

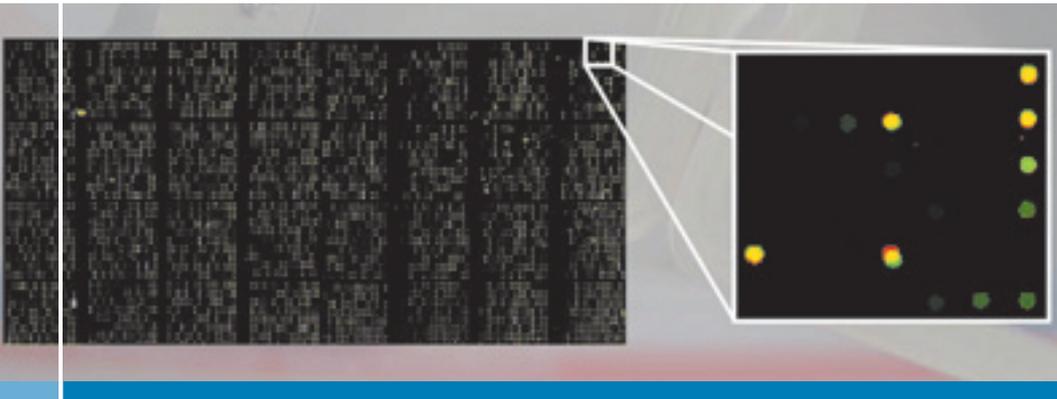
# Funktionelle Genomik

## in mikrobiellen und humanen Systemen

In der Systembiologie als Teilgebiet der Biologie steht die Analyse der Zelle im Vordergrund. Bisher erfolgte die Analyse der Proteine und Gene mit den Methoden der klassischen Biochemie, die aber hinsichtlich der Vielzahl von Genen und Proteinen eines Organismus sehr aufwendig ist. Zudem lässt sie nur wenige Aussagen über Regulationsmuster und das Zusammenspiel der in einem biologischen System vorhandenen Gene und Proteine zu. Die komplette Sequenzierung verschiedenster Genome versetzt die Wissenschaft heutzutage

in die Lage, das Geschehen der Zelle als Ganzes zu betrachten. Hierbei spielt die funktionelle Genom-Analyse (FUNCTIONAL GENOMICS) eine entscheidende Rolle. Die Funktion der Gene und Proteine, deren Regulation sowie deren Zu-

sammenspiel, können mit Hilfe neuer Technologien auf der Ebene des gesamten Genoms betrachtet werden. Eine dieser vergleichsweise neuen Techniken basiert auf den so genannten DNA-Chips (DNA-MICROARRAYS), mit deren Hilfe die Aktivität von Tausenden oder sogar aller Gene einer Zelle gleichzeitig bestimmt werden können. Die parallele Beobachtung einer Vielzahl von Genen in einem einzigen Experiment liefert schließlich Hinweise zur Analyse der gegenseitigen Regulation der Gene, eine Vorgehensweise die häufig als Reverse Engineering bezeichnet wird. Solche komplexen Netzwerke können mit klassischen Techniken nur schlecht oder gar nicht entdeckt werden.



## 1. Die Transkriptomanalyse oder: Was passiert eigentlich in der Zelle?

Noch Zukunftsmusik ist heute der gezielte Einsatz von Medikamenten unter weitgehender Vermeidung von Nebenwirkungen durch den Einsatz von DNA-Microarrays in der Arztpraxis. Denn theoretisch wäre es möglich, dass der Arzt die DNA eines Patienten, die er über eine Speichelprobe gewonnen hat, mit dem diagnostischen Hilfsmittel eines DNA-Microarrays analysiert, mit dem die individuellen Varianten spezieller, Medikamente abbauender Enzyme des Patienten bestimmt werden können.

