

Zuchtfortschritt aus dem Labor • Blick in die gentechnologische Werkzeugkiste • Vom Nutzen der Pflanzenvielfalt • Neues aus der Antibiotikaforschung • Neue Wirtsorganismen für funktionelle (Meta)Genomanalyse • Systembiologie der Harnwegs und Wundinfektion • Neues über das Sprachgen • Leichte Kette mit schweren Folgen: Zebrafische • Offene Lösung für quantitative Genomanalyse • Dem Bilharziose-Erreger auf der Spur

**Streptomyceten: wichtige Produzenten von Antiinfektiva**  
Neues aus der Antibiotikaforschung · Seite 11

*Foto: Pelzer, S et al. (2004) Prokaryotic and eucaryotic cells in biotech production. In: Kayser, O., Müller, R.H. (eds.) Pharmaceutical Biotechnology, Drug Discovery and Clinical Applications. Wiley-VCH-Weinheim, 9-33. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.*

injiziert. Im sich entwickelnden Zebrafischembryo konnten nun durch das im Plasmid enthaltene Reporterprotein GFP Kardiomyozyten mit Expression der verschiedenen cMLC-1 Formen *in vivo* analysiert werden. Es zeigte sich, dass nur die wild-typ Form (cMLC-1<sup>wt</sup>) und die phosphomimetische Form (cMLC-1<sup>S195D</sup>) in der Lage sind, die Kontraktilität von *laz* Kardiomyozyten zu verbessern. Die Phosphorylierungs-defiziente Form (cMLC-1<sup>S195A</sup>) war nicht in der Lage, die Kontraktilität zu erhöhen. In diesen Ergebnissen zeigte sich somit eine besondere Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin 195 in cMLC-1.

### Ausblick

Die Zebrafisch-Mutante „*lazy susan*“ bietet erstmalig Einblick in einen neuen, cMLC-1-abhängigen Mechanismus, der für die Aufrechterhaltung der Kontraktilität von Kardiomyozyten *in vivo* essentiell ist. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wäre es vorstellbar, durch medikamentöse Beeinflussung der Serin 195 Phosphorylierungsstelle eine Verbesserung der Herzleistung zu erreichen.

### Referenzen

1. Hernandez, OM et al. (2007) Myosin essential light chain in health and disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292:H1643-54. doi:10.1152/ajp-heart.00931.2006
2. Rottbauer, W et al. (2006) Cardiac myosin light chain-2: a novel essential component of thick-myofibril assembly and contractility of the heart. *Circ Res.* 2006; 99:323-31. doi: 10.1161/01.RES.0000234807.16034.fe
3. Bendig, G et al. (2006) Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev.* 2006; 20:2361-72. doi: 10.1101/gad.1448306
4. Hassel, D et al. (2008) Deficient zebrafish ether-a-go-go-related gene channel gating causes short-QT syndrome in zebrafish *reggae* mutants. *Circulation.* 2008; 117:866-75. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.752220
5. Meder, B et al. (2009). A single serine in the carboxyl terminus of cardiac essential myosin light chain-1 controls cardiomyocyte contractility *in vivo*. *Circ Res.* 2009; 104:650-659.

### Kontakt

Dr. med. Benjamin Meder, Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Rottbauer  
Abteilung Innere Medizin III, Universitätsklinikum Heidelberg  
E-Mail: benjamin.meder@med.uni-heidelberg.de  
E-Mail: wolfgang.rottbauer@med.uni-heidelberg.de

