

THEMENHEFT FORSCHUNG

Systembiologie

Universität Stuttgart • 2005

Editorial



Liebe Leserinnen und Leser,

vor Ihnen liegt die erste Ausgabe des neuen **THEMENHEFT FORSCHUNG** der Universität Stuttgart. Das Themenheft ist kein Forschungs-Magazin im üblichen Sinne, das wissenschaftliche Breite durch möglichst viele Themen in einem Heft anstrebt. Diese Aufgabe erfüllen bereits zahlreiche andere Publikationen der Universität. Ziel des Themenheftes ist dagegen die ausführliche Vorstellung *eines* jungen und zukunftssträchtigen Forschungsgebietes, das schon bestehenden Fachrichtungen oder organisatorischen Einrichtungen nicht ohne weiteres zugeordnet werden kann. In unserer ersten Ausgabe wird das fakultäts- und institutsübergreifende Gebiet der Systembiologie vorgestellt. Hier arbeiten Ingenieure, Biologen und Systemwissenschaftler gemeinsam an einem neuen Verständnis organischen Lebens.

Die Universität Stuttgart bietet mit ihrem Themenheft den jungen und aufstrebenden neuen Forschungsinitiativen ein Forum zur Information der Öffentlichkeit und gleichzeitig eine Plattform zur inner-universitären Selbstverständigung. Die inhaltliche Darstellung neuer Technologien und Wissenschaftsfelder und ihrer Auswirkungen auf Wirtschaft und Gesellschaft dient damit auch der Profilschärfung der Universität.

Mit dem Konzept für das **THEMENHEFT FORSCHUNG** findet eine Veröffentlichungsreihe zu einem neuen Gesicht und neuen Namen, die einmal mit einer revueartigen Universitätsdarstellung als „Ballbroschüre“ begann, in der organisationsorientierten Darstellung aller Fakultäten fortgesetzt wurde und in den letzten Jahren mit der Darstellung der Sonderforschungsbereiche und der Simulations- und Visualisierungstechnologien bereits eine Wendung zur Darstellung von disziplinen- und fakultätsübergreifenden Forschungsthemen genommen hatte.

Gerade die Darstellung eines noch jungen Forschungsgebietes für die Öffentlichkeit steht in besonderem Maße vor dem Problem der Verständlichkeit. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Autoren des vorliegenden Heftes bedanken für die nicht unerhebliche zusätzliche Arbeit an dem heute oft geforderten „Public Understanding of Science“. Vielleicht trägt diese Broschüre ja auch ein wenig dazu bei, über die zahlreichen bestehenden wissenschaftlichen Kooperationen und Vernetzungen hinaus weitere Synergien zwischen den Fächern, Instituten und Fakultäten anzuregen.

Dr. Ulrich Engler

Impressum

Das Themenheft Forschung wird herausgegeben im Auftrag des Rektorats der Universität Stuttgart.

Koordination des Themenhefts Forschung:

Ulrich Engler, Tel. 0711/121-2205, E-Mail: ulrich.engler@verwaltung.uni-stuttgart.de

Wissenschaftlicher Koordinator Systembiologie:

Matthias Reuß

Autoren Systembiologie: Frank Allgöwer, Sandra Barth, Thomas Eißing, Ernst Dieter Gilles, Lisa Grundmann, Christoph Hubig, Stefan Lange, Karin Lemuth, Klaus Mauch, Dirk Michel, Dirk Müller, Jürgen Pleiss, Thomas

Reichart, Matthias Reuß, Peter Scheurich, Rolf Schmid, Stephan Tatzel, Jörg Wrachtrup et al.

Titelseite und Grundlayout Themenheft Forschung:

Zimmermann Visuelle Kommunikation, Gutenbergstraße 94 A, 70197 Stuttgart

Druck und Anzeigenverwaltung: Alpha Informationsgesellschaft mbH, Finkenstraße 10, 68623 Lampertheim, Tel. 06206/939-0, Fax 06206/939-232, Internet: www.alpha-werbung.de

Verkaufsleitung: Peter Asel

© Universität Stuttgart 2005

ISSN 1861-0269

*Preis inkl. MwSt.; Stand Januar 2005. Unverbindliche Preisempfehlung für IBM eServer OpenPower System mit 1-Weg 1,5-GHz-Prozessor, 1,024 MB Hauptspeicher, 36,4 GB Festplatte. IBM behält sich vor, den Preis ohne vorherige Hinweis zu ändern. Preise von IBM Business Partners können abweichen. IBM, das IBM Logo, eServer, OpenPower und Power Architecture sowie das eServer- und das e-Logo sind Marken- oder eingetragene Marken der International Business Machines Corporation in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern. Linux ist eine Marke von Linux Torvalds in den Vereinigten Staaten und/oder anderen Ländern. Andere Namen von Firmen, Produkten und Dienstleistungen können Marken oder eingetragene Marken der jeweiligen Inhaber sein. © 2004 IBM Corporation. Alle Rechte vorbehalten. OSM IBM 05 405



SPÜREN SIE DIE KRAFT, DIE IN LINUX STECKT.

Das neue IBM eServer OpenPower System – ein Server, der alles bietet: Power Architecture™ und das Betriebssystem Linux, außergewöhnliche Zuverlässigkeit und Datenverarbeitung mit 64 Bit. Das komplette Fitnessprogramm für Ihr Business, optimiert für Linux. Der Traum jedes Puristen. Der schnellstmögliche Einstieg in die Linux-Welt. Und das Beste: Sein Preis macht es Ihnen besonders leicht, die einzigartigen Stärken der Power Architecture™ zu nutzen. Technologie on demand. Schon ab 5.974,- Euro.* Höchste Zeit, kräftig mitzumischen. Unter ibm.com/eserver/de/pumpup



eserver

Inhalt

Editorial **2**

Impressum **2**

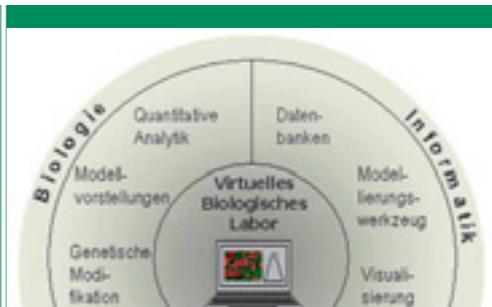
Grußwort des Rektors **7**

Prof. Dr.-Ing. Dieter Fritsch

Einleitung **8**

Forschungsschwerpunkt Systembiologie
an der Universität Stuttgart

Matthias Reuß



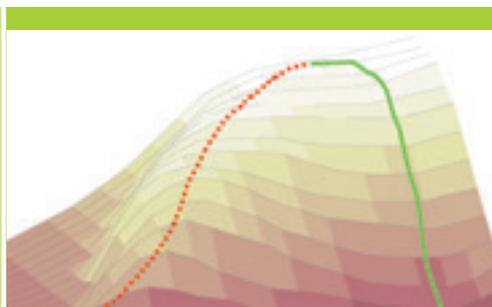
Komplexität in Technik und Biologie **10**

Ernst Dieter Gilles



Integration von zellulären Stoffwechsel- und Signalnetzwerken **18**

Klaus Mauch, Dirk Müller, Matthias Reuß



**Sein oder Nichtsein?
Mathematische Systemtheorie zur
Analyse Biologischer Signalverarbeitung** **32**

Frank Allgöwer, Thomas Eißing, Peter Scheurich

Das grüne Leuchten
Dem Molekül auf der Spur 42

*Margarita Gerken, Elmar Thews, Carsten Tietz,
Jörg Wrachtrup*



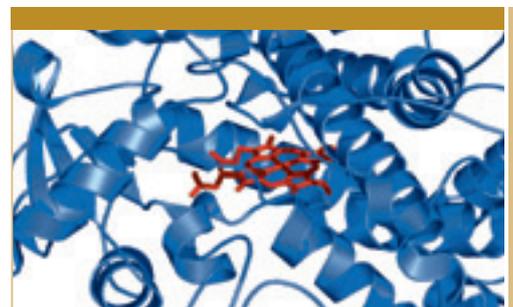
Funktionelle Genomik
in mikrobiellen und humanen Systemen 52

*Lisa Grundmann, Stefan Lange, Karin Lemuth,
Dirk Michel, Thomas Reichart, Rolf Schmid*



Von der Sequenz zur Funktion
Datenbanken und Modellierung 58

Sandra Barth, Jürgen Pleiss, Stephan Tatzel



**Systembiologie als Paradigma der
Technik – Technik als Paradigma der
Systembiologie?** 64

Christoph Hubig

Mitten im Markt

Messe Stuttgart



"High Tech. Hi Stuttgart."

Die neue
Messe Stuttgart

Ab 2007

www.messe-stuttgart.de

Grußwort des Rektors

Mit dem THEMENHEFT FORSCHUNG verfügt die in der Forschung ausgewiesene Universität Stuttgart nun über eine Plattform, um innovative wissenschaftliche Initiativen profiliert herausstellen zu können. Die Systembiologie gehört zu den wichtigen strategischen Forschungsimpulsen in Baden-Württemberg, die zuletzt in einer Bestandsaufnahme der Landesstiftung unter dem Namen „Modellierung komplexer biologischer Prozesse“ genannt wurde. Gerade wegen des in Europa noch bestehenden frühen Entwicklungsstadium konstatiert die Studie für diese Wissenschaftsrichtung einen bedeutenden Finanzierungsbedarf. Angesichts der in nahezu allen Gebieten der lebenswissenschaftlichen Spitzenforschung drohenden Gefahr der Abwanderung vor allem junger Wissenschaftler ist es besonders zu begrüßen, dass die Einrichtung eines Zentrums für Systembiologie an der Universität Stuttgart vom Land unterstützt wird. Das Zentrum Systembiologie soll als zentrale wissenschaftliche Einrichtung fakultätsübergreifend und interdisziplinär wirken; unter anderem durch die Vorbereitung eines Sonderforschungsbereichs, die Einrichtung einer International Summer School und einer Graduate School sowie die Planung eines eigenen Studiengangs. Stuttgart wird damit zu einem wichtigen Standort auf dem bislang vor allem von den USA dominierten Forschungsfeld. Besonders in der fach- und fakultätsübergreifenden Integration von Ingenieurwissenschaftlern, Systemwissenschaftlern und Biologen besitzt die Universität Stuttgart eine bundesweit einmalige Ausrichtung.

Nur eine kleine Auswahl aus dem breiten Spektrum systembiologischer Forschung konnte im Themenheft Platz finden, dennoch spannt sich ein weiter Bogen von der Komplexität in Technik und Biologie über den Beitrag der mathematischen Systemtheorie, die Rolle der funktionellen Genomik, die Integration von Stoffwechsel- und Signalnetzwerken, zu Nachweis- und Verfolgungstechniken einzelner Moleküle in der Zelle und das Zusammenspiel von Datenbanken und Modellierung bis zur philosophischen Reflexion über die Rolle der Systembiologie als Paradigma der Technik.

Allen Wissenschaftlern, die an der Einrichtung des Zentrums Systembiologie beteiligt sind, und auch den Autoren dieses Themenheftes möchte ich meine Anerkennung für die bereits geleistete Arbeit aussprechen. Ein besonderer Dank gilt jedoch dem Kollegen Matthias Reuß, der nicht nur die wissenschaftliche Koordination für dieses Heft übernommen hat, sondern vor allem maßgeblich die Einrichtung des Zentrums Systembiologie mit vorangetrieben hat.



A handwritten signature in black ink, which appears to read 'Dieter Fritsch'. The signature is fluid and cursive.

Prof. Dr.-Ing. Dieter Fritsch

Forschungsschwerpunkt Systembiologie

an der Universität Stuttgart

Die Biologie hat sich in der Vergangenheit vornehmlich damit befasst, die biologischen Systeme in ihre Komponenten zu zerlegen. Dabei waren qualitative und beschreibende auf die molekularen Details ausgerichtete Vorgehensweisen charakteristisch. Diese molekularen Ansätze haben zu außerordentlich bedeutsamen Erkenntnisgewinnen geführt und sind nach wie vor unverzichtbarer Bestandteil biologischer Grundlagenforschung.

Ein jeder Teil hat die Tendenz, sich einem Ganzen anzuschließen, um dadurch aus seiner Unvollkommenheit herauszukommen.

Leonardo da Vinci

Vor dem Hintergrund des wünschenswerten Erwerbs neuer Erkenntnisse zum Verhalten biologischer Systeme wie aber auch für die Beantwortung bedeutsamer Fragestellungen in der Biomedizin und Bioprozesstechnik stoßen diese reduktionistischen Betrachtungsweisen indes immer dann auf konzeptionelle Grenzen, wenn es um das Verständnis des biologischen Systems als Ganzes geht. Diese Grenzen haben ihre Ursachen zunächst einmal in der unglaublich großen Zahl von Einzelkomponenten der Systeme. Eine Rekonstruktion des Gesamtverhaltens des Systems würde aber eine Verschaltung der Informationen über das dynamische Verhalten sämtlicher Einzelbausteine erfordern, was angesichts der immensen Zahl als nicht realistisch anzusehen ist. Darüber hinaus würde diese „bottom-up“ Rekonstruktion immer dann scheitern, wenn das ganzheitliche Verhalten des Systems durch neu hinzutretende Qualitäten charakterisiert ist. Dieses durch den Begriff der Emergenz gekennzeichnete Phänomen, bei dem Systemeigenschaften aus dem Ganzen auftauchen, die nicht Eigenschaften der individuellen Teile sind, trifft man in der Biologie außerordentlich häufig an. Von besonderem systembiologischen Interesse sind hierbei vor allem Fragen der Robustheit und Fragilität großer Netzwerke.

Die anerkannten Schwierigkeiten, biologisches Systemverhalten durch Aggregation aus den Informationen über das Komponentenverhalten zu generieren, stellen einen treibenden Faktor für eine ganzheitlich orientierte Systembiologie dar. Weitere bedeutsame Agenzien für diese mit gewisser Vorsicht als Paradigmenwechsel zu bezeichnende neue Forschungsrichtung sind die stürmischen Entwicklungen neuer Hochdurchsatztechnologien zur Sequenzierung der Genome, experimentellen Analyse der Expression der genetischen Information, Beobachtung der mannigfaltigen Interaktionen zwischen den Proteinen und ganzheitlichen Messungen von Metaboliten. Der durchaus berechtigte Begriff der „Datenfluten“ spiegelt eindrucksvoll das unverkennbare Missverhältnis zwischen Datengenerierung und der auf Erkenntnisgewinn fokussierten Datenverarbeitung wider. Dieses Dilemma der genomskaligen Hochdurchsatzexperimente ist zugleich ein wichtiger Impetus für systemorientierte Analysen, die es erlauben, aus dieser ungeheuren Fülle von Daten neue Erkenntnisse im Sinne eines „Reverse Engineering“ zu extrahieren. So darf es nicht verwundern, dass nur relativ kurz nach der als Meilenstein der Forschung gefeierten Veröffentlichung des menschlichen Genoms bereits ein erstes Sonderheft

des Wissenschaftsmagazins „Science“ dem Thema der Systembiologie gewidmet war. Die Verwendung des Begriffs der Systembiologie geht auf den Biologen und Philosophen Ludwig von Bertalanffy (1901–1972) zurück, der in den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts erste Konzepte einer ganzheitlichen Betrachtung biologischer Systeme zu einer „Allgemeinen Systemtheorie“ weiterentwickelte und diese schließlich als generelles Mandat gegen die Fragmentierung von Wissen in den Wissenschaften ausbaute. Diese allgemeine Systemtheorie wurde sehr bald insbesondere von der Kybernetik aufgegriffen und zu der eigentlichen mathematischen Systemtheorie weiterentwickelt. In der aktuellen Systembiologie, die dank der erwähnten experimentellen Methoden und den bahnbrechenden Erkenntnisgewinnen auf eine ganz neue Qualität biologischer Forschung zurückgreifen kann, liefern nunmehr vor allem im Bereich der mathematischen Modellierung und Simulation diese mathematisch fundierten Methoden der Systemtheorie entscheidende Beiträge. An der Universität Stuttgart wurden die Möglichkeiten, durch interdisziplinäre Zusammenarbeit zentrale Fragestellungen der Biologie mit systembiologischen Methoden zu adressieren, bereits sehr frühzeitig erkannt und systematisch weiterentwickelt. Derzeit hat die Universität in der fach- und fakultätsübergreifenden interdisziplinären Integration der Bio-, System- und Ingenieurwissenschaften ein bundesweites Alleinstellungsmerkmal. Der Ansatz in Stuttgart entspricht den an führenden amerikanischen Universitäten verfolgten Strategien der transdisziplinären Verbindungen zwischen Bio- und Ingenieurwissenschaften.

Neben der zentralen Rolle der mathematischen Modellierung und Simulation komplexer zellulärer Netzwerke kommt der Weiterentwicklung der experimentellen Methoden, um die für die Modellverifizierungen notwendigen quantitativen Daten zu ermitteln, große Bedeutung zu. Hierzu gibt es im Rahmen des interdisziplinären Forschungsschwerpunkts Systembiologie zusätzlich wichtige Beiträge aus den Fachrichtungen der Biochemie, Biologie und Physik. Im Zusammenhang mit diesen notwendigen quantitativen Daten gibt es sehr enge Kooperationen zwischen den Modellierern und experimentellen Arbeitsgruppen. Diese Vernetzung zielt auf die Weiterentwicklung der Methoden der optimalen Versuchsplanung für Fragen der Systemidentifikation und Modelldiskriminierung.

Es ist vorgesehen, die außerordentlich günstigen Voraussetzungen bezüglich der interdisziplinären Vernetzungen zwischen Bio-, System- und Ingenieurwissenschaften weiter auszubauen und nachhaltig in den universitären Strukturen zu verankern. Als Infrastrukturmaßnahme und organisatorischer Rahmen für die zukünftige Vernetzung systembiologischer Aktivitäten an der Universität Stuttgart ist daher die Gründung eines Zentrums für Systembiologie geplant. Für dieses Zentrum wird derzeit ein Forschungsprogramm initiiert, dessen Schwerpunkte auf neue Ansätze zur Integration von System- und Biowissenschaften für die Analyse und das Design biologischer Systeme fokussiert sind. •

*Matthias Reuß
Institut für Bioverfahrenstechnik
Universität Stuttgart*

Komplexität in Technik und Biologie

Viele Veränderungen unseres täglichen Lebens sind dadurch bedingt, dass die Komplexität technischer Prozesse immer weiter wächst. Ein typisches Beispiel ist das Internet, das mit seinen vielfältigen Möglichkeiten die traditionellen Lebensgewohnheiten nachhaltig verändert. Weitere Beispiele sind Verkehrssysteme und hochautomatisierte industrielle Produktions- und Fertigungsprozesse.



Deren zunehmende Komplexität stellt natürlich neue und erhöhte Anforderungen an die Ingenieur- und Systemwissenschaftler. So sind Methoden und Werkzeuge zu entwickeln, die es gestatten, komplexe technische Prozesse so zu gestalten, dass sie bestimmte strukturelle Eigenschaften aufweisen. Eine besonders wichtige Struktureigenschaft ist die Robustheit. Der Entwurf eines komplexen Systems muss sicherstellen, dass dessen erwünschte Funktionalität möglichst auch dann aufrecht erhalten wird, wenn sowohl Fehlerquellen im Innern als auch Störungen in der Umgebung wirksam werden. Bei der Sicherstellung einer robusten Funktionalität kommt der Sensortechnik, der Signalübertragung und vor allem der Regelung eine zentrale Bedeutung zu. Zu den wichtigsten Konzepten, die zur Anwendung kommen, um die Komplexität technischer Prozesse zu beherrschen, gehören:

- Modularisierung,
- Hierarchische Strukturierung der Regelungen,
- Redundanz und Diversität.

Beispiele für nichttechnische komplexe Systeme sind in der Biologie in zahlreichen Formen zu finden. Betrachtet man z.B. das Verhalten einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle etwas genauer, so gewinnt man den Eindruck, dass die Forde-

rungen, denen man bei der Gestaltung komplexer technischer Prozesse zu genügen versucht, im Falle biologischer Zellen in vorbildlicher Weise erfüllt sind. Allerdings sind die Konzepte, die dem ganzheitlichen Verhalten zellulärer Systeme zugrunde liegen, heute noch wenig verstanden. Klar scheint aber zu sein, dass diese Systeme eine natürliche Modularität besitzen. Dies bedeutet, dass sie aus interagierenden Funktionseinheiten des Stoffwechsels, der Signaltransduktion und der Regulation aufgebaut sind, die deutlich voneinander abgegrenzt werden können und durch einen gewissen Grad an Autonomie gekennzeichnet sind. Die Granularität der Module ist durch die Skalengröße der jeweiligen Skalierungsebene bestimmt, auf der man die Modularität eines zellulären Systems betrachtet. Typisch für diese Systeme ist auch, dass ihre Regulationen einen hierarchischen Aufbau besitzen. Schließlich gibt es auch im Bereich des Stoffwechsels redundant angelegte Stoffwechselwege. Bei der Erfassung sensorielleser Informationen kommt weiter ein breites Spektrum an Möglichkeiten zum Einsatz, Reize in Signale umzusetzen (Diversität).

Abgesehen vom deutlichen Unterschied im Grad ihrer Komplexität besteht also zwischen biologischen Systemen und komplexen technischen Prozessen ein gewisses

Maß an Ähnlichkeit und Verwandtschaft. Aus diesem Grunde darf man erwarten, dass die in den System- und Ingenieurwissenschaften entwickelten Methoden und Werkzeuge für die Analyse und Gestaltung komplexer technischer Prozesse auch zum besseren Verständnis biologischer Systeme wichtige Beiträge liefern können.

Betrachtet man den gegenwärtigen Stand der Forschung in der Molekularbiologie, so muss man zunächst einmal die ungeheuren Fortschritte bewundern, die diese Disziplin in den letzten Jahren erzielt hat. Die Aufklärung des menschlichen Genoms ist sicherlich der spektakulärste einer Vielzahl von Meilensteinen, die immer tieferen Einblick in die molekularen Prozesse zellulärer biologischer Systeme ermöglichen. Man stellt aber auch fest, dass das heute verfügbare biologische Wissen noch immer vorwiegend qualitativer und beschreibender Natur ist und dass die Forschung primär auf ein besseres Verständnis des molekularbiologischen Details ausgerichtet ist. So kommt z.B. der Aufklärung der individuellen Wechselwirkungen dieser Komponenten bei der zellulären Regulation und Signaltransduktion eine besondere Bedeutung zu. Was aber bisher stark vernachlässigt wurde ist die Analyse ganzheitlicher Verhaltensmechanismen komplexer Netzwerkstrukturen, die sich aufgrund des Zusammenwirkens einer größeren Anzahl miteinander vernetzter molekularer Komponenten (Gene, Proteine, Metabolite) ergeben. Rein gedanklich sind diese Verhaltensmechanismen nicht mehr nachvollziehbar. Hier braucht man das Hilfsmittel der mathematischen Modellierung. Nur so gelingt es, das heute verfügbare biologische Wissen mit einer systemwissenschaftlich orientierten Denkweise zu verbinden. Allerdings bedeutet diese system- und signalorientierte Betrachtung von zellulären Systemen auch, dass damit der Weg hin zu einer stärker quantitativ orientierten Biologie beschritten werden muss. Dieser Weg wird dadurch erleichtert, dass in den letzten Jahren gänzlich neue Analysemethoden entwickelt werden konnten. Mit der sogenannten DNA-Chip-Technologie ist es z.B. möglich, das Expressionsprofil mehrerer tausend Gene parallel und rasch zu bestimmen. Diese Information ist wichtig, um komplexe Regulationsstrukturen im Sinne eines *reverse engineering* aufklären zu können.

1. Modulare Strukturierung

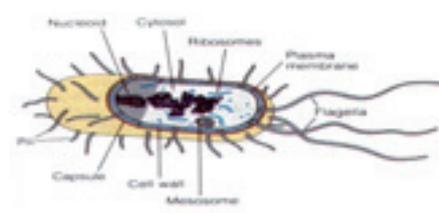
Am Beispiel einer bakteriellen Zelle (01) soll nun ein Strukturierungskonzept erläutert werden, das – im Sinne einer Nachbildung der natürlichen Modularität – der Modellierung zellulärer Systeme zugrunde gelegt werden kann. Dieses Konzept ist auch die Basis, um den hohen Stellenwert, der ganz allgemein der Regelung in biologischen Systemen zukommt, verdeutlichen zu können. Der bekannteste Vertreter einer prokaryotischen Zelle ist das Darmbakterium *Escherichia coli*, das sich in der molekularbiologischen und genetischen Forschung einer großen Beliebtheit erfreut. Dieses „einfache“ Bakterium besitzt über 4800 Gene und verfügt über etwa 50 Stoffwechseleinheiten, bis zu 100 genetisch gesteuerte Regulationsnetzwerke, ca. 2500 Proteine und Enzyme und ca. 50–70 Sensoren einschließlich der zugehörigen signalverarbeitenden Elemente [1, 2, 3]. Aus einer abstrakt systemtheoretischen Sicht lässt sich das ganzheitliche Verhalten einer solchen bakteriellen Zelle durch das Zusammenwirken dreier sehr komplexer Netzwerke, eines Stoffwechselnetzwerks, eines Regulationsnetzwerks und eines Netzwerks der Signaltransduktion beschreiben (02). In ihrem Zusammenwirken bilden diese drei Netzwerke eine autonome Einheit, die in der Lage ist, sich in sehr effizienter Weise veränderten Umgebungsbedingungen anzupassen [4, 5, 6].

1.1. Stoffwechselnetzwerk

Zunächst sei das Stoffwechselnetzwerk etwas detaillierter betrachtet. Es umfasst eine Vielzahl vorwiegend enzymatischer Reaktionsschritte, die ausgehend von den Substraten zur Bildung zellulärer Strukturen führen. Im Zuge der Zellteilung wer-

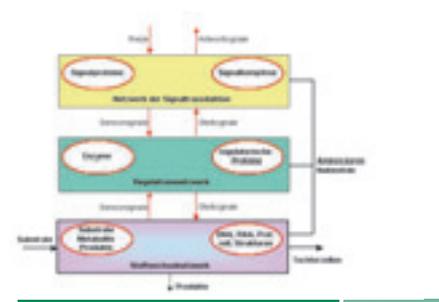
ZUSAMMENFASSUNG

Zur Beherrschung komplexer technischer Prozesse kommen heute in den Systemwissenschaften vor allem die Konzepte der Modularisierung, der hierarchischen Strukturierung sowie der Redundanz und Diversität zum Einsatz. Abgesehen vom Grad der Komplexität besteht zwischen biologischen Systemen und komplexen technischen Prozessen ein gewisses Maß an Ähnlichkeit und Verwandtschaft. Aus diesem Grunde darf man erwarten, dass die in den System- und Ingenieurwissenschaften entwickelten Methoden und Werkzeuge auch zum besseren Verständnis biologischer Systeme wichtige Beiträge liefern können. Die system- und signalorientierte Betrachtung von zellulären Systemen betritt damit den Weg hin zu einer stärker quantitativ orientierten Biologie. Am Beispiel einer bakteriellen Zelle wird in diesem Beitrag ein Strukturierungskonzept vorgestellt, das – im Sinne einer Nachbildung der natürlichen Modularität – der Modellierung zellulärer Systeme zugrunde gelegt werden kann. Aus systemtheoretischer Sicht wird das ganzheitliche Verhalten der Zelle durch das Zusammenwirken dreier sehr komplexer Netzwerke, eines Stoffwechselnetzwerks, eines Regulationsnetzwerks und eines Netzwerks der Signaltransduktion beschrieben. Die Modularisierung des bakteriellen Systems in Funktionseinheiten begrenzter Autonomie ist die Basis der Modellierung ganzheitlicher Verhaltensmechanismen. Dabei kommt der richtigen Abgrenzung einer Funktionseinheit und der Identifikation von Schlüsselgrößen, die das Verhalten der Module charakterisieren, eine entscheidende Bedeutung zu.



01

Bakterielle Zelle

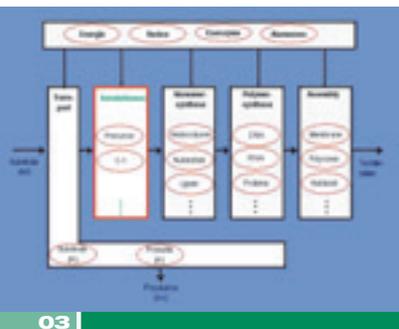


02

Signalorientierte Darstellung einer bakteriellen Zelle

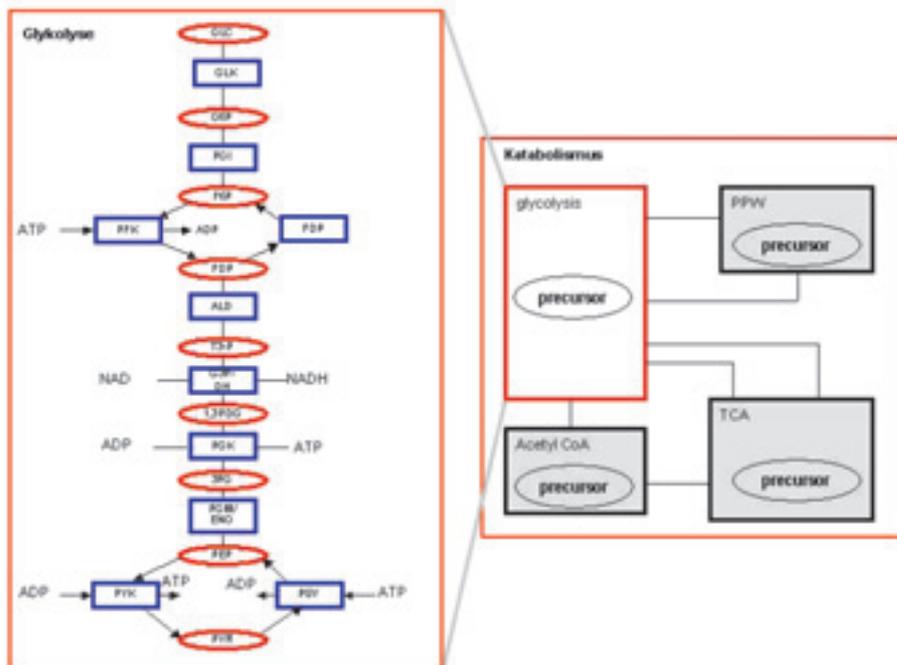
den diese Strukturen dann zu einer Tochterzelle zusammengesetzt. Zusätzlich entstehen bestimmte Produkte, die in die Umgebung ausgeschleust werden. Ordnet man die Reaktionen des Stoffwechselnetzwerks entsprechend ihrer Funktion im Metabolismus, so lässt sich dieses Netzwerk wie in (03) gezeigt, in kleinere Stoffwechseleinheiten zerlegen:

- die Transportreaktionen ermöglichen die Aufnahme und Rückhaltung von Nährstoffen sowie das Ausschleusen von Produkten;
- durch die Reaktionen des Katabolismus werden die Substrate in kleinere Moleküle, die sogenannten Precursor zerlegt. Darüber hinaus dienen diese Reaktionen der Gewinnung von Energie und Reduktionskraft;
- durch die Monomersynthese werden die Precursor transformiert in Zellbausteine wie Nukleotide, Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren;
- durch die Polymerisationsreaktionen werden ausgehend von Zellbausteinen Makromoleküle wie z.B. DNA, RNA und Proteine gebildet;



03

Stoffwechselnetzwerk



03

Katabolismus und Glykolyse

- durch die Assembly-Reaktionen werden Makromoleküle chemisch modifiziert, zu vorbestimmten Stellen in den Zellen transportiert und dort zu zellulären Strukturen wie z.B. Membranen, Polyosomen und Nukleoid verknüpft;

- alle Metabolite, die Energie und Reduktionskraft repräsentieren, werden ebenso wie die Alarmone und Coenzyme einer eigenen Stoffwechseleinheit zugeordnet. Damit wird berücksichtigt, dass diese Metabolite im Gegensatz zu den übrigen Metaboliten des Stoffwechselnetzwerks an einer Vielzahl von Reaktionen beteiligt sind. Diese Beteiligung kann entweder als Reaktand oder als Katalysator erfolgen. Fokussiert man nun auf den Block des Katabolismus, so lässt sich dieser Block wie in (04) gezeigt, in noch kleinere Untereinheiten wie z.B. die Glykolyse, den Pentose-Phosphat-Weg (PPW) und den Zitronensäurezyklus (TCA) zerlegen. Der letzte Schritt der Zerlegung wird am Beispiel der Glykolyse gezeigt. Er führt auf die Ebene elementarer struktureller Modellbausteine. Zwei unterschiedliche Klassen dieser Bausteine sind für eine Dekomposition der Glykolyse erforderlich:
 - Stoffspeicher, als elementare Komponenten,
 - Stoffwandler, als elementare Verknüpfungselemente in Form enzymkatalysierter Reaktionsschritte.

1.2. Regulationsnetzwerk

Betrachtet man nun das in (05) dargestellte Regulationsnetzwerk, so verfügt dieses über eine große Anzahl von Enzymen und Regulatorproteinen, deren Aufgabe darin besteht, die Stoffflüsse des Stoffwechselnetzwerks unabhängig von sich ändernden Umgebungsbedingungen auf eine genaue Selbstreproduktion der Zelle auszurichten [7]. Um geeignete Stellensignale z.B. in Form von Enzymmengen und Enzymaktivitäten zu generieren, stehen dem Regulationsnetzwerk Sensorsignale zur Verfügung, die Informationen über den aktuellen Zustand des Stoffwechselnetzwerks und des Netzwerks der Signaltransduktion beinhalten. Die Darstellung des Regulationsnetzwerks als Pyramide in (05) soll die ausgeprägte hierarchische Strukturierung bakterieller Regulationen verdeutlichen. Auf der untersten Ebene, der sogenannten metabolischen Ebene, erfolgen die Stellengriffe durch allosterische oder kovalente Modifikationen der Enzymaktivitäten innerhalb von Millisekunden. Die Zelle ist damit in der Lage praktisch ohne Verzögerung auf Veränderungen ihrer Substratversorgung und auf andere Reize aus der

Umgebung zu reagieren. Die Regulationsvorgänge dieser Ebene haben primär lokalen Charakter und beschränken sich damit jeweils auf sehr begrenzte Bereiche des Stoffwechselnetzwerks.

Der metabolischen Regulationsebene übergeordnet ist die Ebene der genetischen Regulation. Hier erfolgt die koordinierte Produktion von Enzymen und Regulatorproteinen durch die im Minutenbereich verhältnismäßig langsam ablaufenden Prozesse der Genexpression. Damit ist der Zeithorizont der Regulation auf der genetischen Ebene deutlich länger als derjenige der metabolischen Ebene.

