

Systembiologie von *Bacillus subtilis*

# Mehrere Teile führen zum Ganzen

■ Um biologische Organismen in ihrer Gesamtheit verstehen zu können, arbeiten Wissenschaftler verschiedener Fachrichtungen zusammen. Zwei Gruppen aus Greifswald und Stuttgart versuchen gemeinsam, dem Mikroorganismus *Bacillus subtilis* näher zu kommen. *Laborjournal* begleitet sie bei der praktischen Arbeit.

Wie sieht systembiologische Forschung aus? Der Begriff existiert schon seit Jahren durch Universitäten und Forschungsinstitutionen. Ist es ein neuer Zweig der Biowissenschaften oder doch nur Altes in neuer Verpackung?

Wer könnte diese Frage besser beantworten als Wissenschaftler, die an einem „typisch“ systembiologischen Projekt arbeiten? Ein solches ist die vom BMBF geförderte transnationale Initiative SysMo (Systembiologie der Mikroorganismen). Deutschland, Österreich, England, die Niederlande, Spanien und Norwegen, sowie die Schweiz und Frankreich als assoziierte Partner, haben elf Forschungsprojekte zur Systembiologie der Mikroorganismen initiiert.

## Projekt BaCell-SysMO

Eines davon ist das Projekt BaCell-SysMO, welches von der European Bacillus Community (BACELL) geleitet wird. Der Verbund beschäftigt sich mit der funktionellen Genomforschung von *Bacillus subtilis*. Seine Koordination übernahm im März 2007 Michael Hecker, gemeinsam mit Uwe Völker. Beide arbeiten an der Universität Greifswald.

Hecker leitet das Greifswalder Institut für Mikrobiologie und seit fünf Jahren auch das interfaculty „Zentrum für Innovationskompetenz (ZIK) Funktionelle Genomforschung“. Fragt man ihn nach den Aufgaben eines Systembiologen, wird er nachdenklich. „Allgemein ist das schwer zu sagen, die systembiologische Forschung verlangt eine Koordination verschiedener Wissenschaftler unterschiedlicher Fachgebiete, unter anderem der „Omik-Technologien“, wozu die Genomik, die Transkriptomik, die Proteomik und die Metabolomik/Fluoromik gehören. Die Forscher, die auf diesen Gebieten arbeiten, liefern den Treibstoff, mit dem die eigentlichen Systembiolo-

gen fahren. Es werden also harte Daten quantitativ erstellt, mit denen dann Mathematiker und Bioinformatiker Computermodelle erstellen können“.

Das Ziel der Systembiologen ist ein Bild aller regulatorischen Prozesse eines Organismus, vom Genom über das Proteom, zu den Organellen bis hin zum Verhalten des Gesamtorganismus.

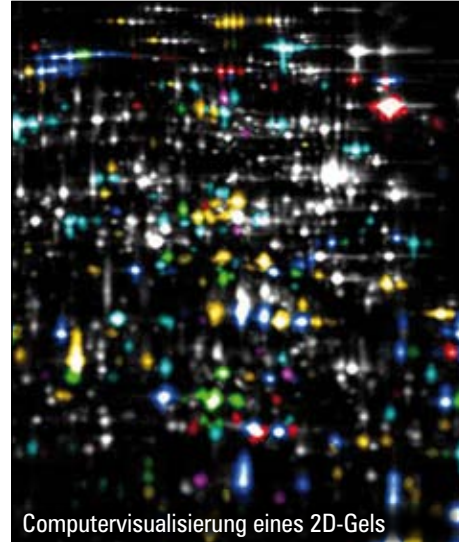
## Modell *Bacillus subtilis*

Bei BaCell-SysMO wird natürlich der Mikroorganismus *Bacillus subtilis* systembiologisch untersucht. Wieso ausgewählt? „Bakterien sind einfache Modelle. Dadurch erhält man die Chance, eine neue Dimension im molekularen Verständnis grundsätzlicher Lebensprozesse einfacher Systeme zu bekommen“, erläutert Hecker. „Beim grampositiven *Bacillus subtilis* handelt es sich um das Pendant zum gramnegativen *E. coli*. Neben ihm ist *Bacillus subtilis* der am besten verstandene Modellorganismus überhaupt“.

