau Urlaub in fernen Ländern macht. Und dann widmet er sich auch seinem Hobby, der Naturfotografie – mit dem gleichen Anspruch an qualitativ hochwertige Bilder wie im Labor.

Das Interview führte Stefanie Reinberger.

Kontakt:

Dr. Timm Schroeder

Helmholtz Zentrum München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Institut für Stammzellforschung, Neuherberg

timm.schroeder@helmholtz-muenchen.de

www.helmholtz-muenchen.de/isf/haematopoese/index.html

BioQuant

Interdisziplinäres Zentrum für Systembiologie an der Universität Heidelberg

von Angela Oberthür und Roland Eils

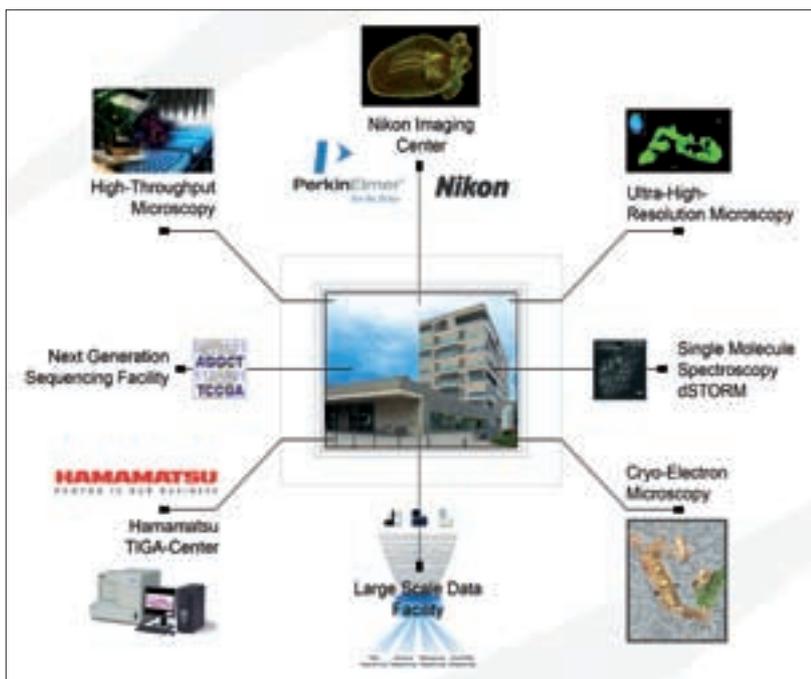
300 Mitarbeiter, 30 Forschergruppen, davon mehr als ein Drittel selbstständige Nachwuchsgruppen...

Nirgendwo sonst in Deutschland befassen sich so viele international angesehene Wissenschaftler unterschiedlichster Disziplinen exklusiv mit systembiologischen Fragestellungen. Fakultäten- und Forschungsinstitutionen übergreifend bündelt BioQuant die erfolgreichen, systembiologischen Forschungsaktivitäten am Standort Heidelberg unter dem Dach eines universitären Forschungszentrums. Im Jahr 2007 als erstes Zentrum für Systembiologie in Deutschland gegründet, zählt BioQuant längst zu den führenden Zentren in Europa.

Der Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeiten des BioQuant-Zentrums liegt auf der quantitativen und skalenübergreifenden Beschreibung zellulärer Prozesse mit einem besonderen Fokus auf medizinisch relevante Fragestellungen.

Mit der Einrichtung des interdisziplinären, internationalen Curriculums Systems Biology an der Universität Heidelberg und zahlreichen, selbstständigen Nachwuchswissenschaftlern setzt das BioQuant-Zentrum auch in der Systembiologie-Ausbildung Maßstäbe in Deutschland.

Abbildung 1: BioQuant Technologieplattformen



Die am BioQuant-Zentrum etablierten Technologieplattformen umfassen schwerpunktmäßig quantitative Bildgebungsverfahren.

Bild: BioQuant



Schwerpunkt Forschung: zelluläre Systeme

Seit der Gründung im Jahr 2007 hat sich im BioQuant-Zentrum eine führende Forschungsgemeinschaft im Bereich der Systembiologie auf dem Heidelberger Campus formiert, die sich schwerpunktmäßig mit medizinisch relevanten, zellulären Prozessen wie z.B. Virus-Wirtszell-Interaktionen¹, Signaltransduktion², Apoptose³, Genregulation⁴ & Epigenetik⁵ und Zellarchitektur⁶ beschäftigt.

So ist das BMBF-geförderte FORSYS-ViroQuant-Konsortium (Koordination: Prof. Roland Eils/Prof. Jürgen Wolfrum) seit 2007 integraler Bestandteil des BioQuant-Zentrums. Das interdisziplinäre Forschungsprogramm widmet sich der SYSTEMBIOLOGIE VON VIRUS-WIRTSZELL-INTERAKTIONEN und bündelt die Expertise renommierter Virologen, Molekularbiologen, Mathematiker, Physiker, Computerwissenschaftler und Ingenieure am Heidelberger Standort. Im Fokus der Arbeiten stehen dabei die ursächlichen Erreger von AIDS (HIV) und Hepatitis C (HCV).

Die erfolgreiche, interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb von ViroQuant war Ausgangspunkt für das internationale Verbundprojekt PathoSys (Koordination: Prof. Roland Eils/Dr. Lars Kaderali), das seit Ende 2010 von der Europäischen Kommission gefördert wird. Innerhalb PathoSys widmen sich internationale, akademische und industrielle Partner der Entwicklung neuer mathematischer Methoden zur Erforschung des Wechselspiels zwischen Virus und Wirtszelle am Beispiel des Hepatitis C-Virus. Das BioQuant-Zentrum koordiniert das EU-Netzwerk PathoSys federführend.

Einen weiteren Schwerpunkt am BioQuant-Zentrum stellen die zahlreichen wissenschaftlichen Projekte zur SYSTEMBIOLOGIE VON KREBSERKRANKUNGEN dar, die im Rahmen der von der Helmholtz-Gemeinschaft initiierten Helmholtz-Allianz Systembiologie (Teilprojekt „Systems biology of cancer“, Koordination: Prof. Eils/Prof. Klingmüller) erfolgreich bearbeitet werden.

Ein weiteres Forschungsprogramm ist das bereits 2004 etablierte ZENTRUM FÜR MODELLIERUNG UND SIMULATION IN DEN BIOWISSENSCHAFTEN (BIOMS, Koordination: Prof. Ursula Kummer/Prof. Willi Jäger). Mit maßgeblicher Unterstützung des Landes Baden-Württemberg und der Klaus-Tschira-Stiftung, sowie den beteiligten Forschungseinrichtungen (Universität Heidelberg, Deutsches Krebsforschungszentrum, European Molecular Biology Laboratory und Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung) wurde ein zum damaligen Zeitpunkt deutschlandweit einzigartiges Forschungsprogramm ins Leben gerufen, das die Entwicklung neuer theoretischer Ansätze und Methoden für die Systembiologie am Standort Heidelberg unterstützt. Besonderes Augenmerk dieses lokalen Programms liegt dabei auf der Förderung von Nachwuchswissenschaftlern in der Systembiologie. Auch der im Rahmen der Exzellenzinitiative geförderte EXZELLENZCLUSTER CELLNETWORKS (Koordination: Prof. Hans-Georg Kräusslich) ist zu großen Teilen im BioQuant-Zentrum beheimatet.

Zusätzlich zu diesen derzeitigen Hauptforschungsprogrammen haben sich im BioQuant zahlreiche neue Forschungsprojekte gebildet, die z.B. im FORSYS-Partnerprogramm, SysTec, MedSys, GerontoSys, CancerSys, Virtual Liver, SysMo als auch im Rahmen des ERANet „EraSysBio“ gefördert werden.

Schwerpunkt Technologien: *in vivo* Imaging & Datenmanagement

Für eine realitätsnahe, mathematische Beschreibung biologischer Systeme ist die Gewinnung quantitativer sowie räumlich-zeitlich aufgelöster Daten essentiell. Hierfür wurde am BioQuant-Zentrum neben einer leistungsstarken IT-Infrastruktur eine umfassende Technologieplattform etabliert, die zurzeit schwerpunktmäßig bildgebende Verfahren umfasst. Das angebotene Repertoire reicht von hoch- bis höchstauflösender Lebendzell-Mikroskopie über Hochdurchsatz-Verfahren bis hin zur Kryo-Elektronenmikroskopie. Ergänzt wird dieser Bereich um eine „RNAi Screening Facility“ und eine erst kürzlich eingerichtete „Deep Sequencing Facility“. Integrale Bestandteile der BioQuant-Technologieplatt-



Das BioQuant mit seiner preisgekrönten Architektur bietet ideale Bedingungen für interdisziplinäre Forschung auf höchstem Niveau.

form sind auch die beiden erfolgreichen Firmenkooperationen: das Nikon Imaging Center (siehe Seite 68 in diesem Heft) und das Hamamatsu Tissue Imaging and Analysis Center-TIGA (siehe Artikel in systembiologie.de, 2. Ausgabe). Um den beim Einsatz dieser neuen Technologie anfallenden großen Datenmengen gerecht zu werden, wird am BioQuant-Zentrum mit Mitteln des Bundes und des Landes Baden-Württemberg in den nächsten drei Jahren eine Large Scale Data Facility (LSDF) realisiert, die mit zirka 6 Petabyte Speicherkapazität eine der größten europäischen Datenspeichereinrichtungen darstellt, die ausschließlich der lebenswissenschaftlichen Forschung zur Verfügung steht.

Schwerpunkt Nachwuchsförderung

Um den hohen Bedarf an interdisziplinär ausgebildeten Nachwuchswissenschaftlern in der Systembiologie zu decken, hat das BioQuant-Zentrum bereits kurz nach seiner Gründung ein eigenes interdisziplinäres Ausbildungsprogramm ins Leben gerufen. Das interdisziplinäre Major-Curriculum Systems Biology (Koordination: Prof. Ursula Kummer/Prof. Ursula Klingmüller)

ist seit dem WS 2008/2009 fester Bestandteil des internationalen Masterprogramms „Molecular Biosciences“ an der Universität Heidelberg und wird von ausgewiesenen Wissenschaftlern aus Theorie und Lebenswissenschaften gestaltet.

Mehr als ein Drittel der Forschergruppen am BioQuant sind über renommierte Drittmittelprogramme unterstützte, selbstständige Nachwuchsgruppen. So finden im BioQuant u.a. zwei über den European Research Council mit *ERC Starting Grants* geförderte Nachwuchsgruppen (Dr. Anne Marciniak und Dr. Ilka Bischofs-Pfeifer) ideale Bedingungen für die Umsetzung ihrer systembiologischen Forschungsprojekte. Die ersten BioQuant-Nachwuchsgruppenleiter wurden bereits nach wenigen Jahren ihres Wirkens am Zentrum auf W3-Lehrstühle berufen.

Zeitgenössische Architektur für interdisziplinäre Forschung

Die Basis für die aktive Systembiologie-Forschungsgemeinschaft des Zentrums wurde in Heidelberg bereits im Jahr 2001

Abbildung 2: BioQuant-Forschungsprogramme

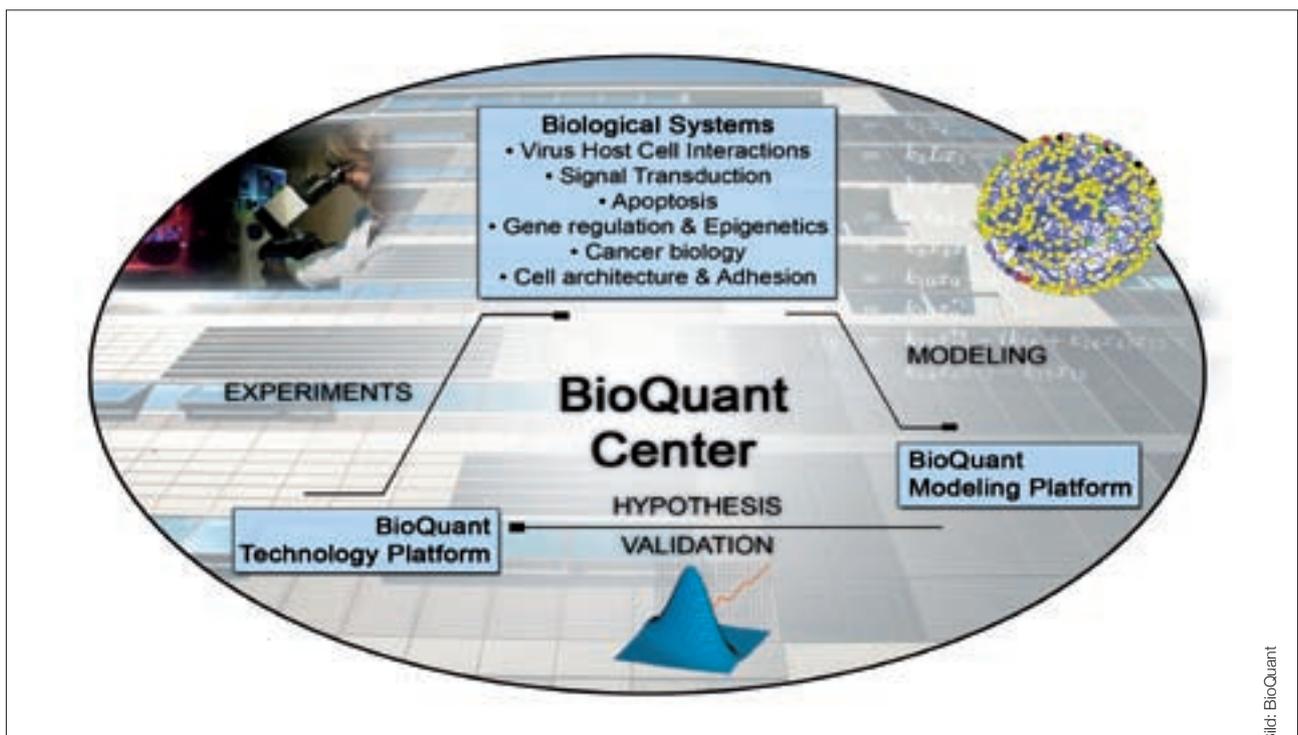


Bild: BioQuant

gelegt. Damals formierte sich im Zuge des von der Landesregierung Baden-Württemberg ausgeschriebenen Wettbewerbs zur Errichtung interdisziplinärer lebenswissenschaftlicher Zentren ein Disziplin- und Forschungsinstitutionen übergreifendes Netzwerk zum Thema „Quantitative Analyse zellulärer und molekularer Biosysteme (BioQuant)“. Die Universität Heidelberg bewarb sich erfolgreich um die Errichtung einer zentralen Struktur für dieses fächerübergreifende Netzwerk, das die international renommierten Forschungsschwerpunkte des Standortes, die molekularbiologische-biomedizinische Forschung und die Expertise im wissenschaftlichen Rechnen zusammenführt. Seit der feierlichen Übergabe im Frühjahr 2007 stehen mit dem BioQuant-Zentrum an der Universität Heidelberg nun rund 5.000 qm ausschließlich für die Forschung und Lehre in der Systembiologie zur Verfügung.

Diese Flächen sind in einem architektonisch exzeptionellen Gebäude untergebracht. Erst kürzlich wurde dem BioQuant-Zentrum der Hugo-Häring-Preis verliehen, mit dem der Landesverband Baden-Württemberg des Bundes Deutscher Architekten (BDA) vorbildliche Bauwerke in Baden-Württemberg auszeichnet. Mit zentralen Kommunikationsräumen unterstützt die Architektur den wissenschaftlichen Austausch zwischen den verschiedenen Disziplinen und bietet ideale Bedingungen für die experimentellen und theoretischen Forschergruppen des Zentrums.

Referenzen:

¹ Reiss, S., I. Rebhan, P. Backes, I. Romero-Brey, H. Erfle, P. Matulla, L. Kaderali, M. Pönisch, H. Blankenburg, M.-S. Hiet, T. Longe-rich, S. Diehl, F. Ramirez, T. Balla, K. Rohr, A. Kaul, S. Bühler, R. Pepperkok, T. Lengauer, M. Albrecht, R. Eils, P. Schirmacher, V. Lohmann, R. Bartenschlager (2010). Recruitment and activation of a lipid kinase by NS5A of the hepatitis C virus is essential for integrity of the membranous replication compartment. *Cell Host*

& *Microbe*, 9 (1): 32-45.

² Becker, V., Schilling, M., Bachmann, J., Baumann, U., Raue, A., Maiwald, T., Timmer, J., Klingmüller, U. (2010). Covering a broad dynamic range: information processing at the erythropoietin receptor. *Science* 328(5984):1404-1408.

³ Neumann, L., Pforr, C., Beaudouin, J., Pappa, A., Fricker, N., Krammer, P.H., Lavrik, I.N., Eils, R. (2010). Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol.* 6:352.

⁴ Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Höfer T. (2009). Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity* 30(5):673-83. Epub 2009 Apr 30.

⁵ Erdel, F., Schubert, T., Marth, C., Längst, G. and Rippe, K. (2010). Human ISWI chromatin-remodeling complexes sample nucleosomes via transient binding reactions and become immobilized at active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 19873-19878.

⁶ Weichsel, J., and Schwarz, U.S. (2010) Two competing orientation patterns explain experimentally observed anomalies in growing actin networks. *PNAS* 107, 14: 6304-6309.

Kontakt:

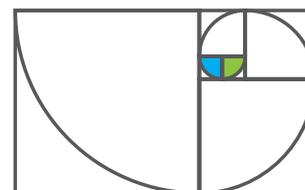
Dr. Angela Oberthür

Geschäftsführung BioQuant

Universität Heidelberg

angela.oberthuer@bioquant.uni-heidelberg.de

www.bioquant.uni-heidelberg.de



BioQuant
MODEL base of LIFE

das nikon imaging center der universität heidelberg

Kollaboration zwischen Forschung und Industrie im Bereich der modernen Lichtmikroskopie

von Peter Bankhead und Ulrike Engel

In der Lichtmikroskopie hat in den letzten 25 Jahren eine atemberaubende Entwicklung stattgefunden, so dass moderne Forschungsmikroskope nur noch wenig Ähnlichkeiten zu den Mikroskopen aufweisen, die jedermann aus dem Biologieunterricht kennt. So verwenden zum Beispiel die konfokalen Lasermikroskope einen gebündelten Laserstrahl, um lebende Zellen abzutasten. Am Computer entsteht dann aus dieser Information innerhalb weniger Sekunden ein vollständiges, dreidimensionales Bild. Diese heutzutage in der Forschung am häufigsten genutzten Mikroskope, wie auch die verwandten Spinning-Disk-Konfokal-Mikroskope, werden komplett computergesteuert, um Optik, Laser, Blenden und Detektoren zu synchronisieren (Abb. 1). Meist reicht dem Forscher lediglich ein kurzer Blick durch das Okular bevor er sich dem Computermonitor zuwendet. Um diese Technologien den Forschern auf dem Campus breit zugänglich machen zu können, wurde vor fünf Jahren das Nikon Imaging Center (NIC) der Universität Heidelberg (NIC@Uni-HD) gegründet.

Fluoreszenzmarkierung macht Zellbestandteile sichtbar

Sämtliche Mikroskope im NIC@Uni-HD basieren auf der Darstellung von Fluoreszenz. Da die Bestandteile von Tierzellen natürlicherweise nicht fluoreszieren, färben Forscher jene Bereiche, die sie erforschen wollen, mit Fluoreszenzfarbstoffen an. Da sich nur wenige Farbstoffe in lebende Zellen einschleusen lassen, sind Wissenschaftler auf Fluoreszenzfarbstoffe angewiesen, die von der Zelle selbst produziert werden. Obwohl die meisten Tierzellen keine fluoreszierenden Bestandteile besitzen, gibt es ein paar wenige Ausnahmen wie die lumineszierende Qualle *Aequoria victoria*. Wir verwenden als Fluoreszenzmarkierung ein bestimmtes Protein dieser Qualle namens „grün fluoreszierendes Protein“ (GFP, *green fluorescent protein*). Das erste bahnbrechende biologische Experiment, in welchem GFP die Nervenzellen des

Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* grün leuchten ließ, wurde in der Zeitschrift *Science* von Martin Chalfie's Labor 1998 veröffentlicht (Duggan *et al.*, 1998). Dank der darauffolgenden Entwicklungen gibt es heutzutage Fluoreszenzproteine in den Farben gelb, orange, rot und infrarot (Shaner *et al.*, 2007). Der Nobelpreis für Chemie wurde 2008 an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien (Ehrensprecher der ICSB 2011, siehe auch Seite 99) für die Identifizierung dieser fluoreszierenden Proteine und deren Weiterentwicklung für die Verwendung in der biologischen Forschung verliehen. Die Möglichkeit, Lebendzellbeobachtungen durchzuführen, verdanken wir dieser Entdeckung genauso wie der technischen Weiterentwicklung der Lichtmikroskope. In dem sie genetische Information (DNS) in Zellen einschleusen, können Wissenschaftler durch den Gebrauch dieser Farbpalette zelluläre Bestandteile im Mikroskop sichtbar machen. Die fluoreszierenden Proteine sind wie leuchtende Markierungen, die durch das entsprechende Experiment des Biologen einen einzelnen Bestandteil der Zelle hervorheben. Die Fluoreszenz wird durch das Einstrahlen energiereicheren Lichts in der Probe ausgelöst: grüne Fluoreszenz wird durch blaues Licht hervorgerufen, rote Fluoreszenz entsprechend durch grünes Licht.

In derart markierten Zellen können Forscher Bilderserien auf unterschiedlichen Fokusebenen über die Zeit aufnehmen. So entstehen vielfarbige, dreidimensionale Filme, die zeigen, wie dynamische Prozesse innerhalb der Zelle ablaufen. In Abbildung 2 ist eine grün markierte Zelle zu sehen, die eine kleinere rotmarkierte Hefezelle verschlingt. Dieses Bild wurde mit einem konfokalen Lasermikroskop in verschiedenen Fokusebenen über eine gewisse Zeit aufgenommen. Das Instrument hat sozusagen die Zelle immer wieder in viele „optische Schnitte“ zerlegt, ohne das Präparat tatsächlich zu zerschneiden. Mithilfe eines Computerprogramms werden die vertikalen Schnitte (Abb. 2B) oder beliebige Schnittebenen (Abb. 2C) zusammengesetzt. Dadurch kann klar bestimmt werden, ob die Hefezelle wirklich von der anderen Zelle einverleibt wurde oder sich lediglich einige Mikrometer hinter der anderen Zelle versteckt hat.

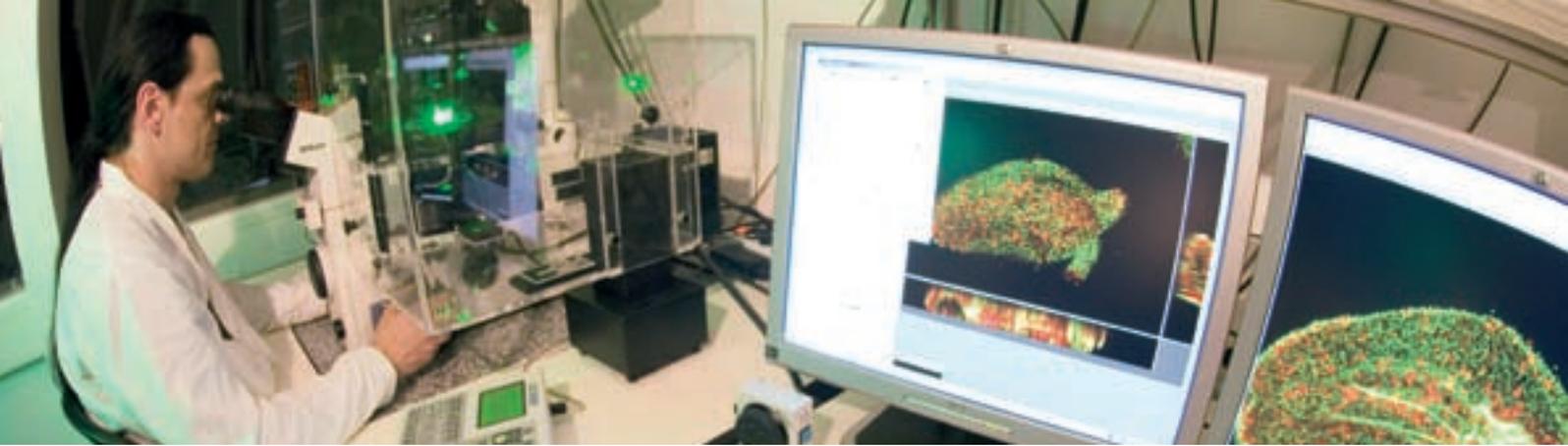


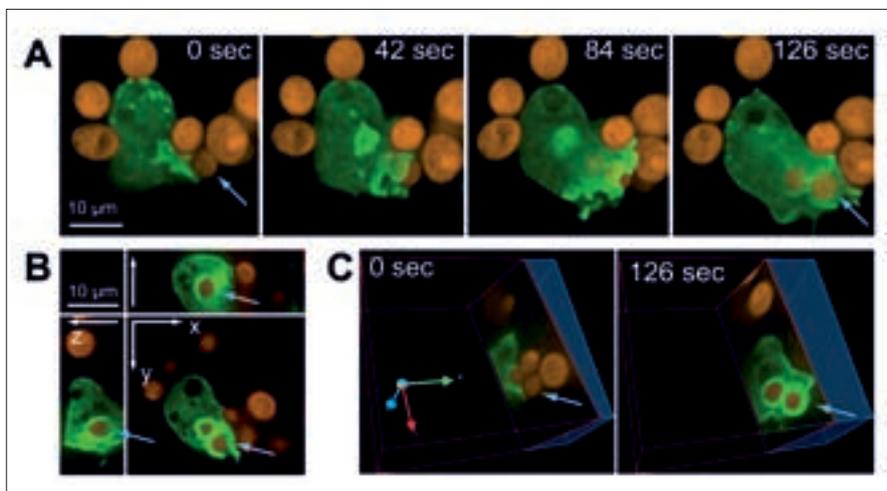
Abbildung 1: Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop im NIC@Uni-HD (Bild: Markus Winter).