Wichtig erscheint, dass die genetische Ebene in sich selbst bereits hierarchisch strukturiert ist. Die Basiseinheit der Genexpression ist das Operon. Mehrere Operons werden durch ein übergeordnetes Regulatorprotein, ein sogenanntes Regulon koordiniert gesteuert. Eine hierarchisch noch höhere Einheit ist das Modulon. Dieses Regulatorprotein fasst eine mehr oder weniger große Anzahl von Regulons zu einer bereits sehr komplex strukturierten Regulationseinheit zusammen. Einem Modulon lässt sich in der Regel eine bestimmte physiologische Aufgabenstellung zuordnen. Es ist in der Lage die untergeordneten Expressionseinheiten koordiniert zu aktivieren oder zu inhibieren. Der Graph in (05) zeigt, dass die Informationsübertragung in einer solchen Regulationseinheit nicht nur vom Modulon ausgehend von oben nach unten erfolgt, sondern dass Rückführungen auch eine Signalübertragung in umgekehrter Richtung bewirken.

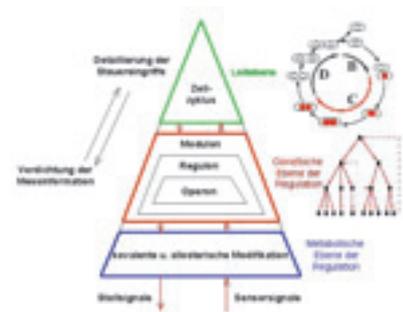
Die oberste Ebene des Regulationsnetzwerks kann man als Leitebene interpretieren. Sie ist entscheidend durch das Verhalten des Zellzyklus bestimmt. Der Zellzyklus hat die Funktion einer periodisch arbeitenden Programmablaufsteuerung der zellulären Prozesse. Ziel dieser Ablaufsteuerung ist die Herstellung möglichst exakter Kopien einer Zelle durch Mitose (Zellteilung). Der bakterielle Zellzyklus besteht aus drei diskreten Phasen (05). In der B-Phase erfolgt das Massenwachstum der Zelle. Ist ein bestimmter Reifezustand erreicht, so beginnt mit dem Umschalten in die C-Phase die Replikation der DNA. Die Mitose selbst, also die Zellteilung, erfolgt in der D-Phase. Die Übergänge von einer Phase zur nächsten hängen strikt von der korrekten Beendigung aller Funktionen der gerade existierenden

Phase ab und sind immer irreversibel. Charakteristisch ist, dass in Richtung höherer Hierarchieebenen der Regulation eine Verdichtung der Messinformationen erfolgt und dass in umgekehrter Richtung die Steuersignale immer stärker detailliert werden. Während für die Ebene des Zellzyklus im Wesentlichen diskrete Entscheidungsprozesse bestimmend sind, haben die Steuersignale der unteren Regulationsebenen primär zeitkontinuierlichen Charakter.

1.3. Netzwerk der Signaltransduktion

Der Informationsaustausch zwischen der Zelle und ihrer Umgebung erfolgt über das Netzwerk der Signaltransduktion. Reize aus der Umgebung werden über membrangebundene Rezeptoren aufgenommen, verarbeitet und an das Regulationsnetzwerk weitergegeben, das dann entsprechende Stelleingriffe z.B. in das Stoffwechselnetzwerk vornimmt. Diese Stelleingriffe führen auch zu Antwortsignalen der Zelle an ihre Umgebung. Auch das Netzwerk der Signaltransduktion ist durch eine modulare Strukturierung gekennzeichnet. Eine wichtige Frage ist, ob dieses Netzwerk aus einem begrenzten Satz immer wiederkehrender Grundbausteine der Signaltransduktion aufgebaut ist, die durch elementare Formen ihres Übertragungsverhaltens gekennzeichnet sind.

Ein schon etwas komplexerer Grundbaustein der Signaltransduktion ist das in (06) dargestellte Zweikomponentensystem. Es ist aus den beiden Komponenten „Sensor“ und „Antwortregulator“ aufgebaut. Dem Sensor entspricht in der Regel ein membrangebundenes Sensorprotein, welches aus zwei Domänen aufgebaut ist. Die Inputdomäne ragt dabei durch die Zellmembran, so dass extrazelluläre Reize aufgenommen werden können. Die Wahrnehmung eines Reizes durch den Sensor führt zu einer Konformitätsänderung des Proteins, welches die Transmitterdomäne zur Autophosphorylierung befähigt. Die Signaltransduktion erfolgt durch Phosphorylierung des Antwortregulators. Dabei handelt es sich um ein im Zytoplasma gelöstes diffusibles Protein, das häufig als Aktivator oder Repressor an die DNA bindet. Eine Dephosphorylierung des Antwortregulators entspricht einer Signallöschung.



05 Regulationsnetzwerk



06 Schematische Darstellung vom Aufbau eines Zweikomponentensystems

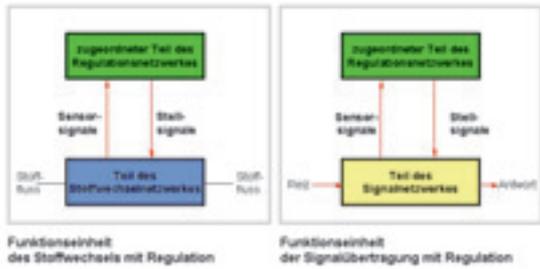
1.4. Zelluläre Funktionseinheiten

Verschaltet man eine Untereinheit des Stoffwechselnetzwerks mit der ihr zugeordneten Untereinheit des Regulationsnetzwerks und verfährt man in

gleicher Weise mit einer Untereinheit des Netzwerks der Signaltransduktion, so erhält man die in (07) dargestellten beiden Klassen geregelter zellulärer Funktionseinheiten. Bei geeigneter Abgrenzung sind diese Einheiten durch ein gewisses Maß an Autonomie ihres Verhaltens gegenüber ihrer Umgebung gekennzeichnet.

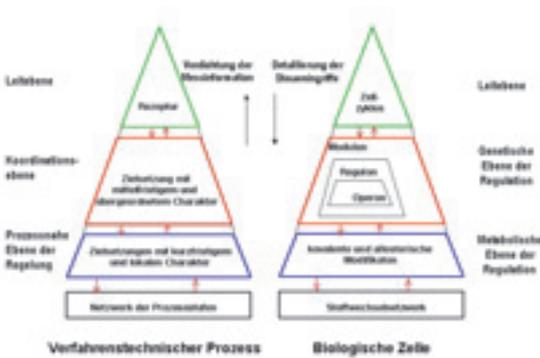
Erst aufgrund dieser begrenzten Autonomie macht es Sinn ein solches Teilsystem als autarke zelluläre Funktionseinheit zunächst weitgehend unabhängig vom Rest einer Zelle zu untersuchen. Der in diesem

Sinne richtigen Abgrenzung einer Funktionseinheit kommt damit eine entscheidende Bedeutung zu. Da zur Zeit noch keine systemtheoretischen Methoden und Werkzeuge zur Verfügung stehen, um eine Zelle in geeigneter Weise in zelluläre Funktionseinheiten zu zerlegen, muss man sich mit den folgenden intuitiven Abgrenzungskriterien begnügen:



07

Klassen zellulärer Funktionseinheiten



08

- **Physiologische Funktion:** Komponenten einer Funktionseinheit erfüllen durch Zusammenwirken eine physiologische Funktion (Nahrungsaufnahme, Atmung, Sporulation, Stressbewältigung).
- **Genetische Struktur:** Gene einer Funktionseinheit werden koordiniert exprimiert (Operon, Regulon, Modulon).
- **Regulation:** Funktionseinheit enthält geschlossene Regelkreise, die im Sinne einer Verhaltensreduktion ihr Eigenverhalten prägen.
- **Signaltransduktion:** Komponenten einer Funktionseinheit bilden ein Netzwerk von Übertragungsgliedern zur Verarbeitung und Integration von Signalen.

Um zelluläre Verhaltensmechanismen ganzheitlich zu untersuchen, kann man zunächst mit der Modellierung verhältnismäßig einfacher Funktionseinheiten beginnen, um diese dann zu höher strukturier-

ten Funktionseinheiten zu vernetzen. Die mit dieser Vernetzung verbundene Zunahme der strukturellen Komplexität muss sich allerdings nicht in einer entsprechenden Zunahme der Verhaltenskomplexität äußern. Der Grund dafür sind meist übergeordnete Regulationen, die mit der fortschreitenden Vernetzung zur Wirkung kommen und auf diese Weise zu einer Eingrenzung und Fokussierung der möglichen Verhaltensmechanismen führen. Diese Wirkung der Regulation lässt erwarten, dass zelluläres Verhalten auch bei zunehmender struktureller Komplexität mit überschaubaren reduzierten Modellen beschrieben werden kann. Die mit der fortschreitenden Vernetzung wirksam werdenden Regulationen sind auch die Ursache dafür, warum das Verhalten detaillierter Modellstrukturen oft eine hohe Robustheit gegenüber Veränderungen einer Vielzahl ihrer Parameter aufweist. Der Versuch zelluläres Verhalten ganzheitlich zu modellieren, muss deshalb auch nicht an der Beschaffung einer kaum noch überschaubaren Anzahl reaktionskinetischer und thermodynamischer Parameter scheitern, die im Falle molekularbiologisch detaillierter Strukturen zellulärer Funktionseinheiten benötigt werden. Stattdessen wird es wichtig sein, diejenigen Schlüsselparameter zu identifizieren, die für die Beschreibung der ganzheitlichen Verhaltensmechanismen bestimmend sind.

2. Schlussfolgerungen

Die bisherigen Ausführungen sollten verdeutlichen, dass zwischen dem Aufbau zellulärer biologischer Systeme und dem Aufbau komplexer technischer Prozesse gewisse Ähnlichkeiten bestehen. So zeigt z.B. (08) Analogien, die zwischen einer bakteriellen Zelle und einem technischen Produktionsprozess bestehen. Die Konzepte, die sich einerseits im Laufe der Evolution zellulärer biologischer Systeme herausgebildet haben und die andererseits von Ingenieuren angewendet werden, um komplexe technische Prozesse so zu gestalten, dass diese trotz ihrer Komplexität beherrschbar bleiben, sind durchaus miteinander verwandt. Modularität, hierarchische Strukturierung der Regulationen, Redundanz und Diversität gehören offensichtlich zu den unverzichtbaren Gestaltungsmerkmalen der Systeme und Prozesse in beiden Bereichen.

Zelluläre Funktionseinheiten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Vielzahl molekularbiologischer Komponenten enthalten, die in komplexer Weise miteinander vernetzt sind. Das Zusammenwirken dieser Komponenten könnte nicht auf eine bestimmte physiologische Funktion ausgerichtet sein und müsste im Chaos enden, wenn nicht auf der Basis sensorischer Informationen hoch effiziente Regulationsvorgänge eine zielgerichtete Funktionsweise nicht nur ermöglichen, sondern trotz Störeinflüssen auch aufrecht erhalten würden. Die komplexen molekularbiologischen Strukturen müssen also auch leistungsfähige Signaltransduktionen und Regulationen umfassen, um ihre Funktion überhaupt wahrnehmen zu können. Will man also biologische Systeme in ihrem Verhalten verstehen, so reicht eine Erforschung aus rein molekularbiologischer Sicht nicht aus. Die zentrale Bedeutung, die der Signaltransduktion und Regulation im Hinblick auf die Funktionalität zellulärer Funktionseinheiten zukommt, verlangt auch eine Analyse ihres dynamischen Verhaltens aus systemtheoretischer Sicht. Insbesondere ganzheitliche Verhaltensmechanismen lassen sich nur dann wirklich verstehen, wenn sie auf der Grundlage molekularbiologisch fundierter Modelle einer systemtheoretischen Analyse unterzogen werden. Hier existieren heute noch erhebliche Defizite, die darauf zurückzuführen sind, dass sich die Biologie nur zögernd einer quantitativen Betrachtungsweise öffnet. Unter den Begriffen „Systembiologie“ und „Biosystemtechnik“ ist aber in jüngster Zeit ein Prozess des Umdenkens deutlich erkennbar.

Nach diesen Überlegungen versteht es sich von selbst, dass eine interdisziplinäre Zusammenarbeit der Biologie mit den System- und Ingenieurwissenschaften im Hinblick auf ein verbessertes Verständnis zellulärer Funktionseinheiten außerordentlich lohnend sein muss. Vor allem ist es das system- und regelungstheoretische Gedankengut, das in diesem Sinne wichtige Beiträge zu leisten vermag, um ganzheitliches Verhalten biologischer Systeme besser zu verstehen. So führt die Anwendung system- und regelungstheoretischer Methoden und Werkzeuge auch in der Biologie zu neuen Einsichten in die Prinzipien, die der Gestaltung zellulärer Systeme zugrunde liegen. Besonders nützlich erscheint an dieser Stelle die Entwicklung eines virtuel-

len biologischen Labors, dessen interdisziplinärer Aufbau aus (09) hervorgeht. Mittels computergestützter Modellierung und Simulation kann man in einem solchen Labor in ähnlicher Weise experimentieren wie mit biologischen Systemen der realen Welt. Die in (08) dargestellten Analogien zwischen einer Zelle und einem chemischen Produktionsprozess legen es nahe, auch darüber nachzudenken, ob die zellulären Regulationskonzepte nicht geeignet sind, um die Leittechnik technischer Produktionsanlagen wesentlich zu verbessern. • Ernst Dieter Gilles

Literatur

- 1 J.W. Lengeler. Metabolic Networks: a signal oriented approach to cellular models. *Biol.Chem.* 381: 911–920, 2000.
- 2 F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, M. Schaechte. *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach.* Sinauer Associates, Inc., 1990.
- 3 J.W. Lengeler, G. Drews, H.G. Schlegel. *Biology of the Prokaryotes.* Georg Thieme Verlag, 1999.
- 4 A. Kremling, K. Jahreis, J.W. Lengeler, and E.D. Gilles. The organization of metabolic reaction networks: A signal oriented approach to cellular models. *Metabolic Engineering*, 2(3):190–200, 2000.
- 5 A. Kremling and E.D. Gilles. The organization of metabolic reaction networks: II Signal processing in hierarchical structured functional units. *Metabolic Engineering*, 3(2): 138–150, 2001.
- 6 A. Kremling, K. Bettenbrock, B. Laube, K. Jahreis, J.W. Lengeler, and E.D. Gilles. The organization of metabolic reaction networks: III. Application for diauxic growth on glucose and lactose. *Metabolic Engineering*, 2001. 3(4): 362–379, 2001.
- 7 J. Stelling, A. Kremling, M. Ginkel, K. Bettenbrock, and E.D. Gilles. Towards a Virtual Biological Laboratory. In H. Kitano, editor, *Foundations of Systems Biology*, chapter 9, pages 189–212, MIT Press. 2001.

SUMMARY

For the control of complex technological processes modern systems sciences use mainly the concepts of modularisation and hierarchical structuring of regulations. Apart from the level of complexity there are many similarities and affinities between biological systems and complex technical processes. One may expect for this reason that the methods developed in modern engineering technology can deliver also to a better understanding of biological systems. The analysis of signal processes in cellular systems today enters the way to a more quantitative oriented biology. At the example of a bacterial cell a structuring concept is introduced for the structuring and modularization of the cellular process in general. In a system oriented view the integral behaviour of the cell can be described as the cooperation of three complex networks, metabolism, regulation and signal transduction. The modularization of the bacterial system into functional units of limited autonomy is the basis of modeling global behavioral characteristics. In that process of modularizing the correct demarcation of functional units and the identification of key variables describing the dynamics of the modules are of decisive importance.



Systembiologie – Interdisziplinärer Charakter

DER AUTOR



PROF. DR.-ING. DR. H.C. MULT. ERNST DIETER GILLES

Der im Jahr 1935 geborene Ernst Dieter Gilles absolvierte 1954 die Reifeprüfung in St. Goarshausen. Nach dem Studium der Elektrotechnik, Fachrichtung Regelungstechnik, legte er 1960 das Diplomexamen an der TH Darmstadt ab und promovierte dort 1963 und habilitierte 1966 an der Fakultät für Elektrotechnik der TH Darmstadt. Seit 1968 ist Ernst Dieter Gilles Direktor des Instituts für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Von 1987 bis 1991 war er Sprecher des Zentralen Schwerpunktprojekts Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart und von 1989 bis 1995 fungierte er als Sprecher der DFG-Forschergruppe „Methoden zur Modellierung und Berechnung der Dynamik verfahrenstechnischer Prozesse“. Als Mitglied des Senats der Deutschen Forschungsgemeinschaft wirkte Gilles von 1990 bis 1996 und von 1993 bis 2002 arbeitete er als Deutscher Herausgeber der Publikationsreihe „Chemical Engineering Science“ des Elsevier Verlages. Ab 1996 übernahm er die Sprecherfunktion im Sonderforschungsbereich 412 „Rechnergestützte Modellierung und Simulation zur Analyse, Synthese und Führung verfahrenstechnischer Prozesse“. Seit 1997 leitet er als Direktor das Max-Planck-Institut „Dynamik komplexer technischer Systeme“ in Magdeburg (Gründungsdirektor). Zahlreiche Preise und Ehrungen markieren den wissenschaftlichen Werdegang von Ernst Dieter Gilles. 1967 erhielt er den DECHEMA-Preis der Max-Buchner-Forschungstiftung, im Jahr 1992 wurde ihm die Carl-Friedrich-Gauß-Medaille, der Ernest-Solvay-Preis sowie der Landesforschungspreis Baden-Württemberg verliehen. 1995 erhielt er die Ehrendoktorwürde der Universität Hannover und die Ehrendoktorwürde der Technischen Universität Donezk/Ukraine. Im Jahr 1999 folgte die Ehrendoktorwürde der Universität Ploiesti/Rumänien und 2004 wurde Ernst Dieter Gilles der 7th Nordic Process Control Award der Nordic Working Group on Process Control verliehen. Professor Gilles ist Mitglied der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft sowie der Berlin-Brandenburgischen Akademie der Wissenschaften.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik
 Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart
 Tel.: 0711/685 6302, Fax: 0711/685 6371
 E-Mail: secretary@isr.uni-stuttgart.de, Internet: www.isr.uni-stuttgart.de

ANZEIGE

Ein wichtiger Ratgeber für Wissenschaft und Forschung



Herausgeber:
Dr. Dieter Herrmann und
Dr. K.P. Christian Spath

Geleitet von:
Dr. Ambros Schindler
 Leiter des Stiftungszentrums
 des Stifterverbandes für die
 Deutsche Wissenschaft

Bezug:
ALPHA Informationsgesellschaft mbH
 Frau Paulin
 Finkenstraße 10 • D-68623 Lamertheim
 Telefax: (0-6206) 939-243
 E-Mail: bestellung@alphawerbung.de

Forschungshandbuch 2005 | 2006

Finanzratgeber der Förderquellen und
 Förderprogramme und -institutionen
 für Wissenschaft und Forschung

640 Seiten • 14,40 EUR • ISBN 3-9803983-1-5

Wissenschaft und Forschung sind der Motor der künftigen wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Entwicklung. Dennoch schrumpfen die Grundetats seit Jahren. Wer Wissenschaft und Forschung auf einem hohen und internationalen Standard betreiben will, braucht deshalb Drittmittel.

Das System der Fördertöpfe und Drittmittelinwerbemöglichkeiten in Deutschland kennen nur wenige. Deshalb haben sich Drittmittelexperten zusammengetan, um einen aktuellen Finanzratgeber für Wissenschaft und Forschung zu erstellen.

Sie haben alle aktuellen nationalen, europäischen und internationalen Förderprogramme zusammengetragen, für die deutsche Hochschullehrer/innen, Wissenschaftler/innen und der wissenschaftliche Nachwuchs antragsberechtigt sind. Außerdem werden detaillierte Informationen gegeben über mehr als 500 wissenschaftsfördernde Institutionen, die nicht personenbezogen fördern, sondern Geld bereitstellen für bestimmte Forschungsarbeiten, Fachgebiete oder Zwecke, z.B. Reisemittel, Druckkosten, Stiftungs- oder Gastprofessuren oder für einen Forschungsaufenthalt im Ausland.

Das Buch kann über den Buchhandel oder über den Verlag zum Preis von 14,40 EUR bezogen werden.



I II

Sie beherrschen Ihr Fach. Nicht umgekehrt.

Bei sd&m sind ausgeglichene Persönlichkeiten gefragt. Unsere Kunden sind führende Unternehmen aller Branchen, deren Erfolg mit anspruchsvollen Softwarelösungen steht und fällt. sd&m will ihnen einen Vorteil durch maßgeschneiderte, leistungsfähige Softwarelösungen und durch IT-Beratung verschaffen.

Unser Team besteht aus rund 950 hoch qualifizierten IT-Fachleuten mit einer ganz besonderen, Kraft spendenden Kultur. Wir suchen folgende Positionen:

Als **Software-Ingenieur** sind Sie verantwortlich für herausfordernde Software-Engineering-Aufgaben. Im Team spezifizieren, entwerfen, programmieren, testen und integrieren Sie maßgeschneiderte Lösungen direkt für unsere Kunden und arbeiten an Studien mit.

Auf Ihre ausdrucksstarke Bewerbung mit Zeugnissen freuen wir uns. Ihre Unterlagen senden Sie bitte an die von Ihnen bevorzugte Niederlassung in **München, Stuttgart, Frankfurt, Köln/Bonn, Düsseldorf** und **Hamburg** oder an sd&m AG, Sylvia Brockmann, Carl-Wery-Str. 42, 81739 München. Mehr zu Projekten, Team und Kultur unter: www.sdm.de

Als **Senior-Software-Ingenieur** übernehmen Sie zusätzlich mehr eigene Verantwortung und leiten kleinere Projekte.

Als **Berater** mit einer Berufserfahrung von 5 oder mehr Jahren übernehmen Sie das Design der Architektur unserer Systeme sowie die Rolle des Chefdesigners. Sie beraten und coachen.

Als **Projektleiter** führen Sie ein Team von 5 bis 15 Personen. Sie sind der feste Ansprechpartner des Kunden und für die Koordination und das Ergebnis verantwortlich.

Wichtig sind exzellente Fähigkeiten, die Fertigkeiten können Sie sich schnell aneignen. Als Generalist sind Sie bereit zwischen den Rollen zu wechseln.

Als **Senior-IT-Berater** übernehmen Sie anwendungsübergreifende Aufgaben zur IT-Architektur, zur Betriebsführung, zu Geschäftsprozessen und zum Projektmanagement. Sie übernehmen Führungsaufgaben und arbeiten an der inhaltlichen und geschäftlichen Weiterentwicklung unserer IT-Beratung.

sd&m bietet Hochschulabsolventen eine hervorragende Fortsetzung ihrer akademischen Ausbildung in der industriellen Praxis. Erfahrenen Profis bieten wir herausfordernde, spannende und abwechslungsreiche Aufgaben bei renommierten Kunden.

Auch in dem schwierigen Umfeld der letzten Jahre hat sich sd&m sehr gut behauptet. Wegen unserer guten Auftragslage suchen wir in 2005 rund 200 neue Kolleginnen und Kollegen.

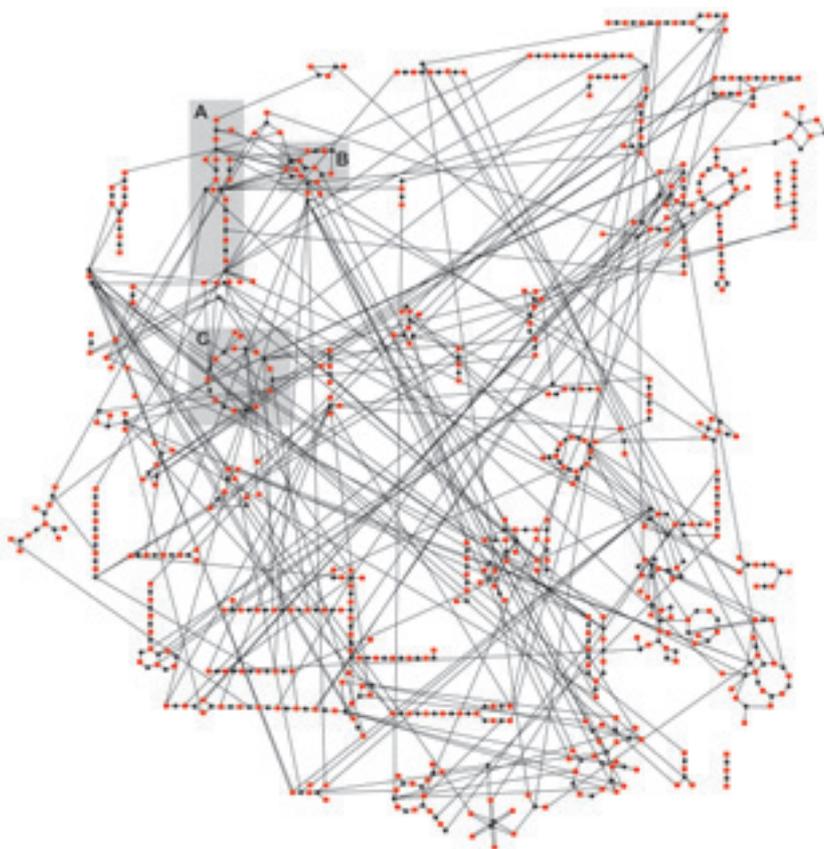


sd&m

A Company of  Capgemini

Integration von zellulären Stoffwechsel- und Signalnetzwerken

Rien ne va plus – nichts geht mehr ohne sie, die früher schon mal als Simulanten und Schönfärber der Wissenschaft Geschmähten. Aus der Simulation, einst eine der Haupttriebfedern für die Entwicklung von Computern überhaupt, ist längst eine allgegenwärtige Querschnittstechnologie geworden, deren Ergebnisdaten in immer größerer Zahl immer schneller produziert – nur durch grafische Aufbereitung oder Visualisierung interpretierbar bleiben.



1. Einführung

Experimentelle Beobachtungen und mathematische Modellierung und Simulation sind zwei zentrale und nicht trennbare Aspekte der Systembiologie. Beide Bereiche zeigen in den vergangenen Jahren stürmische Entwicklungen. Technologische Fortschritte im Bereich der Hochdurchsatztechnologien für die Sequenzierung der Genome, die experimentellen Analysen der Expression der genetischen Informationen, die Beobachtungen der mannigfaltigen Interaktionen zwischen den Proteinen und die ganzheitliche Erfassung der Konzentrationen der Metabolite in verschiedenen biologischen Systemen haben dabei zu einer noch nie dagewesenen Fülle von Daten in der experimentellen Biologie geführt. Der durchaus berechtigte Begriff der „Datenfluten“ spiegelt eindrucksvoll das unverkennbare Missverhältnis zwischen Datengenerierung und Datenverarbeitung wider. Der Begriff der Verarbeitung beschränkt sich in diesem Zusammenhang nicht auf das Informationsmanagement im Sinne von Datenbanken, sondern zielt auf den Erkenntnis-

gewinn, also die Generierung von neuem biologischen Wissen, die zielgerichtete Modifikation biologischer Systeme in der Bioprosesstechnik und die Identifikation multipler Targets bei der Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe. Die zunehmende Erschließung des Wissens um die Genome der hierbei interessierenden biologischen Systeme erfordern neben den bereits weitgehend verfügbaren experimentellen Methoden zur Entschlüsselung der Genome neue Werkzeuge und Methoden zur Quantifizierung der biologischen Komponenten und für die mathematische Modellierung und Simulation.

Eine besondere Herausforderung bei der genomweiten mathematischen Modellierung und Simulation stellt die Kopplung von Signal- und Stoffwechselnetzwerken dar. Diese Integration ist aber unerlässlich, um die Verarbeitung von Informationen in und zwischen Zellen mit der Verteilung von materiellen Stoffflüssen im biologischen System zu verknüpfen. In der systemorientierten, ganzheitlichen Analyse werden diese Netzwerke häufig getrennt betrachtet, und es ist sogar eine Tendenz zu beobachten, Signaltransduktionsprozesse und Stoffwechselnetzwerke in eigenen wissenschaftlichen Communities zu behandeln.

Im vorliegenden Beitrag wird versucht, Gemeinsamkeiten aber auch einige Besonderheiten dieser beiden Formen zellulärer Netzwerke herauszustellen. Diese Fragestellungen werden zunächst auf den Ebenen der Identifikation und Strukturanalyse der Netzwerke diskutiert. Am ausgewählten Beispiel der Kopplung von Zellzyklus und Energiestoffwechsel bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* soll darüber hinaus die Kopplung von Modulen aus der Signaltransduktion und dem Stoffwechsel gezeigt werden.

2. Rekonstruktion von zellulären Netzwerken

Selbstverständlich müssen vor jedweder Analyse zellulärer Netzwerke, sei es die des Stoffwechsels oder der Informationsverarbeitung, in einem ersten Schritt die für die Lösung der interessierenden Probleme relevanten Netzwerke identifiziert werden. Vor dem Hintergrund der Abertausenden zellulären Komponenten und ihrer gleichermaßen vielfältigen wie komplexen Interaktionen ist dieser Schritt der Rekon-

struktion mit gleichzeitiger Fokussierung auf das Wesentliche keineswegs trivial. Insbesondere ist bei vielen Fragestellungen unklar, welche Details zu berücksichtigen sind, beziehungsweise welche Granularität in der Modellierung erforderlich ist. Prinzipiell stehen für die Lösung dieser schwierigen Aufgabe zwei in der Regel komplementäre Strategien bereit: der Bottom-up und der Top-down Ansatz (01).

Bei der Rekonstruktion der Netzwerke mit Hilfe des Bottom-up Ansatzes wird versucht, biologisches Detailwissen über Einzelkomponenten und deren molekulare Wechselwirkungen in geeigneten Modulen zu aggregieren, um diese nachfolgend in für ganzheitliche Betrachtungen geeigneten Architekturen zu verschalten. Der Top-down Ansatz geht vom Gesamtsystem aus und verarbeitet dabei ganzheitliche Informationen (Genom, Transkriptom, Proteom etc.). Über globale Optimierungen sind dann die strukturellen gegebenfalls aber auch die kinetischen Eigenschaften der Komponenten im Gesamtnetzwerk zu rekonstruieren. Die hierfür erforderlichen Operationen werden auch unter dem Begriff des „Reverse Engineering“ zusammengefasst. Bei dieser Analyse ist also der Ausgangspunkt für die Netzwerkrekonstruktion bereits eine ganzheitliche Betrachtungsweise.

In die Bewertung der beiden Ansätze fließen verschiedene Kriterien ein. Zunächst einmal sind Kenntnisse

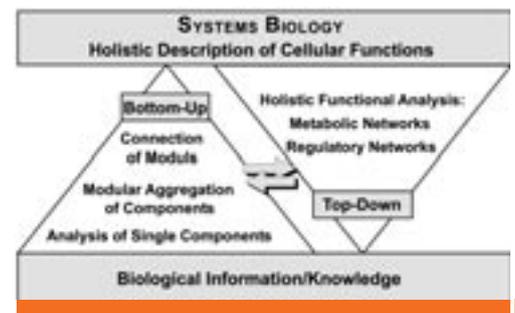
SUMMARY

Eine besondere Herausforderung in der Systembiologie stellt die Kopplung von Signal- und Stoffwechselnetzwerken dar. Diese Integration ist aber unerlässlich, da das phänotypische Verhalten von zellulären Systemen sowohl von den Prozessen der Signalübertragung als auch durch Stoffwechselprozesse bestimmt wird. In der systemorientierten, ganzheitlichen Analyse werden diese Netzwerke häufig getrennt betrachtet, und es ist sogar eine Tendenz zu beobachten, Signaltransduktionsprozesse und Stoffwechselnetzwerke in eigenen wissenschaftlichen Communities zu behandeln.

*Im vorliegenden Beitrag wird versucht, Gemeinsamkeiten aber auch einige Besonderheiten dieser beiden Formen zellulärer Netzwerke herauszustellen. Diese Fragestellungen werden zunächst auf den Ebenen der Identifikation und Strukturanalyse der Netzwerke diskutiert. Am ausgewählten Beispiel der Kopplung von Zellzyklus und Energiestoffwechsel bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* soll darüber hinaus die Kopplung von Modulen aus der Signaltransduktion und dem Stoffwechsel gezeigt werden.*

Integrating signalling networks with metabolic networks poses a major challenge in systems biology. The coupling is essential since phenotypic behaviour of cellular systems results from both (1) signal transduction and (2) distribution of metabolic fluxes. In systems biology, however, signalling networks and metabolic networks are often treated separately and, more and more, within specialised scientific communities.

*In this contribution, the authors try to work out similarities but also to discriminate between the two network classes. At first, the problem is discussed on the basis of structural network analysis. In the following section, the linkage of modules from signal transduction and metabolism is exemplified by the cell cycle and energy metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.*



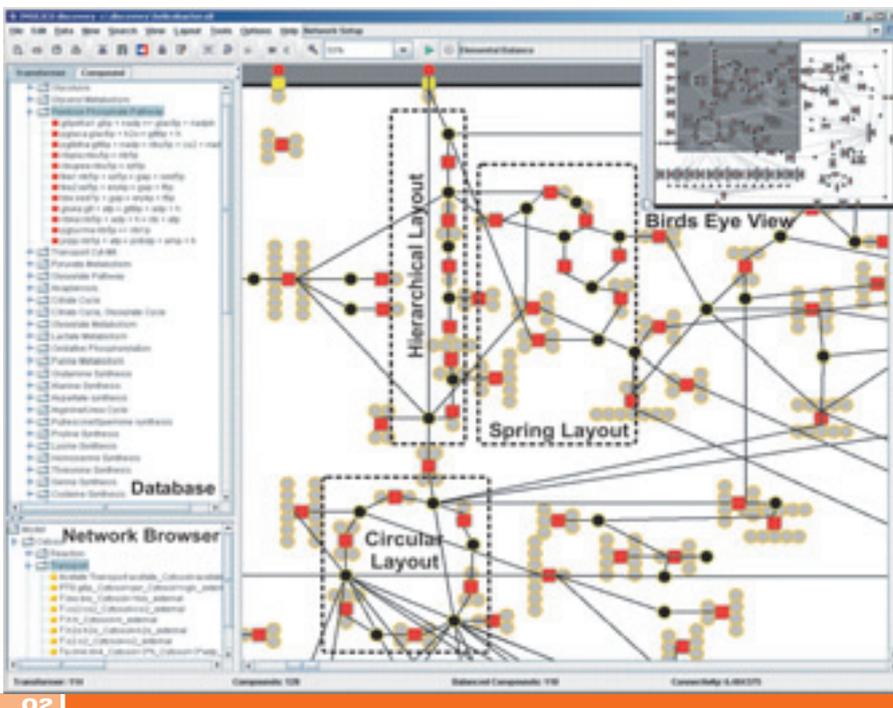
Bottom-up and Top-down Ansätze in der Systembiologie.

über die notwendigen Details bezüglich der zu berücksichtigenden Komponenten des Netzwerkes a priori nicht vorhanden. Demzufolge gibt es natürlich Risiken, bedeutsame Einflussgrößen bei den experimentellen Beobachtungen und der Rekonstruktion des Netzwerkes beim Bottom-up Ansatz zu übersehen. Häufig reicht auch der Stand des Wissens nicht aus, um die zur Lösung des Problems relevanten Komponenten und deren Wechselwirkungen bereit zu stellen. Andererseits ist der Rechenaufwand bei der holistischen Rekonstruktion von Netzwerken via Top-down Ansätzen u.U.

Der Stand des Wissens und vor allem der Mangel an Methoden und Werkzeugen im Bereich der Top-down Ansätze erlaubt derzeit noch keine zuverlässige beziehungsweise endgültige Bewertung der beiden Strategien. Man darf daher die beiden Methoden als komplementäre Strategien betrachten.

