

Inhaltsverzeichnis

Nachrichten aus der Gesellschaft	1
---	----------

Originalarbeit

<i>Peter Benz und Thomas Renné, Würzburg</i> Wie die Gefäßschranke zusammengehalten wird: Komplexe aus Spektrin und VASP regeln die Stabilität von Zell-Zell Kontakten	3
---	---

Aus der Arbeit der Gesellschaft

<i>Doris Hendig und Christian Götting, Bad Oeynhausen</i> The role of systemic and local calcification inhibitor proteins and ABC transporter genes in Pseudoxanthoma elasticum (PXE)	7
<i>Kai Bartkowiak und B. Brandt, Hamburg</i> Proteomanalyse zur Untersuchung der differentiellen Regulation von Proliferation und Migration am Beispiel von Brustkrebszelllinien	13
<i>Peter Tschentscher, Felix Klebig, Christoph Wagener, Hamburg</i> Molekularbiologischer Nachweis okkulter Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom	18

9. Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Kloster Banz, 15. – 17. Juni 2008

Zusammenfassungen der Vorträge

<i>Sven Baumann, Leipzig</i> Massenspektrometrische Analyse glykosylierter Peptide in Kombination mit stabilen Isotoplabeling-Verfahren zur Identifizierung krankheitsassoziierter Marker	23
<i>Peter Benz, Würzburg</i> Komplexe aus Spektrin und VASP regulieren die Endothelschrankenfunktion <i>in vivo</i>	24
<i>Alexander Buhl, Peter B. Lippa, München</i> Anti-dsDNA-Bestimmung mittels Biosensortechnologie – Auf dem Weg zu einer Referenzmethode?	25
<i>Ilaria Dalla Rosa, Stefan Sobek, Peter Schröder, Verena Schildgen, Melanie Wurm, Frank Essmann, Hongliang Zhang, Christian Mielke, Helmut Hanenberg, Jean Krutmann, Yves Pomier, Fritz Boege, und Morten O. Christensen, Düsseldorf</i> Fehlregulierte Expression mitochondrialer Topoisomerase I als Ursache mitochondrialer Funktionsstörungen	26

<i>Marcus Dittrich, Würzburg</i> PlateletWeb: Interaktionen und Proteinkinasen	27
<i>P. Goetz, G. Mennicken, E. Kuhlisch, E. Henkel, G. Siegert, Dresden</i> Einfluss des Minorallels des Polymorphismus TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) auf den TAFI Antigenspiegel	28
<i>Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, Weiskirchen R, Gressner AM, Aachen</i> Characterization of signalling-pathways for CTGF/CCN2 expression in hepato- cytes of normal and injured livers	29
<i>Sandra C. Haas, Christian Cappello, Andreas Zwergal, Judith D. Kandemir, Michael Wehmeier, Lutz Schwettmann, Sharon Page, Korbinian Brand, Hannover</i> Steuerung der konstruktiven NF- κ B-Aktivität durch C/EBP β - I κ B- α als Effek- tormolekül	30
<i>D. Hendig, T. Langmann, S. Kocken, R. Zarbock, C. Szliska, G. Schmitz, K. Kleesiek and C. Götting, Bad Oeynhausen</i> Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseu- doxanthoma elasticum (PXE) patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis	31
<i>Lesca Holdt, Leipzig</i> QTL-Identifizierung und Validierung von ADAM17: ein neuer Faktor der Athe- roskleroseresistenz?	32
<i>J. Hurst, K.J. Lackner, P. von Landenberg, Mainz</i> Evidence for Toll-Like-Receptors mediated thrombogenic activity of Antiphos- pholipid Antibodies	32
<i>Berend Isermann, Ilya A. Vinnikov, Thati Madhusudhan, Muhammed Kashif, Stefanie U. E. Herzog, Edward Conway, und Peter P. Nawroth, Heidelberg</i> Das TM-PC System schützt vor diabetischer Nephropathie durch zwei unab- hängige Mechanismen: Die Bedeutung der Lektin-ähnlichen Domäne	33
<i>Krebs, A., Grisk, O., Schaefer, H., Nauck, M., Greifswald</i> A PCA-model to distinguish Mrp2-deficient rats on the basis of proton NMR spectra of urine	35
<i>Dirk Meyer zum Büschenfelde, Rudolf Tauber und Otmar Huber, Berlin</i> Trefoil Factor (TFF)-vermittelte Modulation von Zell-Zell-Kontakten	36
<i>Faiza M. Khalfalah, Ellen Wannagat, Frank Essmann, Wilhelm G. Dirks, Morten O. Christensen, Fritz Boege, Christian Mielke, Düsseldorf</i> Regulation und mitotische Funktionen des Replikationsinitiationsfaktors Cdc6	37
<i>Silvia Gilka Muñoz Saravia, Berlin</i> Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren bei Chagas-Krankheit	38
<i>Andreas Peter, Cora Weigert, Harald Staiger, Kilian Rittig, Alexander Cegan, Philipp Lutz, Fausto Machicao, Hans-Ulrich Häring, Erwin Schleicher, Tübingen</i> Induction of stearyl-CoA desaturase (SCD-1) protects human arterial endo- thelial cells against lipotoxicity	39

<i>Prante C., Müller B., Kuhn J., Götting C. and Kleesiek K., Bad Oeynhausen</i> Human xylosyltransferases and their differential expression during heart fibrosis	40
<i>Gerhard Pütz, Oliver Schmah, Jürgen Eckes, Heinrich Wieland & Karl Winkler, Freiburg</i> CARL: Controlled application and removal of liposomal therapeutics – erste klinische Ergebnisse	40
<i>Thomas Renné, Würzburg</i> Role of factor XII in thrombosis and inflammation	42
<i>Lorenz Risch, Innsbruck</i> Niedermolekulare Proteine als Marker der glomerulären Filtrationsrate.....	43
<i>Heidi Rossmann, Mainz</i> G-Quadruplex- und i-Motiv-Strukturen und präferenzielle Amplifikation eines Allels – Ursache für fehlerhafte Genotypisierungen	43
<i>René Teich, Marburg</i> Epigenetik und Asthma – Mechanismen der Allergie-Prävention durch Stallbakterien	44
<i>F. Thieme, A. Fiebig, T. Lu, H. von Eller-Eberstein, B. Flesch, M. Spannagl, E. Lindhoff-Last, S. Schreiber, C. M. Schambeck, Kiel</i> Eine genomweite Assoziationsstudie zur Identifizierung von Kandidatengenen für hohe Faktor VIII-Spiegel bei venösen Thromboembolien.....	45
<i>Jörg Weiske and Otmar Huber, Berlin</i> Fhit represses β -catenin activity.....	46

Nachrichten

Themenhefte „Klinische Chemie und molekulare Diagnostik“	45
--	----

Nachruf

<i>Bernd Puschendorf</i>	46
--------------------------------	----

Positionen	49
-------------------------	----

Preis Ausschreibung

Ausschreibung: Wissenschaftspreis der Lesser-Loewe-Foundation e.V.....	50
--	----

Tagungs- und Kursankündigungen

7. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Chipdiagnostik und 3. gemeinsame Jahrestagung der Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik der DGKL vom 29. – 30. Mai 2008 in der Evangelischen Akademie Tutzing	53
15. BNLD-Jahrestagung am Samstag, 14. Juni 2008.....	54
Hj. Staudinger Symposium, Kloster Banz, 15. bis 17. Juni 2008	55
15. Rostocker Gerinnungssymposium – Klinische Probleme in der Hämostaseologie - Plättchen und ihre klinische Bedeutung	57
5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), 21. bis 24. September 2008	58
6. Anwendertreffen LC-MS/MS in der Labormedizin, 24. September 2008	59
13. Intensivkurs für klinische Hämostaseologie, der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Giessen, 17. - 21.11.2008	60
Repetitorium Klinische Chemie 2008	62
Mikroskopische Blutzellendifferenzierung 2008	62

Personalia

Neumitglieder	63
Adressenänderungen	64
Adressenkorrekturen.....	66
Titel- und Adressenänderungen.....	66
„Verschollene Mitglieder“	66

Veranstaltungskalender	VII
-------------------------------------	-----

**Deutsche Vereinigte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.****Präsidium**

Präsident	Prof. Dr. K. Lackner, Mainz
Vizepräsident	Prof. Dr. R. Tauber, Berlin
Schriftführer	Prof. Dr. K.P. Kohse, Oldenburg
Schatzmeister	Prof. Dr. H. Patscheke, Karlsruhe
Weitere Präsidiumsmitglieder	Prof. Dr. V. Armstrong, Göttingen Dr. B. Wiegel, Deggendorf

Geschäftsstelle

Geschäftsführer	Dr. Jens Klabunde Geschäftsstelle der DGKL Im Mühlenbach 52 b, D-53127 Bonn Telefon: 0228-92 68 95-0 e-mail: geschaeftsstelle@dgkl.de
-----------------	---

Ständige Kommissionen

Kommission für die Weiterbildung und Anerkennung als Klinischer Chemiker	
Vorsitz	Prof. Dr. I. Schimke, Berlin
Kommission für die Ausbildung	
Vorsitz	Prof. Dr. Dr. N.R. Katz, Gießen

Referenzinstitut für Bioanalytik

Geschäftsstelle	Dr. R. Kruse Dr. W.-J. Geilenkeuser Im Mühlenbach 52 a, D-53127 Bonn Telefon: 0228-92 68 95 -0; Telefax: 0228-92 68 95 -29
-----------------	---

Wissenschaftlicher Beirat	
Vorsitz	Prof. Dr. L. Siekmann, Bonn

Mitteilungen

Schriftleitung	Prof. Dr. Dr. med. Thomas Demant Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt Institut für Klinische Chemie und Labormedizin Friedrichstraße 41, D-01067 Dresden Telefon: 0351-480 3900; Telefax: 0351-480 3909 e-mail: demant-th@khdf.de
----------------	---

DGKL im Internet: <http://www.dgkl.de>

RfB im Internet: <http://www.dgkl-rfb.de>

Impressum:

Klinische Chemie - Mitteilungen

Herausgeber: Der Präsident der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V., Prof. Dr. med. K. Lackner, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz-Klinikum, Langenbeckstr. 1, D-55131 Mainz

Verantwortliche Schriftleitung und Redaktion: Prof. Dr. Dr. med. Thomas Demant, Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt, Institut für Klinische Chemie und Labormedizin, Friedrichstraße 41, D-01067 Dresden.

Manuskripte: erbeten an die Schriftleitung (möglichst Word-Datei per e-mail oder CD). Für die Zeitschrift werden nur unveröffentlichte und nicht anderweitig angebotene Manuskripte angenommen. Mit der Annahme des Manuskriptes geht das ausschließliche Recht des Nachdruckes, der Vervielfältigung und Übersetzung auf den Herausgeber über. Die veröffentlichten Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte, wie Nachdruck von Abbildungen, Vervielfältigungen jeder Art, Vortrag, Funk, Tonträger- und Fernsehsendungen in Datenverarbeitungsanlagen, auch auszugsweise, behält sich der Herausgeber vor. Bezugsbedingungen: Der Bezugspreis für Mitglieder ist durch den Beitrag abgegolten. Jahresabonnement: 6 Hefte zu € 46,- inkl. 7% MwSt. zuzüglich Versandkosten. Die Bezugsdauer verlängert sich jeweils um ein Jahr, wenn bis 30. September des Vorjahres keine Abbestellung erfolgt ist. Einzelheft: € 7,70 inkl. 7% MwSt. zuzüglich Versandkosten.

Konto: Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V., Dresdner Bank Karlsruhe (BLZ 660 800 52) Nr. 572 616 500

Erscheinungsweise: zweimonatlich. Annoncenpreise auf Anfrage.

ISSN: 0173-6647

Layout: Büro-, Verlags- und Tagungsservice Dagmar Strebel, Belfortstraße 10, D-76133 Karlsruhe,
e-mail: bvt-dagmar-strebel@t-online.de

Druck: E & B print.ware Digital- und Schnelldruck Gesellschaft mbH, Kämpfelestraße 10, D-76131 Karlsruhe

Nachrichten aus der Gesellschaft

Sehr geehrte Mitglieder der DGKL,



wie bereits auf der letzten Mitgliederversammlung in Wien berichtet, hat sich das Präsidium im Hinblick auf die wachsenden Anforderungen an die Arbeit unserer Fachgesellschaft dazu entschlossen, eine professionelle Geschäftsleitung aufzubauen. Ich freue mich Ihnen heute mitteilen zu können, dass als ersten Schritt in diese Richtung zum 1. April 2008 der neue Geschäftsführer der DGKL Herr Dr. Jens Klabunde (Bild) seine Arbeit aufgenommen hat. Herr Klabunde ist promovierter Biologe. Er hat in Göttingen bis zum Diplom studiert, das er mit der Note „Sehr gut“ abschloss. Anschließend hat er am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbio-

logie und am Institut für Tropenmedizin in Tübingen über ein molekularbiologisches Thema mit der Note „magna cum laude“ promoviert. Er hat sich dann im Jahr 2000 zunächst für eine Laufbahn in der Industrie entschieden, die ihn zu Thermo Electron, der Eppendorf AG und Dade Behring führte, wo er breite Erfahrungen sammeln konnte und beruflich rasch vorankam.

Herr Dr. Klabunde wird das Präsidium bei seinen Aufgaben nun hauptamtlich unterstützen. Dazu wird die Geschäftsstelle der DGKL unter seiner Leitung in Kürze von Karlsruhe nach Bonn an den Sitz des Referenzinstituts für Bioanalytik verlegt werden. Eine der Hauptaufgaben der Geschäftsführung wird es sein, das Präsidium bei der Modernisierung der DGKL zu unterstützen mit dem Ziel, unsere Fachgesellschaft für die Mitglieder und alle in der Labordiagnostik tätigen Wissenschaftler attraktiver zu machen. Auch die Außendarstellung der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin als zentrales diagnostisches Fach mit hoher Innovationskraft in der gesamten Medizin aber auch der Öffentlichkeit wird zukünftig stärker in den Fokus der Arbeit von Präsidium und Geschäftsführung der DGKL rücken. Und schließlich wird es erforderlich werden, das Referenzinstitut für Bioanalytik der DGKL auf die Herausforderungen der nächsten Jahre als moderne und konkurrenzfähige Ringversuchsinstitution nicht nur in Deutschland sondern auch in Europa vorzubereiten.

Selbstverständlich ist der Geschäftsführer auch Ansprechpartner für die Mitglieder der DGKL in Fragen, die die Fachgesellschaft betreffen. Für eine vergleichsweise kleine Fachgesellschaft wie die unsere ist

der konstruktive Dialog mit den Mitgliedern von großer Bedeutung. Auch hier soll die Einführung eines hauptamtlichen Geschäftsführers die Lücken schließen helfen, die ein ehrenamtliches Präsidium niemals vollständig ausfüllen kann.

Das Präsidium wünscht Herrn Dr. Klambunde einen guten Start für seine neue Auf-

gabe in unserer Fachgesellschaft und hofft, dass auch die Mitglieder ihn, wo und wenn es einmal nötig ist, nach Kräften bei seiner Arbeit unterstützen.

Prof. Dr. Karl J. Lackner

Originalarbeit

Wie die Gefäßschranke zusammengehalten wird: Komplexe aus Spektrin und VASP regeln die Stabilität von Zell-Zell Kontakten

Peter Benz und Thomas Renné

Sonderforschungsbereich 688 und Institut für Klinische Biochemie – Zentrallabor
Uniklinikum Würzburg, Würzburg

Die Gefäßschranke regelt den Durchtritt von Zellen und Proteinen aus dem Blut ins Gewebe. Störungen der Schrankenfunktion zum Beispiel bei Entzündungen erhöhen ihre Durchlässigkeit, was zur Bildung von Ödemen führt. Auf zellulärer Ebene wird die Gefäßschranke durch die Endothelschicht kontrolliert, die Blutgefäße auf ihrer Innenseite auskleidet. Wichtig für die Durchlässigkeit der Endothelbarriere sind Kontakte zwischen den Endothelzellen, sogenannte „Junctions“ (Tight- oder Adherens-Junctions). Das Öffnen und Schließen der endothelialen „Junctions“ erfolgt durch Veränderungen im zellulären Zytoskelett, wodurch gezielt Aktinfasern neu gebildet und abgebaut werden. Abbildung 1 zeigt exemplarisch, wie sich das Zytoskelett in aktivierten Endothelzellen umlagert, Zell-Zell Kontakte öffnen und Lücken zwischen den Zellen bilden. Dies erhöht die Durchlässigkeit der Endothelbarriere.

Wie funktioniert der Umbau des endothelialen Zytoskeletts und wie wird dieser Prozess molekular reguliert? Eine wichtige Rolle bei Zytoskelettveränderungen nimmt das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ein. VASP ist ein Aktin-bindendes Protein, das in vielen Zelltypen die Bildung von Aktinfasern verstärkt. Die VASP Aktivität wird durch spezifische Phosphorylierungen reguliert und in Thrombozyten wird diese als

Marker diagnostisch eingesetzt, um Resistenzen gegen den Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel (Iscover®, Plavix®) zu bestimmen. Welche Funktion die VASP Phosphorylierung in Gefäßen einnimmt, war bislang wenig verstanden.

Diese Fragestellung hat Peter Benz im Rahmen seiner Doktorarbeit in Chemie in der Nachwuchsgruppe des Sonderforschungsbereiches 688 am Institut für Klinische Biochemie – Zentrallabor in Würzburg bearbeitet. Mittels Affinitätschromatographie wurden VASP-bindende Proteine aus Endothelzellen isoliert, die abhängig vom VASP Phosphorylierungszustand an das Adapterprotein binden. Durch Massenspektroskopie konnten so >100 Interaktionspartner identifiziert werden von denen α II-Spektrin weiter untersucht wurde.

α II-Spektrin ist eine endotheltypische Form der Spektrinfamilie. Spektrine stabilisieren die Zellmembran und Mutationen führen z.B. in Erythrozyten zum Krankheitsbild der Sphärozytose. In konfluenten Endothelzellen kolokalisieren und kopräzipitieren VASP und α II-Spektrin. Mittels Deletionsmutanten und „Peptide-Scan“ Analysen wurde die α II-Spektrin-VASP Bindungsstelle kartiert. Die α II-Spektrin-SH3 Domäne bindet an ein „triple- GP5“ Motiv in der Prolin-reichen

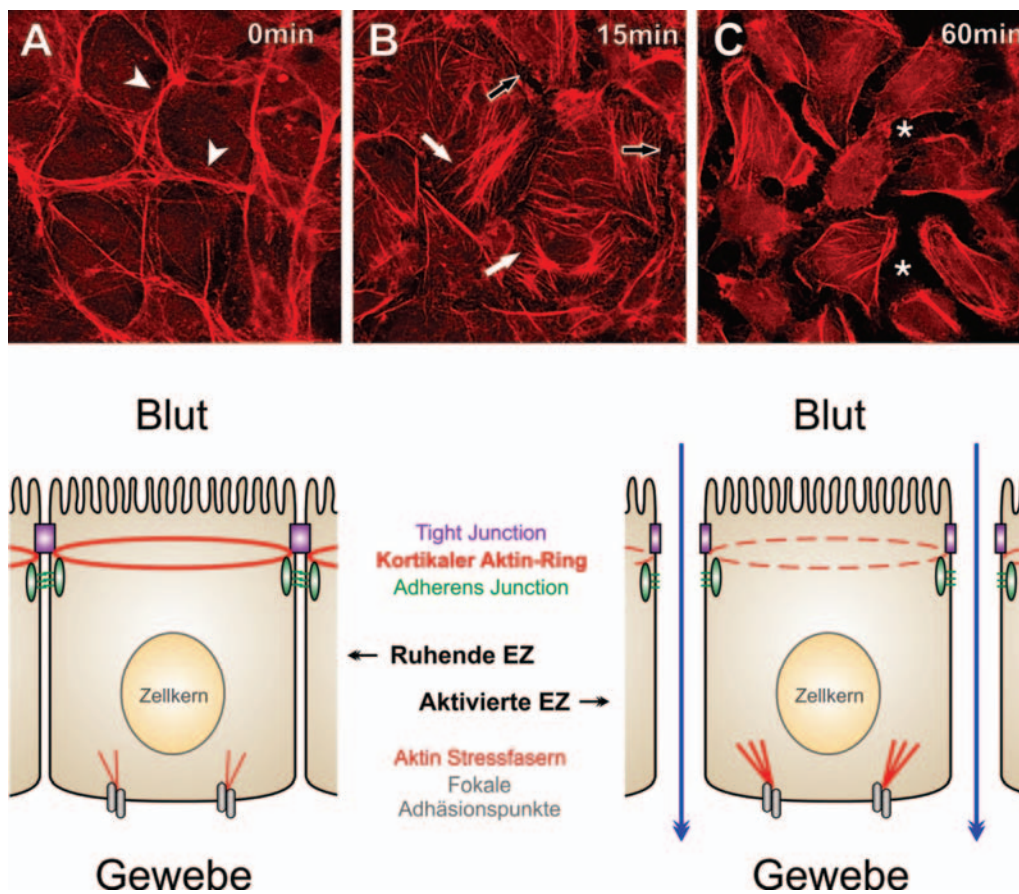


Abbildung 1: Umorganisation des Aktin Zytoskeletts in Endothelzellen erhöht die Permeabilität. Oben: Extrazelluläres Kalzium wurde bei konfluente humanen ECV304 Endothelzellen (EZ) entfernt. Anschließend wurden die Aktin-Fasern (rot dargestellt) zu den angegebenen Zeitpunkten mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Vor Stimulation erscheinen die interendothelialen Kontakte geschlossen und die Aktinfasern bilden einen charakteristischen kortikalen Ring, auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran (A, Pfeilspitzen). Schon 15 min nach Aktivierung beginnen sich die Zell-Zellkontakte zu öffnen (B, schwarze Pfeile) und das Zytoskelett organisiert sich zu Stressfasern (B, weiße Pfeile) um, wobei der perijunctale Aktin Ring verschwindet. Nach 60 Minuten haben sich größere Lücken (C, Sternchen) gebildet und die Permeabilität (Durchlässigkeit) der Endothelschicht steigt an. In der unteren Abbildung ist dieser Prozess schematisch dargestellt.

Domäne von VASP, die in Nachbarschaft zur Phosphorylierungsstelle Serin157 (S157) liegt, die durch die cAMP-abhängige Kinase (PKA) phosphoryliert wird. α II-Spektrin bindet nur an nicht S157 phosphoryliertes VASP und die PKA-vermittelte S157 Phosphorylierung führt zum vollständigen Verlust der Bindung. Welche zelluläre Funk-

tion kommt der α II-Spektrin-VASP Interaktion im Endothel zu? Mittels Immunfluoreszenz und Kopräzipitationsexperimenten konnten wir demonstrieren, dass der VASP S157 Phosphorylierungsgrad hoch ist, wenn Endothelzellen vereinzelt vorliegen und beweglich sind. Mit der Bildung von Zell-Zell Kontakten nimmt die S157 Phosphorylierung

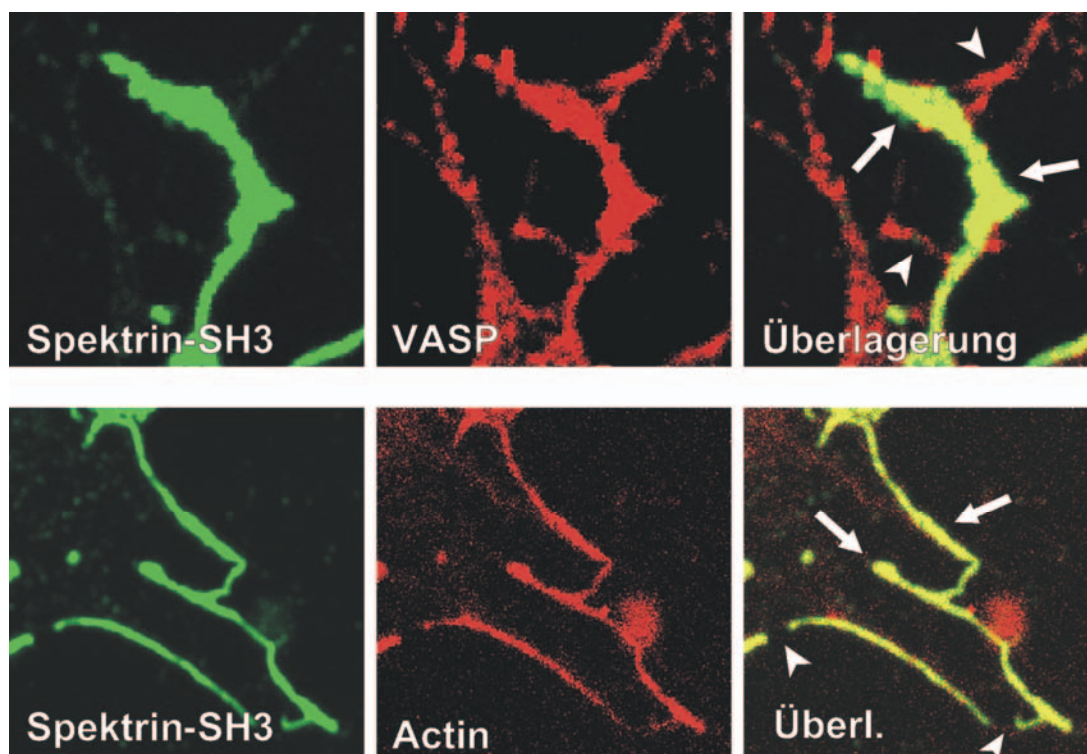


Abbildung 2: Die α II-Spektrin-VASP Interaktion rekrutiert VASP an die Plasmamembran und verstärkt die Ausbildung eines kortikale Aktin Zytoskeletts. *Oben:* Ektope Expression der VASP-bindenden SH3 Domäne von α II-Spektrin an der Zellmembran rekrutiert VASP und VASP kolokalisiert mit seinem Bindungspartner Spektrin fast vollständig (Überlagerung). *Unten:* Die Rekrutierung von VASP zur Plasmamembran induziert die Akkumulation von Aktin und führt zur Ausbildung eines kortikalen Zytoskeletts. Eine Verstärkung der Aktinfasern findet nur dort statt, wo VASP und α II-Spektrin-SH3 vorliegen (z.B. an den mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen) nicht aber in Kompartimenten, in denen α II-Spektrin fehlt (gekennzeichnet durch Pfeilspitzen in der Überlagerung).

jedoch ab. Der S157 Phosphorylierungszustand reguliert die α II-Spektrin-VASP Interaktion in Zellen. Die Proteine bilden einen Komplex, wenn sich Kontakte ausbilden und Endothelzellen konfluent werden, nicht aber in singulären Zellen. Die VASP Rekrutierung zur Plasmamembran durch Bindung an α II-Spektrin induziert die Ausbildung eines kortikalen Aktinzytoskeletts an Zell-Zell Kontakten (Abbildung 2).