Herausforderungen an die Lichtmikroskopie: Details in lebenden Zellen aufdecken

Tierzellen sind winzig klein: mit einem mittleren Durchmesser von etwa 0,02 mm sind sie zu klein, um mit dem bloßen Auge sichtbar zu sein. Nichtsdestotrotz erscheint das Innere der Zellen im Mikroskop feingegliedert, eingeteilt in Untereinheiten wie die Zimmer eines Hauses. Jede dieser Untereinheiten enthält weitere, noch kleinere Objekte und Maschinerien, deren Funktionen wir gerne untersuchen würden, um die Funktionsweise der Zelle zu verstehen. Die Frage ist also, wie viele dieser Details die Mikroskopie sichtbar machen kann. Im Gegensatz zur Hauswand, hindert die Zellmembran uns kaum daran, die Vorgänge im Zellinneren zu beobachten. Glücklicherweise ist die Zellmembran wie auch die Zelle insgesamt für fluoreszierendes Licht, das von den fluoreszierenden Farbstoffen erzeugt wird, mehr oder weniger transparent. Wenn man aber versucht, mit Licht immer kleinere Details darzustellen, stößt man bald auf ein grundlegendes Problem. Sämtliche Objekte, die kleiner als ein paar hundert Nanometer sind – was in etwa der Größenordnung der Wellenlänge von sichtbarem Licht entspricht – sehen irgendwann, ungeachtet ihrer wirklichen Form, wie ein kleiner diffuser Klecks aus. Auch eine weitere Erhöhung der Vergrößerung hilft hier nicht weiter:

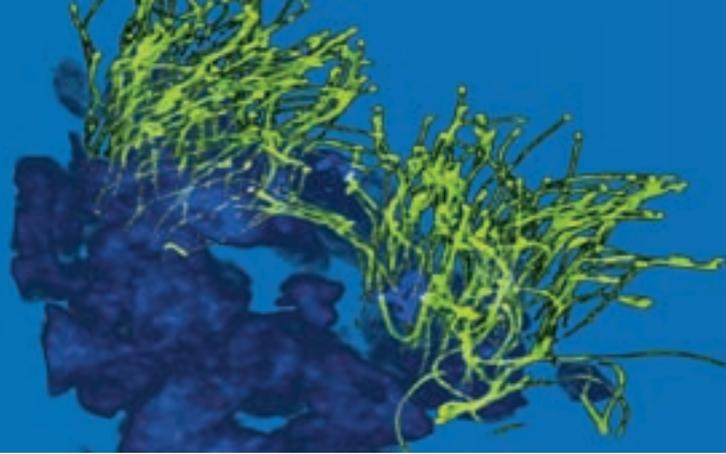
die sogenannte „Auflösungsgrenze“ ist erreicht. Das hindert uns daran, Details zu erkennen und führt unweigerlich dazu, dass die Bilder sehr kleiner Strukturen verschwommen aussehen. Kleine Bestandteile innerhalb der Zelle, die wir mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie abbilden, erscheinen deshalb unweigerlich unscharf. Andere Mikroskopiertechniken sind weit besser dafür geeignet, einzelne Strukturen aufzulösen. Das Elektronenmikroskop beispielsweise nutzt Elektronenstrahlen anstelle von Lichtstrahlen, um noch kleinere Strukturen abzubilden, die sich sogar nahe der molekularen Auflösung (Bruchteile von Nanometern) befinden. Es ist jedoch unmöglich, Lebendzellbeobachtung mittels Elektronenmikroskopie durchzuführen, da die Objekte vor der Aufnahme fixiert (und dadurch abgetötet) und in extrem dünne Scheiben geschnitten werden müssen. Auch wenn diese hohe Auflösung häufig erwünscht ist, ist sie nicht immer notwendig, um etwas zu verstehen. Hätten wir beispielsweise niemals zuvor eine Schere gesehen, könnten wir alleine aufgrund ihrer Form vermutlich kaum erraten, wozu sie benutzt werden kann. Wir würden aber ihre Funktion sofort erkennen, wenn wir ein verschwommenes Filmchen einer papierschneidenden Schere erhalten könnten, auch wenn die Form der Schere nicht klar auszumachen wäre.

Abbildung 2: Bildsequenz einer Zelle (*Dictyostelium*), die GFP exprimiert



Für jeden Zeitpunkt wurden 26 „optische Schnitte“ mit einem konfokalen Laser-Mikroskop aufgenommen. (A) die Bildsequenz zeigt, dass die Zelle innerhalb von zwei Minuten eine Hefezelle (rot) aufgenommen hat (Pfeil). (B) Senkrechte und Horizontale Ansichten des letzten Zeitpunkts. (C) Ein schräger Schnitt zeigt, dass die Hefezelle sich erst außerhalb, am Ende aber innerhalb der grünen Zelle befindet (Pfeil).

Bild: Ulrike Engel



Zilienbündel im Epithel eines Froschembryos. Mikrotubulifärbung in gelb, Kernfärbung in blau (Bild: Ulrike Engel).

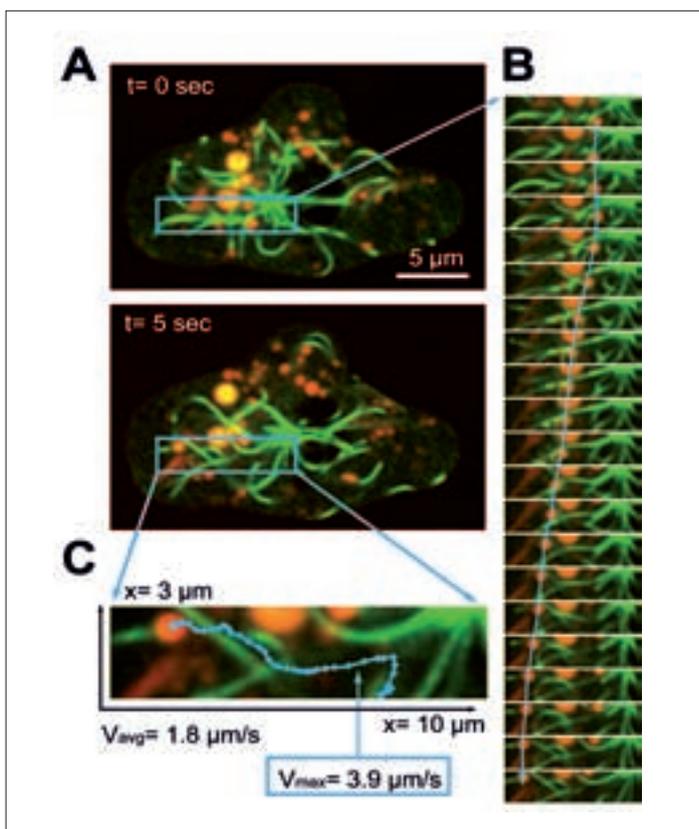
Einer der größten Vorteile der Lichtmikroskopie besteht sicherlich darin, lebende Zellen in Bewegung und Funktion aufzunehmen. Das stellt uns jedoch vor eine weitere technische Herausforderung: Wir müssen hohe Aufnahmegeschwindigkeiten erreichen, um wirklich schnelle Vorgänge aufzuzeichnen. Und schnelle Bewegungen sind in der Biologie mehr Regel als Ausnahme. Auch wenn man scheinbar reglos an einem Tisch sitzt, arbeiten, bewegen und teilen sich die Körperzellen dennoch unentwegt. Innerhalb der Zelle sind die Aktivitäten noch größer. So zeigt Abbildung 3 eine Zelle, die Partikel aufgenommen hat und diese nun in der Zelle hin und her transportiert. Diese als „Vesikel“ bezeichneten kleinen Nahrungspakete werden mit einer Geschwindigkeit von bis zu drei Mikrometer pro Sekunde transportiert. Das ist im Vergleich zur Geschwindigkeit eines Radfahrers mit 30 km/Std. zwar drei Millionen mal langsamer, bezogen auf einen solch kleinen Raum ist es jedoch extrem schnell: Um

diesen Vorgang sichtbar zu machen, benötigen wir deswegen für die Bilderfassung zehn Aufnahmen pro Sekunde. In den so entstandenen Filmen können wir dem Transport der Vesikel entlang der zellulären Transportstrecken (Mikrotubuli) folgen und dies mit spezialisierten Computerprogrammen auf Richtung und Geschwindigkeit analysieren (Abb. 3C).

Wo liegt die Zukunft: Lichtmikroskopie in Hochauflösung

In Zukunft gilt es, höhere Auflösungen und schnelle Lebendbeobachtung zu vereinen. Die Entwicklung der vergangenen fünf Jahren hat komplexe Techniken hervorgebracht, die es uns nun erlauben, die oben erwähnte Auflösungsgrenze hinter uns zu lassen und kleinere Details in lebenden Zellen zu beobachten (Chi *et al.*, 2009). Diese Techniken werden deswegen oft als Superresolutions-Mikroskopie bezeichnet, und sämtliche großen Mikroskopieher-

Abbildung 3:



Eine Zelle, in der die Mikrotubuli mit GFP grün markiert sind, hat rotmarkierte Partikel aufgenommen. (A) Innerhalb von nur 5 Sekunden haben sich beide Bestandteile in der Zelle bewegt. (B) Ein Ausschnitt zeigt, dass sich die Bewegung einzelner Vesikel entlang der Mikrotubuli verfolgen lässt. (C) Mit Hilfe eines Computerprogramms kann Richtung und Geschwindigkeit analysiert werden.

Bild: Ulrike Engel

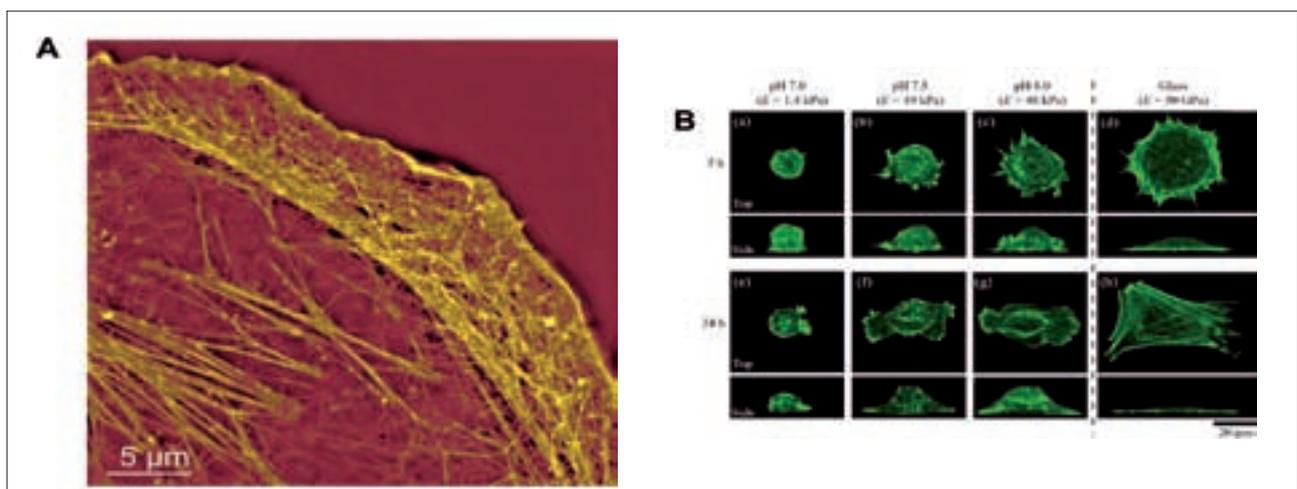
steller sind dabei, Forschern diese Art von Instrumenten verfügbar zu machen. Nikon hat zwei neue Arten von Superresolution-Mikroskopen auf den Markt gebracht: STORM und SIM, die sich unterschiedliche Prinzipien zu Nutzen machen. Während STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) auf der Bildgebung von Einzelmolekülen beruht, um Hochauflösung durch Aufnahme von 10.000-100.000 Bildern zu erhalten, bedient sich SIM (*structured illumination microscopy*) einem gestreiften Belichtungsmuster, um kleine Details in den „sichtbaren“ Bereich der Lichtmikroskopie zu transportieren. Nikon installierte sein erstes SIM 2010 im NIC@Uni-HD im Bioquant Heidelberg. Auch wenn noch immer viele Optimierungen nötig sind, können wir jetzt Bilder von Zellen aufnehmen, die weniger verschwommen sind und wesentlich detailreicher sind, als es bisher möglich war (Abb. 4A).

Zahlen und Fakten des Nikon Imaging Centers der Universität Heidelberg (NIC@Uni-HD)

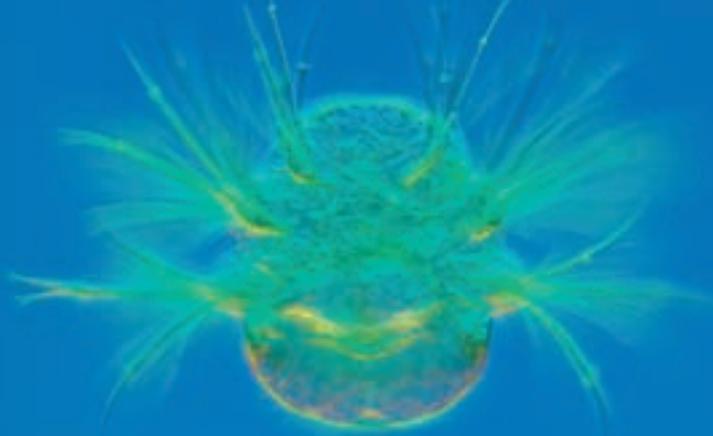
Die Ausstattung für moderne Lichtmikroskopie (*Advanced Light Microscopy*) ist aufwendig und erweist sich für ein Einzellabor oft als zu kostspielig. Andererseits haben diese Mikroskope ein sehr breites Einsatzgebiet in der Forschung an isolierten Zellen, in der Entwicklungsbiologie und Bereichen der medizinischen

Forschung. Der Zweck des NIC@Uni-HD ist es deshalb, Wissenschaftlern den Zugang und die Nutzung dieser modernen Mikroskope zu ermöglichen. Das NIC@Uni-HD wurde 2005 als eine zentrale Einrichtung der Universität Heidelberg gegründet und ist eine Kollaboration zwischen Industrie und Universität. Diese neue Art, Forschern die innovativsten Technologien zugänglich zu machen, wurde von Professor Thomas Holstein (COS – Center for Organismal Studies, Universität Heidelberg) und Jörg Kukulies (Nikon Messtechnik, Deutschland), in Anlehnung an das bereits existierende NIC an der Harvard Medical School Boston, ins Leben gerufen. Nikon steuert in dieser Kollaboration die neuesten Mikroskope bei, die Universität stellt das notwendige Personal und die Räumlichkeiten. Weitere Firmen beteiligen sich mit Kameras, Filtern und mit komplementärer konfokaler Technologie. Das NIC@Uni-HD ist die erste zentrale Lichtmikroskopieeinheit auf dem Heidelberger Campus, an der Forscher Mikroskope selbst buchen und nutzen können. Dieser Zugang wird nach einem oder zwei Trainings durch die Mitarbeiter des NICs gewährt. Diese beraten auch die Wissenschaftler in der Wahl des Mikroskops: Die Anzahl der Mikroskope hat sich von anfänglich fünf schnell verdoppelt und die meisten dienen unterschiedlichsten Einsatzgebieten. Es sind zwei Laser-Scanning-Konfokalmikro-

Abbildung 4:



(A) Super-Resolutionsaufnahme einer Epithelzelle, in der das Aktinzytoskelett gefärbt ist; gut sichtbar sind insbesondere die feinen Aktinbündel nach der Wachstumsfront. Das Bild wurde mit dem Nikon Structured Illumination Microscope (N-SIM) aufgenommen. (B) Anheftung von Epithelzellen an Material unterschiedlicher Steifheit nach 3 Stunden (a-d) und 24 Stunden (e-h). Die Abbildung B erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Journal of the American Chemical Society.



Larve von *Platyneris* (mariner Wurm) in Differential-Interferenz-Kontrast dargestellt (Bild: Ulrike Engel).

skope, zwei Spinning-Disk-Konfokalmikroskope, zwei aufrechte Fluoreszenzmikroskope, ein Mikroskop für TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), zwei inverse Fluoreszenzmikroskope für Multipoint-Lebendzellmikroskopie und das oben erwähnte N-SIM für Superresolution verfügbar. Innerhalb der letzten fünf Jahre wurden insgesamt 600 Wissenschaftler an den Mikroskopsystemen von den vier NIC-Mitarbeitern angelernt, was bisher in mehr als 100 Publikationen mündete. Die Forschungsprojekte erstrecken sich auf ein weites Feld und beinhalten z.B. die Analyse menschlicher Erkrankungen, die Erforschung der Wanderung von Nervenzellen während der Gehirnentwicklung, die Bedeutung von Kalziumwellen in der zellulären Signaltransduktion sowie die Polarisierung von Zellen und deren Teilung. Sogar die Bindung zwischen Proteinen kann lichtmikroskopisch dargestellt werden. Die Mikroskopie ist in keinem Fall das einzige Werkzeug, das zur Erforschung und dem Verständnis eines Mechanismus führen kann, aber in Kombination mit der Molekularbiologie, der Biophysik und der Biochemie können intelligente Versuche entwickelt werden, um zu beweisen, dass ein Protein wie eine Schere in einer Zelle wirken kann, oder dass eine Komponente für das Ziehen der Spindel in die Tochterzellen verantwortlich ist. Abbildung 4B zeigt beispielsweise wie chemisches Design in der Biologie uns helfen kann, zu verstehen, wie Zellen sich am Untergrund fest halten. Auf einem weichen Untergrund können sich Zellen nicht anheften, wird jedoch dessen Festigkeit durch Veränderung des pH-Wertes erhöht, flacht sich die Zelle ab und verbindet sich mit dem Untergrund (Yoshikawa *et al.*, 2011).



Das NIC-team: Nicolas Dross, Christian Ackermann, Peter Bankhead, Astrid Marx, Ulrike Engel (von links oben nach rechts unten).

Das Nikon Imaging Center erlaubt es Wissenschaftlern, deren Fachkompetenz sich nicht auf bildgebende Verfahren bezieht, zur Lösung komplexer Fragestellungen von der modernen Mikroskopie Gebrauch zu machen. Die innovative Instrumentierung ist eines der notwendigen Bestandteile des Zentrums, die Fachexpertise im Zentrum selbst, bezüglich der Anwendung und der Planung der Experimente, ist die andere wichtige Voraussetzung.

Danksagung:

Wir danken Thomas Holstein, COS – Center for Organismal Studies der Universität Heidelberg, für die Gründung des NIC, und Günther Gerisch, MPI München, für das Bereitstellen von Zellen und die Abwicklung der *Dictyostelium*-Experimente, sowie Nikon und der DFG für ihre fortlaufende Unterstützung.

Referenzen:

- Chi, K. R. (2009). Microscopy: Ever-increasing resolution. *Nature* 462, 675-8.
- Duggan, A., Ma, C. and Chalfie, M. (1998). Regulation of touch receptor differentiation by the *Caenorhabditis elegans* *mec-3* and *unc-86* genes. *Development* 125, 4107-19.
- Shaner, N. C., Patterson, G. H. and Davidson, M. W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 120, 4247-60.
- Yoshikawa, H. Y., Rossetti, F. F., Kaufmann, S., Kaindl, T., Madson, J., Engel, U., Lewis, A. L., Armes, S. P. and Tanaka, M. (2011). Quantitative evaluation of mechanosensing of cells on dynamically tunable hydrogels. *J Am Chem Soc* 133, 1367-74.

Kontakt:

Dr. Ulrike Engel

Nikon Imaging Center
Bioquant, Universität Heidelberg
ulrike.engel@bioquant.uni-heidelberg.de
www.nic.uni-hd.de

Prof. Dr. Thomas Holstein

COS-Center for Organismal Studies
Universität Heidelberg
holstein@uni-hd.de

SPONSORED BY THE



Federal Ministry
of Education
and Research

NGFN

National Genome
Research Network

4th Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer

26th - 28th September 2011 - Berlin, Urania

PROGRAM OF MEDICAL GENOME RESEARCH

Main Topics:

- Genomics of CNS Disorders
- Genomics of Cardiac Disease & Metabolism
- Genomics of Cancer
- From Genomics to Application
- Genomics of Infection, Inflammation & Environmental Interaction
- **Satellite Symposium**
Next-Generation Sequencing
- **Poster Session**
- **Company**
Satellite Sessions
Exhibition

www.ngfn-meeting.de/2011

10
JAHRE
NGFN

TAG DER
GENOMFORSCHUNG
2011

26. SEPTEMBER 2011
URANIA, BERLIN

www.ngfn.de

Genomforschung
zum Verstehen und Anfassen für Jedermann

HIGHLIGHTS DER GENOMFORSCHUNG
EXPERTEN IM PRESSEGESPRÄCH
PODIUMSDISKUSSION
BÜRGERDIALOG

GENOMFORSCHUNG IN DEINER HAND - EXPERIMENTE

mikroskopie auf höchstem level

Das Life Imaging Center (LIC) im Zentrum für Biosystemanalyse (ZBSA) der Universität Freiburg

von Roland Nitschke

Die Lichtmikroskopie entwickelte sich in den letzten 25 Jahren durch den Einsatz neuer Beleuchtungs- und Detektionsverfahren und den sich daraus ergebenden experimentellen Möglichkeiten zu einer der wichtigsten Methoden in den Lebenswissenschaften. Die heutigen optischen Technologien erlauben, oft unter Verwendung von Markierungen mit fluoreszierenden Proteinen, ungeahnte Einblicke in biologische Details und Mechanismen. Der Ablauf vieler biologischer Vorgänge konnte durch die räumlich und zeitlich hochaufgelöste Bildaufzeichnung erstmals erfasst werden und wurde durch nachfolgende Analyse in einigen Fällen auch mathematisch modelliert. Die Aufklärung und das Verständnis auch komplexer Signalerschaltungen konnte so deutlich verbessert werden.

Problematisch beim Einsatz der neuen optischen Technologien sind der dafür nötige technische Aufwand und die Komplexität ihrer Anwendung und der Auswertung des Bildmaterials. Nur gut ausgebildete und betreute Wissenschaftler können das Potential voll nutzen, deshalb werden die Techniken manchmal sowohl unter- als auch überschätzt oder wegen der Komplexität nicht berücksichtigt. Nicht immer ist vorhersehbar, welche Technik zum optimalen Ergebnis führen wird. Die Anschaffung von modernen, spezialisierten Mikroskopen für ein einzelnes Labor ist nur bei einer längerfristigen Auslastung denkbar und sinnvoll. Daher ist die Zusammenfassung von Mikroskopietechniken in fach- und fakultätsübergreifenden „Core Facilities“ angebracht.

Das Life Imaging Center (LIC) in Freiburg wurde 2001 von Roland Nitschke und Wolfgang Driever als Einrichtung des Sonderforschungsbereichs 592 etabliert. 2008 zog das LIC mit anderen zentralen Einrichtungen für Genomik, Proteomik und Metabolomik in das Zentrum für Biosystemanalyse (ZBSA), das gemeinsam vom Rektorat, den Fakultäten der Lebenswissenschaften sowie der technischen Fakultät getragen wird.

Ausrüstung auf neuestem Stand

Auf 400 m² stehen neun konfokale Mikroskope, auch für speziellere Methoden (2-Photonen, High-Speed, Photomanipulation und Aktivierung, Spinning Disk, Laserablation, Multi-Position) und sieben Weitfeld-Mikroskope für Ratio-Imaging, FRET, TIRF und Langzeit-Aufnahmen zur Verfügung. Ein Computerlabor mit zwölf Workstations, Bildanalyse- und Visualisierungs-Software, und weiteren acht Plätzen ermöglicht die Analyse bis zur Publikationsreife, sowie die Durchführung von internen Schulungen und Kursen mit Industriepartnern. Am LIC sind neben dem Leiter derzeit fünf Mitarbeiter (Informatiker und TAs) auf 3,5 Vollzeit-Stellen beschäftigt.

