

DAS HUMANE TOPONOM-PROJEKT: ENTSCHLÜSSELUNG DES PROTEIN-NETZWERK-CODES DER ZELLEN UND GEWEBE

Walter Schubert

Unter dem Toponom versteht man die Gesamtheit der molekularen Netzwerke der Zellen und Gewebe. Es beinhaltet den umfassenden Funktionsplan (den biologischen Code) für die Myriaden verschiedener Zell- und Gewebefunktionen. Die vollständige Entschlüsselung des Toponom ist eine der größten Herausforderungen der Post-Genomforschung, denn erst die genaue Kenntnis der gegenseitigen Abhängigkeit der Proteine voneinander und der dahinter stehenden Regeln werden es erlauben, die Zelle und die genauen Mechanismen der Fehlsteuerung bei Krankheiten zu verstehen. Die weltweite Vernetzung der Toponomforschung auf verschiedenen Spezialgebieten der Biomedizin wird das Ziel der Entschlüsselung des humanen Toponom in Etappen vorantreiben.

GLOSSAR

TOPOLOGIE

Der hier verwendete Begriff der Topologie geht auf die Arbeiten des Mathematikers Johann Benedict Listing zurück, der in seinen *Vorstudien zur Topologie* (Göttingen, 1847) den Begriff wie folgt definiert hat: Die Gesetze des Zusammenhangs, der gegenseitigen Lage und der Aufeinanderfolge von Punkten, Linien, Flächen, Körpern und ihren Teilen oder ihren Aggregaten im Raume, abgesehen von den Maß- und Größenverhältnissen.

Unsere gegenwärtigen Erkenntnisse über die Zelle sind das Resultat jahrzehntelanger zellbiologischer Forschung, die zur Aufklärung wichtiger biochemischer Reaktionswege und deren Kompartimentierung in subzellulären Organellen geführt hat. Die größte Herausforderung der Zukunft besteht nunmehr in der Entschlüsselung des gesamten Funktionsplans der Zelle in Krankheit und Gesundheit, den wir als den biologischen Code bzw. das Toponom bezeichnen /1-3/. Wie etabliert, organisiert und koordiniert die Zelle räumlich und zeitlich die Myriaden verschiedener Funktionalitäten, wie z. B. während der Bildung (Morphogenese) komplexer Organe? Wie realisieren Zellen den übergeordneten, für alle Zellen verbindlichen Funktionsplan in einem derart komplexen räumlich ausgedehnten Prozess, damit genau derjenige histologische Bau eines Gewebes entsteht, der für die hoch spezifischen Leistungen des jeweiligen Gewebes grundlegend ist? Wie gewährleistet ein Gewebe, dass sich alle Zellen räumlich exakt anordnen, um die funktionelle und strukturelle Integrität des Gewebes zu jedem Zeitpunkt zu gewährleisten? Wie wird diese physiologische Integrität von Zellen und Geweben unter Krankheitsbedingungen gestört bzw. was sind die essentiellen operativen Mechanismen?

VOM GENOM ZUM TOPONOM

Während die Sequenzierung des humanen Genoms u. a. die Bauanweisung für alle Proteine ergab, können die Antworten auf diese Fragen in der Zukunft nur gegeben werden, wenn wir verstehen lernen, wie die Proteine und andere molekulare Bestandteile in individuellen Zellen und Geweben als Netzwerke zeitlich und räumlich

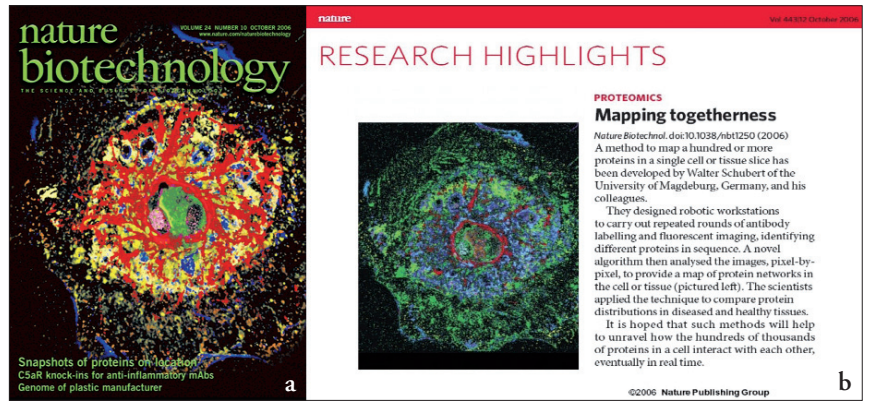
zusammenwirken. Dazu benötigen wir neue Technologien, die in der Lage sind, eine quasi beliebige Anzahl von Proteinen in einer Zelle oder einem Gewebeschnitt gleichzeitig zu lokalisieren, um zunächst das zu kartieren, was die Zelle tatsächlich selbst macht: Sie bildet funktionelle Protein-Muster (Cluster von Proteinen), um mit Hilfe dieser Cluster konkrete Zellfunktionen zu generieren: Protein-Moleküle verbinden sich zu Protein-Clustern, Protein-Cluster wiederum können, quasi auf einer noch höheren Ebene der funktionellen Organisation, zu Protein-Cluster-Netzwerken assoziieren. Diese können unter bestimmten Bedingungen wieder zerfallen (de-assemblieren), sodass die einzelnen Protein-Moleküle dann andere Protein-Cluster bilden können, um andere Zellfunktionen zu steuern. Die Zelle ist also ein Protein-Musterbildungsapparat. Er ist heute weder im Detail noch als Ganzes verstanden. Weder die tatsächlich vorkommenden Protein-Cluster in einem gegebenen Status einer Zelle noch die Regeln ihrer Bildung können aus genomischen oder rein molekularen Daten der Proteine unmittelbar abgeleitet werden. In anderen Worten: Wir kennen zwar schon sehr viele Details sehr vieler einzelner Moleküle, z. B. die molekulare Funktion zahlreicher Proteine. Daraus können wir aber die zelluläre Funktion dieser Proteine nicht ohne weiteres vorhersagen, denn diese ist immer abhängig von der Position des jeweiligen Proteins innerhalb eines Protein-Netzwerkes in der individuellen Zelle, bzw. davon, mit welchen Nachbarproteinen oder auch weiter entfernten Proteinen Interaktionen bestehen /4/. Man muss daher die molekulare(n) Funktion(en) eines Proteins von seiner/seinen zel-