Die Spektrin-VASP vermittelte Ausbildung eines kortikalen Zytoskeletts stabilisiert

interendotheliale Kontakte und senkt die Permeabilität für makromolekulare „Tracer“ (z.B. fluoreszenzmarkiertes Albumin). Im Umkehrschluss konnten wir zeigen, dass die Permeabilität von VASP defizienten Endothelzellen erhöht ist. Verlust der α II-Spektrin-VASP Komplexe ist auch auf Gesamttier-Ebene relevant für die Blut-Gefäßschanke. Nach Stimulation mit dem Entzündungsmediator Bradykinin entwickeln VASP defiziente Mäuse deutlich größere Ödeme als wild-typ Kontrolltiere (Abbildung 3).

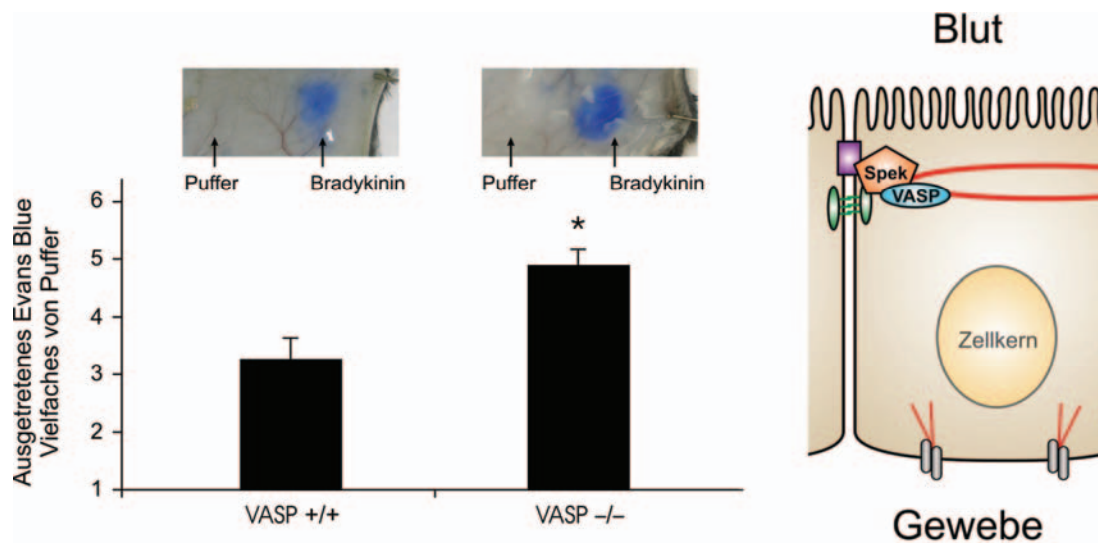


Abbildung 3: α II-Spektrin-VASP Komplexe stabilisieren interendotheliale Kontakte. Links: Erhöhte vaskuläre Permeabilität in VASP-null Mäusen. Intradermale Injektion von Bradykinin (1 μ M, 50 μ l) in die Rückenhaut von VASP-null (VASP^{-/-}) und wild-type Tieren (VASP^{+/+}) induziert den Ausstrom von Evans Blue markiertem Albumin, das vor Stimulation intravenös appliziert wurde, aus den Gefäßen ins Gewebe. Der „Tracer“ Evans Blue wurde in den gebildeten Ödemen fluoresszenzphotometrisch quantifiziert. Rechts: VASP und Spektrin bilden Komplexe an Endothelkontakten und induzieren dort die Ausbildung von Aktinfasern, die ihrerseits den Zellzusammenhalt verstärken und die Permeabilität reduzieren.

Um nachzuweisen, dass spezifisch die α II-Spektrin-VASP Interaktion für die Stabilität von interendothelialen Kontakten verantwortlich ist, wurden „Rescue“-Experimente durchgeführt. Rekonstitution von VASP^{-/-}-Zellen mit wild-type VASP normalisiert die erhöhte Permeabilität. Im Gegensatz dazu können VASP Mutanten, die nicht mehr an α II-Spektrin binden, auch den Permeabilitäts-Phänotyp der VASP^{-/-}-Zellen nicht kompensieren. Diese Daten liefern einen neuen Mechanismus zur Stabilisierung von endothelialen Kontakten mit Bedeutung für die Permeabilitätsregulation und stellen α II-Spektrin und VASP ins Zentrum dieses Prozesses. In einer unabhängigen Arbeit konnte Dr. Frank Gertler (M.I.T. Cambridge, USA) an Mäuse mit defekter Ena/VASP Funktion zeigen, dass VASP auf Gesamttierebene für die vaskuläre Permeabilität essentiell ist

(Furman et al., J. Cell. Biol., 2007). In ihrer Gesamtheit belegen diese neuen Forschungsergebnisse, dass α II-Spektrin-VASP-vermittelte kortikale Aktin-Polymerisation für die Barrierenfunktion und so die vaskuläre Permeabilität eine zentrale Rolle einnehmen.

Literatur

Benz, P. M., Blume, C., Moebius, J., Oschatz, C., Schuh, K., Sickmann, A., Walter, U., Feller, S., M., and Renné, T. (2008) Cortical actin cytoskeletons are assembled by protein kinase A-regulated α II-spectrin/VASP complexes. J. Cell. Biol., 180, 205-219

Anschrift des Verfassers

PD. Dr. rer. nat. Dr. med. Thomas Renné, SFB688, Institut für klinische Biochemie- Zentrallabor, Josef-Schneider Strasse 2, D-97080 Würzburg, Telefon: 0931-201-36116, E-Mail: thomas@renne.net

Aus der Arbeit der Gesellschaft

The role of systemic and local calcification inhibitor proteins and ABC transporter genes in Pseudoxanthoma elasticum (PXE)

Projekt gefördert durch die DGKL – Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik –

Doris Hendig und Christian Götting

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen, Germany.

Parts of this work have been published in
Clin. Chem. (2006) 52(2): 227-34, Clin. Chem. (2007) 53(5): 829-36.

Introduction

Pseudoxanthoma elasticum (PXE, OMIM 264800) is an autosomally heritable disorder of the connective tissue (1). Until now, others and we have identified more than 200 PXE-associated mutations in the PXE candidate gene *ABCC6* (2-4). *ABCC6* belongs to the ATP-binding cassette transporter subfamily C genes and encodes a 165-kDa transmembrane protein, which is termed multidrug resistance-associated protein 6 (MRP6) (5). MRP6 is a member of the large ATP binding-cassette (ABC) transporter superfamily. To date, 49 ABC transporter proteins were identified to accompany to this family of membrane transporter proteins performing various functions in human cells. Nothing is known about a possible compensatory expression of other ABC transporter proteins in MRP6 deficient cells. PXE is histological characterized by progressive calcification of elastic fibres and massive accumulation of proteoglycans in the extracellular matrix. The age of onset of PXE and the clinical expression of the disease are highly

variable. Thus, other genes and environmental factors are assumed to contribute to the expression and severity of PXE. MRP6 is highly expressed in the liver and kidneys and, to a lesser extent, in tissues affected by PXE (5). Due to these findings, PXE was considered a metabolic disorder with undetermined circulating molecules leading to the mineralisation of elastic fibers (6). Such factors could also be involved in the extracellular matrix alterations typical for PXE. Interestingly, serum concentrations of calcium and phosphate exceed their solubility product in biological fluids. The regulation of unwanted extraosseous calcification is a complex process in which several proteins and metabolites are involved. Moreover, numerous disorders characterized by pathological calcification have pointed out altered expression of calcification inhibitor proteins as fetuin-A (alpha2-Heremans Schmid glycoprotein, AHSG), matrix Gla protein (MGP) and secreted phosphoprotein 1 (SPP1, 7-9). The question is whether a MRP6 deficiency has an effect on the expression of proteins, which are actively involved in inhibiting calcification.

In this project, we evaluated the association between serum fetuin-A, MGP and the PXE phenotype in order to discover the link between the absence or functional insufficiency of MRP6 and the mineralisation of elastic fibres in PXE. Moreover, we investigated whether *AHSG*, *MGP* or *SPP1* polymorphisms and haplotypes contribute to PXE susceptibility as secondary genetic risk factors. In a third part of this project, we have analyzed the gene expression profile of ABC transporter genes in dermal fibroblasts from PXE patients and healthy controls by Taqman Low-Density array to uncover a possible compensatory expression due to *ABCC6*/MRP6 deficiency.

Methods

Measurement of fetuin-A and total MGP concentrations in serum was performed using commercially available ELISA kits (Epitope Diagnostics, San Diego, USA; Biomedica, Vienna, Austria). Denaturing high-performance liquid chromatography screening was used to screen the *SPP1* promoter region for sequence variations. Several PCR as well as RFLP assays were developed to determine the distribution of polymorphisms in the *AHSG*, *MGP*, and the *SPP1* gene. In a third part of this project, we investigated the gene expression profile of 47 ABC transporters in dermal fibroblasts of healthy controls and PXE patients ($n=2$ and 4 , respectively) by TaqMan low-density array in cooperation with Prof. Dr. G. Schmitz and PD Dr. T. Langmann, Universität Regensburg, Germany (10). We re-analysed the gene expression of selected ABC transporters in a larger set of dermal fibroblasts from controls and PXE patients ($n=6$, each) by conventional quantitative real-time PCR (qPCR). The altered ABC transporter gene expression profile was further examined after inhibition of MRP efflux activity using benzbromarone (BNZ) and *ABCC6* specific small interfering (si)RNA in normal dermal fibroblasts. Statistical analysis was performed using Student's t-test and Mann-Whitney-U-test where appropriate. Allele and haplotype

frequencies were calculated and compared between cases and controls using the Fisher's exact test and Haploview 3.2 software.

Results

Serum fetuin-A in PXE patients was significantly decreased in comparison to the groups of relatives and controls ($p<0.0001$). The scatter plots of levels of serum fetuin-A in the three groups are shown in Fig. 1A. The mean values were 0.55 ± 0.11 g/L for PXE patients (a decrease of approximately 32.5%) and 0.80 ± 0.23 g/L for the controls respectively. Fetuin-A levels in serum from relatives were also significantly greater compared to the PXE patients' group (mean value 0.70 ± 0.23 g/L, $p<0.0001$). Interestingly, the value observed in the group of relatives was intermediate between that of the patients and the controls (Fig. 1A). Moreover, serum fetuin-A in relatives was also decreased compared to the group of controls (a decrease of approximately 12.5%, $p=0.01$). We noticed decreasing fetuin-A levels in association with the number of organs involved, although it did not reach significance. Significantly lower total MGP concentrations were found in the serum of the PXE patients compared to the healthy controls (3.85 ± 1.5 nmol/L and 4.72 ± 1.3 nmol/L respectively, $p=0.0002$, Figure 1B). A positive and significant correlation was found between MGP serum concentrations and age of PXE onset. Total serum MGP concentrations were also significantly decreased in relatives compared to the healthy control population ($p=0.02$, Figure 1B), whereas serum MGP concentrations did not differ between PXE patients and relatives. Since most of the relatives were identified as heterozygous carriers of one *ABCC6* mutation we divided this group in symptom-free carriers and symptom-free non-carriers and re-analysed the obtained data. We found no significant differences in serum fetuin-A and slightly lower MGP concentrations in heterozygote carriers of *ABCC6* mutations, although not statistically significant.

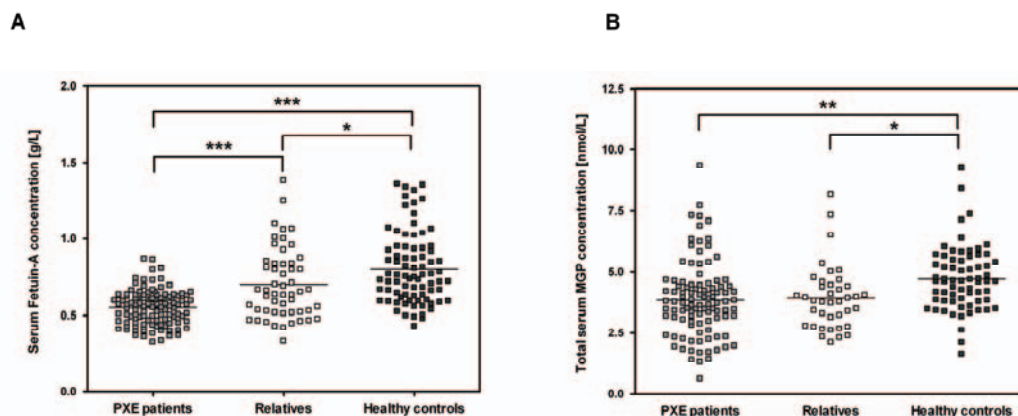


Figure 1, Serum concentrations of fetuin-A and matrix gla protein in PXE patients, unaffected first-degree relatives and healthy controls.

(A) Comparison of serum fetuin-A concentrations (g/L) in patients with PXE (n=110), unaffected first-degree relatives (n=53) and healthy controls (n=80). Scatter plots illustrate the distribution of fetuin-A levels for the three groups. The central line represents the mean value. *** $p < 0.0001$, * $p = 0.01$. (B) Comparison of total serum MGP concentrations (nmol/L) in patients with PXE (n=101), unaffected first-degree relatives (n=34) and healthy controls (n=67). Scatter plots illustrate the distribution of MGP levels for the subjects in the three groups. The central line represents the mean value. ** $p = 0.0002$, * $p = 0.02$.

The frequencies of the *AHSG* polymorphisms p.T248M and p.T256S and the *MGP* promoter polymorphisms c.-7G>A and c.-138T>C did not differ between PXE patients, relatives and controls. However, the *MGP* haplotype combination GT was more frequent in the control population compared to the group of PXE patients (frequencies 0.360 and 0.489, respectively; $p_{\text{corrected}} = 0.03$). Mutational screening of the *SPP1* promoter region revealed nine different sequence variations. Three *SPP1* promoter polymorphisms (c.-1748A>G, c.-155_156insG and c.244_245insTG) were significantly more frequent in PXE patients compared to age- and sex-matched healthy controls ($p_{\text{corrected}} < 0.05$ each). We found an increased risk for PXE among carriers of allele c.-1748G (odds ratio (OR)=2.16, 95% confidence interval [95% CI] 1.34–3.48), allele c.-155_156GG (OR=2.41, 95% CI=1.51–3.82) and allele c.244_245TGTG (OR=1.97, 95% CI=1.23–3.15). Haplotype analysis of 6 *SPP1* promoter polymorphisms (c.-1748A>G; c.-616G>T, c.-443C>T, c.-155_156GG, c.-66T>G

and c.244_245TGTG revealed one haplotype to be significantly reduced among PXE patients ($p_{\text{corrected}} = 0.035$, OR=1.80, 95% CI=1.19–2.71).

The TaqMan Low-Density array analysis revealed the expression of 37 ABC transporter genes in dermal fibroblasts. *ABCC6* gene expression was not detectable in fibroblasts derived from PXE patients. Seven genes (*ABCA6*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCC2*, *ABCC9*, *ABCB5* and *ABCD2*) were induced whereas the gene expression of one gene (*ABCA3*) was decreased comparing controls and PXE patients (relative quantity value difference at least 2 fold, Figure 2A and B). Re-analysis using conventional qPCR showed high inter-individual variability between samples, but reflected the changes in gene expression obtained in the array analysis. Usage of benzobromarone and *ABCC6* specific siRNA to inhibit *ABCC6*/MRP6 activity and expression reproduced the gene expression alterations.

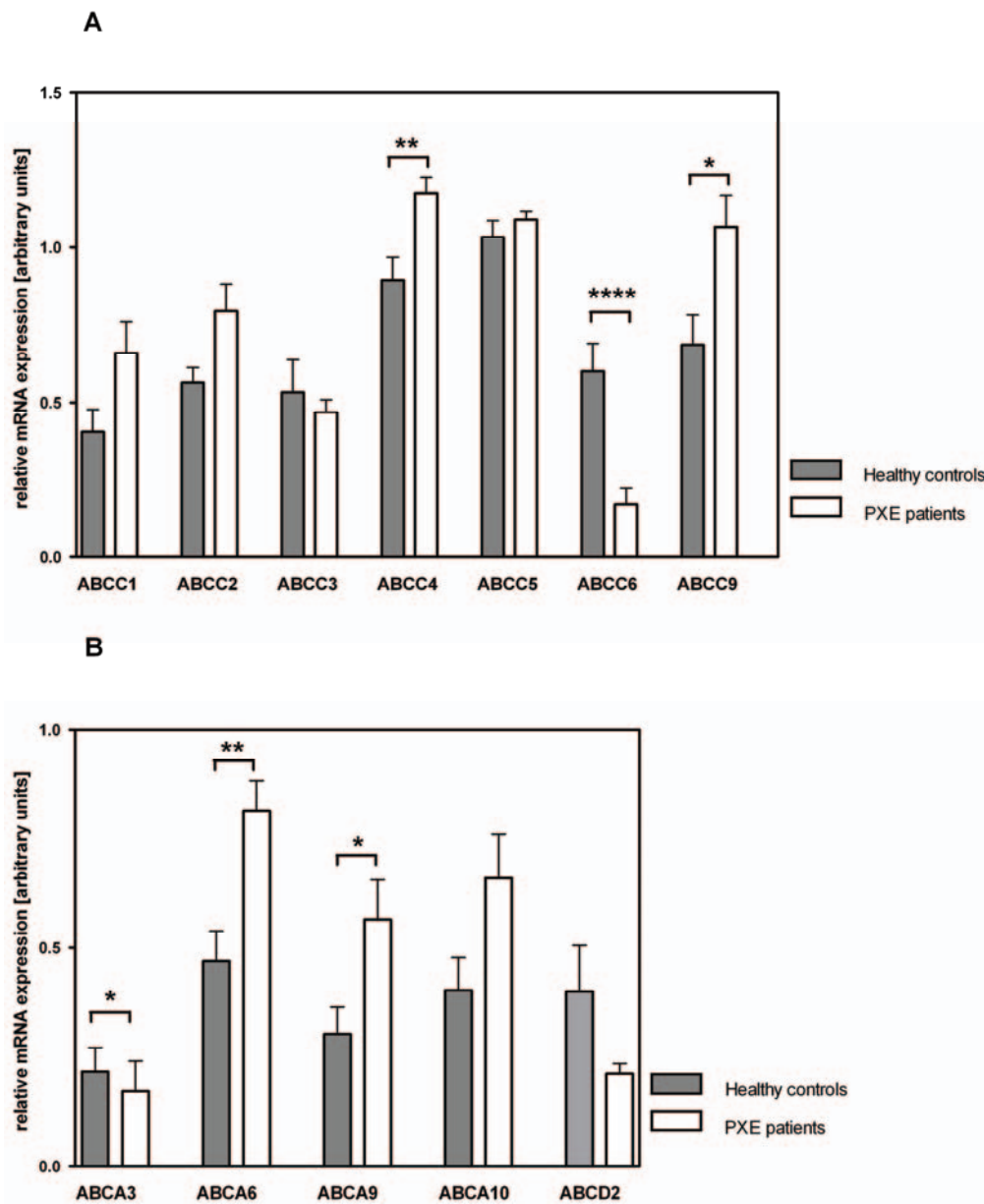


Figure 2, Altered mRNA expression profile of ABCC (A) and ABCA (B) transporter genes in dermal fibroblasts from PXE patients and healthy controls. A) Validation of ABC-C subclass members mRNA expression by quantitative real-time PCRs in dermal fibroblasts derived from skin biopsies of PXE patients and healthy controls (n=6, each). Data are presented in arbitrary units as mean with corresponding standard error. (B) Validation of ABC-A subclass members mRNA expression by quantitative real-time PCRs in dermal fibroblasts derived from skin biopsies of PXE patients and healthy controls (n=6, each). Data are presented in arbitrary units as mean with corresponding standard error. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

Discussion and Conclusion

PXE is caused by mutations in the *ABCC6* gene encoding for MRP6, a transmembrane transporter with a still unknown function. The question remains of what may be inducing calcification of connective tissues in this disorder. Thus, PXE might result from an imbalance of positive and negative regulatory factors. We have found decreased fetuin-A and MGP levels in our cohort of PXE patients compared to relatives and controls. Both proteins are part of so-called calciprotein particles, together with hydroxyapatite (7). These findings led us suggest that reduced levels of fetuin-A and MGP in PXE patients might result from calciprotein particles bound to the mineral deposits. Recent studies have reported altered expression of systemic and local calcification inhibitory proteins as a result of MRP6 deficiency in *ABCC6* knockout mice. Further studies published very recently presented data on the involvement of MGP in elastic fibre calcification in PXE patients and *ABCC6* knockout mice (11-13). Moreover, our findings were supported by a study of Meng et al. discovering MRP6 deficiency as cause of increased *SPP1* expression in mice suffering from dystrophic cardiac calcification (14). These results indicate that MRP6 might be indirectly involved in the calcium-phosphate metabolism; however, the underlying mechanism remains to be investigated. Therefore, our studies have added significant support to the role of proteins actively involved in regulating calcification processes in PXE. The variability in the outcome and progression of PXE may include variations in several of the functional pathways involved in the pathophysiology of the disease. We have found a significant association between *MGP* as well as *SPP1* promoter polymorphisms and PXE. Hence, also other - so-called modifier genes - might affect individual PXE susceptibility, for instance the degree of pathological calcification. Our results underscore the importance of the analysis of gene-gene-environment interactions in understanding the development of complex phenotypes such as PXE. Revealing the whole genetic risk pattern(s) of PXE may

provide new insights into the pathogenesis of the disease and eventually provide treatment opportunities for this until now incurable disease.

Analysing the gene expression profile of ABC transporter genes in dermal fibroblasts of healthy controls and PXE patients revealed that MRP6 deficient cells exhibit a distinct gene expression profile, potentially to compensate for MRP6 dysfunction. The observed alterations in gene expression also reflect high inter-individual variability due to different *ABCC6* genotypes or genetic background. This may contribute to the great clinical variability observed in PXE patients. Several studies reported increased expression of related ABC/MRP proteins as a mechanism to compensate a loss of function. In contrast, a recent study of Li and coworkers reported no alterations in the gene expression of other ABC transporter subfamily C members in *ABCC6* knockout mice (15). We have found altered gene expression in four of the currently known seven ABC protein subclasses in dermal fibroblasts of PXE patients. The fact that most of the genes, whose expression is altered due to MRP6 deficiency, belong to the ABCA subclass points to a role of *ABCC6*/MRP6 in lipid metabolism. This assumption is underlined by the identification of *ABCC9*/SUR2 and *ABCD2* as further candidates in PXE pathogenesis as these genes are also affected by intermediates of lipid biosynthesis. Further studies are now required to uncover the role of other ABC transporters in PXE.

References

- 1 Neldner KH, Struk B. Pseudoxanthoma elasticum. In: Royce P, Steinmann B, eds. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects. 2nd ed. New York: Wiley-Liss., 2002:561-83.
- 2 Le Saux O, Urban Z, Tschuch C, Csiszar K, Bacchelli B, Quaglino D, et al. Mutations in a gene encoding an ABC transporter cause pseudoxanthoma elasticum. [Letter] Nat Genet, 2000;25:223-7.