Um einen umfassenden Überblick über das zu erlangen, was in der Zelle während der verschiedensten experimentellen Bedingungen, die ja nicht zuletzt auch die Natur widerspiegeln, passiert, bedient man sich seit nun mehr als zehn Jahren der DNA-Microarray-Technologie. Hierbei werden DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Gene *in vitro* oder *in vivo* synthetisiert, chemisch modifiziert und an speziell beschichtete Glas-Objektträger gekoppelt. Hierbei spielt die Lokalisation der DNA-Sequenzen auf dem Array eine wichtige Rolle, um später biologische Aussagen treffen zu können. Mit speziellen Druckern (Spottern) können mehrere tausend

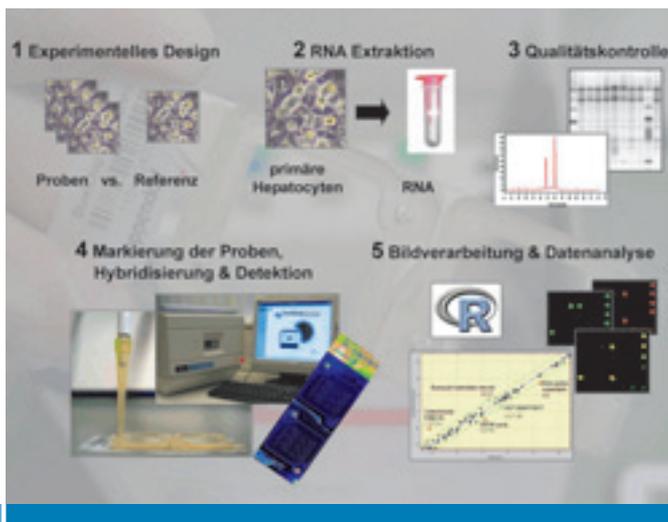
verschiedene Gensequenzen in Form von kleinen Punkten, den so genannten Spots abgesetzt und immobilisiert werden. Diese repräsentieren Teile oder gar das gesamte Genom des zu untersuchenden Organismus. Will man nun Aussagen darüber gewinnen, was unter verschiedenen experimentellen Bedingungen in der Zelle passiert, so kann man nach Durchführung des Experiments die Boten-RNA aus dem biologischen Material isolieren, in die stabilere cDNA – eine komplementäre Kopie – umschreiben und währenddessen mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren. Wichtig hierbei ist es, immer auch die Boten-RNA des biologischen Materials vor Durchführung des Experiments als Kontrolle zu isolieren und mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Die Mischung der so

### ZUSAMMENFASSUNG

*Die Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart beschäftigt sich unter anderem mit der ganzheitlichen Untersuchung biologischer Systeme auf Gen- und Proteinebene. Im Rahmen dieses systembiologischen Ansatzes werden zwei Themenstellungen verfolgt: Zur Untersuchung des Fremdstoff-Metabolismus in Leberzellen, werden die Aktivitäten der verschiedenen Gene, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen und verbunden damit die Variation der entsprechenden Proteinmengen mit Hilfe von DNA-Chips untersucht. Ergänzend werden ausgewählte Enzyme gentechnisch in Hefen hergestellt und biochemisch charakterisiert. Da der Fremdstoff-Metabolismus die Wirkung von Medikamenten von Patient zu Patient verschieden beeinflusst, hat das Projekt eine intensive pharmakologische Bedeutung. Zur Untersuchung der Stressantwort des Bakteriums Escherichia coli werden in einem weiteren Projekt die Genexpressionsmuster in Abhängigkeit von verschiedenen Stressfaktoren wie etwa Nährstoffmangel mit Hilfe von DNA-Chips ermittelt. Ziel beider Projekte – in Zusammenarbeit mit dem Institut für Bioverfahrenstechnik – ist die Erzeugung von systembiologischen Modellen, die die Simulation der bearbeiteten Stoffwechselvorgänge am Rechner und damit die Vorhersage biologischer Phänomene erlauben.*



Microarrays bilden die Grundlage der Expressionsanalyse. Der „hepato-DualChip“ der Firma Eppendorf dient der Analyse der toxiologisch relevanten differentiellen Genexpression und beinhaltet Sonden für 151 Gene in Triplikaten (leere Kreise). Die Auswahl repräsentiert alle für diese Fragestellung relevanten Bereiche wie z.B. Phase 1 und 2 Metabolismus, Apoptose, Transport. Des Weiteren ist der Chip mit zahlreichen Kontrollspots versehen (farbig gefüllte Kreise), die der Überprüfung der einzelnen Arbeitsschritte (Reverse Transkription, Hybridisierung) sowie der Normalisierung der gewonnen Rohdaten dienen. Die statistisch ausgewerteten Fluoreszenzsignale geben Aufschluss über die differentielle Genexpression in unterschiedlichen Hepatozytenproben.