lulären Funktion(en), die vom räumlichen Protein-Kontext abhängig sind, klar trennen: Wie jedes System hat auch das zelluläre System der Proteine eine innere Struktur, einen Code und eine Semantik. Um an diesen zellulären Funktions-Code heranzukommen, muss er messtechnisch in morphologisch intakten Zellen und Gewebeschnitten erfasst werden, und zwar Zelle für Zelle in einem räumlichen Zusammenhang. Eine quantitative Beschreibung setzt die Verfügbarkeit hochdimensionaler mikroskopischer Imaging-Verfahren voraus.

ÜBERWINDUNG DER SPEKTRALEN LIMITIERUNG DER TRADITIONELLEN FLUORESCENZ-MIKROSKOPIE DURCH „TOPONOME IMAGING“

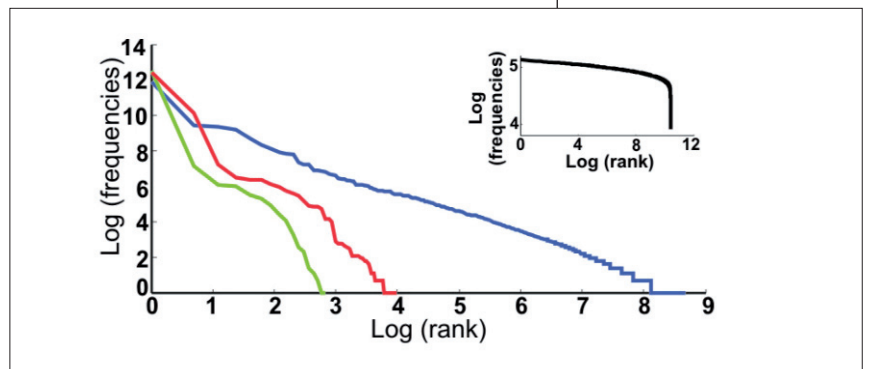
Während die Grundlagen eines geeigneten Verfahrens für die Erfassung von molekularen Netzwerken in Zellen bereits in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts vorlagen /5/, verfügen wir aufgrund interdisziplinärer Entwicklungsarbeit unseres Labors seit 1994 heute über eine ausgereifte Robotermesstechnologie (Toponom-Technologie), die das Prinzip der Kolo-kalisierung einer nahezu beliebigen Anzahl von Molekülen der Zelle automatisch vollzieht /6-8/. Das Verfahren beruht auf der Markierung von molekularen Zellkomponenten (z. B. Proteinen), indem Fluoreszenzfarbstoff(Fluorochrom)-gekoppelte Marker (sogenannte „Tags“) eingesetzt werden. Ist eine erste molekulare Komponente in einer Probe markiert, dann wird das entsprechende Fluoreszenz-Signal aufgezeichnet. Anschließend wird das Fluorochrom durch weiche Anregung gebleicht. Damit ist der erste sogenannte „Incubation – Imaging – Bleaching“-Zyklus beendet, und es erfolgt ein nächster Zyklus mit einem zweiten Tag zur Markierung einer anderen molekularen Komponente in der Probe (Zelle oder Gewebe). Auf diese Weise können mindestens 100 Zyklen, vermutlich aber sogar mehr als 1 000 Zyklen, in ein und derselben Zell- oder Gewebeprobe ortsgleich zeitlich hintereinander geschaltet werden. Es entsteht in jedem Messpunkt der Probe ein hochdimensionaler, strukturgebundener, kombinatorischer molekularer Datensatz.