- 3 Bergen AA, Plomp AS, Schuurman EJ, Terry S, Breuning M, Dauwerse H, et al. Mutations in ABCC6 cause pseudoxanthoma elasticum [Letter]. *Nat Genet*, 2000;25:228-31.
- 4 Schulz V, Hendig D, Henjakovic M, Szliska C, Kleesiek K, Götting C. Mutational analysis of the ABCC6 gene and the proximal ABCC6 gene promoter in German patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) [Mutations in Brief]. *Hum Mutat*, 2006;27:831.
- 5 Kool M, van der Linden M, de Haas M, Baas F, Borst P. Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells. *Cancer Res*, 1999;59:175-82.
- 6 Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum - A connective tissue disease or a metabolic disorder at the genome/environment interface? *J Invest Dermatol*, 2004;122(3):ix-x.
- 7 Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest*, 2003;112(3):357-66.
- 8 Luo G, Dacy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997;386:78-81.
- 9 Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions [Review]. *FASEB J* 1993;7:1475-82.
- 10 Langmann T, Mauerer R, Schmitz G. Human ATP-binding cassette transporter TaqMan low-density array: analysis of macrophage differentiation and foam cell formation. *Clin Chem*, 2006;52:310-3.
- 11 Jiang Q, Li Q, Uitto J. Aberrant mineralisation of connective tissues in a mouse model of pseudoxanthoma elasticum: systemic and local regulatory factors. *J Invest Dermatol*, 2007;127:1392-402.
- 12 Li Q, Jiang Q, Schurgers LJ, Uitto J. Pseudoxanthoma elasticum: reduced gamma-glutamyl carboxylation of matrix gla protein in a mouse model (Abcc6^{-/-}). *Biochem Biophys Res Commun*, 2007;364:208-13.
- 13 Gheduzzi D, Boraldi F, Annovi G, DeVincenzi CP, Schurgers LJ, Vermeer C et al. Matrix Gla protein is involved in elastic fiber calcification in the dermis of pseudoxanthoma elasticum patients. *Lab Invest*, 2007;87:998-1008.
- 14 Meng H., Vera I., Che N., Wang X., Wang S.S., Ingram-Drake L., et al. Identification of Abcc6 as the major causal gene for dystrophic cardiac calcification in mice through integrative genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007;104:4530-5.
- 15 Li Q, Jiang Q, Larusso J, Klement JF, Sartorelli AC, Belinsky MG, et al. Targeted ablation of Abcc1 or Abcc3 in Abcc6^{-/-} mice does not modify the ectopic mineralisation process. *Exp Dermatol*, 2007;16:853-9.

Anschrift der Verfasser:

Privatdozent Dr. rer. nat. Christian Götting, Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Georgstraße 11, D-32545 Bad Oeynhausen, Germany, Telefon: +49-5731-97-2033; Telefax: +49-5731-97-2013, E-mail: cgoetting@hdz-nrw.de

Dr. rer. nat. Doris Hendig, Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Georgstraße 11, D-32545 Bad Oeynhausen, Germany, Telefon: +49-5731-97-2003, Telefax: +49-5731-97-2013, E-mail: dhendig@hdz-nrw.de

Proteomanalyse zur Untersuchung der differenziellen Regulation von Proliferation und Migration am Beispiel von Brustkrebszelllinien

Forschungsbericht zum Projekt: „Phosphoproteomics mittels Massenspektrometrie am Beispiel von erbB-Tyrosinkinaserzeptoren“ der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL

Kai Bartkowiak und B. Brandt

Institut für Tumorbilogie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Einleitung

Rezeptortyrosinkinasen der ErbB Familie (epidermal growth factor EGFR, c-erbB-2, c-erbB-3 und c-erbB-4) sind Schlüsselproteine bei der Metastasierung von Brustkrebs. Dabei spielt die Feinregulation von Proliferation und Migration eine zentrale Rolle. Sie wird vermittelt über die Dimerisierung und gegenseitige Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen, die zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden führt. Der dominante und für die Metastasierung von Brustkrebszellen notwendige Heterodimerisierungspartner ist das Protein ErbB-2. Darüber hinaus ist wenig über die Funktion von ErbB-2 im Prozess der Signaldifferenzierung, die entweder zu Proliferation oder Migration führt, bekannt.

Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektrometrie ist es prinzipiell möglich das Proteom einer Zellpopulation in 1000 bis 2000 unterschiedliche Proteinspezies aufzutrennen und die isolierten Proteine zu identifizieren. Durch Vergleich der Proteome von ErbB-2 exprimierenden Zelllinien mit Kontroll-Zelllinien kann anhand unterschiedlicher Spotmuster im 2D-Gel einerseits die differen-

zielle Expression von Proteinen andererseits die differenzielle Phosphorylierung von Proteinen bestimmt werden. Beides erlaubt Rückschlüsse auf die Aktivierung von intrazellulären Signalproteinen als Reaktion auf die Expression von ErbB-2 und damit auf Schlüsselprozesse der Metastasierung.

In der Arbeitsgruppe Brandt wurde ausgehend von der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 durch heterologe Expression von ErbB-2 ein Tumorzellmodell für die differenzielle Regulation von Proliferation und Migration über Rezeptortyrosinkinasen (RTK) etabliert (Dittmar et al., FASEB, 1999; Dittmar et al., FASEB, 2002). Aus der wenig invasiven (migratorisch ungerichteten) aber schnell proliferierenden Wildtypzelllinie wurde durch heterologe Expression eines erbB-2-Vektors die hochinvasive (migratorisch gerichtete) Tochterzelllinie MDA Her2 hergestellt. In einer weiteren Zelllinie MDA PM wurde gentechnisch der Tyrosinrest an Position 1248 durch ein Phenylalanin ersetzt, so dass der Einfluss der Phosphorylierung an Y1248 ermittelt werden kann. Die Linie MDA neo, die lediglich den Vektor ohne Insert enthielt diente als Kontroll-Zelllinie um den Vektoreinfluss bei der Auswertung zu eliminieren.

Methodik

Im Gegensatz zur Standardanwendung der 2D-Gelelektrophorese Proteine mit einem nicht-linearen pH-Gradienten von 3 bis 10 aufzutrennen wurde zur besseren Auflösung der Proteinspots die Trennstrecke durch zwei unterschiedliche Verfahren der isoelektrischen Fokussierung (IEF) verdoppelt. Im pH-Bereich von 4 – 7 wurde „rehydration loading“ und im pH-Bereich von 6 – 11 „cup loading“ angewendet. Eine Modifikation des „cup loading“ ermöglichte eine reproduzierbare Fokussierung von bis zu 200 µg Protein. Durch die Überlappung der pH-Gradienten zwischen 6 und 7 wurde der häufig zu beobachtende Proteinverlust bei Massen von über 60 kDa am Rand der 2D-Gele im Alkalischen minimiert, wodurch mehr Proteinspots ausgewertet werden konnten.

Bei Proteinexpressionsanalysen mittels 2D-Elektrophorese besteht die Gefahr, dass vor der IEF Modifikationen von Aminogruppen der Aminosäureseitenketten entstehen, die in der nachfolgenden Auswertung der 2D-Gele fälschlich als Phosphorylierung interpretiert werden können. Daher wurde in dieser Arbeit wurde auf irreversibel cysteinmodifizierende Chemikalien wie Iodacetamid vor der IEF verzichtet.

2D-Protein-Referenzkarte für das Proteom menschlicher Brustkrebszellen

Die methodische Verfeinerung der 2D-Elektrophorese zusammen mit Proteinidentifikation durch Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS und ESI-MS) ermöglichte die Erstellung einer hochaufgelösten und umfangreichen 2D-Referenzkarte für das gewählte Zellsystem.

Sie beinhaltet die Proteinpositionen (MW / pI) auf den 2D-Gelen und ist für die Identifizierung weiterer Proteine sehr nützlich, da durch präzise Abschätzung der Größen Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt die Datenbankabgleiche von massenspektrometrischen Datensätzen erheblich vereinfacht wird. Im Rahmen der Auswertung und Verifizierung differenziell exprimierter Proteine wurden 102 Spots mit darin identifizierten 113 Proteinspe-

zies bestimmt. Das Molekulargewicht der identifizierten Proteine reichte von 284 kDa (Spektrin) bis 19 kDa (Fortilin); der pI reichte von 4,29 (Calreticulin) bis zu 9,26 (helix-destabilizing protein). Diese Arbeit lieferte im Vergleich mit Karten anderer menschlicher Zellen (siehe SWISS-2DPAGE) eine der detailliertesten und aussagekräftigsten der verfügbaren 2D-Protein Referenzkarten für das menschliche Proteom.

Eine effiziente Signalverwaltung: das Phosphoproteom

Von 113 mit Massenspektrometrie identifizierten Proteinspezies und etwa 1100 gemessenen Peptiden (bei geschätzten 10 gemessenen Peptiden pro Protein) wurden nur 3 Phosphopeptide, also etwa bei jedem 300. bis 400. Peptid, gefunden. Um eine unabhängige Abschätzung zur Häufigkeit von Proteinphosphorylierung zu erhalten, wurde in weiteren Zelllinien ein 2D-Western Blot mit anschließendem Phosphotyrosin-Antikörnernachweis etabliert. Auch wenn die Proteinphosphorylierung in durchschnittlichen menschlichen Zellen etwa im Verhältnis von 2000 (pSerin) : 200 (pThreonin) : 1 (pTyrosin) auftritt, wurde dem Phosphotyrosin-Antikörnernachweis der Vorzug gegeben, da diese Antikörper die höchste Spezifität der Phosphoprotein-Antikörper aufweisen. Ein solcher Phosphotyrosin-2D-Western Blot war mit hoher Auflösung und guter Reproduzierbarkeit mit jedoch geringer Signalstärke möglich. Um die Effektivität des Antikörnernachweises zu überprüfen, wurde der Anteil der Tyrosinphosphorylierung in der Probe durch Behandlung mit Vanadat/Natriumfluorid erhöht. Die deutlich höhere Signalstärke der Phosphotyrosin-2D-Western Blot belegte die Effizienz der Antikörper. Diese Versuche bestätigten jedoch den geringen Anteil der Phosphotyrosine in den analysierten Zellen.

Somit scheint sowohl das Ausmaß als auch die Variabilität von Proteinphosphorylierung in diesen Zellen begrenzter und damit zielgerichteter zu sein, als nach der Anzahl der Phos-

phorylierungsstellen der Wachstumsfaktor-Rezeptorfamilie und nachfolgender Signaltransduktion anzunehmen war. Dieses fokussierte zelluläre Signaling und die definierte Modifikation der Rezeptordichten in der Zellmembran durch heterologe Proteinexpression führte über die Analyse des Proteinexpressionsmusters zum rezeptorinduzierten Phänotyp.

Verschiebung vom EGFR- zum ErbB-2/ErbB-3-Phänotyp

Zunächst wurden die verwendeten Zelllinien MDA neo, MDA Her2 und MDA PM mittels Western Blot initial charakterisiert. Die

Kontroll-Zelllinien MDA neo aktivierten bevorzugt den MAP-Kinase Pathway (gemessen als Verhältnis von Phospho-Erk 1/2 zu Gesamt-Erk 1/2) bei einer geringeren Aktivierung des AKT-Pathways (gemessen als Verhältnis von Phospho-Akt Ser 473 zu Gesamt-Akt), wie es für EGFR-dominiertes Signaling zu erwarten ist. Durch die Einführung des ErbB-2 Expressionsvektors (MDA Her2) verschob sich das Aktivierungsprofil der Zellen in Richtung des Akt-Pathways bei unveränderter Aktivierung des MAP-Kinase Pathway. Mit der heterologen Expression von ErbB-2 stieg außerdem das Expressionsniveau von ErbB-3. In der Zelllinie

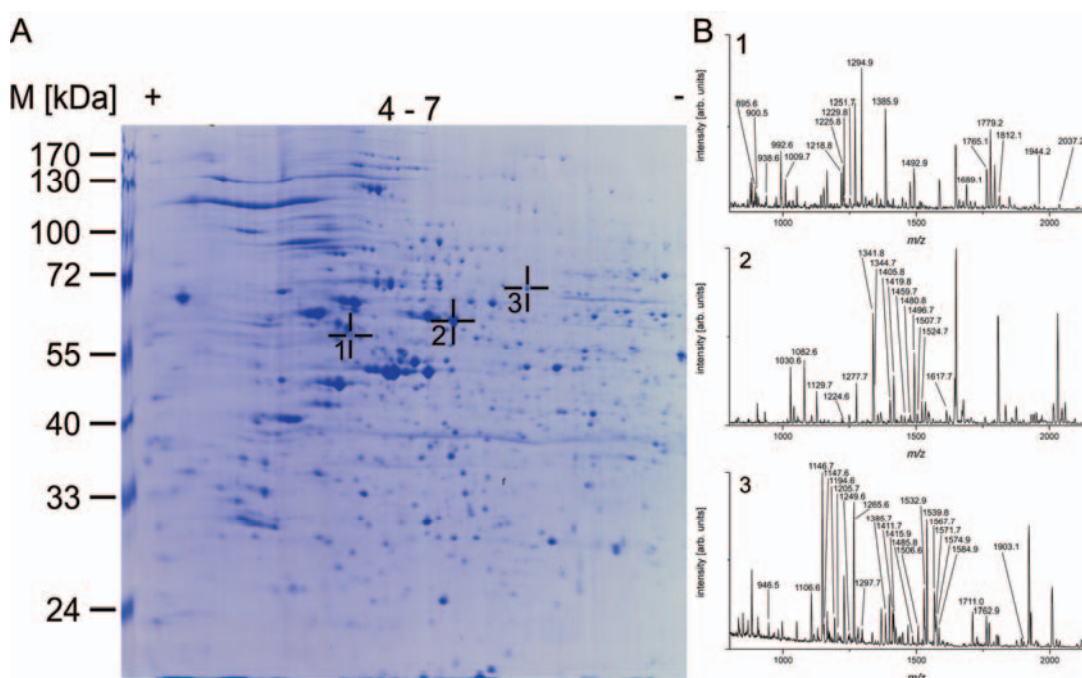


Abbildung 1: Proteinexpressionsanalyse der Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 mit 2D-Elektrophorese und Massenspektrometrie. Exemplarische Darstellung von Arbeiten an Zelllinie MDA-MB-468 PM. Die Wildtypzelllinie, die kein ErbB-2 exprimiert, wurde mit einem ErbB-2-Expressionsvektor transfiziert, bei dem ErbB-2 an Position 1248 einen Aminosäureaustausch von Y nach F enthält. Die Proteinfärbung erfolgte mit kolloidalem Coomassie (A). Proteinidentifikation mittels MALDI-ToF (positive ion mode; reflector mode) peptide maps ausgewählter Proteine. Bei Protein 1 handelt es sich um 26S Protease regulatory subunit 6B, die in der MDA PM-Zelllinie eine geringere Expression als in der MDA Kontroll-Zelllinie aufwies. Protein 2 (Keratin, type II, cytoskeleal 8) kann in Mammakarzinomen als Tumormarker verwendet werden und Protein 3 (T-complex protein 1 alpha) diente als interne Kalibration (B).

MDA PM konnte die Verschiebung der Signaling-Pathways weiter gesteigert werden, was sich auch in einer weiteren Erhöhung der ErbB-3-Expression zeigte.

Somit verschob sich das zelluläre Signaling von einem EGFR dominierten zu einem ErbB-2/ErbB-3 bestimmten Rezeptortyp. Da die Zellen außerdem selbsttätig die Expression von ErbB-3 verstärkten, ist davon auszugehen, dass die heterolog exprimierte ErbB-2-Proteine aktiv und korrekt in das zelluläre Signaling eingreifen und nicht losgelöst von der restlichen Signaltransduktion exprimiert werden.

Phänotypische Effekte der neuen Signalschaltung

Um die phänotypischen Effekte der Signalverschiebung zu bestimmen, wurde zunächst die Wirkung der ErbB-2-Expression auf das Proteinexpressionsmuster ohne zusätzliche Stimulation der Zellen mit EGF untersucht.

Wie aufgrund des strengen experimentellen Designs zu erwarten, zeigten sich nur geringe Unterschiede im Proteinexpressionsmuster. Allerdings bewirkte die Expression der tyrosin-1248-defizienten Variante von ErbB-2 (PM) (Abb. 1) eine erhöhte Expression von Proteasen.

So ist Calpain-2 eine Calcium-regulierte und nicht-lysosomale Thiolprotease, die an dem Umbau des Cytoskeletts und an der Signaltransduktion beteiligte Proteine abbaut. Ein anderes Beispiel ist die erhöhte Expression von Collagenase 3, die in die Familie der Matrix-Metalloproteinase (MMP) eingeordnet wird. Sie ist neben normalen physiologischen Prozessen wie Knorpelabbau auch beteiligt an dem Zusammenbruch der extrazellulären Matrix bei der Metastasierung von Krebszellen. Weiterhin zeigt diese Zelllinie eine erhöhte Expression der Caspase 14a. Die Funktion dieser Caspase ist noch ungeklärt, könnte aber wie andere Caspasen an der Regulation der Apop-

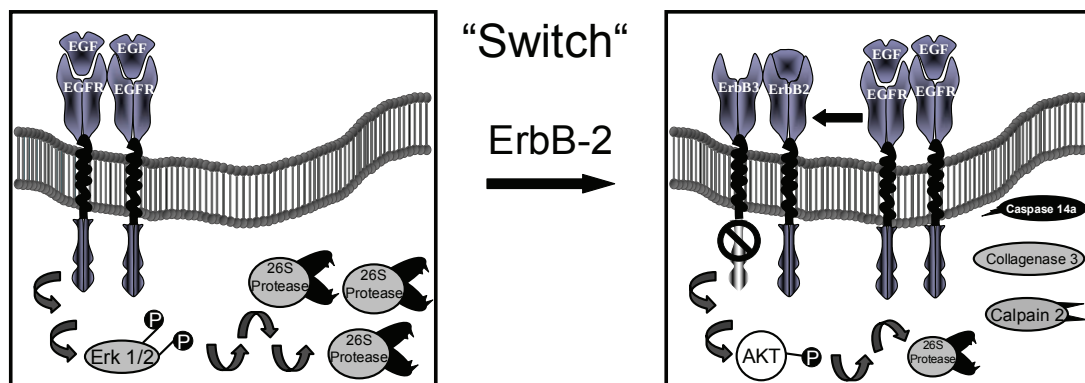


Abbildung 2: Umschalten des Proteinexpressionsprofils in MDA MB 468 Zellen nach heterologer Expression von ErbB-2. In der MDA Kontroll-Zelllinie (links) wird das ErbB-Signaling von EGFR dominiert, was zu bevorzugter Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk 1/2 führt. Weitere Signaltransduktionen bewirken die Expression der 26S-Protease, einem Protein, das an dem irreversiblen Proteinabbau im Proteasom beteiligt ist. Nach Expression von ErbB-2 (rechts) wird endogen und simultan ErbB-3 verstärkt exprimiert, wodurch sich das Aktivierungsprofil in Richtung AKT-Pathway verschiebt. Als Folge verringert sich die Expression der 26S-Protease. Gleichzeitig werden andere Proteasen (Caspase 14a, Collagenase 3 oder Calpain 2) verstärkt exprimiert, die möglicherweise die Zellen auf Metastasierung vorbereiten.

tose beteiligt sein. Bemerkenswert ist, dass in anderen Krebsarten beispielsweise Ovarialkarzinomen die Expression von Caspase 14a niedrig, dagegen in Brustkrebs erhöht ist.

In beiden ErbB-2 überexprimierenden Zelllinien wurde jedoch eine verringerte Expression des Proteins 26S protease regulatory subunit 6B festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass der irreversible Abbau von Proteinen im Proteasom in diesen Zelllinien im Vergleich mit der Kontroll-Zelllinie permanent geringer ist. Die Wirkung von ErbB-2 in Form einer verringerten Abbaurate der ErbB Proteine ist bekannt. Ein möglicher reduzierter irreversibler Abbau im Proteasom könnte diesen Effekt um einen weiteren Aspekt erweitern, da auf diese Weise das Recycling über das Lysosom begünstigt werden könnte, wodurch sich die ErbB-2-Signalstärke in den Zellen erhöht.

Mit Ausnahme von Caspase 14a, die in der Zelllinie MDA PM am stärksten exprimiert wird, fielen die Überexpressionen genannter Proteasen in dieser Zelllinie geringer aus. Diese Arbeit kann also erste Hinweise zur Funktion der Caspase 14a geben.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die phänotypische Vorbereitung der MDA PM Zelllinie auf eine Zellmigration/Invasion ausgeprägter verläuft als bei der MDA Her2 Zelllinie. Wie jedoch Dittmar et al. in vorangegangenen Arbeiten nachwiesen, zeigen nach EGF-Stimulation

nur die MDA Her2 Zellen ein ausgeprägtes Migrationsverhalten, die MDA PM dagegen nicht. Möglicherweise lässt sich die erhöhte ErbB-3 Expression und die erhöhte AKT-Phosphorylierung der MDA PM Zelllinie mit der erhöhten Expression dieser Proteasen in Zusammenhang bringen. Ein möglicher ErbB-2 induzierter switch von einem Proliferations- zum Migrationstyp (Thor et al. Clin. Cancer Res., 2001) erfolgte dann in den Zellen in zwei Etappen. Zuerst erfolgt die Signalgebung für die allgemeine Umstellung des Proteoms auf Migration über ErbB-2/ErbB-3 induzierte Signalwege (Abb.2). Nachdem diese abgeschlossen ist, entscheidet allein noch die Tyrosinphosphorylierung an Position 1248 von ErbB-2 über die Induktion der Migration (Dittmar et al. FASEB, 2002).

Danksagung:

Wir danken PD Dr. Friedrich Buck und Sönke Harder (Institut für klinische Chemie, Universitätskliniken Hamburg Eppendorf) für die freundliche Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analytik.

Anschrift der Verfasser

Dipl. Biol. Kai Bartkowiak und Prof. Dr. Burkhard Brandt, Institut für Tumorbologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg.

Molekularbiologischer Nachweis okkultter Lymphknotenmetastasen beim kolorektalen Karzinom

Forschungsbericht zum Projekt: „Nachweis von Tumorzellen in Lymphknoten durch Subtraktive Iterative PCR“ der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL.

Peter Tschentscher, Felix Klebig, Christoph Wagener

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Diagnostikzentrum, Institut für Klinische Chemie, Hamburg

Diagnostische Bedeutung von Tumorzellen in Lymphknoten

Karzinomzellen im Lymphknotengewebe sind ein wichtiger Prognosefaktor bei vielen malignen Erkrankungen. Beim kolorektalen Karzinom sind sie Bestandteil aller pathologischen Stadieneinteilungen (Calaluce et al., 1998). Sie gelten als Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung, für die eine Chemotherapie zur Entfernung von Metastasenzellen empfohlen wird (Chau and Cunningham, 2006). Allerdings versterben auch 20 bis 40 Prozent der zurzeit als Lymphknoten-negativ eingestuft Patienten an ihrer Erkrankung, wenn ihr Karzinom die Muskelschicht der Kolonschleimhaut infiltriert (Cserni, 2003). Bei diesen Patienten könnte eine frühe Metastasierung vorliegen, die mit der bisher üblichen Untersuchung des Lymphknotengewebes übersehen wird: Die lichtmikroskopische Routineuntersuchung erfasst nur einen kleinen Teil des gesamten Lymphknotengewebes. Tumorzellen, die sich außerhalb der mikroskopischen Schnittebene befinden, können nicht nachgewiesen werden.

Verbesserung der Diagnostik durch molekularbiologische Methoden

Zur Verbesserung der Diagnostik müssen nach dieser Überlegung Tumorzellen im

Lymphknoten als Zeichen einer Metastasierung empfindlicher und zuverlässiger nachgewiesen werden, als es mit den bisherigen Methoden möglich ist. Dabei besteht das Problem, dass die Tumorzellen in einem hohen Überschuss normaler Zellen vorliegen. Für die Suche nach Tumorzellen als „Nadeln im Heuhaufen“ ist ein Marker erforderlich, der die maligne von den normalen Zellen des Patienten unterscheidet und der in klinischen Proben auch in geringsten Mengen zuverlässig nachgewiesen werden kann. Als Marker kommen neben DNA-Veränderungen (Mutationen, Methylierungen) grundsätzlich auch eine quantitativ oder qualitativ veränderte Bildung von RNA, Proteinen oder anderen Substanzen in Frage. Im Hinblick auf einen hochempfindlichen Nachweis weniger Tumorzellen hat die Untersuchung von Nukleinsäuren gegenüber der Proteindiagnostik einen prinzipiellen und entscheidenden Vorteil: Die Zielmoleküle können nicht nur mit Signal-verstärkenden Methoden detektiert, sondern vorher auch als Zielmoleküle selbst vervielfältigt werden. Der Nachweis tumorspezifischer Nukleinsäuren ist daher ein viel versprechender Ansatz, um die in der Frühdiagnostik einer Metastasierung bestehenden Probleme zu lösen. Sensitivität und Spezifität einer Amplifikation von Tumor-RNA haben sich als unzureichend herausgestellt, weil sie durch einen frühen RNA-Abbau, pro-

zessierte Pseudogene genomischer DNA oder eine Hintergrundexpression in nicht-malignem Gewebe beeinträchtigt werden (Tschentischer et al. 1997, Tschentischer et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurden mutierte Allele von Tumorgenen erfolgreich als Marker für den Nachweis von Tumorzellen in unterschiedlichen Patientenmaterialien verwendet, zum Beispiel im Urin (Prescott et al., 2001), Pankreassaft (Fischer et al., 2001) oder Stuhl (Imperiale et al., 2004).