02

Ablauf eines typischen Microarray-experiments. (1) Zu Beginn jeder Untersuchung muss das Experiment geplant werden. Berücksichtigt werden hierbei unter anderem die erforderliche Probenanzahl, die für die Statistik erforderlichen Replikate, die Zeitpunkte der Probenahmen. (2) Nach erfolgter Probenahme wird die RNA aus den Zellen isoliert, sowie deren Qualität durch Gelelektrophorese und Konzentrationsbestimmung kontrolliert (3). Die RNA-Proben werden in einer reversen Transkriptionsreaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend auf einem Array hybridisiert (4). Nach der Hybridisierung wird der Array eingescannt. (5) Die gewonnenen Signale werden dann mittels Bildverarbeitung und statistischen Analysewerkzeugen, wie der Software „R“ in Expressionslevel der einzelnen Gene übersetzt.

disierung, d.h. zur Wechselwirkung zwischen komplementären DNA-Fragmenten kommen, sofern sie in der Mischung vorhanden sind. Dies ist dann der Fall, wenn unter den gegebenen experimentellen Bedingungen diejenige Boten-RNA gebildet wurde. Die so behandelten Glas-Objektträger können mit Hilfe spezieller Fluoreszenzscanner eingescannt und mit einer Bildverarbeitungssoftware in numerische Daten übersetzt werden. Diese Daten werden dann in Statistikprogramme eingelesen und ausgewertet. Dabei wird festgestellt, welche Gene signifikant höhere Fluoreszenzen der einen oder anderen Farbe aufweisen oder aber unverändert bleiben, also die Mischfarbe der Fluoreszenzen aufweisen.

Die Auswertung dieser Intensitäten erlaubt die Genotypisierung der in den Proben enthaltenen DNA-Sequenzen, d.h. die Detektion von Veränderungen der Sequenzen (Mutationen) oder aber die Bestimmung der relativen Expressionslevel der Proteine. 1996 kam der erste DNA-Chip mit verschiedenen Varianten eines HIV-Gens zur Überprüfung von Resistenzen gegen bestimmte Medikamente auf den Markt.

Microarray-Drucker. Dargestellt sind die Nadeln beim Absetzen der DNA auf speziell chemisch modifizierte Glasobjektträger. Pro Druckvorgang werden zwischen 2,5 und 6,4 nL abgesetzt, was einem Spottedurchmesser von 75–215 µm entspricht.



03

gewonnenen cDNA kann dann auf den Microarray aufgetragen werden. Da sich auf dem Microarray die zur cDNA komplementäre DNA-Sequenz befindet, kann es nun im nächsten Schritt zu einer Hybri-

Seither wurde eine Vielzahl von Chips entwickelt und die Anzahl der auf einem Chip verankerten und testbaren DNA-Fragmente von einigen Tausend auf mehrere Hunderttausend erhöht. Dies erlaubt die Bestimmung der veränderten Expressionslevel aller Gene einer Zelle als Reaktion auf einen Stimulus oder aber den Vergleich der Expressionslevel zwischen verschiedenen Zelltypen. DNA-Chips werden des Weiteren für die Genotypisierung und die Diagnose von Mutationen oder Polymorphismen, die zu Erbkrankheiten oder einem erhöhten Krebsrisiko führen können, genutzt.

## 2. Transkriptomanalyse von Leberzellen (Hepatozyten)

Im Rahmen eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojektes am Institut für Technische Biochemie (ITB) innerhalb des Forschungsschwerpunkts *Systembiologie – Systeme des Lebens*, steht die Leberzelle, der Ort der Entgiftung des menschlichen Körpers, im Focus. Warum ist die Entgiftung für den Körper lebensnotwendig? Dem Körper werden täglich zahlreiche Fremdstoffe (Nahrungsmittelzusätze, Medikamente ...) zugeführt, die er nicht verwenden kann und die zudem eine schädigende Wirkung haben können. Viele werden, da sie wasserlöslich sind, über die Niere wieder ausgeschieden, nicht aber solche, die fettlöslich sind. Diese müssen vom Körper erst in wasserlösliche und somit ausscheidbare Varianten umgewandelt werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als Entgiftung.