Da diese Technologie die Grenzen der traditionellen Fluoreszenzmikroskopie, die etwa bei maximal fünf bis zehn kolo-kalisierbaren Molekülen der Zelle liegt, überwindet und damit den Zugang zum Funktionsplan der Zelle ermöglicht /9/, hat sie große internationale Beachtung erfahren (s. z. B. „Mapping togetherness“, Nature 443, 12 Oct. 2006) (Abb. 1). Seit der Erstpublikation /5/ haben mehrere Gruppen das Prinzip aufgegriffen /10-15/ und in Anwendungen übersetzt (hier ist nur eine Auswahl zitiert). Evaluierende Sekundärpublikationen /16, 17/ und beginnende weltweite Aktivitäten zeigen, dass die Bedeutung der Technologie für die Entschlüsselung des Funktionsplans von Zellen und Geweben *in situ* keine Alternative hat. Dass die Überlegung einer paarweisen Analyse der Kolo-kalisation von Proteinen mit



Hilfe traditioneller Fluoreszenzmikroskopie in tausenden Gewebeserienschnitten, also nicht in einem einzelnen Schnitt, tatsächlich keine Alternative bietet, zeigt z. B. das Zipf-Gesetz, ein „Power Law“ als eine Art mathematisches ‚Maß‘ für den hohen Organisationsgrad eines Systems /18/. Wenn z. B. innerhalb ein und derselben biologischen Struktur weniger als 15 Proteine kolo-kalisiert werden, trifft das Zipf-Gesetz nicht zu /6/. Werden aber mehr als 45 Proteine kolo-kalisiert, dann trifft das Gesetz zu /6/ (Abb. 2). Die Kolo-kalisation von nur zwei Proteinen bzw. der Einsatz traditioneller Fluoreszenzmikroskopie würde also

Abbildung 1
(a) Titelblatt-Abbildung (Cover Image) der Toponom-Karte einer menschlichen Leberzelle
(b) Research Highlight in Nature 443 (12 Oct 2006) zu /6/



nicht zu Daten führen, die Aufschluss über die innere Struktur der zellulären Protein-Systeme geben könnten. Der Systemcharakter der zellulären Proteine wird mithin erst dann deutlich, wenn eine sehr große Zahl verschiedener Proteine gleichzeitig in ein und derselben Struktur erfasst wird. Auch in sogenannten proteomischen (biochemischen) Ansätzen, die prinzipiell *ex vivo* an Zell- oder Gewebehomogenaten arbeiten, geht dieser zelluläre Systemcharakter der Proteine zwangsläufig verloren.

VISUALISIERUNG FUNKTIONSSPEZIFISCHER PROTEIN-CLUSTER: ZUKUNFT EINER DIAGNOSTISCHEN MIKROSKOPIE

Das o. g. von George Kingsley Zipf beschriebene Gesetz wurde ursprünglich angewandt, um die Gesetzmäßigkeiten der Häufigkeit von Wörtern in menschlichen Sprachen zu analysieren /19/. Dabei ergibt das Produkt aus Rang und Häufigkeit von Wörtern (Wörter = Kombination von Buchstaben als kleinste semantische Einheit in Sprachsystemen) eine immer annähernd gleiche Konstante. In hochdimensionalen Toponom-

Abbildung 2
Zipf-Plot: Beziehung zwischen dem Rang und der Häufigkeit von Protein-Clustern. Es wurden 49 Moleküle (blaue Linie), 10 Moleküle (rote Linie), und 5 Moleküle (grüne Linie) kolo-kalisiert. Die (log-log) Linearität, die für die 49 Moleküle zu erkennen ist, verschwindet progressiv, wenn weniger Moleküle kolo-kalisiert werden. Sie ist vollständig aufgehoben, wenn 49 beliebig angeordnete Moleküle analysiert werden (oben rechts).