Nutzung, Expertisen und Training

Das LIC hat 295 Nutzer aus allen naturwissenschaftlichen Fakultäten. Es ist auch für Nutzer anderer Universitäten offen, soweit diese in gemeinsamen Projekten mit Forschungsgruppen aus Freiburg arbeiten. Die durchschnittliche Auslastung der Geräte in der Facility liegt bei über 80%. Viele Nutzer des LIC arbeiten mit lebenden Organismen oder Zellkultursystemen, die in der Entwicklungsbiologie, der Zellsignalforschung und der Systembiologie Verwendung finden. Beispiele hierfür sind Modellorganismen wie Zebrafisch, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *Xenopus*, *C. Elegans* oder Maus, verschiedene Pflanzenteile (Wurzel, Blatt, Knospe) sowie Zellen aus Primär- und Dauerkulturen und Zellclustern (Zysten, Biopsien, Hirnschnitte). Die meisten Geräte im LIC sind auf Langzeitbeobachtung von bis zu zehn Tagen (auch Zellkulturen unter Flussbedingungen) (Abb. 1; Boehlke *et al.*, 2010), großflächige hochauflösende Bildaufnahmen (Abb. 2; Tay *et al.*, 2011; Emmenlauer *et al.*, 2009), Objekterkennung und Verfolgung (Lienkamp *et al.*, 2010), sowie die dafür erforderliche Automatisierung spezialisiert. Über die BIOSS Toolbox, das Ressourcen und Informations-Zentrum des Exzellenzclusters BIOSS (EXC 294) stehen den Nutzern über 150 fluoreszierende Proteine für ihre Experimente zur Verfügung. Seit 2002 wurden mehr als 285 Nutzer im einwöchigen Kurs „Advanced Imaging Techniques in Microscopy“ in Theorie und Praxis der High-End Mikroskopie eingeführt. Die Finanzierung des LIC wird durch die Universität, den SFB 592

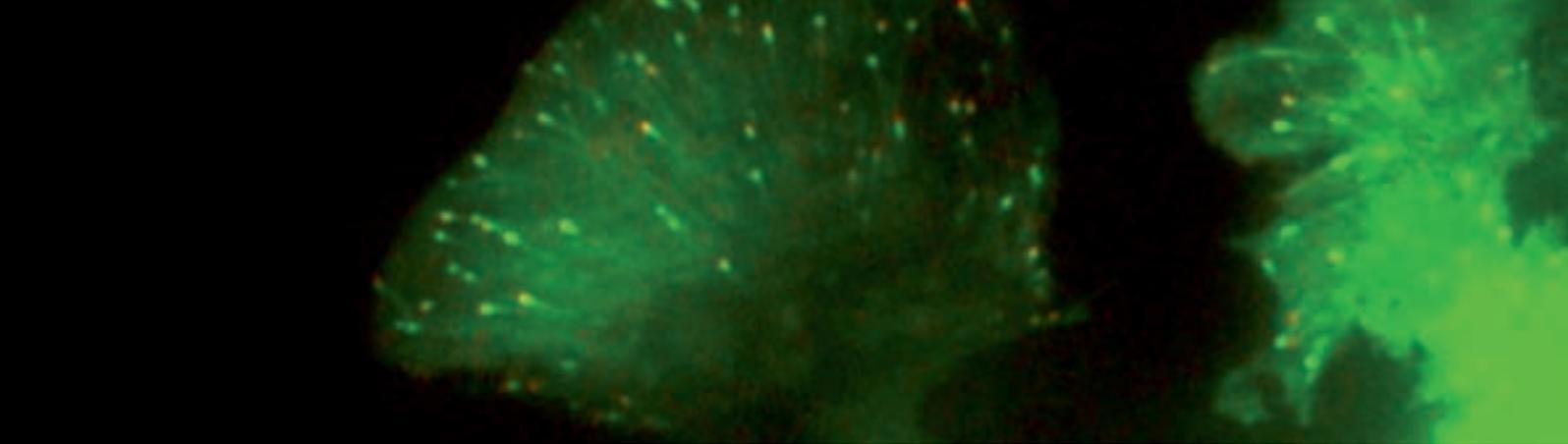


Abbildung 1: Visualisierung des Wachstums von Microtubuli mittels TIRF.

Time-Differenz-Bild aus einer Zeitserie mit stabil transfizierten EB-1 YFP MDCK Zellen. Die gewachsene Distanz ist rot eingefärbt (C. Böhlke, Med. Klinik IV, Universität Freiburg).

und das BIOS-Exzellenzcluster getragen. Neue Geräte werden über Förderanträge von Gruppen oder einzelnen Forschern beschafft, die dann die Geräte an das LIC übertragen.

Erfolgreich durch Vernetzung

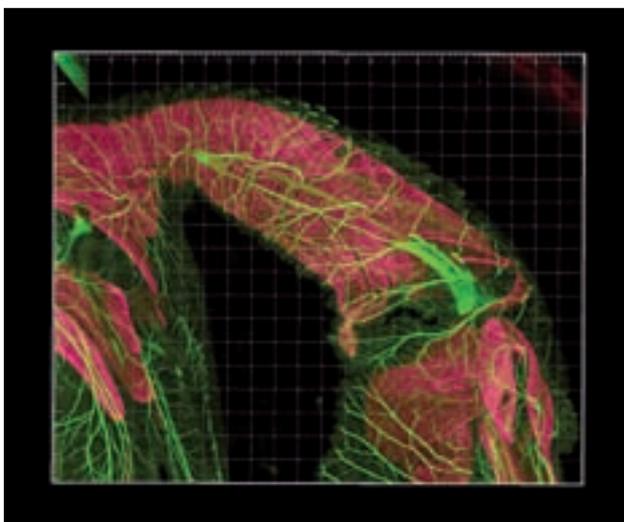
Im BIOS-Exzellenzcluster arbeitet das LIC mit der 11. Technischen Fakultät an neuen, intelligenten Mikroskop-Systemen (4D-Analyzer), die Mikrofluidik, Automatisierung und Bildverarbeitung integrieren. Die erfolgreiche Zusammenarbeit mit der biologischen und der medizinischen Fakultät spiegelt sich in zahlreichen, gemeinsamen, hochrangigen Publikationen (Referenzen 1-5) wider. Kollaborationen bestehen mit den Imaging Facilities des Max-Planck-Instituts in Freiburg und dem Friedrich-Miescher-Institut in Basel. Das LIC ist Mitglied der Europäischen Lichtmikroskopie-Initiative (ELMI) und assoziierter Partner in Euro-BioImaging. Roland Nitschke ist mit Elisa May deutscher Koordinator für EuroBioImaging und das in 2010 gegründete deutsche BioImaging Netzwerk (<http://bioimagingde.org>). Das LIC unterhält langjährige Partnerschaften mit Firmen wie Carl

Zeiss MicroImaging (Jena, Göttingen) und ibidi GmbH (München). Mit der Bundesanstalt für Materialforschung, Fluka und Schott wurden Tools zur Kalibrierung von Fluoreszenzmikroskopen entwickelt und patentiert (Resch *et al.*, 2008).

Referenzen:

- Boehlke,C., Kotsis,F., Patel,V., Braeg,S., Voelker,H., Bredt,S., Beyer,T., Janusch,H., Hamann,C., Godel,M., Muller,K., Herbst,M., Hornung,M., Doerken,M., Kottgen,M., Nitschke,R., Igarashi,P., Walz,G., and Kuehn,E.W. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat. Cell Biol.* 12, 1115-1122.
- Emmenlauer,M., Ronneberger,O., Ponti,A., Schwarb,P., Griffa,A., Filippi,A., Nitschke,R., Driever,W., and Burkhardt,H. (2009). XuvTools: Free, fast and reliable stitching of large 3D datasets. *J. Microsc.* 233, 42-60.
- Lienkamp,S., Ganner,A., Boehlke,C., Schmidt,T., Arnold,S.J., Schafer,T., Romaker,D., Schuler,J., Hoff,S., Powelske,C., Eifler,A., Kronig,C., Bullerkotte,A., Nitschke,R., Kuehn,E.W., Kim,E., Burkhardt,H., Brox,T., Ronneberger,O., Gloy,J., and Walz,G. (2010). Inversin relays Frizzled-8 signals to promote proximal pronephros development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 20388-20393.
- Resch-Genger,U., Grabolle,M., Cavaliere-Jaricot,S., Nitschke,R., and Nann,T. (2008). Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* 5, 763-775.
- Tay,T.L., Ronneberger,O., Ryu,S., Nitschke,R., and Driever,W. (2011). Comprehensive catecholaminergic projectome analysis reveals single-neuron integration of zebrafish ascending and descending dopaminergic systems. *Nat. Com.* 2, 171.

Abbildung 2: Konfokaler 3D Stapel eines 7 Tage alten Hühnchen Embryos



Immunfluoreszenzfärbung (grün: Nervenzellen, rot: Muskelzellen) Größe des Datensatzes 32 GB mit 100 Teilbildern mit jeweils 160 z-Ebenen (R. Nitschke, LIC und S. Theiss, UCL London)

Kontakt:

Dr. Roland Nitschke

Life Imaging Center, Zentrum für Biosystemanalyse (ZBSA)

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Roland.Nitschke@biologie.uni-freiburg.de

www.imaging.uni-freiburg.de

auf den spuren des pflanzenwachstums

Neue Mikroskopietechnik macht molekulare Prozesse der Wurzelbildung sichtbar

von Klaus Palme, Bingshan Wang, Franck Ditengou, Roland Nitschke, Alexander Dovzhenko, Rainer Uhl und Olaf Ronneberger

Genetische Verfahren stellen unverzichtbare Werkzeuge bei der Aufklärung komplexer biologischer Signalprozesse dar. Ihr Defizit bei der Entschlüsselung der exakten Reaktionsmechanismen im dreidimensionalen Umfeld macht es jedoch notwendig, als ergänzende Untersuchungsmethode die Lichtmikroskopie einzusetzen. Mit der „4D Analyzer“-Plattform gelangen neue, herausragende Einsichten in die dreidimensionalen molekularen Netzwerke der Zellen. Wir nutzen als Modellsystem Wurzeln der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, um das Wechselspiel zwischen Umweltsignalen und endogenen Entwicklungsprogrammen bei der Neubildung von pflanzlichen Organen zu untersuchen.

Im Gegensatz zu Säugetieren, deren Organentwicklung auf ein kurzes Zeitfenster innerhalb der Embryonalentwicklung beschränkt ist, bilden Pflanzen während ihrer gesamten Lebenszeit neue Organe. So können sie sich an kontinuierlich verändernde Umweltbedingungen anpassen, das Sonnenlicht als Energiequelle optimal nutzen und mit ihren Wurzeln das Erdreich nach Nährstoffen

Abbildung 1: Mechanische Stimulierung der *Arabidopsis*-Wurzelspitze durch Biegen mit einer Pinzette induziert die Bildung von Seitenwurzeln



und Wasser durchsuchen. Wie aber induzieren Umweltsignale die Neubildung von Seitenwurzeln und welche regulatorischen Prozesse liegen diesem Wachstumsprozess zugrunde? Wir haben einen kombinierten Ansatz aus Genetik, Biochemie, bildgebenden Verfahren, Informatik und systembiologischer Modellierung entwickelt, um diese molekularen Mechanismen zu verstehen.

Es ist schon lange bekannt, dass mechanische Kräfte eine entscheidende Rolle in der pflanzlichen Organbildung spielen. Wachsende Wurzeln tasten das Erdreich ab, können um Steine herum und in Spalten hinein wachsen. Dabei bestimmen mechanische Reize das Wachstum und erlauben die Bildung neuer Wurzeln. Seit mehr als 100 Jahren gibt es davon bemerkenswert detaillierte Beschreibungen (z. B. Darwin, 1880; Noll, 1900). Die molekularen Mechanismen hinter diesen Prozessen konnten wir jedoch erst jetzt durch innovative Mikroskopietechniken entschlüsseln (Teale *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010). Die Entwicklung der „4D Analyzer“-Plattform und informatische Verfahren zur 4-dimensionalen Zellanalytik spielen dabei eine wichtige Rolle. Es gab bislang keine überzeugenden molekularen Beweise für die Umprogrammierung pflanzlicher Entwicklung durch mechanische Kräfte. Erste Hinweise kamen aus der lokal-induzierbaren Expression des Proteins Expansin, welches normalerweise nur die Zellstreckung steuert. Überraschenderweise führte die lokale Produktion des Expansins nicht zur erwarteten Zellstreckung, sondern zur Bildung eines neuen Blattes (Pien *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass Veränderungen in der Biomechanik der Zellteilungszone an den Sprossspitzen zur Bildung eines neuen Organs führen können. Wir haben nun mit molekularen, genetischen und optischen Verfahren nachgewiesen, dass durch die mechanische Biegung von Wurzelspitzen die Anlage von Seitenwurzeln induziert wird (Abb. 1).

Einblicke in die Architektur der beteiligten Gennetzwerke

Die Seitenwurzelentwicklung wird von der koordinierten Expression vieler Gene bestimmt. Microarray-Analysen des zeitlichen Verlaufs der Genexpression in Seitenwurzeln dokumen-

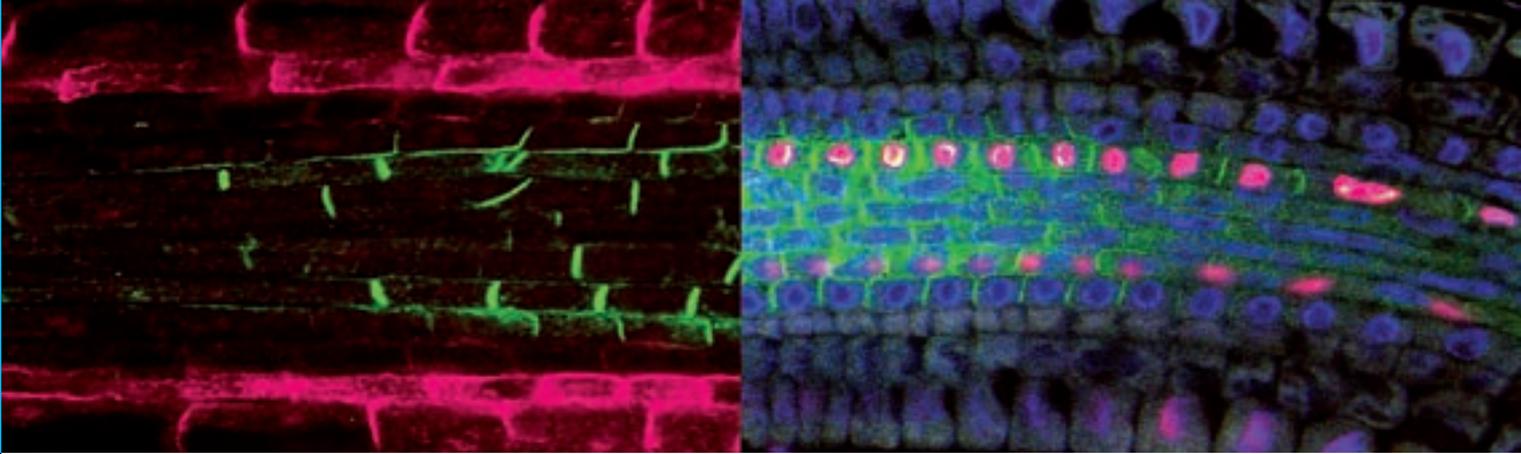
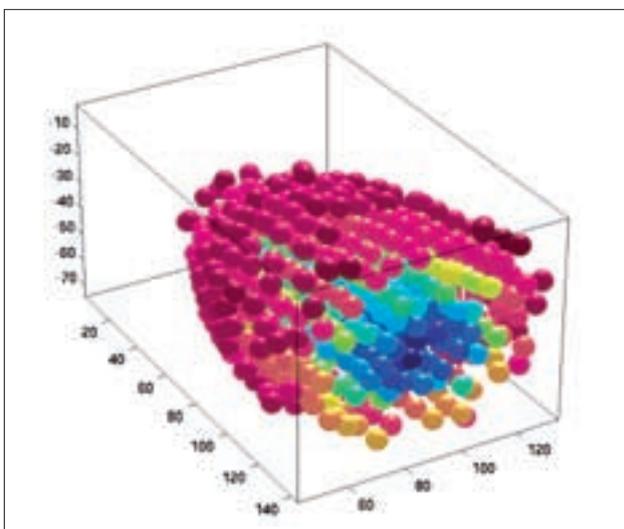


Abbildung 3: Lokalisierung der polar lokalisierten Proteine PIN1 (grün) und PIN2 (rot) in mechanisch gekrümmten *Arabidopsis*-Wurzeln (A). Durch die Umordnung der PIN-Proteine kommt es zu einem mikroskopisch nachweisbaren Stau des Hormons Auxin, der mithilfe eines rosa gefärbten Auxinreporters in transgenen Linien, die das Konstrukt PIN1::PIN1- GFP, pDR5rev::3XVenus-N7 enthalten, nachgewiesen werden kann (Copyright: PNAS).

Proteinen sowie die zeitliche und räumliche Skalierbarkeit einzelner Reaktionsschritte über viele Zellen mit meist schnellem Informationsaustausch aus. Schnapsschüsse wie die hier beschriebene Reaktion auf mechanische Reize geben einen ersten Einblick in das komplexe Reaktionsgeschehen, bilden aber die Signalvorgänge nur unvollständig ab. Einzig dynamische, bildgebende Verfahren können eine nahezu ungestörte Beobachtung und Analyse von Lebensprozessen in einzelnen Zellen leisten. Innovative optische Verfahren sind daher notwendig, um komplexe Lebensprozesse und Reaktionskaskaden besser verstehen zu können. Die enge Verbindung von Molekularbiologie und optischer Gerätetechnologie ermöglichte es uns, neue Verfahren zu entwickeln und in eine innovative Lichtmikroskopie-Plattform zu integrieren. Diese „4D Analyzer“ genannte automatisierte Mikroskop-Plattform kombiniert die räumlich (3D) und zeitlich (+1D) aufgelöste Bildaufnahme mit automatisierter intelligenter Bildauswertung. Im Vordergrund steht die vollautomatische Durchführung von Experimenten mit lebenden Zellen in Echtzeit, mit höchster Aufnahmegeschwindigkeit bei minimierter Probenschädigung und einem

maximalen Probendurchsatz für ein breites Spektrum von Anwendungen, die bisher mehrere Messstände erforderlich machten. Das integrierte Design ermöglicht Umschalten zwischen verschiedenen Anwendungen wie FRET, FRAP, strukturierter Beleuchtung, TIRF und Weitfeld-Fluoreszenz innerhalb von Millisekunden und kombiniert diese mit Online-Analysen und Schnittstellen für die Bild-Nachbearbeitung und Visualisierung von mehrdimensionalen Datensätzen. Die resultierende, bis dahin unerreichte Leistung des voll automatisierten Systems ermöglicht die Erfassung und Visualisierung zellulärer Strukturen und Funktionen in Echtzeit und die räumliche 3D Visualisierung von Molekülen in den Signalkaskaden, in die sie involviert sind. Nach Abarbeitung komplexer Messprotokolle an einer Vielzahl von Stellen in der Probe ist es möglich, mit hoher Reproduzierbarkeit wieder an beliebige Punkte in der Probe zurückzukehren und dadurch an vielen Stellen parallele Langzeitbeobachtungen durchzuführen. 3D- und 4D-Mustererkennungsalgorithmen in Verbindung mit selbstlernenden Strategien für intelligente Segmentation ermöglichen eine statistisch untermauerte, quantitative Analyse von Datensätzen (Schulz *et al.*, 2006). Dies führte zur Entwicklung eines intrinsischen Koordinatensystems der *Arabidopsis*-Wurzel und ermöglicht den direkten quantitativen Vergleich der Zellen verschiedener Wurzeln (Schmidt, Pasternak *et al.*, 2011; in Vorbereitung – Abb. 4).

Abbildung 4: Visualisierung der Zellkerne in der Spitze der *Arabidopsis*-Wurzel



Copyright Springer-Verlag

Bei der Konzeption der „4D Analyzer“-Plattform achteten wir darauf, die Probenbelastung durch das Beobachtungslicht in jeder Phase der Messungen minimal zu halten. Nur so konnten wir sicherstellen, dass keine Artefakte beobachtet werden und dass die Proben auch bei Langzeitbeobachtungen in einem möglichst nativen Zustand verbleiben. In diesem Zusammenhang gilt es jedoch eine Art „biologische Unschärferelation“ zu beachten: jede Beobachtung eines biologischen Systems stellt eine Beeinträchtigung dieses Systems dar, und diese Beeinträchtigung nimmt mit zunehmender Messgenauigkeit und mit zunehmender Zeitauflösung zu. Beispielsweise ergibt zwar eine konfokale Messung, d.h. die Ausleuchtung eines kleinen Ausschnitts der Probe durch einen wandernden Lichtpunkt, eine bessere 3D-Auflösung als

eine Weitfeldmessung, bei der das ganze Probenfeld weitflächig ausgeleuchtet wird. Je mehr man die konfokale Messung jedoch beschleunigen möchte, umso höher wird die Lichtbelastung der Probe. In Zukunft muss deshalb daran gearbeitet werden, neue Konzepte zu erarbeiten, mit deren Hilfe sich die Auflösung des Konfokalmikroskops mit der Geschwindigkeit von Weitfeldmessungen kombinieren lässt.

Nicht nur für Pflanzen stellt die „4D Analyzer“-Mikroskopplattform ein bahnbrechendes neues Werkzeug dar. Wir gehen davon aus, dass dieses Verfahren in vielen Bereichen als diagnostisches Instrument einsetzbar sein wird, in denen das quantitative Sichtbarmachen von molekularen Prozessen in der Zelle eine neue Ebene der Erforschung biologischer Systeme eröffnet.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Projektname: „4D cell analysis - Quantitative 3D and 4D cell analysis in living organisms – novel instrumentation, computational tools, proof of concept applications“ ist ein Forschungsprojekt im Rahmen des BMBF-Förderprogramm „Neue Methoden in der Systembiologie“ im Rahmenprogramm „Biotechnologie - Chancen nutzen und gestalten“, Koordinator: Klaus Palme.

„AUTOSCREEN“ für zellbasierte High-Throughput- und High-Content-Genfunktionsanalysen und Wirkstoffscreens. 6. EU-Rahmenprogramm Priority LifeSciHealth, www.autoscreen.eu.

BIOSS - Centre for Biological Signalling Studies (Forschungszentrum gefördert aus der Exzellenzinitiative der Deutschen Forschungsgemeinschaft (EXEC 297))

www.bioss.uni-freiburg.de.

FRISYS – Freiburg Initiative for Systems Biology,

www.frisys.biologie.uni-freiburg.de.

FORSYS-Forschungseinheiten der Systembiologie gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung, www.forsys.net.

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg – Zentrum für Biosystemanalyse ZBSA, www.zbsa.uni-freiburg.de.

Referenzen:

Darwin, C and Darwin, F. (1880). *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London.

Ditengou *et al.* (2008). Mechanical induction of de novo lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 18818-18823.

Noll, F. (1900). Über den bestimmenden Einfluss von Wurzelkrümmungen auf Entstehung und Anordnung der Seitenwurzeln. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 29: 361–426.

Paponov *et al.* (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*. 1: 321-337.

Pien *et al.* (2001). Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 11812–11817.

Santos *et al.* (2010). Modeling polar auxin transport in developmental patterning. *Plant Biology* 12: 3-14.

Schulz *et al.* (2006). Fast scalar and vectorial gray-scale based invariant features for 3D cell nuclei: localization and classification. *Lect. Notes Comp. Sci.* 4174: 182-194.

Teale *et al.* (2008). Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Mol. Plant*. 1: 229-237.

Teale *et al.* (2006). Auxin in action: signaling, transport and the control of plant growth. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847-859.

Kontakt:

Prof. Dr. Klaus Palme

Abteilung für molekulare Pflanzenphysiologie

Fakultät für Biologie

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

klaus.palme@biologie.uni-freiburg.de

verteilung therapeutischer antikörper im tumorgewebe

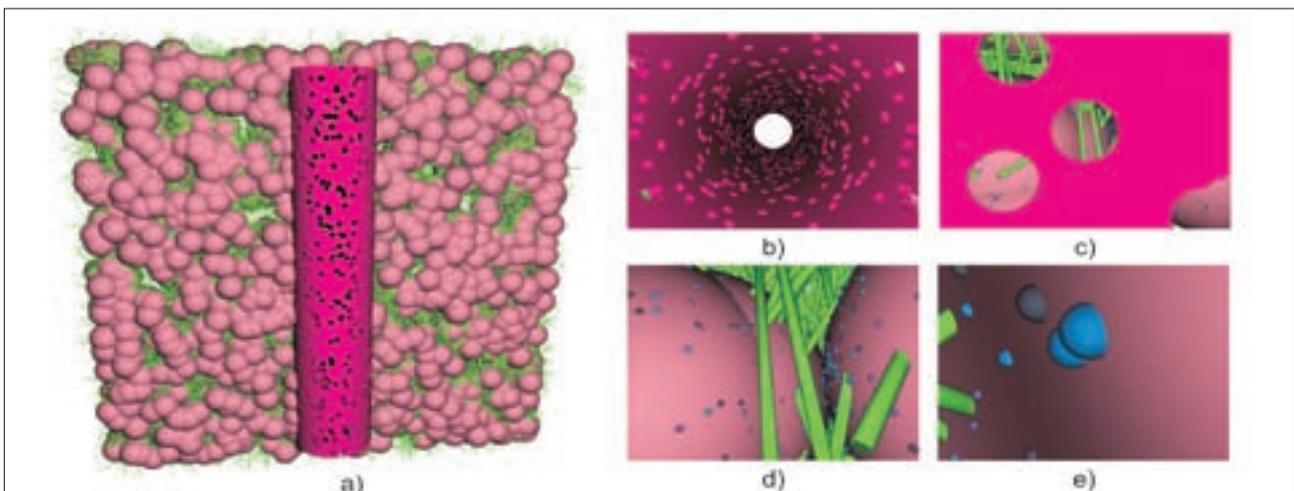
Räumlich-zeitliche Multiskalenverfahren zur Modellierung und Simulation von Tumorthérapien

von Holger Perfahl und Matthias Reuss

Zum Zeitpunkt des Therapiebeginns haben Tumore meistens schon einen größeren Durchmesser und besitzen ein gut ausgebildetes Gefäßsystem. Ziel einer Behandlung ist es, möglichst viele Tumorzellen abzutöten und dabei die gesunden Zellen zu verschonen. Am Center Systems Biology (CSB) der Universität Stuttgart arbeitet ein interdisziplinäres Forscherteam an der mathematischen Modellierung und Simulation des Tumorwachstums und der Ausbreitung von Medikamenten in Geweben. Im Fokus der Forschung steht die mehrskalige Beschreibung des Zusammenspiels der räumlichen Struktur der Tumore und der Effizienz verschiedener Therapien.

Avaskuläre Tumore sind Tumore, die keinerlei Blutgefäße enthalten und den Anfangspunkt des Wachstums solider Tumore bilden. Bei einem Durchmesser von wenigen Millimetern, hört ihr Wachstum in der Regel auf. Zu diesem Zeitpunkt sterben gleich viele Zellen im Tumorrinneren, wie neue Zellen durch Proliferation entstehen. Dieser an sich stabile Zustand wird dadurch beendet, dass mit Sauerstoff unterversorgte Zellen im Tumorrinneren Botenstoffe absondern, die das benachbarte vaskuläre System stimulieren, neue Blutgefäße zu bilden, die dann in den bis dahin avaskulären Tumor hineinwachsen. Nach erfolgreicher Blutgefäßbildung (Angiogenese) kann der Tumor weiter wachsen. Neben der Versorgung des Tumors mit Nährstoffen dienen die Blutgefäße sozusagen als „Autobahnen“, über die Wirkstoffe in Tumore eintreten können. Das vaskuläre System hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz einer Tumorthérapie.

