Inhaltsverzeichnis

Aus der Arbeit der Gesellschaft

Holger Müller, Michael Neumaier, Georg Hoffmann
DGKL-Arbeitgruppe "Bioinformatik":
Genexpressions-Profile und Laborbefunde 69

J. Aufenanger, W. Guder, J. Hallbach, W. Hofmann, G. Hoffmann, K. Lackner, D. Meyer-Lüerßen, M. Müller, H. Renz, P. Sinha, L. Thomas, M. Wick
DGKL-Arbeitsgruppe: Diagnostische Pfade 72

Aus dem Mitgliederkreis

Christian Prante, Bad Oeynhausen
Untersuchungen zur Synthese der extrazellulären Matrix bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 74

Antonija Begonja, Zadar, Kroatien
NO/cGMP und ROS-Signalwege in der Regulation der Plät-tchenfunktion und Megakaryozytenentwicklung
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 75

Peter M. Benz, Scherzingen, Schweiz
Das Aktin Zytoskelett an endothelialen Zell-Zell-Kontakten wird durch αII-Spektrin/VASP Komplexe reguliert
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 77

Leif H. Kühler, Esslingen a. N.
Identifizierung Genetischer Defekte der Familiären Dilatativen Kardiomyo-pathie
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 78

Lino L. Teichmann, Köln
Stromabwärts der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Thrombozyten: Physiologische und diagnostische Relevanz von VASP und Identifikation neuer Substrate
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 80

Thomas Renné, Kusel
Strukturelle und funktionelle Analyse der Interaktion des Blutgerinnungsfaktors XI mit H-Kininogen
(Dissertationsschrift – Zusammenfassung) 81

Nachrichten

Themenhefte „Klinische Chemie und molekulare Diagnostik“ 83

Prüfungstermine für die Abschlussprüfung zur Klinischen Chemikerin / zum Klinischen Chemiker 2008 83

Tagungs- und Kursankündigungen

15. Rostocker Gerinnungssymposium – Klinische Probleme in der Hämostaseologie - Plättchen und ihre klinische Bedeutung 84

5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), 21. bis 24. September 2008 85

6. Anwendertreffen LC-MS/MS in der Labormedizin, 24. September 2008 86

13. Intensivkurs für klinische Hämostaseologie, der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Giessen, 17. - 21.11.2008 87

Repetitorium Klinische Chemie 2008 89

Mikroskopische Blutzelldifferenzierung 2008 89

Kongressbericht

Dieter Meißner und Thomas Demant, Dresden
17. Sächsisch-Thüringisches Laborleitertreffen, Burgstädt, 4. - 5. April 2008 90

Positionen

..... 95

Personalia

Adressänderungen 96
Adressenergänzungen 96
Titeländerungen 96
Titel- und Adressenänderungen 97
„Verschollene Mitglieder“ 97

Veranstaltungskalender

..... V

Deutsche Vereinte 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, Käppelestraße 10, D-76131 Karlsruhe

Aus der Arbeit der Gesellschaft

DGKL-Arbeitgruppe "Bioinformatik": Genexpressions-Profile und Laborbefunde

Holger Müller, Michael Neumaier, Georg Hoffmann

Genexpressionsprofile liefern Zehntausende von Messwerten in einem einzigen Analysengang. Auch wenn sie unsere Vorstellungskraft auf den ersten Blick übersteigen, ähneln sie letztlich klassischen Laborprofilen, die möglicherweise in den nächsten Jahren eine Renaissance erleben. Die AG Bioinformatik hat sich zum Ziel gesetzt, Unterschiede und Gemeinsamkeiten herauszuarbeiten, um Nutzen und Problematik solcher Profiluntersuchungen neu zu bewerten.