# OpenSource-Lösung für die quantitative Genomanalyse

**ddCt: Ein Softwarepaket zur relativen Quantifizierung des Expressionslevels von Genen anhand von RT-qPCR Daten**



Nationales Genomforschungsnetz

Rudolf Biczok, Markus Ruschhaupt, Stefan Wiemann und Jitao David Zhang

Die Real-Time quantitative Polymerase-Kettenreaktionen (kurz: RT-qPCR) ermöglicht im Gegensatz zur einfachen PCR neben der Vervielfältigung von Nukleinsäuren auch die quantitative Bestimmung der Genexpressionen. Häufig wird dieses Verfahren dazu verwendet, um festzustellen, ob und in wie fern Gene z.B. in Krebszellen unterschiedlich reguliert werden. Dies wird ermöglicht, indem Fluoreszenz-Messungen direkt während eines jeden Vervielfältigungszyklus durchgeführt werden. Die daraus resultierenden Ct-Werte (Cycle Threshold) dienen anschließend als Input für verschiedene Algorithmen, welche eine Quantifizierung des Expressionslevels der untersuchten Gene durchführen. Am häufigsten werden diese Berechnungen mit Hilfe einer Standardkurve oder nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode[1] durchgeführt, wobei letztere Methode zwar wesentlich zeitsparender aber schwieriger zu realisieren ist. Bislang wurde die Quantifizierung des Expressionslevels mit Hilfe der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode häufig mittels Tabellenkalkulationen oder kleineren Skripten durchgeführt, da sich die Anschaffung kommerzieller Anwendungen in den meisten Fällen nicht lohnt. Eine visuelle Darstellung der Ergebnisse ist daher meist nicht gegeben. Um diese Lücke zu schließen, entwickelten wir am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg im Rahmen des NGFN Verbundes IG-Cellular Systems Genomics das Softwarepa-

ket ddCt. ddCt ist das erste freie Softwarepaket, welches zahlreiche Funktionen zur Qualifizierung und Visualisierung von RT-qPCR Daten bereitstellt.

### R und Bioconductor als Rückgrat für biologisch-statistische Auswertungen

Die ddCt-Software wurde als R-Paket im Rahmen der Bioconductor-Community[2] entwickelt. Die Programmiersprache R wird von vielen Statistikern und Biologen verwendet, um Informationen aller Art statistisch auszuwerten und die Ergebnisse mittels Grafiken und Schaubildern zu visualisieren. R zeichnet sich dabei vor allem durch seine leichte Erweiterbarkeit mit neuen Algorithmen und durch eine Vielzahl an Visualisierungsmöglichkeiten aus, was die Akzeptanz von R zunehmend steigert. Die Community hinter R ist dabei mittlerweile auf eine Größe angewachsen, dass sich aus ihr eine eigenständige Gemeinschaft namens Bioconductor gebildet hat, die sich speziell mit Themen der Analyse und Visualisierung von Daten aus der Genomforschung beschäftigt. Die Auswertung von Datensätzen aus Microarrays, Zellbasierten-Assays und jüngst auch Next-Generation Sequenzierung sind einige der vielen Themen für die sich die Bioconductor-Community mit Erfolg einsetzt. Dieser Erfolg ist nicht zuletzt mit dem open-source Charakter der R-Pakete verknüpft, die frei zugänglich und von jedermann genutzt und erweitert werden können. Erweiterungspakete, die in die Bioconductor Gemeinschaft aufgenommen werden sollen, müssen jedoch spezielle Richtlinien einhalten, um den Anwendern, meist Biologen und Mediziner, später den Umgang mit dem Paketen zu erleichtern und um einheitliche Standards zu gewährleisten. So muss z.B. jedes Paket über eine so genannte Vignette verfügen, die sowohl eine Dokumentation als auch ein ausführbares Beispieldokument enthält. Dadurch wird den Forschern eine umfassende und kontextbezogene Einführung in das jeweilige Paket geboten. Das Softwarepaket ddCt ist eine solche Erweiterung, die einen Begutachtungsprozess durchlaufen hat und anschließend in Bioconductor aufgenommen wurde.