Abbildung 1: Verteilung von Wirkstoffen in Tumoren



Die Abbildung zeigt einen kleinen Gewebeausschnitt, der dazu dient, die Ausbreitung und Verteilung von Wirkstoffen in Geweben zu untersuchen. Auf der linken Seite (a) ist das Gesamtgewebe abgebildet. Grobe Strukturen, wie zum Beispiel Zellen, werden durch Kugeln dargestellt. Eine Kugel repräsentiert nicht notwendigerweise eine Zelle, es können auch mehrere Kugeln eine Zelle darstellen. Ziel der Rekonstruktion ist es, einen virtuellen Gewebeausschnitt zu generieren, der die gleichen charakteristischen Eigenschaften wie das reale Gewebe aufweist. Die grün dargestellten Hindernisse repräsentieren kleinskalige Gewebedetails, wie z.B. die extrazelluläre Matrix. Die vier Abbildungen auf der rechten Seite zeigen den Weg eines Wirkstoffpartikels durch das vaskuläre System (b) und den Austritt durch die Fenestrierung des Blutgefäßes in den interstitiellen Bereich (c). Die Bewegung der Wirkstoffpartikel im interstitiellen Bereich (d) ist ebenso Gegenstand der Forschung wie die Reaktion mit Rezeptoren auf den Zelloberflächen (e) (Bild: Holger Perfahl).



Holger Perfahl (Foto: CSB / sven cichowicz photography).

Wie gelangen die Wirkstoffe in den Tumor und wie werden sie dort verteilt?

Nach der Injektion in eine Vene haben die Wirkstoffpartikel einen langen Weg vor sich. Zuerst verteilen sie sich in den großen Blutgefäßen, bis sie in die Kapillaren übergehen und dann in den interstitiellen Raum eintreten. Sie reichern sich langsam in den unterschiedlichen Organen an und werden beispielsweise in der Leber abgebaut oder von den Nieren ausgeschieden. Nur ein geringer Anteil der Gesamtmenge der Wirkstoffmoleküle gelangt in den Tumor. Im interstitiellen Bereich diffundieren die Moleküle durch das Gewebe, werden aber in ihrer freien Ausbreitung durch die Gewebestruktur gebremst. Die extrazelluläre Matrix, die Zellen und das Tumorstroma hindern die Wirkstoffe daran, sich schnell und gleichmäßig im Tumor zu verteilen. Daher ist es wichtig, detaillierte Informationen über die Struktur des Tumors in die Simulation der Wirkstoffbewegung einfließen zu lassen. Zu diesem Zweck forscht die Arbeitsgruppe um Holger Perfahl und Matthias Reuss daran, verschiedene Gewebebereiche so detailliert wie möglich nachzubilden, um so die Bewegung der Wirkstoffe durch Simulationen zu untersuchen (Abb. 1). Eine zentrale Fragestellung ist, inwieweit die Größe und Form der Wirkstoffmoleküle die Beweglichkeit und somit die Effektivität der Wirkstoffe beeinflusst. Es wird untersucht, ab welcher Größe Wirkstoffpartikel das vaskuläre System nicht mehr verlassen können, oder ab wann die Moleküle in dichten Gewebeabschnitten stecken bleiben und somit die Rezeptoren auf den Zelloberflächen der Tumorzellen nicht mehr erreichen können.

Multiskalen-Modellierung: Welche Skalen sind beteiligt?

Bei biologischen Prozessen im menschlichen Körper reichen die beteiligten Längenskalen von Nanometern bis hin zu Metern. Die Zeitskalen erstrecken sich vom Hundertstelsekundenbereich bis hin zu Jahrzehnten. Damit lassen sich sowohl schnelle Vorgänge im Körper (z. B. das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen) als auch extrem langsame Vorgänge (Alterungsprozesse) abbilden. Das Tumorwachstum umfasst Prozesse, die sich von der Ebene des

intrazellulären Raums über die Tumorzelle zum Tumor selbst, auf das betroffene Organ, bis hin zum gesamten Organismus erstrecken. Wechselwirkungen und Interaktionen der einzelnen Skalen verlaufen nicht nur in eine Richtung von der Zelle zum Organismus, sondern es treten vielfältige Wechselwirkungen zwischen den verschiedensten Skalen auf. Ein Ziel der aktuellen Forschung ist es, die relevanten Effekte auf den unterschiedlichen Skalen zu bestimmen und diese mit den anderen Skalen zu verbinden, um letztendlich ein Gesamtmodell für das Wachstum und die Veränderung der Struktur von Tumoren unter dem Einfluss verschiedener Therapien zu erarbeiten.

Modellierung und Simulation des Tumorwachstums

Bei der Simulation des vaskulären Tumorwachstums kooperiert die Arbeitsgruppe um Holger Perfahl und Matthias Reuss intensiv mit den Universitäten Nottingham und Oxford*, um das dreidimensionale Wachstum vaskulärer Tumore zu beschreiben (Abb. 2). Das verwendete Multiskalen-Modell (Perfahl *et al.*, 2010) koppelt intrazelluläre Vorgänge mit Zellbewegungen sowie mit der Entstehung und Veränderung von Blutgefäßen. Diffundierende Substanzen, wie z. B. Sauerstoff oder Wirkstoffe treten durch das vaskuläre System aus und werden von den Zellen aufgenommen. Mit Sauerstoff unterversorgte Zellen sondern den Botenstoff VEGF (vascular endothelial growth factor) ab und stimulieren das umliegende vaskuläre System, neue Gefäße zu bilden. Daneben beeinflusst wiederum das Sauerstoff-Konzentrationsfeld die Länge der Zellzyklen und dadurch die Zellteilungsraten. Um eine engere Verbindung zwischen Experimenten und den durch Simulationen gewonnenen vaskulären Netzwerken zu erreichen, wurde ein hybrider Ansatz gewählt. Dieser Ansatz stellt eine Mischung aus Imaging Daten und Simulationen dar. Experimentell gewonnene vaskuläre Systeme bilden die Grundlage der hybriden Simulationen. Durch die Simulationen wird versucht, das weitere Wachstum eines Tumors vorherzusagen. Zur Validierung kooperiert die Forschergruppe von Holger Perfahl und Matthias Reuss mit Wissenschaftlern am Moffitt-Cancer-Center** in den USA, die experimentelle Daten zur Verfügung stellen.

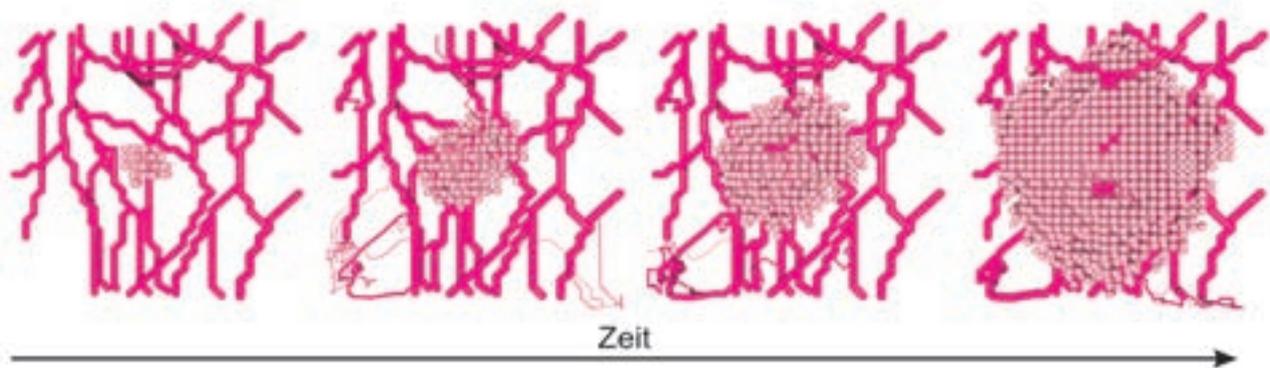


Abbildung 2: Vaskuläres Tumorwachstum

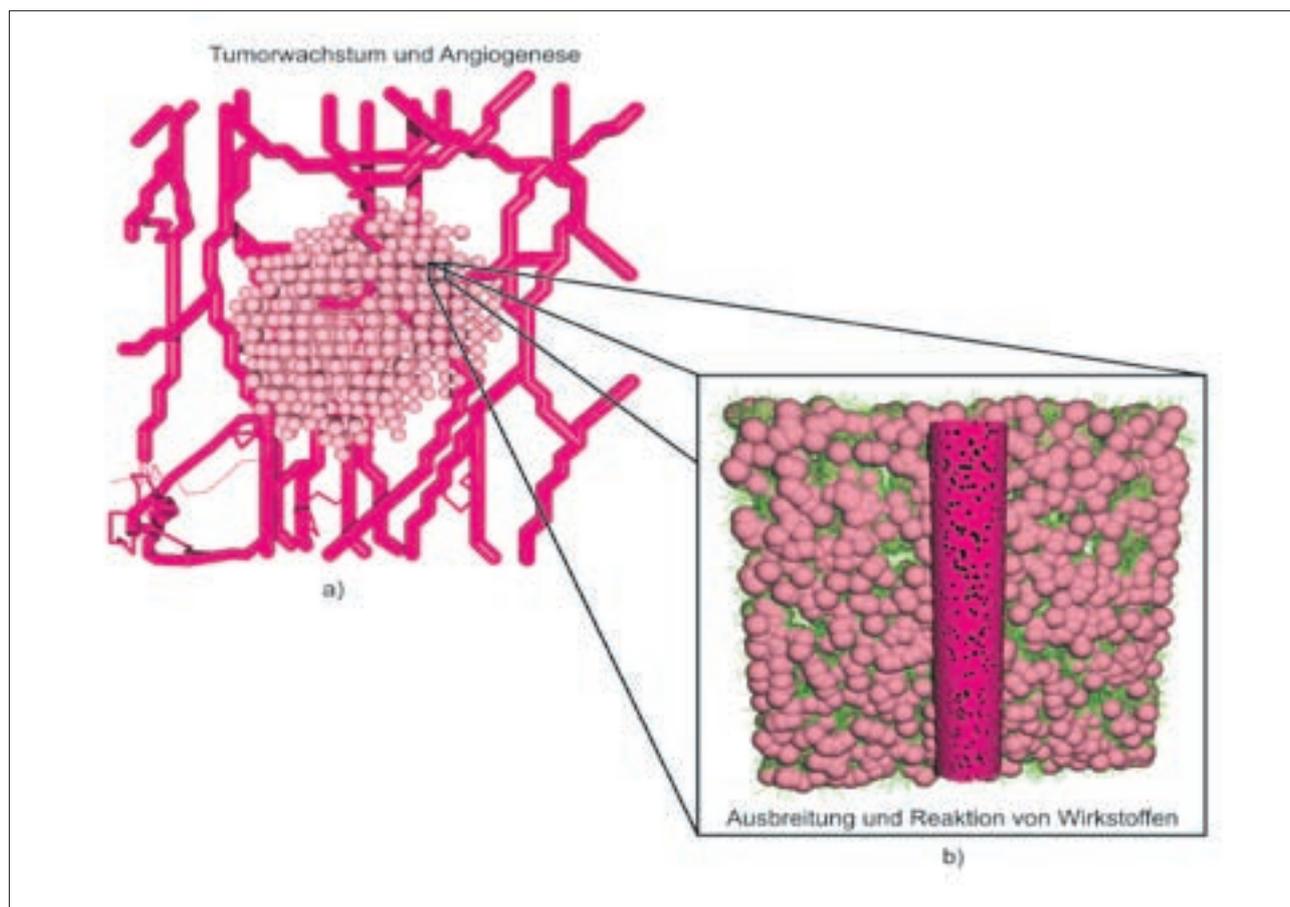
Die Grundlage der vaskulären Struktur im Simulationsmodell bilden *in vivo* Imaging-Daten ** aus einem Maus-Modell. Nach der Implantation einiger Tumorzellen in das virtuelle Gewebe wird die weitere Entwicklung des Gesamtsystems simuliert. Die vorliegende Abbildung verzichtet aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Darstellung der gesunden Zellen, die den Tumor umgeben. Die Simulation zeigt neben der Ausbreitung der Tumorzellen den Einfluss des Tumorwachstums auf das vaskuläre System. Mit diesen Simulationen konnte ein hybrider Modellierungsansatz (eine Verbindung zwischen realen und virtuellen Strukturen) realisiert werden (Bild: Holger Perfahl).

Bewegung der Wirkstoffe im Tumor

Liegt die Struktur des vaskulären Systems vor, werden detailliertere Informationen über die Beweglichkeit der Moleküle im Gewebe benötigt, um die Effektivität einer Therapie vorhersagen zu können. Dazu wird ein agenten-basierter Ansatz verwendet, bei dem die Bewegung jedes einzelnen Moleküls durch

das Gewebe verfolgt wird (Abb. 1). Grundlage der Simulationen bildet eine möglichst detaillierte Rekonstruktion von verschiedensten Tumorgeweben. Es werden Teile des vaskulären Systems als verbundenes Röhrensystem nachgebildet, durch welches das Blut fließt. Zufällig angeordnete Öffnungen in der Gefäßwand beschreiben die Durchlässigkeit des Gefäßsystems.

Abbildung 3: Kopplung der Skalen



Die Abbildung stellt das Zusammenspiel des Tumorwachstumsmodells mit dem Random-Walk-Modell dar und bietet die Möglichkeit, den Einfluss von Therapien auf das Gewebe zu untersuchen. Die detaillierten Strukturinformationen auf der kleineren Längenskala (b) lassen es zu, die Bewegung einzelner Wirkstoffmoleküle durch das Gewebe zu verfolgen und dabei den Einfluss der Gewebestruktur mit zu berücksichtigen. Die Austritts-, Diffusions- und Reaktionsraten, die auf der kleineren Längenskala abgeschätzt werden, dienen als Grundlage für die Berechnung der Wirkstoffausbreitung auf der größeren Längenskala (a) (Bild: Holger Perfahl).



Matthias Reuss (Foto: CSB / sven cichowicz photography).

Sowohl die Zellen als auch die extrazelluläre Matrix sind so angeordnet, dass sie dieselben charakteristischen Eigenschaften (Volumenanteile, Zell-Zell Abstände) wie reale Tumorgewebe aufweisen.

Mit Hilfe des Modells zur individuellen Krebstherapie

Gegenstand der aktuellen Forschung ist es, aus histologischen Schnitten die reale Tumorstruktur zu rekonstruieren und als Grundlage der Berechnungen zu verwenden. In den Simulationen wird der Einfluss der Gewebestruktur auf die Wirkstoffbewegung untersucht. Diese Erkenntnisse können dann in Modellen auf größeren Skalen integriert werden (Abb. 3). Die Untersuchungen geben einen Einblick, wie verschiedene Größen und Zeitskalen ineinander greifen und sich gegenseitig beeinflussen. Das Ziel eines Mehrskalenerfahrens ist es, die Interaktion und gegenseitige Beeinflussung verschiedener Skalen zu beschreiben und zu untersuchen. Die Verbindung zwischen Imaging-Daten und Simulationen bilden einen ersten Schritt in Richtung der „Personalized Medicine“ – einer Medizin, welche die interindividuelle Variabilität der Patienten berücksichtigt und beispielsweise mit der Hilfe von bildgebenden Untersuchungen einen optimierten Therapieansatz für den speziellen Tumortyp und die spezielle Tumorgeometrie vorschlägt.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Forsys Partner Projekt: „A Systems Biological Approach to Predictive Cancer Therapy“, Universität Stuttgart, Center Systems Biology (CSB), Institut für Zellbiologie und Immunologie: Klaus Pfizenmaier (Koordinator), Roland Kontermann, Peter Scheurich; Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik: Frank Allgöwer; Lehrstuhl für Hydromechanik und Hydrosystemmodellierung: Rainer Helmig; Center Systems Biology: Matthias Reuss; Universität Tübingen, Labor für Präklinische Bildgebung und Bildgebungstechnologie: Bernd Pichler; Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie: Matthias Schwab; Institut für automatische Kontroll- und System-Theorie, Universität Magdeburg: Rolf Findeisen; Celonic GmbH: Andreas Herrmann; Bayer Technology Services: Jörg Lippert.

Beteiligte Partner:

Holger Perfahl, Matthias Reuss, Alexei Lapin, Bernd-Simon Dengel, Center Systems Biology, Universität Stuttgart

*) Helen M. Byrne, Markus R. Owen, Universität Nottingham, UK; Philip K. Maini, Universität Oxford, UK; Tomás Alarcón, Centre de Recerca Matemàtica, Spain.

***) Mark C. Lloyd, Veronica Estrella, Tingan Chen, Robert A. Gatenby, Robert J. Gillies, H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Tampa, USA.

Referenzen:

Perfahl, H., Byrne, H.M., Chen, T., Estrella, V., Alarcon, T., Lapin, A., Gatenby, R.A., Gillies, R.J., Lloyd, M.C., Maini, P.K., Reuss, M., Owen, M.R. (2010) 3D Multiscale modelling of vascular tumour growth: the roles of domain size and boundary conditions, PLoS ONE 6(4): e14790. doi:10.1371/journal.pone.0014790.

www.ibvt.uni-stuttgart.de/institut/mitarbeiter/perfahl/perfahl.html

Kontakt:

Dipl.-Math. Dipl.-Ing. Holger Perfahl

holger.perfahl@ibvt.uni-stuttgart.de

Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss

matthias.reuss@ibvt.uni-stuttgart.de

Center Systems Biology (CSB)

Universität Stuttgart

innovative techniken der lichtmikroskopie

Firmenporträt TILL Photonics GmbH

von Frank Lison

Die TILL Photonics GmbH entwickelt, produziert und vertreibt innovative Modulkomponenten sowie Komplettlösungen für das Studium lebender Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. TILL wurde 1993 von Dr. Rainer Uhl, heute Leiter des BioImaging Zentrums (BIZ) der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München, gegründet und wuchs schnell zu einem international wahrgenommenen Unternehmen, das gleichermaßen für deutsche Wertarbeit und Innovation steht. Nach einer kurzen Phase als Tochter des US-Konzerns Agilent Technologies (2008-2009) wurde TILL Photonics von einem Konsortium unter der Führung des Laserherstellers TOPTICA Photonics AG übernommen.

Die ersten TILL Photonics Produkte waren schnell schaltbare Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie. In den Jahren nach der Gründung wurde das Portfolio sukzessive erweitert. Den Schwerpunkt bildeten komplette Imaging Systeme, welche alle Komponenten beinhalteten, die aus einem zugekauften Mikroskop-Stativ und einer Kamera ein komplettes Echtzeit-Mikroskopsystem machen. In dieser Zeit wurde der Name TILL Photonics zum Synonym für zellschonende Beobachtung schneller Prozesse im Bereich der Lebendzell-Mikroskopie.

Kundenkreis und Produkte

Der Kundenkreis der TILL Photonics setzt sich heute aus Wissenschaftlern der Bereiche Neuro- und Zellbiologie sowie aus OEM-Partnern und Systemintegratoren zusammen, welche Komponenten von TILL Photonics als opto-mechanische Basis für ihre Aufbauten verwenden. Zur Anwendung kommen die Produkte vorwiegend in Labors der biologischen und pharmazeutischen Grundlagenforschung, aber auch zunehmend in angewandten Forschungsbereichen und der Wirkstoffsuche.

Die Produkte der TILL Photonics sind durch mehrere Patentfamilien geschützt, die in Zusammenarbeit mit dem BioImaging Zentrum (BIZ) an der Ludwig-Maximilians-Universität München und der TILL I.D. GmbH (Martinsried, München) stetig weiterentwickelt werden.

In einer dritten, noch nicht abgeschlossenen Phase begann die TILL Photonics damit, ihr Produktportfolio um eigene Mikroskopstative zu erweitern. Im Jahr 2003 wurde das erste eigene Mikroskop – das achteckige iMIC – auf den Markt gebracht. Die mittlerweile über 200 mal installierte iMIC-Plattform zeichnet sich durch einen Paradigmenwechsel im opto-mechanischen Konzept aus, d.h. konkret die konsequente Umsetzung des Prinzips der zentralen optischen Achse für den Aufbau des Mikroskops, um damit kurze Abstände zur optischen Achse zu realisieren. Das Konzept wurde mehrfach einschlägig ausgezeichnet, ist modular, skalierbar und lässt sich optimal mit heute unverzichtbaren Komponenten wie Kameras, Lasern, Scannern u.a. ergänzen. Mit der iMIC Plattform (Abb. 1) verfügt TILL über ein vielseitiges Werkzeug, mit dem sich eine Vielzahl anspruchsvollster Mikroskopie-Verfahren wie beispielsweise EPI, TIRF, FRAP, FRET, strukturierte Beleuchtung, konfokale Spinning Disk oder auch FCS in einem einzigen, kompakten und hochintegrierten Instrument vereinen und vollständig automatisieren lassen. Der erfahrene Benutzer hat jedoch jederzeit die Möglichkeit die Konfiguration an seine eigenen Anforderungen anzupassen oder zusätzliche Verfahren hinzuzufügen.

Die *more*-Plattform – High-end-Mikroskopie auf kleinstem Raum

Mit seiner zweiten Mikroskop-Plattform adressiert die TILL Photonics ein gänzlich neues Marktsegment: nicht mehr nur den Wissenschaftler, der den Umgang mit einem hochkomplexen Instrument in den Vordergrund seiner Arbeiten stellt, sondern auch den Biologen oder Mediziner, der sich ganz auf seine biologischen Fragestellungen konzentrieren möchte, ohne dabei an der Komplexität seines Arbeitsgerätes zu verzweifeln. Die sogenannte *more*-Plattform vereint die Funktionalität verschiedener hochspezialisierter High-end-Mikroskope in einem einzigen Gerät und erreicht dabei eine Leistungsfähigkeit, die der von Spezialgeräten in keiner Weise nachsteht, sie durch den hohen Integrationsgrad in vieler Hinsicht sogar übertrifft. Die Kombination von Geschwindigkeit und Präzision sowie die Tatsache, dass sich alle Funktionen des Mikroskops automatisieren lassen, ist einzigartig im Bereich der High-end-Mikroskopie.



Abbildung 1: Die iMIC-Plattform in drei unterschiedlichen Konfigurationen für Screening, mit Durchlicht-Beleuchtung und mit kleiner Stage als allgemeinste Mikroskopie-Plattform.

Im Rahmen der Entwicklungsphase wurden diverse Prototypen und Vorseriengeräte in unterschiedlichsten Konfigurationen gebaut und im Haus, am Bioimaging Zentrum und bei ausgewählten Kunden ausgiebig getestet. Hierbei konnten neben Routineanwendungen in der Zellbiologie auch Erfahrungen bei der Beobachtung von einzelnen schnellen Prozessen in der Physiologie bis hin zu Reihenuntersuchungen im *High Content Screening* gesammelt werden.

Den Kern der **more**-Plattform bildet ein Mineralguss-Körper, der als 3-dimensionaler optischer Tisch fungiert, an dem alle optomechanischen Komponenten zueinander in Bezug gesetzt werden. Das Mineralguss-Material sorgt für eine hohe intrinsische Stabilität und aufgrund seiner herausragenden Dämpfungseigenschaften im Vergleich mit Standardmaterialien wie Aluminium für sehr gute Kurz- und Langzeitstabilität.

Das **more** ermöglicht auf engstem Raum die Integration von Funktionalitäten, die man ansonsten nur in wesentlich größeren und kostenintensiveren Geräten vorfindet. Auch das **more** ist skalierbar, doch anders als beim iMIC muss bereits im Fertigungsprozess berücksichtigt werden, welche Eigenschaften aus einer Vielzahl von Funktionen am Ende integriert werden sollen.

Die aktuelle Produktpalette von TILL Photonics umfasst damit zwei Mikroskop-Plattformen iMIC und **more**, dazu intelligente, schnell schaltbare und durchstimmbare Lichtquellen, aber auch Mikroskopie-Zubehör (z.B. TIRF Aufbauten) und Photometrie-Systeme. Ein durchgehendes Kennzeichen dieser Systeme ist die

stets vorhandene Echtzeit-Steuerung. Sie ermöglicht die Synchronisation von Fluoreszenz-Anregung und Bildaufnahme auf Mikrosekunden-Zeitskalen und damit eine Minimierung des Photoschadens an den zu untersuchenden lebenden Zellen.

Steckbrief TILL Photonics GmbH

Am Firmensitz in Gräfelfing bei München arbeiten derzeit 40 Mitarbeiter, zu je einem Drittel in Forschung & Entwicklung, in Vertrieb, Marketing und Produktmanagement sowie in der Produktion. Die Stammmannschaft der Fertigung besteht aus Fachhochschul-Ingenieuren, Facharbeitern und besonders geschulten Fertigungskräften. Nahezu die gesamte Zulieferkette befindet sich in Deutschland mit Schwerpunkt im süddeutschen Raum. Der Bereich Entwicklung wird v. a. aus hochqualifizierten Akademikern der Naturwissenschaften, der Elektrotechnik und des Maschinenbau gebildet.

Kontakt:

Dr. Frank Lison
Geschäftsführer
TILL Photonics GmbH
Gräfelfing
info@till-photonics.com

Weitere Informationen unter:

www.till-photonics.com

wo hochleistungs- lichtmikroskope nicht nur genutzt, sondern konzipiert werden

Das Biomaging Zentrum (BIZ) der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Rainer Uhl

Im Mittelpunkt der Arbeiten am BIZ steht das Lichtmikroskop. Dieses viele hundert Jahre alte Instrument, das vor nicht allzu langer Zeit noch als Auslaufmodell mit Relevanz nur für den Routinebetrieb oder die Lehre gehandelt wurde, hat in den vergangenen Jahrzehnten eine ungeahnte Renaissance erfahren. Kein anderes Instrument erlaubt es, in lebende Zellen hineinzusehen und inter- sowie intrazelluläre Prozesse im Submikrometer-Bereich zu verfolgen, in drei Dimensionen und in Echtzeit. Und seit es vor kurzem gelang, die Grenzen der Beugungslimitation zu überwinden und mit der Auflösung in den molekularen Bereich vorzustoßen, der bisher hochinvasiven Methoden wie der Elektronenmikroskopie vorbehalten war, wurden der Lichtmikroskopie neue aufregende Felder erschlossen.