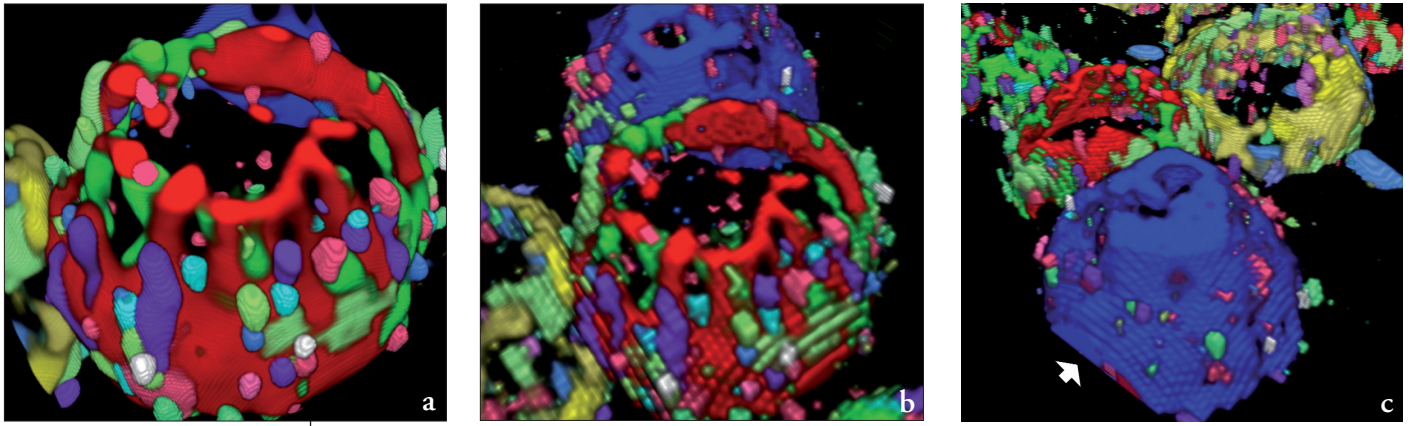


Abbildung 3
Dreidimensionale Toponom-Karten der Zelloberflächen-Cluster von zwei T-Lymphozyten.
(a) CD4-T-Lymphozyt (hoch aufgelöst);
(b) derselbe CD4-T-Lymphozyt wie in (a), jedoch im Kontext seiner Umgebung;
(c) das Bild von (b) um 180° zur Längsachse gedreht zeigt einen CD8-T-Lymphozyten (Pfeil).
In der CD4-Zelle (a, b) sind zahlreiche verschiedene Protein-Cluster (umschriebene rundliche Strukturen, dargestellt in verschiedenen Farben) in der rot gekennzeichneten CD4-positiven Zellmembran eingelagert. Sie stehen in direktem räumlichen Kontakt (räumliche Vernetzung). In der CD8-Zelle (c) hingegen sind die vorkommenden Protein-Cluster (verschiedene Farben) unverbunden in der CD8-positiven Membran (blau) lokalisiert.

Datensätzen ergibt sich eine ähnliche Konstante, wenn man die Protein-Cluster (= spezifische Protein-Kombinationen am Ort als kleinste semantische Einheit des Toponom), d. h. räumlich (topologisch) genau definierte Zusammenlagerungen bestimmter Proteine in der Zelle misst (zu beachten ist die hier verwendete Definition des Begriffs Topologie: s. Glossar). Die für einen bestimmten Zelltyp und seine Funktionszustände hoch spezifischen Cluster kann man mit der Toponom-Technologie direkt sichtbar machen /8/. Abbildung 3 zeigt das Beispiel von zwei gut bekannten Zelltypen: einen CD4- und einen CD8-T-Lymphozyten aus dem Blut eines gesunden Menschen. Es ist in der Immunologie lange bekannt, dass sich diese Zelltypen funktionell spezifisch unterscheiden, aber hier sehen wir erstmals, wie sie tatsächlich aussehen, wenn man zahlreiche Protein-Cluster ihrer Zelloberflächen visualisiert: Während die Protein-Cluster der Zelloberfläche der CD4-Zelle praktisch alle miteinander direkt räumlich gekoppelt sind, liegen die Protein-Cluster der CD8-Zelle unverbunden in der Zelloberfläche. Hierin liegen ganz neue Möglichkeiten für spezifische diagnostische und therapeutische Verfahren, z. B. die Vorhersage und das „Monitoring“ immunologischer Krankheitsprozesse, abgesehen von der grundsätzlichen Bedeutung für das Verstehen dieser Zelltypen und ihrer immunologischen Interaktionen.

Das „semantische“ System des zellulären Toponom (s. Abb. 3 und Abb. 4) lässt mithin zwei grundsätzliche Aspekte erkennen: erstens die Existenz ganz verschiedener Protein-Cluster und zweitens die räumliche Anordnung dieser Cluster zueinander. Dabei ist es gleichermaßen wichtig herauszufinden, welche Protein-Cluster in gesunden Zuständen vorkommen und welche nie vorkommen, bzw. welche nur bei ganz bestimmten Krankheiten vorkommen. Protein-Cluster, die nur krankheitsspezifisch vorkommen, sind von großer pathophysiologischer Bedeutung. Wir gehen aufgrund aller bisher vorliegenden Toponom-Daten davon aus, dass das hochorganisierte Toponom genauen kombinatorischen Regeln der Verschlüsselung biologischer Information folgt (Generative Grammatik des Toponom /3, 4/). Die Protein-Cluster, die, diesen Regeln folgend, in der Zelle entstehen, funktionieren wahrschein-

lich wie kleine molekulare Maschinen, die alle Funktionen der Zelle steuern. Das Ziel der Toponom-Forschung besteht somit aus zwei Komponenten /3, 9/: Erstens müssen Zellen und Gewebe möglichst vollständig hinsichtlich der tatsächlich existierenden Protein-Cluster und ihrer räumlichen Verbindungen und Nicht-Verbindungen kartiert werden. Zweitens muss durch Kopplung von Toponom-Kartierung und Experiment die genaue Funktion dieser Cluster und ihrer Verknüpfungen entschlüsselt werden. Beides sei anhand eines Beispiels erläutert.