Die Entgiftung von Fremdstoffen (Xenobiotika) wird in zwei Phasen eingeteilt:

Phase 1 beinhaltet die Umsetzung von Xenobiotika (meist fettlösliche Substanzen) durch chemische Modifikationen. Diese Reaktionen dienen der Funktionalisierung. Die dabei in die Moleküle eingebauten reaktiven Gruppen stellen Angriffspunkte für die Enzyme der Phase 2 dar, in der die funktionalisierten Zwischenprodukte an verschiedene kleine, häufig negativ geladene Moleküle gebunden werden. Diese auch als Konjugation bezeichneten Reaktionen erhöhen die Wasserlöslichkeit und fördern die Ausscheidung der Xenobiotika über Niere und Leber: Der konjugierte Metabolit verlässt die Leber, gelangt über den Blutkreislauf zu den Nieren oder

in die Galle und wird dort in Phase 3 über Transporter, die das mit dem Xenobiotika konjugierte Molekül erkennen, in den Urin bzw. die Galle ausgeschieden.

Ziel des Projektes ist die Generierung holistischer Daten, die in Kooperation mit den Projektpartnern zu einem Modell des Xenobiotikastoffwechsels der Hepatozyten verarbeitet werden. Neben der Analyse der am Fremdstoff-Metabolismus beteiligten Gene und Genprodukte soll auch das Differenzierungsverhalten primärer Hepatozyten (Leberzellen, die nach einer Operation in Kultur genommen werden) auf Transkriptionsebene verfolgt und analysiert werden.

Hierfür werden am IBVT primäre Hepatozyten kultiviert und mit unterschiedlichen Medikamenten behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden den Kulturen Proben entnommen und die RNA isoliert. Die RNA wird in die stabilere Form der cDNA umgeschrieben und hierbei jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die unterschiedlich markierten cDNAs aus behandelten und nicht behandelten Zellen werden vereinigt und auf einem Mikroarray hybridisiert. Dazu werden im Rahmen einer Kooperation mit der Firma Eppendorf die *Dual Hepato DNA Arrays* verwendet, auf denen derzeit 151 für den Fremdstoffmetabolismus relevante Gene erfasst werden.

Findet eine Hybridisierung auf dem Array statt, sind Fluoreszenzsignale detektierbar. Je nachdem ob nun die cDNA eines Gens der behandelten oder der unbehandelten Probe überwiegt, fällt das Fluoreszenzsignal an der entsprechenden Position des Arrays entweder grün oder rot aus. Führt ein Stimulus der Zellen zu keiner Veränderung des Transkriptionslevels eines Gens ergibt sich an der entsprechenden Position des Arrays ein gelbes Signal (rot:grün = 1:1). So kann mithilfe der Transkriptomanalyse die Relevanz einer Vielzahl von Genen bei der Verstoffwechslung von unterschiedlichen Fremdstoffen gleichzeitig untersucht werden.

Des Weiteren sollen die zugrunde liegenden genetischen Regulationsnetzwerke identifiziert werden. Da bislang nicht alle Gene bekannt sind, die eine Rolle spielen, sollen am ITB alternativ zu den Arrays von Eppendorf eigene Arrays hergestellt werden, die zusätzliche, auf dem kommerziellen Array noch nicht repräsentierte, Gene enthalten. Hierfür ist geplant, auf Oligo-

basierte Mikroarrays der Fa. Agilent Technologies und/oder eine cDNA-Bank des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung zurückzugreifen. Die Identifizierung der zusätzlichen Gene erfolgte zum Teil bereits anhand von Literaturrecherchen sowie in Absprache mit den Projektpartnern, insbesondere dem Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) an der Robert Bosch Klinik. Knapp 300 relevante Gene wurden identifiziert. Zukünftig fließen hier die Ergebnisse von Transkriptionsmessungen der Hepatozytenkulturen mit kommerziellen Mikroarrays ein, die das komplette Humangenom repräsentieren.

Eine besondere Herausforderung stellt die statistische Analyse der gewonnenen Daten dar: Hohe Hintergrundsignale, unterschiedliche Einbauraten der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe sowie die hohe Zahl an Variablen (gleichzeitig beobachtete Gene) bei nur wenigen Beobachtungen (Wiederholungen) erfordern eine Normalisierung der Daten sowie eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten. Diese Analyse erfolgt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Stochastik und Anwendungen der Universität Stuttgart.