Die meisten Entwicklungen, die der Lichtmikroskopie den Sprung in das neue Jahrtausend bescherten, fanden (und finden) in einer akademischen Umgebung statt oder nahmen dort ihren Anfang. Das dialektische Miteinander von biologischer Fragestellung und methodischer Problemlösung, d.h. das Wechselspiel von „Wollen“ und „Können“ hat im Falle des Lichtmikroskops ganz besonders gut funktioniert und immer wieder den Biologen Vorteile verschafft, die nicht auf käufliche Instrumente angewiesen waren, weil sie selbst an Entwicklungen beteiligt waren, die die Grenzen des Möglichen erweitert haben. In dieser Tradition werden am BIZ eigene biologische Fragestellungen aufgegriffen oder die Probleme von Partner-Gruppen abstrahiert und dienen als Ausgangspunkt von Methodenentwicklungen, die in enger Zusammenarbeit mit kooperierenden Industrieunternehmen vorangetrieben werden.

Die fünf Themenfelder am BIZ

Mensch-Maschine-Schnittstelle:

Hier geht es darum, ein neuartiges Bedienkonzept für die automatisierte *High-End*-Mikroskopie zu entwerfen und mit Industriepartnern umzusetzen. Ziel ist es, die Robustheit und Geschwindigkeit einfacher automatisierter Mikroskope auf komplexe *High-Tech*-Mikroskope zu übertragen. Damit werden einem breiten Anwenderkreis komplexe Verfahren zum Studium lebender Zellen ermöglicht, die bisher nur methodisch orientierten Spezialisten vorbehalten waren.

Intravital-Mikroskopie:

Hier gibt es eine enge Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Herms am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) an der LMU München, der tief im Gehirn von lebenden, über Monate hinweg beobachteten „Alzheimer-Mäusen“ das Wachstum und die Zerstörung von Nervenzellen untersucht (Abb. 1) und mit Prof. Galizia an der Universität Konstanz, der lebenden Fliegen und Bienen „beim Riechen zusieht“. Das BIZ hat neue Konzepte entwickelt, mit denen die Photonen-Sammeleffizienz eines Multiphotonen-Intravital-Mikroskops beträchtlich gesteigert werden konnte und arbeitet gegenwärtig an neuen digitalen Antriebskonzepten, mit denen der abtastende Femtosekunden-Laserstrahl mit bisher unerreichter Geschwindigkeit in drei Dimensionen über das Präparat bewegt werden kann. Eine am BIZ entwickelte *Open-Source-Software* zur Ansteuerung eines Multiphotonen-Mikroskops wird bereits in einer Reihe von Partner-Labors erfolgreich eingesetzt.

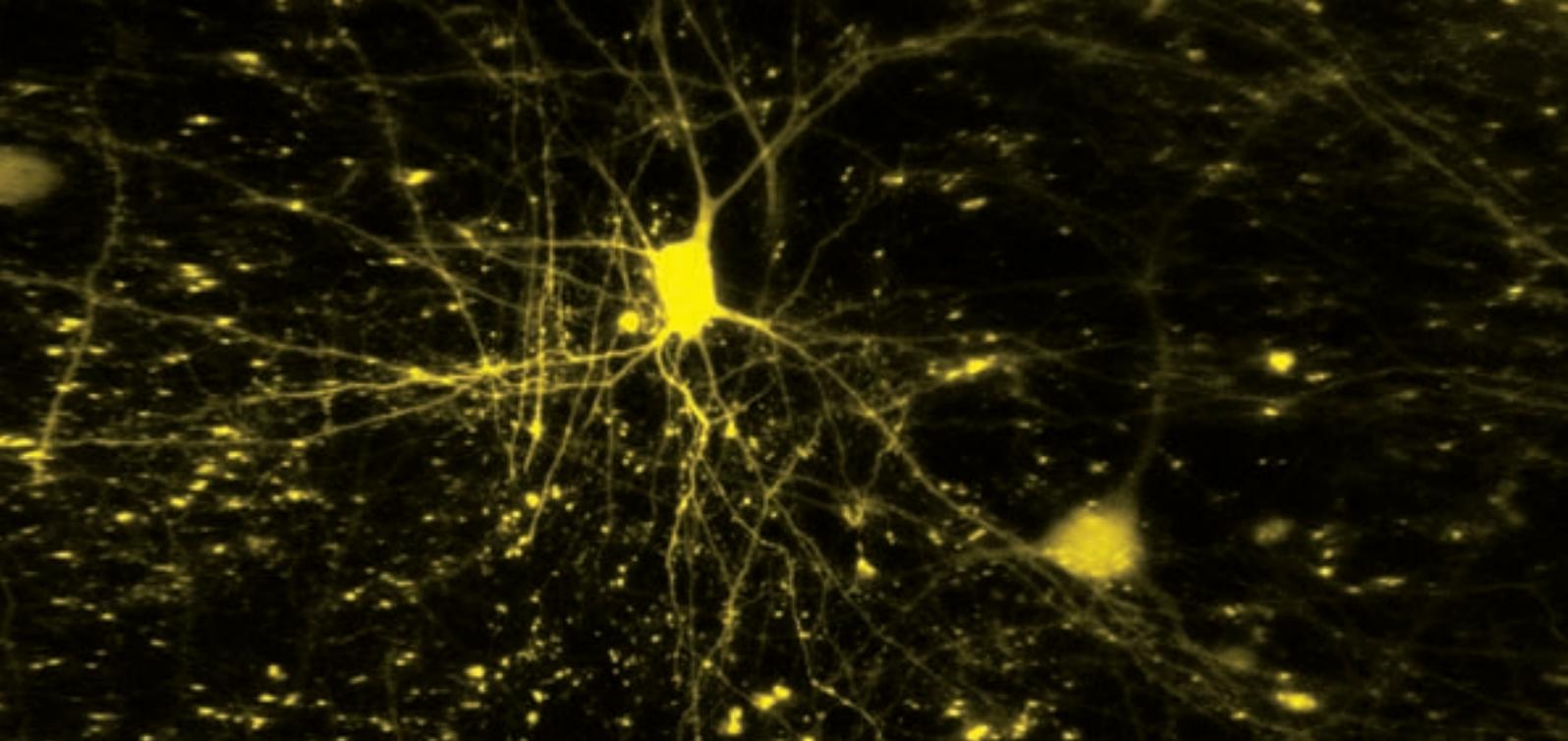


Abbildung 1: Projektion eines Bildstapels, aufgenommen von einem YFP-gefärbten Neuron im Gehirn einer lebenden Maus (Bild: Sabine Scheibe).

Strukturierte Beleuchtung:

Dieses Verfahren liefert 3D-Schichtaufnahmen ohne den Einsatz von Laserscan-Verfahren und erlaubt zudem eine Steigerung der Auflösung bis auf ca. 100 nm herab. Am BIZ wird derzeit an einfachen Alternativen zu den äußerst teuren käuflichen Geräten gearbeitet.

Spinning Disc-Mikroskopie:

Das „spinning disc“-Verfahren stellt die derzeit einzige Möglichkeit dar, konfokale Messungen in Echtzeit durchzuführen und die lebende Probe auch bei längerer Beobachtung am Leben zu lassen. Auch hierzu gibt es am BIZ neue methodische Ansätze, die derzeit in der Erprobungsphase sind.

Superresolution-Mikroskopie:

Auf der Basis von Einzelmolekül-Lokalisation lässt sich die Auflösung der Lichtmikroskopie bis in den 10 Nanometer-Bereich steigern. Am BIZ werden derzeit neue Verfahren zu einer 3-dimensionalen Vielfarben-Variante erarbeitet und zusammen mit Partnern in Hamburg sowie Nijmegen erprobt.

Über die genannten Entwicklungsprojekte hinaus gibt es am BIZ weitere „cutting edge instrumentation“ zum Thema FRET (fluorescence resonance energy transfer), TIRF (total internal reflection fluorescence), FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FLIM (fluorescence life-time imaging) und

FCS (fluorescence correlation spectroscopy). Sie alle basieren auf der Mikroskop-Plattform, die in enger Zusammenarbeit mit der Firma TILL Photonics entwickelt worden ist.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Das **BioImaging Zentrum (BIZ)** der LMU München wurde auf Initiative der Fakultät für Biologie gegründet und hat sich zur Aufgabe gestellt, interdisziplinäre Forschung und Lehre in allen Bereichen zu fördern, die sich mit der Anwendung bildgebender mikroskopischer Verfahren auf biologische Objekte befassen. Derzeit arbeiten am BIZ 16 Wissenschaftler, darunter Biologen, Chemiker, Physiker und mehrere Ingenieure. Das BIZ ist Bestandteil des Münchner „Exzellenzclusters Medizin“ und wurde 2004 zusammen mit der TILL Photonics GmbH im Rahmen des Bayerischen Innovationspreises für seinen Beitrag zur Entwicklung des „iMIC = Mikroskop der Zukunft“ ausgezeichnet. Ein Jahr danach gewann dieses Mikroskop-Konzept auch den angesehenen Prism-Award der Zeitschrift Photonics Spectra.

Kontakt:

Prof. Dr. Rainer Uhl

BioImaging Zentrum der Universität München
uhl@biz.uni-muenchen.de

genome-based systems biology

Deutschlands erster Master-Studiengang zur Systembiologie an der Universität Bielefeld

von Frank-Jörg Vorhölter, Alf Pühler und Karsten Niehaus

Als im Oktober 2005 an der Universität Bielefeld die ersten Studierenden zum Modul „Mathematische Methoden in der Systembiologie“ erschienen, war dies der Startschuss für den ersten Masterstudiengang zur Systembiologie in Deutschland. Ausgangsbasis für die Etablierung des Masterstudiengangs war die Nachfrage von geeigneten Absolventen der biowissenschaftlichen Bachelorstudiengänge. Als Querschnittswissenschaft erfordert Systembiologie Beiträge unterschiedlicher Fachrichtungen. In Bielefeld wird der Studiengang getragen von den Fakultäten für Biologie, Physik und Mathematik sowie der Technischen Fakultät. Die Unterrichtssprache ist Deutsch.

Die modulare Struktur des Studiengangs *Genome-Based Systems Biology*

Der Studiengang *Genome-Based Systems Biology* ist in Modulen gegliedert (Tab. 1). Im ersten Studienjahr erfolgt zunächst eine grundlegende „Einführung in Mathematische Methoden in der

Systembiologie“, sowie in „Angewandte Bioinformatik“ (Abb. 1). Hier werden die mathematischen Kenntnisse erworben, um Modelle biologischer Prozesse zu entwerfen, und um experimentelle Messdaten zur Überprüfung der Modelle zur Verfügung zu stellen. Im Weiteren werden biowissenschaftliche Vorkenntnisse ausgebaut. Als Modellsysteme dienen Bakterien, die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, biotechnologisch relevante CHO-Zellkulturen und humane Stammzellen. Zunächst ermöglicht das Modul „Methoden und Beispiele der funktionellen Genomforschung“ einen aktiven Einblick in alle modernen „omics“-Technologien. Beginnend mit der Genom-Sequenzierung erlernen die Studierenden in Laborexperimenten die Transkriptom-Analytik mit Microarrays, Protein- und Metabolit-Analysen über Massenspektroskopie sowie erste Verfahren der automatisierten Mikroskopie. Dieses Wissen wird dann in den Modulen „Physiologie und Genetik der Prokaryotenzelle“, „Stoffwechselkompetenz der Eukaryotenzelle“ und „Regulatorische Netzwerke der Eukaryotenzelle“ ausgeweitet und vertieft. Während die ersten beiden Semester einem festen Studienprogramm folgen, bieten die anschließenden beiden Semester eine große Freiheit in der Gestaltung eigener

Tabelle 1: Übersicht über die Module des Masterstudiengangs *Genome-Based Systems Biology*

1. Semester	Mastermodul I "Funktionelle Genomforschung"	Mastermodul II "Physiologie und Genetik der Prokaryotenzelle"	Mastermodul III "Mathematische Methoden"
2. Semester	Mastermodul IV "Stoffwechselkompetenz der Eukaryotenzelle"	Mastermodul V "Regulatorische Netzwerke der Eukaryotenzelle"	Mastermodul VI "Angewandte Bioinformatik"
3. Semester	Forschungsmodul Theorie "Systembiologie an Beispielen"	Forschungsmodul Praxis I oder Praxis II	Erweiterungsmodul
4. Semester	Master-Arbeit		



Abbildung 1: Intensive Betreuung der Studierenden des Studiengangs *Genome-Based Systems Biology*

Der Studiengang ist für 12 Studierende pro Jahr konzipiert. Das ermöglicht eine optimale Betreuung der Studierenden, wie hier in der Angewandten Bioinformatik (Bild: Universität Bielefeld).

Schwerpunkte. Dazu kann der praktische Umgang mit modernsten Geräten im Labor ebenso gehören wie das Erstellen neuer Bioinformatik-Anwendungen zur systematischen Datenauswertung. Übergeordnetes Ziel aller Projekte ist es jedoch, mit Hilfe mathematischer Methoden Modelle zu entwickeln, die funktionale Zusammenhänge zwischen Genen, Transkripten, Proteinen und Metaboliten aufzeigen. Die individuellen Projekte werden im Rahmen von Forschungs- und Erweiterungsmodulen von den Studierenden weitgehend eigenverantwortlich durchgeführt. Erfahrungen aus diesen Projekten erleichtern dann die Anfertigung einer Masterarbeit als letzten Bestandteil des Studiums.

Einzige Ressourcen zur Erstellung und modellhaften Analyse experimenteller Daten

Studentinnen und Studenten des Studiengangs *Genome-Based Systems Biology* haben vollen Zugang zur Infrastruktur der Universität Bielefeld, insbesondere zu den Ressourcen der naturwissenschaftlichen Fakultäten und des Centrums für Biotechnologie (CeBiTec). Im CeBiTec sind es vor allem die Technologie-Plattformen Genomik und Bioinformatik, die von den Studierenden genutzt werden können (Abb. 2). Möglich ist so die unmittelbare Arbeit mit allermodernsten Labor-Großgeräten wie die Ultrahochdurchsatz-Sequenziergeräte Roche 454 Genome Sequencer FLX und Illumina Genome Analyzer IIX, deren Daten etwa im Rahmen von Master-Arbeiten analysiert werden können. Für Transkriptom-Experimente bietet das CeBiTec die Möglichkeit, im Haus eigene Microarrays zu entwerfen und herzustellen. Ergänzend werden zurzeit Verfahren zur RNA-Sequenzierung etabliert. Zur Proteom-Analytik stehen massenspektrometrische Verfahren zur Verfügung, z. B. die Identifikation von Proteinen durch MALDI-TOF mit einem Bruker Ultraflex extreme Massenspektrometer, nachdem die Proteine zunächst durch zweidimensionale Gelelektrophorese separiert worden sind. Massenspektrometrische Methoden stehen auch im Mittelpunkt der Metabolomik, wo durch eine Koppelung mit unterschiedlichen chromatographischen Trennverfahren wie Flüssigkeits- oder Gas-Chromatographie ein breites Spektrum unterschiedlicher Metabolite identifiziert und quantifiziert werden kann, etwa beim GC-GC-TOF Kombinationsgerät Leco Pegasus 4 für zweidimensionale Gas-Chromatographie mit massenspektrometrischer

Identifikation. In der Bioinformatik stehen nicht nur optimale Hardware-Ressourcen zur Verfügung, etwa im Bereich Compute, Storage oder Datenbank. Vor allem kann über Software-Ressourcen des CeBiTec die Auswertung experimenteller Daten drastisch erleichtert werden, etwa bei der automatisierten Generierung von metabolischen Modellen in der Markup-Sprache SBML mit dem Tool CARMEN. Zum selbständigen Vertiefen der ersten Modellier- und Simulationserfahrungen haben sich tragbare MacBook-Rechner sehr bewährt, die den Studierenden zur Verfügung stehen. Die Studierenden werden auch angehalten, an wissenschaftliche Konferenzen teilzunehmen, z. B. an den jährlich stattfindenden CeBiTec-Symposien, die sich jeweils einem zukunftsorientierten Thema widmen. Die Ergebnisse der CeBiTec-Symposien sind in Sonderheften des Journals of Biotechnology publiziert (Tab. 2).

Tabelle 2. Übersicht über die Themen der bisherigen CeBiTec Symposien

Jahr	Thematik und Publikation im Journal of Biotechnology
2006	Molecular Systems Biology <i>J. Biotechnology Volume 129, Issue 2</i>
2007	The Future of Genome Research in the Light of Ultrafast Sequencing Technologies <i>J. Biotechnology Volume 136, Issues 1-2</i>
2008	Solar Bio-Fuels <i>J. Biotechnology Volume 142, Issue 1</i>
2009	bioIMAGING <i>J. Biotechnology Volume Volume 149, Issue 4</i>
2010	New Frontiers in Microbial Genome Research



Abbildung 2: Probennahme an einem Bioreaktor

Im Rahmen von Projekten oder der Masterarbeit können die Studierenden weitgehend eigenverantwortlich mit komplexen Technologien arbeiten, um Daten für die Falsifikation zuvor erstellter Modelle zu gewinnen (Bild: Universität Bielefeld).

Erfolgreiche Teilnahme von Bielefelder Systembiologie-Studierenden am iGEM-Wettbewerb

Den Studierenden des Masterstudiengangs wird nicht nur modernstes Wissen vermittelt, sondern sie erhalten auch Freiraum für eigene Projekte. Das zeigte sich im Sommer 2010, als Studierende des Master-Studiengangs *Genome-Based Systems Biology*, unterstützt durch Studierende der Molekularen Biotechnologie, erfolgreich am iGEM-Wettbewerb für Synthetische Biologie teilnahmen (Abb. 3). Das Kürzel iGEM steht für *international Genetically Engineered Machine competition*, ein internationaler Forschungswettbewerb für nicht graduierte Studenten der Lebenswissenschaften, der seit 2003 vom MIT in Boston, Massachusetts, USA ausgerichtet wird. Gesucht werden innovative Systeme und Ideen im Bereich der synthetischen Biologie. Die Bielefelder Studierenden haben ihr Projekt selbständig konzipiert und in kurzer Zeit im Labor erfolgreich vorangetrieben. Ziel des Projekts mit dem Titel MARSS (*Modulated Acetosyringon Receptor Sensor System*)

war es, in *Escherichia coli* einen molekularen Rezeptor für Gewürz-Schärfe zu konstruieren. Die Substanz Capsaicin ist für die Schärfe in Chili und Pfeffer – und damit in vielen Nahrungsmitteln – verantwortlich. Für das Projekt wurde folgender Plan entwickelt. Ein Rezeptor-Protein des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens*, das den pflanzlichen Sekundärmetaboliten Acetosyringon detektiert, wird im Labor so modifiziert, dass es Capsaicin erkennt. Durch die Erkennung wird im Modell-Organismus *E. coli* eine Signaltransduktion ausgelöst, die zur Emission von Licht führt. Dadurch wird mit dem Projekt ein Biosensor entwickelt, der die Capsaicin-Konzentration als Helligkeit wiedergibt, die messtechnisch leicht und robust erfasst werden kann. Das Projekt wurde von der Jury des iGEM-Wettbewerbs als sehr gelungen angesehen: das Bielefelder Team gewann bei dem vom MIT veranstalteten Wettbewerb eine Goldmedaille.

Abbildung 3: Bielefelder Teilnehmer am iGEM-Wettbewerb des Massachusetts Institute for Technology (MIT) 2010



Studierende des Masterstudiengangs *Genome-Based Systems Biology* – hier vor dem Bunker Hill Monument in Boston, USA – haben 2010 erfolgreich am iGEM-Wettbewerb für Synthetische Biologie teilgenommen und dabei eine Goldmedaille gewonnen (Bild: Dr. Jörn Kalinowski, Universität Bielefeld).

Herausragende Perspektiven für die Absolventen des Masterstudiengangs *Genome-Based Systems Biology*

Mit dem Abschluss des Masterstudiengangs ist bei allen bisherigen Absolventen die Begeisterung für die Wissenschaft nicht erloschen. Die Mehrzahl von ihnen hat sich für eine anschließende Promotion im In- wie auch im Ausland entschieden. Absolventen des Masterstudiengangs *Genome-Based Systems Biology* waren z. B. überdurchschnittlich erfolgreich bei Bewerbungen um Promotionsstipendien, etwa im Rahmen des Graduiertenclusters „Industrielle Biotechnologie“ (CLIB), einer Zukunftsinitiative des Landes Nordrhein-Westfalen, die von einem Verbund der Universitäten Bielefeld, Dortmund und Düsseldorf getragen wird.

Kontakt:

Prof. Dr. Karsten Niehaus

Universität Bielefeld

Fakultät für Biologie

Abteilung für Proteom- und Metabolomforschung

Studiengangsbeauftragter

kniehaus@cebitec.uni-bielefeld.de

gegen altersblindheit ist ein moos gewachsen

Freiburger Systembiologen entwickeln ein Medikament gegen die Altersbedingte Makuladegeneration

von Ralf Reski, Eva Decker und Sabine Stebel

Unter Makuladegeneration, umgangssprachlich auch Altersblindheit genannt, ist eine Gruppe von Krankheiten zusammengefasst, bei welcher der Punkt des schärfsten Sehens, auch „Gelber Fleck“ genannt, seine Funktion verliert. Durch das Absterben dieses Punktes auf der Netzhaut geht das zentrale Sichtfeld, welches für das scharfe Sehen benötigt wird, langsam verloren. Die häufigste Form der Makuladegeneration ist die altersbedingte Form (AMD), die per Definition erst nach dem 50. Lebensjahr auftritt. Durch die in den Industrieländern deutlich veränderte Altersstruktur ist ein immer größerer Teil der Bevölkerung von dieser Krankheit betroffen und verursacht

dadurch den Krankenkassen zusätzlich hohe Kosten, denn die Altersbedingte Makuladegeneration ist in den Industriestaaten die Hauptursache für eine Erblindung bei Menschen über 50 Jahren. Weltweit leiden geschätzte 25 bis 30 Millionen Menschen unter der AMD, davon 2 Millionen allein in Deutschland.

Komplementfaktor H und Altersblindheit

Freiburger Wissenschaftler schließen nun eine Lücke in der AMD-Behandlung. Forschern um Eva Decker und Ralf Reski (Abb. 1) ist es erstmals gelungen, den „Komplementfaktor H“ herzustellen, der in der Behandlung von AMD eingesetzt werden kann (Abb. 2) (Büttner-Mainik *et al.*, 2010). Sinkt die Menge an „Komplementfaktor H“ im Blut älterer Menschen, ist das einer der Hauptgründe für die Ausprägung einer AMD. Der Komplementfaktor H ist Teil des sogenannten Komplementsystems, einem System von Proteinen des Blutplasmas, welches im Rahmen der Immunantwort aktiviert wird. Mit mehr als 30 Proteinen ist es an der Abwehr von Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Parasiten) als Teil des sogenannten angeborenen Immunsystems beteiligt. Faktor H ist ein großes, mit Zuckermolekülen versehenes Eiweiß (Glykoprotein), dessen Hauptaufgabe es ist zu kontrollieren, dass das Komplementsystem nicht fälschlich körpereigenes Gewebe angreift. Erfüllt Faktor H seine Aufgabe nicht richtig, kann es zu schwerwiegenden gesundheitlichen Folgen kommen. Die Mutation oder Veränderung des Faktor H führt neben der Altersbedingten Makuladegeneration auch zum atypischen hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS), einer seltenen Erkrankung, die Kleinkinder und Säuglinge betrifft und zu lebensbedrohlicher Nierenschädigung führen kann. Dieses so lebenswichtige Eiweiß ist jedoch bisher nicht käuflich zu erwerben, da es sich um eine so genannte „Orphan Drug“ handelt, also um ein Medikament, bei dem der Markt zu klein ist, als dass sich eine Entwicklung für die pharmazeutische Industrie lohnen würde, da bei hohen Entwicklungs- und Produktionskosten nicht mit einer ausreichenden Rendite während des Patentschutzes zu rechnen ist. Dieser offizielle „Orphan Drug“-Status bedeutet, dass Entwicklung und Zulassung solcher Arzneimittel behördlich besonders gefördert werden.

Abbildung 1: Ralf Reski mit Kulturen des Kleinen Blasenmützenmooses



Bild: Thomas Kunz, PR Universität Freiburg

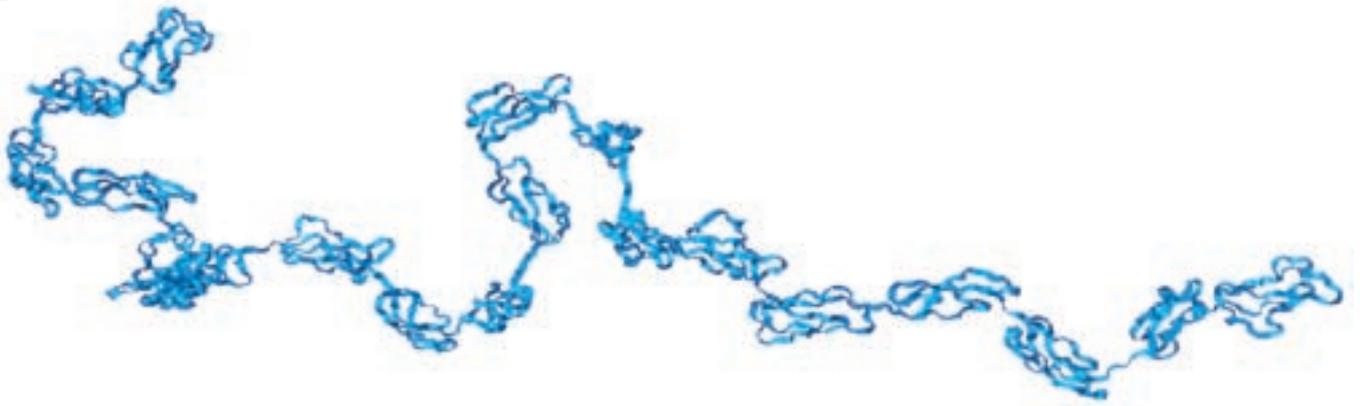


Abbildung 2: Komplementfaktor H

Faktor H kommt im menschlichen Plasma in einer Konzentration von 500-800 µg/ml vor. Die Struktur des Proteins besteht aus 20 kugelförmigen Domänen, den sog. „short consensus repeats“. Bildrechte: 1haq.pdb, Darstellung durch das Programm Starbiochem (Bild: Sabine Stebel).