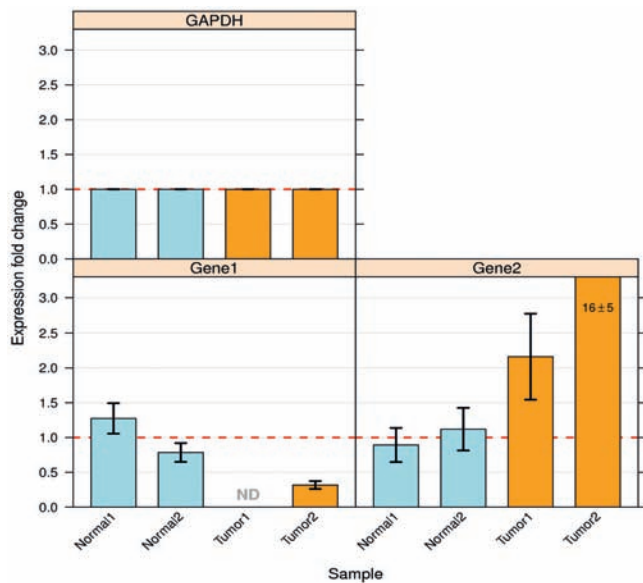


Abb. 1: Grafische Darstellung der Expressionsveränderungen zwischen zwei verschiedenen Testgruppen. Die blau markierten Balken mit der Aufschrift „Normal1“ und „Normal2“ stehen stellvertretend für Proben aus gesundem Gewebe, während die gelben Balken „Tumor1“ und „Tumor2“ Proben aus erkrankten Geweben widerspiegeln. Man erkennt sofort, dass das Gen „Gene2“ in beiden Tumorproben hoch exprimiert wird, während die Expression des Gens „Gene1“ dort vergleichsweise niedrig reguliert ist. Bei Genen, für die keine Expression nachgewiesen wurde, kann dies mit einem ND (Undetermined / Not Detectable) verdeutlicht werden, wie es für das „Gene1“ mit Probe „Tumor1“ gezeigt ist. Das Gen „GAPDH“ ist als Referenz-Gen festgelegt und dient zur Normalisierung. Die Grafik wurde mithilfe der in Listing 1 abgebildeten R-Befehle erstellt.

### ddCt für $\Delta\Delta\text{Ct}$ Berechnungen

Das ddCt-Paket ermöglicht die automatische Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Algorithmus. Als Input dienen die von TaqMan-Sonden stammenden Daten. Dabei wird bei der Berechnung stets mindestens ein Referenz-Gen (in den meisten Fällen ein konstitutiv exprimiertes Gen wie GAPDH oder COPB2) mitgeführt, welches in allen Proben gleichermaßen exprimiert sein sollte und somit als gemeinsame Basis für die Quantifizierung genutzt werden kann. Zudem müssen eine oder mehrere Referenz-Proben angegeben werden, die mit den Test-Proben verglichen werden können. Das Ergebnis der Berechnung ist ein in R gekapseltes Objekt, welches als Text-, CSV- oder HTML-Datei ausgegeben und mit Hilfe zahlreicher weiterer zur Verfügung stehender Funktionen visualisiert werden kann. So ist es beispielsweise möglich das gewonnene R-Objekt als gitterbasiertes Säulendiagramm (siehe Abbildung 1) anzuzeigen oder es in einer Vielzahl anderer Formate abzuspeichern (z.B. PNG, JPEG oder PDF). Diese Funktionalität hat sich bereits in mehreren Projekten des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) bewährt, die insbesondere im Verbund IG-Cellular Systems Genomics durchgeführt werden. Beispielsweise konnte Dr. Ulrich Tschulena mit Hilfe von ddCt das Expressionslevel von Genen bestimmen, die bei der Apoptose und der Regulation des Zellzyklus eine Rolle spielen[3]. Die Forschergruppe nutzte in diesem Zusammenhang vor allem auch die Visualisierungsmöglichkeiten der Software, um die entsprechenden Schaubilder zu den Expressionslevels zu generieren. Auch wurde in Projekten von Dr. Özgür Sahin auf das ddCt-Paket zurück-

### Listing 1

```
> library("ddCt")
> sdmframe <- SDMFrame(c("ex1.csv", "ex2.csv"))
> result <- ddCtExpression(sdmframe,
  calibrationSample=c("Normal1", "Normal2"),
  housekeepingGenes=c("GAPDH"))
> errBarchart(result)
```

Listing 1: Auflistung aller R-Aufrufe[5], die für die Erzeugung des in Abbildung 1 dargestellten Diagramms notwendig waren. Die Rohdaten in „ex1.csv“ und „ex2.csv“ werden mit dem Aufruf von „SDMFrame“ eingelesen. „ddCtExpression“ führt den  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Algorithmus mit den in „sdmframe“ gespeicherten Ct-Werten aus und speichert das Ergebnis der RT-qPCR-Berechnung in dem R-Objekt „result“. Daraus wird dann mithilfe des Aufrufes „errBarchart“ das Säulendiagramm erzeugt.