Die Genome zahlreicher Mikroorganismen, wie z.B. des Bakteriums *Escherichia coli* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, wurden nicht nur erfolgreich sequenziert, sondern auch bereits funktionell charakterisiert. Die Informationen sind in öffentlich zugänglichen Datenbanken (z.B. EcoCyc, SGD) verfügbar. Die Rekonstruktion von metabolischen Netzwerken wird darüber hinaus durch entsprechende Links zu Proteindatenbanken (z.B. Swiss-Prot) erleichtert. Diese geben darüber Auskunft, welche Gene unter verschiedenartigsten Umweltbedingungen exprimiert werden. Im Falle der Signalnetzwerke stehen vergleichbare Informationen nur außerordentlich beschränkt zur Verfügung und biologisches Wissen über die Funktionalität der einzelnen Bausteine des Netzwerkes muss in der Regel aus primären Literaturquellen extrahiert werden. Die ersten Datenbanken über Signalnetzwerke sind aber im Entstehen (z.B. <http://www.signaling-gateway.org>).

Das wichtigste Werkzeug in der Analyse von biologischen Netzwerken ist die Bilanzierung der chemischen Spezies im Netzwerk. Diese Bilanzierung erfordert zunächst einmal eine Überprüfung der Konsistenz des rekonstruierten Netzwerkes. Hierzu sind die Bilanzen der chemischen Elemente und der elektrischen Ladungen der Moleküle zu kontrollieren. Diese Kontrollen geben Hinweise auf Unvollständigkeiten beziehungsweise auch Fehler in den angenommenen Reaktionsgleichungen. Für die Rekonstruktion und das Management dieser Netzwerke stehen verschiedene Modellierungs- und Simulationswerkzeuge zur Verfügung (02). Nach der essentiellen Konsistenzüberprüfung können dann verschiedene topologische Analysen durchgeführt werden. Diese liefern Hinweise über beispielsweise nicht genutzte Transformationschritte (fehlende Verbindungen im Netz), sogenannte Dead-end Metabolite (fehlende Anschlussreaktionen), parallele Wege und die wichtigen elementaren Moden im System. Diese Elementarmoden, die sich auch für genom-



02

In silico-Netzwerkrekonstruktion. (1) Die Netzwerkkomponenten werden aus der Datenbank gezogen. (2) Das computergestützte Layout beschleunigt die Rekonstruktion. Die Elemente- und Ladungsbilanzen und die damit durchgeführten Konsistenzüberprüfungen laufen im Hintergrund (INSILICO discovery; <http://www.insilico-biotechnology.com>). Die roten Kästen symbolisieren die Stoffwandler, die blauen Kreise die Stoffspeicher.

außerordentlich groß. In der Tat können Methoden der Rekonstruktion der Verschaltung in Regulationsnetzwerken wie genomweite topologische Analysen an der kombinatorischen Explosion scheitern. Neuere Erkenntnisse bei der dynamischen Analyse großer Netzwerke (Mauch et al., unveröffentlichte Untersuchungen) liefern indes Hinweise, dass die Zuordnung des Verhaltens der Einzelkomponenten an Bedeutung verliert. Dieser Sachverhalt geht auf die Beobachtung zurück, dass die Sensitivitäten der Kontrolle über das gesamte Netzwerk verteilt sind. Diese geringere Empfindlichkeit der Verhaltensweise des Einzelbausteins im Kontext des Gesamtsystems entspricht der biologischen Plastizität und erleichtert die dynamische Modellierung großer Netzwerke.

|Realizing Systems Biology



In silico network solutions for
biotechnological products

INSILICO
biotechnology

www.insilico-biotechnology.com

Henkel

A Brand like a friend *

Menschen machen Marken erfolgreich!

Denken Sie in neuen Dimensionen?

Dann sind Sie bei uns richtig.

Faszinieren Sie innovative Technologien?

Biotechnologie
Nanotechnologie
Produktionstechnologie
Die erschließen wir in
Forschung und Technologie
bei Henkel.

Sind Sie neugierig und kreativ?

Dann können Sie sich bei
uns in einem interdisziplinären
Netzwerk entfalten.

Interesse?

Nehmen Sie Kontakt auf!



* Weitere Informationen: henkel.de oder +49 211 797 9468



Wir sind weltweit führend im Reifenmarkt – über 125.000 Mitarbeiter, Innovationsbereitschaft und eine ausgezeichnete Produktqualität garantieren unseren Erfolg.

Wir suchen

N a c h w u c h s k r ä f t e

mit Universitäts- bzw. Fachhochschulabschluss

für eine nationale oder internationale Entwicklung.

Wir bieten Ihnen die Chance als Absolvent oder mit erster Berufserfahrung für unsere Bereiche

**Betriebsorganisation
Qualität und Produktion
Konstruktion und Automatisierung
Forschung & Entwicklung in Frankreich
Marketing & Vertrieb**

tätig zu werden.

Wir bieten Ihnen individuelle Einarbeitung, teilweise mit Traineecharakter, und gezielte Weiterbildungsmaßnahmen, interessante und anspruchsvolle Aufgaben in unserem innovativen Unternehmen und Förderung Ihrer Aufstiegs- und Entwicklungsmöglichkeiten bei uns weltweit.

Sie verfügen über einen guten Hochschulabschluss und besitzen idealerweise französische und englische Sprachkenntnisse. Die Bereitschaft auch im Ausland tätig zu werden wäre von Vorteil.

Interesse? Dann freuen wir uns über Ihre Bewerbung.

MICHELIN Reifenwerke KGaA

Zentrale Personalabteilung
Kennziffer 0305
Michelinstraße 4, 76185 Karlsruhe
0721/530-1326
<http://www.michelin-jobs.de>



weite Netze berechnen lassen (Mauch et al., 2002), liefern Hinweise über die unterschiedlichsten Stoffwechselwege im biologischen System, die von einem vorgegebenen Ausgangsstoff (z.B. Nährsubstrat) zu einem Produkt (z.B. ausgeschiedener Metabolit oder Biomasse) führen. Hieraus lassen sich beispielsweise im Fall von biotechnischen Prozessen jene Stoffwechselwege in der Zelle identifizieren, die zu maximalen Ausbeuten (kgProdukt/kgSubstrat) führen. Die gleiche Analyse führt zur Beantwortung der Frage, welche Gene für eine vorgegebene Funktionalität (z.B. Produktion eines Stoffwechselproduktes) essentiell sind, beziehungsweise wie viele Gene gleichzeitig auszuschalten sind, um eine spezifische Dysfunktion des Netzwerkes herbeizuführen. Letztgenannte Analyse führt zum Begriff der „strukturellen Robustheit“ des Systems, ein anschauliches Maß für die Sensitivität einer Funktionalität gegenüber genetischen Defekten.

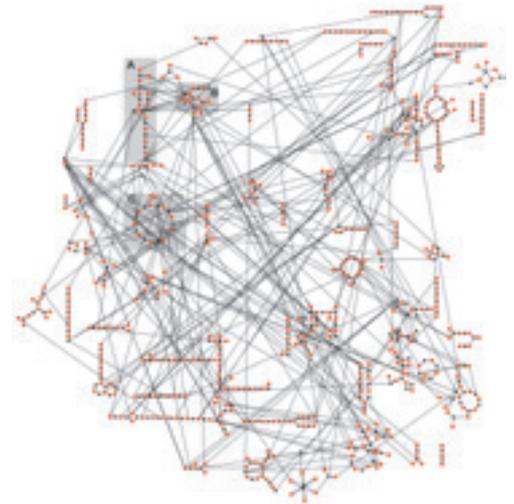
Außerordentlich hilfreich für die diversen Analysen der interessierenden Systeme sind automatisierte Visualisierungen (Layouts). (03) zeigt als Beispiel das genomweite metabolische Netzwerk des Bakteriums *Helicobacter pylori*, das aus der Datenbank MetaCyc (<http://biocyc.org/meta>) rekonstruiert wurde. Bei der Visualisierung der Rekonstruktion wurden die in der klassischen Biochemie definierten Stoffwechselwege, wie z.B. „Glykolyse“, „TCA-Zyklus“ und „Pentosephosphat-Shunt“ in Gruppen aggregiert. Es ist darauf hinzuweisen, dass diese „klassischen“ Stoffwechselwege keineswegs mit den oben erwähnten Elementarmoden, die der mathematisch strengen Definition eines elementaren Stoffwechselweges entsprechen, übereinstimmen.

(04) zeigt die Visualisierung eines Signalnetzwerkes für den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β). Dieses Netzwerk wurde aus primären Literaturdaten rekonstruiert. Die Zahl der Netzwerkkomponenten (561) ist in vergleichbarer Größenordnung wie bei dem metabolischen Netzwerk in (03) (461). Trotz dieser vergleichbaren Größe der Netze sieht man aber sofort gravierende Unterschiede in den Topologien.

Zunächst einmal lässt sich in keinem der beiden Netze eine modulare Organisation und klare Abgrenzungen von kleineren, autonomen Netzwerken erkennen. Diese

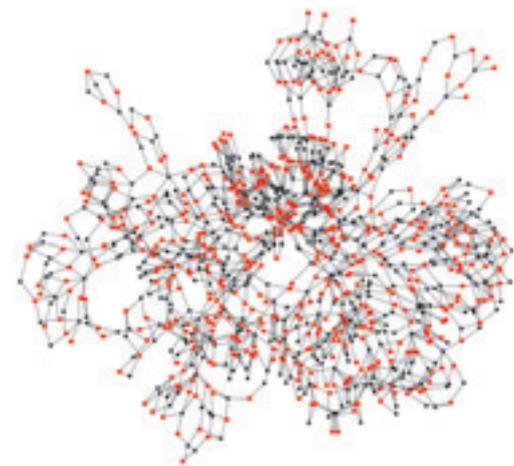
rein visuelle Beobachtung wird durch Analysen der Netzwerktopologie bestärkt. In der Tat zeigen neuere Untersuchungen (Eeka et al., 2000; Ravasz et al., 2002; Barabasi and Oltvai, 2004), dass die metabolischen Netzwerke durch die Eigenschaften so genannter skalenfreier Topologie gekennzeichnet sind. Aus der Darstellung in (05) geht hervor, dass auch das metabolische Netzwerk des Bakteriums *Helicobacter pylori* eine skalenfreie Topologie zeigt, wobei die Steigung einen Exponenten von 2,4 liefert. Eine charakteristische Eigenschaft dieser skalenfreien Netzwerke ist die Existenz einiger hochvernetzter Knoten (hubs), wie z.B. ATP, NADPH etc., die an einer großen Zahl von Verbindungen (Reaktionen) beteiligt sind. Infolge dieser hochvernetzten Knoten ist eine Dekomposition des Gesamtnetzes in abgegrenzte, autonome Teilnetze (Module) nicht möglich.

Im Unterschied zum metabolischen Netzwerk liefert das Signalnetz den deutlich niedrigeren Exponenten von 1,5 (05). Dies darf man als Hinweis werten, dass die Architektur des Signalnetzes durch eine im Vergleich zum metabolischen Netzwerk geringere Anzahl von hochvernetzten Knoten zusammengehalten wird. Weitere interessante Unterschiede lassen sich beobachten, wenn man versucht, das oben erwähnte Konzept der Elementarmoden auf die Signalnetze zu übertragen. Dabei lassen sich zunächst einmal keine Lösungen (Signalwege) finden, die den Eingang (Rezeptor für das Eingangssignal) mit dem Ausgang (z.B. Aktivierung eines Transkriptionsfaktors für die Genexpression) verbindet. Vielmehr zeigen die Lösungen eine Fragmentierung in sehr kleine Regionen, die sich als Signaltransduktionseinheiten interpretieren lassen. Beispiele für diese kleinsten Einheiten sind Assoziationen und Dissoziationen von Proteinkomplexen, Aktivierungen und



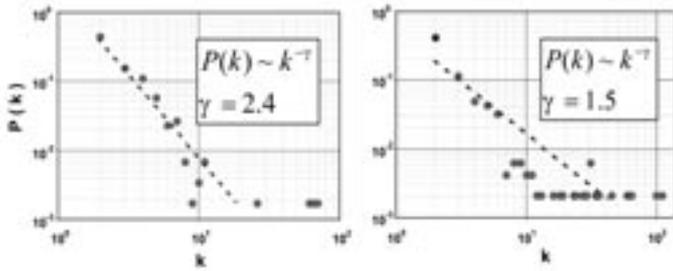
03

Genomweites metabolisches Netzwerk des Bakteriums *Helicobacter pylori*. Das Netzwerk besteht aus 450 Reaktionen und 461 Metaboliten. (A) Glykolyse (B) Pentosephosphat shunt (C) TCA Zyklus. Datenbank: MetaCyc (<http://biocyc.org/meta>). Das *H. pylori*-Netzwerk kann als SBML-file von <http://sbml.org/models> heruntergeladen werden (SBML: Systems Biology Markup Language).



04

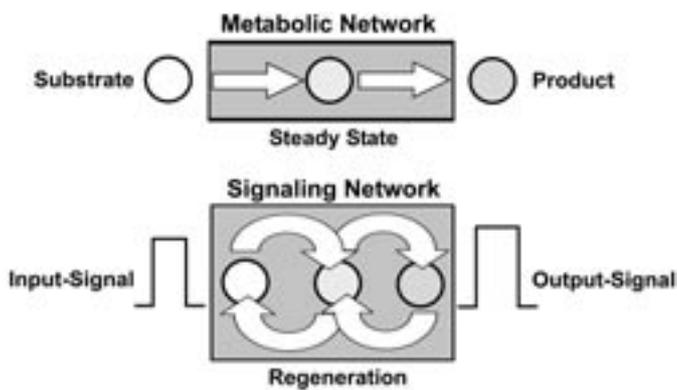
Signaltransduktionsnetzwerk mit Rezeptoren für den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β). Das Netzwerk enthält 553 Reaktionen und 561 Komponenten. Die Mehrzahl der Komponenten sind Proteine. Das TGF- β Netzwerk kann als SBML-file von <http://sbml.org/models> heruntergeladen werden.



05

Verteilung des Verknüpfungsgrades $P(k)$. k ist die Zahl der Verknüpfungen pro Knoten und $P(k)$ ist die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion der Knoten mit k Verknüpfungen im Netz. Links: Verteilung der Verknüpfungen der Metabolite im metabolischen Netz von *H. pylori*. Rechts: Verteilung der Verbindungen der Speicher im Signalnetz (TGF- β).

Deaktivierungen von Enzymen oder Transportprozessen über die Grenzen von Zellkompartimenten. Bei der Aggregation dieser Einheiten zu größeren Signalnetzen lassen sich direkte Verbindungen der Einheiten zu Signalkaskaden und „Fernwirkungen“ über Kinasen beobachten. Während die Regeneration innerhalb der elementaren Einheit durch einen materiellen Stofffluss gekennzeichnet ist, kommt es nach Aggregation nicht mehr zur Übertragung von Stoffflüssen, sondern von Informationen im Signalnetz. Ein weiterer Unterschied zwischen den Signalnetzen und den metabolischen Netzen besteht darin,



06

Materieller Stofffluss im Stoffwechselnetzwerk und Informationsübertragung im Signalnetzwerk.

einer anderen Reaktion bewirken kann. Eine Komponente im Signalnetz (z.B. Protein) kann indes sowohl als Reaktand wie auch als Katalysator einer anderen Transformation in Erscheinung treten (T.01).

dass im Stoffwechselnetzwerk eine Komponente (Metabolit) stets nur Substrat oder Produkt einer Reaktion darstellt und demzufolge keine Katalyse einer anderen Reaktion bewirken kann. Eine Komponente im Signalnetz (z.B. Protein) kann indes sowohl als Reaktand wie auch als Katalysator einer anderen Transformation in Erscheinung treten (T.01).

3. Integration von Signal- und Stoffwechselnetzwerken

3.1. Biologische Fragestellung

Eine inhärente Eigenschaft von Zellpopulationen ist ihre Heterogenität. Diese Heterogenität hat ihre Ursachen in den unterschiedlichen Lebensstadien der individuellen Zellen. Das dynamische Verhalten der Gesamtpopulation ergibt sich demzufolge aus der Superposition der Dynamik der individuellen Zellen. Da sich die Dynamik der zellulären Netzwerke in Abhängigkeit des Zellalters beziehungsweise der jeweiligen Position im Zellzyklus verändert, führt die Superposition zu einem dynamischen Verhalten auf der Populationsebene, das zunächst einmal keine Rückschlüsse auf das Verhalten der Einzelzelle zulässt. Diese systeminhärente Problemstellung manifestiert sich in einer Reihe ebenso interessanter wie auch offener Fragen der systembiologischen Analysen in der Biomedizin wie auch Biotechnologie. Es ist bekannt, dass Subpopulationen unterschiedliche Wirkungen auf Medikamente zeigen können. Beispielsweise ist die Wirkung der Cytostatika in der Krebstherapie von der Zellzyklusposition der individuellen Zellen im Tumor abhängig (Smith et al., 2000; Kitano 2003). Gänzlich andere Auswirkungen kann die Heterogenität der individuellen Zellen in biotechnologischen Anwendungen haben. So kann der Gehalt der Plasmide, Träger zusätzlicher extrachromomaler DNA, von Zelle zu Zelle variieren. Diese Phänomene sind dann für quantitative Analysen von Prozessen mit rekombinanten Mikroorganismen von großer Bedeutung.

Die zentrale Rolle des sekundären Messengers cAMP (cyclisches AMP) bei der Koordinierung des Energiestoffwechsels und des Zellzyklus bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* soll als Beispiel für die Unterschiede des Verhaltens auf der Ebene der individuellen Zellen und den Eigenschaften der Population dienen. Mit diesem Beispiel soll aber auch zugleich die Bedeutung der Kopplung von Stoffwechsel- und Signal-

netzwerken aufgezeigt werden. In Anwendung dieser Kopplung auf die individuelle

Stoffwechselnetzwerk

Materieller Stofffluss

Der Stationäre Zustand ist für die Funktionalität des metabolischen Netzwerks von großer Bedeutung

Die Enzyme treten nicht als Reaktanden in Erscheinung

Signalnetzwerk

Informationsübertragung

Die Funktion wird durch transientes Verhalten bestimmt

Komponenten, die transformiert werden, sind häufig Katalysatoren anderer Reaktionen

T.01

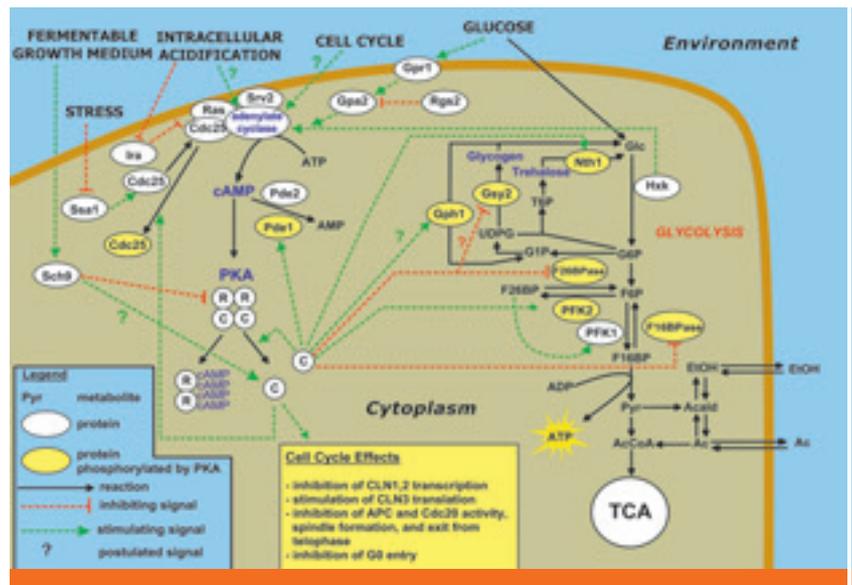
Charakteristische Eigenschaften der Stoffwechsel- und Signalnetzwerke.

Zelle wird schließlich die Frage adressiert, wie der unterschiedliche Energiebedarf während der verschiedenen Phasen des Zellzyklus abgedeckt werden kann. Für die mathematische Modellierung dieser Problemstellung wird ein Konzept vorgestellt, das auf der Aggregation verschiedener Module basiert. Diese Modellierungsstrategie ist dann dem in (01) skizzierten Bottom-up Ansatz zuzuordnen.

3.2. Kopplung des Zellzyklus mit dem Energiestoffwechsel

(07) illustriert die wichtigsten Teile des cAMP-Signalnetzwerkes in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und dessen Ankopplung an den Energie- und Speicherstoffwechsel. Das Signal des Botenstoffs cAMP wird in Folge einer Aktivierung der Adenylatcyclase gebildet und durch die Wirkung der Phosphodiesterasen wieder abgebaut. Ausgelöst wird der für die Bildung des Signals entscheidende Teil des Signalweges entweder durch einen zellexternen Stimulus (z.B. Zugabe von Glucose) oder durch zellinterne Signalkaskaden unter Mitwirkung der RAS-Proteine.

Die allgemeine Aufgabe des cAMPs besteht in der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Hierbei dissoziiert das Tetramer in die zwei katalytischen und ein Dimer der regulatorischen Untereinheiten (C und R). Die katalytischen Untereinheiten können dann verschiedene Substratproteine phosphorylieren. In (07) sind einige der Zielproteine (Enzyme) im Energie- und Speicherstoffwechsel der Hefe dargestellt. In der Glykolyse ist es zunächst einmal die Phosphofruktokinase 2 (PFK 2), die die Umwandlung des Metaboliten Fructose-6-phosphat in Fructose-2,6-bisphosphat katalysiert. Das Produkt dieser Reaktion ist seinerseits ein sehr starker Aktivator des glykolytischen Enzyms Phosphofruktokinase 1 (PFK 1), das die Umwandlung von Fructose-6-phosphat in Fructose-1,6-bisphosphat katalysiert. Der integrale Effekt dieser Phosphorylierung und Aktivierung ist eine Erhöhung der Aktivität des Enzyms PFK 1, so dass eine Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse stattfinden kann, wenn unter den entsprechenden physiologischen Bedingungen dieses Enzym einen Einfluss auf die Flusskontrolle ausübt. Weiterer durch die katalytische Untereinheit der PKA phosphorylierte Enzyme findet man im Speicherstoffwech-



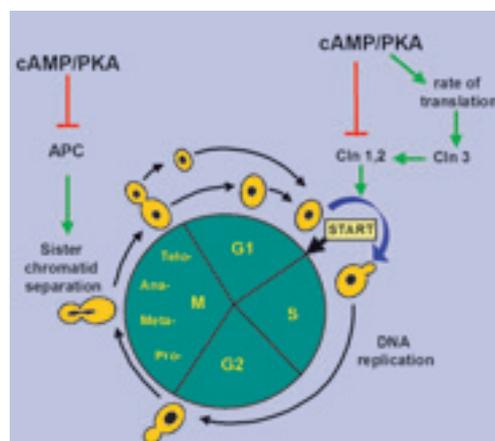
07

sel. Hier kommt es zu einer Aktivierung der Trehalase, die für den Abbau des Speicherstoffes Trehalose verantwortlich ist, sowie einer Aktivierung der Glykogenphosphorylase und Inhibition der Glykogensynthese, was schließlich zum Abbau des zweiten wichtigen Speicherstoffes der Hefe, des Glykogens, führt. Der integrale Effekt dieser zellinternen Regulation ist eine Mobilisierung der Speicherstoffe, die eine Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse bewirkt. Mit dieser Stoffflussverstärkung ist eine Zunahme der ATP-Bildung verknüpft.

Neben diesen Zielproteinen im Energiestoffwechsel übernimmt die aktivierte PKA auch wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus (08). Hier sind vor allem zwei wichtige Ereignisse herauszustellen. Gemeinsam mit anderen Schlüsselproteinen der Wachstumsregulation (TOR) führt der Anstieg der PKA-Aktivität zu einer Verstärkung der Proteinbiosynthese

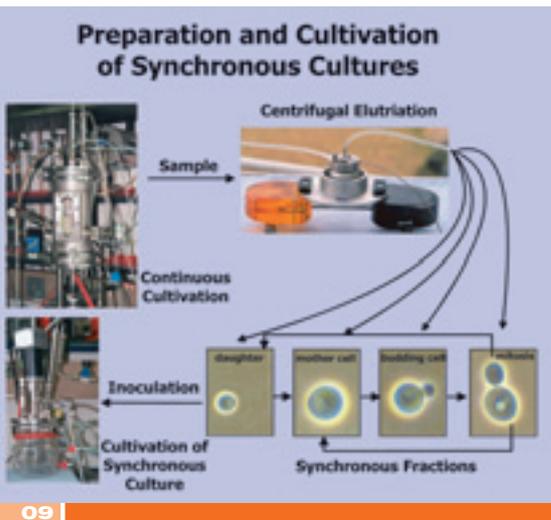
Schematische Darstellung der cAMP-PKA Signaltransduktionskaskade und ausgewählte Verbindungen zum Energiestoffwechsel und Zellzyklus. Die ausgezogenen Linien sind Reaktionen, die gestrichelten Linien repräsentieren Stimulationen (→) und Inhibitionen (⊥). Ellipsen sind Proteine, auch zusätzlich markiert, um Phosphorylierungen anzuzeigen.

Abkürzungen: Ac: Acetat, Acald: Acetaldehyd, AcCoA: Acetyl-CoA, APC: anaphase promoting complex, ATP: Adenosintriphosphat, C: Katalytische Untereinheit der PKA, EtOH: Ethanol, F6P: Fructose-6-Phosphat, F16BP: Fructose-1,6-Bisphosphat, F26BPase: Fructose-2,6-Bisphosphatase, Glc: Glucose, G1P: Glucose-1-Phosphat, G6P: Glucose-6-Phosphat, Hxk: Hexokinase, PDC: Pyruvatdecarboxylase, PDH: Pyruvatdehydrogenase, PFK1: Phosphofruktokinase 1, PFK2: Phosphofruktokinase 2, Pyr: Pyruvat, R: Regulatorische Untereinheit der PKA, TCA: Tri-carbonsäurezyklus, UDPG: UDP-Glucose.



Die Phasen des Zellzyklus und dessen Interaktion mit der Proteinkinase A.

08



se, was über eine Verkürzung der in (08) skizzierten G1-Phase zu einem Anstieg der Wachstumsrate der Hefe führt. Für die Verkürzung diese G1-Phase ist eine weitere Rückkopplung zwischen PKA und den G1-Cyclinen von Bedeutung (Baroni et al., 1994), die schließlich für den Startpunkt des Eintritts in die nächste Zellzyklusphase (S) relevant ist. Des weiteren beeinflusst PKA aber auch den Austritt aus der Mitose, in der die Zellteilung erfolgt. Dieser Einfluss erfolgt ver-

Ergebnisse bestätigen die Vermutungen bezüglich des Zeitverhaltens des cAMPs (Anstieg in der Nähe der S-Phase und rapider Abfall in der M-Phase (Mitose)), um die Trennung der Zellen sicherzustellen. Weitere experimentelle Untersuchungen zeigen, dass der Anstieg des cAMP Signals zu der erwarteten Mobilisierung der Speicherstoffe der Zelle führt, so dass zusätzlich benötigtes ATP bereitgestellt werden kann. Die durch die Mobilisierung der Speicherstoffe bewirkte Verstärkung des Stoffflusses durch die Glykolyse manifestiert sich auch in einer entsprechenden Erniedrigung des gelösten Sauerstoffs. Offenbar wird ein Teil des zusätzlichen Stoffflusses dem TCA-Zyklus zugeführt, was mit einer Erhöhung des Sauerstoffbedarfs der Kultur einhergeht. Ein weiterer Teil des zusätzlichen Stoffflusses wird aber über einen sogenannten „Metabolic overflow“ zum Ethanol umgeleitet, was sich durch entsprechende Messungen des ausgeschiedenen Ethanols belegen lässt.

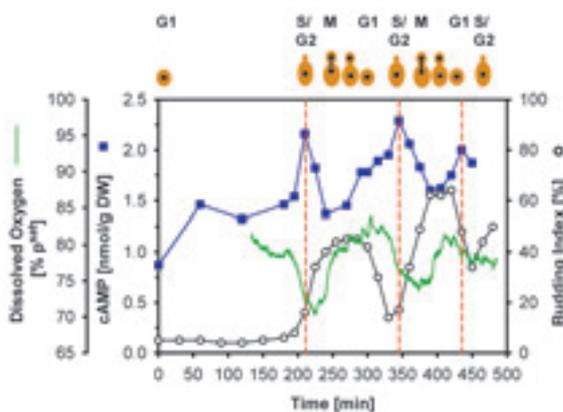
Eine nach wie vor noch nicht zufriedenstellend beantwortete Frage betrifft das Problem, welcher Stimulus die Aktivität der Adenylat-cyclase beziehungsweise der Phosphodiesterasen in einer zellzyklusabhängigen Art und Weise beeinflusst. Vor dem Hintergrund von Konzepten zur hierarchischen Strukturierung zellulärer Regulationsnetzwerke scheinen zwei Strategien denkbar. Entweder kommt der Stimulus direkt aus dem Zellzyklus oder aber der Energiezustand der Zelle greift direkt in die Regulation ein („demand control“). Messungen von Adenin- und Guanin-nukleotiden während des Zellzyklus (Müller et al., unveröffentlichte Untersuchungen) zeigen Variationen der Konzentrationen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wird derzeit ein direkter Eingriff des Energiezustandes über die in (07) skizzierte Ras-Kaskade postuliert, die ebenfalls eine Aktivierung der Adenylat-Cyclase bewirken kann.

Von der kontinuierlichen Züchtung der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* im Bioreaktor über die Elutriations-zentrifugation zu der Auftrennung der Zellpopulation in verschiedene Fraktionen. Die kleinen Tochterzellen werden als Inokulum für die nachfolgende Züchtung einer Synchronkultur herangezogen.

mutlich über eine Inhibierung des Proteinkomplexes APC (anaphase promoting complex), der für die zeitliche Regulation der Trennung der Schwesterchromatiden verantwortlich ist. Diese beiden Schlüsselfunktionen der PKA legen die Vermutung nahe, dass die Konzentration des auslösenden Signals für die PKA-Aktivierung, das cAMP, während des Zellzyklus variieren muss.

Diese Vermutung lässt sich durch gezielte Messungen der Dynamik der Konzentration des intrazellulären Botenstoffes in sogenannten Synchronkulturen erhärten. Ausgangspunkt dieser Synchronkulturen sind zunächst Züchtungen der Hefe bei kontinuierlicher Prozessführung, d.h. zeitlich konstanter spezifischer Wachstumsrate beziehungsweise Verdopplungszeit. Dieser Kultur wird eine Probe entnommen und in einer speziellen Zentrifugation (Elutriationszentrifuge) die Hefezellen in Fraktionen verschiedener Zellgrößen aufgetrennt (09). Mit der dabei gewonnenen Fraktion der kleinsten Tochterzellen wird anschließend ein neuer Prozess unter kontrollierten Wachstumsbedingungen gestartet. Da hierbei alle Zellen

zumindest während eines Zellzyklus das gleiche Alter haben, spricht man auch von einer synchronisierten Kultur. In Verbindung mit schneller Probenahmetechnik (Theobald et al., 1993; Buziol et al., 2002) lassen sich die zeitlichen Verläufe der intra- und extrazellulären Metabolite sowie des cAMPs verfolgen. Die in (10) dargestellten



Dynamik der intrazellulären cAMP-Konzentration, des gelösten Sauerstoffs, des Budding Index (Kennzeichnung der Geburtsnarben; BI) in einer Glucose-limitierten Kultur (Müller et al., 2003). Die als Cartoon gekennzeichneten Hefezellen zeigen die Zellzyklusposition.

3.3. Entwurf eines modularen Modells für die Kopplung von Energiestoffwechsel und Zellzyklus

Die Fragestellung der quantitativen Beschreibung des Einflusses des cAMP auf das Wachstum der Zellpopulation erfordert im ersten Schritt die mathematische Modellierung und Simulation auf der Ebe-

ne der Einzelzelle. Um sicherzustellen, dass das detaillierte biologische Wissen möglichst umfassend Berücksichtigung findet, ist es erforderlich, zunächst auf den in (01) dargestellten Bottom-up Ansatz zurückzugreifen. Dieses Modellierungskonzept basiert auf der modularen Strukturierung, wozu Funktionsmodule in geeigneter Weise zu definieren sind. Die für das Einzelzellmodell definierten Funktionsmodule sind neben ihrer Verschaltung in (11) dargestellt.

Der Funktionsmodul für die Signaltransduktion umfasst die für die Beschreibung der Bildung und Abbau des Botenstoffes cAMP erforderlichen Reaktionen sowie das Teilmodell für die Aktivierung der PKA. Eine für zahlreiche Signaltransduktionsprozesse charakteristische dynamische Eigenschaft dieses Signals ist das über Rückwirkungen im System bewirkte adaptive Verhalten. Im konkreten Fall sind zwei Rückwirkungen von Bedeutung und im Modell zu berücksichtigen. Wie in (07) bereits skizziert, wird eine der für den Abbau des cAMPs verantwortlichen Phosphodiesterasen (Pde1) durch die katalytische Untereinheit C der PKA via Phosphorylierung aktiviert (Ma et al., 1999). Eine Verstärkung erfährt die Rückführung durch die Einwirkung der PKA auf die Konzentration des membrangebundenen Adenylat-Cyclase-Komplexes. Die beiden Rückführungen bewirken eine Rückstellung des cAMP-Signals auch unter Bedingungen anhaltender Stimulation des Signalweges durch extrazelluläre Glucose. Diese Simulationsergebnisse finden ihre Bestätigung im Experiment. Die Bedeutung des adaptiven Verhaltens lässt sich besonders anschaulich an der Dynamik des cAMP-Signals im Zellzyklus erkennen (10). Dem beim Übergang in die S/G2-Phase erkennbaren Maximum in der Konzentration des cAMPs folgt ein rascher Abfall, um die für die Regulation der Trennung der Schwesterchromatiden erforderliche niedrige PKA-Aktivität sicherzustellen.