Das rettende Moos

Die Freiburger Wissenschaftler setzten bei der Entwicklung des Medikaments auf das Kleine Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens* (Abb. 3). Schon Ende der 1990er Jahre erkannte BASF das Potential, das in diesem kleinen Moos schlummert und investierte an der Universität Freiburg einen zweistelligen Millionenbetrag in die Erforschung der damals noch neuen Modellpflanze. 1999 gründete Ralf Reski zusammen mit Kollegen das Biotechnologie-Unternehmen greenovation (www.greenovation.com), um in Moos eiweißbasierte Medikamente herzustellen. *Physcomitrella patens* hat sich wegen einiger sehr nützlicher spezifischer Merkmale als pflanzliches Modellsystem etabliert. Im Gegensatz zu anderen Pflanzen hat es einen sehr viel einfacheren Bauplan und nur wenige Zelltypen. Des Weiteren können Gene durch Homologe Rekombination (Austausch von DNA-Abschnitten zwischen zwei ähnlichen DNA-Molekülen) in Moos gezielt entfernt werden, etwas, das bei keiner anderen Pflanze möglich ist. So können gezielt Gene eingefügt oder deaktiviert werden.

Physcomitrella patens hat noch weitere Vorteile, die Blütenpflanzen nicht aufweisen: Seine vorherrschende Daseinsform ist haploid, besteht also nur aus einem einfachen Chromosomensatz (Abb. 4). Mutationen machen sich also sofort bemerkbar, da sie nicht durch eine „genetische Sicherungskopie“ kompensiert werden können. Das Moos kann zudem in flüssigem Medium (Abb. 6) im Bioreaktor wachsen. So kann sein Wachstum gezielt gesteuert werden und außerdem können gentechnisch veränderte Moose nicht in die Umwelt gelangen.

Medikamentenherstellung in Moos

Gentechnisch in Bakterien, Tieren oder Pflanzen hergestellte therapeutische Proteine sind nicht neu. Man bezeichnet dieses Verfahren als „molecular pharming“. Diese Wortschöpfung setzt sich zusammen aus dem englischen Wort „pharmaceutical“ (für Arzneimittel), „farming“ (für Landwirtschaft) und molekular (angelehnt an die verwendeten Methoden der Molekularbiologie). Das einfach gebaute Insulin, welches früher aus Schlacht-

Abbildung 3: Das Kleine Blasenmützenmoos *Physcomitrella patens*



Das Kleine Blasenmützenmoos ist ein Laubmoos aus der Familie der *Funariaceae*. Es dient in der Biologie als Modellorganismus für die Erforschung der Evolution, Entwicklung und Physiologie der Pflanzen. Diese Art kommt in Eurasien und Nordamerika vor und wächst auf verschlammten oder tonigen Böden, an trockenen Flussufern oder abgelassenen Teichen. Die Pflanzen werden bis 5 mm hoch. Die Art ist sehr kurzlebig, sie vollführt ihren Lebenszyklus in nur vier Wochen (Bild: Pflanzenbiotechnologie Freiburg, Prof. Reski).

abfällen gewonnen wurde, kann noch in Bakterien hergestellt werden. Einige Impfstoffe (z. B. der Hepatitis-Impfstoff) werden in gentechnisch veränderten Hefezellen hergestellt. Bei komplexeren Eiweißmolekülen, die zusätzlich noch mit Zuckermolekülen dekoriert werden, muss man jedoch auch zu entsprechend komplexeren Produktionsorganismen greifen. So kann der Komplementfaktor C1-Inhibitor zur Behandlung des erblichen Angioödems (eine seltene Erbkrankheit, bei der es zu immer wiederkehrenden Schwellungen (Ödemen) der Haut, der Schleimhäute und der inneren Organe kommt, die unter Umständen lebensbedrohlich sein können) in der Milch von Kaninchen produziert werden. Das Melken der Tiere ist jedoch sehr mühselig. In der Maispflanze konnte das Enzym gastrische Lipase hergestellt werden, welches bei der Behandlung der Mukoviszidose eingesetzt werden soll. Der Freilandanbau von gentechnisch veränderten Pflanzen ist jedoch besonders in Deutschland äußerst umstritten.

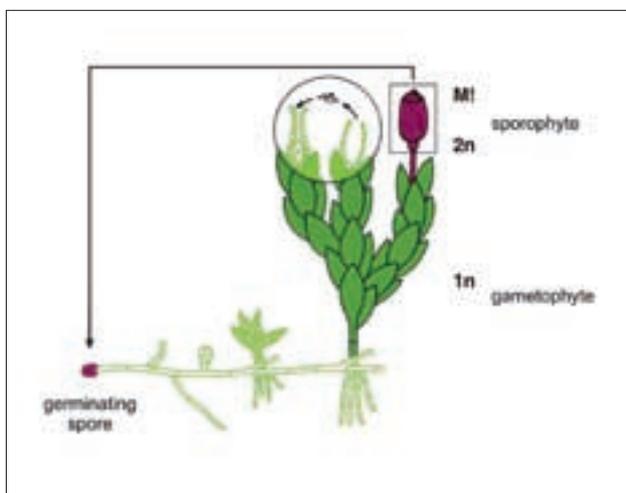
Das Kleine Blasenmützenmoos (*Physcomitrella patens*) ist nach einem Eingriff in sein Erbgut, anders als andere Pflanzen, in der Lage, die produzierten Proteine mit menschlichen Zuckerstrukturen zu dekorieren (Decker *et al.*, 2007). Das ist wichtig, da pflanzliche Zuckerreste zu Allergien (wie Heuschnupfen) führen

können. Das Moos kann sauber und sicher in einem Bioreaktor gezüchtet werden und benötigt hierfür nur Wasser, Licht und Kohlendioxid (Abb. 5).

Erleichternd kommt hinzu, dass das Moos das produzierte Medikament bereits fertig in seine Nährlösung abgibt und zudem recht anspruchslos ist, was den pH-Wert der Nährlösung angeht, die somit an die Ansprüche des produzierten Eiweißes angepasst werden kann. Das Medikament kann also unter den strengen GMP-Regeln (Good Manufacturing Practice, Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktion von Arzneimitteln und Wirkstoffen), hergestellt werden und es kann vor allem kontinuierlich produziert werden. Bei Bioreaktoren gibt es zudem keine Gefahr der Belastung der Umwelt mit gentechnisch veränderten Organismen oder deren Erbgut, und anders als bei der Produktion in Tieren halten sich ethische Bedenken bei Moosen in Grenzen.

Gegenüber der tierischen Zellkultur hat das Moos den großen Vorteil, dass es nicht so anfällig für Verunreinigungen mit Krankheitserregern und dabei kostengünstiger, einfacher in der Haltung und zudem nahezu geruchsneutral ist. Was vor 20 Jahren als belächelte Nischenforschung begann, hat sich vor allem auch mit Hilfe der Unterstützung durch das BMBF, auch im Rahmen

Abbildung 4: Lebenszyklus des Kleinen Blasenmützenmooses



Der Lebenszyklus von *Physcomitrella patens* wird durch zwei Daseinsformen gekennzeichnet: den haploiden ($1n$ = ein Chromosomensatz pro Zellkern) Gametophyten (produziert Gameten) und den diploiden ($2n$ = zwei Chromosomensätze pro Zellkern) Sporophyten (produziert Sporen).

Sporen entwickeln sich zum fädigen Protonema, das an Knospen Gametophoren bildet (das Moospflänzchen mit seinen Blättern). Diese Gametophoren bilden zwei Arten sexueller Organe aus, weibliche (Archegonien) und männliche (Antheridien), die sich in Gegenwart von Wasser befruchten. Nach der Befruchtung entsteht der Embryo. Dieser wächst zum Sporophyten bzw. zur Mooskapsel heran, in welcher die Sporen gebildet werden (Bild: Pflanzenbiotechnologie Freiburg, Prof. Reski).



Abbildung 5: *Physcomitrella patens* im Photobioreaktor (Bild: Pflanzenbiotechnologie Freiburg, Prof. Reski).

von FRISYS, zu einem potentiellen millionenschweren Markt entwickelt, der in Zukunft alten Menschen das Augenlicht bewahren wird und erkrankten Kindern möglicherweise eine Nierentransplantation ersparen kann.

Steckbrief Forschungsprojekt:

FRISYS – Freiburger Initiative für Systembiologie (FÖKz: 0313921) www.FRISYS.de. FRISYS beschäftigt sich mit der Aufklärung regulatorischer Mechanismen auf zellulärer und suprazellulärer Regulationsebene. Die FRISYS-Projekte konzentrieren sich auf zelluläre Entscheidungsmechanismen, die zu Zelldifferenzierung oder koordinierten Veränderungen in Zellpopulationen führen.

FRISYS ist Teil von FORSYS, den Forschungseinheiten der Systembiologie (www.FORSYS.net), welche durch das BMBF gefördert werden.

Beteiligte Partner:

Kernkompetenz Proteomics, ZBSA, Freiburg

www.zbsa.uni-freiburg.de.

Beteiligte Wissenschaftler:

Annette Büttner-Mainik, Juliana Parsons, Hanna Jérôme, Andrea Hartmann, Stephanie Lamer, Andreas Schaaf, Andreas Schlosser, Peter F. Zipfel, Ralf Reski, Eva L. Decker.

Referenzen:

Büttner-Mainik, A., Parsons, J., Jerome, H., Hartmann, A., Lamer, S., Schaaf, A., Schlosser, A., Zipfel, P.F., Reski, R., Decker, E.L. (2010) Production of biologically active recombinant human factor H in *Physcomitrella*. *Plant Biotechnol J.*, published online ahead of print 17.08.2010.

Decker, E.L., Reski, R. (2007): Moss bioreactors producing improved biopharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 393-398.

Abbildung 6: *Physcomitrella patens* in Flüssigkultur



Bild: Pflanzenbiotechnologie Freiburg, Prof. Reski.

Kontakt:

Prof. Dr. Ralf Reski

ralf.reski@biologie.uni-freiburg.de

PD Dr. Eva Decker

eva.decker@biologie.uni-freiburg.de

Dr. Sabine Stebel

Koordinatorin FRISYS

sabine.stebel@biologie.uni-freiburg.de

Pflanzenbiotechnologie – FRISYS

Fakultät für Biologie

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

GerontoSys

Neue Wege in der Altersforschung

von Petra Boukamp, Jürgen Sühnel, Heinz D. Osiewacz und Björn Dreesen

Altern – jeden betrifft es und jeder leidet irgendwann unter den Folgen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in einer zunehmend mobilen Gesellschaft ein selbstbestimmtes Leben auch im Alter ein zentrales Thema ist. Trotzdem ist über die molekularen Abläufe des Alterns, die zum Auftreten von Erkrankungen, wie Demenz, Stoffwechsel- oder Krebserkrankungen führen, bisher wenig bekannt. Um diesem gesellschaftlichen Wandel gerecht zu werden, unterstützt das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) seit Juli 2008 den Einsatz der „Systembiologie für die Gesundheit im Alter – GerontoSys“. Die Bedeutung dieses Forschungsfeldes für das Ministerium unterstreicht, dass bereits im Dezember 2009 ein weiterer Aufruf

für Projektideen veröffentlicht wurde. Im Fokus beider Fördermaßnahmen steht dabei die systematische Erfassung des komplexen Zusammenspiels altersbedingter Prozesse beim Menschen. Perspektivisch wird hiervon ein Beitrag zur Entwicklung effektiver Therapien für ältere Patienten erwartet.

In der ersten Förderphase konnten Wissenschaftler mit Expertise auf den Feldern der Systembiologie und Altersforschung identifiziert und erfolgreich zusammengebracht werden. Ein lokal vereinigter, arbeitsteilig organisierter Forschungskern und zwei anwendungsorientierte Verbundprojekte erhalten für ihre Arbeiten in den nächsten fünf bzw. drei Jahren insgesamt fast 11 Millionen Euro. Im Rahmen der zweiten Ausschreibungsrunde setzte mit Förderempfehlungen für zwei weitere Forschungskerne, sechs Verbundprojekte und drei Nachwuchsgruppen, die insbesondere der nachhaltigen Stärkung der systembiologischen Altersforschung in Deutschland dienen, das internationale Gutachtergremium von GerontoSys2 ein zukunftsweisendes Zeichen. Durch die Aufwendung weiterer 32 Millionen Euro für diese Maßnahme wird der Projektträger Jülich (PtJ) im Auftrag des BMBF im Frühjahr 2011 insgesamt 43 Millionen Euro Fördergelder für die Altersforschung bewilligen und damit die Grundlage für einen international konkurrenzfähigen Standort entwickelt haben. Mit einer gemeinsamen BMBF-Veranstaltung werden am 26. und 27. September in Berlin der wissenschaftliche Austausch und die Vernetzung der Teilnehmer entlang von Projektpräsentationen im festlichen Rahmen gefördert.

Verteilung der GerontoSys Forschungsgruppen





Bild: Daniel Etzold – Fotolia.com

Projekte aus GerontoSys

Milder Stress gegen Alterung

Dies ist das zentrale Thema mit dem sich der Forschungskern des **Jenaer Centrums für die Systembiologie des Alterns – JenAge** auseinandersetzt. Die zumeist förderliche Reaktion eines Organismus auf geringen Stress wird oft als Hormesis bezeichnet. Sie wurde bereits mehrfach als Mechanismus vermutet, dem z.B. der Effekt einer gesunden Ernährung oder auch anderen lebensverlängernden Behandlungen zugrunde liegt. Das JenAge-Centrum untersucht dieses Phänomen nun aus einem neuen, systembiologischen Blickwinkel. Das Ziel ist die Identifikation von konservierten Transkriptions- oder Stoffwechselnetzwerken, die durch milden Stress aktiviert werden. Zudem soll aufgeklärt werden, inwieweit mit zunehmendem Alter die funktionelle Integrität dieser Netzwerke leidet.

Das JenAge-Centrum verwendet als Untersuchungsobjekte neben Zellkulturen und anderen Tiermodellen, wie z.B. dem Fadenwurm, auch ein neues am Fritz-Lippmann-Institut für die Altersforschung etabliertes kurzlebiges Fisch-Modell, für das die drei JenAge-Forscher Cellerino, Englert und Platzler im September 2010 mit dem Max-Bürger-Preis der Deutschen Gesellschaft für Gerontologie und Geriatrie ausgezeichnet worden sind. Schließlich soll über das Säugetiermodell Maus letztendlich eine Brücke zum Menschen geschlagen werden, für den durch die Beteiligung einer klinischen Gruppe Patientenproben zur Verfügung stehen.

Mit dem neu etablierten JenAge-Centrum wird die Altersforschung in Jena substantiell gestärkt und es werden Bemühungen zur besseren Vernetzung der in Jena vorhandene Expertise, wie sie auch in der Gründung des Jenaer Centrums für die Biologie des Alterns (JCBA) zum Ausdruck kommen, unterstützt.

Projekttitel:

Jenaer Centrum für die Systembiologie des Alterns - JenAge:
Systembiologie von mildem Stress beim gesunden Altern - ein Multi-Spezies-Ansatz.

Beteiligte Partner:

Koordinator Dr. J. Sühnel (Leibniz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lipmann-Institut e. V.), Prof. O. Witte (Universitätsklinikum Jena), Dr. R. Guthke (Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. Hans-Knöll-Institut), Prof. S. Schuster (Friedrich-Schiller-Universität Jena).

Internet: www.jenage.de

Haben die Kraftwerke der Zellen Einfluss auf Alterung

Seit November 2009 beschäftigt sich der Forschungsverbund **GerontoMitoSys** mit der Bedeutung von Mitochondrien, den 'Kraftwerken der Zelle', für die Alterung biologischer Systeme. Das Projekt verfolgt einen systembiologischen Ansatz mittels der mathematischen Modellierung von experimentellen Daten und der Validierung der erhaltenen Modelle in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem Pilz *Podospora anserina*.

Um die Relevanz der an diesen beiden kurzlebigen Modellorganismen gewonnenen neuen Erkenntnisse für Alterungsprozesse bei Säugetieren und zur möglichst starken Annäherung an die Situation beim Menschen zu überprüfen, werden gezielte Untersuchungen an Mäusen und Ratten durchgeführt. Auf diese Weise werden über den derzeitigen Erkenntnisstand hinausgehende Einsichten in die sehr komplexen und netzartig verknüpften molekularen Mechanismen biologischen Alterns gewonnen. Im Vordergrund der ersten Projektphase stand die Formulierung konkreter Fragen für mathematische Modellierungsansätze und die Definition von experimentellen Standards zur Generierung reproduzierbarer, qualitativer und quantitativer Daten. Zur Datenablage und -analyse sowie zum sicheren Datentransfer zwischen den Projektpartnern wurde eine gesicherte Internetplattform erstellt. Ein erstes mathematisches Modell der zellulären Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde generiert, das nun in einer zweiten Phase weiterverfolgt und verfeinert wird. Weitere Modellierungsansätze beschäftigen sich mit den Grundlagen der Bildung von ROS an der Atmungskette und mit zellulären Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle.

Projekttitle:

Mitochondriale Netzwerke von Signalwegen bei der Alterung und der Lebensspannenkontrolle - ein systembiologischer Ansatz.

Beteiligte Partner:

Koordinator Prof. H.D. Osiewicz (Goethe Universität Frankfurt), Prof. N.A. Dencher (TU Darmstadt), Prof. M. Rögner (Ruhr-Universität Bochum), Prof. E. Klipp (Humboldt Universität Berlin), Prof. M. Meyer-Hermann (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig).

Internet: www.gerontomitosys.uni-frankfurt.de

Alter(n) geht unter die Haut

Deshalb schaut sich das Gerontosys Konsortium **Stromal Aging** die Zellen der tieferen Hautschichten an, weil dort die Erklärung für die Hautalterung, wie Faltenbildung oder Bindegewebschwäche, vermutet wird. Bisherige Studien zur Alterung haben Zellen in der Petrischale altern lassen. In der Tat hören die Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen auf zu wachsen und zeigen vielfältige Veränderungen. Das wirkliche Altern ist aber wahrscheinlich viel komplexer. Erste Erkenntnisse des Projektes zeigen, dass die Zellen in menschlicher Haut, anders als ursprünglich vermutet, weit mehr und andere Veränderungen zeigen als in der Petrischale gealterte Zellen. Aus diesem Grund baut das Konsortium eine Zell- und Gewebekbank aus Hautproben auf, die einzigartig auf der Welt ist. Probanden im Alter zwischen 20 und 70 Jahren wird aus lichtexponierten und -geschützten Stellen, dem Nacken und dem Gesäß, Hautproben entnommen, um sie mittels neuester wissenschaftlicher Methoden und bildgebenden Verfahren auf Gen-, RNA- und Proteinebene zu charakterisieren. Mit Zellkulturen, die aus diesen Proben etabliert werden, kann die Relevanz bestimmter Befunde funktionell in der Haut vergleichbaren Modellen, sog. organotypischen Kulturen, dann auch verifiziert werden.

Die Kombination von Zellbank und Zellkultur erlauben erstmalig die Anwendung verschiedenster systembiologischer Methoden, um im Computer den Verlauf der Hautalterung nachzuvollziehen, d.h. um zu ergründen, welche Prozesse sich in den Zellen

über die Jahre ändern. Alterung der Haut zeigt sich aber nicht nur in den bekannten Ausprägungsmerkmalen wie Faltenbildung, sondern auch in geänderten dynamischen Regenerationsprozessen auf Zeitskalen von Tagen bis Wochen, wie z.B. verlangsamte Wundheilung der Haut. Die Zellbank erlaubt es nun, diese Prozesse in unterschiedlich alten Zellen zu studieren. Mittels Analyse und von genregulatorischen Netzwerken können wir in mathematischen Modellen diese Entscheidungspunkte zellulärer Steuerung identifizieren und vergleichen, wie und wo altersbedingte Veränderungen in den Zellen entstehen. Damit wird der Grundstein gelegt, auch das 'Warum' des Alterns zu verstehen, nämlich altersbestimmende Signalwege identifizieren und möglicherweise auch kontrollieren zu können.

Projekttitle:

Stromale Alterung.

Projektpartner:

Koordinatorin Prof. P. Boukamp (DKFZ Heidelberg), Dr. K. Stühler (Ruhr-Universität Bochum), Dr. F. Theis (Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt GmbH), Dr. H. Busch (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg), Dr. N. Grabe (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg), Prof. G. Reifenberger (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), Prof. J. Krutmann (Institut für umweltmedizinische Forschung GmbH an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Kontakt:

Dr. Björn Dreesen

Projekträger Jülich
Geschäftsbereich Biotechnologie
Forschungszentrum Jülich GmbH
b.dreesen@fz-juelich.de

www.fz-juelich.de/ptj

heidelberg und mannheim werden zum mekka für systembiologen

Die 12. Internationale Konferenz für Systembiologie (ICSB) 2011

28. August – 01. September 2011

von Klaus-Peter Michel, Jan Eufinger, Ulrike Conrad, Angela Oberthür und Roland Eils

Internationale Kongresse und Tagungen sind das Salz in der Suppe des Alltags von Forscherinnen und Forschern. Sie bieten einen willkommenen Anlass, um dem „Klein-Klein“ des hektischen Laboralltags zu entfliehen und Wissenschaft mal wieder ganz anders und inspirierend zu erleben. Beim Wiedersehen mit Kollegen, alten Bekannten und Freunden können Projekte reflektiert oder neue interessante Bekanntschaften gemacht werden. Der Besuch einer Tagung ist immer auch ein guter Zeitpunkt, die eigene Forschung und die eigenen wissenschaftlichen Projekte einer kritischen Überprüfung zu unterziehen. Trotz mannigfaltiger elektronischer Möglichkeiten, über E-Mail, Twitter, Facebook und Co. miteinander in Kontakt zu treten, sind es doch allzu oft nur die auf Konferenzen gebotenen intensiven Austauschmöglichkeiten mit anderen Wissenschaftlern, die den Beginn neuer wissenschaftlicher Projekte und Kooperationen einläuten. Darüber hinaus bieten Konferenzen immer auch die Chance, sich in kompakter Form einen aktuellen Überblick über die Trends und aktuellen Forschungsergebnisse zu verschaffen und den eigenen Kenntnisstand aufzufrischen.

In dieser Hinsicht wird es die Gemeinschaft deutscher Systembiologen freuen, dass es einem Gremium renommierter Wissenschaftler um Prof. Roland Eils (Foto, DKFZ und Universität Heidelberg) gelungen ist, zum zweiten Mal nach 2004 die *International Conference on Systems Biology (ICSB)* ausrichten zu dürfen. Die ICSB ist die weltweit größte und bedeutendste Tagung zur Systembiologie und wird von der *International Society for Systems Biology (ISSB)* im jährlichen Turnus veranstaltet. Der Grundstein für die Konferenzserie wurde im Jahr 2000 mit einer Konferenz in Tokio unter der Ägide von Prof. Hiroaki Kitano gelegt. Kitano ist einer der Gründungsväter und weltweit anerkanntesten Protagonisten der aktuellen Systembiologieforschung.

Im Jahr 2011 wird das Hauptprogramm der ICSB in der Zeit vom 28. August bis 1. September im Konferenzzentrum Rosengarten im Zentrum von Mannheim stattfinden (Abb. 1). Eingerahmt wird die Konferenz von spezifischen Workshops und Tutorien, die auf dem naturwissenschaftlichen Campus in Heidelberg am Systembiologie-Zentrum BioQuant der Universität und am Deutschen Krebsforschungszentrum stattfinden.

„Wir freuen uns sehr, Systembiologen aus der ganzen Welt in Heidelberg und Mannheim willkommen zu heißen“, sagt Konfe-

Abbildung 1:



Links: Frontansicht des Rosengartens. Rechts: Erweiterungsbau des Konferenzzentrums Rosengarten (Bildrechte m:con – mannheim:congress GmbH).



Abbildung 2: Oberes Foyer des Kongresszentrums Rosengarten (Bildrechte m:con – mannheim:congress GmbH).

renzpräsident Prof. Roland Eils. „2004 steckte die Systembiologie in Deutschland noch in den Kinderschuhen, und somit gab die ICSB 2004 gewissermaßen einen Startschuss für die enorme Entwicklung dieser Forschungsrichtung in Deutschland. Daher macht es mich besonders stolz, im Jahre 2011 die ICSB wieder bei uns in Heidelberg/Mannheim zu haben und einem breiten Publikum die in den letzten Jahren erreichten Erfolge darstellen zu können.“ Bundesministerin Frau Prof. Dr. Schavan unterstreicht als Schirmherrin der Konferenz die Wichtigkeit der systembiologischen Forschung für Deutschland.

In die Planung des Programms sind zahlreiche Systembiologen aus dem In- und Ausland involviert. Neben Roland Eils gehören dem Organisationskomitee Peer Bork (EMBL Heidelberg), Thomas Höfer (DKFZ Heidelberg), Ursula Klingmüller (DKFZ Heidelberg), Ursula Kummer (Universität Heidelberg) und Peter Sorger (Harvard Medical School, Boston) an. Unterstützt wird dieses Team von

Prof. Roland Eils lädt in seiner Funktion als Kongresspräsident zur 12. Internationalen Konferenz für Systembiologie 2011 ein.