gegriffen, um das Muster von microRNA-Expression in verschiedenen Gastrointestinalen Stromatumor Typen (GIST) zu identifizieren[4]. Darüber hinaus verfügt ddCt aber auch über die Möglichkeit die Berechnung samt Grafikausgabe automatisch ablaufen zu lassen, wodurch auch große Datensätze automatisiert ausgewertet werden können. Dabei hat der Anwender die Wahl zwischen einem Kommandozeilen-basierten R-Skript oder mehreren ausführbaren Vignetten [5]. Schon wenige Befehle (siehe Listing 1) ermöglichen so einen Vergleich der Expressionslevels mehrerer Proben sowie eine visuelle Darstellung der Ergebnisse wie in Abbildung 1. Neben diesen zahlreichen Funktionen steht dem Benutzer eine detaillierte Dokumentation und eine Schritt-für-Schritt Anleitung zur Verfügung, die eine schnelle und einfache Anwendung erleichtert. Das R-Paket steht unter folgendem link als open source zum Download bereit: [www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/ddCt.html](http://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/ddCt.html)

### Danksagung

Die Entwicklung des ddCt Paketes wurde vom BMBF im Rahmen des Programms der Medizinischen Genomforschung (NGFN) im Verbund IG-Cellular Systems Genomics (01GS0864) gefördert.

### Referenzen

- [1] Kenneth J. Livak and Thomas D. Schmittgen. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta\text{Ct}]$  Method*. *Methods*, 25(4):402 – 408, 2001 [2] Bioconductor-Community for the analysis and comprehension of genomic data. Link: [www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org) [3] Jitao David Zhang et al. *qPCR identification of genes involved in apoptosis and cell cycle regulation*. *BIOCHEMICA* No 2/2009. Link: [www.bionity.com/articles/e/101945/](http://www.bionity.com/articles/e/101945/) [4] Florian Haller et al. *Localisation- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of coexpressed miRNAs located at 14q32.31*. *The Journal of Pathology*, in press. Link: [www3.interscience.wiley.com/journal/122543203/abstract](http://www3.interscience.wiley.com/journal/122543203/abstract) [5] ddCt Package Vignette. Abteilung Molekulare Genomanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg.

### Kontakt

Stefan Wiemann  
Abteilung Molekulare Genomanalyse  
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg  
[s.wiemann@dkfz.de](mailto:s.wiemann@dkfz.de)



## MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

An der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, Institutsbereich Pflanzenphysiologie, Abteilung Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen, ist zum nächstmöglichen Zeitpunkt die auf 3 Jahre befristete Stelle einer/eines

### Wissenschaftlichen Mitarbeiterin/Mitarbeiters

zu besetzen. Eine Verlängerung ist möglich. Vollzeitbeschäftigung

Die Eingruppierung erfolgt je nach Aufgabenübertragung und Erfüllung der persönlichen Voraussetzungen bis zur Entgeltgruppe 13 TV-L, einschließlich landesspezifischer Tarifverträge. Bis zum Inkrafttreten der neuen Entgeltordnung ist die hier dargestellte Eingruppierung vorläufig und begründet keinen Vertrauensschutz und keinen Besitzstand (auf § 17 Abs. 3 und 4 TVÜ-L wird hingewiesen). Das Hauptforschungsthema der Abteilung ist der Transport von kerncodierten Organellproteinen über pflanzliche Membranen. Schwerpunkte der Analyse sind dabei (i) das intrazelluläre targeting zum richtigen Organell (=> dual targeting), (ii) Struktur und Funktion der plastidären Proteintransportapparate, (iii) die Mechanismen der innerplastidären Proteinsortierung (=> Thylakoidtransport), (iv) die Charakterisierung des [Delta]pH-abhängigen Tat-Transportwegs, (v) die Beteiligung des Cytoskeletts an Organellbewegung und Stromulibildung. Die Analyse erfolgt durch molekulargenetische, biochemische und zellbiologische Methoden und umfasst sowohl in vitro-Transportversuche als auch transgene Ansätze (*Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* PCC 6803). Die Möglichkeit zur Habilitation ist gegeben.