IDENTIFIKATION FUNKTIONELLER MOLEKULARER NETZWERKE

Die Kartierung eines Teils des Zelloberflächen-Toponom einer Tumorzelle (Rhabdomyosarcom-Zelle) zeigte, dass bestimmte Protein-Cluster immer in genau derselben Reihenfolge auf der Zelloberfläche angeordnet sind /6/ (Abb. 4). Diese Anordnung findet man immer nur dann, wenn sich die Zellen aus ihrem sphärischen in einen elongierten Zustand, den sogenannten Migrationsstatus strecken. Diesen Übergangsprozess nennt man Zellpolarisierung: Die Zellen bilden drei Zellausläufer (sogenannte Zellextensionen), mit denen sie zunächst die Umgebung abtasten (explorieren). Daher wird diese transiente Zellform auch als Explorationsstadium bezeichnet. Die o. g. Anordnung der Protein-Cluster ist ausschließlich auf dieses Explorationsstadium begrenzt, also für dieses ein spezifisches Merkmal. Analysiert man nun die innerhalb jedes dieser Protein-Cluster vorkommenden Proteine, so stellt man fest, dass ein bestimmtes Protein (ein proteolytisches Enzym) in allen Clustern vorkommt, während alle anderen Proteine variabel vorkommen. Das Protein, das immer vorkommt, bezeichnet man als Leitprotein, die variabel vorkommenden als ‚wild card‘-Proteine. Wenn man, der Leitprotein-Hypothese folgend /1/, das Leitprotein blockiert, dann beobachtet man, dass die meisten Protein-Cluster verschwinden (de-assemblieren), mit der Folge, dass die Zellen den Übergang von der sphärischen in die elongierte Migrationsform nicht mehr vollziehen können. Dies zeigt dreierlei: Erstens, dass die ‚wild card‘-Proteine von dem Leitprotein abhängig sind, zweitens, dass auf diese Weise die Existenz eines bestimmten molekularen Netzwerkes und dessen Komponenten auf Einzel-

zell-Niveau direkt nachgewiesen werden konnte, und drittens, dass die topologische und funktionelle Integrität der detektierten Protein-Cluster von der Kontrolle durch das Leitprotein abhängig sind. Man kann daher das Leitprotein auch als ein Organisatorprotein für genau dieses Netzwerk in genau diesem spezifischen Zelltyp und diesem konkreten Funktionszustand, nämlich der Zellpolarisierung, bezeichnen und ihm diese zelluläre Funktion zuweisen: Das Netzwerk und das Kontrollprotein sind identifiziert. Wir haben somit durch Kopplungen von Toponom-Kartierung und Experiment erstmals die Möglichkeit, systematisch die molekularen Netzwerke, deren Komponenten und Leitproteine, ihre Hierarchie und innere Struktur umfassend in allen Zellsystemen zu ermitteln, und damit wichtige Proteine zu finden, die normale und pathologische Zellfunktionen kontrollieren. Die Leitprotein-Hypothese /1/ über das genannte Beispiel hinaus durch andere bestätigende Experimente stark untermauert worden (z. T. beschrieben in /6/), dennoch ist eine noch größere Anzahl weiterer Experimente in der

Zukunft durchzuführen, um das Prinzip weiter zu explorieren. Bei diesem systematischen Vorgehen werden noch viele offene Fragen zu beantworten sein, z. B.: Kann ein Leitprotein ein sehr hoch oder sehr gering konzentriertes Protein sein? Um dieses Spektrum lokal zu identifizieren, müssen in der Zukunft (schon existierende) neue Algorithmen eingesetzt werden, die jedes einzelne Protein in molekularen Netzwerken mit einer sehr hohen Informationstiefe erfassen. Wir nennen diese neue Phase der Toponom-Forschung die Apeiron-Phase (Apeiron, altgriechisch: das Nicht-Limitierte): Mikroskopie mit hoher Funktionsauflösung. Des Weiteren: Nicht nur ein einzelnes molekulares Netzwerk ist hierarchisch strukturiert (Abb. 4, das Leitprotein kontrolliert ‚wild card‘-Proteine, die wiederum einer Hierarchie folgend, unterschiedlich häufig mit dem Leitprotein zusammen vorkommen), sondern auch die Netzwerke sind untereinander hierarchisch strukturiert. Wir müssen mindestens zwei Formen unterscheiden: Die sogenannten operativen Netzwerke, die bestimmte Zellfunktionen direkt ausführen