Bild: DKFZ und Universität Heidelberg

den mehr als 30 Kolleginnen und Kollegen des wissenschaftlichen Komitees und den Geschäftsstellen von FORSYS (Klaus-Peter Michel, Ulrike Conrad), der Helmholtz-Allianz Systembiologie (Jan Eufinger) und BioQuant/ViroQuant (Angela Oberthür). Wie auch in den Jahren zuvor in Göteborg 2008, Stanford 2009 und Edinburgh 2010 werden wieder über 1000 Teilnehmer erwartet.

Dass es sich bei der ICSB um einen beachtenswerten Kongress handelt, zeigt die Dimension des viertägigen Hauptprogramms: Im Wechsel zwischen Plenums- und Parallelvorträgen haben 17 Plenarredner ihre Teilnahme zugesagt, in den insgesamt 21 parallelen Sitzungen werden noch einmal rund hundert Sprecher zu verschiedensten Themen der Systembiologieforschung vortragen.

„Besonders freuen wir uns auf die Vorträge unserer beiden Ehrensprecher“, erläutert Eils. Zu Beginn wird Nobelpreisträger Roger Tsien von der Universität Kalifornien in San Diego über seine bahnbrechenden Arbeiten zur Entwicklung von Molekülen, mit denen zelluläre Prozesse „ausspioniert“ werden können, sprechen. Prof. Tsien, ein Mitglied der US-amerikanischen National Academy of Science und der britischen Royal Academy, wurde im Jahr 2008 zusammen mit zwei seiner Kollegen der Nobelpreis für Chemie für seine Arbeiten zur Entdeckung und Weiterentwicklung des *Green Fluorescent Protein (GFP)* verliehen. Mithilfe von GFP, verwandten Proteinen und anderen fluoreszierenden Molekülen gelingt es Wissenschaftlern, intrazelluläre Prozesse *in vivo*, also in der lebenden Zelle, zu visualisieren und dadurch zu verstehen.

Mit dem gebürtigen Niederländer Alexander van Oudenaarden konnte ein zweiter Spitzenforscher als Ehrensprecher für die ICSB gewonnen werden. Prof. Oudenaarden, Lehrstuhlinhaber für Systembiologie am renommierten Massachusetts Institute for Technology (MIT) in den USA, hat in den letzten Jahren mit seinen Arbeiten zur individuellen Variation der Genexpression und zu Evolutionsprozessen in Zellpopulationen, die in renom-



Abbildung 3: Eingangsfoyer des Kongresszentrums Rosengarten (Bildrechte m:con – mannheim:congress GmbH).

mierten Zeitschriften wie *Nature*, *Science* und *Cell* veröffentlicht sind, wichtige Beiträge zum Verständnis von beobachteten, nicht genetisch erklärbar Variationen zwischen Zellen geleistet. Van Oudenaarden wird am letzten Tag der Konferenz sprechen.

Neben den beiden erwähnten Highlights wird es eine Reihe von ebenso interessanten wie hochkarätigen Hauptreden geben, allesamt gehalten von international anerkannten Systembiologen. Unter den Rednern finden sich so bekannte Namen wie Judy Armitage (Großbritannien), Naama Barkai (Israel), Philippe Bastiaens (Deutschland), Gaudenz Danuser (USA), Sandro J. de Soza (Brasilien), Trey Idecker (USA), Josef A. Käs (Deutschland), Markus Covert (USA), Andrew J. Millar (Großbritannien), Gioacchino Natoli (Italien), Ytzhak Pilpel (Israel), Eytan Ruppim (Israel), Uwe Sauer (Schweiz), Kim Sneppen (Dänemark) und Jochen Wittbrodt (Deutschland). Jede(r) dieser Rednerinnen und Redner gilt als ausgewiesener Experte seines Gebiets, das sich von der pflanzlichen Systembiologie über diverse Themengebiete bis hin zur Krebsforschung erstreckt.

Neben dem wissenschaftlichen Hauptprogramm wird die ICSB 2011 eine Reihe weiterer interessanter Programmpunkte bieten. Im Rahmen der Industrieausstellung werden sich Firmen präsentieren, die im Rahmen einer *Industry-Session* auch die Bedeutung der Systembiologie für ihre Forschung beleuchten werden.

Dem Gedanken, dass moderne lebenswissenschaftliche Forschung nicht mehr im „stillen Kämmerlein“, sondern aufgrund des heutzutage notwendigen Ressourceneinsatzes nur noch in Gemeinschaftsprojekten möglich ist, folgt die sogenannte Science Arena. Im Rahmen dieser Science Arena können sich Universitäten, nicht-kommerzielle Forschungsinstitute, Wissenschaftsinitiativen und andere Einrichtungen vorstellen und ihre besondere Expertise und Forschungsrichtung präsentieren. So kann beispielsweise neuer Nachwuchs gewonnen oder neue Allianzen geschmiedet werden. Die Science Arena wird in direkter Anbindung an die Industrieausstellung im lichtdurchfluteten oberen Foyer des Rosengartens stattfinden (Abb. 2).

Einen ebenso wichtigen wie unerlässlichen Programmpunkt der ICSB werden die Postersessions einnehmen, die im großzügigen Eingangsfoyer des Kongresshauses Rosengarten stattfinden werden (Abb. 3). Auf großformatigen Postern wird sowohl dem wissenschaftlichen Nachwuchs als auch dem gestandenen Wissenschaftler die Möglichkeit gegeben, eigene Ergebnisse zu präsentieren und im persönlichen Gespräch mit den Kollegen zu diskutieren.

„Natürlich wollen wir unseren Gästen auch die Gastfreundschaft von Heidelberg und der Region nahe bringen. Die optionale Schifffahrt auf dem Neckar mit anschließendem Konferenzdinner auf dem Heidelberger Schloss wird da sicher in Erinnerung bleiben“, sagt Roland Eils. „Besonders freue ich mich auf die Systembiologie-Party-Night am letzten Abend der Konferenz. Nach einem Spezialvortrag werden hier alle Gäste noch einmal die Gelegenheit haben, gemeinsam eine hoffentlich gelungene Konferenz kräftig zu feiern.“ Ergänzt wird das Tagungsprogramm der ICSB 2011 sowohl für die Tagungsteilnehmer als auch deren Begleitpersonen durch ein abwechslungsreiches Sightseeing-Programm in und um Heidelberg und Mannheim.

Details und Informationen zur Konferenz entnehmen Sie bitte der Homepage der Konferenz unter www.icsb-2011.net. Darüber hinaus stellen die Veranstalter allen Interessierten einen Conference Blog (<http://icsb2011.blogspot.com>) und einen Twitter Feed (http://twitter.com/icsb_2011) zur Verfügung, um sich über das tagesaktuelle Geschehen zur ICSB 2011 zu informieren.

e:Bio – Innovationswettbewerb Systembiologie

Mit der Fördermaßnahme „e:Bio – Innovationswettbewerb Systembiologie“ gibt das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) einen weiteren entscheidenden Impuls für die Entwicklung der Systembiologie in Deutschland. e:Bio ist eine Plattform für Forschung, die mit Hilfe der Systembiologie einen direkten und neuartigen Beitrag zur Lösung gesellschaftlicher Probleme leistet. Vor dem Hintergrund des „Rahmenprogramms Gesundheitsforschung“ und der „Nationalen Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030“ können vielfältige Anwendungen z.B. in der Biomedizin und der Biotechnologie adressiert werden.

Der Innovationswettbewerb vereint vier Module unter einem Dach, in denen erfolgreiche Ansätze weiterverfolgt oder neue Aspekte eingebracht werden können. Im „Ideenwettbewerb national“ (I) werden neue Impulse, Ideen und Innovationen aufgenommen, während im „Transfer“ (II) Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung aufgegriffen und mit Blick auf mögliche Anwendungen weiterentwickelt werden. Junge Wissenschaftler/innen etablieren sich in „Nachwuchs“ (III) mit eigenen systembiologischen Vorhaben. Transnationalen Verbänden wird im „Ideenwettbewerb international“ (IV) eine Plattform zur wissenschaftlichen Zusammenarbeit gegeben. Erste Einreichungsfrist für Projektskizzen zu den Modulen I, II und III war der 02. Mai 2011, Modul IV wird zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht. Nächste Einreichungsfrist für die Module II und III ist der 02. Mai 2012.

Quelle: BMBF

Einzelner Gendefekt löst Hirntumor aus

Wissenschaftler aus dem DKFZ und dem Universitätsklinikum Heidelberg konnten an Mäusen zeigen, dass ein Defekt in einem einzigen Gen ausreicht, um einen gefährlichen Hirntumor auszulösen.

Das pilozytische Astrozytom, der häufigste Hirntumor bei Kindern, wächst langsam und ist meist gutartig. Der diffus wachsende Tumor kann jedoch oft nicht gänzlich herausoperiert werden, was Folgetherapien nötig macht. Da Chemo- oder Strahlentherapie gerade diese sehr langsam wachsenden Tumoren kaum beeinflusst, sind die erkrankten Kinder dringend auf neue, zielgerichtete Behandlungen angewiesen. In der überwiegenden Mehrzahl der pilozytischen Astrozytome liegt ein Fehler im Gen BRAF vor,

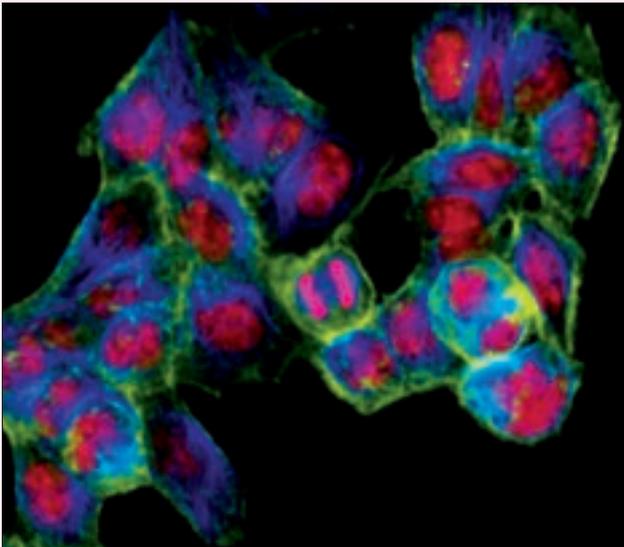
wodurch ein wichtiger zellulärer Signalweg, der in gesunden Zellen nur bei akutem Bedarf eingeschaltet wird, dauerhaft aktiv ist.

Jan Gronych und Kollegen verpackten ein defektes BRAF-Gen in ein Virus und schleusten es so in Nervenvorläuferzellen von Mäusen ein. Bei 91 % der so behandelten Tiere entwickelten sich im Bereich der Injektionsstelle Tumoren, die in Biologie, Wachstumseigenschaften und Gewebestruktur dem pilozytischen Astrozytom entsprachen. Die Zellen dieser Tumoren zeigten alle das typische Symptom eines defekten BRAF-Gens, was zu einer dauerhaften Aktivierung des Enzyms MAP-Kinase führte, das der Krebszelle permanent Wachstumssignale liefert. „Das beweist, dass tatsächlich ein einziger Gendefekt ausreicht, um ein pilozytisches Astrozytom auszulösen“, fasst Professor Lichter die Ergebnisse zusammen. Die BRAF-Mäuse eröffnen nun als neues Modellsystem die Möglichkeit, neue Kinase-Inhibitoren oder auch andere Medikamente gezielt auf ihre Wirksamkeit gegen diese Krebserkrankung zu testen.

Quelle: Pressemitteilung Deutsches Krebsforschungszentrum

Facebook für Gene: Neues Verfahren zeigt wie Gene zusammenarbeiten

Mithilfe eines Vergleichs von Genvarianten von gesunden und kranken Menschen gelingt es heutzutage, das individuelle Risiko für eine spezifische Erkrankung abzuleiten. Da häufig nicht nur ein Gen, sondern erst das Zusammenwirken verschiedener Gene krankheitsauslösend ist, ist die jetzt von Michael Boutros (DKFZ/Universität Heidelberg) und Wolfgang Huber vorgestellte und in *Nature Methods* veröffentlichte Methode, die gezielt Gen-Kombinationseffekte aufgedeckt, ein echter wissenschaftlicher Durchbruch. Durch das Ausschalten (RNA-Interferenz) einzelner Gene und aller paarweisen Kombinationen gelang eine systematische Katalogisierung aller Wechselwirkungen zwischen wichtigen Signalmolekülen. Für jedes Gen konnte eine Liste von Interaktionspartnern, vergleichbar mit einer „Freundes-Liste“ im sozialen Netzwerk „Facebook“ erstellt werden. „Wenn zwei Nutzer von Facebook die gleichen Freunde haben, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die beiden sich kennen – auch dann, wenn sie selbst nicht „Facebook-Freunde“ sind“, erklärt Boutros. „Übertragen auf die Situation im Erbgut kann man durch den Vergleich ihrer Wechselwirkungen vorhersagen, welche Gene eine gemeinsame Funktion ausüben.“



Rot gefärbte Zellkerne mit der Erbsubstanz DNA (Bild: DKFZ).

Diese Methode wird deshalb dazu beitragen, neue Komponenten krebsrelevanter Signalketten und mögliche Angriffspunkte für neue Krebstherapien zu finden. Horn, T. *et al.* 2011; *Nature Methods*, Adv. Onl. Publ. 6 March 2011. DOI: 10.1038/nmeth.1581.

Quelle: Pressemitteilung Deutsches Krebsforschungszentrum

Die Schätze aus dem Datenschwungeln heben: DKFZ und IBM unterzeichnen Rahmenvertrag zur Krebsgenomanalyse

Beim Internationalen Krebsgenomprojekt (ICGC) wird das komplette Erbgut von Tausenden Krebspatienten analysiert. Dabei fallen enorme Datenmengen an. Um die für die Krebsentstehung und -therapie entscheidenden Genabschnitte zu finden, bedarf es intelligenter IT-Systeme. Das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg und IBM haben deshalb auf der CeBIT 2011 einen strategischen Rahmenvertrag unterzeichnet. Ziel der Vereinbarung ist es, die Sequenzdaten für die Krebsmedizin nutzbar zu machen.

„In den nächsten Jahren wird die Sequenzierung von Krebsgenomen erhebliche Mengen an Daten hervorbringen. Das wird die Diagnose und die Therapie von Krebspatienten grundlegend verbessern“, sagt Professor Otmar D. Wiestler, Vorstandsvorsitzender des Deutschen Krebsforschungszentrums. „Doch um die Erkenntnisse aus der enormen Datenflut auch wirklich nutzen

zu können, benötigen wir eine intelligente Informationstechnologie. Sie hilft uns dabei, die wirklich entscheidenden Abschnitte zu erkennen und zu verwerten. Mit IBM haben wir einen idealen Partner für diese große Aufgabe gefunden.“

Der Rahmenvertrag zwischen dem DKFZ und IBM umfasst verschiedene Aspekte des Umgangs mit den riesigen Datenmengen, die in den Lebenswissenschaften anfallen. Darunter sind Strategien zur effektiven Kompression von Sequenzdaten, ähnlich wie bei MP3 Files in der Musikbranche, und Lösungen für den effektiven Transfer von Datenmengen zwischen den Speichereinrichtungen und den Hochleistungscomputern für die Analyse. Außerdem sollen Verfahren entwickelt werden, um die Genomdaten mit klinischen Parametern wie dem Fortschreiten der Erkrankung oder dem Ansprechen auf zielgerichtete Medikamente abzugleichen.



Prof. Otmar D. Wiestler, wissenschaftlicher Stiftungsvorstand des Deutschen Krebsforschungszentrums (links) und Martin Jetter, Vorsitzender der Geschäftsführung der IBM Deutschland GmbH (Bild: DKFZ).

Die Daten der drei deutschen ICGC-Projekte laufen bei Professor Roland Eils am DKFZ zusammen. Professor Eils baut dazu am BioQuant-Zentrum der Universität Heidelberg eine der weltweit größten Datenspeichereinheiten für die Lebenswissenschaften auf. Man rechnet damit, für die Speicherung der Genomsequenzen Datenspeicher im Umfang von sechs Petabyte in Betrieb zu nehmen.

Quelle: Pressemitteilung Deutsches Krebsforschungszentrum

Helmholtz Zentrum München klärt molekularen Mechanismus der Bildung von neuronalen Verschaltungen auf

Wissenschaftler am Helmholtz Zentrum München haben herausgefunden, wie sensorische und motorische Fasern bei der Nervenbildung der Gliedmaßen interagieren: Beide Typen von Nervenfasern können diesen Prozess anführen. Damit leisten die Forscher einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Entstehung neuronaler Netzwerke während der Embryonalentwicklung und finden einen neuen Erklärungsansatz für neurodegenerative Störungen.

Bei der Nervenbildung in den Gliedmaßen wirken während der Embryonalentwicklung sensorische und motorische Nervenfasern zusammen. Das Team um Dr. Andrea Huber Brösamle hat nun herausgefunden, wie diese Zusammenarbeit auf molekularer Ebene funktioniert: der Oberflächenrezeptor Neuropilin-1 ist sowohl in motorischen und sensorischen Nervenfasern vorhanden und kontrolliert deren Interaktion zum richtig gesteuerten Wachstum.

In der Studie wurde beobachtet, dass sowohl motorische als auch sensorische Fasern die Führung übernehmen können, wenn es darum geht, die Spinalnerven von Armen und Beinen zu bilden. Diese Erkenntnis überraschte insofern, als bisher angenommen wurde, dass motorische Nerven stets den korrekten Weg festlegen. Zugleich schaffen sie ein Modell, um strukturelle Anpassungen nach Traumata und bei neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen verstehen zu können: „Herauszufinden, inwieweit Neuropilin-1 auch die Nervenfaserbildung im Gehirn beeinflusst, ist unser nächstes Ziel“, so Huber Brösamle.

Original-Publikation: Huettl R.E. *et al.* (2011). PLoS Biol 9(2): e1001020. doi:10.1371/journal.pbio.1001020

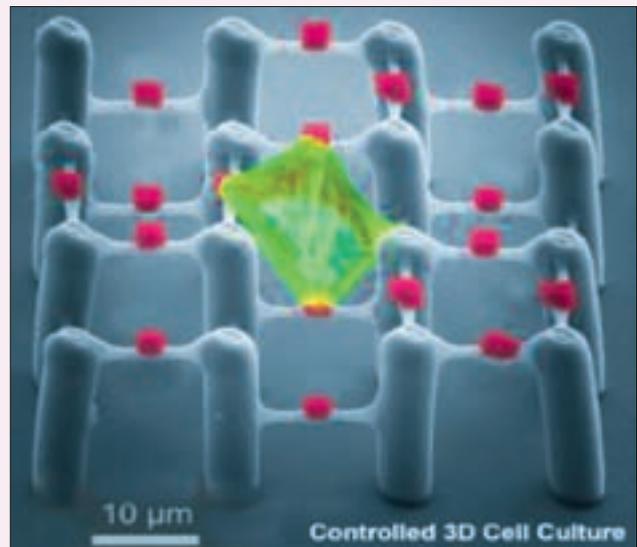
Quelle: Helmholtz Zentrum München

Dritte Dimension in gezielter Zellkultivierung realisiert
CFN-Wissenschaftler entwickeln ein Zweikomponenten-Polymergerüst für die kontrollierte drei-dimensionale Zellkultur.

Forschern des DFG-Centrums für Funktionelle Nanostrukturen (CFN) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) ist es ge-

lungen, gezielt Zellen auf dreidimensionalen Strukturen zu kultivieren. Das Faszinierende daran ist, dass den Zellen Mikrometer-kleine „Griffe“ am Gerüst angeboten werden, an denen sie anhaften können - und zwar nur an diesen Punkten - am restlichen Gerüst finden sie keinerlei Halt.

Mit diesen Ergebnissen ist dem Team um Professor Martin Bastmeyer ein großer Fortschritt im Bereich des Biomaterial-Engineerings gelungen, da die Haftung und somit die Form einer Zelle erstmalig präzise in 3D beeinflusst werden konnte. Mit dieser Technik lassen sich Parameter wie Zellform, Zellvolumen, intrazelluläre Kraftentwicklung oder zelluläre Differenzierung systematisch in Abhängigkeit von der äußeren Geometrie der Umgebung bestimmen.



Zelle im Zweikomponenten-Polymergerüst (Bild: CFN).

Diese Erkenntnisse sind sehr nützlich, um später gezielt dreidimensionale Wachstumsumgebungen für Gewebekulturen, die beispielsweise in der regenerativen Medizin benötigt werden, in größerem Maßstab herzustellen. Die Ergebnisse sind ein wichtiger Schritt zum allgemeinen Verständnis, wie die natürliche dreidimensionale Umgebung im Gewebe das Verhalten von Zellen beeinflusst.

Weitere Informationen finden Sie unter:

www.kit.edu/besuchen/pi_2011_6187.php

Quelle: Pressemitteilung KIT Karlsruhe

Neues Target für Hepatitis C-Therapie entdeckt

Mehr als 170 Millionen Menschen leiden weltweit an einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (HCV). Hepatitis C kann die Leber fortschreitend zerstören und zu Krebs führen. Derzeitige Therapien führen nur bei 50% der Erkrankten zu einer Heilung und sind durch zahlreiche Nebenwirkungen gekennzeichnet. Ein Impfstoff zur Prävention der HCV-Infektion ist gegenwärtig nicht in Sicht.

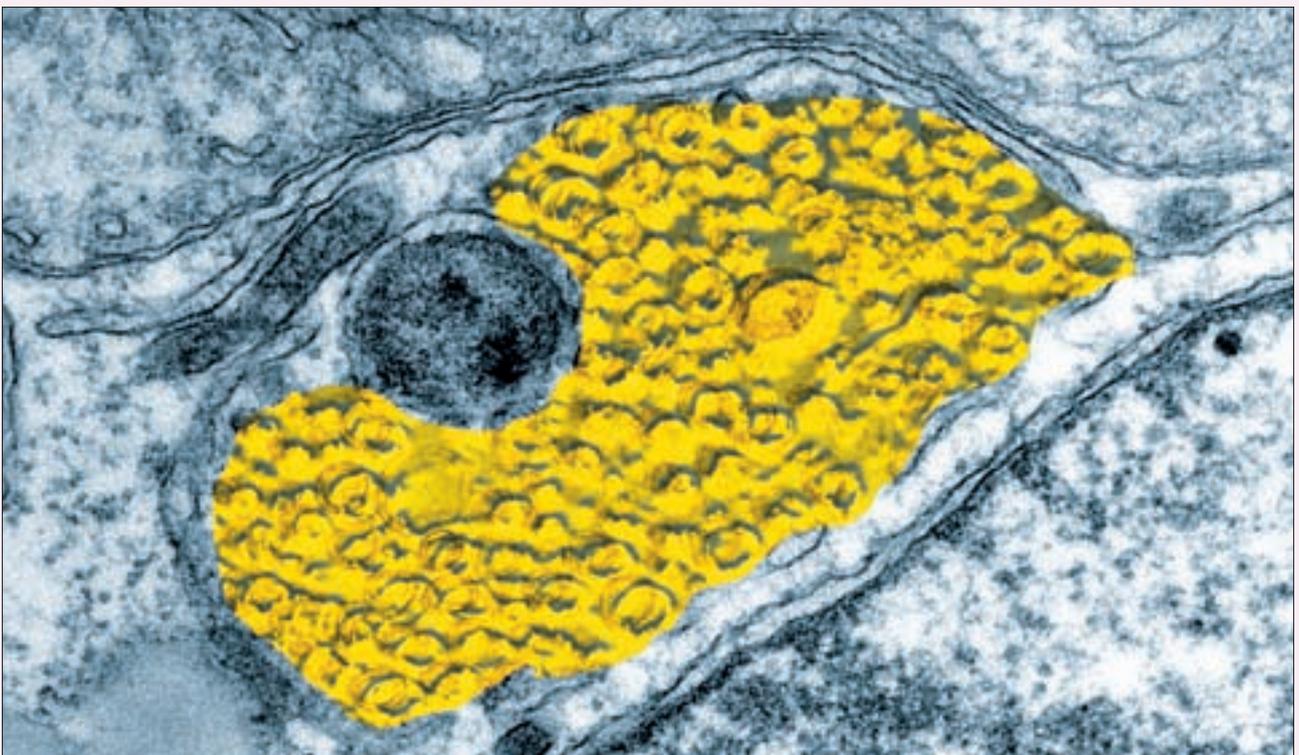
Die Forscher um Dr. Volker Lohmann und Prof. Dr. Ralf Bartenschlager, Universitätsklinikum Heidelberg, konnten im Rahmen des BMBF-geförderten FORSYS-ViroQuant-Konsortiums nun ein zelluläres Schlüsselprotein identifizieren, das die Grundlage für neue Behandlungsansätze von HCV-Infektionen schafft. Unter Verwendung eines genomweiten Screening-Assays wurde das Enzym Phosphatidylinositol 4-Kinase-III-alpha (Pi4KIII α) als kritischer Wirtszellfaktor für die erfolgreiche Vermehrung von HCV in Leberzellen identifiziert. Die Wissenschaftler klärten auch, wie

das Virus auf molekularer Ebene die Lipid-Kinase (Pi4KIII α) für seine Replikation ausnutzt. Das virale Protein (NS5A) rekrutiert das Enzym in der Leberzelle an die Stelle, wo die Virusvermehrung stattfindet und aktiviert Pi4KIII α durch Bindung direkt. Daraufhin produziert das Enzym Pi4KIII α große Mengen des Botenstoffs PI4P, der essentiell für die Funktionalität des viralen Replikationskomplexes ist.

Original-Publikation: Reiss S, Rebhan I, Backes P, Romero-Brey I, Erfle H, Matula P, Kaderali L, Poenisch M, Blankenburg H, Hiet MS, Longereich T, Diehl S, Ramirez F, Balla T, Rohr K, Kaul A, Bühler S, Pepperkok R, Lengauer T, Albrecht M, Eils R, Schirmacher P, Lohmann V, Bartenschlager R. (2011)

„Recruitment and Activation of a Lipid Kinase by Hepatitis C Virus NS5A Is Essential for Integrity of the Membranous Replication Compartment.“ *Cell Host & Microbe*, Volume 9, Issue 1, 32-45, 20 January 2011.