Hot Spot-Mutation als Marker für Metastasenzellen

Zahlreiche frühere Studien haben ergeben, dass die Tumorgene *KRAS*, *P53* und *APC* in kolorektalen Karzinomen sehr häufig mutiert sind: *KRAS* in 20 – 38 %, *P53* in 41 – 69 % und *APC* in 50 – 83 % der sporadischen kolorektalen Tumoren (Conlin et al., 2005). Dennoch wurden diese häufigen Tumorassoziierten Mutationen bisher nicht in einem praktischen Vorgehen genutzt, um Mikrometastasen in Lymphknoten nachzuweisen und dadurch die Diagnostik zu verbessern. Wenn die genannten Mutationen für die Tumorentstehung relevant sind, warum sollte es nicht möglich sein, diese durch direkte Sequenzierung in einem Tumor zu erfassen und als Marker für metastasierende Zellen einzusetzen? Aufgrund der Mutationsraten der genannten Tumorgene müsste es nach unserer Hypothese möglich sein, mit einer begrenzten Zahl so genannter Hot-Spot-Mutationen eine effiziente Diagnostik für einen Großteil der kolorektalen Tumorpatienten zu erreichen.

Die meisten früheren DNA-Studien untersuchten nur einzelne Gene, amplifizierte Mutationen aus wenigen Tumorzellen, bezogen auch fortgeschrittene Tumoren ein oder benutzten Methoden, die sich wegen ihres hohen Aufwandes nicht für eine Routinediagnostik eignen. In unserer Studie konzentrierten wir uns auf die diagnostisch relevante Patientengruppe und untersuchten 48 frühe Tumoren (T_2N_0 oder T_3N_0 nach der aktuellen TNM-Klassifikation) mit Hilfe der direkten Sequen-

zierung auf Mutationen in den *KRAS*-Kodons 12 und 13, den *P53*-Kodons 245, 248, 249, 273 und 282 sowie den *APC*-Kodons 1306, 1309, 1367, 1378, 1450 und 1465. In der direkten Sequenzierung mit Hilfe der Fluoreszenz-Kapillar-Elektrophorese spiegelt das Verhältnis der Signale von Mutation und Wildtyp den Anteil mutierten DNA in der Gesamt-DNA-Probe wider; Es werden damit nur quantitativ relevante Mutationen im Tumor erfasst. Dies ist der entscheidende Unterschied gegenüber den meisten anderen Studien, die Klonierungen oder Amplifikationen durchführen und dabei auch Mutationen beschreiben, die nur in einer sehr kleinen Fraktion der Tumorzellen vorhanden und daher vermutlich kein sicherer Marker für alle Tumor- und Metastasenzellen eines Patienten sind.

KRAS-, *P53*- und *APC*-Mutationen in frühen kolorektalen Tumoren

Die Häufigkeit der nachgewiesenen *KRAS*-Kodon 12-Mutationen lag in unserer Studie mit etwa 20 Prozent in einem Bereich, der auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde (Berger et al., 2003; Smith et al., 2002). Im Gegensatz dazu wurden *P53*- und *APC*-Mutationen mit unserem Vorgehen deutlich seltener nachgewiesen (Klebig et al., 2007). Berger et al. (2003) untersuchten zwar dieselben Kodons, bezogen aber Tumoren aller Stadien ein und verwendeten die Single-Base-Extension-Methode, die ein mutiertes auf 100 normale Allele erfasst. Smith et al. (2002) untersuchten ebenfalls frühe und fortgeschrittene Tumorstadien und verwendeten eine Kombination aus WAVE Denaturing HPLC Analysis und direkter Sequenzierung. Die geringe Zahl von *P53*- und *APC*-Mutationen in unserer Arbeit kann demnach erklärt werden durch 1.) das frühe Tumorstadium mit einer geringen Häufigkeit quantitativ relevanter Mutationen in solchen Tumoren und 2.) der direkten Sequenzierung als Screeningmethode, die Mutationen in einer kleinen Fraktion der Tumorzellen ausschließt. Das vollständige Fehlen von Mutationen in den ausgewählten *APC*-Kodons könnte darin be-

gründet sein, dass – im Gegensatz zu *KRAS* – Tumor-assoziierte Mutationen in diesem Gen über einen großen Bereich mehrerer Exons verteilt sind. Etwa eine Drittel der *APC*-Mutationen treten in einer Region von 228 Kodons auf, die als "mutation cluster region" bezeichnet wird. Wir fanden zwar ebenfalls zwei spezifische Mutationen innerhalb dieser Region (in Kodon 1317 und 1333), die aber außerhalb der in dieser Studie betrachteten Hot Spot-Kodons lagen.

Nachweis von Tumorzellen im Lymphknoten

Für die Suche nach Mutationen in Lymphknotengewebe bieten sich als routinefähige Methoden mit einer ausreichend hohen Sensitivität und Spezifität die bereits häufiger verwendete Mutant-Enriched PCR (mePCR) (Chen and Viola, 1991) und die neuere Subtraktive Iterative PCR (siPCR) (Nollau et al., 1999) an. Die mePCR wird oft für den Nachweis von *KRAS*-Kodon 12-Mutationen eingesetzt, indem das Restriktionsenzym *Bst*NI verwendet wird (Chen and Viola, 1991). Um diese Methode als generellen Ansatz auch für den Nachweis anderer Mutationen zu prüfen, haben wir die Restriktionsenzyme *B*beI und *M*spI ausgewählt, die aufgrund ihrer Erkennungssequenz im Prinzip geeignet wären, Mutationen im *KRAS*-Kodon 13 bzw. in den *P53*-Kodons 248 und 282 zu erfassen. Selbst unter optimalen Reaktionsbedingungen zeigten diese Enzyme beim Verdau von Wildtyp-DNA jedoch eine deutlich geringere Effizienz als *Bst*NI. Solche Unterschiede in der Effizienz von Restriktionsenzymen sind ein wichtiger Faktor in Restriktionsenzym-abhängigen Mutations-Assays (Jenkins et al., 1999). Ungeschnittene Rest-DNA beeinträchtigt auch die Sensitivität und Spezifität der mePCR. Wir beschränkten deren Anwendung daher in den folgenden Untersuchungen auf den Nachweis von *KRAS*-Kodon 12-Mutationen mit Hilfe von *Bst*NI.

Bei zwei von neun *KRAS*-Kodon 12-positiven Tumorpatienten zeigte die mePCR-Untersuchung die Mutation auch in jeweils ei-

nem der bei diesen Patienten entnommenen Lymphknoten. In einem Fall war das Signal jedoch deutlich schwächer als in dem anderen, so dass die Untersuchung mit der siPCR als einer prinzipiell anderen Methode kontrolliert wurde: Bei der siPCR werden die Wildtyp-Allele durch eine stringente Hybridisierung an komplementäre Oligonukleotide entfernt und anschließend die verbliebenen mutierten Allele nachgewiesen (Nollau et al., 1999). Während die siPCR eines der mePCR-Ergebnisse bestätigte, blieb sie in der Probe mit dem schwächeren mePCR-Ergebnis negativ. Nach den theoretischen Überlegungen und praktischen Erfahrungen mit der siPCR liegt deren Sensitivität wahrscheinlich höher, keinesfalls jedoch niedriger als die Sensitivität der mePCR (Fischer et al., 2001). Insofern steht bei dem diskrepanten Lymphknotenergebnis eher die Spezifität des mePCR-Ergebnisses in Frage. Ein unvollständiger Verdau der Wildtyp-DNA kommt dafür als Ursache ebenso in Frage wie statistische Fehler der DNA-Polymerase (Fischer et al., 2001). Im Falle des mit beiden Methoden eindeutig positiven Mutationsnachweises im Lymphknoten könnte der ursprünglich als Lymphknoten-negativ eingestufte Patient tatsächlich eine bereits metastasierende Erkrankung aufweisen.

Zusammenfassung

Für den molekularbiologischen Nachweis von Lymphknotenmetastasen bei frühen kolorektalen Tumorerkrankungen lässt sich nach unseren Ergebnissen feststellen: Auch in frühen Tumorstadien sind *KRAS*-Kodon 12-Mutationen mit einer Häufigkeit von etwa 20 Prozent vorhanden. Ein Screening auf geeignete Markermutationen in frühen kolorektalen Karzinomen mit Hilfe der direkten Sequenzierung ergibt jedoch eine unerwartet niedrige Rate an Mutationen in *P53*- und *APC*-Hot-Spot-Kodons. Nur 31 % der frühen Tumoren enthielten eine Mutation in mindestens einem der untersuchten Codons. Das Screening auf Markermutationen für eine praktische klinische Diagnostik kann sich demnach nicht auf kleinere Hot-Spot-Regionen weniger Tumorgene

beschränken, sondern muss möglicherweise auch andere häufige, zum Beispiel epigenetische DNA-Veränderungen (Methylierungen) einbeziehen. Die mePCR ist eine bekannte einfache Methode zum Nachweis von *KRAS*-Kodon 12-Mutationen, kann aber nicht ohne weiteres auf den Nachweis beliebiger anderer Mutationen angewendet werden, weil die Zahl der verfügbaren Restriktionsenzyme begrenzt ist und die Enzyme nicht alle dieselbe Effizienz aufweisen wie *Bst*NI. Der molekularbiologische Nachweis von Mikrometastasen im Lymphknoten zur Verbesserung eines pathologischen Stagings ist mit Hilfe der mePCR und der siPCR im Prinzip möglich, sollte aber sorgfältig hinsichtlich falsch positiver Befunde überprüft werden, um zuverlässig zwischen metastasierenden und noch nicht metastasierenden Erkrankungen zu unterscheiden.

Danksagung

Wir danken der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik für die großzügige finanzielle Unterstützung unserer Arbeit.

Literatur

- Berger, B. M., Robison, L., and Glickman, J. (2003). Colon cancer-associated DNA mutations: marker selection for the detection of proximal colon cancer. *Diagn Mol Pathol* 12, 187-192.
- Calaluce, R., Miedema, B. W., and Yesus, Y. W. (1998). Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *J Surg Oncol* 67, 194-202.
- Chau, I., and Cunningham, D. (2006). Adjuvant therapy in colon cancer - what, when and how? *Ann Oncol* 17, 1347-1359.
- Chen, J., and Viola, M. V. (1991). A method to detect ras point mutations in small subpopulations of cells. *Anal Biochem* 195, 51-56.
- Conlin, A., Smith, G., Carey, F. A., Wolf, C. R., and Steele, R. J. (2005). The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 54, 1283-1286.
- Cserni, G. (2003). Nodal staging of colorectal carcinomas and sentinel nodes. *J Clin Pathol* 56, 327-335.
- Fischer, C., Büthe, J., Nollau, P., Hollerbach, S., Schulmann, K., Schmiegel, W., Wagener, C., and Tschentscher, P. (2001). Enrichment of mutant *KRAS* alleles in pancreatic juice by subtractive iterative polymerase chain reaction. *Lab Invest* 81, 827-831.
- Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Turnbull, B. A., and Ross, M. E.; Colorectal Cancer Study Group. (2004). Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 351, 2704-2714.
- Jenkins, G. J., Suzen, H. S., Sueiro, R. A., and Parry, J. M. (1999). The restriction site mutation assay: a review of the methodology development and the current status of the technique. *Mutagenesis* 14, 439-448.
- Klebig, F., Fischer, C., Petri, S., Gerull, H., Wagener, C., and Tschentscher, P. (2007). Limitations in molecular detection of lymph node micrometastasis from colorectal cancer. *Diagn Mol Pathol* 16, 91-95.
- Nollau, P., Fischer, C., Tschentscher, P., and Wagener, C. (1999). Enrichment of mutant alleles by chromatographic removal of wild type alleles: a new principle for the detection of alleles with unknown point mutations at excess of wild type alleles. *Clin Chem Lab Med* 37, 877-881.
- Prescott, J. L., Montie, J., Pugh, T. W., McHugh, T., and Veltri, R. W. (2001). Clinical sensitivity of p53 mutation detection in matched bladder tumor, bladder wash, and voided urine specimens. *Cancer* 91, 2127-2135.
- Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R. J., and Wolf, C. R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 9433-9438.
- Tschentscher, P., Wagener, C., and Neumaier, M. (1997). Sensitive and specific cytokeratin 18 reverse transcription-polymerase chain reaction that excludes amplification of processed pseu-

dogenes from contaminating genomic DNA. Clin Chem 43, 2244-2250.

Tschentscher, P., Heeschen, C., Hamm, C., and Wagener, C. (2000). High background levels compromise the use of cardiac troponin I RNA detection in peripheral blood as a diagnostic tool in cardiology. Int J Clin Lab Res 30, 13-15.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Peter Tschentscher, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Diagnostikzentrum, Institut für Klinische Chemie, Martinistraße 52, D-20246 Hamburg, Email: tschentscher@uke.de

9. Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Kloster Banz, 15. – 17. Juni 2008

Zusammenfassungen der Vorträge

Massenspektrometrische Analyse glykosylierter Peptide in Kombination mit stabilen Isotoplabeling-Verfahren zur Identifizierung krankheitsassoziiierter Marker

Sven Baumann

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig

Einleitung: Die quantitative Proteomanalytik unter Verwendung stabiler Isotop-labeling-Verfahren und hochauflösender Tandem-Massenspektrometrie stellt eine vielversprechende neue Technologie zur Identifizierung krankheitsassoziiierter Markermoleküle dar. Die massenspektrometrische Detektion niedrig konzentrierter Proteine/Peptide aus Plasma oder Serum ist jedoch aufgrund der enormen Probenkomplexität sehr limitiert. Daher ist eine selektive Aufarbeitung zur Isolierung spezifischer Protein/Peptidklassen notwendig.

Methoden: Die Glykosylierung ist die häufigste posttranslationale Modifikation und stellt somit ein wichtiges Sub-Proteom für zahlreiche Erkrankungen dar.

Wir haben eine neue Methode zur selektiven Isolierung von N-Glykosylierten Peptiden aus Plasma etabliert (Zusammenarbeit mit der ETH Zürich, Stipendium DGKL). Unter Hydrazonbildung werden Peptide mit dem N-Glykosylierungsmotiv (N-X-S/T) mit Hilfe eines Hydrazid-Adsorbens kovalent gebunden und aus der komplexen Probe isoliert. Unter Verwendung von N-glycosidase F (PNGase F) erfolgt nachfolgend die enzymatische Abtrennung der isolierten Peptide.

Als Untersuchungsansatz stellten wir die Frage nach diskriminierenden Peptiden/Proteinen bei Patienten mit Pankreaskarzinom. In unterschiedlichen komparativen Ansätzen wurden von uns EDTA-Plasmaproben von Patienten mit Pankreaskarzinom und Proben gesunder Probanden mit stabilen Isotopen wie 4- und 8-plex iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) sowie ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) markiert. Die markierten Proben wurden vereinigt und mittels nano-LC MALDI-TOF/TOF MS sowie nano-LC ESI-MS/MS untersucht. Die Proteinidentifizierung erfolgte anhand der erhaltenen MS/MS Peptidsequenzen unter Verwendung der Mascot Search Engine. Die isotopenmarkierten Peptide wurden hinsichtlich ihrer relativen Verteilung miteinander verglichen. In 4-plex iTRAQ und ICAT Experimenten konnten verschiedene diskriminierende Proteine identifiziert werden, die in nachfolgenden Studien validiert werden müssen.

Ergebnisse und Diskussion: Das Glyco-capture mittels Festphasenisolierung durch Hydrazonbildung und die nachfolgende enzymatische Spaltung mit PNGase F stellt eine selektive Methode zur Isolierung N-glykosylierter Plasmaproteine dar. Durch Verwendung stabiler Isotopenmarkierungen wie iTRAQ oder ICAT ist

die parallele Untersuchung mehrerer Proben möglich. Das 8-plex iTRAQ Labeling zeigte erhöhte Varianzen hinsichtlich der Reproduzier-

barkeit bei der Markierung und seiner Isotopenreinheit.

Komplexe aus Spektrin und VASP regulieren die Endothelschrankenfunktion *in vivo*

Peter Benz

Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor, Universitätsklinikum Würzburg

Endothelzellen kleiden Blutgefäße auf ihrer Innenseite aus und regulieren die Durchlässigkeit von Wasser und Plasmaproteinen aus dem Blut in das darunterliegende Gewebe. Auf molekularer Ebene wird die Durchlässigkeit der Gefäßschranke durch endotheliale Zell-Zell-Kontakte reguliert, deren Stabilität entscheidend durch das zelluläre Aktinzytoskelett beeinflusst wird. Im intakten Blutgefäß sind die Zell-Zell-Kontakte geschlossen und die Aktinfasern bilden einen kortikalen Ring, der die Endothelschranke stabilisiert und so ein Ausströmen von Wasser und Plasmaproteinen aus dem Gefäß verhindert. Unter pathologischen Bedingungen jedoch aktivieren Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin oder Bradykinin Signalwege, die eine Auflösung des kortikalen Aktins bewirken und Zell-Zell-Kontakte öffnen. Dies beeinträchtigt die Endothelschrankenfunktion und führt zur Ödembildung. Die molekularen Mechanismen, die diesen Prozessen zu Grunde liegen waren bisher nur unvollständig verstanden.

In Säugerzellen koppelt das „Vasodilator-stimulated Phosphoprotein“ (VASP) cAMP- und cGMP-abhängige Signaltransduktionswege an das Aktinzytoskelett. Daher ist das Adapterprotein ein attraktiver Kandidat die Endothelschrankenfunktion zu modulieren. Mittels Affinitätschromatographie und Massenspektroskopie wurden neue VASP-bindende Proteine aus Endothelzellen isoliert und identifiziert. Von diesen Proteinen wurde α I-Spektrin weiter untersucht. Spektrine sind große Gerüst-

proteine, die in praktisch allen Säugerzellen die Zusammensetzung und Stabilität der Plasmamembran regulieren. α I-Spektrin und VASP interagieren an endothelialen Zell-Zell-Kontakten. Dabei bindet die α I-Spektrin-SH3 Domäne an ein prolinreiches Motiv von VASP, das in Nachbarschaft zur cAMP-abhängigen VASP-Phosphorylierungsstelle Serin157 (S157) liegt. α I-Spektrin bindet nur an das nicht-S157 phosphorylierte VASP und die PKA-vermittelte S157 Phosphorylierung führt zum vollständigen Verlust der Bindung. *In vivo* führt eine hohe VASP-Phosphorylierung in vereinzelt Endothelzellen und eine niedrige VASP-Phosphorylierung in konfluenten Endothelzellen dazu, dass sich α I-Spektrin/VASP-Komplexe erst dann etablieren, wenn Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden. Dabei rekrutiert α I-Spektrin das nicht-phosphorylierte VASP zur Plasmamembran und induziert dadurch die Ausbildung eines kortikalen Aktinzytoskeletts. Dies stabilisiert die endothelialen Zell-Zell-Kontakte und senkt so die Durchlässigkeit für Albumin und andere Plasmaproteine. Umgekehrt ist die Permeabilität von VASP-defizienten Endothelzellen erhöht und in VASP-defizienten Mäusen bilden sich nach Stimulation mit dem Entzündungsmediator Bradykinin deutlich größere Ödeme als in Kontrolltieren. In ihrer Gesamtheit belegen diese neuen Forschungsergebnisse, dass α I-Spektrin/VASP Komplexe für die Endothelschrankenfunktion und so die vaskuläre Permeabilität eine zentrale Rolle einnehmen.

Anti-dsDNA-Bestimmung mittels Biosensortechnologie – Auf dem Weg zu einer Referenzmethode?

Alexander Buhl, Peter B. Luppa

Institut f. Klinische Chemie u. Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technischen Universität München

Die Detektion von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA) stellt ein etabliertes Klassifikationskriterium des systemischen Lupus erythematoses (SLE) dar und ist aufgrund ihrer hohen Spezifität oft richtungsweisend für die frühzeitige Diagnose. Darüberhinaus wird die Bestimmung von anti-dsDNA auch zur Verlaufskontrolle eingesetzt und ermöglicht in vielen Fällen die Vorhersage von Exazerbationen.

Analytisch unbefriedigend ist die Tatsache, dass sich die hierzu verwendeten Methoden in zahlreichen Punkten gravierend unterscheiden und unterschiedliche Subgruppen der vorhandenen anti-dsDNA nachweisen. So werden mit dem Farr-RIA alle Isotypen, jedoch nur Antikörper hoher Affinität erfasst, während bei ELISA-Methoden nur IgG, allerdings auch solche niedrigerer Bindungsstärke zum gemessenen Wert beitragen. Die *Crithidia luciliae* Immunfluoreszenz zeigt ebenfalls nur IgGs an, ermöglicht jedoch keine echte Quantifizierung. Ein weiteres ungelöstes Problem stellt neben der Frage des zu verwendenden Assays das Fehlen eines internationalen Standards dar. Das bis vor kurzem verwendete Referenzserum WO/80 der WHO ist nicht mehr verfügbar. Sekundäre Standards liefern aus oben genannten Gründen jeweils nur für exakt diejenige Bestimmungsmethode korrekte Werte, auf der die Rekalibration vorgenommen wurde.

Wir präsentieren daher hier ein neuartiges Konzept zur Interaktionsanalyse von anti-dsDNA. Die eingesetzte Oberflächenplasmonresonanz (SPR)-Biosensortechnologie erlaubt es, die Anbindung an oberflächenimmobilisierte dsDNA markierungsfrei in Echtzeit aufzuzeichnen. Mittels geeigneter Versuchsaufbauten können so zahlreiche Informationen, wie Isotypverteilung, Spezifität, relative Bindungsaffinität oder kinetische Eigenschaften der spezifischen Antikörper gewonnen werden. Schon in der einfachsten Variante, der direkten Messung von Seren von SLE-Patienten und gesunden Spendern, wird eine sehr gute Diskriminierung mit hoher Spezifität und Sensitivität erreicht. Das SPR-Verfahren ist damit sowohl für diagnostische Anwendungen als auch für die Charakterisierung neuer, auf monoklonalen Antikörpern basierenden Standards geeignet und bietet prinzipiell die Möglichkeit zur Automatisierung. Durch die detaillierten Messungen von Patientenproben bzw. neuen Standards können die zum Teil erheblichen Diskrepanzen, die bei der Messung mit verschiedenen etablierten Methoden erhalten wurden, erklärt werden. Damit wird ein umfassendes Bild der Bindungseigenschaften gewonnen, durch das der parallele Einsatz mehrerer Methoden vermieden werden kann.

Fehlgeregulierte Expression mitochondrialer Topoisomerase I als Ursache mitochondrialer Funktionsstörungen

Ilaria Dalla Rosa¹, Stefan Sobek¹, Peter Schröder², Verena Schildgen³, Melanie Wurm⁴, Frank Essmann⁵, Hongliang Zhang⁶, Christian Mielke¹, Helmut Hanenberg⁴, Jean Krutmann², Yves Pomier⁶, Fritz Boege¹, und Morten O. Christensen¹.

¹ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, ² Institut für umweltmedizinische Forschung, ³ Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie, ⁴ Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie, ⁵ Institut für Molekulare Medizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, ⁶ Laboratory of Molecular Pharmacology, National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda MD

Mitochondriale Funktionsstörungen tragen maßgeblich zu klinisch relevanten Krankheiten bei, und es wird vermutet, dass Defekte der Mitochondrien eine wichtige Rolle bei Alterungsprozessen spielen. Solch degenerative Erscheinungen in den Zellen entstehen durch die fehlerhafte Veränderung von mitochondrialen Proteinen, die sowohl vom nukleären als auch vom mitochondrialen Genom (mtDNA) codiert werden. So wurden z.B. in alternierenden Zellen in der mtDNA vermehrt Punktmutationen, Deletionen und auch topologische Veränderungen nachgewiesen. Die Topoisomerase I (Top1) ist ein Enzym, das die Topologie der DNA modifiziert, und interessanterweise haben sich in der Evolution der Vertebraten zwei sehr ähnliche, aber genetisch unabhängige Top1-Varianten entwickelt: eine Kern-Top1 (Top1) und eine mitochondriale Top1 (Top1mt). Dies lässt eine sehr spezialisierte Rolle der Top1mt im mitochondrialen DNA-Metabolismus vermuten, und es stellt sich die Frage, ob Interferenzen mit der natürlichen Funktion dieser Top1-Variante zu den beobachteten Veränderungen im mitochondrialen Genom beitragen können.