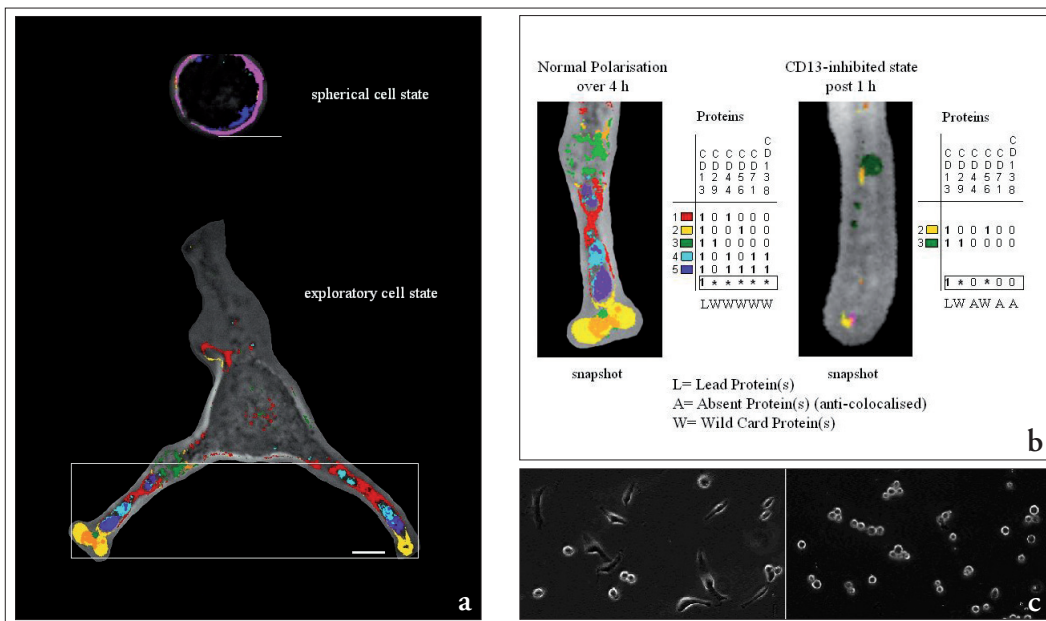


Abbildung 4

Identifikation eines molekularen Netzwerkes in einer Tumorzelle.

(a) Zwei Zellstadien: Das sphärische Stadium (oberer Bildteil) und das Explorationsstadium (unterer Bildteil), das aus dem sphärischen Stadium hervorgeht. Auf der Zelloberfläche der unteren beiden Zellausläufer des Explorationsstadiums erkennt man verschiedene Farben, die in folgender Reihenfolge von der Spitze der Zellausläufer zum Zellkörper angeordnet sind: gelb, dunkelblau, hellblau, rot. Diese Farben stellen jeweils verschiedene Protein-Cluster dar, die mit Hilfe der Toponom-Technologie /6/ erfasst wurden. Man beachte, dass die Anordnung und Reihenfolge dieser Cluster in beiden Zellausläufern dieser Zelle exakt übereinstimmen.

(b) Linker Bildteil: Ausschnittvergrößerung einer der in (a) gezeigten Zellextensionen einschließlich der Darstellung eines kleinen Ausschnitts der Zuordnung dieser Farben zu Protein-Clustern, die hier als CMPs (combinatorial molecular phenotypes) bezeichnet sind. Es erweist sich, dass diese Protein-Cluster das CD13-Molekül als Leitprotein gemeinsam haben, während viele andere Proteine (hier sind nur einige gezeigt) variabel vorkommen (wild cards). Das gemeinsame Motiv ist mit Hilfe eines Drei-Symbol-Codes /6, 9/ auszudrücken: LW*****. Wenn man das Leitprotein inhibiert, dann beobachtet man eine Desintegration bzw. ein vollständiges Verschwinden der meisten Protein-Cluster (rechter Bildteil), und es entsteht ein neues gemeinsames Motiv: LWAWAA.

(c) Funktionell führt dieses letztere inhibitorische Motiv zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit der Zellen, das Explorationsstadium auszubilden (vergleiche: linker Bildteil, nicht inhibiert: Die Zellen bilden elongierte Stadien aus; rechter Bildteil, inhibiert: Die Zellen verweilen im sphärischen Stadium).

(s. z. B. Abb. 4), und Netzwerke, welche diese operativen Netzwerke regulieren (regulatorische Netzwerke). Darüber hinaus gibt es in jeder Gruppe Netzwerk-Familien. All diese Formen sind in hochdimensionalen Toponom-Datensätzen erfassbar, sodass systematische Toponom-Analysen diese verschiedenen Hierarchien funktionell zu kartieren haben.

Zusammenfassend konzentriert sich die Toponom-Forschung derzeit auf vier Bereiche:

1. Die Detektion neuer zellulärer Mechanismen in Geweben. Ein Beispiel als Leitmodell: Die Kolokalisation von neun zellulären Proteinen in Muskelbiopsien des Menschen zeigte, dass sich im regenerierenden Skelettmuskel neue Muskelzellen durch Transdifferenzierung aus lokal invasiven Gefäßendothelzellen bilden /20/, eine Entdeckung, die durch *in vivo*-Modelle bestätigt wurde /21/, und die in weiteren Forschungsarbeiten zu einer neuartigen Zelltherapie der Muskeldystrophie, zunächst im Tiermodell geführt hat /22/.
2. Die Detektion kombinatorischer Biomarker für die klinische Diagnostik. Dieser Bereich wird bereits in den USA mit besonderer Intensität betrieben.
3. Die Detektion krankheitsspezifischer Leitproteine als neue Zielmoleküle (Targets) für die Therapieforschung. Beispiele: (a) Detektion des FcγR3-Rezeptors als neues Target-Protein bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) /23/; (b) Detektion eines proteolytischen Enzyms als Leitprotein der Zellpolarisierung bestimmter Tumorzellen /6/; (c) Detektion eines post-synaptischen Proteins als Leitprotein-Kandidat für die Schmerzforschung /6/.