Zudem ist *B. subtilis* im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien in der Lage zu sporulieren, und daher ein Modell, um molekulare Mechanismen der Zelldifferenzierung zu analysieren. Außerdem dient der Mikroorganismus als Modell für andere Vertreter der Gattung *Bacillus*, wie zum Beispiel *Bacillus licheniformis*, die als Enzymproduzenten in der weißen Biotechnologie von Bedeutung sind oder für hochgradig pathogene grampositive Bazillusarten wie *Bacillus anthracis*.

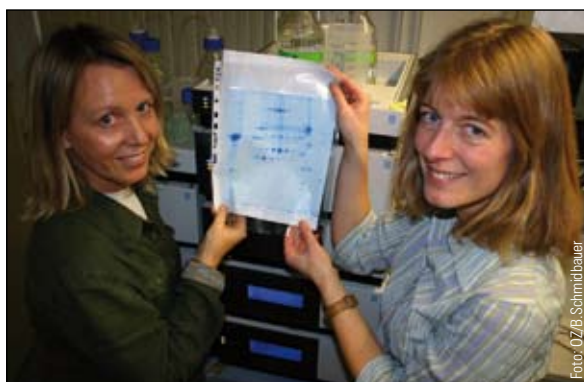
1995 wurde das erste Genom eines Bakteriums sequenziert. In Bakterien und eukaryotischen Zellen sind die biochemischen Reaktionen miteinander vernetzt. Viele Knoten dieses Netzwerkes sind Stoffwechselreaktionen, bei denen einzelne Enzyme eine Substanz in eine andere umwandeln. Über die Organisation, zum Beispiel des Zytoplasmas, weiß man wenig. Man glaubt, dass die Mehrzahl der Stoffwechsellzyme metabolischer Pathways miteinander agieren und die Intermediate nicht frei diffundieren, sondern von einem Partner zum anderen weitergegeben werden.

Der erste Schritt bei der systembiologischen Beschreibung eines Mikroorganismus ist die Identifikation des biochemischen Netzwerkes. Die Genomsequenzinformation liefert die Verknüpfungspunkte. Doch lernt man aus diesen *in silico*-Analysen nur, wie das Netzwerk prinzipiell aussehen könnte, nicht aber, wie es unter physiologischen Bedingungen wirklich



Computervisualisierung eines 2D-Gels

Foto: M. Hecker, Software-Paket Color Coding, Decodon GmbH



Dörte Becher (li) und Haike Antelmann (re) aus der AG Hecker mit Coomassie-gefärbten Proteinen auf einem 2D-Gel.

Foto: GZB Schmittbauer

funktioniert. Es werden daher einzelne Bestandteile herausgelöst und analysiert.

### Glukosehunger

Beim BaCell-SysMO-Projekt hat man sich für die Erforschung eines bestimmten Prozesses entschieden: den Übergang der Bakterienzelle vom Wachstums- in den Nichtwachstumszustand (stationäre Phase). Letzterer ist als Glukosehunger definiert. Zuerst gibt man den Zellen zum Wachsen Nährstoffe und Glukose. Ist die Glukose verbraucht, gehen die Zellen in die stationäre Phase über.

Für die Ökophysiologie von *B. subtilis* ist die Steuerung des Wachstums durch Glukose entscheidend: In den Ökosystemen



Proteomiker **Michael Hecker**

haben die Bakterien keine reichen Nährstoffquellen wie im Labor, sie leben im Hungerzustand und wachsen meist nicht. Aber auch aus biotechnologischer Sicht ist die Wachstumssteuerung wichtig. Die Bakterien werden in Fermentoren zur Produktion von Enzymen genutzt, mit der

sie erst in der Nichtwachstumsphase beginnen. Zudem ist der Übergangsprozess für die Pathogenitätsforschung interessant, da pathogene grampositive Bakterien ihre Virulenzfaktoren erst in der stationären Phase produzieren.

Wie sind die Aufgaben beim BaCell-SysMO verteilt? Die bekannte, in Datenbanken abgelegte und annotierte Genomsequenz von *B. subtilis* bildet die Grundlage für die Herstellung von DNA-Chips. Mit letzteren ermittelt man die exprimierten mRNAs und erhält so ein Bild der Genexpression.

### Quantitative Proteomanalyse

Dann legt Heckers Gruppe im Proteomzentrum in Greifswald los. Mit 2D-Gelen und Massenspektrometrie-Techniken identifizieren und (gegebenenfalls) quantifizieren sie möglichst viele der in einer Bakterienzelle exprimierten Proteine.