Quelle: Pressemitteilung Universitätsklinikum Heidelberg



Elektronenmikroskopisches Bild einer Leberzelle, der das Schlüsselprotein Pi4KIII α fehlt. Veränderte Strukturen führen vermutlich dazu, dass sich das Hepatitis C-Virus nicht mehr vermehren kann (Bild: Ralf Bartenschlager und Volker Lohmann, Universitätsklinikum Heidelberg).

Neue Diagnostik für akute myeloische Leukämie

Das Wissenschaftler-Team um Dr. Philipp Greif und Prof. Stefan Bohlander in der Klinischen Kooperationsgruppe „Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie (AML)“ des Helmholtz Zentrums München (HZM) und der Medizinischen Klinik III der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), haben eine Methode entwickelt, mit der sie nur die in Tumorzellen aktiven Gene auf Veränderungen untersuchen können.

Mit Hilfe einer Transkriptom-Sequenzierung konnten fünf bisher unbekannte AML-spezifische Gen-Mutationen gefunden werden, von denen zwei (RUNX1 und TLE4) mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Entscheidende Unterstützung erhielten die Forscher dabei von Dr. Tim Strom vom Institut für Humangenetik des HZM. „Ohne die am Institut für Humangenetik vorhandenen Sequenziergeräte der neuesten Generation und die dazu gehörige Auswertungskompetenz, wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen“, erläutert Greif. Durch die neue Art der Diagnostik könnten erstmals bei jedem Patienten die spezifischen genetischen Veränderungen bestimmt werden, um daraus nicht nur den individuellen Krankheitsverlauf genauer vorherzusagen, sondern auch das Ansprechen der Therapie besser zu überwachen, drohende Rezidive frühzeitig zu erkennen und Angriffspunkte für eine gezielte Therapie abzuleiten. Für die Erkenntnisse der Studie erhielt Greif 2010 den *Merit Award der International Society of Oncology and Biomarkers* und den Forschungspreis der Anne-Liese-Gaebel-Stiftung. Das Projekt wird von der Deutschen Krebshilfe gefördert und die Ergebnisse wurden kürzlich in der Fachzeitschrift *Leukemia* veröffentlicht.

Quelle: Pressemitteilung Ludwig-Maximilians-Universität München

Natürliche Killerzellen unter Kontrolle – Modellierung identifiziert Schaltstelle von Immunzellen

Das menschliche Immunsystem besitzt zahlreiche Mechanismen, um den Körper vor einer Schädigung durch Viren oder entarteten eigenen Zellen zu schützen. Eine Schlüsselrolle nehmen dabei die sogenannten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ein. Diese Immunzellen können Tumorzellen und mit Viren infizierte Zellen erkennen und gezielt abtöten. Sie bilden also eine potente Waffe des Immunsystems. Wie diese Waffen unter Kontrolle gehalten werden und z. B. eine Attacke von gesunden Zellen vermieden wird,

haben jetzt Wissenschaftler der Universität Heidelberg und des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) untersucht. In der im Fachjournal *Science Signaling* erschienenen Studie, die im Rahmen eines Projekts des SBCancer-Netzwerks der Helmholtz-Allianz Systembiologie durchgeführt wurde, konnten die Gruppen von Prof. Carsten Watzl (Institut für Immunologie, Universität Heidelberg) und Prof. Roland Eils (BioQuant, Universität Heidelberg und DKFZ) zeigen, dass das regulatorische Protein Vav1 eine entscheidende Rolle im Aktivierungsprozess spielt.

Durch eine Kombination aus mathematischer Modellierung und experimenteller Überprüfung konnten die Wissenschaftler nachweisen, dass Vav1 permanent sowohl Signale von aktivierenden wie auch von inhibitorischen Rezeptoren auf der Außenseite der NK-Zellen erhält, die zu einer Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Vav1 führen. Das Protein fungiert dabei als eine Art Schalter, der über verschiedene Vermittlerproteine (Kinasen und Phosphatasen) sehr schnell reguliert wird und dabei entscheidend für die Tötungsaktivität der NK-Zellen ist. Durch den Einsatz von mathematischen Methoden wurden hier neue Einsichten in die Integration von positiven und negativen Signalen bei diesem Schlüsselprozess in NK-Zellen gewonnen. Dieser neue Ansatz bietet außerdem ein großes Potenzial für die Untersuchung von ähnlichen Entscheidungsprozessen in anderen Immunzellen.

Original-Publikation: Mesecke, S., Urlaub, D., Busch, H., Eils, R., and Watzl, C. Integration of Activating and Inhibitory Receptor Signaling by Regulated Phosphorylation of Vav1 in Immune Cells. *Science Signaling* 4, ra36 (2011).

events

International Conference on the Systems Biology of Human Disease (SBHD)

22.-24. Juni 2011, Boston, USA

Die internationale SBHD widmet sich speziell der Systembiologie menschlicher Erkrankungen und den korrespondierenden Therapien. Zum zweiten Mal nach 2010 wird die Konferenz von Prof. Peter Sorger (Harvard Medical School, Boston) und dem Council for Systems Biology in Boston (www.csb2.org) in Zusammenarbeit mit den größten deutschen Systembiologie-Initiativen, der Helmholtz-Allianz Systembiologie und FORSYS – Forschungseinheiten der Systembiologie, organisiert. Auch in diesem Jahr konnten dank der großzügigen Unterstützung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 30 Reise-Stipendien für Doktoranden und junge Postdoktoranden aus-ge-lobt werden. In 2012 wird die Konferenz erstmalig in Heidelberg stattfinden. Die SBHD 2011 wird neben interessanten Vorträgen auch zwei Postersessions mit Redebeiträgen aus ausgewählten Posterbeiträgen präsentieren.

Informationen zur Konferenz finden Sie unter:

www.csb2.org/events/sbhd-2011



4. Berlin Summer Meeting

23.-25. Juni 2011, Berlin

Das diesjährige 4. Berlin Summer Meeting wird am 23.-25. Juni im traditionsreichen Langenbeck-Virchow-Haus in Berlin-Mitte stattfinden. Das Berlin Institute for Medical Systems Biology am MDC Berlin-Buch (BIMSB) koordiniert diese interdisziplinäre Konferenz, die von Prof. Nikolaus Rajewsky ins Leben gerufen wurde. Mit dem Titel „From RNA to Protein and beyond“ greift das Meeting zentrale Themen der post-transkriptionellen Regulation auf.

Die Sprecher, die zu diesem Thema beitragen werden, sind:

Gianni Cesareni, University of Rome

Anne Ephrusse, EMBL Heidelberg

Anne-Claude Gavin, EMBL Heidelberg

Michael Hengartner, IMLS University of Zurich

Matthias Hentze, EMBL Heidelberg

Elisa Izaurrealde, MPI for Biochemistry, München

Nikolaus Rajewsky, MDC Berlin

Uwe Sauer, ETH Zurich

Rob Singer, ASB-AECOM New York

Thomas Tuschl, Rockefeller University New York

Karen Vousden, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow sowie Kurzpräsentationen, die über das Abstract-Verfahren ausgewählt wurden.

Teilnahme durch Registrierung online oder vor Ort.

Das finale Programm und weitere Informationen unter:

www.berlinsummermeeting.org

Biological Sequence Analysis and High Throughput Technologies School

2.-9. Juli 2011, Lipari, Italien

Die Lipari School on Bioinformatics and Computational Biology lädt am 2.-9. Juli 2011 auf die Mittelmeerinsel Lipari ein, um revolutionäre Methoden der Datenanalyse vorzustellen und zu diskutieren. Das kommende Zeitalter der personalisierten Medizin wird mit seiner durch die Anwendung von Hochdurchsatzverfahren zu erwartenden unglaublich großen Datenflut neue Methoden der Datenanalyse unabdingbar machen. Während der achttägigen Veranstaltung sind Vorträge zu den Bereichen (i) *Methods for High-throughput and Parallel Sequencing*, (ii) *Data Integration* und (iii) *Knowledge Inference*

from High-throughput Genomic Experiments geplant. Ferner werden Tutorials angeboten, die die Thematik der Sessions aufgreifen und vertiefen.

Weitere Informationen zur Veranstaltung und zur Registrierung unter:

<http://lipari.dmi.unict.it/LipariSchool/Bio>

19th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology und 10th European Conference on Computational Biology

17.-19. Juli 2011, Wien, Österreich

Bereits zum 19. Mal findet die jährliche International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB) der Internationalen Gesellschaft für Computational Biology (ISCB) vom 17.-19. Juli 2011 in Wien statt. Bei der Tagung handelt es sich um die weltweit bedeutendste Tagung zur Computational Biology. Die Tagung findet in Kombination mit der 10th European Conference on Computational Biology (ECCB) statt und führt Wissenschaftler aus den Bereichen der Computerwissenschaften, Molekularbiologie, Mathematik und Statistik sowie deren angrenzenden Fachgebieten zusammen. Der Fokus der Tagung liegt auf der Entwicklung und Anwendung von fortgeschrittenen computertechnischen Methoden auf biologische Fragestellungen.

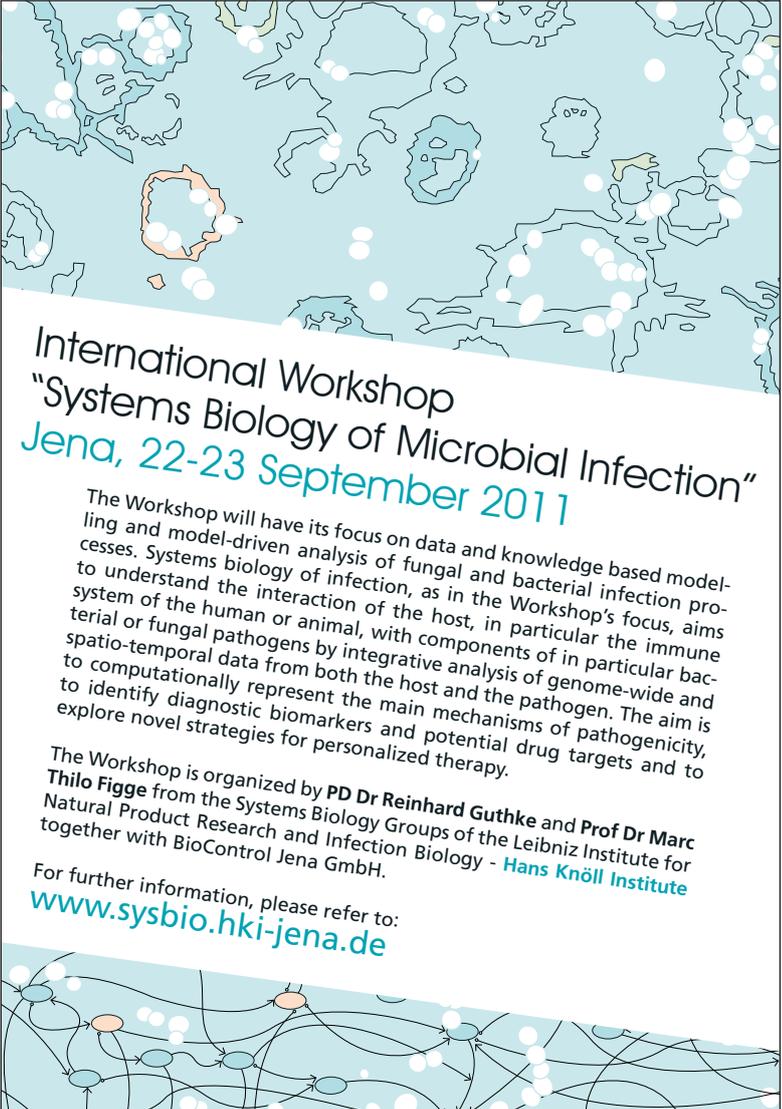
Weitere Informationen unter:

www.iscb.org/ismbecb2011-general-info/about-ismb

International Workshop Systems Biology of Microbial Infection

22.-23. September 2011, Jena

Zum neunten Mal in Folge wird am 22.-23. September der internationale Workshop zum Thema „Systembiologie bei mikrobiellen Infektionen“ vom Leibniz-Institut für Naturstoffforschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut in Jena stattfinden. Die diesjährige Veranstaltung wird sich den Themenfeldern *Data and Knowledge-based Modeling* und *Model-driven Analysis of Mi-*



**International Workshop
"Systems Biology of Microbial Infection"
Jena, 22-23 September 2011**

The Workshop will have its focus on data and knowledge based modeling and model-driven analysis of fungal and bacterial infection processes. Systems biology of infection, as in the Workshop's focus, aims to understand the interaction of the host, in particular the immune system of the human or animal, with components of in particular bacterial or fungal pathogens by integrative analysis of genome-wide and spatio-temporal data from both the host and the pathogen. The aim is to computationally represent the main mechanisms of pathogenicity, to identify diagnostic biomarkers and potential drug targets and to explore novel strategies for personalized therapy.

The Workshop is organized by **PD Dr Reinhard Guthke** and **Prof Dr Marc Thilo Figge** from the Systems Biology Groups of the Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology - **Hans Knöll Institute** together with BioControl Jena GmbH.

For further information, please refer to:
www.sysbio.hki-jena.de

crobial Infection Processes widmen, um die Interaktion des Wirts mit dem Pathogen und insbesondere die Rolle des menschlichen bzw. tierischen Immunsystems im Rahmen der Pathogenese besser zu verstehen. Das übergreifende Ziel ist, Wirt-Pathogen-Interaktionen künftig mithilfe eines räumlich-zeitlichen Modellierungsprozesses so detailliert zu be-

schreiben, dass die Identifikation diagnostischer Marker sowie potentieller Ansatzpunkte für eine verbesserte Medikation und Therapie im Sinne einer neuen und besseren personalisierten Therapie möglich oder zumindest begünstigt wird.

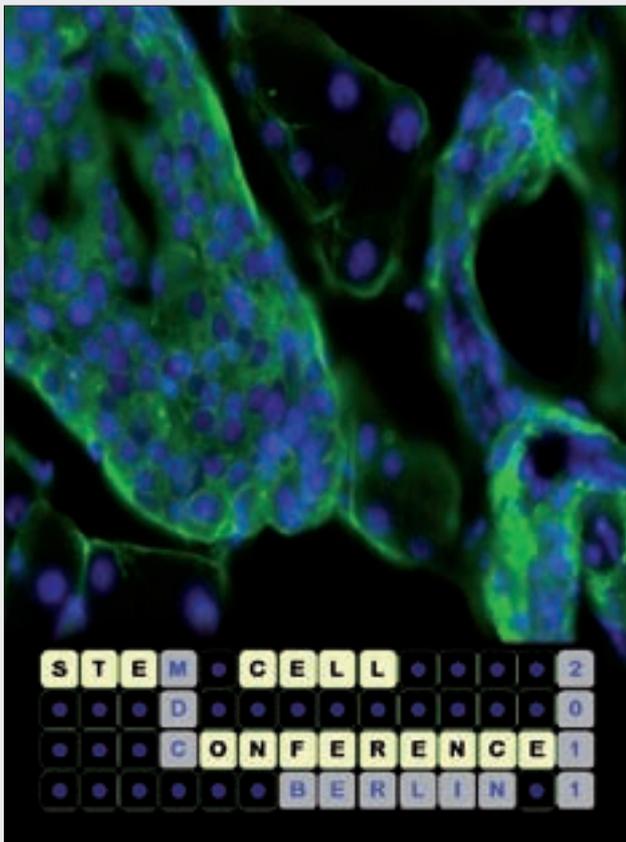
Details und Informationen zur Tagung unter:

www.sysbio.hki-jena.de

Stem Cells in Development and Disease

11.-14. September 2011, MDC Berlin-Buch

Stammzellen haben die bemerkenswerte Eigenschaft, sich sowohl permanent selbst durch Zellteilung zu erneuern als auch sich in spezialisierten Zelllinien zu differenzieren. Diese Fähigkeit birgt enorme Möglichkeiten für die Entwicklungsbiologieforschung, für die Entwicklung neuer Therapieansätze bei diversen Erkrankungen sowie für die Weiterentwicklung in der regenerativen Medizin. Obwohl noch wenig über die Erforschung der Stammzellen bekannt ist, werden sie von einigen Wissenschaftlern als Wundermittel der Zukunft betrachtet.



Die vom 11.-14. September 2011 in Berlin stattfindende Konferenz des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin richtet sich an Studenten und Forscher, die sich dafür interessieren, die grundlegenden Mechanismen zu verstehen, wie Stammzellen während der Embryonalentwicklung und bei Krankheiten reguliert werden.

Die Konferenz wird aktuelle Ergebnisse, Entwicklungen und Trends der Stammzellbiologie präsentieren und sich im Detail mit genetischen und epigenetischen Mechanismen der Reprogrammierung sowie dem Erhalt der Pluripotenz und der Differenzierung beschäftigen.

Weitere Informationen:

www.stemcell2011-mdc-berlin.de/cms/default.asp?id=0

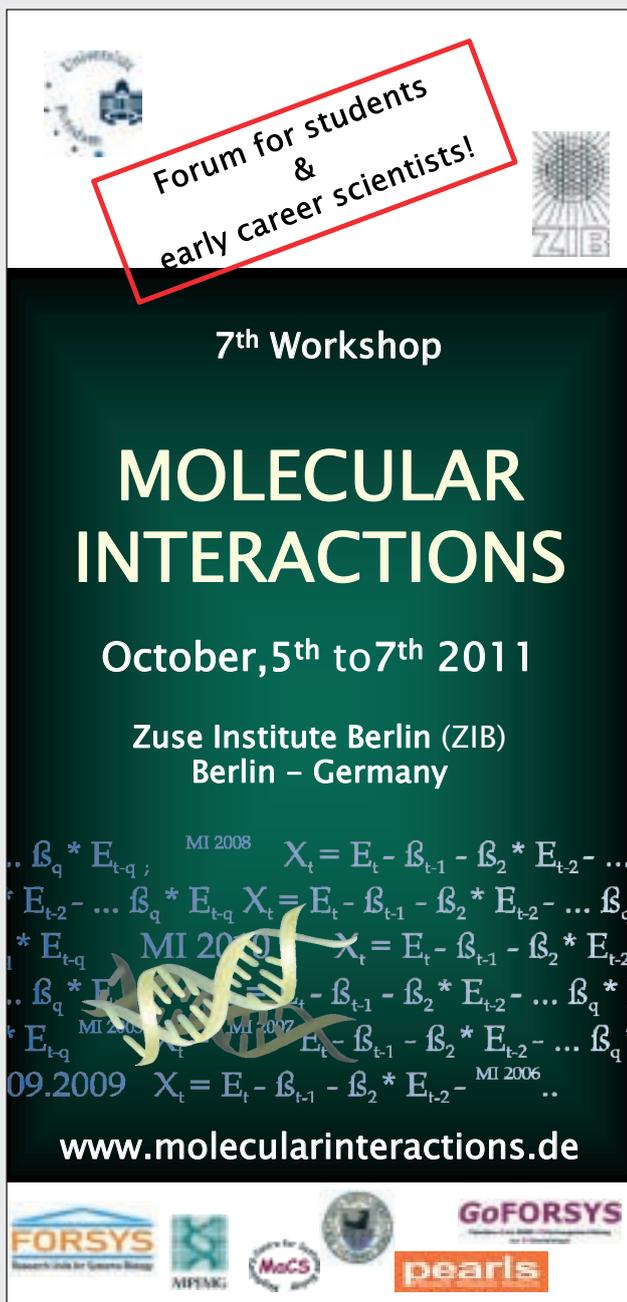
7th Workshop Molecular Interactions

5.-7. Oktober 2011, Berlin

Wie in den Jahren zuvor, sprechen die Veranstalter mit diesem Workshop insbesondere junge und angehende Wissenschaftler aus dem Bereich der Lebenswissenschaften an. Die diesjährige Veranstaltung trägt den Titel „*In vivo - in vitro - in silico*“. Das Programm weist Vorträge von 32 renommierten Wissenschaftlern aus Deutschland, England, Spanien, Brasilien und der Schweiz auf, die über die neuesten Entwicklungen in ihren Forschungsgebieten berichten werden. Die Vorträge widmen sich den folgenden Bereichen: (i) RNA Technologien, (ii) Zelluläre Strukturen, (iii) Molekulare Medizin, (iv) Zellsysteme, (v) Regulatorische Netzwerke, (vi) Systembiologie, (vii) Technische Biologie, (viii) Chemische Biologie, (ix) Modellierung und (x) Technologietransfer. Zusätzlich zu den wissenschaftlichen Vorträgen wird das Tagungsprogramm durch eine Session zum Thema Karriereplanung ergänzt.

Mehr Informationen zur Tagung:

www.molecularinteractions.de



Forum for students & early career scientists!

7th Workshop

MOLECULAR INTERACTIONS

October, 5th to 7th 2011

Zuse Institute Berlin (ZIB)
Berlin – Germany

$\beta_q * E_{t-q}$ MI 2008 $X_t = E_t - \beta_{t-1} - \beta_2 * E_{t-2} - \dots$
 $E_{t-2} - \dots \beta_q * E_{t-q}$ $X_t = E_t - \beta_{t-1} - \beta_2 * E_{t-2} - \dots \beta_q$
 $* E_{t-q}$ MI 2009 $X_t = E_t - \beta_{t-1} - \beta_2 * E_{t-2} - \dots \beta_q * E_{t-q}$
 E_{t-q} MI 2007 $E_t - \beta_{t-1} - \beta_2 * E_{t-2} - \dots \beta_q * E_{t-q}$
09.2009 $X_t = E_t - \beta_{t-1} - \beta_2 * E_{t-2} - \dots$ MI 2006

www.molecularinteractions.de



systembiologie.de

Das Magazin für systembiologische Forschung in Deutschland – Ausgabe 03, Juni 2011

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 „FORSYS-Forschungseinheiten der Systembiologie“, der „Helmholtz-Allianz Systembiologie“ und dem „Virtual Liver Network“.

Redaktion:

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

Redaktion:

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

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:

LANGEundPFLANZ Werbeagentur GmbH, Speyer (www.LPsp.de)

Druck:

Werbedruck GmbH Horst Schreckhase, Spangenberg (www.schreckhase.de)



PEFC zertifiziert

Dieses Produkt stammt aus nachhaltig bewirtschafteten Wäldern und kontrollierten Quellen
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 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

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, FORSYS-Forschungseinheiten der Systembiologie und dem Virtual Liver Network. Finanziert wird das Heft aus Mitteln der über den

Impuls- und Vernetzungsfonds der Helmholtz-Gemeinschaft finanzierten Helmholtz-Allianz Systembiologie und aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung.

Die Redaktionsmitglieder von Systembiologie.de (v. links n. rechts)

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



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, u.conrad@dkfz.de
www.helmholtz.de/systemsbiology



Alliance on Systems Biology

FORSYS – Forschungseinheiten der Systembiologie

Sprecher: Prof. Dr. Roland Eils
Wissenschaftliches Projektmanagement: PD Dr. Klaus-Peter Michel, Ulrike Conrad
c/o Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg
Abteilung Theoretische Bioinformatik – B080
Im Neuenheimer Feld 580; D-69120 Heidelberg
Email: k.michel@dkfz.de, u.conrad@dkfz.de
www.forsys.net



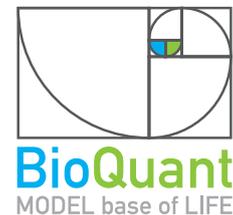
Virtual Liver Network

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
www.virtual-liver.de



BioQuant – Universität Heidelberg

Direktorium: Prof. Dr. Roland Eils, Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich,
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum
Geschäftsleitung: Dr. Angela Oberthür
Im Neuenheimer Feld 267; D-69120 Heidelberg
Email: angela.oberthuer@bioquant.uni-heidelberg.de
www.bioquant.uni-heidelberg.de



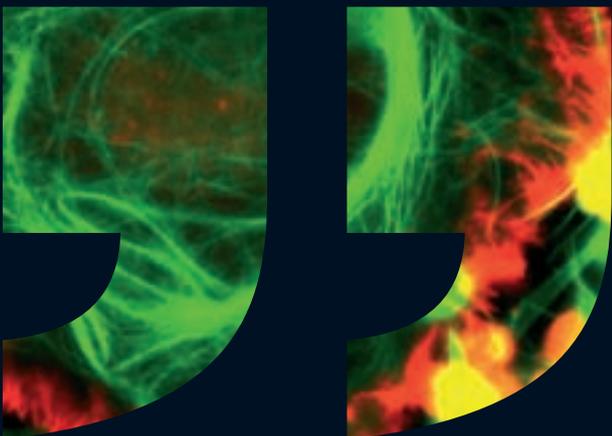
Projekträger im Forschungszentrum Jülich GmbH – PtJ

Ansprechpartner: Dr. Gisela Miczka, Dr. Yvonne Pfeiffenschneider
Wilhelm-Johnen-Straße; D-52425 Jülich
Email: g.miczka@fz-juelich.de, y.pfeiffenschneider@fz-juelich.de
www.fz-juelich.de/ptj





ICSB 2011 HEIDELBERG



THE 12TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON
SYSTEMS BIOLOGY
HEIDELBERG/MANNHEIM, GERMANY
AUGUST 28TH – SEPTEMBER 1ST, 2011

ORGANIZING COMMITTEE:

ROLAND EILS, URSULA KLINGMÜLLER, URSULA KUMMER, PEER BORK, THOMAS HÖFER, PETER SORGER

www.icsb-2011.net

SPONSOR:

SPONSORED BY THE



Federal Ministry
of Education
and Research

ORGANIZATION:

 HELMHOLTZ
ASSOCIATION

Alliance on Systems Biology

 FORSYS
Research Units for Systems Biology

 BioQuant
MODEL base of LIFE

 dkfz.
GERMAN
CANCER RESEARCH CENTER
IN THE HELMHOLTZ ASSOCIATION

 PTJ
Projekträger Jülich
Forschungszentrum Jülich

UNIVERSITÄT
HEIDELBERG
Zukunft. Seit 1386.

625 Jahre
Ruperto Carola