4. Die schrittweise Aufklärung des Funktionsplans der Zellen /24/

INTERNATIONALE VERNETZUNG DER TOPONOM-FORSCHUNG

Im Rahmen einer wachsenden weltweiten Vernetzung der Toponom-Forschung ist geplant, innerhalb der nächsten zwölf Jahre einen wesentlichen Teil des menschlichen Toponom (die kombinatorischen Regeln und Funktionen von ca. 15 000 bis 30 000 menschlichen Proteinen) zu entschlüsseln /24/. Derzeit entstehen bereits Toponom-Zentren in Europa und Ostasien. Weitere Aktivitäten sind in großen Einrichtungen in den USA zu verzeichnen. Das Prinzip dieser Entschlüsselungs- und Anwendungsaktivitäten besteht darin, dass existierende Forschungsgruppen, die hochkarätige Forschung auf einem bestimmten Gebiet der Biomedizin betreiben, wie z. B. der Stammzellforschung, der Krebsforschung, der Entzündungsforschung, der Zellbiologie, der Histologie, der Neurowissenschaften usw., die Toponom-Technologie in ihren eigenen Labors etablieren, um in diesem Bereich eines oder mehrere der oben genannten Themen zu bearbeiten. Eine entscheidende Rolle wird bei diesen Aktivitäten die Einbeziehung informationstechnischer /25, 26/ und exakter mathematischer Methoden der kombinatorischen Geometrie und Statistik spielen /27, 28/, denn die in Toponom-Daten enthaltenen räumlichen Strukturen der Protein-Cluster können mit derartigen Verfahren direkt quantitativ beschrieben werden, sodass hier Instrumentarien ins Spiel kommen, die zur Aufklärung innerer Zusammenhänge, wie auch der Klassifizierung von Protein-Gruppen, und zu Einblicken in die Tiefenstruktur des Toponom führen werden.

Dank/Widmung

Dieser Artikel ist meinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern Manuela Friedenberger, Marcus Bode, Andreas Krusche und Reyk Hillert und meinen Doktoranden und Kooperationspartnern sowie den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Medizinische Neurobiologie gewidmet, die im Hinblick auf das Ziel der Toponom-Technologie immer hoch motiviert waren, viele Hürden in einem weit gespannten interdisziplinären Ansatz unbeirrt zu überwinden. Großer Dank gilt auch der jahrelangen Forschungsförderung durch DFG, BMBF und das Land Sachsen Anhalt, ohne die das Toponom-Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Literatur

- /1/ Schubert, W.: Topological proteomics, Toponomics, MELK Technology. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2003; 83: 189-209.
- /2/ Schubert W.: Cytomics in characterizing toponomes: towards the biological code of the cell. Cytometry A. 69, 209-211 (2006).
- /3/ Schubert W.: Breaking the biological code. Cytometry A, 71(10), 771-772 (2007).
- /4/ Schubert, W.: Exploring molecular networks directly in the cell. Cytometry A. 69, 109-112 (2006).
- /5/ Schubert W.: Multiple antigen – mapping microscopy of human tissue. In: G. Burger, M. Oberholzer, G.P. Vooijs (eds.): Excerpta medica. Elsevier, Amsterdam. Adv. Analyt. Cell. Pathol. 1990; 97-98.
- /6/ Schubert W., Bonnekoh B., Pommer A.J., Philipsen L., Boeckelmann R., Malykh Y., Gollnick H., Friedenberger M., Bode M., Dress A.W.: Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. Nature Biotechnol. 2006; 24(10): 1270-1278.
- /7/ Bode M., Krusche A.: Toponome-Imaging-System (TIS): Imaging the proteome with functional resolution. Application note. Nature Methods 4, iii-iv, 2007.
- /8/ Friedenberger M., Bode M., Krusche A., Schubert W.: Fluorescence detection of protein clusters in individual cells and tissue sections by using toponome imaging system (TIS): sample preparation and measuring procedures. Nature Protocols 2007; 2 (9): 2285-2294.
- /9/ Schubert W.: A three symbol code for organized proteomes based on cyclical imaging of protein locations. Cytometry A, 2007; 71(6): 352-360.
- /10/ Ecker R.C., Rogojuanu B., Streit M., Osterreicher K., Steiner G.E.: An improved method for discrimination of cell populations in tissue sections using microscopy-based multicolor tissue cytometry. Cytometry A 2006; 69 (3): 119-123.
- /11/ Ecker R.C., Tarnok A.: Cytomics goes 3D: toward tissomics. Cytometry A 2005; 65 (1): 1-3.
- /12/ Mittag A., Lenz D., Gerstner A.O., Tarnok A.: Hyperchromatic cytometry principles for cytomics using slide based cytometry. Cytometry A 2006; 69 (7): 691-703.