Zunächst kultivieren sie jedoch die Zellen in Fermentoren unter definierten Bedingungen, ernten sie durch Zentrifugation und schließen die Zellen mit Hilfe von Ultraschall auf. Den Zellextrakt fraktionieren Heckers Leute dann in zytosolische, membranständige oder zelloberflächenassoziierte Proteine und analysieren die Subfraktionen einzeln.

Die Proteine werden in einem 2D-Gel nach Größe und isoelektrischem Punkt aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Kameragesteuerte Roboter schneiden die Proteinflecken aus dem Gel aus und verdauen sie mit Trypsin. Da Trypsin spezifisch hinter Arginin- oder Lysinresten schneidet, entstehen für jedes Protein typische Peptidmuster, deren Molekularmassen sich im Massenspektrometer bestimmen lassen. Parallel dazu verdaut man alle Proteine des Organismus virtuell mit Trypsin und vergleicht die *in silico* erhaltenen Peptidgemische jedes Proteins mit den experimentell ermittelten. Passt eines, ist das Protein identifiziert.

Durch diese Proteomanalyse kann man nicht nur die Expression der Proteine während des Wachstumsprozesses ver-

## Catch the next wave of microarray technology



#### miRNA Profiling Services

- Always up-to-date miRNA content
- Fast turnaround
- Affordable

#### Gene Expression Profiling Services

- Simply send us your sample
- Large numbers of Eukaryotes and Prokaryotes

#### Instruments for Microarray Production and Analysis: Geniom® One and Geniom® RT Analyzer

- Customized microarrays when you need them
- Automated sample handling and data collection



Visit us at the upcoming XX International Congress of Genetics in Berlin, Germany (July 12–17, 2008) at booth 3 and learn more about febit's technology

febit

READ, WRITE, UNDERSTAND THE CODE OF LIFE

Europe: phone +49 6221 6510-300 • [www.febit.eu](http://www.febit.eu) • [info@febit.eu](mailto:info@febit.eu)  
Americas: phone +1 781 391 4360 • [www.febit.com](http://www.febit.com) • [info@febit.com](mailto:info@febit.com)

folgen (*protein expression profiling*). Mit ergänzenden Methoden kann man zudem Schicksal und Eigenschaften eines jeden Proteins verfolgen: wo in der Zelle wird es eingebaut, befindet es sich im Zytosol, mit wem interagiert es, ist es modifiziert oder geschädigt und wie stabil ist es?

### Computermodelle und Simulationen

Geht eine wachsende Zelle aufgrund von Nährstoffmangel (Glukosehungerstimulus) in die Nichtwachstumphase über, stellt sie den Zellstoffwechsel um. Im Proteinsyntheseprogramm ist fast die Hälfte der Proteine davon betroffen. Für die Modellierung am Computer ist dies zu komplex. Man teilt die Proteine daher in Module oder Regulationsgruppen ein, wobei für jedes Modul erneut quantitative Proteomdaten erhoben werden. Diese Daten verwenden Matthias Reuß vom Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart und Olaf Wolkenhauer vom Lehrstuhl für Systembiologie und Bioinformatik der Universität Rostock, um Computermodelle und Simulationen zu generieren. Diese prüfen sie mit Experimenten.

Die Arbeitsgruppen nutzen dazu zwei methodische Ansätze. Die Kernaktivität der AG Reuß besteht in der mathematischen Modellierung und Computersimulation. Dabei verfolgt sie zwei verschiedene Wege zur Erforschung von Mikroorganismen: Zum einen statische Modelle, bei denen man das gesamte Netzwerk des Stoffwechsels oder der Regulation abbildet oder in einer mathematische Codierung ablegt (topologische Analysen von Netzwerken).

Bei dynamischen Modellen werden dynamische Verhaltensmuster in mathematische Modelle überführt. Man erhält ein System von Differentialgleichungen, welche die Dynamik eines Systems beschreiben. Damit kann man Eigenschaften und Verhaltensweisen der Mikroorganismen am Computer imitieren, etwa die metabolische und genregulatorische Reaktion auf eine Limitierung der Kohlenstoff- oder Energiequelle. Zu dieser mathematischen Modellierung gehört die datengetriebene Modellierung, bei der man großskalige Datensätze auf der Ebene des Transkriptoms und des Proteoms erstellt.