#### Voraussetzungen:

- Diplom in Biologie oder Biochemie
- Nachweis der weiteren wissenschaftlichen Tätigkeit
- detaillierte Kenntnisse in pflanzlicher Physiologie, Biochemie und Zellbiologie
- praktische Erfahrung in aktuellen molekularen, biochemischen und zellbiologischen Methoden

#### Arbeitsaufgaben:

- Mitarbeit bei der Konzeption und Durchführung von Forschungsprojekten im Rahmen der Forschungsschwerpunkte der Abteilung
- Vorbereitung und Betreuung von Lehrveranstaltungen des Institutes
- Unterstützung der Arbeitsaufgaben der Professur in Lehre, Forschung und Selbstverwaltung

Bewerbungen von Schwerbehinderten werden bei gleicher Eignung und Befähigung bevorzugt berücksichtigt. Frauen werden nachdrücklich aufgefordert, sich zu bewerben.

Nähere Auskünfte erhalten Sie von  
Herrn Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen

#### Institut für Biologie-Institutsbereich, Pflanzenphysiologie

Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Tel.: 0345 55-26200,  
E-Mail: klosgen@pflanzenphys.uni-halle.de

Ihre Bewerbung richten Sie bitte unter Angabe der  
Reg.-Nr.: N-413/2009 mit den üblichen Unterlagen an die

#### Martin-Luther-Universität, Naturwissenschaftliche Fakultät I

#### Institut für Biologie – Bereich Pflanzenphysiologie,

Herrn Prof. Dr. Klösgen, 06099 Halle (Saale).

Die Ausschreibung erfolgt unter Vorbehalt eventueller haushaltsrechtlicher Restriktionen. Bewerbungskosten werden von der Martin-Luther-Universität nicht erstattet. Bewerbungsunterlagen werden nur zurückgesandt, wenn ein ausreichend frankierter Rückumschlag beigefügt wurde.

# Impressum

#### GENOMXPRESS 3.09

#### Band 9, Ausgabe 3 – September 2009

Der GENOMXPRESS ist ein vierteljährlich erscheinendes Magazin mit Informationen aus der deutschen Genomforschung und Systembiologie. Der GENOMXPRESS erscheint im März, Juni, September und Dezember. Redaktionsschluss für die Ausgabe 4.09 ist der 13. November 2009.

#### Herausgeber

Die Koordinierungsstellen der Forschungsnetzwerke  
GABI, NGFN, GenoMik, FUGATO und der  
Helmholtz-Allianz Systembiologie

#### Redaktion

Dr. Matthias Arlt, Dr. Dirk Büssis (GABI)  
GABI Geschäftsstelle  
c/o MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie  
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam

Dr. Silke Argo (NGFN)  
NGFN Geschäftsstelle, c/o DKFZ, B050  
Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg

Dr. Werner Selbitschka, Dr. Dietrich Trzeciok,  
Dr. Petra Ehrenreich, Dr. Gabriele Gerlach  
(GenoMik) · c/o Universität Bielefeld  
Postfach 100131, 33501 Bielefeld

Dr. Janet Staack (FUGATO)  
FUGATO Sekretariat  
Adenaueralle 174, 53113 Bonn

Dr. Jan Eufinger (Helmholtz-Allianz  
Systembiologie / SBCancer)  
c/o Deutsches Krebsforschungszentrum, B080  
Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg

Der Inhalt von namentlich gekennzeichneten Artikeln  
liegt in der Verantwortung der jeweiligen Autoren.

Layout und Satz Dirk Biermann ([www.dirkbiermann.net](http://www.dirkbiermann.net))  
Druck GS Druck und Medien GmbH, Potsdam

ISSN 1617-562X

Aboservice Das Magazin wird durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert und kostenlos abgegeben. Wenn Sie das Magazin beziehen möchten, wenden Sie sich bitte an:

Dr. Matthias Arlt · GABI Geschäftsstelle  
c/o MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie  
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam  
marlt@mpimp-golm.mpg.de

# GENOMXPRESSPORTAL

- Kostenloses Abo der Druckausgabe
- Alle bisherigen Ausgaben und Sonderhefte als PDF
- Umfangreiche Suchfunktion im Archiv
- Informationen zu den Netzwerken

[www.genomxpress.de](http://www.genomxpress.de)



gefördert durch:



Alliance on Systems Biology