- /13/ Laffers W., Mittag A., Lenz D., Tarnok A., Gerstner A.O.: Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry A* 2006; 69 (3): 127-130.
- /14/ Bedner E., Du L., Traganos F., Darzynkiewicz Z.: Caffeine dissociates complexes between DNA and intercalating dyes: application for bleaching fluorochrome-stained cells for their subsequent restaining and analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2001; 43(1): 38.
- /15/ Haars, R., Schneider, A., Bode, M., Schubert, W.: Secretion and differential localization of the proteolytic cleavage products A β 40 and A β 42 of the Alzheimer amyloid precursor protein in human fetal myogenic cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 400-406 (2000).
- /16/ Murphy R.F.: Putting proteins on a map. *Nat. Biotechnol* 2006; 24(10), 1223-1224 (Kommentar zu Ref 6).
- /17/ Zhou M., Veenstra T.D.: Multiplexed immunofluorescence microscopy for the interrogation of cellular protein complexes. *Expert Rev. Proteomics* 2006; 3, 581-583 (Kommentar zu Ref 6).
- /18/ Newman M.E.J.: Power laws, Pareto distributions and Zipf's law. *Contemp. Phys.* 2005; 46: 323-351.
- /19/ Zipf G.K.: *Human Behaviour and the Principle of Least Effort*. Addison-Wesley, Cambridge MA, 1949.
- /20/ Schubert W.: Antigenic determinants of T lymphocyte α/β receptor and other leukocyte surface proteins as differential markers of skeletal muscle regeneration: detection of spatially and timely restricted patterns by MAM microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 1992; 58: 395-410.
- /21/ De Angelis L., Berghella L., Coletta M., Lattanzi L., Zanchi M., Cusella-De Angelis M.G., Ponzetto C., Cossu G.: Skeletal muscle progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J. Cell Biol.* 1999; 147: 869-878.
- /22/ Sampaolesi M., Blot S., D'Antona G., Granger N., Tonlorenzi R., Thibaud J.L., Galvez B.G., Barthélemy I., Perani L., Mantero S., Guttinger M., Pansarasa O., Rinaldi C., Cusella De Angelis M.G., Torrente Y., Bardignon C., Botinelli R., Cossu G.: Mesangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 2006; 444: 552-553.
- /23/ Schubert, W.: Method of blocking cytotoxic activity in patients with amyotrophic lateral sclerosis using antibodies to Fc γ R3. US patent no. 6,638,506 (first published as international patent application WO 99/2973, (1999).
- /24/ Schubert W.: The human TOPONOME project: deciphering the organized core proteome until 2020. Invited lecture, HUPO world congress, Seoul Oct. 2007.
- /25/ Nattkemper, T., Ritter, H., Schubert, W.: A neural classifier enabling high-throughput topological analysis of lymphocytes in tissue sections. *IEEE Trans. Inf.Techn.in Biomed.* 5: 2, 138-149 (2001).
- /26/ Nattkemper, T.W., Twellmann, T., Schubert, W., Ritter, H.: Human vs.machine: Evaluation of fluorescence micrographs. *Computers in Biology and Medicine* 33: 31-43 (2003).
- /27/ Dress, A., Lokot, T., Pustyl'nikov, L.D., Schubert, W.: Poisson numbers and poisson distributions in subset surprisology. *Ann. Combinatorics* 8: 473-485 (2004).
- /28/ Dress A., Lokot T., Schubert W., Serocka P.: Two theorems about similarity maps. *Ann. Combinatorics* (im Druck)
- Aktueller Lehrbuchartikel zum Thema*
Schubert W.: Toponomanalyse. *Bioanalytik*, In Lottspeich F, Engels J.W. (Hrsg) 2. Aufl. Elsevier, 1036-1046 (2006).



Hochschuldozent Dr. med. Walter Schubert

studierte Medizin an den Universitäten Aachen und Bonn sowie Musik in Salzburg. Als Leiter des neuromuskulären Labors der neurologischen Universitätsklinik Bonn erhielt er 1986 ein Projekt der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur mikroskopischen Erforschung von Protein-Konstellationen in Zellen mit Hilfe mehrerer Laserlinien. Theoretische Arbeiten zur kontinuierlichen

Lokalisierung von Proteinen *in situ* und deren Anwendung in der Medizinischen Forschung führten ihn von 1988 bis 1992 als Research Associate und Thyssen-Stipendiat an das Zentrum für Molekulare Biologie Heidelberg (ZMBH), wo er die entsprechenden Protokolle für zahlreiche Gewebetypen erarbeiten konnte. 1993 wurde er zum C2-Hochschuldozenten für das Fach Medizinische Neurobiologie an der Universität Magdeburg ernannt, wo hervorragende Möglichkeiten für die Etablierung der Proteinkolokalisation als Roboterverfahren bestanden. Hier war er von 1994-1997 Sprecher des Innovationskollegs „Bildinformation“ (INK15), gründete die Arbeitsgruppe „Molekulare Mustererkennung“ am Institut für Medizinische Neurobiologie und beteiligte sich am Aufbau des Studiengangs Computervisualistik. Im Jahr 1999 gründete er die Biotech-Firma Meltec GmbH aus. Als Geschäftsführer und CSO der Firma erhielt er im Jahr 2000 den Biochance und 2003 einen Proteomics Award des BMBF und etablierte Kooperationen mit Industriepartnern. Im Jahr 2004 wurde er zusammen mit Vertretern des Wellcome Trusts in einen wissenschaftlichen Aufsichtsrat der Universität Warwick (England) berufen. Seit 2004 ist er mit einem Projekt im Rahmen des „Human Brain Proteome“-Projekts Mitglied des NGFN2-Forschungsnetzes des BMBF und seit 2007 Mitglied der Human Proteome Organization (HUPO). 2007 erhielt er eine Gastprofessur für „Toponomics“ am CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology Shanghai, einem Partner-Institut der Max-Planck-Gesellschaft in China.