Ein weiteres Feld das die Stuttgarter Bioverfahrenstechniker beackern ist der modellgetriebene Datenerwerb. Dabei setzen sie Hypothesen, die aus dem Wissen über biologische Systeme entstanden sind – zum Beispiel den Regulationsmechanismen von *Bacillus subtilis* – in mathematische Gleichungen um. Daraus ergeben sich Anregungen für neue modellgetrie-

bene Experimente. Stehen die Modelle, beginnt das beliebte Spiel „Ich sehe was, was du nicht siehst“. Zuerst prüfen die Forscher, ob die in mathematischen Modellen abgebildeten Hypothesen ausreichen, um die experimentellen Beobachtungen zu beschreiben, oder ob wichtige Informationen fehlen. Diese müssen die Experimentatoren der Arbeitsgruppe Hecker nachliefern. Das Ziel ist, mit Hilfe eines Modells zu einer hinreichenden mathematischen Beschreibung des biologischen Prozesses zu kommen.



Bioverfahrenstechniker **Matthias Reuß**

Foto: M. Reuß

### Projektziel durch Netzwerk

„Bei *Bacillus subtilis* ist man bei der Beschreibung des Schicksals der Einzelproteine unter bestimmten physiologischen Wachstumsbedingungen schon weit vorangeschritten, man weiß aber noch längst nicht alles über diesen „Tanz der Proteine“, der am Ende das Leben ausmacht“, erklärt Hecker. Da das BaCell-SysMO-Projekt gerade einmal ein Jahr läuft, können die Arbeitsgruppen erst jetzt versuchen, Verknüpfungen herzustellen. Dazu müssen sie Standardprotokolle erarbeiten, die die Experimente der einzelnen Labors miteinander koordinieren, und das Problem des Datenmanagements lösen.

Obwohl schon Teilergebnisse vorliegen, ist das Projektziel großskalige Modelle zu entwerfen, noch in weiter Ferne. Man will ja nicht nur einzelne Reaktionen abbilden, sondern das dynamische Verhalten der Mikroorganismen quantitativ und in seiner Gesamtheit beschreiben. BaCell-SysMO wird jedoch noch mindestens zweieinhalb Jahre gefördert, mit der Option auf eine Verlängerung.

Getroffen haben sich Hecker und Reuß auf einem EU-Meeting in Paris, wo Hecker potenzielle europäische Partner suchte. „Die Systembiologie befasst sich mit metabolischen, Genregulations- und Signalnetzwerken. Zur Lösung dieser Probleme werden wiederum Netzwerke von Forschungsgruppen benötigt. Das Projekt verlangt somit eine enge Kooperation verschiedener biologischer Arbeitsgruppen und Gruppen, die mathematische Modellierungen und Simulationen machen“, sagt Reuß. „Das Wissen und die Kompetenz, die auf diesem Gebiet benötigt werden, ist so immens groß, dass solch ein Projekt von einer Arbeitsgruppe allein nicht mehr gestemmt werden kann. Zudem erfordern die experimentellen Untersuchungen so komplexe, aufwendige und teure Einrichtungen, dass ein einzelnes Labor nicht mehr in der Lage ist, die verschiedenen Methoden selbst noch kompetent zu vertreten.“ Insgesamt sind im Konsortium neben den Gruppen von Hecker und Völker in Greifswald, Reuß in Stuttgart und Wolkenhauer in Rostock weitere aus Göttingen, Braunschweig, Erlangen, Zürich, Groningen, Newcastle, und Paris beteiligt.

Diese Förderinitiative vernetzt die Spezialitäten der einzelnen Gruppen: Vernetzung, um Vernetzung aufzuklären. Das ist Systembiologie.

DANIEL WUNSCH

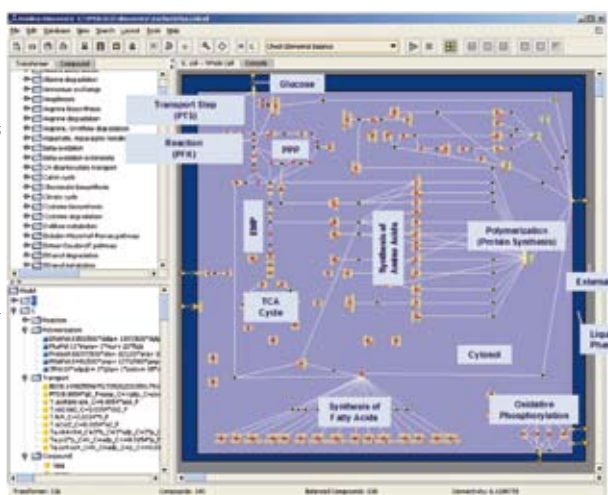


Foto: M. Reuß. InSilico Discovery Software, InSilico Biotechnology AG

Modell des metabolischen Netzwerks von *E. coli*.