Zur Prüfung dieser Hypothese haben wir das Expressionsniveau der Top1mt in Zellkultur manipuliert. Wir haben stabile Zelllinien hergestellt,

die Top1mt als Fusionsprotein mit YFP in Mitochondrien ~10-fach überexprimiert, was zu multiplen Fehlfunktionen im mitochondrialen Metabolismus führte. Die mtDNA-Transkription war zwar nur leicht inhibiert, was durch die Senkung von mtDNA-kodierten RNAs (COXI ~27%; 12S ~33%) gezeigt wird. Als Folge davon sind jedoch die mtDNA-kodierten Proteine um ~79% reduziert, und die Atmungskette zeigte sich weniger leistungsfähig, da die Zellen einen verminderten Sauerstoffverbrauch (~63%) und eine erhöhte ROS-Produktion (~72%) aufwiesen.

Interessanterweise ist kürzlich eine erhöhte Menge von Top1mt Transkripten bei Patienten mit Ataxia telangiectasia, welche u.a. unter mitochondrialen Dysfunktionen leiden, nachgewiesen worden. Unsere Untersuchungen implizieren, dass eine deregulierte Expression der Top1mt dadurch ein schädliches Potential aufweist, dass sie die mtDNA Transkription reprimiert. Das daraus resultierende Ungleichgewicht zwischen nukleär und mitochondrial kodierten Untereinheiten der Elektronentransportkette dürfte für die beobachteten mitochondrialen Funktionsstörungen ursächlich sein, und es ist möglich, dass weitere mit mitochondrialen Funktionsstörungen assoziierte Krankheiten hierin ihre Ursache finden.

PlateletWeb: Interaktionen und Proteinkinasen

Marcus Dittrich

Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor, Universitätsklinikum Würzburg

Zahlreiche Untersuchungen des Proteoms und Transkriptoms humaner Thrombozyten haben in den vergangenen Jahren eine beträchtliche Menge an Daten akkumuliert, und neuere Y2H (Yeast Two-Hybrid) Studien haben zahlreiche Interaktionen zwischen humanen Proteinen identifiziert. Neue Methoden in der Bioinformatik erlauben die Integration verschiedener Daten und bieten neue Konzepte zur Analyse komplexer zellulärer Systeme [1].

Basierend auf den Ergebnissen eigener Studien [2] und Daten aus aktuellen massenspektrometrischen Untersuchungen erstellten wir eine umfassende Datenbank des Thrombozytenproteoms und Transkriptoms. Die Analyse des Domänen-Repertoires und der funktionellen Protein-Annotationen zeigt eine Überrepräsentation von Proteinen mit Funktionen in der Signaltransduktion und der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Die Kombination unserer Thrombozyten-Datenbank mit Protein-Protein-Interaktionsdaten aus etablierten Datenbanken (HPRD) sowie den Resultaten aus den zwei großen Y2H-Screens erlaubte es uns, erstmals ein Modell des Interaktionsnetzwerks humaner Thrombozyten zu erstellen [3]. Aufbauend auf diesem Datensatz charakterisieren wir das Kinase-Repertoire des humanen

Thrombozyten. Die Integration der Resultate einer aktuellen Phosphoproteom-Untersuchung des Thrombozyten ermöglicht uns die Abbildung des Kinoms und des Phosphoproteoms in einem gemeinsamen Interaktionsnetzwerk. Um die Ergebnisse dieser Studie allgemein zugänglich zu machen, entwickelten wir ferner eine integrative Internet-Plattform (PlateletWeb), die es ermöglicht interaktiv das gesamte Netzwerk zu durchsuchen. Damit bietet sich die *in silico* Analyse des Interaktoms als Grundlage für weitere experimentelle Untersuchungen an.

Literatur

- [1] Dittrich, M., I. Birschmann, C. Stuhlfelder, A. Sickmann, S. Herterich, B. Nieswandt, U. Walter, and T. Dandekar, Understanding platelets. Lessons from proteomics, genomics and promises from network analysis, *Thromb Haemost*, 94 , 916–25, 2005.
- [2] Dittrich, M., I. Birschmann, J. Pfrang, S. Herterich, A. Smolenski, U. Walter, and T. Dandekar, Analysis of SAGE data in human platelets: features of the transcriptome in an anucleate cell., *Thromb Haemost*, 95 , 643–651, 2006.
- [3] Dittrich, M., I. Birschmann, S. Mietner, A. Sickmann, U. Walter, and T. Dandekar, Platelet protein interactions: map, signaling components and phosphorylation groundstate, *ATVB*, conditionally accepted, 2008.

Einfluss des Minorallels des Polymorphismus TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) auf den TAFI Antigenspiegel

P. Goetz¹, G. Mennicken², E. Kuhlisch³, E. Henkel⁴, G. Siegert¹

¹ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, ² Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und -psychotherapie, ³ Institut für Medizinische Informatik und Biometrie, ⁴ Zentrum für Klinische Studien, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus Dresden

Einleitung: Die Hypofibrinolyse hat eine hohe Bedeutung für die vaskulären Konsequenzen des metabolischen Syndroms wie Atherosklerose und Thromboembolie.

Dabei spielt der Thrombin aktivierbare Fibrinolyseinhibitor (TAFI) eine Rolle, der Lysin- und Argininreste des Fibrins entfernt, die Aktivierung von Plasmin herabsetzt und die Fibrinolyse verzögert.

In eigenen Untersuchungen zeigten sich erhöhte TAFI-Antigenspiegel bei Patienten mit einer Statin / ACE-Hemmertherapie, allerdings begleitet von auffällig großen interindividuellen Unterschieden.

Als mögliche Ursachen solcher stark unterschiedlicher TAFI-Antigenspiegel werden die SNP TAFI 505 G>A (Ala147Thr), TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) und +1542 C>G diskutiert.

In der vorliegenden Studie wird untersucht, ob und welche dieser Polymorphismen bei der Interpretation erhöhter TAFI-Antigenspiegel bei Patienten mit einer Statin / ACE-Hemmertherapie berücksichtigt werden müssen.

Methoden und Material: Bei 417 konsekutiven Teilnehmern der Dresdner Langstreckenflugstudie wurden die SNP TAFI 505 G>A (Ala147Thr), TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) und +1542 C>G mit RFLP bestimmt und die Haplotypen konstruiert. TAFI Antigen (Zymutest TAFI Antigen, Hyphen Biomed) und TAFI Aktivität Aktivitätsassay (Pefakit TAFI, Pentapharm) wurden in den zugehörigen Plasmen bestimmt und in Abhängigkeit von der Haplotypkombination beurteilt.

In dem Risikokollektiv, in dem die erhöhten TAFI-Antigenspiegel (TAFI EIA) bei den Pati-

enten mit Statin / ACE-Hemmertherapie beobachtet worden waren, konnte bei 240 der 388 Probanden der SNP TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) ermittelt werden. In diesem Teilkollektiv wurden unter Einschluss des TAFI 1040 Genotyps Regressionsanalysen der TAFI-Antigenwerte durchgeführt.

Ergebnisse: Der SNP TAFI 1040 C>T (Thr325Ile) beeinflusst die TAFI-Antigenwerte entscheidend. Er steht im Kopplungsungleichgewicht mit den beiden SNP TAFI 505 G>A (Ala147Thr) und +1542 C>G (<0,00005). Die häufigen TAFI-Haplotypen [505;1040;+1542] sind [G;C;C] 38,8%, [A;C;C] 34,1%, [G;T;G] 21,5% und [G;T;C] 5,5%. Bei Vorliegen des 1040T-Allel sind die TAFI-Antigenwerte stark reduziert, während die TAFI-Aktivitäten sogar leicht erhöht sind. Wegen der herabgesetzten Sensitivität des Assays gegenüber der TAFI 325Ile-Isoform (1040T) können niedrige TAFI-Antigenwerte als Hinweis auf den TAFI1040-Genotyp gewertet werden.

In der Risikopopulation ist die Verteilung des TAFI-1040-Genotyps und der Medikation mit Statinen / ACE-Hemmern voneinander abhängig. 98 der 212 Wildtypträger (46,2%), 43 der 146 Heterozygoten (29,5%) und 8 der 30 TAFI 325Ile Homozygoten (26,7%) erhalten eine Medikation mit Statinen / ACE-Hemmern. Die Wahrscheinlichkeit einer Statin-Therapie ist geringer bei Trägern der TAFI325Ile Isoform (OR 0.581, 95%CI: 0.361–0.935) und größer bei Männern (OR 2.097, (95%CI:1.315–3.344) und bei Patienten mit ACE-Hemmern (OR 2.871, 95%CI:1.686–4.889).

Ein schrittweise aufbauendes Regressionsmodell erklärt 45,8% der Varianz der TAFI-Antigenwerte, Einflussfaktoren sind TAFI-325-

Genotyp, Plättchen, Mikroalbuminurie und Fibrinogen. Ein schrittweise eliminierendes Regressionsmodell erklärt 52,7% der Varianz mit den Einflussfaktoren TAFI-325-Genotyp, Plättchen, rotes Blutbild, Mikroalbuminurie, CRP, s-ICAM und Angabe einer Statintherapie.

Zusammenfassung: Die verwendeten TAFI Antigenassays zeigen bei Vorliegen der

TAFI 325 Ile Isoform falsch niedrige Werte. Merkmalsträger sind in der Risikopopulation nicht gleichverteilt. Niedrige TAFI-Antigenwerte in einer Gruppe können auf dem gehäuften Auftreten der Merkmalsträger mit falsch niedrig gemessenen TAFI-Antigenwerten, aber erhöhter TAFI-Aktivität beruhen.

Characterization of signalling-pathways for CTGF/CCN2 expression in hepatocytes of normal and injured livers

Gressner OA, Lahme B, Siluscheck M, Weiskirchen R, Gressner AM

Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, University-Hospital of the RWTH Aachen

Introduction: Recently, we were the first to identify that hepatocytes (PC) are the major cellular source of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2). Since CTGF is proposed as an important paracrine modulator protein of the downstream signalling of the profibrogenic cytokine TGF- β , and its functional analogon Activin A, we dissected the regulatory pathways leading to CTGF expression in PC.

Methods: Primary cultures of rat PC were exposed to TGF- β , a variety of specific inhibitors of TGF- β , Activin A, p38 MAPK, and Sp1 signalling pathways. Intracellular demasking of latent TGF- β was by modulated calpain or calpain inhibitors.

CTGF expression was monitored by luciferase reporter gene assays, metabolic labelling, Northern blot analysis, immunoblot analysis (Western blots) and immunocytochemical (APAAP, immunofluorescence) stainings. Staining of CTGF *in situ* were performed in bile duct-ligated as well as CCl₄-and galactosamine-treated rat livers. Intracellular activation of TGF- β was studied by APAAP-staining. Activin A expression in PC was confirmed by RT-PCR.

Results: *In situ*, PC in diseased liver show a patch-like expression pattern for CTGF which co-localizes with the control-staining for PC, cytokeratin 18. PC in healthy liver were negative for this protein.

Primary PC in culture express large amounts of CTGF in response to stimulation by recombinant TGF- β and Activin A. Inhibitors of Alk5 type I TGF- β receptor (SB-431542) and phospho-Smad3 inhibitor but also SB203580, a selective inhibitor of p38 MAPK, greatly reduce CTGF expression caused by exogenously added TGF- β , suggesting a signaling via Smad(2)/3 and p38-MAPK. Similar effects were observed after treatment with mithramycin, a specific Sp1-inhibitor, which demonstrates an involvement of this transcription factor in the regulation of CTGF expression under these conditions.

However, we also found that CTGF is spontaneously up-regulated in PC in complete TGF- β -free culture conditions suggesting potential autocrine signalling by TGF- β .

During culture intracellular TGF- β became visible with APAAP staining indicating activation of latent TGF- β . Activin A expression in PC was proven by RT-PCR.

Therefore, PC cultured in entirely TGF- β and Activin A free conditions were selectively subjected to the previously mentioned, cell-permeable Alk4/5 T β RI inhibitor SB-431542 and the effects on CTGF expression compared to those caused by entirely exogenously acting inhibitors of TGF- β (blocking antibodies, soluble T β RII receptor, latency associated peptide) and of activin A (follistatin, neutralizing antibody), respectively.

None of the *exogenous* inhibitors was able to suppress spontaneous CTGF expression and CTGF-luciferase activity, whereas Alk4/5 inhibitor was highly effective. This was also reflected by the pattern of pSmad2, which was

inhibited by Alk4/5 inhibitor but not by exogenous inhibitors.

Conclusion: PC are the major cellular source of CTGF in diseased liver. The expression is under control of exogenous TGF- β and Activin A. However, during early cellular stress, CTGF can also be upregulated by entirely intracellular signaling of TGF- β and its functional analogon activin A.

The latter mechanism, in particular, might be deleterious for keeping long-term hepatocyte cultures due to TGF- β -induced apoptosis and, further, might be of relevance for induction of apoptosis or epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes in injured liver.

Steuerung der konstruktiven NF- κ B-Aktivität durch C/EBP β - I κ B- α als Effektormolekül

Sandra C. Haas[¶], Christian Cappello[¶], Andreas Zwergal[§], Judith D. Kandemir[¶], Michael Wehmeier[¶], Lutz Schwettmann[¶], Sharon Page^{¶¶}, Korbinian Brand[¶]

[¶]Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, [§]Neurologische Klinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, ^{¶¶}Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und C/EBP β sind an der Regulation von Genen beteiligt, die bei Entzündung, Immunität, Differenzierung und malignen Prozessen eine Rolle spielen. Die Wechselwirkung beider Komplexe auf Promotorebene wurde bereits intensiv untersucht, während wenig darüber bekannt ist, wie diese Komplexe „oberhalb“ der Promotorebene interagieren. In der vorliegenden Studie wird die Regulation NF- κ B-assoziiierter Signalübertragung durch C/EBP β in unstimulierten und stimulierten Zellen untersucht. In ruhenden C/EBP β ^{wt}-Makrophagen wurde ein höherer Level von p65 im Zellkern, verglichen mit C/EBP β ^{-/-}-Zellen, detektiert. Gleichzeitig wurde eine erhöhte NF- κ B-Aktivität sowie 3 κ B-abhängige Transkription in den Wildtypzellen festgestellt. Bemerkenswerterweise fanden wir unter diesen Bedingungen verminderte I κ B- α -

Level im Zytosol bei Anwesenheit von C/EBP β . Im Gegensatz dazu wurden bei TNF-Stimulation vergleichbare Maximalwerte für nukleäres p65 und NF- κ B-Aktivität in C/EBP β ^{wt}- und C/EBP β ^{-/-}-Zellen detektiert. Interessanterweise fanden wir bei der Analyse der autoregulatorischen Schleife von I κ B- α nach Stimulation ein schnelleres Wiederauftreten von I κ B- α in höheren Konzentrationen bei Abwesenheit von C/EBP β . Die Überexpression von C/EBP β in HeLa-Zellen führte zu erhöhten Mengen an exogenem p65 im Zellkern, welches bei Koexpression einer p65 S536A-Mutante noch gesteigert wurde, und reduziertem I κ B- α im Zytosol. Schließlich zeigte sich bei Überexpression von C/EBP β ein Anstieg der κ B-abhängigen Transkription. Unsere Studie postuliert, dass C/EBP β für die Aufrechterhaltung der konstitutiven NF- κ B-Aktivierung wichtig ist und

schlägt I κ B- α als Effektormolekül vor, mit Bedeutung für physiologische und pathophysiologische Szenarien.

Gene expression profiling of ABC transporters in dermal fibroblasts of pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients identifies new candidates involved in PXE pathogenesis

D. Hendig¹, T. Langmann^{2,3}, S. Kocken¹, R. Zarbock¹, C. Szliska⁴, G. Schmitz², K. Kleesiek¹ and C. Götting¹

¹ Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Bad Oeynhausen, ² Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, ³ Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Regensburg, Dermatologische Klinik, Krankenhaus Bethesda, Freudenberg

The ATP-binding-cassette (ABC) superfamily represents transmembrane proteins which are involved in various diseases and physiological processes. Mutations in the *ABCC6* gene, encoding the multidrug resistance-associated protein 6 (MRP6), cause *Pseudoxanthoma elasticum* (PXE). This autosomal-recessive disorder affects connective tissues, primarily the skin, the eyes and the vascular system. PXE manifests with a progressive calcification and fragmentation of elastic fibres in the extracellular matrix. The physiological function of MRP6 and the implication of MRP6 deficiency in PXE is still unknown. Moreover, nothing is known about a possible compensatory expression of other ABC transporter proteins in MRP6 deficient cells. In the present study, we investigated the gene expression profile of 47 ABC transporters in human dermal fibroblasts of healthy controls (n=2) and PXE patients (n=4) by TaqMan low-density array analysis. The analysis revealed the expression of 37 ABC transporter genes in dermal fibroblasts. *ABCC6* gene expression was not detectable in fibroblasts derived from PXE patients. Seven genes (*ABCA6*, *ABCA9*, *ABCA10*, *ABCB5*, *ABCC2*, *ABCC9* and *ABCD2*) were induced, whereas the gene ex-

pression of one gene (*ABCA3*) was decreased, comparing controls and PXE patients (with at least 2-fold changes). We re-analyzed the gene expression of selected ABC transporters in a larger set of dermal fibroblasts from controls and PXE patients (n=6, each). Re-analysis showed high inter-individual variability between samples, but confirmed the results obtained in the array analysis. The gene expression of ABC transporter genes, as well as lineage markers of PXE, was further examined after inhibition of MRP efflux activity and *ABCC6* gene expression using benzbradone and *ABCC6* specific small interfering RNA. These experiments corroborated the observed gene expression alterations, most notably in the ABCA subclass (up to 5-fold, p<0.05). We therefore conclude that MRP6 deficient dermal fibroblasts exhibit a distinct gene expression profile of ABC transporters, potentially to compensate for MRP6 deficiency. Moreover, our results point to a function for *ABCC6*/MRP6 in lipid metabolism. Further studies are now required to uncover the role of other ABC transporters in PXE.

Financial support of the "Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik" is gratefully acknowledged.

QTL-Identifizierung und Validierung von *ADAM17*: ein neuer Faktor der Atheroskleroseresistenz?

Lesca Holdt

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Leipzig

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar und sind Folge von atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand. Die individuelle Atherosklerosedisposition folgt einem komplexen genetischen Erbgang. In Vorarbeiten hat unsere Arbeitsgruppe mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen (Quantitative Trait Locus Analyse, QTL) in einer F2-Kreuzung atheroskleroseempfindlicher C57BL/6 (B6)- und atheroskleroseresistenter FVB-Mäuse mit Hypercholesterinämie einen neuen Genort der Atherosklerose auf Chromosom 12 gefunden. Ziel unserer Untersuchungen war die Identifizierung möglicher kausaler Gene der Atheroskleroseresistenz bei Hypercholesterinämie an diesem Genort.

Expressionuntersuchungen von Kandidatengen in den F2 Tieren zeigten, daß der maximale LOD-score der mRNA Expression des Gens „*a disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17)*“ (21.6 Mb, LOD 3.3) mit seiner physikalischen Position auf dem proximalen Chromosom 12 übereinstimmte und zudem mit dem Maximum des Atherosklerose LOD sco-

res kolokalisiert war. Das FVB Allel an diesem Locus war mit einer signifikant höheren *ADAM17* mRNA Expression (39%) assoziiert. Ebenso wurden höhere *ADAM17* Expressionswerte in Leber und Knochenmarkmakrophagen des FVB-Ausgangsstamms gefunden (68% bzw. 58%). In funktionellen Experimenten fanden wir in FVB-Makrophagen eine 5-fach erhöhte TNF-alpha Freisetzung nach Aktivierung der Zellen mit PMA sowie eine um 32% erhöhte Freisetzung des TNF-Rezeptor I im Vergleich zu B6-Makrophagen. Mit Hilfe von Reporter Gen Untersuchungen konnten wir dann eine genetische Variante im proximalen *ADAM17* Promoter identifizieren, welche für die erhöhte Genexpression bei FVB verantwortlich sein könnte. Der Chromosom 12 Locus sowie die *ADAM17* Expressionsunterschiede konnten wir schließlich in Chromosom 12 intervallspezifischen kongenen Mäusen bestätigen.

Zusammenfassend haben wir genetisch und funktionell *ADAM17* als potentiellen Faktor der genetischen Atherosklerosedisposition identifiziert (Holdt LM et al. *Arterioscl Thromb Vasc Biology*, in press).

Evidence for Toll-Like-Receptors mediated thrombogenic activity of Antiphospholipid Antibodies

J. Hurst, K.J. Lackner, P. von Landenberg

Institute für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

Zielsetzung: Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) beschreibt eine Erkrankung, die charakterisiert wird durch die persistierende Anwesenheit von Antiphospholipid-Antikör-

pern (aPL) mit rezidivierenden Thrombosen und Spontanaborten. In dieser Studie wurde die Expression und Signalweiterleitung von Toll-like Rezeptor (TLR) 8 in humanen PBMC's

bzw. TLR 7 in Mausmonozyten nach Stimulation mit humanen monoklonalen aPL und IgG-Fractionen aus APS-Patienten untersucht.

Methoden: Humane und murine Monozyten wurden mit einem humanen monoklonalen aPL (HL5B) oder IgG-Fractionen aus APS-Patienten stimuliert. Die Expression von TLR 7 und TLR 8 wurde über real-time RT-PCR quantifiziert. Stimulationen mit einem spezifischen Liganden für TLR 8 und eine Hemmung mit einem TLR 8-Inhibitor wurden durchgeführt. Um die Aktivierung der weiteren Signalübertragung zu evaluieren wurde außerdem die Expression von TNF- α und IL1 β über real-time RT-PCR und ELISA gemessen. Ergebnisse die durch Stimulationsexperimente erhalten wurden, konnten in PBMC's aus APS-Patienten bestätigt werden.

Ergebnisse: Die Stimulation von PBMC's mit HL5B und IgG-Fractionen aus APS-Patienten

resultierte in einer spezifischen Hochregulation von TLR 8 mRNA Expression in humanen bzw. TLR7 mRNA Expression in murinen Zellen und einer erhöhten Expression und Sekretion von TNF- α und IL1 β . Durch Zugabe des spezifischen ssRNA-Liganden konnte ein weiterer Anstieg beobachtet und durch Zugabe eines inhibierenden DNA-Oligonukleotid neutralisiert werden.

Zusammenfassung: Die gesteigerte Expression von Toll-like Rezeptoren konnte sowohl durch HL5B induziert als auch in PBMC's von APS-Patienten gezeigt werden. Weitere Experimente bestätigten, dass eine Induktion der Zytokine ausschließlich durch TLR 8 bzw. TLR 7 Stimulation herbeigeführt wird, wodurch man vermuten kann, dass eine endogene Stimulation von TLR 8 in APS Patienten und eine fortschreitende Steigerung inflammatorischer Zytokine zu einem erhöhten Thromboserisiko führen kann.

Das TM-PC System schützt vor diabetischer Nephropathie durch zwei unabhängige Mechanismen: Die Bedeutung der Lektin-ähnlichen Domäne

Berend Isermann, Ilya A. Vinnikov, Thati Madhusudhan, Muhammed Kashif, Stefanie U. E. Herzog, Edward Conway, und Peter P. Nawroth

Abteilung für Innere Medizin I und Klinische Chemie, Universität Heidelberg

Hintergrund: Die Bedeutung der endothelialen Dysfunktion für die Entstehung vaskulärer Komplikationen im Rahmen eines Diabetes mellitus war bisher nicht bekannt. Ein Marker der endothelialen Dysfunktion sind erhöhte Plasmawerte des löslichen Thrombomodulin (TM), die einen Verlust des endothelialen TM widerspiegeln. TM ist ein multidomän-transmembranöse Molekül, das überwiegend auf Endothelzellen exprimiert wird und aufgrund seiner antikoagulant Eigenschaften entdeckt wurde. TM bindet mittels der EGF-Domänen 4 und 5 Thrombin und inaktiviert dieses. Der Komplex aus TM und Thrombin erlangt eine

neue Substratspezifität und ist ein potenter Aktivator des Protein C (PC). Aktiviertes Protein C (aPC) inhibiert die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, vermittelt jedoch auch antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte. Neben diesen EGF-Domänen abhängigen Effekten vermittelt TM via der Lektin-ähnlichen Domäne antiinflammatorische Effekte, potentiell durch eine Inhibition des RAGE-Liganden HMGB-1 (scavenger-Funktion).