Im Kern des Funktionsmoduls für das Stoffwechselnetzwerk stehen die bereits früher am Institut für Bioverfahrenstechnik entwickelten und durch Messungen von intrazellulären Metaboliten validierten dynamischen Modelle für die Glykolyse und den Pentosephosphat-Shunt (Rizzi et al., 1997; Vaseghi et al., 1999). Diese wurden durch Teilmodelle für den Speich-

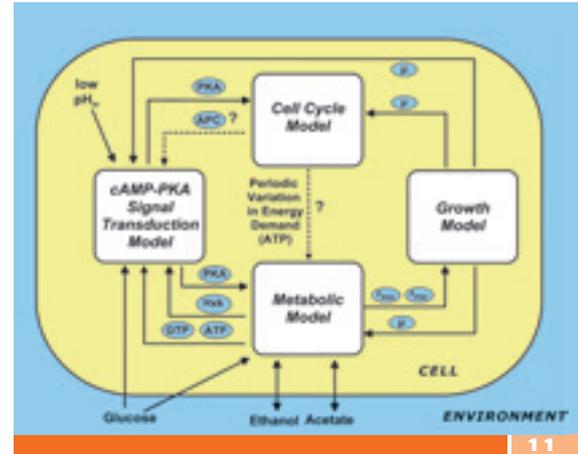
der Trehalose und des Glykogens) erweitert. Von besonderer Bedeutung für die Kopplung der Signaltransduktion mit dem Stoffwechselnetzwerk ist die Berücksichtigung der Aktivitätsänderung der Enzyme infolge der Phosphorylierung durch die katalytische Untereinheit der PKA. Dies lässt sich in den kinetischen Ansätzen dadurch berücksichtigen, dass die Maximalraten beziehungsweise Kapazitäten der Enzyme als Funktion der Konzentration der katalytischen Untereinheit angesetzt werden:

$$r = r_{max}(c_C) f(\vec{c}_M, \vec{p})$$

mit \vec{c}_M Vektor der Metaboliten, die die Reaktionsrate beeinflussen und Parametervektor. Auch bei den hier ablaufenden Phosphorylierungen der Zielproteine im Metabolismus beobachtet man adaptives Verhalten. Die im Modell zu berücksichtigenden Rückführungen betreffen Phosphatasen, die die Zielproteine wieder dephosphorylieren. Die negative Rückführung wird durch die experimentell zu beobachtende Aktivierung der Phosphatasen durch die katalytische Untereinheit der PKA sichergestellt.

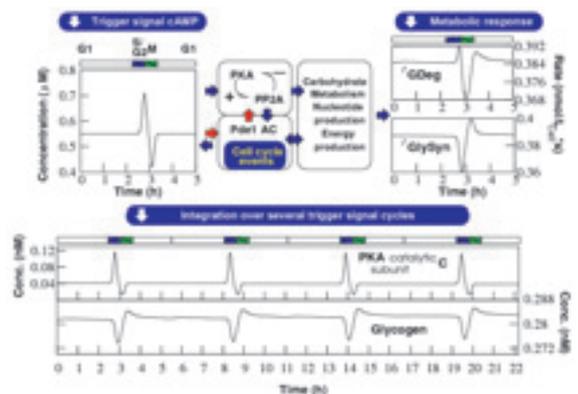
Die zwei weiteren in (11) gezeigten Module betreffen das Zellwachstum und den Zellzyklus. Das Wachstum wird unter Berücksichtigung der Stöchiometrie proportional zu den Stoffflüssen, die das Stoffwechselmodul verlassen, angesetzt. Das Zellzyklusmodell basiert auf einem im Schrifttum für die Hefe vorgeschlagenen Modell (Chen et al., 2000; Cross, 2003), das um einige die PKA betreffenden Reaktionen erweitert wurde.

(12) zeigt ein exemplarisches Simulationsergebnis. Bei dieser Simulation wurde als dynamischer Eingang in das Modell die experimentell beobachtete Abhängigkeit des cAMPs im Zellzyklus (10) in einer analytischen Funktion abgebildet. Das



11

Architektur des durch Aggregation von verschiedenen Funktionsmodulen resultierenden Einzelzellmodells (μ = spezifische Wachstumsrate, r = Rate der enzymkatalysierten Reaktion).



12

Simulierte Antwort der PKA und Enzymaktivitäten für die Produktion und Degradation des Speicherstoffs Glycogen als Antwort auf das gemessene cAMP Signal während des Zellzyklus. AC: Adenylat-Cyclase, Pde1: Niedrigaffine Phosphodiesterase. Blaue Pfeile illustrieren Stimulationen, rote Pfeile inhibitorische Effekte. r_{Gdeg} ist die Reaktionsrate der Glycogenphosphorylase, r_{GlySyn} die Rate der Glycogensynthese.

Modell beschreibt den Anstieg der Konzentration der katalytischen Untereinheit der PKA am G1/S-Übergang und die hierdurch bewirkte Aktivierung der Glykogenphosphorylase und Inhibierung der Glykogensynthese. Dies bewirkt einen Abfall der Glykogenkonzentration, Anstieg des glykolytischen Flusses und zusätzlichen ATP-Gewinn. In der M-Phase sinkt infolge der fallenden cAMP-Konzentration die PKA-Aktivität wieder ab, während die für das adaptive Verhalten der Zielproteinphosphorylierung wichtige Phosphataseaktivität (PP2A) zunimmt. Die simulierte Dynamik der Glykogenkonzentration während des Zellzyklus stimmt qualitativ mit den experimentellen Beobachtungen (Sillje et al., 1997; Müller et al., 2003) überein.

Das integrierte Modell erlaubt eine dynamische Simulation der cAMP abhängigen Regulation des Stoffwechsels und der Progression des Zellzyklus. Die modulare Struktur verbindet die Prozesse der Signaltransduktion, des Stoffwechsels und der Zellzyklusdynamik auf der Ebene der Einzelzelle. Für die natürlich ebenfalls interessierende Simulation der Dynamik der Zellpopulation muss die Dynamik der Einzelzellen zu größeren Zellensembles aggregiert werden. Dieser Ensembleansatz, bei dem die Spezies zusätzlich über ausgechiedene und wieder aufgenommene Metabolite oder Signalsubstanzen kommunizieren und interagieren können, hat sich für die quantitative Beschreibung der Heterogenität von Zellpopulationen bewährt (Henson et al., 2002).

Der hier gezeigte modulare Ansatz, bei dem das zelluläre Geschehen durch eine Dekomposition in Funktionsmodule strukturiert wird, ist vielversprechend und für zahlreiche Problemstellungen eine zielgerichtete Vorgehensweise. Gleichwohl gibt es auch Einschränkungen. Nach wie vor erlaubt die komplexe Verschaltung der zellulären Netzwerke keine eindeutige Definition dieser Module, die hier als abgegrenzte Teilsysteme für Submodelle herangezogen werden. Ein besonderes Problem stellen biologische Komponenten dar, die in Abhängigkeit der Zeit, der subzellulären Lokalisation oder aber auch von zell-externen Stimuli in unterschiedlichen Modulen mit unter Umständen sogar veränderten Funktionen auftreten.

Bei der hier diskutierten Fragestellung gibt es eine weitere Einschränkung. Die kürzlich am Institut abgeschlossenen experimentel-

len Beobachtungen über die zeitlichen Variationen der Konzentrationen der Adenin- und Guaninnukleotide während des Zellzyklus zeigen eine ausgeprägte Dynamik, die unter Umständen mit der in (07) gezeigten Ras-Kaskade wechselwirkt und auf diese Weise Einfluss auf die Aktivität der Adenylat-Cyclase nimmt. Eine solche direkte Interaktion erlaubt über die oben skizzierte Signaltransduktion in die Aktivitäten des Stoffwechsels eine zusätzliche Energielieferung bei Bedarf, der sich beispielsweise im Absinken der ATP-Konzentration manifestiert. Während diese „demokratische“ Hierarchie zellulärer Regulation den Umweg über die übergeordnete hierarchische Ebene des Zellzyklus einspart und damit u.U. sehr viel schneller und effizienter ist, stellt dies für die Modellierung und Simulation eine erhebliche Erweiterung der Komplexität dar. Besonders das ATP ist einer der in Abschnitt 1 vorgestellten hochvernetzten Knoten (Hubs) im Netzwerk. Eine Bilanzierung dieser Komponente lässt sich nicht mehr über Submodelle bewerkstelligen und verlangt demzufolge ein großskaliges Gesamtmodell. Zur effizienteren Lösung dieser schwierigen Fragestellungen im Grenzgebiet zwischen den Top-down und Bottom-up Ansätzen empfiehlt sich unter Umständen eine Strategie, bei der ein detailliertes und leistungsfähiges Modell einer Funktionseinheit mit einer weniger detaillierten Beschreibung des Gesamtnetzwerkes vernetzt wird, um die Dynamik der hochvernetzten Knoten mit hinreichender Genauigkeit zu erfassen. Im Entwurf dieser großskaligen, deutlich über die Grenzen von Funktionsmodulen hinausreichenden dynamischen Zellmodelle, wird man sich auf die strukturellen Informationen zur Topologie der Stoffwechsel- und Signalnetze stützen.

•
Klaus Mauch
Dirk Müller
Matthias Reuss

degussa.
creating essentials

F&E sind für uns das A und O.

Auch in der Wissenschaft spielt die Nummer Eins in der Spezialchemie eine maßgebliche Rolle. Weltweit investieren wir jedes Jahr viele hundert Millionen Euro in Forschung und Entwicklung. Darüber hinaus kooperieren wir mit über 500 Wissenschaftlern an Universitäten und Forschungseinrichtungen auf der ganzen Welt. www.degussa.com

Literatur

- Anghileri P, Branduardi P, Sternieri F, Monti P, Visintin R, Bevilacqua A, Alberghina L, Martegani E, Baroni MD (1999) Chromosome separation and exit from mitosis in budding yeast: Dependence on growth revealed by cAMP-mediated inhibition. *Exp Cell Res* 250:510–523
- Barabási A-L, Oltvai ZN (2004) Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Genetics* 5:101–113
- Baroni MD, Monti P, Alberghina L (1994) Repression of growth-regulated G1 cyclin expression by cyclic AMP in budding yeast. *Nature* 371:339–342
- Buziol S, Bashir I, Baumeister A, Claassen W, Noisommit-Rizzi N, Mailinger W, Reuss M (2002) New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. *Biotechnol Bioeng* 80:632–636
- Chen KC, Csikasz-Nagy A, Gyorfy B, Val J, Novak B, Tyson JJ (2000) Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Mol Biol Cell* 11:369–391.
- Cross FR (2003) Two redundant oscillatory mechanisms in the yeast cell cycle. *Dev Cell* 4:741–752
- Eéka A, Hawoong J, Barabási A-L (2000) Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* 406:378–382
- Henson MA, Müller D, Reuss M (2002) Cell population modelling of yeast glycolytic oscillations. *Biochem J* 368:433–446
- Kitano H (2003) Cancer robustness: tumour tactics. *Nature* 426:125
- Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* 10:91–104

DIE AUTOREN

**KLAUS MAUCH**

Studierte Chemieingenieurwesen an der TH Karlsruhe. Von 1994 bis 2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart mit dem Arbeitsschwerpunkt „Analyse und Gestaltung von Stoffwechsellnetzwerken“. Ab 2000 wissenschaftlicher Hochschulassistent und Leiter der Arbeitsgruppe „Metabolic Engineering – Angewandte Systembiologie“. Seit 2001 geschäftsführender Gesellschafter der INSILICO biotechnology GmbH mit den Verantwortungsbereichen „Architektur und Design von Modellierungswerkzeugen“ sowie „Modellierungssystematik“.

**DIRK MÜLLER**

Geboren 1974 in Braunschweig, studierte von 1993 bis 1999 Verfahrens- und Chemietechnik an der TU Hamburg-Harburg und von 1996 bis 1997 Chemical Engineering an der University of Waterloo in Ontario, Kanada. Er ist seit 1999 am Institut für Bioverfahrenstechnik als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig. Im Rahmen seiner Promotion untersucht er den Einfluss der Signaltransduktion über zyklisches AMP auf die Koordination von Stoffwechsel- und Zellteilungsprozessen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Für diese Arbeiten wurde ihm 2002 von der EFB Section on Biochemical Engineering Science der Malcolm D. Lilly Award verliehen.

**PROF. DR.-ING. MATTHIAS REUSS**

Geboren 1941. Nach dem Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Berlin Promotion zum Dr.-Ing. im Jahre 1970 an der gleichen Universität. Von 1971 bis 1976 wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung für Biotechnologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GFB) in Braunschweig. Von 1976 bis 1987 Professor für das Fachgebiet Bioverfahrenstechnik an der Technischen Universität Berlin und seit 1988 Professor für Bioverfahrenstechnik und Direktor des gleichnamigen Lehrstuhls und Instituts an der Universität Stuttgart. Sonstige systembiologische Aktivitäten: Koordinator des Netzwerks „Detoxifikation und Dedifferenzierung von Hepatocyten“ in der BMBF-Förderinitiative „Systeme des Lebens – Systembiologie“ und designierter Sprecher des geplanten Zentrums für Systembiologie an der Universität Stuttgart.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Bioverfahrenstechnik
Allmandring 31, 70569 Stuttgart
Tel. 0711/685-4574, Fax 0711/685-5164
E-Mail: secret@ibvt.uni-stuttgart.de
Internet: <http://www.ibvt.uni-stuttgart.de/>

- Mauch K, Buziol S, Schmid JW, Reuss M (2002) Computer aided design of metabolic networks. *AIChE Symposium Series* 98: 82–91
- Müller D, Exler S, Aguilera-Vázquez L, Guerrero-Martín E, Reuss M (2003) Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20:351–367
- Ravasz E, Somera L, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabási A-L (2002) Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*:1551–1555
- Rizzi M, Baltés M, Theobald U, Reuss M (1997) In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Mathematical model. *Biotechnol Bioeng* 55:592–608
- Silljé HH, ter Schure EG, Rommens AJ, Huls PG, Woldringh CL, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (1997) Effects of different carbon fluxes on G1 phase duration, cyclin expression, and reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179:6560–6565
- Theobald U, Mailinger W, Reuss M, Rizzi M (1993) In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem* 214:31–37
- Vaseghi S, Baumeister A, Rizzi M, Reuss M (1999) In vivo dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 1:128–140.



Zukunftsmusik

Zukunft ist mehr als eine Vision. Sie ist die Antwort auf Fragen und Forderungen, die die Gegenwart stellt.

Seit über sechzig Jahren denken und arbeiten wir bei MANN+HUMMEL konsequent kunden-, ziel- und marktorientiert. Hinter dieser Erfolgsmaxime steht eine einfache und klare Vision:

Global Leadership with Filtration in Liquid and Air Systems

Möchten Sie daran mitarbeiten?

Dann bieten wir Ihnen:

- **Praktika**
- **Diplomarbeiten**
- **Direkteinstieg**

MANN+HUMMEL operiert mit mehr als 9.000 Mitarbeitern weltweit als innovativer Partner der Automobilindustrie, als anerkanntes Unternehmen im Industriefilterbau und in der Verfahrenstechnik für die Kunststoffindustrie.

Neben Ihrem Studium bringen Sie mit:

- Fremdsprachenkenntnisse, Englisch ist obligatorisch
- Freude an der Arbeit im Team
- Begeisterung für technisch anspruchsvolle Produkte
- zielorientierte Arbeitsweise

Wir bieten Ihnen eine leistungsorientierte Vergütung, die Sozialleistungen eines Großunternehmens, kreativen Freiraum und jede Menge Herausforderungen. Ihre berufliche Entwicklung unterstützen wir durch qualifizierte Weiterbildung.

Wir freuen uns auf Ihre Bewerbung.

Ansprechpartnerin:

Verena Geiger, Abt. VH-D2,

Telefon (0 71 41) 98-29 66,

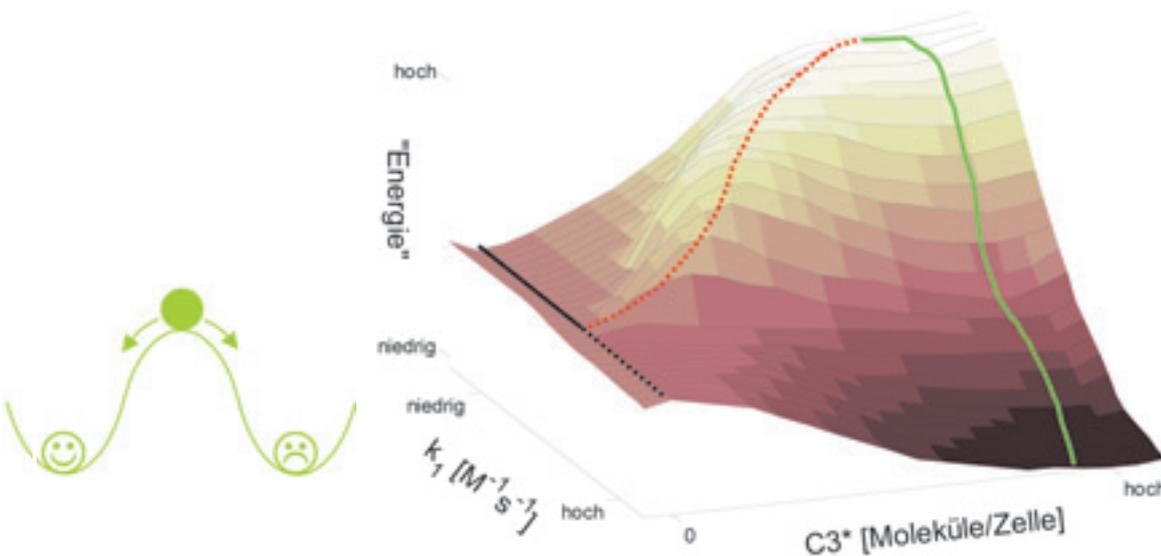
E-Mail: verena.geiger@mann-hummel.com



MANN+HUMMEL GMBH · 71631 LUDWIGSBURG, Germany
Telefon (0 71 41) 98-0 · Fax (0 71 41) 98-25 45
Internet: www.mann-hummel.com · E-Mail: info@mann-hummel.com

Sein oder Nichtsein?

Mathematische Systemtheorie zur Analyse Biologischer Signalverarbeitung



1. Überblick

Die mathematische Modellierung von Signaltransduktionsprozessen stellt besondere Herausforderungen an die Systembiologie. Das zu Grunde liegende komplexe dynamische Verhalten erfordert andere Herangehensweisen als sie z.B. bei der Modellierung von Stoffwechselfvorgängen angewendet werden können. Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 495 „Topologie und Dynamik von Signalprozessen“ haben es sich die beteiligten Institute zum Ziel gesetzt, anhand der vom Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF) ausgelösten Signalwege prinzipielle Funktionsweisen zu verstehen, aber auch Antworten auf spezifische Fragen zu finden. TNF ist ein wichtiges inflammatorisches Signalmolekül, welches in Zellen so verschiedene Prozesse wie deren Aktivierung, Zellteilung oder den programmierten Zelltod auslösen kann. Damit vermag TNF über Sein oder Nichtsein von Zellen zu entscheiden. Obwohl man in Literaturdatenbanken bis zu

100.000 Einträge findet, die sich mit der Wirkweise von TNF auseinandersetzen, bestehen noch viele offene Fragen. Ein Kernproblem beruht in der ungeheuren Komplexität der TNF-Signaltransduktion, wobei hier mathematische Modelle helfen können, die komplexen Wirkweisen besser zu verstehen. Dabei ist die Modellierung aber nur ein Aspekt, denn erst die Analyse der gewonnenen Modelle bringt tiefere Einblicke. Da die zur Analyse eingesetzten Methoden oft ursprünglich für technische Fragestellungen entwickelt wurden, müssen sie von uns angepasst und weiter entwickelt werden.

1.1. Biologische Signaltransduktionsprozesse

Selbst einfach aufgebaute Einzeller, wie z.B. Bakterien, benutzen verschiedene chemische Signalwege, um sich ihrer Umwelt optimal anzupassen. Auch bei höher entwickelten Organismen stehen chemische Botenstoffe im Vordergrund, obwohl z.B.

die hoch spezialisierten Nervenzellen zusätzlich über elektrische Signale Informationen übermitteln. Im menschlichen Körper laufen zu jedem Zeitpunkt eine Vielzahl von Signalprozessen ab. Diese Signale ermöglichen die Kommunikation unterschiedlicher Körperbausteine untereinander und sind somit für die Koordination unseres komplexen Verhaltens essentiell. Mit Hilfe von Hormonen oder den so genannten Zytokinen können Signale vom Produzenten zu oft weit entfernten Zielzellen transportiert werden. Diese Signale bewirken dann auf der nächsten Ebene, der einzelnen Zelle, eine entsprechende Änderung des physiologischen Zustands und koordinieren somit die Homöostase des gesamten Organismus.

Auf der Ebene der einzelnen Zelle sind klassische Abschnitte der Signaltransduktion das Binden des Botenstoffes an seinen Membranrezeptor, welcher hierdurch aktiviert wird und das Signal an intrazelluläre Proteine übergibt. Auf ihrem Weg durch das Zytoplasma werden die Signale oft verstärkt und mit Signalen aus anderen Quellen verrechnet. Die Folge sind geänderte Proteinmengen oder geänderte Proteinaktivitäten. Neben ihrer Rolle als Signalträger fungieren Proteine oft als Enzyme, also Katalysatoren für Reaktionen – die Familie der Proteasen zum Beispiel hat die Fähigkeit andere Proteine zu spalten. Die Aktivität der Gesamtheit der Enzyme bestimmt somit die zelluläre Physiologie. Veränderungen in Enzymaktivitäten können dazu führen, dass die Zelle sich teilt, stirbt oder differenziert, also einen bestimmten Zelltyp ausprägt. Es gibt viele unterschiedliche Signale innerhalb einer Zelle, um deren unterschiedlichste Funktionen zu ermöglichen. Oft sind die Charakteristika der Signale und deren Zusammenspiel unzureichend verstanden; sie bieten somit eine große Herausforderung für die Systembiologie.

1.2. Mathematische Betrachtung der Signaltransduktion

Der Prozess der Signaltransduktion in der Biologie ist also sehr komplex und aus mathematischer Sicht nicht-linear. Die Dynamik, also das zeitliche Verhalten, ist sehr wichtig und wird entscheidend von positiven und negativen Rückkopplungen (feedback loops) beeinflusst. Daher sind

bestimmte Vereinfachungen, wie sie oft in mathematischen Modellen für Stoffwechselwege angenommen werden, ungeeignet. Auch wenn z.B. die Annahme eines Fließgleichgewichtes größere, handhabbare Modelle für Einblicke in die übergeordnete Netzwerkstruktur geben kann, gehen durch diese Einschränkung oft essentielle Charakteristika von Signalprozessen verloren. Weiterhin ist die klassische Unterteilung von Enzymen, Substraten und Produkten schwierig, da in Signalkaskaden das Produkt enzymatischer Reaktionen oft selbst wieder als Enzym fungiert. Bei einem solchen Prozess wird nur die Aktivität als Signal weitergegeben und es findet kein Stofffluss statt. Ein großes Problem bei der Modellierung von Signaltransduktionsprozessen wird weiterhin durch die begrenzte Datenlage geschaffen, die schnell zu unterdeterminierten Modellen führen kann. Prinzipiell stellt ein Modell immer eine Approximation der Wirklichkeit dar und die gewählte Modellierungsart, wie auch der gewählte Detaillierungsgrad (meist ausgedrückt in der Größe der Modelle) hängt von den zur Verfügung stehenden Daten und den Fragestellungen ab, die man untersuchen möchte. Eine Konsequenz dieser Umstände ist, dass es bei bestimmten Fragestellungen sinnvoll erscheint mit kleinen Modellen zu beginnen, die die essentiellen Verhaltensweisen des biologischen Systems wiedergeben können.

ZUSAMMENFASSUNG

Sein oder Nichtsein? – Mathematische Systemtheorie zur Analyse Biologischer Signalverarbeitung

Biologische Signaltransduktionswege sind verantwortlich für die Koordination unterschiedlicher Aspekte, die „das Leben“ ausmachen. Sie werden von einem komplexen Netzwerk biochemischer Reaktionen ausgeführt bei denen, im Unterschied zum Metabolismus, der Signalfluss und nicht der Massenfluss wichtig ist. Der Signalfluss wird durch nichtlineare dynamische Prozesse bestimmt, zu dessen effizienter Aufklärung es eines kombiniert experimentell-theoretischen Ansatzes bedarf. Dies stellt besondere Herausforderungen an die Systembiologie. Im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 495 wird ein solch kombinierter Ansatz verfolgt, um tiefere Einblicke in die Funktionsweise des Zytokins Tumor Nekrose Faktor (TNF) zu erhalten und um grundlegende Mechanismen der biologischen Signaltransduktion sowie deren mathematische Beschreibung zu klären. TNF ist ein wichtiger Vermittler so diverser biologischer Phänomene wie Entzündung, Zellproliferation oder dem programmierten Zelltod (PCD). Obwohl die grundlegenden Signalwege auf molekularer Ebene enträtselt sind, ist ein detailliertes Verständnis des über Rückkopplungs-Mechanismen regulierten Netzwerks noch nicht vorhanden.

In diesem Artikel werden unterschiedliche Aspekte vergangener und aktueller Arbeiten unserer Gruppe vorgestellt. Arbeiten zum PCD-Signalweg werden detaillierter beschrieben, um exemplarisch zu zeigen, wie die Systemtheorie zur Biologie beitragen kann. Unter Verwendung eines reduzierten mathematischen Modells sechster Ordnung und durch Anwendung von Bifurkationsanalysen konnte gezeigt werden, dass es in dem System zusätzlicher Kontrollmechanismen bedarf. Die Modelluntersuchungen konnten genauere Anforderungen beschreiben, die diese Inhibitoren erfüllen müssen, deren Existenz neuerdings auch durch experimentelle Daten unterstützt wird. Das derart erweiterte Modell erfüllt zahlreiche Anforderungen, wie z.B. notwendige Stabilitätseigenschaften. Weiter bringt das Modell widersprüchlich erscheinende experimentelle Befunde in Einklang, welche unterschiedliche Aktivierungskinetiken von Schlüsselvorgängen des PCD auf Einzelzellebene bzw. Zellpopulationsebene beschreiben. Mit Hilfe mathematischer Modelle und deren Analyse können wir also tiefer gehende Einblicke in komplexe Signalnetzwerke erhalten.

etablierten Modell nicht ohne weiteres wiederzugeben. Um diese Problematik detailliert untersuchen zu können, wurde der eigentliche apoptotische Kern des Modells isoliert, in der Hoffnung mit stringenteren mathematischen Analysen zu weiterreichenden Aussagen zu kommen.

2.1. Biologie des apoptotischen Kerns

Das erstellte Modell bildet den Kern der apoptotischen Reaktionen vereinfacht ab (01, rötlich hinterlegt). Hauptakteure bei der Rezeptor induzierten Apoptose sind die so genannten Caspasen, eine Subfamilie von Proteasen. Sie werden durch proteolytische Spaltung aktiviert und können dann weitere Caspasen, wie auch andere Proteine spalten. Somit existiert eine Caspase-Kaskade, von der die rezeptornahen Caspasen, im Folgenden durch Caspase 8 symbolisiert, direkt von TNF-Rezeptorkomplexen durch Spaltung aktiviert werden können. Die rezeptornahen Caspasen können ihrerseits rezeptorferne Caspasen, im Weiteren durch Caspase 3 symbolisiert, aktivieren. Letztere kann zahlreiche, für die Funktion der Zelle wichtige Proteine spalten. Ein prominentes Beispiel ist z.B. ein Inhibitor für eine so genannte DNase, welche nach Verlust des funktionellen Inhibitors die zelluläre DNS degradiert. Ein weiteres wichtiges Substrat für die Caspase 3 ist wiederum die Caspase 8 – hier liegt also eine positive Rückkopplung vor. Es ist offensichtlich, dass die Aktivierung der Caspasen streng kontrolliert werden muss und es wurden sowohl Inhibitoren identifiziert, die die Aktivierung der initialen Caspase 8 im Rezeptorkomplex verhindern (z.B. ein Molekül mit Namen *FLICE inhibitory protein*, FLIP), als auch solche, welche die aktivierte „Arbeits“-Caspase 3 hemmen (z.B. die Familie der *inhibitor of apoptosis* (IAP)-Proteine).

Will man ein möglichst einfaches Apoptose-Modell ohne Berücksichtigung der Rezeptorebene aufbauen, bildet die Initiator-Caspase 8 einen sinnvollen Eingang. Die Aktivität der Caspase 3 kann wiederum als Ausgang fungieren, da ihre Aktivierung mit dem Zelltod gut korreliert. Weiter muss die gegenseitige Caspase-Aktivierung berücksichtigt werden und die IAP-vermittelte Hemmung der aktivierten Caspase 3. Hinzu kommen dann noch Auf- und Abbaureaktionen für sämtliche beteiligte Komponenten, da diese auf den interessie-

renden Zeitskalen nicht vernachlässigbar sind.

2.2. Mathematisches Apoptose Modell

Eine mögliche Form, die biologischen Vorgänge mathematisch zu beschreiben, bilden Differentialgleichungssysteme. Mit Hilfe dieser Gleichungen kann beschrieben werden, wie sich die Konzentrationen der beteiligten Komponenten in Abhängigkeit von der Zeit ändern. Den Zeitverlauf erhält man in sehr einfachen Fällen durch analytisches Lösen des Differentialgleichungssystems und bei komplexeren Modellen allgemeiner durch deren numerische Lösung mit Hilfe von Computern, was auch als Simulation bezeichnet wird. Der Nachteil einer numerischen Lösung ist, dass hierfür numerische Zahlenwerte für Parameter eingesetzt werden müssen, deren genaue Werte oft nicht bekannt sind. Es ist also schwierig, mit Simulationen zu allgemeinen Aussagen zu kommen oder zu beschreiben, wie sich das prinzipielle Verhalten in Abhängigkeit von Parameterwerten ändert – ein Phänomen, das bei nichtlinearen Systemen sehr häufig vorkommt und sogar zu chaotischem Verhalten führen kann. Alternative Ansätze erlauben es jedoch, bestimmte Systemeigenschaften analytisch zu untersuchen, ohne konkrete Werte für alle Parameter einsetzen zu müssen.

Allgemein wird die zeitliche Veränderung einer Komponente beschrieben, indem man produzierende und konsumierende Reaktionen bilanziert. Mathematisch werden für Enzymreaktionen oft so genannte

SUMMARY

To Be or Not to Be? – Mathematical Systems Theory to Analyze Biological Signal Processing

Biological signal transduction pathways are responsible for the coordination of the different aspects that define life. These are carried out by a complex network of biochemical reactions where, unlike in metabolism, signal flow rather than mass flow is important. Signal flow is dictated by nonlinear dynamic processes that demand a combined experimental and theoretical approach in order to be efficiently explored which poses special challenges to systems biology. In the framework of the Sonderforschungsbereich 495 such a combined approach is taken to further elucidate the function of the cytokine Tumor Necrosis Factor (TNF) and clarify principle mechanisms of biological signal transduction and its mathematical description. TNF is an important mediator of diverse biological effects ranging from inflammation and proliferation to programmed cell death (PCD). Although the major signaling pathways have been unraveled at the molecular level, a detailed mechanistic understanding of the underlying feedback-regulated network remains elusive.

Several aspects of our past and current work are sketched in this article. Work on the signaling pathway responsible for PCD is described in more detail to exemplify how systems theory can contribute to biology. Using a reduced mathematical model of sixth order and applying bifurcation analysis to it, it was worked out that the system requires additional control mechanisms. Model studies suggested their nature and have now become supported by recent experimental findings. The respective extended model fulfills desired characteristics, such as appropriate stability properties. Further, the results from the model studies allow the reconciliation of the fast activation kinetics of key PCD executioners observed at the single cell level opposed to the much slower kinetics found at the level of a cell population. With the help of mathematical modeling and analyses we can therefore gain deeper insight into complex signaling networks.

A

$$\begin{aligned}
 v_1 &= k_1 [C8a] \cdot [C3] \\
 v_2 &= k_2 [C3a] \cdot [C8] \\
 v_3 &= k_3 [C3a] \cdot [IAP] - k_{-3} [iC3a \sim IAP] \\
 v_4 &= k_4 [C3a] \cdot [IAP] \\
 v_5 &= k_5 [C8a] \\
 v_6 &= k_6 [C3a] \\
 v_7 &= k_7 [iC3a \sim IAP] \\
 v_8 &= k_8 [IAP] - k_{-8} \\
 v_9 &= k_9 [C8] - k_{-9} \\
 v_{10} &= k_{10} [C3] - k_{-10} \\
 v_{11} &= k_{11} [C8a] \cdot [CARP] - k_{-11} [iC8a \sim CARP] \\
 v_{12} &= k_{12} [CARP] - k_{-12} \\
 v_{13} &= k_{13} [iC8a \sim CARP]
 \end{aligned}$$

B

$$\begin{aligned}
 \frac{d[C8]}{dt} &= -v_2 - v_4 \\
 \frac{d[C8a]}{dt} &= v_2 - v_5 - v_{11} \\
 \frac{d[C3]}{dt} &= -v_1 - v_{10} \\
 \frac{d[C3a]}{dt} &= v_1 - v_3 - v_6 \\
 \frac{d[IAP]}{dt} &= -v_3 - v_4 - v_8 \\
 \frac{d[C3a \sim IAP]}{dt} &= v_3 - v_7 \\
 \frac{d[CARP]}{dt} &= -v_{11} - v_{12} \\
 \frac{d[iC8a \sim CARP]}{dt} &= v_{11} - v_{13}
 \end{aligned}$$

02

Mathematisches Modell. *A* Aus den Reaktionen abgeleitete Raten und *B* das bilanzierte Differentialgleichungssystem des Modells. Das ursprüngliche Modell besteht hierbei aus den ersten zehn gezeigten Reaktionen und den ersten sechs Differentialgleichungen. Das erweiterte Modell beinhaltet alle Reaktionen und Differentialgleichungen.

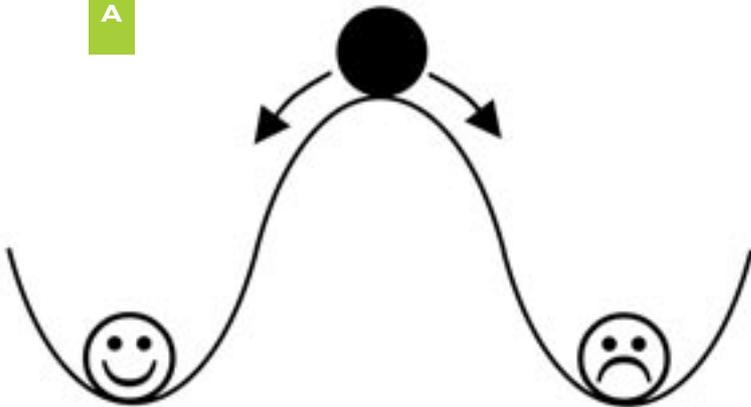
Michaelis-Menten-Kinetiken angenommen. In unserem Fall konnten wir aber zeigen, dass Kinetiken auf Basis des Massenwirkungsgesetzes sinnvoll sind, da man die so genannten Enzym-Substrat-Übergangskomplexe vernachlässigen kann. Dies führt zu einer vereinfachten Gleichungsstruktur, die mathematisch gesehen maximal quadratische Terme enthält. Diese Struktur ermöglicht Untersuchungen, die

anderenfalls so nicht möglich wären. Unser resultierendes Modell beinhaltet sechs Komponenten (Differentialgleichungssystem sechster Ordnung) und zehn Reaktionen (02).