Die Transkriptomanalyse erlaubt eine zeitliche Auflösung sowie einen Vergleich der Regulationsvorgänge bei verschiedenen Stimuli auf Transkriptionsebene; die örtliche Auflösung oder gar eine Aussage über funktionelle Interaktionen zwischen coregulierten Genprodukten ist mit dieser Technik jedoch nicht möglich. Hier setzt ein weiteres Teilprojekt an, das die Bestimmung von möglichen Protein-Protein-Interaktionen im rekombinanten System zum Ziel hat. Neben der Bestimmung der Interaktionen ausgewählter Proteine, ist geplant, ein Interaktionsnetzwerk der Hepatozyte mit entsprechend modifizierten Hefe-Zwei-Hybridssystemen zu generieren. Eine besondere Herausforderung stellen membrangebundenen Proteine dar, die

## SUMMARY

*One of the topics of the working group Molecular Biotechnology at the Institute of Technical Biochemistry deals with the holistic analysis of biological systems mainly on the level of gene and protein expression. Two projects are in the focus: In order to investigate the xenobiotic metabolism in liver cells, the expression profiles of the genes playing a role in this context and the respective protein expression levels are investigated using the microarray technology. Additionally selected enzymes are expressed recombinantly and characterized biochemically. Due to the influence of the xenobiotic metabolism on the function of drugs, the project has a strong pharmaceutical impact. The second project covers the so-called Stringent Response of the bacterium Escherichia coli. The response of the bacterium on stress factors such as nutrient starvation is investigated on the level of gene expression using custom-made DNA-Chips representing the complete genome of E. coli. The aim of both projects – in collaboration with the Institute of Bioengineering – is the generation of a model, allowing the simulation of the respective metabolism in-silico and thus predictions of respective phenomena.*

beim Xenobiotikametabolismus eine wichtige Rolle spielen (CYPs, Transporter, Glucuronosyltransferasen ...). Des Weiteren werden die in der Transkriptomanalyse gewonnenen Daten mit Proteomdaten verglichen, die bei einem Projektpartner, dem Medizinischen Proteomcenter in Bochum, aus denselben Proben gewonnen werden. Neben diesen umfassenden Ansätzen werden biochemische Daten einzelner Proteine des Phase 1 und 2 Stoffwechsels (CYPs, Transferasen) bestimmt. Da die Ausstattung mit den entsprechenden Enzymen aufgrund unterschiedlicher Genotypen und Expressionslevel individuell verschieden ist, gleichzeitig aber für einen Fremdstoff häufig mehrere Wege der Metabolisierung bestehen, werden kinetische Daten anhand rekombinanter Enzyme gemessen. Dies gewährleistet, dass die Kinetik eines einzelnen Enzyms und nicht die Kinetik einer Umsetzung mit einem in vivo vorkommenden Satz an Enzymen bestimmt wird. Gleichzeitig ermöglicht dies den Vergleich der katalytischen Eigenschaften verschiedener Varianten eines Enzyms, die in vivo in Form unterschiedlicher Genotypen vorkommen. Hierfür wird mit der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* ein rekombinantes Expressionssystem etabliert, das die Expression humaner, mikrosomaler CYPs sowie ausgewählter Phase 2 Enzyme erlaubt. Erste Ergebnisse führten zu einer Industriekooperation im Rahmen derer mit den rekombinanten Hefen Verfahren zur Synthese pharmazeutisch relevanter Metaboliten durch Biotransformation entwickelt werden.

Die im Rahmen der beschriebenen Teilprojekte gewonnenen Daten dienen schließlich zur Erzeugung bzw. Validierung geeigneter in-silico Modelle des Xenobiotikastoffwechsels am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT). Insbesondere die im letzten Teilprojekt beschriebenen kinetischen Daten rekombinanter Monoxygenasen dienen der Beurteilung und Validierung der im folgenden Artikel beschriebenen Strukturmodelle und Datenbankansätze hinsichtlich ihrer Fähigkeit biokatalytische Eigenschaften korrekt vorherzusagen.