Wir konnten kürzlich in genetisch veränderten Mäusen mit einem Funktionsverlust oder einem Funktionsgewinn bzgl. der Protein C-Aktivierung zeigen, dass dieses endotheliale

System vor der diabetischen Nephropathie schützt (Isermann, et al., Nature Medicine 2007). Dabei inhibiert aPC durch einen rezeptorabhängigen Mechanismus (PAR-1 und EPCR abhängig) die Glukose-induzierte mitochondriale Apoptose in Endothelzellen und Podozyten. Die Bedeutung der Lektin-ähnlichen Domäne des TM für die Pathogenese der diabetischen Nephropathie blieb in diesen Studien offen und ist Gegenstand der aktuellen Untersuchungen.

Durchführung: Die diabetische Nephropathie wurde in Mäusen mit einer spezifischen Deletion der Lektin-ähnlichen Domäne (TM^{Led/Led}) untersucht. In wild typ (WT) und TM^{Led/Led} Mäuse wurde mittels wiederholter, niedrig dosierter Streptozotocininjektion eine diabetische Stoffwechsellage induziert. Die Analyse erfolgte nach 28 Wochen persistierender Hyperglykämie. Eine Niere wurde für die RNA- und Proteinaufreinigung isoliert, die andere Niere wurde nach Perfusionsfixierung einer histologischen Analyse zugeführt. Untersucht wurden u.a. die Albuminurie (24 h Sammelurin, metabolische Käfige), die Nieren und Glomerulamorphologie, Marker der diabetischen Nephropathie, der Apoptose und der Gerinnungsaktivierung.

Ergebnisse: Die Expression von TM ist in den Nieren von diabetischen Mäusen reduziert (RNA und Proteinexpression), so dass nicht nur ein Funktionsverlust bzgl. der Protein C Aktivierung, sondern auch der Verlust anderer funktioneller Domänen wie der Lektin-ähnlichen Domäne pathophysiologisch relevant sein könnte. In diabetischen WT und zu einem signifikant stärkeren Maße in diabetischen TM^{Led/Led} Mäusen zeigt sich eine Zunahme der Albuminurie sowie morphologischer Indizes. Diese Veränderungen waren mit einer Zunahme pro-apoptotischer Marker (Bax/Bcl-2 Ratio)

sowie ein vermehrten Häufigkeit TUNEL positiver Zellen assoziiert. Ferner waren Marker des oxidativen Stress (TBARS) sowie der Gerinnungsaktivierung (TAT, D-Dimer) in diabetischen TM^{Led/Led} Mäusen signifikant stärker erhöht. Eine Antikoagulation mit Heparin (LMWH, Enoxaparin) für die gesamte Studiendauer (26 Wochen) verhinderte die Zunahme der diabetischen Nephropathie in diabetischen TM^{Led/Led} Mäusen.

Zusammenfassung: Diese Daten etablieren, dass die Lektin-ähnliche Domäne von TM vor der diabetischen Nephropathie schützt. Da die diabetische Nephropathie in TM^{Led/Led} Mäusen mit einer Erhöhung von oxidativen Stress-Markern assoziiert ist, könnte dieser Phänotyp auf der kürzlich identifizierten scavenger Funktion der Lektin-ähnlichen Domäne von TM beruhen. Es konnte gezeigt werden, dass die TM-Lektin-ähnliche Domäne die HMGB-1 abhängige RAGE-Aktivierung im Sepsismodell inhibiert (Abeyama, JCI, 2005). Jedoch sind die erhöhten HMGB-1 Plasmaspiegel nur bei einer gleichzeitigen Gerinnungsaktivierung cytotoxisch („double hit theory“, Ito, JTH, 2007). Der schützende Effekt der Antikoagulation in diabetischen TM^{Led/Led} Mäusen legt nahe, dass die TM-Lektin ähnliche Domäne eine ähnliche scavenger Funktion im Rahmen der diabetischen Nephropathie hat.

Diese Daten etablieren, dass das endotheliale TM-System durch einen dualen Mechanismus (aPC-abhängig und TM-Lektin-abhängig) die diabetische Nephropathie reguliert. Somit weisen diese Ergebnisse eine kausale Rolle der endothelialen Dysfunktion mit einem Verlust TM-abhängiger Funktionen für die Pathogenese der diabetischen Nephropathie nach.

A PCA-model to distinguish Mrp2-deficient rats on the basis of proton NMR spectra of urine

Krebs, A.¹, Grisk, O.², Schaefer, H.³, Nauck, M.¹

¹ Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Greifswald, ² Institute of Physiology, University of Greifswald, ³ Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten

Introduction: Mrp2 (ABCC2) is a multispecific organic anion efflux pump highly expressed at the apical poles of epithelial cells. Mrp2-deficient rat lines rats are hyperbilirubinemic due to disordered biliary elimination of bilirubin glucuronide. They have been used as model organisms to study the physiology of Mrp2 and its role for drug disposition. It is supposed that there are changes in transporter function that compensate for Mrp2-deficiency¹.

Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (1H-NMR) of body fluids has been applied to the field of metabolomics receiving spectral information about hundreds of metabolites. Advantage of this approach is that no pre-selection of measurement parameters, selection of separation/derivatisation procedures or variable detection modes are necessary. The time-consuming visual inspection of a great numbers of complex spectra can be circumvented by the application of pattern recognition methods like principal component analysis (PCA)².

Methods: We investigated the urine of Lewis rats without and with Mrp2-deficiency via the combination of 1H-NMR urinalysis and subsequent statistical PCA looking for biomarkers at a metabolic approach, which might characterize the two groups. The 24h urine spectra were recorded using a 400 MHz Bruker AVANCE spectrometer (Bruker Biospin GmbH) operating in flow injection mode. 1H NMR spectra were acquired at a temperature of 300 K using a 1-dimensional version of the NOESY pulse sequence with presaturation for water suppression.

Results: 1H-NMR spectra of urines from 7 Lewis Mrp2-deficient and 7 wildtype rats were manually processed within TOPSPIN 1.3

(Bruker BioSpin) and inspected for spectral quality. By visual inspection no differences could be observed. Integration into buckets of 0.05 ppm and principal component analysis in AMIX 3.2 (Bruker Biospin) was followed by a model building process using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). A spectral region with a peak maximum at 2.46 ppm could be located to discriminate between Mrp2-deficient and wildtype Lewis rats. The peak is smaller in Mrp2-deficient rats, but the difference is subtle. An NMR database inquiry did not yield the chemical identification of the discriminating peak.

Conclusion: The combination of 1H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis is a promising metabolomic approach to characterize metabolic disorders and to identify biomarkers. However, the correct chemical identification of discriminating spectral signals is still a challenge, since their characterization depends on chemical influences like pH, ion concentrations and temperature so that NMR database inquiry may be without result.

References:

1. Kivisto, K.T., Grisk, O., Hofmann, U., Meissner, K., Moritz, K.U., Ritter, C., Arnold, K.A., Lutjohann, D., von, B.K., Kloting, I., Eichelbaum, M., & Kroemer, H.K. (2005) Disposition of oral and intravenous pravastatin in MRP2-deficient TR- rats. *Drug Metab Dispos.* 33, 1593-1596.
2. Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Holmes, E., Keun, H.C., Craig, A., Pearce, J.T., Bruce, S.J., Hardy, N., Sansone, S.A., Antti, H., Jonsson, P., Daykin, C., Navarange, M., Beger, R.D., Verheij, E.R., Amberg, A., Baunsgaard, D., Cantor, G.H., Lehman-McKeeman, L., Earll, M., Wold, S., Johansson, E., Haselden, J.N., Kramer, K., Thomas, C., Lindberg, J., Schuppe-Koistinen, I., Wilson, I.D., Reilly, M.D., Robertson, D.G., Senn, H., Krotzky, A., Kochhar, S., Powell, J., van der, O.F., Plumb, R., Schaefer, H., & Spraul, M. (2005) Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat.Biotechnol.* 23, 833-838.

Trefoil Factor (TFF)-vermittelte Modulation von Zell-Zell-Kontakten

Dirk Meyer zum Büschenfelde, Rudolf Tauber und Otmar Huber

Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Einleitung: TFF-Peptide (TFF1, TFF2, TFF3) stellen eine kleine Familie sezernierter Polypeptide dar, die durch eine gemeinsame, über drei konservierte Disulfidbrücken definierte Sekundärstruktur charakterisiert sind. TFF-Peptide werden in einer Vielzahl Mucin-sezernierender Epithelien exprimiert und spielen als Bestandteile der apikalen Mucinschicht eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität. Durch ihre motogenen Eigenschaften spielen sie zudem eine wichtige Rolle bei der Modulation von Zellmigrationsprozessen, insbesondere im Rahmen der Restitutionsprozesse nach epithelialen Verletzungen. In pathologischen Situationen wie z.B. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und bei Karzinomen wurde eine Überexpression von TFF-Peptiden festgestellt. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Wirkungsmechanismen der TFF-Peptide in Zusammenhang mit ihren motogenen Eigenschaften zu untersuchen. Dabei galt ein Hauptaugenmerk den Mechanismen, über die TFF-Peptide Einfluss auf epitheliale Zell-Zell-Kontakte nehmen.

Methoden: Es wurden durch stabile Transfektion von HT29/B6- und MDCK-Zellen mit einem hTFF3-Expressions- und Sekretionsvektor zwei Zellsysteme etabliert, die nach eingehender Charakterisierung die typischen Merkmale von TFF3-behandelten Zellen aufweisen. Western Blot- und Immunofluoreszenz-Analysen dienten zur Untersuchung der molekularen Veränderung innerhalb der Adherens Junction und der Tight Junctions. RT-PCR-Analysen und Pulse-Chase-Experimente wur-

den durchgeführt, um die Regulationsmechanismen zu erforschen, welche den beobachteten TFF3 vermittelten Modulationen innerhalb der epithelialen Zell-Zell-Kontakte zu Grunde liegen.

Ergebnisse: Sowohl bei den HT29/B6 als auch bei den MDCK Zellen beobachtet man, dass innerhalb der Adherens Junctions der Gehalt an E-Cadherin sowie an α - und β -Catenin in den hTFF3-transfizierten Zellen reduziert ist. Zudem führt hTFF3 innerhalb der Tight Junctions zu einer Reduktion des Claudin-2 Gehalts. Interessanter Weise zeigte sich, dass der verringerte Gehalt an zellulärem Claudin-2 mit einem erhöhten transepithelialen Widerstand vergesellschaftet ist.

Die molekularen Veränderungen im Bereich der Tight Junctions und der Adherens Junctions sind auf transkriptionelle Regulationsmechanismen zurückzuführen. Darüber hinaus beobachtet man in den hTFF3-transfizierten Zellen, dass die biologische Halbwertszeit von E-Cadherin deutlich reduziert ist und folglich der proteolytische Abbau von E-Cadherin erhöht sein muss.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass TFF-Peptide sowohl über transkriptionelle als auch über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen einen Einfluss auf Adherens Junctions und Tight Junctions ausüben. Der teilweise Verlust des Cadherin/Catenin-Komplexes könnte die motogenen Effekte hervorrufen. Die Veränderungen innerhalb der Tight Junctions scheinen deren Integrität und Funktion zu beeinflussen.

Regulation und mitotische Funktionen des Replikationsinitiationsfaktors Cdc6

Faiza M. Khalfalah¹, Ellen Wannagat¹, Frank Essmann², Wilhelm G. Dirks³, Morten O. Christensen¹, Fritz Boege¹, Christian Mielke¹

¹ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, ² Institut für Molekulare Medizin, Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, ³ DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig.

Organismen mit sehr großen Genomen verdoppeln ihre DNS vor Zellteilungen mit Hilfe zahlreicher Replikons. Die Replikation wird durch die Ausbildung von sogenannten prä-replikativen Komplexen initiiert, bei der die Replikationsstartpunkte für die darauf folgende DNS-Synthese "lizenziert" werden. Dabei werden zunächst die Startpunkte von dem Erkennungskomplex ORC gebunden, welcher dann die beiden Faktoren Cdt1 und Cdc6 dorthin rekrutiert. Der ORC/Cdt1/Cdc6-Komplex schließlich vermittelt die stabile Bindung mehrerer MCM-Helikasen an die DNS. So ist dieser Bereich als Startpunkt für die spätere Replikation markiert, und die dafür nötige Entdrillung der DNS ist gewährleistet.

Durch die strikte zeitliche Trennung der Lizenzierung und der eigentlichen DNS-Synthese ist gesichert, dass jedes Replikon nur exakt einmal pro Zellzyklus repliziert wird, und die Komponenten der prä-replikativen Komplexe unterliegen daher einer rigorosen zellzyklusabhängigen Regulation. Es ist z.B. inzwischen geklärt, dass Cdt1 vor der S-Phase vollständig degradiert wird. Jedoch besteht keine Einigkeit darüber, ob auch Cdc6 vor Beginn der DNS-Synthese abgebaut, oder aus dem Kern exportiert wird. Darüber hinaus ist völlig unklar, wieso eine Unterdrückung von Cdc6 zu Fehlfunktionen in der Mitose führt.

Um dies zu untersuchen, haben wir biofluoreszentes Cdc6 gemeinsam mit dem andersfarbig markierten S-Phasemarker PCNA in menschlichen Zellen exprimiert. Mit Hilfe detaillierter mikroskopische Untersuchungen an lebenden Zellen zeigen wir, dass Cdc6 unmittelbar nach Replikationsbeginn sehr schnell abgebaut wird. Während der folgenden S-Phase wird neusynthetisiertes Protein dann aber aus dem Kern exportiert. Überraschenderweise beobachten wir dann, dass das nun cytosolische Protein kurz vor der Mitose das Zentrosom und den davon ausgehenden Spindelapparat bindet, und so unter Umständen ein entscheidender Schrittmacher und/oder Kontrolleur der Zellteilung darstellt.

Neben diesen teils sehr überraschenden zellbiologischen Befunden zur DNS-Replikation stellen die hier vorgestellten PCNA/Cdc6-doppelexprimierenden Zelllinien auch ein hervorragendes Werkzeug für zellbasierte Untersuchungen, bei denen der Zellzyklus berücksichtigt werden muss. Durch die charakteristischen Verteilungsmuster sind die beiden Proteine hervorragende Marker, um sämtliche Zellzyklusphasen bis hin zum jeweiligen Reifegrad der S-Phase zweifelsfrei zu identifizieren.

Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren bei Chagas-Krankheit

Silvia Gilka Muñoz Saravia

Medizinische Klinik (Kardiologie), Charité – Universitätsmedizin Berlin

Die Chagas-Krankheit ist eine durch den Parasiten *Trypanosoma cruzi* verursachte Infektionskrankheit. Ca. 100 Millionen Einwohner in Süd- und Mittelamerika sind von der Krankheit bedroht, 17-18 Millionen Einwohner infiziert. Nach einer klinisch unauffälligen akuten Phase bleiben die Infizierten lebenslang Träger von *Trypanosoma cruzi*. Während 70 % der Infizierten lebenslang unauffällig als „gesund“ erscheinen, entwickeln sich bei ca. 30 % teilweise erst nach 10-20 Jahren (Latenzphase) lebensbedrohliche Spätschäden. Unter diesen machen Herzscheiden, insbesondere Kardiomyopathie, ca. 90-95 % aus. 5-10 % entfallen auf Erkrankungen des Intestinums, hauptsächlich manifestiert als Megakolon. Bei solchen Patienten wurden Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren (anti-beta1-Rezeptor- (beta1-AAB), anti-beta2-Rezeptor- (beta2-AAB) und anti-muskarinerge-Rezeptor-AAB (M2-AAB) gefunden, von denen angenommen wird, dass sie pathogenetisch an der Entwicklung der Spätschäden beteiligt sind.

Aufgabenstellung: In einer Studie an Patienten mit Chagas-Krankheit sollte geprüft werden, ob 1. die verschiedenen Spätschäden der Chagas-Krankheit durch ein spezifisches AAB-Profil charakterisiert sind, 2. bereits in der Latenzphase AAB nachweisbar sind und wenn ja, 3. aus dem AAB-Profil in der Latenzphase Hinweise auf die Manifestationsrichtung der Chagas-Krankheit abgeleitet werden können und 4. laboratoriumsdiagnostische Marker die bisher genutzten elektrophysiologischen und radiologischen Verfahren zum Nachweis von Kardiomyopathie und Megakolon bei Chagas-Patienten ergänzen bzw. ersetzen können.

Material und Methoden: 228 mit *Trypanosoma cruzi* infizierte Patienten wurden anam-

nestisch, elektrophysiologisch und radiologisch klassifiziert (96 klinisch, elektrophysiologisch und radiologisch Unauffällige (Latenzphase); 57 mit Herzerkrankung insbesondere Kardiomyopathie, 30 mit Megakolon; 45 mit Kardiomyopathie und Megakolon). Im Serum dieser Patientengruppen wurden im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (n=29) das Autoantikörperprofil (beta1-AAB beta2-AAB, M2-AAB) sowie labordiagnostische Marker z.B. NT-proBNP bestimmt.

Ergebnisse: Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon zeichnen sich durch ein spezifisches AAB-Muster aus, das bei den Patienten mit Herzscheiden durch einen höheren Anteil an beta1-AAB gekennzeichnet ist. Ca.1/3 der Patienten in der Latenzgruppe sind ebenfalls AAB positiv. Von diesen AAB positiven Patienten können ca. 85 % dem für die Herzscheiden, 15 % dem für Megakolon typischen AAB-Muster zugeordnet werden. Während sich Kontrollgruppe, Latenzgruppe und Megakolongruppe in der NT-proBNP-Konzentration nicht signifikant unterscheiden, weisen die Patienten mit Herzscheiden signifikant höhere NT-proBNP-Werte auf. Patienten, die mittels EKG und Radiologie der Gruppe mit milder/moderater Herzscheiden zugeordnet wurden, weisen niedrigere NT-proBNP-Werte als Patienten mit schwerer Herzscheiden auf. Werden die Patienten mit milder/moderater Herzscheiden und die der Latenzgruppe verglichen, zeigen erstere signifikant höhere Werte.

Schlussfolgerungen: Chagas-Patienten mit Herzscheiden bzw. intestinaler Schädigung haben spezifische Profile für AAB gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die AAB-Häufigkeit in der Latenzgruppe steht in guter Übereinstimmung mit der epidemiologisch er-

mittelten Häufigkeit von Spätschäden in Chagas-Patienten. Unter den AAB-positiven Patienten der Latenzgruppe überwiegt deutlich das für die Herzschrädigung spezifische AAB-Muster, was ebenfalls in guter Ubereinstimmung zur epidemiologisch ermittelten Häufigkeit der Herzschrädigung steht. Ausgehend von der Bestimmung des AAB-Profiles in der Latenzphase k6nnten die Patienten mit einem

hohen Risiko f6r die Entwicklung von Spätschäden fr6hzeitig in ein Ubewachungsprogramm aufgenommen werden. In einem solchen Programm k6nnte die Bestimmung von NT-proBNP zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der Herzschrädigung als der Hauptkomplikation gegen6ber der elektrophysiologischen und radiologischen Diagnostik von logistischem und 6konomischem Vorteil sein.

Induction of stearyl-CoA desaturase (SCD-1) protects human arterial endothelial cells against lipotoxicity

Andreas Peter, Cora Weigert, Harald Staiger, Kilian Rittig, Alexander Cegan, Philipp Lutz, Fausto Machicao, Hans-Ulrich H6ring, Erwin Schleicher

Department of Endocrinology, Diabetes, Vascular Medicine, Nephrology and Clinical Chemistry, University of T6bingen

Endothelial lipotoxicity has been implicated in the pathogenesis of multiple stages of cardiovascular disease from early endothelial dysfunction to manifest atherosclerosis and its complications. Saturated free fatty acids are the major inducers of endothelial cell apoptosis and inflammatory cytokines. In humans, the enzyme stearyl-CoA desaturase-1 (hSCD-1) is the limiting step of the desaturation of saturated to monounsaturated fatty acids. Since we could demonstrate the expression of SCD-1 in primary human arterial endothelial cells (HAECs) we aimed to prove a beneficial role of upregulated hSCD-1 expression. In contrast to other cells which are less susceptible to lipotoxicity, hSCD-1 was not upregulated in HAECs upon palmitate treatment. Following that, we could show that upregulation of hSCD-1 using the LXR activator TO901317 in HAECs protects the cells against palmitate-induced lipotoxicity, cell apoptosis and expres-

sion of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. Increased hSCD-1 activity was determined as C16:1/16:0-ratio and enhanced triglyceride storage in palmitate treated cells. The beneficial effect was clearly attributed to enhanced hSCD-1 activity. Overexpression of hSCD-1 blocked palmitate-induced cytotoxicity and knockdown of hSCD-1 using si-RNA abolished the protective effect of TO901317 in HEK293 cells. Additionally, inhibition of hSCD-1 with 10/12 CLA blocked the effect of TO901317 on palmitate-induced lipotoxicity, cell apoptosis and inflammatory cytokine induction in HAECs. We conclude that upregulation of hSCD-1 led to a desaturation of saturated fatty acids and facilitates their esterification and storage thereby preventing downstream effects of lipotoxicity in HAECs. These findings add a novel aspect to the atheroprotective actions of LXR activators in cardiovascular disease.

Human xylosyltransferases and their differential expression during heart fibrosis

Prante C., Müller B., Kuhn J., Götting C. and Kleesiek K.

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen

The xylosyltransferases I and II (XT-I, XT-II) catalyze the transfer of xylose from UDP-xylose to selected serine residues in the proteoglycan core protein, which is the initial and rate limiting step in glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis. The impact of GAG biosynthesis in the context of ECM remodeling during pathophysiological processes is still poorly understood. Therefore, we analyzed the expression of both key enzymes during the deposition of GAGs in dilated cardiomyopathy.

We investigated the XT-I and XT-II expression in cardiac fibroblasts and in patients with dilated cardiomyopathy (DCM) and compared our findings to non-failing donor hearts. We analyzed XT-I and XT-II expression and the GAG content in human cardiac fibroblasts incubated with TGF- β 1 or exposed to cyclic mechanical stretch. The enzymes XT-I and XT-II showed a differential expression. In vitro and in vivo no significant changes in the XT-II expression were detected. For XT-I we found an increased expression in parallel with an elevated chondroitin sulfate (CS)-GAG content af-

ter incubation with TGF- β 1 and after mechanical stretch. XT-I expression and subsequently increased levels of GAGs could be reduced with neutralizing anti-TGF- β 1 antibodies or by specific inhibition of the activin receptor-like kinase 5 (ALK5) or p38-MAP-kinase pathway. Usage of XT-I-short interfering RNA (siRNA) could specifically block the increased XT-I expression under mechanical stress and resulted in a significantly reduced CS-GAG content. In left and right ventricular samples of DCM patients our data show increased amounts of XT-I mRNA compared to non-failing controls. Patients had raised levels of XT-I enzyme activity and an elevated proteoglycan content.

Myocardial remodeling is characterized by increased XT-I expression and enhanced proteoglycan deposition. TGF- β 1 and mechanical stress induce XT-I expression in cardiac fibroblasts and have impact for ECM remodeling in the dilated heart. Specific blocking of XT-I expression confirmed that XT-I catalyzes a rate-limiting step during fibrotic GAG biosynthesis.

CARL: Controlled application and removal of liposomal therapeutics - erste klinische Ergebnisse

* Gerhard Pütz, [§] Oliver Schmah, ⁺ Jürgen Eckes, * Heinrich Wieland & * Karl Winkler

* Universitätsklinik Freiburg, Abt Klinische Chemie, [§] Universitätsklinik Freiburg, Abt Hämatologie und Onkologie; ⁺ TellTargeting GbR, Kollmarsreute, Germany

Anthrazykline wie z.B. Doxorubicin sind hochwirksame, aber auch sehr toxische Chemotherapeutika. Ihrer hohen Wirksamkeit in der Bekämpfung von Neoplasien stehen die schwerwiegenden Nebenwirkungen gegen-

über, die sowohl die Einzeldosis als auch die lebenslange Kumulativdosis dieser Substanzen begrenzen. Eine Möglichkeit, die akute Kardiotoxizität von Doxorubicin zu verringern, ist die Verwendung von lang zirkulierenden Li-

posomen (Doxil®/Caelyx®). Das in den Liposomen enthaltene Doxorubicin richtet jedoch weiterhin schwere Schäden im Organismus des Patienten an.

Gewöhnlich erreicht nur ein geringer Teil einer gegebenen Dosis tatsächlich das Zielgewebe, der weitaus überwiegende Teil des gegebenen Wirkstoffes findet sich in anderen Geweben wieder und muss letztendlich über die natürlichen Exkretionsorgane entgiftet werden. Lang zirkulierende Liposomen reichern sich zu einem gewissen Teil (ca. 2-5% der initialen Gesamtdosis) im Tumorgewebe an. Diese Anreicherung im Tumorgewebe erfolgt irreversibel und schneller als die Akkumulation der Liposomen in Geweben, in denen schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten. Nach Akkumulation und Sättigung des Tumorgewebes mit liposomalem Wirkstoff zirkuliert immer noch ein Großteil der gegebenen Liposomen im Plasma des Patienten. Die nach Anreicherung im Tumorgewebe zirkulierende Menge an liposomalem Wirkstoff hat therapeutisch nur einen minimalen Wert, richtet jedoch weiterhin schwerwiegende Schäden im Organismus des Patienten an. Eine Möglichkeit, diese im Plasma befindliche Menge an toxischem Wirkstoff zu einem pharmakologisch sinnvollen Zeitpunkt aus dem Organismus zu entfernen, würde die Belastung des Patienten mit toxischem Wirkstoff und damit das Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen deutlich verringern.