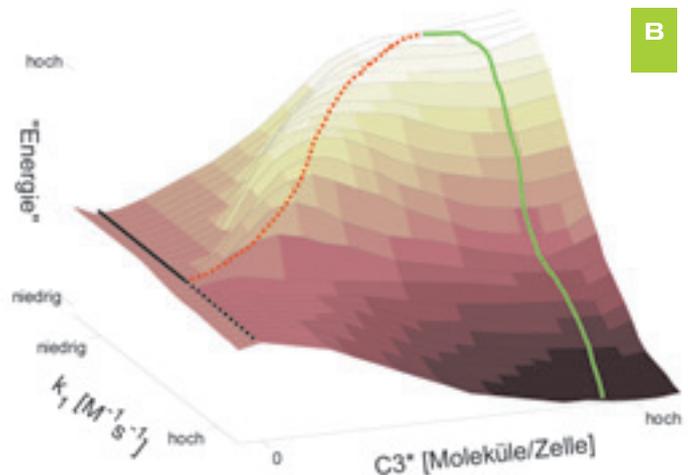
3. Anforderungen an das Modell

Die Entscheidung, ob eine einzelne Zelle Apoptose erleidet oder überlebt, ist letztendlich eine „Ja oder Nein“-Entscheidung. Für eine Zellpopulation ist dies nicht zwingend der Fall, da hier oft nur ein gewisser prozentualer Anteil der Zellen stirbt. Will man nun das Verhalten einer Einzelzelle beschreiben und den zugrunde liegenden Mechanismus verstehen, muss diesem Punkt jedoch Rechnung getragen werden. Neuere Experimentaldaten auf Einzelzellebene unterstreichen diese Überlegungen, da sie zeigen, dass die eigentliche Aktivierung der „Arbeits“-Caspasen (Caspase 3) irreversibel und rasch innerhalb eines sehr engen Zeitfensters nach einer unterschiedlich langen Warte- bzw. Entscheidungsphase abläuft. Offensichtlich wird also ein kontinuierliches Eingangssignal (Caspase 8-Aktivierung) in eine „Ja

A



B



03

Bifurkationsillustration. *A* In einer Ruhelage verändern sich die Konzentrationen der Komponenten des Systems nicht mit der Zeit. Wenn wir nahe diesen Konzentrationen starten und das System in die Ruhelage läuft, wird diese als stabil bezeichnet, sonst als instabil. Das gezeigte Beispiel ist bistabil, besitzt also zwei stabile Ruhelagen (und eine trennende instabile Ruhelage). *B* Hier ist das Stabilitätsverhalten

in Abhängigkeit von dem Parameter k_1 , bei sonst konstanten Parametern, dargestellt. Die „Energie-Koordinate“ soll der Veranschaulichung dienen. Durchgezogene Linien kennzeichnen stabile, gestrichelte Linien instabile Ruhelagen. Für kleine k_1 -Werte gibt es nur eine Ruhelage, die „Lebensruhelage“, die für den gesamten Konzentrationsbereich attraktiv ist. Bei etwas größeren k_1 -Werten tauchen plötzlich

zwei weitere Ruhelagen im positiven Konzentrationsbereich auf. Ab diesem Bifurkationspunkt ergibt sich die Landschaft eines bistabilen Systems (wie in *A* dargestellt) – wir finden eine stabile „Lebensruhelage“ (schwarze Linie), eine stabile „Todesruhelage“ (grüne Linie) und eine instabile Ruhelage (rote Linie), die die Einzugsbereiche trennt. Mit weiter zunehmenden k_1 -Werten verändert sich die Landschaft

und die trennende instabile Ruhelage trifft auf die „Lebensruhelage“. An diesem zweiten Bifurkationspunkt werden die Stabilitätseigenschaften ausgetauscht und die zuvor trennende Ruhelage verschwindet im biologisch irrelevanten negativen Konzentrationsbereich. Für große k_1 -Werte ist also die „Lebensruhelage“ instabil und die „Todesruhelage“ attraktiv für den gesamten positiven Konzentrationsbereich.

oder Nein“-Entscheidung am Ausgang (Caspase 3) umgesetzt.

Mathematisch gesehen lässt sich diese Forderung in ein bistabiles Schalterverhalten übersetzen. Bistabil bezeichnet hier die Tatsache, dass zwei stabile Ruhelagen vorliegen. Als Ruhelage wird derjenige Zustand bezeichnet, der zeitlich invariant unter dem Einfluss der Differentialgleichungen ist. Wenn sich die Konzentrationen der Komponenten über die Zeit also nicht ändern, befindet sich das System in einer Ruhelage. Für die Konzentrationen der im Modell berücksichtigten Komponenten kann angenommen werden, dass sie sich in einer nicht stimulierten Zelle nicht ändern, sich das System also in einer „Lebensruhelage“ befindet. Eine Ruhelage wird dann als stabil bezeichnet (03), wenn kleine Auslenkungen im Zustand zur Rückkehr in die Ruhelage führen (ähnlich einer Kugel in einer Mulde) und als instabil, wenn dies nicht der Fall ist (ähnlich einer Kugel auf einer Anhöhe). Die Lebensruhelage muss stabil sein, da kleine Störungen nicht automatisch den Zelltod zur Folge haben dürfen. Nach einem starken Stimulus des apoptotischen Signalsystems wird die Zelle jedoch unwiderruflich in einen anderen Zustand gebracht, welcher als „Todesruhelage“ bezeichnet werden kann und ebenfalls stabil sein muss. Somit muss das Differentialgleichungssystem zwei stabile Ruhelagen ermöglichen und je nach Anregung muss die eine oder andere angesteuert werden.

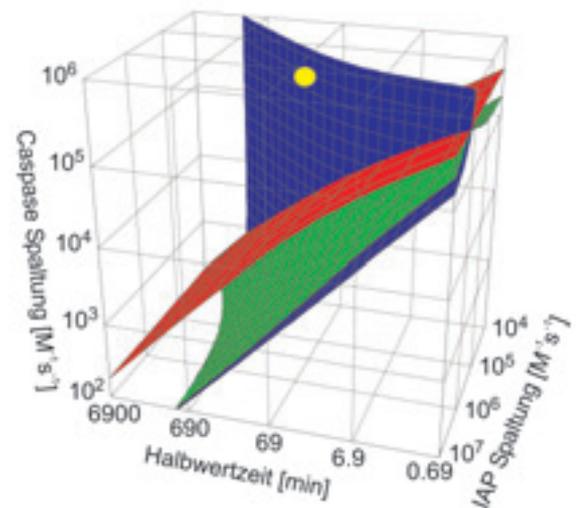
3.1. Bistabilitätsanalyse

Wir haben untersucht, für welche Parameterbereiche das mathematische Modell des apoptotischen Kerns ein bistabiles Verhalten zulässt. Die hierbei angewandten Methoden nutzen die relativ einfache Gleichungsstruktur aus und ermöglichen es, zu analytischen Aussagen bezüglich der Lage und Stabilität der Ruhelagen zu kommen, was selten für Systeme solch hoher Ordnung möglich ist. Die erhaltenen Ergebnisse deuteten stark auf einen Widerspruch des Modellverhaltens mit den Experimentaldaten hin. Obwohl ein kleiner Parameterbereich identifiziert werden konnte, der prinzipiell ein bistabiles Verhalten ermöglicht, zeigte sich jedoch, dass diese Parameterwerte weit weg von denjenigen der Experimentaldaten liegen (04). Die aus experimentellen Daten ermittelte

Modellstruktur ließ sich also nicht mit experimentell bestimmten kinetischen Daten in Einklang bringen.

3.2. Modellerweiterung

Mit Hilfe der Modellbildung ist es nun möglich zu untersuchen, welche strukturellen Veränderungen diese Diskrepanz eliminieren könnten. Das Verhalten des Modells – eine instabile Lebensruhelage bei Parameterkombinationen, die mit den Literaturwerten in Einklang standen, legte es nahe, nach einer zusätzlichen inhibitorischen Komponente des apoptotischen Weges zu suchen. Stabilitätsuntersuchungen und Simulationen zeigen, dass die Einführung eines solchen hypothetischen Inhibitors auf der Ebene der Caspase 8 zu einem Modell führt (02), welches im Einklang mit Parameterwerten der Literatur ein bistabiles Verhalten aufweist. Wie in (05) gezeigt, erfüllt dieses modifizierte Modell alle gestellten Anforderungen: Bei einer schwachen Aktivierung der Caspase 8 gibt es keine signifikante, dauerhafte Aktivierung der rezeptorfernen Caspase 3. Ab einer bestimmten Anregungsschwelle werden jedoch die Effektor-Caspasen maximal aktiviert, das System springt von der stabilen „Lebensruhelage“ in die stabile „Todesruhelage“. Eine weitere Erhöhung des Eingangsstimulus führt interessanterweise nur zu einem früheren Schalten, ändert aber nichts an der Amplitude der Caspase-Aktivierung. Dieses Verhalten des Modellsystems stimmt gut mit publizierten Experimentalergebnissen überein. Ebenfalls in Einklang mit aktuellen Ergebnissen anderer Gruppen, konnten wir die positive Rückkopplung in unserem Modell als notwendige Voraussetzung für ein bistabiles Verhalten identifizieren. Neue Experimentaldaten weisen im Übrigen eindeutig auf die Existenz von Inhibitoren der Caspase 8 hin – wenn auch noch keine biochemischen Details bekannt sind, die in das Modell integriert werden könnten.


04

Bistabilitätsanalyse. Die analytische Lösung der Ruhelagengleichungen, in Kombination mit Stabilitätsanalysen ermöglicht eine dreidimensionale Bifurkationsuntersuchung in einem großen Parameterbereich. Für die Visualisierung wurden folgende, biologisch sinnvolle Parameterverhältnisse gewählt: für die gegenseitige Caspase Aktivierung $k_1 = 2 \cdot k_2$, für die Halbwertszeiten $k_7 = 2 \cdot k_5 = 2 \cdot k_6 = 4 \cdot k_8 = 4 \cdot k_9 = 4 \cdot k_{10}$, und für die IAP-Spaltung k_4 ; k_3 und k_3 wurden auf als genau einzuschätzende Literaturwerte fixiert. Der gelbe Punkt deutet die Lage weiterer Literaturwerte an. Über der roten Fläche gibt es keine stabile „Lebensruhelage“, unter der blauen Fläche gibt es keine zweite stabile Ruhelage im positiven Konzentrationsbereich und unter der grünen Fläche gibt es nur komplexe Lösungen. Für Bistabilität werden also Parameterkombinationen benötigt, die unter der roten und über der blauen und über der grünen Fläche liegen.

3.3. Einzelzell- und Populationsverhalten

Die eindeutige zeitliche Abhängigkeit des „Schaltvorganges“ von der Stimulusstärke ermöglicht es nun, die beobachtete Diskrepanz zwischen Einzelzell- und Populationsmessungen zu erklären:

Es ist bekannt, dass praktisch jedes Molekül innerhalb einer Population von Zellen eine Streuung bezüglich seiner Anzahl aufweist. Bildet man diese Population durch eine entsprechende Anzahl unterschiedlicher Parametersätze im Modell nach, würde jetzt diese „virtuelle Zellpopulation“ auf ein konstantes Eingangssignal mit einem

zeitlich gestreuten Spektrum an Caspase 3-Aktivierung antworten. Gibt man nun das zeitliche Populationsverhalten an Hand von Experimentaldaten vor, so kann man zurückrechnen, welche Eingangssignalverteilung nötig wäre, um das entsprechende Populationsverhalten zu erreichen (06).

Die erhaltene Kurve deckt sich gut mit der experimentell beobachteten Verteilung der Membranrezeptoren. Alleine diese Streuung der auf der Zelloberfläche vorhandenen Membranrezeptoren würde also bei einer konstanten Stimulation einer Zellpopulation (z.B. eine gegebene TNF-Konzentration) zu einer zeitlich gestreuten apoptotischen Antwort führen. Diese Untersuchungen zeigen, dass auch einfache Modelle mit vereinfachten Annahmen bereits ein tieferes Verständnis über die zu Grunde liegenden prinzipiellen Vorgänge liefern können – wie z.B.

grundsätzliche Zusammenhänge zwischen Experimentaldaten aus Einzelzell- und Zellpopulationsmessungen.

4. Aktuelle Arbeiten

Aufbauend auf den neu gewonnenen Erkenntnissen werden zurzeit weitere biologische und theoretische Fragestellungen bearbeitet.

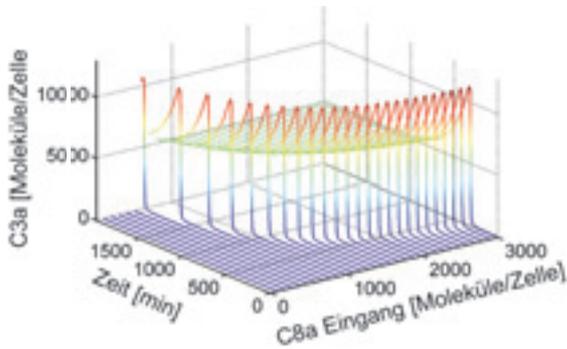
Wie Anfangs erwähnt, werden von TNF zwei widersprüchlich erscheinende Signalwege gleichzeitig aktiviert. Ein Schwerpunkt unserer Arbeiten bildet daher die Beschreibung des Zusammenspiels des apoptoti-

schen Signalwegs mit dem anti-apoptotischen, NF- κ B vermittelten Signalweg. Letzterer wurde isoliert in jüngster Vergangenheit von einigen Gruppen näher charakterisiert und modelliert und dabei wurde die Bedeutung der Signalform herausgearbeitet. Es gibt zahlreiche Interaktionspunkte der beiden Wege miteinander, deren Bedeutung nun theoretisch und experimentell hinterfragt werden kann.

Weiter sind die Vorgänge bei der Signalinitiierung im Rezeptorkomplex noch unzureichend verstanden. Sowohl auf experimenteller, als auch theoretischer Ebene finden hier Arbeiten statt, die zu einem tieferen Verständnis dieser Vorgänge beitragen sollen. Ein besonderes Interesse richtet sich dabei auf die Klärung der Rolle von Rezeptoraggregaten, die hierbei experimentell beobachtet werden.

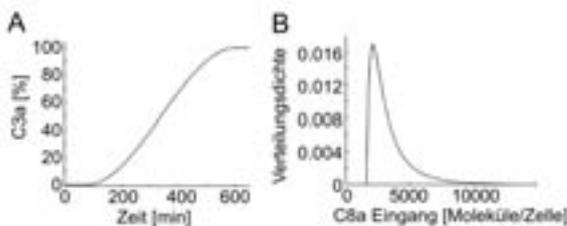
In diesem Fall war es aufgrund des biologischen Wissens möglich, ein Modul (Teilsystem) aus den komplexen TNF Signalwegen zu isolieren und in diesem Modell durch spezifische Untersuchungen Vereinfachungen in den Reaktionsschemata vorzunehmen, die das Systemverhalten kaum verändern und damit noch biologisch sinnvoll wiedergeben. Weitere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe befassen sich damit, selbst bei begrenztem biologischem Wissen systematisch, zum einen Module isolieren zu können und zum anderen komplexe Module zu vereinfachen. Zum Beispiel würde eine exakte Beschreibung der molekularen Vorgänge am TNF-Rezeptor aufgrund der kombinatorischen Vielfalt der zahlreichen interagierenden Proteine viele Millionen Zustände liefern (welche alle in Differentialgleichungen bilanziert werden müssten), obwohl viele dieser Zustände im Informationsgehalt redundant und/oder experimentell nicht differenzierbar sind.

Bei den oben genannten Ergebnissen hat uns die Kombination von theoretischen Untersuchungen mit experimentellen Daten geholfen, eine geeignete Modellstruktur zu finden. Von theoretischer Seite her versuchen wir Verfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe man unterschiedliche Modelle diskriminieren kann, um zu entscheiden, welches Modell unter verschiedenen vorgeschlagenen Modellen das Bessere ist. Hierbei steht die Methodenentwicklung im Vordergrund. Die zwei vorgestellten Modelle dienen hier als Testobjekte. Die derzeitigen Ansätze nutzen die kürzlich herausgearbeitete Eigenschaft der Robustheit



05

Simulation des bistabilen Verhaltens des erweiterten Modells. Es sind zeitliche Verläufe der aktivierten Caspase 3 für verschiedene Eingänge gezeigt. Oberhalb einer Schwelle (~ 75 Moleküle aktivierter Caspase 8 pro Zelle) wird das System vollständig aktiviert, während unterhalb dieser Schwelle keine signifikante Aktivierung stattfindet. Die „Lebensruhelage“ entspricht in etwa dem blauen Bereich und die „Todesruhelage“ dem grünen Bereich, der nach langer Zeit erreicht wird.



06

Einzelzell- und Populationsverhalten in Einklang gebracht. A Zeitverlauf der Caspase 3 Aktivierung einer Zellpopulation. B Verteilungsdichte des Eingangsimpulses in das in Abbildung 5 beschriebene Modell, welche nötig ist, um das in A gezeigte Populationsverhalten zu erhalten.

von biologischen Signalwegen als Diskriminierungskriterium. Hiermit ist gemeint, dass das Systemverhalten oder bestimmte Systemeigenschaften relativ tolerant gegenüber Störungen sind. Wir untersuchen zum einen die Robustheit des bistabilen Verhaltens bezüglich Parametervariationen und zum anderen die Robustheit der bistabilen Schwelle unter dem Einfluss der stochastischen Natur der Reaktionen. Die hier vereinfacht dargestellten Einflüsse von unterschiedlichen Molekülkonzentrationen in unterschiedlichen Zellen sind in realen Systemen nicht die einzigen stochastischen Einflüsse auf die Signalübertragung. Die biochemischen Reaktionen an sich können nämlich nur näherungsweise mit dem hier vorgestellten deterministischen Ansatz wiedergegeben werden. Diese Untersuchungen sind rechenintensiv, können aber nicht nur ein Kriterium zur Modelldiskriminierung liefern, sondern wir erhoffen uns hiervon weitere Einblicke in das prinzipielle Systemverhalten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde beispielhaft gezeigt, wie mit Hilfe von mathematischer Modellierung in Kombination mit einer anschließenden Analyse experimentelle biologische Daten und Sichtweisen auf Konsistenz überprüft werden können. Des Weiteren können die theoretischen Überlegungen helfen, scheinbar widersprüchliche Daten in Einklang zu bringen und somit zum tieferen Verständnis der zugrunde liegenden Vorgänge beitragen. Diese Arbeiten zeigen exemplarisch einige Vorzüge und Möglichkeiten der systemtheoretischen Analyse biologischer Vorgänge auf. Während die angewandten Methoden bisher meistens nur für Systeme sehr geringer Ordnung (≤ 3) angewendet wurden, zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse und die damit gewonnenen Einsichten, dass auch für größere Modelle oft noch sehr allgemeine Aussagen über interessierende Systemeigenschaften möglich und sinnvoll sind.

Zum Abschluss wurden noch einige zusätzliche Arbeitsgebiete angesprochen, die weitere Herausforderungen in diesem neuen Arbeitsgebiet aufzeigen. Ein besseres Verständnis des Systemverhaltens ist nicht nur für die Grundlagenwissenschaften von großem Interesse, sondern natürlich essentiell, um in der Zukunft rationale, sinnvoll-

le Angriffspunkte für potentielle Medikamente zu identifizieren. Hier können mathematische Modelle helfen, Medikamente *in silico* auf Wirksamkeit und Spezifität zu untersuchen. Modelle mit einer Qualität, die Experimente überflüssig machen, liegen aber wohl noch sehr weit in der Zukunft.

Frank Allgöwer
Thomas Eißing
Peter Scheurich

Literatur

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2003). *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Conzelmann, H., J. Saez-Rodriguez, T. Sauter, E. Bullinger, F. Allgöwer and E. D. Gilles (2004). Reduction of mathematical models of signal transduction networks: simulation-based approach applied to EGF receptor signalling. *IEE Systems Biology* 1(1): 159–169.
- Eißing, T., H. Conzelmann, E. D. Gilles, F. Allgöwer, E. Bullinger and P. Scheurich (2004). Bistability analyses of a caspase activation model for receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279(35):36892–7.
- Fall, C. P., E. S. Marland, J. M. Wagner and J. J. Tyson (2002). *Computational cell biology*. Springer-Verlag, New York.
- Kitano, H. (2002). *Systems biology: a brief overview*. *Science* 295(5560):1662–4.
- Saez-Rodriguez, J., A. Kremling, H. Conzelmann, K. Bettenbrock and E. D. Gilles (2004). *Modular Analysis of Signal Transduction Networks*. *IEEE Control Systems Magazine* 24(4):35–52.
- Schoeberl, B., E. D. Gilles and P. Scheurich (2001). *A mathematical vision of TNF receptor interaction*. *Proceedings of the International Congress of Systems Biology, Pasadena, CA, pp. 158–167*, Omnipress, Madison.
- Stelling, J., U. Sauer, Z. Szallasi, F. J. Doyle, 3rd and J. Doyle (2004). Robustness of cellular functions. *Cell* 118(6):675–85.
- Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). *Tumor necrosis factor signaling*. *Cell Death Differ.* 10(1):45–65.

DIE AUTOREN

THOMAS EISSING

ist zur Zeit wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Systemtheorie technischer Prozesse der Universität Stuttgart und Student der Technischen Kybernetik. Er erlangte den Abschluss Diplom-Biologe (technisch orientiert) im Jahr 2002 nach Studien an der Universität Stuttgart und der University of New South Wales. Ein Forschungsaufenthalt brachte ihn 2001 zur Fa. Millennium Pharmaceuticals nach Cambridge, Massachusetts. Sein Forschungsschwerpunkt liegt in der Anwendung von Systemtheorie auf molekulare Zellbiologie.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Systemtheorie technischer Prozesse, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-7750

E-Mail: eissing@ist.uni-stuttgart.de

PETER SCHEURICH

ist Professor für Molekulare Immunologie am Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart. Er hat in Mainz Chemie studiert und im Fach Biochemie promoviert. Danach war er Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institutes für Medizin der damaligen Kernforschungsanlage Jülich, am Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz sowie bei einer Klinischen Arbeitsgruppe der Max-Planck-Gesellschaft in Göttingen. Sein Hauptarbeitsgebiet sind Signal- und Wirkmechanismen immunregulatorischer Zytokine.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Zellbiologie und Immunologie, Allmandring 31, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-6987

E-Mail: Peter.Scheurich@izi.uni-stuttgart.de

FRANK ALLGÖWER

ist Professor für Systemtheorie technischer Prozesse und Leiter des gleichnamigen Instituts an der Universität Stuttgart. Er hat in Stuttgart Technische Kybernetik und an der University of California at Los Angeles Angewandte Mathematik studiert und promovierte in der Fakultät Verfahrenstechnik der Universität Stuttgart. Vor seiner Berufung nach Stuttgart im Jahr 1999 hatte er eine Professur für Nichtlineare Systeme im Departement Elektrotechnik der ETH Zürich. Längere Forschungsaufenthalte brachten Frank Allgöwer an das NASA Ames Research Center, das California Institute of Technology, die University of California at Santa Barbara und zur Fa. DuPont in Wilmington, Delaware. Sein Hauptarbeitsgebiet ist die Entwicklung und Anwendung systemtheoretischer Methoden zur Analyse und Regelung dynamischer Systeme.

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Systemtheorie technischer Prozesse, Pfaffenwaldring 9, 70569 Stuttgart

Tel. 0711/685-7733

E-Mail: allgower@ist.uni-stuttgart.de

WEITERE AN DEN PROJEKTEN BETEILIGTE PERSONEN

Markus Branschüdel, Eric Bullinger, Carla Cimatoribus, Holger Conzelmann, Ernst D. Gilles, Cedric Gondro, Thomas Sauter, Monica Schliemann, Birgit Schoeberl, Harald Wajant, Gudrun Zimmermann

Karriere ist keine Glückssache



Busak+Shamban – ein Unternehmen der Trelleborg-Group –, ist Systemlieferant von technisch hochwertigen Produkten und Lösungen mit einem jährlichen Umsatzvolumen von ca. 140 Mio. € und 420 Mitarbeitern am Standort Stuttgart. Als führender Anbieter von Dichtungssystemen resultiert der Erfolg von Busak+Shamban aus Kundennähe in Verbindung mit Innovationskraft, einer breiten Produktpalette und höchsten Qualitätsansprüchen.



Im Zuge einer Nachfolgeregelung suchen wir zum nächstmöglichen Zeitpunkt an unseren Standort in Stuttgart eine/n einsatzfreudige/n und zuverlässige/n

Leiter/in der technischen Anwendungsberatung für den Bereich Mobilhydraulik / Marine

Ihre Aufgabe besteht in der Durchführung von technischen Projekten, Machbarkeitsanalysen und der Auslegung von Dichtungselementen und -systemen für unseren internationalen Kundenkreis aus der Mobilhydraulik sowie deren Systemlieferanten. Dazu arbeiten Sie in einem interdisziplinär zusammengesetzten Team mit Mitarbeitern aus den Bereichen Technical Account Management, F & E, Materials Technology, Qualitätswesen, Einkauf und Vertrieb eng zusammen. Sie fungieren als Schnittstelle zwischen unseren internationalen Produktionswerken und den Kunden. Im Bereich der Mobilhydraulik leiten Sie ein Team von Mitarbeitern und übernehmen die Verantwortung für die Projektkoordination.

Ihre Qualifikation:

Sie sind Techniker oder Ingenieur und kommen idealerweise aus dem Umfeld der Dichtungstechnik. Erfahrung in Projektmanagement und der Mobilhydraulik sind von Vorteil. Problemlösefähigkeit und Kompetenz sind neben Engagement und Teamfähigkeit Ihre Stärken. Aufgrund unseres internationalen Umfeldes setzen wir gute Englischkenntnisse voraus.

Unser Angebot:

Wir bieten Ihnen einen modernen, sicheren Arbeitsplatz in einem erfolgreichen Unternehmen mit anspruchsvollen Aufgaben und einem hohen Maß an Selbständigkeit. Fachseminare und unser internes Weiterbildungskonzept fördern kontinuierlich Ihre Entwicklung.

Für Vorabinformationen steht Ihnen Frau Bollinger unter Tel. 0711 / 7864-395 oder per e-mail (Bewerbung@busakshamban.com) gerne zur Verfügung.

Sind Sie interessiert? Dann senden Sie Ihre vollständigen Bewerbungsunterlagen an

Busak+Shamban Deutschland GmbH, Personalabteilung, Handwerkstr. 5-7, D - 70565 Stuttgart
<http://www.busakshamban.de>, <http://www.trelleborg.com>

Das grüne Leuchten

Dem Molekül auf der Spur



1. Einleitung: Nachweis einzelner Moleküle in der lebenden Zelle

Der Nachweis einzelner Moleküle in lebenden Zellen stellt das ultimative analytische Instrument in der Zellbiologie dar. Entsprechend vielfältig sind die Forschungsbemühungen in den letzten Jahren, um bestehende Verfahren, wie beispielsweise die Fluoreszenzmikroskopie oder Massenspektroskopie, in ihrer Empfindlichkeit zu verbessern. Dabei ist es bisher allein im

Bereich der optischen Mikroskopie gelungen, verlässlich einzelne Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen. Diese Verfahren ermöglichen teilweise bereits jetzt einen neuen Zugang zu zellbiologischen Prozessen, der auch die Systembiologie befruchtet wird. Im Folgenden sollen die wesentlichen Grundlagen der Technik erläutert und Möglichkeiten sowie Limitierungen beschrieben werden.

Die optische Mikroskopie ist die tragende Säule in der Darstellung zellulärer Pro-

zesse. Die am häufigsten benutzten Formen sind dabei die Transmissions-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Aufgrund der Möglichkeit spezifisch einzelne Proteinsorten mittels Farbstoffen anzufärben hat sich die Fluoreszenzmikroskopie als besonders leistungsfähiges Werkzeug erwiesen. In der jüngeren Vergangenheit ist es zudem gelungen, die räumliche Auflösung durch die Konfokalmikroskopie oder die Verwendung einer strukturierten Beleuchtung in der Weitfeldmikroskopie zu verbessern.

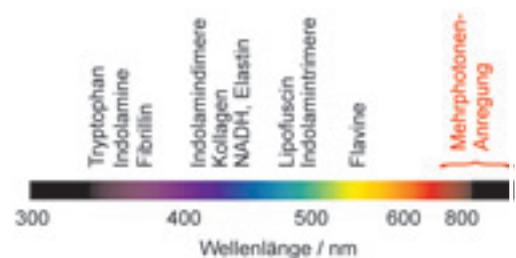
In der Tat ist es auch die Fluoreszenzmikroskopie, die den Nachweis einzelner Moleküle erlaubt. Entscheidend hierfür ist es zunächst, dass es gelingt, genau *ein* Molekül zur Fluoreszenz anzuregen und diese Fluoreszenz auch nachzuweisen. Ein einfaches Rechenbeispiel soll zeigen, dass beides – zumindest unter gewissen Voraussetzungen – technisch realisierbar ist. Ein Fluoreszenzmikroskop besteht aus einer Lichtquelle, in der Regel einem Laser, der in einem Konfokalmikroskop auf ein möglichst kleines Probenvolumen fokussiert wird. Die Abmessung dieses Volumens ist durch die Beugung des Laserstrahls begrenzt und beträgt ca. $0,025\mu\text{m}^3$. Nur die in diesem Volumen angeregte Fluoreszenz wird auch nachgewiesen. In diesem Probenvolumen befinden sich ca. 10^8 Moleküle der Zelle, von denen nur eines fluoresziert. Erreicht wird diese hohe Selektivität durch eine geeignete Wahl der Laserwellenlänge und eine spezielle Markierung der nachzuweisenden Moleküle mittels geeigneter Farbstoffe. Die meisten in der Zelle vorhandenen niedermolekularen Verbindungen zeigen bei Anregungswellenlängen oberhalb von 550nm keine Fluoreszenz mehr (O1). Auch Proteine lassen sich in diesem Fall nicht mehr effektiv zur Fluoreszenz anregen. Nur eigens in die Zelle eingebrachte Farbstoffe oder von der Zelle synthetisierte Proteine absorbieren bei dieser oder längeren Wellenlängen. Zudem kann eine intensive langwellige Anregung durch die Absorption von zwei Photonen (anstelle eines einzigen Photons bei niedrigen Intensitäten) zu einer weiteren Steigerung der Selektivität in der Anregung führen. Unterstützt wird dies dadurch, dass viele interessante Proteinarten, wie z.B. einige Membranrezeptoren in der Zelle in solch geringen Mengen vorkommen, dass sich in einem Probenvolumen von $0,025\mu\text{m}^3$ gerade ein Protein befindet.

Durch den Laser wird der an dem Protein befindliche Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt. In einem optimal aufgebauten Mikroskop wird ca. 1 Prozent des Fluoreszenzlichtes nachgewiesen. Ein guter Fluoreszenzfarbstoff emittiert ca. 10^6 Photonen pro Sekunde, falls der optische Übergang gesättigt wird. Damit können bis zu 10^4 Photonen pro Sekunde zum Detektor gelangen. Da heutzutage die Nachweisempfindlichkeit der Detektoren für Photonen in einem Wellenlängenbereich von 500nm–900nm bis zu 80 Prozent beträgt, bei nahezu keinem Eigenrauschen der Detektoren, werden diese Photonen auch vom Mikroskop nachgewiesen. Ausgewählte Farbstoffmoleküle emittieren also ausreichend Photonen, so dass einzelne Moleküle leicht detektiert werden können. Entscheidend für den erfolgreichen Nachweis einzelner Moleküle in Zellen ist es vielmehr, wie viele unspezifisch emittierte Photonen (Autofluoreszenz der Zelle) gleichzeitig mit dem Fluoreszenzsignal des Moleküls zum Detektor gelangen.

Wie bereits erwähnt, kann mittels geeigneter Auswahl der Zellen und der Wachstumsbedingungen diese Autofluoreszenz minimiert werden. Weiterhin spielt die Wahl der Anregungswellenlänge eine entscheidende Rolle. In der Regel gilt dabei: je langwelliger die Anregungswellenlänge, desto geringer die Autofluoreszenz der Zelle. Daher ist die Zweiphotonenabsorption, bei der zwei langwellige Photonen statt einem kurzwelligeren zur Anregung benutzt werden, eine geeignete Methode zur Unterdrückung der Autofluoreszenz. In der Regel wird unter günstigen Umständen ein

ZUSAMMENFASSUNG

In der Systembiologie sind analytische, experimentelle Methoden wichtig, um zuverlässige Daten und Parameter für die Modellierung der biologischen Systeme zu gewinnen. Neben der Fluoreszenzmikroskopie erhält in Stuttgart die Einzelmolekülmikroskopie eine zunehmend wichtige Rolle. Es werden Methoden entwickelt, die eine möglichst genaue Messung der entscheidenden Schlüsselparameter zellulärer Prozesse leisten können. Entscheidend ist dabei, die Fluoreszenz einzelner Moleküle nachzuweisen, um somit den zellulären Prozessen „zusehen“ zu können. Hier macht man sich die Entdeckung zunutze, dass die Fluoreszenz einer Qualle von einem relativ kleinen Protein stammt, dem GFP (green fluorescent protein). Da man die Zelle veranlassen kann, das fluoreszierende GFP an einem bestimmten interessierenden Zielprotein anzuhängen, war der entscheidende Marker gefunden. Mit den Messmethoden der Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy) und der Fluoreszenz-Kreuzkorrelationspektroskopie (FCCS, Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy) können die Stuttgarter nun nachweisen, ob ein Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem anderen Protein oder in einen Proteinkomplex gebunden ist oder nicht; eine wichtige Voraussetzung zur Aufklärung der Signalkaskaden in der Zelle, mit denen diese auf ihre Umgebung reagiert und ihre Reproduktion oder auch den Zelltod reguliert.



Darstellung der verschiedenen intrazellulären Substanzen, die zur Autofluoreszenz der Zelle beitragen als Funktion ihrer Absorptionswellenlänge. Aus der Abbildung wird sichtbar, dass im langwelligen roten Bereich praktisch keine Autofluoreszenz angeregt wird. Durch gezielten Einsatz von Mehrphotonenabsorption kann dies ausgenutzt werden, um die Autofluoreszenz bei der Anregung einzelner Moleküle zu unterdrücken.



Piezo · Nano · Positioning **PI**

Multiachsen Piezo-Nanopositionier-Tisch! PIMars
Riesenhub und viele Achsen

■ nm Auflösung ■ bis 6 DoF ■ Ultra schnell ■ bis 300 µm

www.pi.ws/martf

Wir öffnen Nanowelten | www.pi.ws

Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG · Tel. 0721 4846-0

Signal-zu-Rausch-Verhältnis von ca. 5:1 erreicht. Dieses reicht aus, um einzelne Moleküle in lebenden Zellen nachzuweisen und auch ihre Diffusion oder den Transport zu bestimmen.

Eine weitere Herausforderung besteht in der Photostabilität der verwendeten Farbstoffe. Wie in der klassischen Fluoreszenz-Konfokalmikroskopie unterliegen die Farbstoffe dem Photobleichen, d.h. durch die optische Anregung werden chemische Modifikationen induziert, die dazu führen, dass der Farbstoff nicht mehr (oder bei einer anderen Wellenlänge) fluoresziert. Die besten Farbstoffe emittieren zwischen 10^7 bis 10^8 Photonen bevor sie „photobleichen“. Dies führt dazu, dass einzelne Farbstoffe in lebenden Zellen nur einige 10 Sekunden kontinuierlich verfolgt werden können, bevor sie einer irreversiblen photochemischen Reaktion unterliegen. Entsprechend intensiv werden Bemühungen verfolgt, stabilere Farbstoffe zu verwenden. In diesem Zusammenhang kommen Halbleiternanopartikeln eine wichtige Rolle zu, da sie sich als besonders photostabil herausgestellt haben.