### 3. Analyse von Bakterien

Ein vom Land Baden-Württemberg finanziertes Projekt befasst sich mit der Analyse von Bakterien und deren Reaktion auf ver-

schiedene Stressfaktoren aus der Umwelt. Beispielsweise löst die Limitierung von Nährstoffen bei *Escherichia coli* – einem unter anderem auch im menschlichen Darm vorkommenden Bakterium – zahlreiche physiologische Reaktionen aus, die auf verschiedenen Ebenen (Genom, Proteom sowie Metabolom) analysiert werden können. Ein als „Stringente Kontrolle“ bezeichnetes Phänomen bezeichnet die physiologischen Reaktionen des Bakteriums auf Stickstoff- sowie Kohlenstofflimitierung. Stickstoff ist ein elementarer Baustein von Aminosäuren, die zur Eiweißsynthese unentbehrlich sind. Stehen keine Aminosäuren zur Verfügung, können lebenswichtige Proteine nicht mehr hergestellt werden – die Zelle muss sterben. Um dies zu verhindern, sind die Bakterien in der Lage, die Proteinsynthese auf die dringend erforderlichen Proteine zu beschränken. Dazu gehören solche, die das Überleben der Zelle im momentanen Zustand gewährleisten, nicht aber solche, die für das Wachstum oder die Vermehrung nötig sind. Dadurch wachsen die Zellen deutlich langsamer und minimieren ihren Energieverbrauch. Dieser wirtschaftliche Umgang mit den zur Verfügung stehenden Ressourcen ermöglicht es den Zellen, die Hungerperiode zu überstehen und erlaubt durch feinste Regulation auf der Transkriptionsebene ein Wiederaufnehmen des Wachstums, wenn wieder genügend Nährstoffe in der Umgebung zur Verfügung stehen. Dementsprechend hat die „Stringente Kontrolle“ weit reichende Auswirkungen auf zellulärer Ebene. Zahlreiche Gene sind beteiligt und verschiedenste Proteine interagieren miteinander, um die gewünschte Reaktion zu ermöglichen. Um dieses Phänomen möglichst umfassend zu beschreiben, werden mithilfe von Microarrays die das komplette Genom von *E. coli* K12 repräsentieren (> 4000 Gene) Transkriptionsanalysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor, während und nach einer induzierten Stressantwort durchgeführt. Die so gewonnenen Daten werden dann mit am IBVT bestimmten Metabolitdaten (zelluläre Konzentrationen verschiedener Alarmone wie ppGpp, cAMP, etc.) verglichen. •

Lisa Grundmann

Stefan Lange

Karin Lemuth

Dirk Michel

Thomas Reichart

Rolf Schmid

## DIE AUTOREN

## DIE ARBEITSGRUPPE MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE

Die Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie (Bild Wintersemester 2004/5) wird von Dr. Stefan Lange (vordere Reihe, 4. v. li.) geleitet, der selbst an der Universität Stuttgart Technische Biologie studiert und am Institut für Technische Biochemie nach der Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. Rolf Schmid auch promoviert hat. Derzeit werden die systembiologischen Themen von drei Doktoranden, Lisa Grundmann (v. R., 2. v. li.), Karin Lemuth (h. R., 2. v. li.) und Thomas Reichart (h. R., 4. v. li.) bearbeitet, die ebenfalls aus der Fachrichtung Technische Biologie stammen und bereits am Institut für Technische Biochemie ihre Diplomarbeiten angefertigt haben. Tatkräftig unterstützt werden sie dabei von Dirk Michel (h. R., 6. v. li.), ein Chemisch Technischer Assistent, der vor allem für die Betreuung der Analytik verantwortlich ist. Ergänzt wird die Gruppe regelmäßig durch Studenten der Technischen Biologie oder Chemie, die in Form von Studienarbeiten und/oder Praktika einen Teil ihrer Ausbildung absolvieren oder diese mit der Diplomarbeit bei uns abschließen. Des Weiteren wird die Forschung durch unsere internationalen Gäste verschiedenster Nationalitäten bereichert, die uns zudem den einen oder anderen tieferen Einblick in ihre für uns zum Teil fremden Kulturen erlauben.

**Kontakt**

Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie, Allmandring 31, 70569 Stuttgart  
Tel. 0711/685-3198, Fax 0711/685-4569  
E-Mail: stefan.lange@itb.uni-stuttgart.de