Seit vielen Jahren wird die extrakorporale Elimination von Lipoproteinpartikeln durch verschiedene Aphereseverfahren im klinischen Alltag erfolgreich durchgeführt. Liposomen sind den Lipoproteinen in einigen Eigenschaften recht ähnlich. CARL untersucht die Möglichkeit, durch eine extrakorporale Elimination liposomale Chemotherapeutika aus dem Plasma des Patienten zu entfernen.

In vitro Untersuchungen: Die verschiedenen Trennprinzipien, die bei der LDL-Apherese angewandt werden, wurden auf ihre Tauglichkeit zur Entfernung von Liposomen aus humanem Plasma untersucht. Grundsätzlich sind alle Aphereseverfahren zur extrakorporalen Eli-

mination von entsprechenden Modellliposomen geeignet. Präzipitations- und Adsorptionsverfahren sind jedoch weniger breit einsetzbar als Filtrationsverfahren, und letztere Methode erlaubt im Gegensatz zu den anderen Verfahren die Entfernung von therapeutisch eingesetzten Liposomen (Caelyx®). Die in der LDL-Apherese eingesetzte Gerätetechnik für die Membrandoppelfiltration ist für die Elimination von Caelyx® geeignet. Die Filtration von Caelyx® erfolgt mit hoher Effizienz, eine Freisetzung von Doxorubicin findet nicht statt.

Klinische Untersuchungen: Im Rahmen einer Phase I Studie wird die Effektivität und Sicherheit der extrakorporalen Elimination von Caelyx® an 12 Patienten untersucht. Die Liposomenapherese wird im Rahmen von 2 verschiedenen Behandlungsprotokollen durchgeführt: neoadjuvante Kombinationstherapie von primärem Brustkrebs mit Navelbine®/Caelyx® und Caelyx®-Monotherapie als second line Therapie bei metastasiertem Ovarialkarzinom (palliativ). Die Liposomenapherese wird zusätzlich zum normalen Behandlungsprotokoll durchgeführt.

Anhand der ersten Patientendaten können folgende vorläufige Erkenntnisse gewonnen werden: Die extrakorporale Elimination von Caelyx® erfolgt mit derselben Effizienz wie die LDL-Apherese (ca. 70% ($\pm$ 1%) der im Plasma befindlichen Menge bei Filtration eines Plasmavolumens). Zum Zeitpunkt der Apherese befanden sich noch ca. 75% ($\pm$ 2%) der initialen Gesamtdosis an liposomalem Doxorubicin im Plasma, nach Elimination durch die Apherese noch ca. 21% ($\pm$ 5%). Im Durchschnitt konnten somit 54% ($\pm$ 3%) der Gesamtdosis eliminiert werden. Eine Freisetzung von Doxorubicin während der Filtration fand nicht statt. Die Apherese wurde gut vertragen, Komplikationen oder schwerwiegende Nebenwirkungen durch die Apherese traten bisher nicht auf.

Schlussfolgerung: Nach den bisher vorliegenden Daten kann die extrakorporale Elimination von Caelyx® mit Hilfe der Membrandoppelfiltration als effizient und sicher angese-

hen werden. Sofern die weiteren im Rahmen der Phase-I-Studie gesammelten Daten den bisherigen Trend bestätigen, kann CARL zu einer wesentlichen Verringerung der Belastung der Patienten in einer Chemotherapie beitragen. Auf der Basis dieser Erkenntnisse können

neue Dosierungsschemata für die Chemotherapie mit liposomalen Anthrazyklinen aufgestellt werden, die ein verbessertes Nebenwirkungsprofil und/oder eine höhere Wirksamkeit aufweisen.

Role of factor XII in thrombosis and inflammation

Thomas Renné

Institute for Clinical Biochemistry and Pathobiochemistry, University of Würzburg

Factor XII (FXII), triggers the intrinsic pathway of coagulation and the kallikrein-kinin system. We studied the contribution of FXII for thromboembolic diseases and edema formation.

We analyzed FXII-null mice in arterial injury models and found a severe defect in thrombus formation in three arterial beds. The importance of FXII for occlusive diseases was analyzed using models of ischemic stroke and myocardial I/R injury. Following transient middle cerebral artery occlusion, ischemic brain injury was significantly reduced in FXII deficient and FXII inhibitor-treated mice, without an increase in hemorrhage. FXII-null and inhibitor treated mice were largely protected from ischemia/reperfusion injury in myocardial infarction models. Targeting FXII reduced fibrin formation in ischemic vessels, and reconstitution of FXII deficient mice with human FXII restored fibrin deposition. Mice deficient in factor XI were similarly protected from thrombosis, suggesting that FXII contributes to pathologic clotting through the intrinsic pathway.

Hereditary angioedema (HAE) is characterized by life-threatening swelling attacks. In contrast to classical forms, which are due to deficiency of C1-inhibitor, pathology of HAE type III is unknown. In a genome wide linkage analysis we found that HAE III is associated with a FXII gene missense mutation, which results in a Thr328Lys substitution. Mutated FXII has in-

creased proteolytic activity and generates bradykinin by the contact activation system in plasma. For diagnosis, we generated specific antibodies that detect mutated FXII protein in patient plasma. Edema models in mice revealed the pathomechanism of HAE III. Intravital confocal microscopy showed that mutated FXII increases vascular leakage in wildtype mice, whereas bradykinin receptor deficient mice were resistant to FXII-induced edema formation. Bradykinin receptor antagonists or FXII-inhibitors inhibited FXII-driven leakage in wildtype mice.

The data suggest that, FXII is essential for thrombus formation and vascular permeability and that FXII inhibition may offer a selective and safe strategy for preventing thromboembolic disease and edema formation in HAE III.

For further reading:

- 1) Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, U., Renné, C., Gailani, D., Nieswandt, B., and Renné, T. (2006) Targeting coagulation Factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J. Exp. Med.* 203, 513-518
- 2) Gailani, D. and Renné, T. (2007) The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J. Thromb. Haemost.*, 5, 1106-12
- 3) Gailani D, Renné T. (2007) Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 2507-13.

Niedermolekulare Proteine als Marker der glomerulären Filtrationsrate

Lorenz Risch

Zentralinstitut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik, Landeskrankenhaus Innsbruck

Die Erfassung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) als Summe der Filtrationsrate aller funktionierenden Nephrone ist der beste globale Marker der funktionellen Kapazität der Nieren. Vor dem Hintergrund, dass die besten Methoden zur Bestimmung der GFR für den klinischen Alltag zu aufwendig und die Routinemarker der GFR (z.B. Kreatinin, Harnstoff) mit substantiellen Nachteilen behaftet sind, wurde nach alternativen Nierenfunktionsparametern, vornehmlich niedermolekularen Proteinen, gesucht.

Die Bestimmung von Serumkonzentrationen von Cystatin C, β_2 -Mikroglobulin und β -trace protein ist jener des Kreatinins in der Erkennung einer erniedrigten GFR überlegen. Die Entwicklung von Schätzformeln erlaubt dabei für den klinischen Alltag eine Umrechnung von Serumkonzentrationen in eine ent-

sprechende GFR. Allerdings ist z.B. bei nieren-transplantierten Patienten, einem Patientenkollektiv mit dem Bedarf nach möglichst verlässlicher Schätzung der GFR, v.a. Cystatin C als Nierenfunktionsmarker nur beschränkt geeignet. Grund dafür stellt eine durch Glucocorticoid-Therapie bedingte, dosisabhängige Erhöhung von Cystatin C dar, welche sich mit zunehmender Abnahme der GFR akzentuiert.

Einer richtigen und sensitiven Einschätzung einer erniedrigten GFR kommt im klinischen Alltag eine wichtige Rolle zu. Die Erkennung selbst milder Einschränkungen der GFR hat v.a. auch wegen einem damit verbundenen kardiovaskulären Risiko zunehmende Bedeutung. Im Vergleich mit Kreatinin hat sich Cystatin C diesbezüglich als stärkerer Prädiktor gezeigt.

G-Quadruplex- und i-Motiv-Strukturen und präferenzielle Amplifikation eines Allels – Ursache für fehlerhafte Genotypisierungen

Heidi Rossmann

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinikum Mainz

Sogenanntes „Allele Dropout“ bei eigentlich heterozygoten Individuen wird durch präferenzielle Amplifikation eines Allels verursacht und kann im Rahmen der molekulargenetischen Diagnostik zu schwerwiegenden Fehldiagnosen führen. Ausgehend von einem Fall von präferenzieller Amplifikation und Allele Dropout, der im Rahmen der MEN1 (Multiple endokrine Neoplasie Typ I) Diagnostik auffiel, zeigen wir hier, dass dieses Phänomen bei zahlreichen SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in Kombination mit spezifischen

flankierenden Sequenzmotiven auftreten kann. Diese Motive sind in der Mehrzahl sogenannte G-quadruplex oder i-Motive, typische Sequenzmotive, die die Bildung sekundärer und tertiärer DNA-Strukturen in vitro und in vivo vermitteln und dadurch die Aktivität von DNA-Polymerasen regulieren können. Die Bildung von G-quadruplexen ist abhängig von der Konzentration ein- und zweiwertiger Kationen. Entsprechend beeinflusst die Konzentration dieser Ionen im PCR-Puffer die Amplifikation der jeweiligen Allele massiv. Man kann z.B. in

solchen Fällen in Abhängigkeit von der $MgCl_2$ -Konzentration völlig unterschiedliche, aber jeweils reproduzierbare Genotypisierungsergebnisse erzielen. Basierend auf unseren Daten haben wir Algorithmen entwickelt, die helfen SNPs zu identifizieren, die von einem solchen Problem betroffen sein könnten. Mit Hilfe unterschiedlicher $MgCl_2$ -Konzentrationen im PCR-Puffer und einem quantitativen Genotypi-

sierungsverfahren können wir schliesslich experimentell prüfen, ob ein SNP vom Phänomen des „Allele Dropout“ betroffen ist. Aufgrund der weiten Verbreitung von G-quadruplex und i-Motiven im Genom ist davon auszugehen, dass eine große Zahl von SNPs von diesem Phänomen betroffen ist, darunter auch – wie unser Fall zeigt – diagnostisch relevante SNPs.

Epigenetik und Asthma – Mechanismen der Allergie-Prävention durch Stallbakterien

René Teich

Abteilung Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH, Marburg

Allergien gehören weltweit zu den häufigsten Erkrankungen mit steigenden Neuerkrankungsraten in industrialisierten Ländern, insbesondere beim allergischen Asthma bronchiale. Allergischen Erkrankungen liegt eine fehlgeleitete, TH2-favorisierende Immunantwort zugrunde, die multifaktoriell beeinflusst wird: wobei einerseits die individuelle genetische Disposition und zum anderen Umwelteinflüsse von Bedeutung sind. Als eine Ursache für die Zunahme atopischer Erkrankungen wird der sinkende Kontakt zu Mikroorganismen diskutiert („Hygiene-Hypothese“). Epidemiologische Daten konnten zeigen, dass das Leben auf traditionellen Bauernhöfen einen schützenden Effekt vor Allergien und Asthma vermittelt. Diese Studien deuten auch an, dass möglicherweise bereits die pränatale Lebensphase, in der die schwangere Mutter verschiedensten mikrobiellen Komponenten in hohen Konzentrationen ausgesetzt ist, einen entscheidenden Einfluss auf die Allergiesuppression der Kinder besitzt.

In diesem bäuerlichen Milieu wurde das Gram-negative, apathogene γ -Proteobakterium *Acinetobacter lwoffii* F78 dominant detektiert. Zur Untersuchung der Ursache-Wirkungs-

beziehung direkter bzw. indirekter Exposition zu Bakterien verwendeten wir verschiedene Mausmodelle des allergischen Asthmas. Hiermit konnten wir die allergoprotektiven Eigenschaften von *A. lwoffii*, charakterisiert durch eine signifikant verbesserte Lungenfunktion, eine Reduktion der Atemwegsentzündung sowie der Anzahl Mucus-produzierender Becherzellen, nachweisen. Gleichzeitig bewirkte die pränatale *A. lwoffii*-Exposition der Mütter eine reduzierte $IFN-\gamma$ Produktion in den Nachkommen. Unserer Hypothese folgend, dass epigenetische Mechanismen an der pränatalen Allergieprotektion beteiligt sind, untersuchten wir den DNA-Methylierungsstatus des proximalen $IFN-\gamma$ Promoters in T-Helfer-Zellen von Neugeborenen. Tatsächlich bewirkte die Exposition der Mütter mit *A. lwoffii* eine erhöhte Methylierung in den Nachkommen, was mit der reduzierten $IFN-\gamma$ Produktion korreliert.

Die Ergebnisse unserer tierexperimentellen Untersuchungen bekräftigen, dass pränatale mikrobielle Exposition einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer allergischen Immunantwort in den Nachkommen besitzt und dass epigenetische Mechanismen an der Allergie-Protektion beteiligt sind.

Eine genomweite Assoziationsstudie zur Identifizierung von Kandidatengen für hohe Faktor VIII-Spiegel bei venösen Thromboembolien

F. Thieme¹, A. Fiebig², T. Lu³, H. von Eller-Eberstein², B. Flesch⁴, M. Spannagl⁵, E. Lindhoff-Last⁶, S. Schreiber², C. M. Schambeck¹

¹ Institut für Klinische Chemie, ² Institut für Klinische Molekularbiologie, ³ Institut für Medizinische Informatik und Statistik, ⁴ Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, ⁵ Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum München, ⁶ Gefäßzentrum, Schwerpunkt Angiologie und Hämostaseologie, Universitätsklinikum Frankfurt

Hohe Plasmaspiegel des Gerinnungsfaktors VIII (FVIII) sind ein bekannter Risikofaktor für tiefe Venenthrombosen. Jedoch ist der zugrundeliegende Mechanismus für hohe FVIII-Spiegel bis heute nicht aufgeklärt. Obwohl, wie in aktuellen Untersuchungen gezeigt werden konnte, ein familiärer Hintergrund wahrscheinlich ist, konnten bis jetzt keine kausalen molekularen Defekte in den Genen für FVIII und den von-Willebrand-Faktor (vWF) entdeckt werden die eine Assoziation zu venösen Thrombosen aufweisen. Kürzlich wurde ein neuer Phänotyp, das „Faktor VIII Residuum“, beschrieben, mit einer erhöhten *in vivo* Ratio von zirkulierendem FVIII zu vWF, verglichen mit gesunden Probanden oder Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen [1]. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für tiefe Venenthrombosen.

Um potentielle neue Gene zu identifizieren, die zu einem hohen FVIII-Residuum beitragen, führen wir derzeit eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durch.

Blutproben von 500 Probanden aus der deutschen Populations-Biobank PopGen wur-

den für die Bestimmung der FVIII- und vWF-Spiegel verwendet. Aus den Proben wurde DNA isoliert und für Affymetrix und Illumina 500K SNP-Chip-Analysen eingesetzt. Die besten 46 Hits aus den Microarray-Experimenten, die p-Werte bis zu 10^{-7} aufweisen, werden zur Zeit in Thrombose-Patienten mit hohen Faktor-VIII-Spiegeln aus dem Main-Isar-Thrombose-Register (MAISTHRO) mittels SNPlex und TaqMan repliziert.

Mutationen, identifiziert durch die Microarray- und SNPlex-Analysen, würden uns in die Lage versetzen, in den Modifier-Genen nach spezifischen Mutationen zu suchen, die zu hohen FVIII-Spiegeln und einer erhöhten FVIII:vWF-Ratio führen.

Die Aufklärung der kausalen Mechanismen für hohe FVIII-Spiegel könnte außerdem einen völlig neuen Ansatz für die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen zur Behandlung hämophiler Patienten möglich machen.

1) Berger M, Mattheisen M, Kulle B, Schmidt H, Oldenburg J, Bickelböller H, Walter U, Lindner TH, Strauch K, Schambeck CM. Blood 2005;105:638-644.

Fhit represses β -catenin activity

Jörg Weiske and Otmar Huber

Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin

Fhit (fragile histidine triad) ist ein Mitglied der Superfamilie der Histidin-Triaden (HIT)-Proteine, die durch das Sequenzmotiv HXHXHXX (H: Histidin; X: hydrophobe Aminosäure) im aktiven Zentrum gekennzeichnet sind. Es besitzt eine typische AP_nA -Hydrolase Aktivität, wobei AP_3A hierbei das bevorzugte Substrat darstellt, das durch Fhit zu AMP und ADP umgesetzt wird.

Interessanterweise ist das kodierende Gen für das Fhit Protein im FRA3B-Bereich des dritten Chromosoms lokalisiert, einer der instabilsten Regionen des menschlichen Genoms. In Karzinomen der Lunge, des Gastrointestinaltraktes und anderer Gewebe wurden auf Chromosomenbrüchen beruhende Deletionen in diesem Bereich beschrieben. In verschiedenen Tumorzelllinien und Mausmodellen, konnte eine Tumorsuppressor-Wirkung von Fhit gezeigt werden, jedoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weitgehend unverstanden.

Die gegenwärtigen Befunde deuten darauf hin, dass Fhit unter anderem über die Regulation der Induktion von Apoptose die Tumor-

suppression vermittelt. Wir konnten bereits zeigen, dass Hint1, ein Mitglied des ersten Zweiges der HIT-Superfamilie, die TCF- β -Catenin vermittelte Transkriptionsaktivität inhibiert und in Tumorzellen Apoptose induziert.

Ausgehend von diesen Befunden sollte untersucht werden, ob Fhit als Mitglied des zweiten Zweiges der HIT-Proteine ebenso die β -Catenin-regulierte Gentranskription moduliert und dies somit einen molekularen Mechanismus für seine tumorsuppressive Aktivität darstellt.

Wir konnten zeigen, dass Fhit im Gegensatz zu Hint1 mit dem LEF-1/ β -Catenin Komplex durch eine direkte Interaktion mit β -Catenin assoziiert ist. Dies führt zu einer Repression der transkriptionellen Aktivität von β -Catenin und geht einher mit veränderten Wachstumsverhalten von Karzinomzellen im Softagar-Assay. Wir konnten somit erstmals einen molekularen Mechanismus für die tumorsuppressive Wirkung von Fhit aufzeigen.

Nachrichten

Themenhefte „Klinische Chemie und molekulare Diagnostik“

Heft 1: Leistungsverzeichnis des Medizinischen Laboratoriums

W. Vogt, Herausgeber, 62 Seiten, 1997, brosch., € 10,90 (für DGKL-Mitglieder € 8,00)

Heft 2: Sicherung der Qualität molekularbiologischer Methoden in der Klinischen Chemie

M. Neumaier, A. Braun, Th. Deufel, A. Roscher und Ch. Wagener, 62 Seiten, 1997, brosch., € 17,90 (für DGKL-Mitglieder € 15,00)

Heft 3: Die Vergütung ärztlicher Leistungen im medizinischen Laboratorium

S. Appel, Herausgeber, 58 Seiten, 1997, brosch., € 12,90 (für DGKL-Mitglieder € 10,00)

Heft 4: Total Quality Management und die Bewertung nach dem Modell der European Foundation for Quality Management - Anwendung auf das Medizinische Laboratorium

W. Vogt, Herausgeber, 216 Seiten, 2000, brosch., € 35,90 (für DGKL-Mitglieder € 30,00)

Weitere Informationen und Bestellungen bei:

Isensee Verlag GmbH, Haarenstr. 20/Burgstr. 17, D-26122 Oldenburg; Telefon 0441-25388; Telefax: 0441-17872; e-mail: Isensee-Verlag@t-online.de; URL: <http://www.isensee.de>

Nachruf

Bernd Puschendorf



Am 3. Januar 2008 verschied Univ.-Prof. Dr. *Bernd Puschendorf*, langjähriger Leiter der Abteilung / Sektion für Klinische Biochemie der Universität Innsbruck / der neu gegründeten Medizinischen Universität Innsbruck.

Bernd Puschendorf wurde am 20.07.1942 in Berlin geboren. Nach Absolvierung seiner Schulzeit in Berlin, Konstanz und Freiburg und des Abiturs am humanistischen Berthold-Gymnasium in Freiburg studierte er von 1961 bis 1966 Medizin an der dortigen Universität. 1964 wurde er Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes. 1966 legte er das

Staatsexamen ab und promovierte mit einer unter Anleitung von Prof. Dr. *Hans Grunicke* am Institut für Biochemie erstellten Arbeit mit dem Thema: *„Die Nikotinsäuremononukleotid-pyrophosphorylase in Ehrlich Aszites Tumorzellen und ihre Bedeutung für die durch alkylierende Zytostatika hervorgerufene Nikotinsäureamidadeninnukleotid-Senkung“*. Für diese Arbeit erhielt er 1968 den Preis des Kultusministeriums von Baden-Württemberg. Von 1968 bis 1974 arbeitete er zunächst als Assistent, später als Oberassistent in der Arbeitsgruppe von *Hans Grunicke* über den Einfluss von Pharmaka auf Struktur und Funktion von Nukleinsäuren und Chromatin. 1973 habilitierte er mit dem Thema *„Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Distamycin A“*. 1975 wechselte er von Freiburg an das von *Hans Grunicke* geleitete Institut für Medizinische Chemie und Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität Innsbruck. Hier etablierte er eine Abteilung für Klinische Biochemie. 1979 wurde er zum Professor für Medizinische Chemie ernannt. Mehrmals wurde er mit der Leitung des Instituts betraut. Bis zu seiner Emeritierung war er Direktor der Sektion Klinische Biochemie am Biozentrum der neu gegründeten Medizinischen Universität Innsbruck.

Zu Beginn seiner Innsbrucker Tätigkeit war der Forschungsschwerpunkt seiner Arbeitsgruppe Histonazetylierung und Histonvarianten. Später baute er mit den kardialen Markern einen weiteren Forschungsschwerpunkt auf. Neben der CKMB wurden neue Marker wie die Glycogenphosphorylase BB und die Troponine zur Feststellung einer kardialen Ischämie bzw. Nekrose untersucht. Zusätzlich wurde die Freisetzung von Skelettmuskelschädigungsmarkern bei exzentrischer und konzentrischer Belastung, Immobilisation und Muskelerkrankun-

gen ermittelt und von der Myokardschädigung abgegrenzt. Die natriuretischen Peptide und deren second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat wurden frühzeitig für die Diagnostik der Herzinsuffizienz evaluiert. Diese Untersuchungen wurden in enger Kooperation mit den Innsbrucker Kardiologen, Kardiochirurgen, Neurologen und Sportmedizinern sowie mit Arbeitsgruppen in Berlin, Freiburg, Montpellier und der Slowakei durchgeführt. *Bernd Puschendorf* zeichnete sich durch außerordentliche Leistungen in der Etablierung und klinischen Umsetzung wichtiger Parameter zur Diagnose kardiovaskulärer Erkrankungen aus.

Seine wissenschaftlich erfolgreiche Tätigkeit belegte *Bernd Puschendorf* mit über 200 Publikationen - jeweils die Hälfte mit biochemischer und klinisch chemischer Thematik. In Anerkennung seiner Arbeiten wurde er mit dem schon erwähnten Preis des Kultusministeriums Baden-Württembergs, dem Forschungspreis der Firma Byk-Gulden und mit anderen Kollegen zusammen mit vier weiteren Preisen der Firma Höchst ausgezeichnet. Für seine Verdienste um die wissenschaftliche Kooperation wurde ihm 1990 von der Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der DDR die Leonor Michaelis Medaille verliehen. 1993 erhielt er einen Ruf auf den Lehrstuhl für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald.

Neben seiner wissenschaftlichen Tätigkeit widmete sich *Bernd Puschendorf* mit großem Engagement der Lehre mit Vorlesungen in Chemie, Biochemie und Klinischer Chemie sowie in Praktika gewidmet. 1975 führte er zusammen mit seinen Kollegen erstmals die freiwillige, aber sehr gut besuchte Lehrveranstaltung mit Praktikum für klinische Chemie in Innsbruck ein. Die zahlreichen Vorlesungen belasteten ihn, wie er im persönlichen Gespräch betonte, nicht. Die Weitergabe des Wissens an die jüngere Generation war ihm ein Bedürfnis und bereiteten ihm Freude. Es war ihm stets wichtig, den Studenten der Me-

dizin die Bedeutung der klinischen Chemie in der späteren ärztlichen Tätigkeit bewusst zu machen. Durch sein unermüdliches Engagement als Mitglied der Studienkommission hat diese Lehrveranstaltung seit 2005 einen festen Platz im Studienplan für Medizin erhalten.