2. Einzelmolekülmikroskopie und Systembiologie

Ein Forschungsgebiet, das von der Systembiologie bearbeitet wird, sind so genannte Signalkaskaden. Eine einzelne Zelle nimmt ihre Umgebung in der Regel durch chemische Signale wahr. So können etwa Einzeller einen Gradienten einer Molekülsorte, die als Nahrung dient, erkennen, diese Information verarbeiten und darauf reagie-

ren, indem die Zelle sich auf die Nahrungsquelle zu bewegt. Eine weitere Gruppe von chemischen Stoffen signalisiert eine Gefahr, z.B. durch Viren und Bakterien, mechanischen Stress oder eine toxische Umgebung. Bei höheren Organismen kommen die vielfältigen Mechanismen hinzu, die eine Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen innerhalb eines Organs oder auch zwischen verschiedenen Organen ermöglichen. Ein Beispiel hierfür ist der programmierte Zelltod (Apoptose). In einem höheren Organismus ist es essentiell, dass Zellen, die ihre Funktion nicht mehr korrekt erfüllen, durch neue Zellen ersetzt werden. Hierbei ist es entscheidend, dass zum einen keine gesunden Zellen abgebaut werden und andererseits, dass der Prozess wohl definiert abläuft, d.h. keine für benachbarte Zellen schädlichen Substanzen, wie z.B. eiweißspaltende Enzyme, freigesetzt werden. Es gibt verschiedene Signale, die eine Zelle zum programmierten Zelltod veranlassen können, die aber immer auf der Ausschüttung einer Molekülsorte durch das Immunsystem beruhen. Zellen, die mit diesem Signal in Berührung kommen, entscheiden quasi selbstständig, wie auf das Signal reagiert wird, also ob der programmierte Zelltod eingeleitet wird oder nicht. Die Beschreibung der Signalverarbeitung auf das Todesignal, aber auch auf jedes andere Signal, das eine Zelle empfangen kann, ist auf molekularer Ebene komplex und man ist heutzutage weit davon entfernt, eine beliebige Signalkaskade einer Zelle auf molekularer Ebene präzise in ihrem raumzeitlichen Ablauf zu beschreiben.

Wie kann man sich eine solche molekulare Beschreibung vorstellen? Das Signalmolekül bindet an einen bestimmten Rezeptor, da dieser eine Bindungsstelle hat, die z.B. genau entgegengesetzt geladen ist, wie die Bindungsstelle des Signalmoleküls, so dass eine starke anziehende Wechselwirkung entsteht. Durch den Bindungsvorgang wird der Rezeptor auf der Innenseite der Zelle leicht verformt, da dies energetisch etwas günstiger ist. Dadurch werden wiederum zuvor verborgene Bindungsstellen freigelegt, an die Enzyme, die hochspezifisch andere Proteine zerschneiden können, aus dem Zellinneren binden können. Diese Enzyme sind eigentlich inaktiv, können aber nun, da sie sehr dicht beieinander sind, sich gegenseitig modifizieren, so dass aktive Enzyme entstehen. Diese wiederum können dann andere inaktive Proteine aktivieren. Allein diese kurze Sequenz zeigt, dass eine molekulare Beschreibung nicht nur sehr lang, sondern auch kompliziert werden kann, insbesondere, wenn man bedenkt, dass in vielen Signalkaskaden hunderte von verschiedenen Proteinen eine Rolle spielen.

Der Ansatz der Systembiologie, diese Sisyphusarbeit der molekularen Beschreibung auf ein System zu reduzieren, das mit sehr wenigen Parametern auskommt und trotzdem das Ergebnis einer Signalkaskade korrekt beschreibt, ist sehr verlockend. Es ist leicht einzusehen, dass nicht jeder Schritt in der Signalkaskade genau bekannt sein muss. Oft ist nur notwendig, dass wichtige Zwischenschritte erfasst werden. Im zuvor genannten Beispiel ist dies die Aktivierung eines Proteins, das nuklearer Faktor genannt wird und das nach Aktivierung in den Zellkern vordringt, um Gene zu aktivieren, wodurch dann die Produktion von anderen Proteinen veranlasst wird. In diesem Prozess ist der nukleare Faktor das Nadelöhr der Prozessgeschwindigkeit. Wenn man von Stuttgart nach München fährt und auf der A8 im Stau steht, ist es für die Gesamtfahrzeit völlig egal, wie man in Stuttgart auf die Autobahn gefahren ist, sondern nur wie lang der Stau ist. Solche Schlüsselstellen der Signalkaskade sind entscheidend für eine erfolgreiche Simulation der Kaskade. Hier können kleine Abweichungen in der Parametrisierung großen Einfluss auf das Gesamtergebnis haben. Es ist also entscheidend, dass man Methoden zur Verfügung hat, die eine möglichst genaue Messung der Schlüssel-

parameter liefert. Genau an dieser Stelle spielt die Einzelmolekülmikroskopie eine wichtige Rolle.

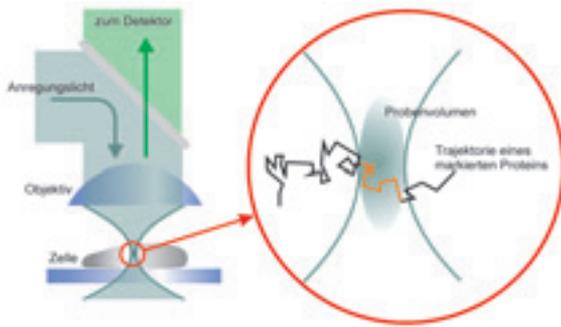
Verschiedene zellbiologische Untersuchungen haben zudem in der jüngsten Vergangenheit gezeigt, dass Fluktuationen selbst den Ort und den Zeitpunkt eines bestimmten biochemischen Prozesses in einer Zelle bzw. einem Organismus bestimmen können. Ein Beispiel ist die Zellteilung, bei der die Orientierung der mitotischen Spindel durch die (räumlich begrenzte) Fluktuation in der Konzentration eines bestimmten Proteins induziert wird. Auch hier vermag räumlich hochauflösende und ultraempfindliche Fluoreszenzmikroskopie neuartige Einblicke zu liefern, indem nämlich diese Fluktuationen direkt anhand der Fluoreszenzintensität nachvollzogen werden können. Im Folgenden soll dargestellt werden, warum hochsensitive Mikroskopietechniken, bis hin zur Einzelmoleküldetektion, das geeignete Werkzeug sind, um Parameter für die Modellierung zu bestimmen.

3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie: Statistische Schwankungen unter dem Mikroskop

Obwohl viele verschiedene Proteinsorten an Signalkaskaden beteiligt sind, ist die Konzentration der einzelnen Sorten teilweise sehr gering, d.h. in der Zellmembran bzw. im Zellinneren (im Zytoplasma) befinden sich lediglich einige Tausend Proteine einer Sorte. Für eine typische Säugerzelle bedeutet dies z.B., dass der mittlere Abstand zwischen zwei Rezeptorproteinen in der Zellmembran im Bereich einiger hundert Nanometer liegt, also im Bereich der Auflösung eines optischen Mikroskops. Wenn pro optisch auflösbarem Bereich aber nur ein Protein vorhanden ist, müssen einzelne Moleküle detektiert werden können, um überhaupt noch ein nachweisbares Signal zu erhalten. Dies ist nur möglich mittels höchstempfindlicher Fluoreszenzmikroskopie. Das Problem ist nun, dass Proteine in der Regel nicht fluoreszieren. Wie schafft man es, dass Proteine, und zwar nur Proteine der Sorte, die von Interesse



Die Abbildung zeigt einen Membranrezeptor, an dem ein Grünfluoreszierendes Protein (GFP) befestigt ist. Bei einer optischen Anregung mit einer Wellenlänge von 500 nm fluoresziert nur das GFP.



ist, fluoreszieren? Hier macht man sich die Entdeckung zunutze, dass die Fluoreszenz einer Quelle von einem relativ kleinen Protein stammt, dem GFP (*green fluorescent protein*). Es ist möglich, das Erbgut einer Zelle so zu verändern, dass sie anstelle des Proteins von Interesse, z.B. dem TNF-Rezeptor, ein so genanntes Fusionsprotein aus

TNF-Rezeptor und GFP produziert, also einen Rezeptor, an dessen Ende ein GFP angehängt wurde (02). Bestrahlt man die Zelle nun mit blauem Licht, so leuchten die GFPs grün, und da sie direkt mit den Rezeptoren verbunden sind, stammt diese grüne Fluoreszenz direkt von den Orten, an denen sich der Rezeptor befindet. Man hat also eine Methode, um Gen-spezifisch Proteine zu markieren.

Es ist leicht einzusehen, dass GFP aus der Zellbiologie mittlerweile nicht mehr wegzudenken ist. Obwohl nicht optimal, sind die Fluoreszenzeigenschaften des GFP glücklicherweise gut genug, um einzelne GFP-Moleküle detektieren zu können. Dies wird in einer Messmethode ausgenutzt, die sich Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie nennt (FCS, *Fluorescence Correlation Spectroscopy*). Mit FCS können Diffusionskonstanten und mit Einschränkungen auch Konzentrationen gemessen werden. Diese Methode soll im Folgenden kurz erläutert werden.

(03) zeigt den schematischen FCS-Aufbau.

Genau wie in der Konfokalmikroskopie wird nicht die gesamte Zelle beleuchtet, sondern vielmehr das Anregungslicht stark fokussiert, so dass nur ein „Punkt“ in der Zelle beleuchtet wird. Aufgrund der Wellennatur des Lichtes kann hier minimal eine Größe von bis zu 200nm in XY-Richtung und bis zu 600nm in Z-Richtung erreicht werden. Den Fokus platziert man nun an die Stelle der Zelle, an der die mit GFP markierten Proteine

untersucht werden sollen, also etwa auf die Zellmembran im Falle der TNF-Rezeptoren. Hat man sehr wenige Rezeptoren in der Membran, so misst man ein stark fluktuierendes Signal: Immer wenn ein mar-

FLUORESZENZ

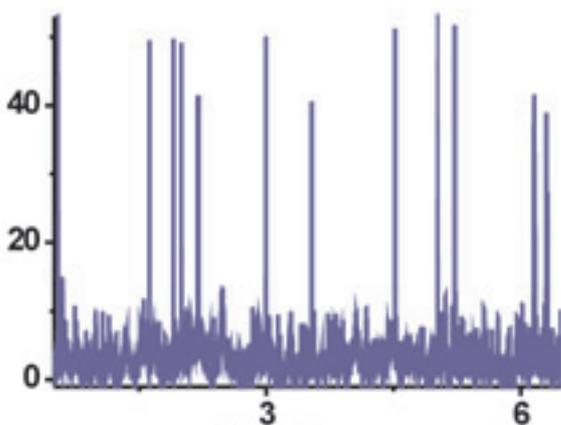
Fluoreszenz und fluoreszierende Proteine

Fluoreszenz ist die Eigenschaft von Molekülen, Licht zu absorbieren und mit einer größeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Eine intensive Fluoreszenz beobachtet man bei nur verhältnismäßig wenigen Molekülen. Unabhängig davon gibt es viele Anwendungen für fluoreszierende Moleküle, z.B. so genannte Aufheller in Waschmitteln, die im UV absorbieren und im Blauen fluoreszieren und so der Wäsche ein strahlendes Weiß verleihen können. Technische Anwendungen sind z.B. der Farbstofflaser oder die Fluoreszenzmikroskopie. Wie kommt die Verschiebung zu größeren Wellenlängen zustande? Bei der Anregung eines Moleküls in einen höheren elektronischen Zustand werden in der Regel zusätzlich noch Schwingungszustände mit angeregt (06). Die Energie dieser Schwingungszustände wird extrem schnell an die Umgebung abgegeben, so dass das Molekül im rein elektronischen Zustand verbleibt. Von hier relaxiert das Elektron unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurück. Die Energie dieses Photons ist nun um die Energie vermindert, die zuvor durch die Schwingungen abgegeben wurde.

In der Fluoreszenzmikroskopie macht man sich die Fluoreszenz zunutze, indem man nicht-fluoreszierende Moleküle (z.B. Proteine in einer Zelle) mit fluoreszierenden Molekülen markiert. Durch Herausfiltern des Anregungslichts sieht man im Mikroskop nur die Fluoreszenz der Marker und damit die Position des interessierenden Moleküls. In der Zellbiologie benutzt man als Marker häufig fluoreszierende Proteine, z.B. GFP. Diese haben den Vorteil, dass die Zelle sie selbst produziert, noch dazu verbunden mit dem Protein, das von Interesse ist. (02) etwa zeigt TRAF2, ein Protein, das in der Signalkaskade des programmierten Zelltods beteiligt ist, das mit GFP markiert ist. Man sieht, dass GFP verhältnismäßig groß ist, so dass durchaus die Gefahr besteht, dass die Funktion des markierten Proteins gestört wird.

kierter Rezeptor in den Fokus diffundiert, steigt das Signal an, diffundiert er wieder hinaus, geht das Signal auf ein Untergrundniveau zurück. Dies ist in (04) zu sehen, wo die Fluoreszenz als Funktion der Zeit aufgetragen ist (Fluoreszenzspur). Die einzelnen Spitzen (*Bursts*) im Signal entsprechen einzelnen markierten Rezeptoren, die durch den Fokus diffundieren. Die Breite der Bursts korreliert mit der Diffusionsgeschwindigkeit. Je langsamer ein

Schematische Darstellung des konfokalen Strahlenganges. Die Ellipse im unteren Teil der Abbildung symbolisiert das Fokalvolumen der Anordnung und ist rechts in der Abbildung vergrößert dargestellt. Die Linie im Fokalvolumen soll den Diffusionspfad eines einzelnen Moleküls andeuten.



Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität. Immer wenn ein einzelnes Molekül durch das Fokalvolumen (03) diffundiert, ergibt sich eine Spitze (*Burst*) im Fluoreszenzsignal.

Protein diffundiert, desto länger sind die Bursts. Bildet man die Autokorrelation (**Korrelationen**) der Fluoreszenzspur, so lässt sich mit Hilfe eines analytischen Modells sofort die Diffusionskonstante und die Proteinkonzentration aus der Korrelationsfunktion ableiten. Die Daten in (05) stammen von mit GFP markierten TNF-Rezeptoren. Es zeigt sich, dass die gemessenen Diffusionskonstanten im für Membranproteine typischen Bereich von 10^{-9} cm^2/s liegen. Dies ändert sich drastisch, wenn der Rezeptor aktiviert wird, also ein chemisches Signal empfangen wird (Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor), auf das die Zelle reagieren muss und das die Einleitung des programmierten Zelltodes bedeuten kann. (05) zeigt, wie sich die Autokorrelationsfunktion zu großen Zeiten hin verschiebt, d.h. die Diffusion wird deutlich langsamer. Nach einer aktuell diskutierten Theorie liegt dieses Verhalten daran, dass der Rezeptor nach Aktivierung in einen Membranbereich wechselt, der eine höhere Ordnung hat als die übrige Zellmembran. Die gemessene Diffusion entspricht dann der Diffusion des gesamten geordneten Bereichs (einige 10nm Durchmesser) in der Zellmembran.

Dieses einfache Beispiel zeigt verschiedene wichtige Aspekte:

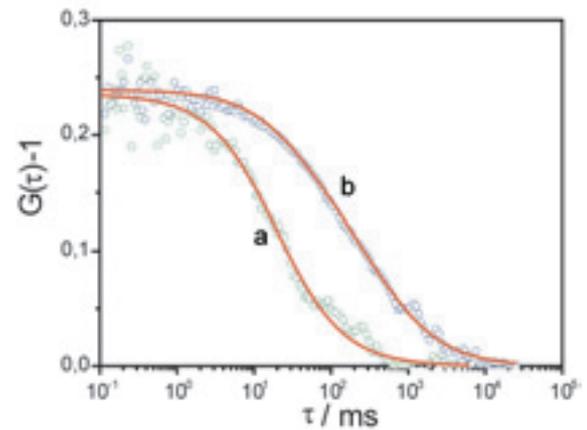
1. Man kann Diffusionskonstanten von molekularen Komponenten kleinster Konzentration in lebenden Zellen leicht messen.
2. Fluktuationen sind ein wesentlicher Bestandteil von zellulären Prozessen, die aber in der Regel in der klassischen Fluoreszenzmikroskopie nicht berücksichtigt werden.
3. Schon der erste Schritt der Signalkaskade, die den programmierten Zelltod vermittelt, ist hoch kompliziert und auf molekularer Ebene bis jetzt nicht verstanden.

4. Kreuzkorrelation: Nachweis molekularer Bindung durch korrelierte Fluktuationen

Mit Hilfe von Fluktuationen ist es aber nicht nur möglich, Diffusionskonstanten zu bestimmen, sondern es können ebenfalls Kollokalisationen auf molekularer Ebene bestimmt werden, d.h. man kann feststellen, ob zwei Proteine aneinander gebunden sind oder nicht. Man kann sich leicht vorstellen, dass gerade diese Fragestellung, ob ein Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem anderen Protein oder

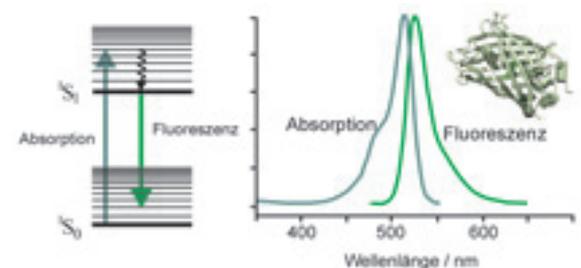
einem Proteinkomplex gebunden ist oder nicht, in Signalkaskaden eine zentrale Rolle einnimmt. Eine elegante Methode, dies direkt in lebenden Zellen zu messen, ist die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationspektroskopie (FCCS, *Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy*). Hierbei werden zwei Proteinsorten, von denen man wissen möchte, ob sie innerhalb einer Kaskade aneinander binden, mit unterschiedlichen Markern versehen, d.h. Markern, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren. Nun muss die Fluoreszenz beider Marker getrennt mittels zweier Detektoren gemessen werden. Detektor 1 weist ausschließlich Fluoreszenz von einem Marker, Detektor 2 ausschließlich vom anderen Marker nach. Bildet man nun die Korrelationsfunktion (**Korrelationen**) zwischen den Signalen von Detektor 1 und 2, so erhält man nur dann eine Korrelation mit einem Betrag größer als eins, wenn die beiden Marker immer zusammen durch den Fokus des Mikroskops diffundieren. In einer Zelle, in der beide Proteine aneinander gebunden sind, ist dies immer der Fall und man erhält eine starke Korrelation. Sind die Proteine hingegen nicht aneinander gebunden, ergibt sich keine Korrelation. Auch ein gleichzeitiges zufälliges Passieren des Fokus von je einer Proteinsorte ist belanglos. Solche zufälligen Koinzidenzen mitteln sich in der Korrelation zu eins heraus.

Für Messungen in lebenden Zellen benötigt man also verschiedenfarbige Marker oder autofluoreszierende Proteine. Durch Mutationen des GFP ist es gelungen, GFP-Mutanten zu erzeugen, die bei unterschiedlichen Farben leuchten. Dementsprechend heißen sie Blaufluoreszierendes Protein (BFP), Cyanfluoreszierendes Protein (CFP) und Gelbfluoreszierendes Protein (YFP). Markiert man zwei verschiedene Proteine mit zwei unterschiedlichen Mutanten sollte FCCS leicht möglich sein. Allerdings ist zu beachten, dass die Fluoreszenzspektren der verschiedenen fluoreszierenden Proteine spektral



05

Korrelationsfunktion $G^{(2)}(\tau)$ vor a) und nach der Stimulation b) eines Membranrezeptors. Die Kreise stellen Messdaten und die durchgezogene Linie eine numerische Anpassung an die Daten dar.

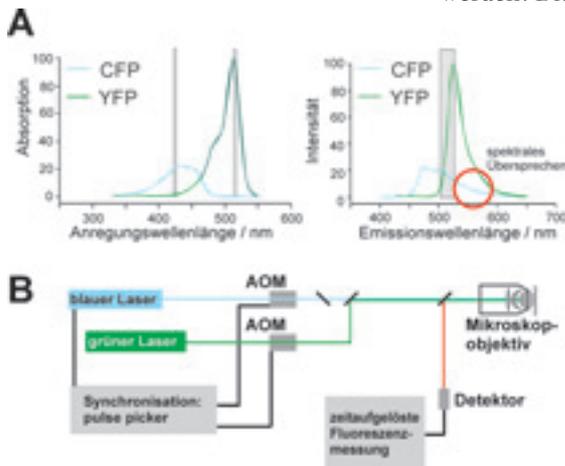


06

Die Abbildung zeigt das vereinfachte Niveauschema eines fluoreszierenden Proteins. Die dicken Linien (S_0 , S_1) entsprechen rein elektronischen Zuständen, die dünnen Linien stellen Schwingungsniveaus dar. Da Schwingungen sehr schnell abklingen, sind Absorptions- und Fluoreszenzspektren gegeneinander verschoben.

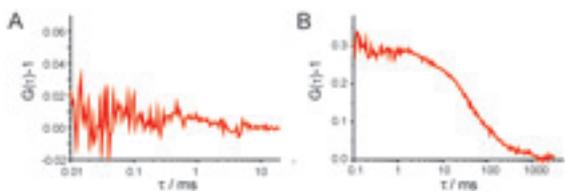
sehr breit sind, so dass es nicht möglich ist, zwei spektrale Bereiche zu finden, in denen jeweils nur ein Protein fluoresziert. Man erhält also immer in beiden Detektoren Fluoreszenzlicht, obwohl nur eine Proteinsorte durch den Fokus diffundiert ist. Dies bedeutet aber, dass man immer eine scheinbare Kreuzkorrelation misst.

Wie kann dieses Problem nun umgangen werden? Die Fluoreszenzspektren überlappen spektral und sind somit unbrauchbar für Korrelationsmessungen. Auf die Absorptionsspektren trifft dies jedoch nicht zu. Es ist möglich, unterschiedliche fluoreszierende Proteine getrennt anzuregen. **(07)** zeigt dies für CFP und YFP. Bei einer Wellenlänge von 425 nm (blau) lässt sich ausschließlich CFP anregen, bei 514 nm (grün) ausschließlich YFP. In dem am 3. Physikalischen Institut entwickelten Aufbau wird dieser Sachverhalt aus-



A) Die Spektren von CFP und YFP sind in Absorption spektral trennbar (graue Linien), während in Emission ein Übersprechen der Fluoreszenzkanäle nicht vermeidbar ist (roter Kreis). **B)** Schematische Darstellung des Kreuzkorrelationspektrometers. Durch abwechselndes Anregen von CFP und YFP mit zwei Lasern sowie zeitaufgelöster Detektion kann jedes gemessene Photon eindeutig CFP oder YFP zugeordnet werden.

genutzt: Mit gepulsten Lasern wird abwechselnd CFP, mit einem blauen Laserpuls, und YFP, mit einem grünen Laserpuls, angeregt. Die Fluoreszenz wird dann zeitaufgelöst detektiert. Fluoreszenzphotonen, die unmittelbar nach dem blauen Anregungspuls gemessen werden, müssen vom CFP stammen, da mit Blau ausschließlich CFP angeregt wurde, während Photonen, die unmittelbar nach dem grünen Puls gemessen werden von YFP stammen. **(07)** zeigt diesen Aufbau im Detail: Ein gepulster Titan-Saphir-Laser liefert eine Wellenlänge von 850 nm (nahes Infrarot) und alle 10 ns einen Puls. Mittels eines Kristalls, der die Frequenz der Laserstrahlung verdoppelt, erhält man die benötigten 425 nm. Ein so genannter Pulspicker sorgt dafür, dass nur jeder zehnte Puls durchgelassen wird, so dass nun alle 100 ns ein sehr kurzer blauer Laserpuls zur Verfügung steht. Synchron hierzu, aber mit 50 ns Verzögerung, wird aus einem kontinuierlichen grünen Laser ein Puls herausgeschnitten. Man erhält also abwechselnd alle 50 ns einen blauen und einen grünen Laserpuls. Durch das zeitaufgelöste Messen der Photonen lassen sich am Ende die Fluoreszenz von CFP und YFP getrennt als Funktion



Kreuzkorrelationskurven vor und nach der Bindung von Proteinen.

KORRELATION

Mit Hilfe von Korrelationsfunktionen kann man allgemein Ähnlichkeiten zwischen Funktionen oder Selbstähnlichkeiten innerhalb einer Funktion aufdecken. Hier werden die Intensitäts-Autokorrelationsfunktion und die Intensitäts-Kreuzkorrelationsfunktion benutzt, um aus Fluktuationen der Fluoreszenz, d.h. aufgrund von Konzentrationsschwankungen innerhalb eines Fokall Volumens Informationen über Proteine innerhalb einer lebenden Zelle zu erlangen.

Die Autokorrelationsfunktion ist definiert als:

$$G^{(2)}(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Hierbei ist F die Fluoreszenzintensität und die spitzen Klammern bedeuten eine Zeitmittelung. Es wird also die Intensität zur Zeit t mit der Intensität zu einem späteren Zeitpunkt $t + \tau$ verglichen. Die Zeit, die ein Protein benötigt, um durch den Fokus zu schwimmen, taucht somit direkt in der Korrelationsfunktion auf. Aus ihr kann dann die Diffusionskonstante des Proteins abgeleitet werden.

Die Kreuzkorrelation für zwei verschiedenen fluoreszierende Spezies, z.B. für CFP und YFP, lautet:

$$G_{\text{cross}}^{(2)}(\tau) = \frac{\langle F_{\text{CFP}}(t)F_{\text{YFP}}(t+\tau) \rangle}{\langle F_{\text{CFP}}(t)F_{\text{YFP}}(t) \rangle}$$

Hier sind F_{CFP} und F_{YFP} die Intensitäten der fluoreszierenden Proteine CFP und YFP. Sind diese Proteine miteinander verbunden, so ergeben sich für sie identische Fluoreszenzspuren, d.h. die Kreuzkorrelationsfunktion stimmt mit der Autokorrelationsfunktion überein. Sind beide Komponenten unabhängig voneinander, so mitteln sich die Fluoreszenzspuren zu eins.

der Zeit aufnehmen. Aus diesen Fluoreszenzspuren bestimmt man die Kreuzkorrelation.

(08) zeigt Beispiele für zwei Proteine, die nicht aneinander gebunden sind **(08A)** bzw. zwei Proteine, bei denen das der Fall ist **(08B)**. Man erkennt leicht, dass im ersten Fall die Kreuzkorrelation flach verläuft, während im zweiten Fall, der aneinander gebundenen Proteine, die Korrelationsfunktion deutlich größer Null ist. Bei genauer Kenntnis des Untergrunds (also geringe Fluoreszenz von anderen Zellkomponenten und Dunkelzählrate des Detektors) ist es sogar möglich, mit Hilfe der Autokorrelationen beider Proteinsorten sowie deren Kreuzkorrelation genau zu bestimmen, wie hoch der Anteil der gebundenen und ungebundenen Proteine ist.



SX-8: BESCHLEUNIGT VISIONEN

Höchste Performance mit höchster Effizienz

Die SX-8 löst heute bereits die Aufgaben von morgen. Mit einfacher Programmierung, dem weltweit schnellsten numerischen Prozessor und dem geringsten Total Cost of Ownership auf dem Markt. Die SX-8 wurde speziell für Numerische Simulationen und wissenschaftliche

Anwendungen wie Strömungsberechnungen und Grundlagenforschung entwickelt und ist heute das fortschrittlichste Tool für Wissenschaftler, Forscher und Ingenieure, die ihrer Zeit voraus sind.

Weitere Information unter:

NEC High Performance
Computing Europe GmbH

Prinzenallee 11
D-40549 Düsseldorf
Germany

Telefon: +49-211-5369-0
Fax: +49-211-5369-199
E-Mail: info@hpce.nec.com

SX-8

Vector Supercomputer

www.hpce.nec.com



**Straßenbau
Tiefbau
Pflasterbau**



75
J A H R E *leistungsstark und zuverlässig*

Wegbereiter

Julius Bach Bauunternehmung GmbH
Schulze-Delitzsch-Straße 4-8 · 70565 Stuttgart
Telefon (07 11) 7 84 87-0
Telefax (07 11) 7 84 87-42
Internet: www.julius-bach.de
E-Mail: info@julius-bach.de


Julius Bach
BAUNTERNEHMUNG



seit 1932

F. + W. ERBIS GMBH

FLACHDACH + TERRASSENBAU

Strohgäustraße 22
70435 Stuttgart

Tel. 0711-80609690
Fax 0711-806096920

5. Videomikroskopie an einzelnen Molekülen

Besonders elegant ist die Abbildung bzw. das Verfolgen einzelner Moleküle mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop. Neuartige, empfindliche CCD-Kameratypen erlauben den Nachweis einzelner Photonen mit einer Quantenausbeute von bis zu 80 Prozent bei gleichzeitigem geringen Eigenrauschen und hoher Ausleserate. Mit einem solchen Gerät gelingt es, einzelne Moleküle in lebenden Zellen mit einem konventionellen Epifluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Gleichzeitig kann mit einer Bildwiederholrate von 10 Hz die Diffusion bzw. der Transport einzelner Moleküle verfolgt werden. Auf diese Weise lässt sich direkt, d.h. weitgehend modellfrei, das Diffusionsverhalten der Moleküle erfassen, was Informationen über die Umgebung der Moleküle bzw. über die Assoziation der Moleküle mit Bindungspartnern liefert.

6. Fazit

Eine erfolgreiche systembiologische Beschreibung zellulärer Prozesse wird ganz wesentlich auf der Bereitstellung verlässlicher und detaillierter experimenteller Daten basieren. Teilweise, etwa bei der Erhebung des Proteinbestandes einer Zelle, sind diese nur mit erheblichem Aufwand zu beschaffen und es bedarf sicherlich jahrelanger systematischer Bemühungen, um entsprechendes Datenmaterial zur Verfügung zu stellen. Die experimentellen Techniken in diesem Bereich sind jedoch gut entwickelt, so dass „lediglich“ entsprechende Bemühungen unternommen werden müssen. In anderen Bereichen fehlen die entsprechenden experimentellen Techniken noch oder befinden sich im Erprobungsstadium. Dies trifft in diesem Zusammenhang auf die Einzelmolekülmikroskopie zu. Die große Chance besteht darin, in bisher nicht gekanntem Maß detaillierte Einblicke in die Bewegung von Proteinen und Proteininteraktion in Zellen zu erreichen. Gleichzeitig kann mit Zellen gearbeitet werden, bei denen die entsprechenden Proteine nicht überexprimiert werden, so dass entsprechende Artefakte ausgeschlossen werden können. Eine Nutzung für die Systembiologie setzt voraus, dass die Technik an bestimmten Stellen eingesetzt wird, etwa an einem besonders neuralgischen Punkt in einer Signalkette. Eine genaue Quantifi-

zierung von Proteinmengen gehört dabei zu den Stärken der Methode. Weiterhin kann das Bewegungsverhalten von Proteinen weitgehend modellfrei bestimmt werden, d.h. es ist möglich zu bestimmen, ob Proteine transportiert werden, in beschränkten Volumina zwei- oder dreidimensional diffundieren oder gar eine freie unbeschränkte Diffusion durchführen. Hier stellt die Einzelmolekülmikroskopie oder das *Single Particle Tracking* eine sinnvolle Ergänzung zu Standardtechniken wie *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP) dar. Eine gänzlich neue Möglichkeit besteht im Nachweis der zeitlichen Fluktuationen von Proteinmengen in Zellen. Bei verschiedenen zellulären Prozessen wird vermutet, dass solche Fluktuationen zur Musterbildung bzw. Asymmetrie führen. Hier hat die hochempfindliche Fluoreszenzmikroskopie sicherlich ein interessantes Einsatzgebiet. Auch der klassische Nachweis von Proteininteraktion in Zellen wird durch die Methode neu beleuchtet. Die Kreuzkorrelationspektroskopie stellt ein neues Verfahren zum Nachweis der Proteinbindung dar, ohne auf die teilweise kritischen Energietransfermessungen, oder die Kollisionsmessungen zurückzugreifen. Alles in allem stellt die Einzelmolekülmikroskopie eine beträchtliche Erweiterung der klassischen Fluoreszenzmikroskopie dar, ohne diese zu verdrängen oder gar zu ersetzen. Aber ein immer genaueres Verständnis zellulärer Prozesse erfordert schließlich doch gelegentlich das Verfolgen einzelner Moleküle in Zellen. •

SUMMARY

In systems biology it is important to find reliable input data for key parameters for the model of a biological system. These data can only be found by analytically experimental methods. In addition to standard fluorescence microscopy, single molecule methods became popular nowadays in Stuttgart. Methods are developed to help determine key parameters of cellular processes with highest possible accuracy. The extreme low concentrations of the molecular components of many important processes require methods that allow for the detection of the fluorescence of single molecules. Therefore, the fluorescence of a relatively small protein extracted from a jelly fish named green fluorescent protein (GFP) can be used. It is possible to trigger the cell to fuse the GFP to every target protein under investigation. This makes GFP the most used marker in cell biology. Using fluorescence correlation spectroscopy (FCS), it is possible to measure the mobility of proteins within living cells. Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) shows whether a protein binds to another protein or protein complex. These data are important to model a signal cascades describing the response of a cell to the manifold signals of the environment.

Jörg Wrachtrup
Carsten Tietz
Margarita Gerken
Elmar Thews

DIE AUTOREN


PROF. DR. JÖRG WRACHTRUP (im Bild rechts)

Leiter des 3. Physikalischen Instituts, studierte und promovierte an der Freien Universität Berlin und habilitierte an der Technischen Universität Chemnitz. Sein Hauptinteresse gilt der Spektroskopie an einzelnen Molekülen und Quantensystemen. Diese methodische Klammer umschließt so unterschiedliche Forschungsgebiete wie Untersuchungen zu Quantencomputern mittels einzelner Spins im Festkörper bis zur Erforschung von Signalkaskaden in lebenden Zellen, also von der „harten“ Quantenphysik bis zur „weichen“ Biophysik.

DIE BIOPHYSIKGRUPPE

wurde am Dritten Physikalischen Institut mit der Berufung von Prof. Wrachtrup in Jahr 2000 eingerichtet und seit 2002 geleitet von **Dr. Carsten Tietz** (Mitte, Physikstudium in Düsseldorf, Promotion in Chemnitz und Stuttgart). Das Hauptinteresse liegt in der Untersuchung von einzelnen Proteinen, wobei zu Anfang ein Schwerpunkt auf Proteinen der Photosynthese lag. Schon kurze Zeit später mit dem Eintritt des Instituts in den Stuttgarter Sonderforschungsbereich, der sich die Untersuchung von Signalkaskaden zum Ziel gesetzt hat, wurden Methoden zur Untersuchung einzelner Proteine in lebenden Zellen entwickelt, wie z.B. Verfahren der Korrelationspektroskopie. Diese Verfahren wurden im wesentlichen von den Doktoranden **Margarita Gerken** (rechts vorne, Physikstudium in Eriwan, Armenien) und **Elmar Thews** (links, Physikstudium in Aachen und Stuttgart) aufgebaut, die beide zur Zeit ihre Promotionen abschließen.

Kontakt

Universität Stuttgart, 3. Physikalisches Institut, Pfaffenwaldring 57, 70550 Stuttgart

Tel. 0711/685-5231, Fax 0711/685-5281

E-Mail: c.tietz@physik.uni-stuttgart.de

ANZEIGE

Ingenieur(in)

Maschinenbau/Feinwerktechnik/Kunststofftechnik/Fahrzeugtechnik/
Luft- und Raumfahrttechnik

als Projektleiter/Teamleiter

für die Entwicklung von Geräten und Systemen in der Medizintechnik gesucht.

B&W bietet Grundlagenentwicklungen, Machbarkeitsstudien, Produktentwicklungen, Konstruktionen, Berechnungen, Aufbau von Prototypen, Organisation von Erprobungen, Lieferantenbetreuung und Betreuung von Serienproduktionen – und das in den Bereichen Fahrzeugtechnik, Medizintechnik, Elektrowerkzeuge und Telekommunikation.

Sie nehmen teil an High-Tech-Entwicklungen mit hochprofessionellen Methoden und das in einer offenen, fast hierarchiefreien Struktur.

Absolventen sind willkommen.

B&W ENGINEERING UND DATENSYSTEME GmbH

Grenzstr. 9-11 • 70435 Stuttgart

Tel (0711) 13 67 14 - 12 • Gerhard Wiegelmann

E-Mail: wiegelmann@buw-eng.de

Homepage: <http://www.buw-eng.de>



B&W

**Nah dran heißt, erst zufrieden zu sein,
wenn auch die kritischsten Kunden zufrieden sind.**



97% unserer Kunden sind von unserer Beratungsleistung überzeugt und mit uns zufrieden. Das zeigen die Ergebnisse der letzten EMNID Kundenbefragungen, in denen die BW-Bank wieder einmal hervorragend abgeschnitten hat. Zufrieden sind wir damit aber noch lange nicht. Wir arbeiten hart daran, auch den restlichen 3% ein Lächeln aufs Gesicht zu zaubern.

*Wenn auch Sie zu den zufriedenen Bankkunden in Deutschland gehören möchten, rufen Sie jetzt an, Telefon 07 11/180-0.
Internet: www.bw-bank.de*

Nah dran.
BW (BANK

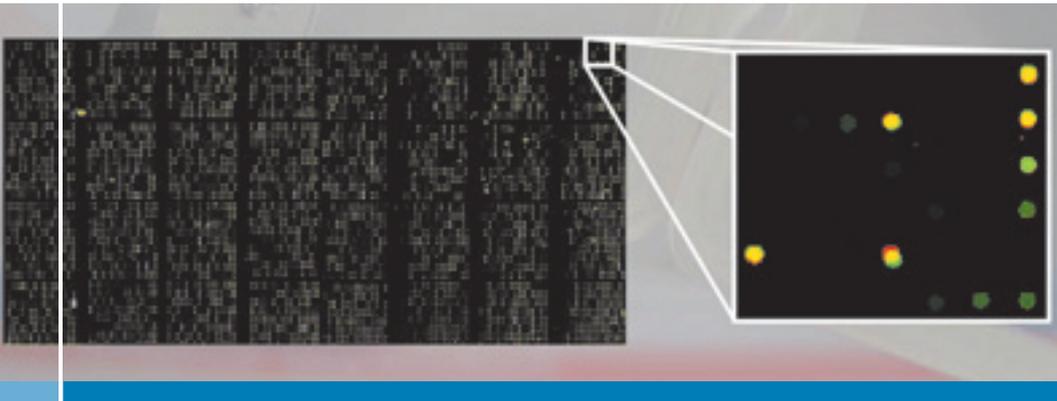
Funktionelle Genomik

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

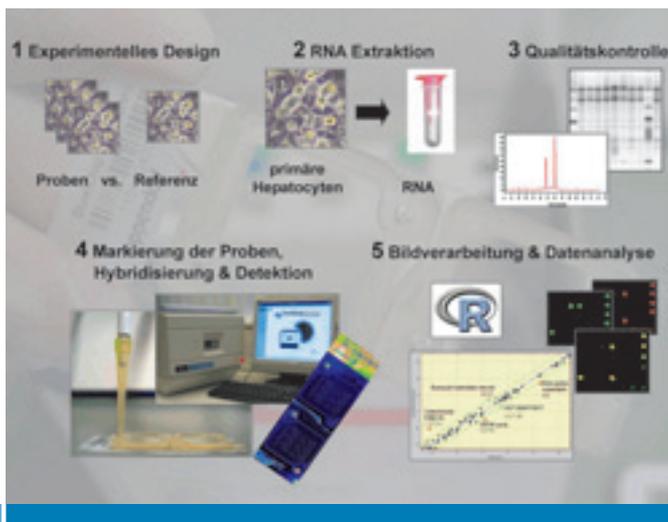
verschiedene Gensequenzen in Form von kleinen Punkten, den so genannten Spots abgesetzt und immobilisiert werden. Diese repräsentieren Teile oder gar das gesamte Genom des zu untersuchenden Organismus. Will man nun Aussagen darüber gewinnen, was unter verschiedenen experimentellen Bedingungen in der 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-Experimentes. (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.

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 Hy-

bridisierung, 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.

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

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

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

ANZEIGE



NETZ SATT FÜR NUR 145 €.

DAS VVS STUDITICKET.

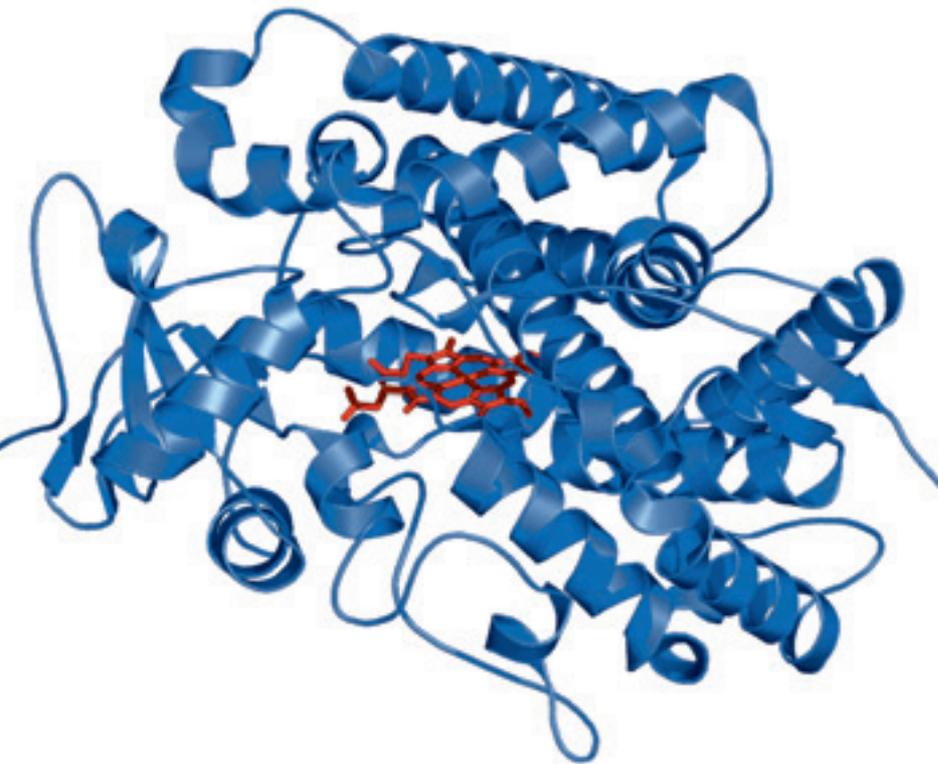
Studentinnen und Studenten sind viel auf Achse. Die freie Bus- und Bahnfahrt mit dem Studentenausweis gilt aber erst ab 18 Uhr. Wie kommt man nun tagsüber günstig von A nach B? Ganz einfach: mit dem StudiTicket*! Für nur 145 € pro Semester steht allen Studierenden der Hochschulen im Großraum Stuttgart das ganze Verbundnetz rund um die Uhr offen. Das lohnt sich! Denn 145 € sind gerade mal 24,16 € im Monat bzw. 0,80 € am Tag. Wir wünschen guten Appetit!

* Halbjahres-Netzkarte zum Sondertarif für Studierende. Verbundpass mit Lichtbild erforderlich.
Infos: 07 11/1 94 49 oder www.vvs.de

VVS
Clever auf Achse

Von der Sequenz zur Funktion

Datenbanken und Modellierung



Enzyme spielen in der Medizin eine wichtige Rolle, da je nach der vorhandenen Enzymausstattung die individuelle Reaktion auf Medikamente äußerst unterschiedlich ausfallen kann und von Mensch zu Mensch variiert. Wird zuviel eines Enzyms produziert, das am Abbau eines bestimmten Medikaments beteiligt ist, kann dieses Medikament unwirksam werden. Ist hingegen das Enzym in zu geringen Mengen vorhanden, wird das Medikament zu langsam abgebaut.

Ein zu langsamer Abbau hat dabei den gleichen Effekt wie eine Überdosierung und kann zu Nebenwirkungen führen. Ein Fehlen

des Enzyms kann ebenfalls die Bildung giftiger Nebenprodukte bewirken, da der eigentliche Abbauweg nicht funktioniert. Aus der großen Enzymklasse der P450 Monooxygenasen sind die drei wichtigsten am Abbau von 30 Prozent aller in der Leber verarbeiteten Arzneimitteln beteiligt. Ein großer Schritt für die Entwicklung maßgeschneiderter Medikamente ist daher das Verständnis, wie sich die unterschiedlichen Variationen in der DNA-Sequenz eines Gens, die entweder zu einem veränderten Enzym oder zu einer Änderung der Menge an produziertem Enzym führen können, auf die Eigenschaften von P450 Monooxygenasen auswirken.

1. Einleitung

Die Enzymklasse der P450 Monooxygenasen spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung und der Biosynthese. Monooxygenasen kommen in allen Lebewesen vor; so wurden drei P450 Monooxygenasen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, 18 in dem Bodenbakterium *Streptomyces coelicolor*, 80 in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und 257 in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* gefunden. Erstaunlicherweise enthalten die Bakterien *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* keine P450 Monooxygenasen. Das menschliche Genom kodiert für 60 verschiedene P450 Monooxygenasen. 15 dieser Enzyme sind für den Abbau von Fremdstoffen wie etwa Medikamenten, die normalerweise nicht im Körper vorkommen, zuständig; 14 sind am Steroidstoffwechsel beteiligt, vier P450 Monooxygenasen oxidieren fettlösliche Vitamine und neun Enzyme sind am Stoffwechsel von Fettsäuren beteiligt. Die Funktion der restlichen P450 Monooxygenasen ist zurzeit noch nicht bekannt. Die Hauptaufgabe dieser Enzyme ist es, wasserunlösliche Substanzen in wasserlösliche Produkte umzuwandeln. Dies trifft auch auf Medikamente zu, die dadurch unwirksam und aus dem Körper ausgeschieden werden können. Die wichtigsten an Abbau, Aktivierung oder Umbau von Medikamenten beteiligten P450 Monooxygenasen kommen in der Leber vor, aber auch in anderen Geweben befindet sich eine Vielzahl dieser Enzyme. Allerdings hat nicht jeder Mensch die gleiche Ausstattung an P450 Monooxygenasen, sondern es existieren erblich bedingte Variationen. Diese werden verursacht durch so genannte *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). SNPs sind Variationen in der DNA-Sequenz eines Gens, die entweder zu einem veränderten Enzym oder zu einer Änderung der Menge an produziertem Enzym führen können.

2. P450 Datenbank

Die Funktion der meisten humanen P450 Monooxygenasen ist noch nicht bekannt. Die Vorhersage der Eigenschaften dieser Enzyme und ihrer SNPs bezüglich Menge und biochemischer Eigenschaften, und somit die Vorhersage ihrer Aktivität gegenüber neuen Wirkstoffen ist das Ziel der P450 Datenbank. Durch systematisches Sammeln und Vergleichen der Daten von

P450 Monooxygenasen mit bekannten und unbekanntem Eigenschaften können die Funktionen der einzelnen Bereiche des Proteins entschlüsselt werden. Obwohl die Proteinsequenzen von P450 Monooxygenasen nur geringe Ähnlichkeit aufweisen, haben die Proteine eine ähnliche Struktur und Funktion, wodurch sie direkt verglichen werden können. Der systematische Vergleich aller bekannten Sequenzen, Strukturen und Eigenschaften soll daher zum Verständnis dieser Enzyme führen.

Die P450 Datenbank ist eine familienspezifische Datenbank, sie bündelt und organisiert große Mengen an Sequenz-, Struktur- und Annotationsinformationen und ist daher ein nützliches Werkzeug, um Beziehungen zwischen Proteinsequenzen und Proteinstrukturen zu untersuchen. Ein Protein ist ein Polymer bestehend aus einer Kette von Aminosäuren, die eine definierte räumliche Struktur einnehmen. Die räumliche Struktur eines Proteins bedingt seine Funktion und Wirkungsweise. Verwandte, also aus einem gemeinsamen Vorgängerprotein hervorgegangene Proteine weisen neben einer ähnlichen Struktur auch eine ähnliche Proteinsequenz auf. Je nach dem Verwandtschaftsgrad wurden die Proteinsequenzen daher in homologe Familien und übergeordnet in Superfamilien eingeteilt. Die Benennung von P450 erfolgt nach ihrem Verwandtschaftsgrad und deckt sich mit der Einteilung der Enzyme in der P450 Datenbank: Der Name eines P450 beginnt mit CYP (*C*ytocrom *P*450) gefolgt von einer Zahl, die die Superfamilie bestimmt, eines Buchstabens, der die homologe Familie bezeichnet und einer weiteren Zahl, die das Enzym identifiziert (z.B. CYP2C9, CYP3A4). Die P450 Datenbank enthält 3538 Proteineinträge, wobei von 128 Einträgen Proteinstrukturen bekannt sind. Sie lassen sich in 934 homologe Familien und 462 Superfamilien einteilen. Hiervon sind 218 Proteine aufgeteilt in 43 homologe Familien und 20 Superfamilien humane P450 Monooxygenasen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Enzymklasse der P450 Monooxygenasen spielt eine wichtige Rolle beim Ab- und Umbau von Fremdstoffen wie Giftstoffen oder Medikamenten. Obwohl alle Vertreter dieser Klasse den gleichen Reaktionstypus katalysieren, variieren die einzelnen Enzyme erheblich in ihrem Substrat- und Produktspektrum. Alleine im menschlichen Genom gibt es 60 verschiedene P450 Gene. An unserem Institut wird durch Methoden der Bioinformatik und durch computergestützte Proteinmodellierung untersucht, welche Bereiche in den P450 Monooxygenasen für die Erkennung der Fremdstoffe verantwortlich sind und welche Produkte dabei jeweils entstehen. Mit einem solchen Modell lässt sich erklären, wie eine unterschiedliche Zusammensetzung von P450 Monooxygenasen bei zwei Patienten zu unterschiedlichen Abbauraten desselben Medikaments führen kann. Ziel ist es, die Abbauraten und die Abbauprodukte für jeden beliebigen Fremdstoff individuell vorhersagen zu können.



01

Phylogenetischer Baum der homologen Familien 2A, 2B, 2C, 2D, 2E und 2F. Humane P450 wurden in rot hervorgehoben, homologe Familien wurde durch Einrahmungen gekennzeichnet.

Eine interessante Familie ist die Superfamilie 2. Mitglieder dieser Superfamilie sind beteiligt am Abbau von Nikotin (CYP2A6, CYP2B6), Morphinen (CYP2B1), AT1-Antagonisten (Cyp2C9), Protonenpumpenhemmern, Antiepileptika und Antidepressiva (CYP2C19), β -Blockern (CYP2D6) sowie Anästhetika, Ethanol und Paracetamol (CYP2E1). Um Proteinsequenzen dieser Superfamilie zu untersuchen, werden verschiedene Analysemethoden angewandt.

Zur Analyse der gesammelten Sequenzdaten wurden für jede homologe Familie und jede Superfamilie Sequenzvergleiche erstellt. Bei einem Sequenzvergleich werden Proteinsequenzen nach ihrer Ähnlichkeit angeordnet, wobei die Eigenschaften ihrer Aminosäuren (hydrophob, polar, geladen) eine wichtige Rolle spielen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Beobachtung, dass die Eigenschaften von Aminosäuren an bestimmten Positionen im Protein für die Faltung und Aktivität essentiell sind. Anhand eines Sequenzvergleichs können daher Aminosäuren, die in allen Proteinsequenzen einer Familie gleich sind, identifiziert werden. Solche konservierten Aminosäuren sind häufig entweder für die Funktion oder die Struktur eines Proteins essentiell. Sequenzvergleiche werden als Grundlage für eine Vielzahl von Analysemethoden eingesetzt, wie für die Berechnung von phylogenetischen Bäumen, welche die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen Proteinen aufgrund ihrer

Sequenzähnlichkeit darstellen. In (01) ist ein phylogenetischer Baum ausgesuchter Proteine aus sechs homologen Familien der Superfamilie 2 dargestellt. Der Baum gliedert sich für die homologen Familien 2A, 2B, 2D und 2F deutlich in vier Äste, wobei auch Unterteilungen innerhalb einer homologen Familie sichtbar sind (2A, 2B und 2D). Die homologen Familien 2C und 2E hingegen

zeigen keine deutliche Trennung, da die Familie 2C streut. In diesem Fall wäre zu überlegen, ob die Einordnung der Proteine

2C22, 2C30, 2C117 und 2C33 aus diesem Beispiel in die homologe Familie 2C korrekt ist.

Zur Analyse der Auswirkungen von Polymorphismen werden alle verfügbaren Informationen über bekannte SNPs in der Datenbank gesammelt und ausgewertet: welche Position wurde mutiert, welche Aminosäure wurde ausgetauscht, und welche Auswirkungen auf die Aktivität und die Substratspezifität des Enzyms sind bekannt. Allerdings führt nicht jeder Austausch notwendigerweise zu einer Änderung der Eigenschaften. Gewisse Variationen in der Proteinsequenz werden toleriert, andere hingegen führen zur Inaktivierung des Enzyms. Um diese Variationen innerhalb einer Familie zu untersuchen, wurden Konservierungsanalysen durchgeführt. Hierbei werden die Eigenschaften der Aminosäuren, ihre Position im Protein und ihre Konservierung berücksichtigt. Im Alignment der Familie CYP2B erkennt man, dass die Aminosäure Glutamin an Position 21 des humanen CYP2B6 Enzyms nur in einer weiteren Sequenz der Familie vorkommt, und damit nicht konserviert ist (02). Die Aminosäure Methionin an Position 46 hingegen ist in fast allen Sequenzen der Familie 2B erhalten und damit hoch konserviert. Experimentelle Daten zu Mutationen an diesen Positionen in CYP2B6 zeigen, dass eine Mutation des hoch konservierten Methionins zu einem Verlust der Enzymfunktion führt, während das Enzym tolerant gegenüber einer Mutation an der nicht konservierten Position 21 ist. Im Vergleich mit P450/SNPs mit bekannten Eigenschaften lassen sich Rückschlüsse auf die Eigenschaften neu entdeckter SNPs ziehen. Das Ziel dieser Untersuchungen ist, die Eigenschaften unbekannter SNPs vorherzusagen und somit die Grundlage zu schaffen, dass individuell für jeden Patienten das richtige Medikament in der richtigen Dosierung verabreicht werden kann.

3. Modellierung

Um die Funktionsweise von Enzymen zu verstehen sind Informationen über ihre dreidimensionale Proteinstruktur nötig. Zur Zeit sind etwa 28.500 Proteinstrukturen in der öffentlich zugänglichen Datenbank, der *Protein Data Base* (PDB) (www.pdb.org) zugänglich. Seit Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhun-



02

Ausschnitt aus dem Sequenzalignment der Familie 2B. Die Positionen 21 und 46 sind farbig markiert.

derts, als die erste Kristallstruktur eines bakteriellen P450 Enzyms publiziert wurde, konnten die Strukturen von 13 verschiedenen P450 Monooxygenasen aufgelöst werden. Zunächst wurden vor allem die Strukturen bakterieller Enzyme, in den letzten Jahren jedoch auch die von höheren Organismen aufgeklärt (03). Trotz unterschiedlicher Sequenzen zeigen die bisher bekannten P450 Monooxygenasen eine große Ähnlichkeit. Da die Kristallisation von Proteinen, die für die Ermittlung von Proteinstrukturen benötigt wird, sehr aufwendig und schwierig ist, gibt es, im Verhältnis zu den bekannten Sequenzen, nur eine relativ geringe Anzahl aufgelöster Proteinstrukturen. Allerdings kann die Struktur eines Proteins auch auf dem Computer modelliert werden. Dabei wird vorausgesetzt, dass Proteine mit ähnlicher Sequenz eine ähnliche Struktur besitzen. Die Sequenzidentität zwischen einem Protein mit bekannter Struktur und dem zu modellierenden Protein sollte 50 Prozent oder mehr betragen, um ein vertrauenswürdigeres Modell zu erhalten.

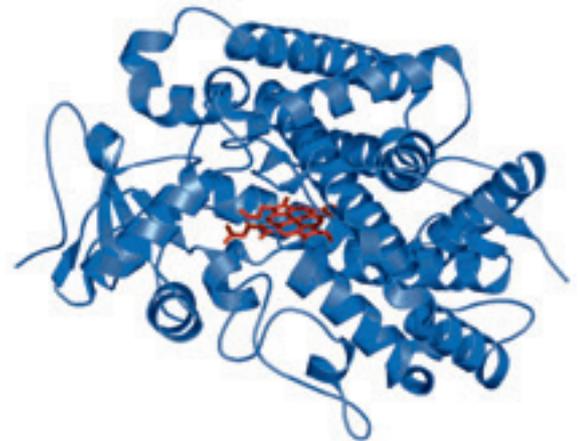
Mit Hilfe der Methoden der Bioinformatik und der computergestützten molekularen Modellierung soll der Zusammenhang zwischen Sequenz, Struktur und biochemischen Eigenschaften der P450 Monooxygenasen untersucht werden. Auf dem Computer wird modelliert, wie ein Enzym sein Substrat in der Bindungsstelle bindet, und welche Aminosäuren für die biochemischen Eigenschaften verantwortlich sind. Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym können mit der Methode des Dockings untersucht werden. Mit Hilfe dieser Methode können große Substratbibliotheken virtuell in Enzymstrukturen gedockt werden und deren Wechselwirkungen untersucht werden (*virtual screening*). Da für die Erkennung von Substraten durch Enzyme sowohl die Struktur als auch die Flexibilität eine wichtige Rolle spielen, müssen bei der Modellierung die Bewegungen des gesamten Systems simuliert werden. Ein typisches Enzym-Substrat-System besteht zusammen mit dem Lösungsmittel aus 50.000 bis 100.000 Atomen. Um solch große Systeme simulieren zu können, wurde 2002 am Institut für Technische Biochemie ein Höchstleistungscomputer aus 256 PC-CPU's mit einer Spitzenleistung von 785 GFlops aufgebaut (04).

Durch Modellierung von P450 Enzym-Substrat-Komplexen auf dem Computer wird die Selektivität verschiedener P450 gegenüber Substraten und der Einfluss einzelner Aminosäuren untersucht. Aber nicht nur die Substratspezifität, sondern auch die Selektivität der entstehenden Produkte kann modelliert und verstanden werden. Dies ist ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Entwicklung von Medikamenten, da unterschiedliche Reaktionsprodukte verschiedene, teils toxische Eigenschaften haben können. So konnte die unterschiedliche Regioselektivität von CYP2B6 gegenüber Cyclophosphamid und Ifosfamid, Wirkstoffen aus der Krebstherapie, durch Modellierung verstanden werden. Durch den Austausch von Aminosäuren werden die Auswirkungen von SNPs auf die Selektivität einzelner P450 untersucht. Die computergestützte Modellierung ist damit eine Brücke zwischen Proteinstrukturen und ihren Funktionen.

• Sandra Barth
Stephan Tatzel
Jürgen Pleiss

SUMMARY

The enzyme class of P450 monooxygenases plays a major role in the metabolism of xenobiotics like toxic agents or drugs. Although all members of this class catalyse the same reaction type, their substrate and product spectrum varies considerably. In the human genome 60 different P450 genes have been identified. At our institute we investigate by bioinformatics and computer-aided protein modelling methods which binding sites in the protein mediate the recognition of xenobiotics and the formation of product. Such a model explains how for the same drug the different compositions of P450 monooxygenases in two patients lead to a different degradation rate. This model will then be applied to predict the individual degradation rates and degradation products for any xenobiotic.



03

*Struktur des P450 CYP2B4 aus *Oryctolagus cuniculus* (Hase). Im aktiven Zentrum ist das Häm, die prosthetische Gruppe des Enzyms, rot dargestellt.*



04

BioCORTEX Ein PC-Cluster bestehend aus 256 AMD MP1800+ Prozessoren.

DIE AUTOREN

**SANDRA BARTH**

Geboren 1972, studierte nach einer Ausbildung zur chemisch-technischen Assistentin an der Universität Karlsruhe Chemieingenieurwesen, anschließend an der Universität Stuttgart Technische Biologie, wo sie am Institut für Technische Biochemie ihre Doktorarbeit über die systematische Analyse von Sequenz- und Strukturdaten von Proteinfamilien anfertigte. Seit 2005 ist sie in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung von Philips Medical Systems tätig.

**STEPHAN TATZEL**

Geboren 1975, studierte Chemie an der Universität Stuttgart und schloss sein Studium mit einer Diplomarbeit zur Untersuchung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen von Cytochrom P450 Monoxygenasen mittels Dockingsimulationen ab. Seit 2003 promoviert er am Institut für Technische Biochemie auf dem Gebiet der molekularen Modellierung von humanen P450 Monoxygenasen.

**JÜRGEN PLEISS**

Geboren 1959, studierte Physik an den Universitäten Stuttgart und Tübingen und promovierte am Max-Planck Institut für Biologie in Tübingen. Nach einer dreijährigen Tätigkeit als Product Manager bei Biostructure (Strasbourg) baute er seit 1994 am Institut das Gebiet der Bioinformatik in Forschung und Lehre auf und habilitierte sich im Jahr 2001. Seine Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der molekularen Modellierung von Proteineigenschaften und Proteindesign.

Kontakt

Universität Stuttgart
Institut für Technische Biochemie
Allmandring 31
70569 Stuttgart
Tel. 0711/685-3191
Fax 0711/685-4569
E-Mail: itbjpl@itb.uni-stuttgart.de



Technologie Transfer Initiative

Wir sind für Sie da

TTI GmbH
Technologie-Transfer-Initiative GmbH
an der Universität Stuttgart

Wir fördern Existenzgründer
Vertrauen Sie auf unsere Kompetenz

Informationen und Beratung
Qualifizierung und Coaching
Kontakte zu Netzwerkpartnern
Finanzierung über Förderprogramme
Subventionierte Büroräume
Vermittlung von Patenten und Ressourcen
der Universität Stuttgart



Nobelstraße 15
70569 Stuttgart
Telefon: 0711/6868749-0
Telefax: 0711/6868749-19
www.tti-stuttgart.de
info@tti-stuttgart.de

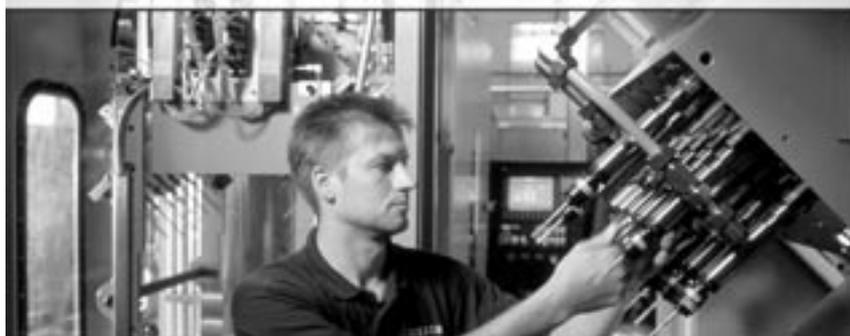


Baden-Württemberg
WIRTSCHAFTSMINISTERIUM

TTI GmbH wird gefördert vom Wirtschaftsministerium Baden-Württemberg -
Initiative für Existenzgründungen und Unternehmensnachfolge (Ifex) mit Mitteln des Europäischen Sozialfonds



Faszination Fortschritt



Die Fa. Gebr. Heller Maschinenfabrik GmbH mit Stammsitz im schwäbischen Nürtingen wurde 1894 als kleiner Handwerksbetrieb gegründet.

Über die Jahrzehnte hat sich das Unternehmen zu einem international agierenden Hersteller von Werkzeugmaschinen und kompletten Fertigungseinrichtungen entwickelt.

In dieser Branche sind wir einer der führenden Hersteller und beschäftigen weltweit rund 2200 Mitarbeiter.

Produktionsstätten in Europa, Nord- und Südamerika gewährleisten die zuverlässige Betreuung unserer Kunden. Darüber hinaus sind wir in allen wichtigen Märkten mit eigenen Sales- und Serviceorganisationen sowie qualifizierten Servicepartnern vertreten.

HELLER

**Gebr. Heller
Maschinenfabrik GmbH**
Neuffener Str. 54, 72622 Nürtingen
Telefon: 07022 77-0
Telefax: 07022 77-610
Email: info@heller.de

www.heller-machinetools.com

Systembiologie als Paradigma der Technik – Technik als Paradigma der Systembiologie?

(Walther Ch. Zimmerli zum 60. Geburtstag)



Paul Klee, Baumkultur, 1927
© VG Bild-Kunst, Bonn 2005

1. Problemlage

Die beeindruckenden Erträge systembiologischer Forschung zu den Funktionsmechanismen biologischer Systeme, insbesondere der Zelle, erwecken berechtigte Hoffnungen, ein besseres Verständnis komplexer biologischer Prozesse fruchtbar zu machen für die Beherrschung technischer Prozesse, die immer komplexer werden. Dies betrifft nicht bloß die Herstellungsverfahren im engeren Sinne (Produktions-/Verfahrenstechnik etc.), sondern auch unsere technologische Kultur insgesamt mit ihren immer komplexer werdenden Systemen der Wandlung, des Transports und der Speicherung von Stoffen, Energie und Information. Angesichts der Störanfälligkeit dieser Systeme, deren Havarien oftmals durch scheinbar „banale“ Faktoren ausgelöst werden, beeindruckt die Robustheit und Leistungsfähigkeit biologischer Systeme, die aufgrund ihrer hierarchischen Regelungsprozesse, ihrer Modularisierung, ihrer sicherheitsverbürgenden Redundanzen sowie äquifunktionaler Diversivität mit den Provokationen ihrer Umwelt fertig werden, ja diese Provokationen selbst beeinflussen und daher für viele die ge-

suchte – überfällige – Konkretisierung des allerorten befürworteten, aber eben kriteriologisch unscharfen Leitbildes „nachhaltige Entwicklung“ abgeben – soweit man sie in Ruhe läßt. Biologische Systeme also als Vorbild für die Architektur und das Management technischer Systeme?

Die menschliche Technik – sieht man sie im Kontrast zum tierischen Werkzeuggebrauch und zur „Zufallstechnik“ (José Ortega y Gasset) der Jäger und Sammler – war und ist immer Systemtechnik. Seit der agrikulturn Revolution (ein Pleonasmus, denn „cultura“ heißt ursprünglich Ackerbau, Pflege der äußeren „natürlichen“ Natur, sogleich dann der inneren Natur unseres Geistes und Handelns) dient ihre Technik nicht bloß der Optimierung des Mitteleinsatzes durch artifizielle Verstärkung, Entlastung oder des Ersatzes natürlicher Mittel (Organe), sondern zugleich auch und gerade der Absicherung und Gewährleistung gelingenden Mitteleinsatzes gegenüber den Widerfahrnissen der Natur, denen die Jäger und Sammler ausgesetzt waren. Zu diesem Zwecke wurde die natürliche Umwelt gestaltet (Ackerbau, Siedlung, Bewässerung, Straßen etc.), genauer: ein Ausschnitt der natürlichen

Umwelt wurde transformiert und in das System aufgenommen, mithin die Grenzen des Systems nach außen verschoben. Dies bedeutete zugleich eine Erhöhung der Binnenkomplexität des Systems, dessen Leistungen (Optimierung und Absicherung des Mitteleinsatzes) nur zu erbringen waren über eine Diversifizierung der Wahrnehmung der Systemfunktionen (Spezialisierung/Arbeitsteilung) sowie den Aufbau zusätzlicher Systemfunktionen zum Zwecke der Relationierung und Koordinierung (Sprache, Schrift/Fernkommunikation, Informationsaustausch) der speziellen Funktionen. Ausgedrückt in der Begrifflichkeit der Systemtheorie finden wir hier bereits die beiden Grundoperationen technischen Handelns angelegt: „Steuern“ als Erzielen von Effekten (Regelgrößen) im Ausgang von Inputs als Stellgrößen, und „Regeln“ als Operation, die den Steuerungsprozess angesichts der Störgrößen der Systemumwelt gelingen lässt, absichert, von ihnen unabhängig macht für die Realisierung der Regelgrößen als Ziele. Auch finden wir bereits in rudimentärer Form die beiden grundlegenden Typen einer solchen Regelung, nämlich die einer vorgeschalteten

„Die menschliche Technik – sieht man sie im Kontrast zum tierischen Werkzeuggebrauch und zur „Zufallstechnik“ (José Ortega y Gasset) der Jäger und Sammler – war und ist immer Systemtechnik.“

höherstufigen Steuerung (der Steuerung) im hierarchischen Aufbau der soziotechnischen Systeme sowie (sozial-institutionalisierte) Mechanismen der Rückkopplung, indem durch Abgleich der Regelgröße mit der Sollgröße der „Regler“ eingestellt wird (hierzu später). Das Führungsverhalten dieser Regelungen dient der Stabilität und der Störunterdrückung, wobei erstere bei starken Störungen, instabilen Systemen oder ungenau bekannten Systemen in der Regel versagt, während letztere aufgrund der Feed-back-Effekte bei deterministisch chaotischen Systemen an ihre Grenzen kommt.