Bernd Puschendorf war Mitglied des Gründungskonvents der Medizinischen Universität und gehörte bis zum Jahre seiner Emeritierung dem Senat an.

Wie sehr er sich für das Institut, für die Forschung und Lehre selbstlos engagierte, brachte sein Doktorvater und langjähriger Institutsdirektor *Hans Grunicke* bei der Verabschiedung im Oktober 2007 zum Ausdruck, indem er sagte: "Niemand hat ihm mehr zu verdanken als ich. Mein Leben in Innsbruck wäre ohne ihn sehr viel schwieriger gewesen."

Bernd Puschendorf war in den wichtigsten deutschsprachigen klinisch chemischen und biochemischen Gesellschaften aktiv tätig und spielte eine bedeutende Rolle bei der Umsetzung wichtiger neuer Forschungsergebnisse in der Labormedizin. Darüber hinaus engagierte er sich mit voller Kraft für die Österreichische Gesellschaft für Klinische Chemie (ÖGKC). Zuerst gründete *Bernd Puschendorf*, noch als Sekretär, die Nebenstellen der ÖGKC in Wien, Linz, Salzburg, Innsbruck und Graz. Es war ihm immer wichtig, die wissenschaftlichen Aktivitäten innerhalb der Gesellschaft zu betonen, da für ihn von allem Anfang an die Klinische Chemie auf zwei Säulen aufgebaut war: auf dem Routinelabor und den wissenschaftlichen Aktivitäten.

1986 wurde er zum Präsident der ÖGKC gewählt. In dieser Eigenschaft baute er die Nebenstellen weiter aus. Bis zum heutigen Tag beschäftigen sich diese vor allem mit wissenschaftlichen Fragestellungen und weniger mit der Standespolitik.

Bernd Puschendorf erwies sich als ein sehr weitsichtiger Präsident der ÖGKC, in dem er bereits 1988 forderte, dass im Fach Klinische Chemie die wissenschaftliche Forschung in

Form der Klinischen Biochemie an erster Stelle zu stehen hat.

Seine Vorstellung, dass der Facharzt für medizinische und chemische Labordiagnostik sich verstärkt der Interpretation der Labordaten und Befunderstellung zuwenden und daraus an entsprechenden pathobiochemischen Modellen die molekulare Ursache von Krankheiten aufklären müsse, ist bis zum heutigen Tage gültig. *Bernd Puschendorf* erkannte schon damals, dass der Labormediziner nur dann auf Dauer als Partner von den klinischen Kollegen akzeptiert wird, wenn er sich neben der angewandten Analytik auch mit eigenständigen Ideen und Interpretationen einbringt. Dieses Streben von *Bernd Puschendorf* hat bis heute nichts von seiner Wichtigkeit eingebüßt. In der Vollversammlung vom 23. Sep 1988 wurde *Bernd Puschendorf* erneut zum Präsident der ÖGKC gewählt. In Anerkennung seiner Verdienste um das Fach „Medizinische und Chemische Labordiagnostik“ und um die Fachgesellschaft wurde ihm im Jahre 2006 die Ehrenmitgliedschaft der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC) verliehen.

In seiner neuen Heimat Telfs leitete er neun Jahre lang die Bezirksstelle des Roten Kreuzes und war von 1997 bis 2003 Vizepräsident des Landesverbandes Tirol des Roten Kreuzes. Diese Tätigkeit war sein Dank an die Tiroler für die herzliche Aufnahme und Integration.

Für *Bernd Puschendorf* waren diese vielfältigen Tätigkeiten und Aktivitäten keine Last, vielmehr die Erfüllung seines Lebensentwurfs. Er ist ihnen mit Freude nachgekommen, wobei ihm sein ausgezeichnetes Organisationstalent eine große Hilfe war. Er verfügte über ein breites Fachwissen und zeichnete sich durch Kollegialität und Hilfsbereitschaft aus. Überlastung war ein Begriff, den er nicht kannte. Selbstlos setzte er sich für die Anerkennung der Klinischen Chemie und Labormedizin als eigenständige medizinische Disziplin ein.

Ich, *Andrea Griesmacher*, möchte persönlich Herrn Professor *Puschendorf* für seine stets aufrichtigen, engagierten und ehrlichen Ratschläge, Unterstützung und Förderung bedanken, die er mir in den letzten 20 Jahren und vor allem seit Beginn meiner Tätigkeit in Innsbruck selbstlos entgegengebracht hat.

Mit ihm ist ein sehr liebenswerter und wissenschaftlich hervorragender Kollege und engagierter Lehrer von uns gegangen. Wir werden die anregenden Gespräche und Diskussionen mit ihm vermissen.

Unsere herzliche Anteilnahme gilt Frau *Sigrid Puschendorf*.

Für die ÖGLMKC:
Univ. Doz. Dr. Andrea Griesmacher

Für die DGKL:
Prof. Dr. Dr. Dr. h.c. Hermann Wisser

Positionen

1 Stellenanzeige aus Kassel

Preis Ausschreibung

Ausschreibung

Wissenschaftspreis der Lesser-Loewe-Foundation e.V.

Die Lesser-Loewe-Foundation e.V.(LLF) zur Förderung der klinischen Forschung und Grundlagenforschung schreibt für 2008 erneut den Lesser-Loewe-Wissenschaftspreis aus.

Durch den Preis sollen hervorragende wissenschaftliche Leistung auf dem Gebiet der Pathobiochemie und molekularen Diagnostik in der Klinischen Chemie / Laboratoriumsmedizin ausgezeichnet werden.

Der Themenschwerpunkt der diesjährigen Preisverleihung ist auf die molekulare Diagnostik onkologischer Erkrankungen ausgerichtet.

Der Preis ist mit 10.000 € dotiert. Er wird im Rahmen der diesjährigen Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) in Mannheim gemeinsam durch die LLF und die DGKL verliehen.

Weitere Informationen zur Ausschreibung sind im Internet unter <http://www.lesser-loewe-foundation.de/> hinterlegt. Bewerbungen können bis spätestens **31.07.2008** gerichtet werden an:

Dr. rer. nat. D. Hannak, Institut für Klinische Chemie, Theodor Kutzer Ufer 1-3, 68167 Mannheim

Tagungs- und Kursankündigungen

7. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Chipdiagnostik und 3. gemeinsame Jahrestagung der Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik der DGKL vom 29. – 30. Mai 2008 in der Evangelischen Akademie Tutzing

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

die Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik der DGKL haben die Aufgabe, Entwicklungen auf dem Gebiet der hochparallelisierten Nukleinsäureanalytik zu beobachten, auf ihr Potential für die klinische Diagnostik zu bewerten, und bei der Einführung geeigneter Qualitätssicherungsmaßnahmen mitzuwirken. Die Einsatzmöglichkeiten der Chiptechnologie umfassen Anwendungen in allen Bereichen der in-vitro-Diagnostik wie z.B. in der Laboratoriumsmedizin, der Bakteriologie und Virologie, der Humangenetik oder der Pathologie. Aus diesem Grund legen die Arbeitsgruppen Wert auf eine rege interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Vertretern anderer Fachgruppen. Nach einem sehr erfolgreichen Treffen im vergangenen Jahr zum Einsatz der Chipdiagnostik in der Infektionserregerdiagnostik, setzen wir in diesem Jahr die Tradition der Interdisziplinarität mit dem Titel „Microarrays in der Pathologie“ fort. Hierbei werden insbesondere neue Entwicklungen auf dem Feld der Gewebematrizes oder Multigewebeblöcken (tissue arrays) beschrieben. Tissue Arrays finden schon heute Anwendung bei der molekularen Charakterisierung von Geweben auf der Ebene der Proteine, der Zucker und der DNA. Der zweite Schwerpunkt der Tagung beschäftigt sich mit Anwendungen der multiparametrischen Analytik in der epigenetischen Regulation der Genaktivität, die insbesondere bei der Karzinogenese eine Rolle spielen kann. Das dritte Hauptthema der Tagung ist die arraybasierte vergleichende genomische Hybridisierungstechnologie (engl. array comparative genomic hybridization oder Array-CGH). Diese empfindliche Methode zur hochauflösenden Darstellung genomischer Imbalancen wird bereits in der Routine eingesetzt, um kleine Verluste bzw. Zugewinne an genetischem Material zu erkennen, die mit den klassischen Methoden der Zytogenetik und Molekularzytogenetik nicht zu erfassen sind. Die Array CGH wird auch immer häufiger zur Charakterisierung von Tumorgewebe verwendet. Wie in vergangenen Jahren, wird eine Zusammenfassung der Tagung in verschiedenen Fachzeitschriften, u.a. im Journal of Laboratory Medicine, veröffentlicht. Wir hoffen, dass es uns gelungen ist, auch in diesem Jahr wieder ein interessantes Programm zusammenzustellen (Programm kann per Email unter info@medizinische-genetik.de angefordert werden).

Prof. Dr. med. Paul Cullen (Vorsitz AG Chipdiagnostik)

Prof. Dr. med. Michael Neumaier (Vorsitz AG Bioinformatik)

Dr. med. Hanns-Georg Klein (Gastgeber und Organisation)

Berufsvereinigung der Naturwissenschaftler in der Labordiagnostik e.V.

Prof. Dr. Dr. N. Gässler Zentrum für Labordiagnostik St. Bernward-Krankenhaus 31132 Hildesheim
Tel. 05121-90-1680 Fax 05121-90-1694 Email: n.gaessler@bernward-khs.de
Sekretariat: I. Schwetje, Postfach 10 02 08, 31102 Hildesheim, Email: sekretariat@bnld.de



Hiermit lade ich Sie recht herzlich zur 15. BNLD-Jahrestagung am Samstag, 14. Juni 2008 ein.

Tagungsort: Thoraxklinik am Universitätsklinikum Heidelberg, Rohrbacher Schlösschen, Amalienstr. 5, 69126 Heidelberg-Rohrbach (s. auch www.bnld.de)

Vorläufiges Programm

9.30 h	Begrüßung	<i>Prof. Dr. N. Gässler, Hildesheim</i>
9.45 h		<i>Prof. Dr. W. Ebert, Heidelberg</i>
	<i>Fortbildungsteil</i>	
	Blick in die Zukunft – Welche Veränderungen wird die Labordiagnostik in Deutschland im Jahre 2015 erfahren haben?	
10.00 h	Labordiagnostik aus Sicht der DGKL	<i>Prof. Dr. Lackner, Mainz</i>
10.20 h	Labordiagnostik aus Sicht der VDGH	<i>Dr. Schulze, Frankfurt</i>
10.40 h	Labordiagnostik aus Sicht der BDL	<i>Dr. Bobrowski, Lübeck</i>
11.00 h	Labordiagnostik aus Sicht der BNLD	<i>Prof. Dr. Gässler, Hildesheim</i>
11.20 h	Labordiagnostik aus Sicht des DVTA	<i>Frau A. Michelsen, Lahr</i>
11.40 h	Labordiagnostik aus Sicht der Industrie (Siemens)	<i>Herr S. Wolf, Eschborn</i>
12.00 h – 12.30 h	Podiumsdiskussion	<i>alle Referenten</i>
12.30 h – 13.30 h	<i>Mittagspause –Imbiss</i>	
13.30 h	Berufspolitische Teil	
	TOP 1 Eröffnung, Tagesordnung	
	TOP 2 Bericht der Vorstandsmitglieder	
	TOP 3 Bericht der Kassenprüfer	
	TOP 4 Verschiedenes	

ca. 17:00 h Abreise

Wir bitten Sie, sich für die Teilnahme an der Jahreshauptversammlung per E-Mail sekretariat@bnld.de oder telefonisch unter 05121-90-1680 anzumelden. Dort erhalten Sie auch Hinweise zur Übernachtung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. N. Gässler

Hj. Staudinger Symposium Kloster Banz, 15. bis 17. Juni 2008

Liebe Kolleginnen, liebe Kollegen,

wir möchten Sie zum Hj. Staudinger Symposium der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. einladen. Auf dieser Konferenz, die im Kloster Banz stattfindet, sollen die wissenschaftlichen Arbeitsgruppen der DGKL e.V. ihre aktuellen Forschungsergebnisse in der Klinischen Chemie und Pathobiochemie vorstellen. Während der Tagung wird durch die Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. der „Ivar-Trautschold-Nachwuchs-Förderpreis für Klinische Chemie und Pathobiochemie“ verliehen.

Wie bei den vorangegangenen Staudinger-Symposien wird das wissenschaftliche Programm wieder aus den Vorschlägen der Teilnehmer erstellt, wobei die gesamte Breite des Fachgebietes berücksichtigt werden soll. Wegen des zeitlichen Rahmens muss die Zahl der Vorträge auf etwa 25 begrenzt bleiben. Deshalb wird gegebenenfalls eine Auswahl der geeignetsten Beiträge vorgenommen. Wir möchten Sie nun bitten, uns bis 01.März 2008 die vortragenden Mitarbeiter(innen) aus Ihrem Institut zu benennen und diese bitten, uns einen Abstract des Beitrages zuzusenden.

Wir würden uns freuen, wenn Sie und Ihre Mitarbeiter(innen) an der Tagung teilnehmen könnten. Nach Zusammenstellung des Programms werden wir Sie und die ausgewählten Vortragenden über weitere Details informieren.

Wir freuen uns auf anregende Diskussionen im Kloster Banz und verbleiben

mit herzlichen Grüßen

Ihre



Prof. Dr. Ingolf Schimke



Prof. Dr. Erwin Schleicher

Prof. Dr. Ingolf Schimke
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie (CCM)
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Charité Platz 1
10117 Berlin
Fax: 030 450 7513011
E-Mail: ingolf.schimke@charite.de

Anmeldung zum Hj. Staudinger-Symposium
15. –17.06.2008 in Kloster Banz
(Bitte bis 1. März 2008 zurücksenden)

Am Hj. Staudinger Symposium 2008 nehme ich teil
 nicht teil

Als Redner schlage ich vor:

.....
.....

Vorgeschlagene Vortragsthemen (ca. 15 min.):

.....
.....
.....
.....

Absender:

Ort, Datum

Unterschrift

15. Rostocker Gerinnungssymposium – Klinische Probleme in der Hämostaseologie

Plättchen und ihre klinische Bedeutung

Tagungsort Rotunde der HanseMesse Rostock, Zur HanseMesse 1-2 (ehem. IGA-Gelände), 18106 Rostock-Schmarl, www.hansemesse-rostock.de

Datum Samstag, 6. September 2008

Programm

9:00-9:05 Begrüßung: P. Schuff-Werner, Ärztlicher Direktor des Universitätsklinikums Rostock

Plättchen und ihre zentrale Rolle in der Hämostase

Vorsitz: O. Anders, H. Lestin

9:05-9:45 Neue Konzepte zum Verständnis der Thrombozytenfunktion, *U. Walter, Würzburg*

9:45-10:15 Thrombozytenfunktionsdiagnostik – aktueller Stand in der Abklärung thrombozytärer Störungen, *C. Burstein, Rostock*

10:15-10:45 Thrombozytopathien als Ursache von Blutungen und ihre Behandlungsmöglichkeiten, *A. Greinacher, Greifswald*

10:45-11:15 Kaffeepause in der Industrieausstellung

Plättchen und akutes Koronarsyndrom

Vorsitz: P. Schuff-Werner, V. Kiefel

11:15-11:45 Bedeutung der Plättchen in der Pathophysiologie des akuten Koronarsyndroms, *M. P. Gawarz, Tübingen*

11:45-12:15 Patientenmanagement bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Stenttherapie, *C. Nienaber, Rostock*

12:15-12:45 ASS- und Clopidogrelresistenz – ein pharmakologisches Problem?, *T. Hohlfeld, Düsseldorf*

12:45-13:15 ASS- und Clopidogrelresistenz – ein klinisches Problem?, *R. Klamroth, Berlin*

13:15-14:30 Mittagspause in der Industrieausstellung

Plättchen bei ausgewählten Erkrankungen

Vorsitz: M. Freund, A. Greinacher

14:30-15:00 Diagnostik der Autoimmunthrombozytopenie – benötigen wir die Bestimmung der thrombozytären Autoantikörper?, *V. Kiefel, Rostock*

15:00-15:30 Chronische refraktäre Autoimmunthrombozytopenie – eine therapeutische Herausforderung, *O. Anders, Rostock*

15:30-16:00 Essentielle Thrombozythämie – Diagnostik und therapeutisches Management, *M. Freund, Rostock*

Schlussbemerkungen: H.-G. Lestin

Organisation (Anmeldung, weitere Auskünfte)

Porstmann Kongresse GmbH, Alte Jakobstr. 77, 10179 Berlin, Telefon: 030 284499-17, Telefax: 030 284499-11, E-Mail: haemostase2008@porstmann-kongresse.de

Weitere Informationen finden Sie unter www.porstmann-kongresse.de/haemo2008.

5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL)

„Laboranalytik: Vom Labortisch ans Krankenbett“

in Kooperation mit:

Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC)

Berufsverband Deutscher Laborärzte (BDL)

Berufsvereinigung der Naturwissenschaftler in der Labordiagnostik (BNLD)

Verband der Diagnostica-Industrie (VDGH)

Datum:	21. – 24. September 2008
Ort:	Mannheim (Baden-Württemberg), Congress Center Rosengarten, Rosengartenplatz 2, D-68161 Mannheim
Inhalte:	Plenarsitzungen, Symposien, Industriesymposien, praktische Kurse, Postersitzungen
Fachbereiche:	Klinische Chemie, Labormedizin und angrenzende Berufsgruppen
Teilnehmer:	ca. 700
Aussteller:	ca. 50
Wissenschaftliche Leitung:	Prof. Dr. med. Karl J. Lackner Direktor Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Mainz
Organisation:	Conventus Congressmanagement & Marketing GmbH Markt 8, D-07743 Jena +49 (0)3641 353 30 dgkl2008@conventus.de www.dgkl2008.de
Abstract Deadline:	28. Mai 2008

Zertifizierung: CME-Punkte beantragt bei der Landesärztekammer Baden-Württemberg

6. Anwendertreffen LC-MS/MS in der Labormedizin

Die Arbeitsgruppe LC-MS/MS der DGKL veranstaltet am **24. September 2008** ein Treffen von Anwendern der LC-MS/MS-Technologie im Bereich der Labormedizin. Tagungsort ist die Evangelische Akademie in Tutzing am Starnberger See. Unsere Veranstaltungen haben einen informellen Charakter, sie dienen vor allem dem praktischen Erfahrungsaustausch und der offenen Diskussion. Detaillierte Informationen zu unserer Veranstaltung finden Sie auf der Homepage unserer Arbeitsgruppe (www.lcms-medizin.de).

Um die Planung möglichst gut auf die tatsächliche Teilnehmerzahl ausrichten zu können, bitten wir um eine möglichst frühzeitige Anmeldung.

U. Ceglarek, H. Kirchherr, U. Kobold, R. Schreiner, M. Rauh, B. Rolinski, M. Vogeser für die Arbeitsgruppe LC-MS/MS der DGKL

Kontaktadresse:

PD Dr. Michael Vogeser, Institut für Klinische Chemie
Klinikum Großhadern der LMU München, Marchioninistr. 15, 81377 München
Tel. 089-7095-3221, E-Mail: Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de



13. Intensivkurs für klinische Hämostaseologie der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Giessen, 17. - 21.11.2008

Kursbeginn: Montag, 17.11.2008, 14.00 Uhr

Kursende: Freitag, 21.11.2008, 13.00 Uhr

Inhalte:

- **Physiologie und Biochemie von**
 - Blutplättchen
 - Gefäßwand
 - Plasmatischer Gerinnung
 - Fibrinolyse
- **Molekularbiologie bei Hämostasedefekten**
- **Gerinnungsanalytik**
- **angeborene und erworbene**
 - Thrombozytopathien und Thrombozytopenien
 - Koagulopathien
 - Thrombophilien
 - Von Willebrand Syndrom
- **Diagnostik und Therapie akuter venöser Thromboembolien**
- **Hämostaseologische Veränderungen bei arterieller Verschlusskrankheit**
- **Hämostaseologie in**
 - Gynäkologie u. Geburtshilfe
 - Pädiatrie
 - Chirurgie und Intensivmedizin
- **Hämostaseologische Veränderungen bei Tumoren**
- **Indikation und Therapie mit**
 - direkten und indirekten Antikoagulantien
 - oralen Antikoagulantien
- **Fibrinolytische Therapien**
- **Einsatz von Gerinnungsfaktorenkonzentraten**
- **Antikoagulantien und Thrombolytika beim akuten Koronarsyndrom**
- **Hämostaseologische Kasuistiken**
- **Labor-Demonstrationen**
(Koagulometer, insbes. Großgeräte, Plättchenaggregationsteste, Immunolog. Methoden, Facs-Analysen, Gentypisierung)

Voraussetzungen: Abgeschlossenes Studium (Medizin, Biochemie u. ä.), hämostaseologische Vorkenntnisse

Kursgebühr: 500,- € (incl. Manuskript via GTH-Homepage, Mahlzeiten, Rahmenprogramm)

Fortbildungspunkte: sind bei der LÄK Hessen beantragt, bisher wurden 35 Punkte vergeben.

Anmeldungen (nur per Anmeldeformular) an:

Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes, ISP für Hämostaseologie, Klinikstr. 36, 35385 Gießen, Tel.: 0641/ 99 42702 oder 0641/ 99 24726 (Sekret.), Fax: 0641/ 99 42728, e-Mail: GTH.Crashkurs@innere.med.uni-giessen.de

Organisatoren des 13. Intensivkurses: B. Kemkes-Matthes ISP für Hämostaseologie Giessen, M. Barthels Hannover, B Pötzsch Institut Exp. Hämatologie u. Transfusionsmedizin Bonn, K.T. Preissner Institut Biochemie Giessen, H. Riess Medizinische Klinik Campus Virchow Berlin. e-mail: GTH.Crashkurs@innere.med.uni-giessen.de

Veranstaltungskalender

	2008
14. 06. 2008 Heidelberg Germany	15. BNLD-Jahrestagung Skr.: E-mail: sekretariat@bnld.de oder telefonisch unter 05121-90-1680, auch www.bnld.de
15. – 17. 06. 2008 Kloster Banz Germany	Staudinger Symposium Skr.: Prof. Dr. Ingolf Schimke, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie (CCM), Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité Platz 1, D-10117 Berlin, Fax: 030 450 7513011, E-mail: ingolf.schimke@charite.de
28. 06. – 3. 07. 2008 Athen Greece	“33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference” on Biochemistry of Cell Regulation Skr.: Congress’ website http://www.febs-iubmb-2008.org
06. 09. 2008 Rostock Germany	15. Rostocker Gerinnungssymposium – Klinische Probleme in der Hämostaseologie – „Plättchen und ihre klinische Bedeutung“ Skr.: Porstmann Kongresse GmbH, Alte Jakobstr. 77, 10179 Berlin, Telefon: 030 284499-17, Telefax: 030 284499-11, E-mail: haemostase2008@porstmann-kongresse.de ; www.porstmann-kongresse.de/haemo2008
21. – 24. 09. 2008 Mannheim Germany	5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) in Kooperation mit: Österreichische Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC), Berufsverband Deutscher Laborärzte (BDL), Berufsvereinigung der Naturwissenschaftler in der Labordiagnostik (BNLD), Verband der Diagnostica-Industrie (VDGH) Skr.: Conventus Congressmanagement & Marketing GmbH, Markt 8, D-07743 Jena, +49 (0)3641 353 30, E-mail: dgkl2008@conventus.de , www.dgkl2008.de
17. – 21. 11. 2008 Giessen Germany	13. Intensivkurs für klinische Hämostaseologie der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. Skr.: Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes, ISP für Hämostaseologie, Klinikstr. 36, 35385 Gießen, Tel.: 0641/ 99 42702 oder 0641/ 99 24726 (Sekret.), Fax: 0641/ 99 42728, E-mail: GTH.Crashkurs@innere.med.uni-giessen.de

Geschäftsstelle der DGKL
c/o Städt. Klinikum Karlsruhe gGmbH
Moltkestraße 90
76133 Karlsruhe



Antrag auf Mitgliedschaft

Mitglieds-Nr.: _____

Name: _____

Vorname (ausgeschrieben): _____

Geburtsdatum: _____

Titel: _____
(Prof., PD, Dr.●, Dipl.-●, akademische Titel bitte vollständig eintragen!)

Dienstanschrift:
Institut/Klinik/Firma: _____

Abteilung: _____

Straße, Haus-Nr.: _____

Postleitzahl, Ort: _____

Bundesland: _____

Telefon / Telefax: _____

E-Mail / Internet: _____

Zum Nachweis meiner Tätigkeit in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsdiagnostik füge ich meinen **Lebenslauf** mit wissenschaftlichem Werdegang (ggf. **Publikationsliste**) bei.

Datum

Unterschrift

Der Antrag wird befürwortet von 2 Ordentlichen Mitgliedern der DGKL:

1. _____
Name Datum Unterschrift

2. _____
Name Datum Unterschrift