Gerade Martin Heidegger, an dessen Technikverständnis man durchaus Zweifel anmelden kann, hat dies allerdings völlig richtig gesehen. Als Grundzug abendländischen Denkens (welches er kritisiert) stellt er heraus, dass die Widerfahrnisse beim technischen Handeln dazu führen, dass uns Gegenstände ersichtlich werden, sich ein vorstellender Weltbezug etabliert, in dessen Rahmen das „rechnende Denken“ darauf aus ist, (nun bewusst) zu „steuern“ und zu „sichern“ (d.i. zu regeln). Der symptomatische Irrtum jedoch, der die gesamte abendländische Technikphilosophie – mit Ausnahme der Stoa – bis zur Aufklärung hin begleitet, tritt bei ihm auch deutlich zu Tage: Erst die „moderne Technik“ sei eine, innerhalb derer jene beiden Operationen im „Gestell“ (seine Übersetzung für „System“) stattfänden. Hier werde – in spezifischer Weise – die Natur „gestellt“, „herausgefordert“, was er insbesondere an der Energiebereitstellung verdeutlicht, und in dem „Versammelnden dieses Stellens“ werde auch der Mensch insofern herausgefordert, als der somit gegebene „Bestand“ als Inbegriff der technischen Mittel dem Menschen nicht mehr als (disponibler) „Gegenstand“ gegenüber tritt, sondern der Mensch „Teil“ dieses Bestandes ist, auf ihn angewiesen ist, sofern er die Sorge um sein Dasein nicht aufgeben will. Das ist eine Formulierung der allgemein geteilten These, dass der Mensch der „Herrschaft“ seiner Mittel unterliege (Jacques Ellul u.v.a.), Teil des Reproduktionsmechanismus des technischen Systems ist – womit wir wieder bei der Biologie, hier: einem problematischen „Biologismus“, wären. In Gang gesetzt wurde dieser Prozess – wie gesagt – durch einen technologischen Weltbezug, wie ich ihn bezeich-

ZUSAMMENFASSUNG

Der Beitrag analysiert die philosophischen Implikationen der modernen Systembiologie unter der Leitfrage, in welcher Hinsicht biologische Systeme als Vorbild für die Architektur und das Management technischer Systeme gelten können. Zunächst wird die Problemlage durch eine Skizze der Entwicklung des Systembegriffs in der philosophischen Tradition im Verhältnis zum jeweiligen Stand der Wissenschaften und der Technik entfaltet. Es zeigt sich, dass menschliche Technik und Kultur vom Prinzip her immer schon als Systemtechnik zu verstehen ist, und dass die Prozesse des Steuerns und Regels nicht nur die basalen Prozesse der Technik, sondern auch der Naturwissenschaft sind. In dieser Hinsicht ist die wissenschaftliche und philosophische Hinwendung zu den Prozessen, Verfahren und Steuerungsmöglichkeiten in der molekularen, biologischen, technischen und kulturellen Welt unverzichtbar für das Verständnis dieser Systeme. Den Gefahren eines kruden Naturalismus und Mechanismus hat sowohl die philosophische Tradition als auch die Wissenschaftstheorie mit der Theorie der offenen Systeme entgegengearbeitet. Der Autor zeigt, dass auch die moderne Systembiologie nicht unter das Verdikt des naturalistischen Fehlschlusses fällt, da sie den biologischen Systemen keine Ziele ablauschen oder unterstellen will. Ihre Intention zielt vielmehr auf die komplexen Mittel und Kriterien, mit denen die Systeme organisiert sind, um die Prozesse effektiv, effizient und stabil zu halten. Damit komme die Systembiologie sowohl dem modernen Paradigma einer nachhaltigen Technik als auch den frühen Intentionen von „Technik“ nahe.

ne, welcher alle Widerfahrnisse der Natur als technisch lösbare Probleme im Felde disponibler Gegenstände begreift.

Ein weiteres hat Heidegger – wohl auch unter dem Einfluss der Gespräche mit prominenten Physikern seiner Zeit – richtig erfasst: Die Prozesse des Steuerns und Regeln sind nicht nur die basalen Prozesse der Technik, sondern auch der Naturwissenschaft. Das naturwissenschaftliche Experiment ist ein Steuerungsprozess, einer „Praxis, die Theorie heißt“ unter „Methoden als nützlichen Maschinen“ (Edmund Husserl) – gegenständlich gestützt, algorithmisiertem gedanklichen Vorgehen.

„Die Prozesse des Steuerns und Regeln sind nicht nur die basalen Prozesse der Technik, sondern auch der Naturwissenschaft.“

Dieser Steuerungsprozess ist dahingehend reguliert, dass die Versuchsanordnung darauf aus ist, eine Unabhängigkeit von Störgrößen (durch Isolierung, Unterdrückung, Kompensation dieser Größen) zu erzielen, eben eine Stabilität der Steuerung und ihre Wiederholbarkeit – Definition des gelungenen Experiments wie gelingender Technik – zu erreichen. Technik als Wissenschaft ist nicht „angewandte Naturwissenschaft“, wie Heidegger hervorhebt, sondern beide richten sich auf das, was (wiederholbar) „sein kann“ (Ernst Cassirer): Seien es mögliche Inputs für gesetzte Outputs oder mögliche Outputs bei gesetzten Inputs. Ihre gemeinsame Wurzel ist der realtechnische Eingriff in die Natur.

Aber trifft dies nicht erst für ein Denken in Galileischen Paradigma oder einer „Leonardo-Welt“ (Jürgen Mittelstraß) zu? Ist dies nicht doch ein Spezifikum moderner Wissenschaft und moderner (System-) Technik als „Gestell“? Hatte Heidegger doch recht, und finden wir hier nicht den wahren Kern der (problematischen) kulturpessimistischen Technikphilosophie? Ja und nein – die Sachlage ist komplizierter.

2. Der Systembegriff im Wandel der Technikphilosophie

Wie bereits erwähnt, findet sich im technikphilosophischen Denken der älteren Tradition ein Ansatz, der erstens eine adäquate Einschätzung der realen Technik (als Material-, Intellektual- und Sozialtechnik) verhinderte (und von Heidegger u.a. aufgenommen wurde), und der zweitens Technik *neben* einer theoretisch ausgerichteten Wissenschaft verortete, so dass mit Leonardo und Galilei die neue Wissenschaft erst etwas einholen und integrieren musste, was in Gestalt realer Technik bereits durchaus entwickelt war, nur eben nicht in einer adäquaten wissenschaftlichen *Deutung* dieser Technik. Man ging vom Handeln aus, präzisiertere Handeln als Einsatz von Werkzeugen zwecks Verfertigung von Gütern des alltäglichen Gebrauchs (einschließlich der Kunst) und verfehlte damit von vorneherein denjenigen Bereich der Technik, der – s.o. – als *cultura* ein *System* der Absicherung darstellte, das bereits ganz erheblich auf die Umwelt wirkte und diese nutzte (Rodung, Züchtung, Bergbau) mit einschlägigen ökologischen Folgen (Georg Agricola). Ferner fiel nicht in den Blick, dass seit der Antike Maschinen – wenn auch quantitativ nicht repräsentativ – eingesetzt wurden (Nutzung von Wind und Wasserkraft sowie Verbrennungsenergie), so dass die Charakterisierung erst der modernen Technik als Maschinenteknik zwar ihre Berechtigung in quantitativen Sinne hat sowie bezüglich eines spezifischen Typs der Bereitstellung und Nutzung von Verbrennungsenergie in Arbeits- und Werkzeugmaschinen, nicht jedoch prinzipiell.

Die mythischen Bilder der Entstehung von Technik bei Hephaistos, Prometheus, Herakles, Athene und Odysseus sind da trefflicher und zeigen das breitere Spektrum: Athene steht für die Technik des „Webens“ (Zusammenfügen, Wortwurzel τεκ) von Rohstoffen, Zeichen (nach Pindar) und Sozialbeziehungen/Arbeitsteilung (Orestie), wobei zum einen nützliche Produkte und Zustände entstehen, sie zum anderen aber eben dadurch und darüber hinaus Sorge dafür trägt, Unabhängigkeit von den Einflüssen (Gefahren und Verlockungen) der unmittelbaren Natur zu gewährleisten. Dabei finden wir im Kleinen wie im Großen Steuerungs- und Regelungsprozesse, und wir finden regelmäßig die Klage der-

jenigen, die sich in das „Gestell“ mit seinen Herausforderungen nicht fügen wollen und dies in vergangenheits- oder zukunfts-zentrierten Utopien (letztere positiv oder negativ) oder im Hang zur arkadischen Idylle artikulierten. Weitere Pointen sollten nicht unerwähnt bleiben: Prometheus wurde nicht von den Göttern gestraft, weil er den Menschen die Kunst der Medizin, der Mathematik, der Navigation und der Weissagung gebracht, sondern auch und gerade die des Bergbaus und der Feuerkunst sowie die der Bearbeitung von Metall (Aischylos). Und sein Befreier Herakles letet den Fluss um zwecks Reinigung der Ställe der Augias. Was sich hier ausdrückt, ist die Loslösung von einer natürlichen Ordnung, die ihre Ressourcen (Holz, Wasser, Wind etc.) gemäß den „Launen der Götter“ bereitstellt – Technik als „Kontingenzmanagement“ (Niklas Luhmann). Ihren Triumph feiert diese Technik allerdings erst im Zuge der industriellen Revolution, dem Abschied von der „Holz- und Wasserwirtschaft“ (Lewis Mumford, Phyllis Deane) qua Erschließung neuer Energie- und Rohstoffvorräte, nicht mehr solchen, von deren Regenerationsmodus man abhängig war. Bergbau und Artifizialisierung von Ausgangsstoffen waren die Grundlage für die Freisetzung eines Potentials „endlos erweiterbarer“ Mittel für neue Zweckbindungen – diesen „Frevel“ haben die alten Götter erkannt. Nach Norbert Wiener ist dies die einzige technische Revolution (die zweite wäre die der Ersetzung menschlicher Intelligenz).

„Bloße Wissenschaft oder bloße Erfahrung sind nicht hinreichend für technisches Gelingen; systemtheoretisch: bloße Steuerung oder bloßes (regelndes) Feed-back laufen, jeweils für sich, ins Leere.“

In der Technikphilosophie – die ja nicht eine Disziplin darstellt, vielmehr das jeweilige philosophische Weltverständnis für die Analyse eines bestimmten Umgangs mit der Welt geltend macht – findet sich der Wandel des Technikverständnisses, das seine

Provokationen in der realtechnischen Entwicklung findet. Die Einsichten des Mythos waren verdrängt, überboten von einem spekulativen Philosophieren, das bis zum Humanismus und der Aufklärung der Technik nicht gerecht werden konnte. Aber selbst in der Antike mit ihrer Einschränkung auf die Technik des Werkzeuggebrauchs und des Herstellens finden wir zwei Impulse unterschiedlicher Art: Aristoteles (wer sonst?) verweist auf das menschliche Spezifikum der Hand als nicht festgelegtem Steuerungsorgan (kinesis) spezialisierter komplexer Werkzeuge (als kleinen Systemen, die die entsprechenden Gegenstände und Zustände realisieren), „ablegbaren Teilen“ unseres Körpers als höherstufigem, „anpassungsfähigem“ Organ, das zudem diese Teile adäquat bereithalten und bevorraten (Regelung) und seinerseits nur in höherstufigen Koordinationszusammenhängen (als zoon politikon) leben kann (de generatione animalium). Technik bedarf des Wissens um die Gründe ihres Tuns (Episteme/Wissenschaft), die sie aus der Kenntnis der Natur bezieht sowie der Erfahrung (Emperia), aus der sie die Informationen über die notwendige situative Anpassung erhält. Bloße Wissenschaft oder bloße Erfahrung sind nicht hinreichend für technisches Gelingen; systemtheoretisch: bloße Steuerung oder bloßes (regelndes) Feed-back laufen, jeweils für sich, ins Leere.

Ferner wurden –in anderer Hinsicht – die Überlegungen der Stoa traditionsbildend: „Technik ist das System von Unterweisungen und Fertigkeiten gemäß ihrer Nützlichkeit für das Leben insgesamt“ (Zenon, Lukian) – hier erscheint explizit der Terminus „System“, der erst später wieder im Humanismus und Rationalismus aufgenommen wurde – Lukian wurde geradezu paradigmatisch zitiert (von Petrus Ramus, Philipp Melanchthon, Bartholomäus Keckermann, Clemens Timpler, Johann Heinrich Alstedt über Gottfried Wilhelm Leibniz bis hin zu Christian Wolff). Freilich verschob sich der Akzent zunächst hin zu den Intellektualtechniken, dann über die Charakterisierung ihrer Gründe „ex physica“ in eine Auffassung der Technik als „große Maschine“ (Gottfried Wilhelm Leibniz). Gemeinsam ist die Betonung des notwendigen inneren Zusammenhangs, der das System konstituierenden verbindenden Kräfte (Johann Heinrich Lambert), der ein System von einem bloßen „Aggre-

gat“, das eines solchen Ordnungsprinzips ermangelt, unterscheidet (Keckermann, Immanuel Kant). Ein im heutigen Sinne „technisches Aggregat“ ist ein System. Die Idee eines technischen Systems als Megamaschine wurde leitend für Lewis Mumford.

Es scheint, als seien wir weit von unserem Thema abgekommen. Ist doch jetzt in einem allgemeinen Sinne von Technik die Rede oder von einem mehr oder weniger problematischen Technikverständnis, nicht aber von der Technik i.e.S. als Prozesstechnik (Verfahrenstechnik, Biosystemtechnik) mit ihrer Sensor-, Signalübertragungs- und Regeltechnik, die etwa von der Systembiologie lernen kann. Allerdings sind verfahrenstechnische Prozesse – von denen her sich übrigens der moderne Technikbegriff als spezifische Benennung historisch ableitete (nicht von „ars“ oder „techne“) – ja ihrerseits solche eines Systems, das Subsystem größerer realtechnischer Systeme ist, die ihrerseits soziotechnisch eingebettet sind. Auch mussten – und müssen – wir weiter ausholen, um die eigentümliche Karriere philosophischer Systemkonzepte und ihre Annäherung an die Biologie nachvollziehen zu können.

Für Immanuel Kant, der noch einen „Newton des Grashalms“ vermisste und glaubte, dass es einen solchen nicht geben könne, schien es nur zirkulär begründbar, der Natur entweder die „technica intentionalis“ eines organisierenden Wesens beizulegen (einer auf Zweckmäßigkeit ausgerichteten „Weltseele“) oder eine „technica rationalis“ als Notwendigkeit der Naturscheinungen, deduziert aus einem „hyperphysischen“ Grund (wie Baruch de Spinoza). Gleichwohl war die Annahme einer „Technik der Natur“ für ihn ein notwendiges heuristisches Prinzip, eine als-ob-Vorstellung einer ökonomisch rational handelnden Instanz, welche unverzichtbar ist, wenn wir (in mathematischer Modellierung) ihre Mechanismen erforschen wollen. Denn andernfalls – wenn wir der Natur spielerische Ausreißer und Willkür konzedierte – hätten wir keinerlei Kriterien, die uns veranlassen, unsere Erkenntnisse in einem System zusammenzuführen, Theorien unter das Ideal einer Einheit zu stellen, ja nicht einmal eine simple Fehlerrechnung wäre möglich. Nur unter der Idee eines „Technizismus“ und des Mechanismus als dessen „Mittel“ (man ist an Albert Einsteins „Gott würfelt nicht“ erin-

ner) sei Naturwissenschaft möglich.

Ansonsten erhielten wir ein bloßes Aggregat von Regelmäßigkeiten auf induktivem Wege nach Maßgabe beliebig möglicher Abstraktionen (wie es ja manchen Typ „alternativer Wissenschaft“ auszeichnet). Dieses Konzept einer Einbettung des Mechanismus in einen Technizismus leitete die Systembegriffe des Idealismus bis hin zu Hegel, wobei „Notwendigkeit“ und „Vollständigkeit“ aller Elemente und ihrer internen Relationen letztlich das „absolute“, unbedingte System definieren. Dieser Anspruch als Idee von Wissenschaft überhaupt bedingt, wie wir die Welt als uns gegebene erschließen, bestimmen und gestalten und uns in dieser Gestaltung als Subjekt/„Geist“ entfalten.

War somit zwar ein „technomorpher“ Weltbezug radikal zu Ende gedacht, so war doch diese erkenntnistheoretisch plausible Pointe für die an der Biologie orientierten Philosophien unbefriedigend. Ihre Probleme gründeten gerade im Festhalten am Mechanismus, der eben dadurch seine Defizienzen erwies: Einen Organismus als rein materielles System zu begreifen, maschinenanalog, könne nicht die „prospektive Potenz“ der Formbildung erklären, wie sie in den „komplex äquipotentiellen Systemen“ angelegt sei (d.h. nach Zerstückelung, Umstellung oder Neukombination der Teile wieder komplette Systeme zu bilden) und das lernfähige Agieren der Systeme sei nur über „harmonisch äquipotentielles“ Zusammenwirken der Signalflüsse erklärbar. Beides verweise auf eine systemkonstitutive „Lebenskraft“ als „organischer Kausalität“, eine „ganzmachende Kraft“ – hologen (aus der Ganzheit), nicht mero-gen (aus den Teilen resultierend) – als „Insertion“, wie die Vitalisten (Hermann Diersch, Wilhelm Ostwald) postulieren zu müssen glaubten. Diese Kraft ist sozusagen die oberste Regelung (Ostwald), die oberste Ausgleichsinstanz für systemgefährdende „Intensitätsdifferenzen“ jeder Art.

Die Antworten auf diese philosophische Verzweiflungstat kamen aus der Biologie, der Kybernetik sowie physikalischen Untersuchungen zur Entstehung geordneter Strukturen (Synergetik) selbst: Nicht ein Festhalten am Mechanismus, sondern am Organismus als geschlossenem System bedingt diese Probleme. Eine Theorie offener Systeme, die mit ihrer Umgebung nicht nur Energie, sondern auch Stoffe austauschen und von einer Thermodynamik

nicht modelliert werden können, die nur Übergänge von einem Gleichgewichtszustand in einen anderen thematisiert, analysiert biologische Prozesse (Stoffwechsel, Regeneration) unter dem zeitunabhängigen und nur durch Transport- und Produktionsgrößen bestimmten „Fließgleichgewicht“ mit Entropieänderung 0 (so zunächst Ludwig von Bertalanffy). Fließgleichgewichte als „primäre Regulative“ werden ihrerseits von sekundären „homöostatischen“ Regulationen überlagert, die den stationären Zustand des Organismus – qua Rückkopplung – aufrecht erhalten, aber Regenerations- und Adaptionsfähigkeit zugunsten besserer „Systemleistung“ einschränken. Wir finden hier bei Bertalanffy bereits den Befund, der später von manchen soziologischen Systemtheoretikern aufgegriffen wurde: die Schere zwischen Optimierung der Systemfunktionen und Adaptionsfähigkeit (Beispiel Bürokratie!). Doch was heißt „Systemleistung“? Jedenfalls war gezeigt – trotz mancher Irrtümer –, dass Organismen begriffen als offene Systeme qua Aufnahme der Negentropie (Erwin Schrödinger) nicht, wie die Vitalisten unterstellten, unter physikalischen Gesetzen nicht verstehbar seien. Zugleich wurde – manche Philosophie korrigierend – ersichtlich, dass eine Einteilung nach geschlossenen oder offenen Systemen davon abhängt, wie weit ein geeigneter Umweltausschnitt einbezogen wird oder nicht. Systeme existieren also nicht absolut, sondern qua Festlegung der Systemgrenzen und sind überdies, was die Modellierung unter stationären oder Fließgleichgewichtsgesichtspunkten betrifft, von der beobachteten Geschwindigkeit der Systemprozesse relativ zur Beobachtungsdauer und -geschwindigkeit abhängig (schnelle molekulare Prozesse → stationäre Zustände, langsame höherstufige Prozesse → dynamische Zustände).

Die Analyse von Gleichgewichtszuständen und stabilen, instabilen oder neutralen Zustandsfolgen („Zyklen“) wurde zum Thema der Kybernetik (W. Ross Ashby u.a.), die Kopplungs- und Rückkopplungsprozesse zwischen Systemen und ihren Subsystemen modelliert und in einer Fülle von Ansätzen ausdifferenziert ist. Generell geht es um die Abbildungsfunktionen von Variablen (Größen zur Beschreibung eines Systemzustandes) eines (Sub-)Systems A auf die Parameter (Größen zur Beschreibung des Systemverhaltens) eines (Sub-)

Systems B und umgekehrt in der Hoffnung, durch die angemessene Auswahl der Variablen prognosefähige Modelle zu erhalten. Philosophisch interessant ist hierbei die Untersuchung verschiedener Konzepte von Regelung in ihrem Verhältnis zur Steuerung, denn der Sprachgebrauch ist keineswegs einheitlich. Mit Gesetzmäßigkeiten der Entstehung und Erhaltung geordneter Strukturen in physikalischen, chemischen und biologischen Systemen, die daran gehindert werden, sich auf den Gleichgewichtszustand hinzubewegen, befasst sich die Synergetik (Hermann Haken). Nichtgleichgewichte können zur Quelle von Ordnung werden (was von einem Boltzmannschen Standpunkt aus nicht zu verstehen ist, da dort die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer korrelierten Bewegung einer großen Zahl von Molekülen als gegen Null tendierend erachtet wird). Je nach Randbedingungen werden Selektionen nach Maßgabe des optimalen Energieaustauschs der konkurrierenden Ordnungsparameter realisiert, und

„Dabei ist eben nicht mehr erforderlich, die Entstehung von Ordnungsstrukturen als Folge externer unwahrscheinlicher Anfangsbedingungen anzunehmen

...“

der daraus hervorgehende dominante Ordnungsparameter prägt dem anderen ein bestimmtes Verhalten auf. Solche Selbstorganisationsprozesse in offenen Systemen unter gleichgewichtsfernen Bedingungen finden sich im chemischen und biologischen Bereich, sofern dort autokatalyti-

SUMMARY

The article analyzes the philosophical implications of modern system biology: can biological systems be a valid example for the architecture and the management of technical systems? At first the author outlined the concept of system in the philosophical tradition in relation to the respective development of science and technology. He shows that human technology and culture from the principle is already systems engineering, and that the processes of control and regulation are not only the basic processes of technology but also of natural sciences. This scientific and philosophical turn is inalienable in regard to the processes, methods and controls in the molecular, biological, technical and cultural world for the understanding of these systems. The philosophical tradition and the sciences developed a theory of open systems against the dangers of a crude naturalism and mechanism. The author shows that modern system biology doesn't fall under the verdict of the naturalistic false conclusion because it is not looking for hidden aims in biology. The intention aimed rather at the complex means and criteria which the systems used to keep the processes effective, efficient and stable. System biology therefore gets close to both the modern paradigm of a sustainable technology and the early intentions of „technology“ with that.

sche Reaktionsschritte existieren. An bestimmten Punkten der kinetischen Gleichungen sind mikrophysikalische Schwankungen nicht mehr vernachlässigbar; sie werden für das „Wahlverhalten“ des Systems an solchen Verzweigungspunkten (Bifurkationen) maßgeblich und lassen nur noch eine probabilistische Beschreibung zu, die bedeutsame Abweichungen von einer probabilistischen Theorie des Gleichgewichtszustandes aufweist. Die Übergangswahrscheinlichkeiten werden zu nicht-linearen Funktionen der stochastischen Variablen und sind nicht mehr durch deterministische Bewegungsgleichungen für makroskopische Variablen beschreibbar. Schwankungen können verstärkt werden und das System in einen neuen Zustand treiben. Solche Oszillationsprozesse finden wir in der Populationsdynamik (Raubtier-Beute) und in der Evolution qua Verstärkung oder Abschwächung von Mutationen je nach Randbedingungen, ja auch in präbiotischen evolutionären Prozessen (Manfred Eigen), wo konkurrierende Hyperzyklen der wechselseitig katalytischen Verbindung von Protein- und Nukleinsäuremolekülen nach Maßgabe der Randbedingungen selektiert werden. Der Anspruch dieses Ansatzes ist, auch die Herausbildung geographischer, wirtschaftlicher und sozialer Strukturen auf dieser Basis zu verstehen. Dabei ist eben nicht mehr erforderlich, die Entstehung von Ordnungsstrukturen als Folge externer unwahrscheinlicher Anfangsbedingungen anzunehmen (Jacques Monod), sondern die Physik der Selbstorganisation vermag den Gegensatz „Boltzmann – Darwin“ aufzuheben und unter Nachweis „dissipativer Strukturen“ (Ilya Prigogine) die Herausbildung komplexer Ordnungsstrukturen des Lebens unter neuen Gesichtspunkten zu betrachten. Diese Erträge sind nicht nur naturphilosophisch, sondern auch technik- und kulturphilosophisch relevant.

3. Naturalismus – Eine Begründungsbasis oder Herausforderung der Philosophie?

Angesichts der in aller Kürze beschriebenen Problemtradition ist nun derjenige, der in der Systembiologie orientierungsstiftende Anhaltspunkte für die Technikgestaltung sucht, einem irritierenden Befund ausgesetzt: Zeigte eine Hauptlinie des klassi-

schen philosophischen Nachdenkens über Technik, dass „System“ Resultat eines modellierenden Zugriffs auf die Welt in technischer Absicht ist, der Systemgrenzen „festsetzt“, Parameter „auswählt“ und deren Adäquatheit operativ testet an der Validität der Prognostizierbarkeit des Systemverhaltens unter *pragmatischen* Kriterien, so verweist eine philosophierende Biologie und Physik auf *objektive* Befunde, aus denen Technik und Handeln überhaupt ein neues Selbstverständnis und gegebenenfalls die Basis ihrer normativen Ausrichtung gewinnen sollten. Das hat ihr seitens der Philosophie den Vorwurf des „Naturalismus“ bzw. eines naturalistischen „Reduktionismus“ eingetragen und zu den erbitterten Abwehrschlachten geführt, wie wir sie gegenwärtig auch auf dem Felde der Neurophysiologie (Gerhard Roth, Wolf Singer) und der Evolutionsbiologie (Ernst Mayr) beobachten können. Denn die Verfechter jenes naturwissenschaftlich orientierten Philosophierens fordern ja gerade mit Blick auf ihre molekularbiologischen Befunde, die unstrittig sind, dass wir unser Verständnis von bewusstem Handeln, Technik und Kultur auf eine neue Basis zu stellen hätten. Auf den ersten – und als falsch erweisbaren – Blick scheint der Vorschlag, die Leittechnik großer technischer Systeme an Regulationskonzepten biologischer Systeme zu orientieren, in dieselbe Richtung zu gehen. Dem ist aber mitnichten so, und das spricht für den systembiologischen Vorschlag.

Betrachten wir aber zunächst die erwähnten, öffentlichkeitswirksam ausgetragenen Kontroversen und ihre Erträge: Von einem Beobachterstandpunkt aus (Naturalismus) ist gezeigt, dass im molekularbiologischen Bereich bestimmte Determinationen nachweisbar sind, die wirksam werden, bevor ein Handeln uns als solches bewusst wird (Neurophysiologie). Oder es wird seitens der Evolutionsbiologie darauf verwiesen, dass die Möglichkeiten des Gelingens/Misslingens individueller oder kollektiver Vollzüge in der natürlichen Verfasstheit des Evolutionsgeschehens vorgeben sind. Unser – kulturkonstitutives – Selbstbewusstsein und die hiermit verbundene Selbstzuschreibung von Verantwortung wären dann bloße Ideologie. Freilich wird hier – aufgrund zweier Denkfehler (denen die Systembiologie nicht unterliegt, s.u.) – das Kind mit dem Bade ausgeschüttet: Der erste besteht in der Verwechslung des Be-

obachterstandpunktes mit dem subjektiven Standpunkt („Ich-Perspektive“), unter dem wir uns zu bestimmten Sachverhalten in einen Bezug setzen. Dass wir, wie bereits

„Die ‚Deterministen‘ können nicht aufweisen, was sie dazu determiniert, die kulturell entstandene Komplexität unserer Handlungsmodellierung auf diejenigen unmittelbaren (molekularen) Determinationsketten zu reduzieren, die eine Aktion auslösen.“

Georg Wilhelm Friedrich Hegel bemerkte, „eine Handlung erst aus der Tat kennen lernen“, ist ja gerade dadurch bedingt, dass wir „irgendwie anfangen“ und dann sehen müssen, was unter materiellen Bedingungen aus unserem Plan geworden ist. Entsprechend nehmen wir unsere Verantwortungszuschreibungen vor, ex post, gerade indem wir dem Subjekt zugute halten beziehungsweise anlasten, was im Vorfeld der Handlung vorlag und dazu geführt hat, dass in diesem Subjekt sich die entsprechende Handlungsdisposition etablieren konnte.

Die Arbeit eines Bewusstseins an ihm selbst als komplexer Prozess der Herausbildung von Präsentationen und Repräsentationen ist gerade die Kulturleistung, die Systeme herausgebildet hat, innerhalb derer Determinationsprozesse ihrerseits reguliert werden. Sie ist also zunächst einmal Voraussetzung dafür, dass individuelle Aktionen determiniert sein können. Zu dieser Kulturleistung gehört aber auch und gerade, dass wir individuelle Aktionen, deren determinierender Hintergrund nicht völlig offen liegt, einer Kausalität „aus Freiheit“ (Kant) des handelnden Subjekts zuschreiben. Auf diese Weise nämlich wird die Nötigung ausgesprochen, diejenigen höherstufigen Gründe geltend zu machen, die als Regulative des Handelns (Ideen, Werte, Normen) in der Kultur repräsentiert sind und gegebenenfalls beim handelnden Subjekt nur „unzureichend“ repräsentiert

waren, was zur moralischen Kritik führt. Dass wir so tun „müssen, *als ob* wir frei sind“, ist darin begründet, dass „selbst der hartnäckigste Skeptiker oder entschlossene Fatalist, wenn es zum Handeln kömmt“, gestehen müsse, dass er nicht weiterkommt, wenn er sich auf die These der Determiniertheit des Handelns beruft, eben weil er eine (mögliche) Determination der determinierenden Gründe seines Handelns nicht kennen kann (Kant). Er kann sie nur anerkennen (oder nicht), und das ist ein Akt subjektiver Freiheit, zu dem wir „von der Kultur“ verurteilt sind. Weitergedacht: Die „Deterministen“ können nicht aufweisen, was sie dazu determiniert, die kulturell entstandene Komplexität unserer Handlungsmodellierung auf diejenigen unmittelbaren (molekularen) Determinationsketten zu reduzieren, die eine Aktion auslösen. Ein graduelles Unabhängigwerden von der Natur – die technische Systemleistung – hat uns in einen Zustand der „Mittelbarkeit“ (Helmuth Plessner) versetzt, die uns zwingt, mittels Repräsentationen mit Repräsentationen umzugehen. Kein System von Repräsentationen kann sich mit eigenen Mitteln vollständig beschreiben (Kurt Gödel) – geschweige denn begründen.

Der zweite Denkfehler liegt in der Hoffnung, aus der Erklärung und Analyse von Systemen irgendwelche normativen Kriterien für die Ausrichtung der erwähnten „Anerkennung“ (aus Freiheit) zu gewinnen. Das ist der „naturalistische Fehlschluss“, wie ihn David Hume oder George E. Moore kritisiert haben. Umgekehrt würde eine Suche nach Normen, die Normen begründen sollen, warum wir etwas für gut halten *sollen*, in einen unendlichen Regress führen. Oder wir landen bei inkonsisten-

„Angesichts dieser Problemlage ist nun der Impetus der Systembiologie aus zwei Gründen völlig unverdächtig, ja vielmehr zielführend und aussichtsreich.“

ten Forderungen nach einer „Hebammenkunst“ bzw. -technik (polemisch hierzu Karl Raimund Popper), die nur kunstvoll fördert bzw. sich dem anpasst, was sowieso

geschieht. Ausgeprägt findet sich diese Haltung bei Evolutionsethikern, die über eine humanistisch geprägte Lenkungsstrategie von Evolutionsprozessen nachdenken, die doch ihrerseits als dissipative Strukturen erhellt sind (Erwin Lazlo). Angesichts dieser Problemlage ist nun der Impetus der Systembiologie aus zwei Gründen völlig unverdächtig, ja vielmehr zielführend und aussichtsreich. Denn die Systembiologie debattiert nicht über irgendwie der Biologie des Verhaltens oder biologischer Evolution unterstellte und abgelauchte Ziele, sondern über (komplexe) *Mittel* bzw. *Kriterien*, denen die *Mittelgestaltung* unterliegt, sofern die Prozesse effektiv, effizient und eben abgesichert (stabil, reproduktiv etc.) ablaufen sollen – die Ur-Intentionen von „Technik“.

Dass wir uns, was die Gestaltung von Mitteln betrifft, an den von uns modellierten Naturgesetzlichkeiten zu orientieren haben, ist von Aristoteles über Francis Bacon (*natura non nisi parendo vincitur*) bis zu Hegel („wir unterliegen der Macht äußerer Mittel“) klar. Der Horizont wird freilich dahingehend erweitert, dass nicht molekular determinierte Prozesse per se, sondern ihre Einbettung in die regulatorischen Prozesse auf den verschiedenen Ebenen der Signalverarbeitung und des Stoffwechsels offener Systeme untersucht wird. Die Validität von Mitteln kann somit relativ zu Funktionen besser verstanden und bewertet werden.

Zugleich entspricht die modernste systembiologische Forschung der Einsicht, dass Technik nicht systembiologischen Forschungsergebnissen nachgeordnet, sondern in einem wechselseitigen Konstitutionszusammenhang aufgrund ihrer analogen Ausrichtung (s.o.) verbunden ist: Wenn in „virtuellen biologischen Laboren“ experimentiert wird, wird gerade der Horizont rein molekularbiologischer Sicht überschritten und die Leistungsfähigkeit derjenigen Regelungsparameter eruiert und getestet, die verhindern, dass das Zusammenwirken der Vielzahl kaum zu überschauender reaktionskinetischer und thermodynamischer Parameter mit ihren Veränderungen im Chaos endet. Jene höherstufigen „Schlüsselparameter“, die für die ganzheitlichen Verhaltensmechanismen der Systeme maßgebend sind, können in der Tat die technische Gestaltung anderer komplexer Systeme orientieren bis hin zur Diskussion einer „nachhaltigen Entwicklung“, ohne dass hier ein „Naturalismus“ oder ein „Reduktionismus“ vorzuwerfen wäre. Genauso wären aus den Erträgen der Neurophysiologie und der Evolutionsbiologie – die ihrerseits aus der Systembiologie viel lernen könnten – Orientierungen für die Gestaltung von technischen *Mitteln*, ihrer Leistungsfähigkeit und den Voraussetzungen der Zumutbarkeit ihres Einsatzes zu gewinnen.

Christoph Hubig

DER AUTOR



PROF. DR. CHRISTOPH HUBIG

Geboren 1952, Studium der Philosophie in Saarbrücken und an der TU Berlin, 1976 Promotion (*Dialektik und Wissenschaftslogik*, Berlin 1978), 1983 Habilitation (*Handlung – Identität – Verstehen*, Weinheim 1985). Professuren für Praktische Philosophie/Technikphilosophie in Berlin, Karlsruhe und Leipzig. Seit 1997 Professor für Wissenschaftstheorie und Technikphilosophie an der Universität Stuttgart, dort Prorektor von 2000–2003. Vorsitzender des Bereichs „Mensch und Technik“ des Vereins Deutscher Ingenieure (VDI) 1996–2002, Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Philosophie; Kurator und Leiter des Studienzentrums Deutschland der Alcatel SEL-Stiftung und Honorarprofessor an der University of Technology Dalian/China. Neuere Veröffentlichungen u.a.: *Technik- und Wissenschaftsethik* (2. Aufl. 1995), *Technologische Kultur* (1997), *Mittel* (2000); (Hg. u.a.): *Ethik institutionellen Handelns* (1983), *Funkkolleg Technik: Einschätzen – Beurteilen – Bewerten* (1996), *Dynamik des Wissens und der Werte* (1996), *Nachdenken über Technik* (2000), *Unterwegs in die Wissensgesellschaft* (2000), *Ethische Ingenieurverantwortung* (2002).

Kontakt

Universität Stuttgart, Institut für Philosophie, Seidenstr. 36, 70174 Stuttgart
Tel. 0711/121 2491, Fax 0711/121 3657

E-Mail: sekretariat@philo.uni-stuttgart.de, Internet: www.uni-stuttgart.de/philo