* Dieser Bericht der DGKL Arbeitsgruppe Bioinformatik erscheint als Langfassung in J Lab Med (1). Er ist Bestandteil einer Serie von Publikationen in Printform (2-6) und von Internetbeiträgen auf der Website der DGKL e.V. (www.dgkl.de/Bioinformatik/). Mitglieder der Arbeitsgruppe sind: Prof. Dr. med. Georg Hoffmann, Grafrath (Vorsitz), Prof. Dr. med. Michael Neumaier, Mannheim (stellv. Vorsitz), Dr. med. Peter Findeisen, Mannheim (Schriftführer), Prof. Dr. Peter Martus, Berlin (Biometrie), Dr. med. Holger Müller, Göppingen (Laboratoriumsdiagnostik), Dr. Marc Zapatka, Heidelberg (Bioinformatik).

Als Expressionsprofil bezeichnet man eine Liste aller in einem Gewebe vorkommenden mRNA-Spezies (Transkripte) mit Angabe der zugehörigen Menge. Solche Listen ähneln im Prinzip einem Laborbefund (Abb. 1), jedoch mit zwei wesentlichen Unterschieden: Die Zahl der Werte ist etwa 1000-fach höher (2), was die Komplexität der Auswertung erhöht, dafür entstammen aber alle Analyte derselben Molekülklasse und werden mit derselben Methode gemessen, was diese Komplexität durch geeignete Modellbildung wiederum reduzieren kann (4,6).

Die Erfassung von Genexpressionsprofilen erfolgt üblicherweise mit Microarrays („Biochips“) oder Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). Beide Verfahren sind vor allem durch eine aufwändige Präanalytik gekennzeichnet. Sie beginnt mit der Extraktion der Gesamt-RNA, deren Gehalt zwischen etwa 0,1 (Fettgewebe) und 10 (Milz) mg pro Gramm Gewebe schwankt. Nach Umrechnung auf die Zellzahl ist dieser Wert jedoch mit 10 bis 20 pg pro Zelle in allen untersuchten Geweben recht konstant (1). Die mRNA macht nur 1 bis 5% davon aus und verteilt sich auf über 30.000 verschiedene Transkripte (7). Die meisten davon liegen in extrem geringer Konzentration von rund einem Molekül pro Zelle vor (8). Deshalb folgt bei beiden Techniken eine Anreicherung und Amplifikation mit Poly-dT-beschichteten Beads bzw. Poly-dT-Primern (2,3).

Der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Verfahren liegt in der nachfolgenden Analytik und postanalytischen Datenauswertung: Bei der Microarray-Technik wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzfarbstoff eingebaut. Er liefert nach Bindung der Transkripte an komplementäre DNA-Sonden für jedes Transkript ein (semi-)quantitatives Signal, das der Konzentration in der Probe proportional ist.

Biochip-Daten

ID_REF	Early Stage	Advanced Stage
40682_at	14	5
34958_at	87	27611
31539_r_at	53	35
36824_at	9	25444
36400_at	140	11
37290_at	34	161
41216_r_at	53	185
34123_at	12	53
35609_at	19	81
33612_at	12	277
33927_i_at	66	50
36622_at	37	9306
1757_i_at	4	390
1098_at	16	8
34044_at	10	47
34420_at	9	453
35573_r_at	26	36
37258_at	136	829
31678_at	11	7422
31318_at	27	720
219_i_at	5	22
33525_at	53	79
33527_at	13	117
196_s_at	55	281
35541_r_at	41	356
31706_at	17	9
39483_s_at	15	274
37863_at	14	64
32934_i_at	10	3988
40573_s_at	49	98
35464_at	176	8532

SAGE-Daten

TAG	early stage	advanced stage
GACTCTGGTG	12	23
TCACCCACAC	60	148
GTGACCTCCT	7	26
TTGTTGTTGA	15	42
TCTCTACCCA	4	29
GTGTTGCACA	27	59
CCTGGTCCCA	16	63
GCCTCCTCCC	4	13
AGAACAAAAC	6	10
CACTTGCCCT	4	22
CCATTGCACT	26	53
TTACCTCCTT	7	16
ATCAAGGGTG	12	43
GAAGTCGGAA	9	18
GGTGAGACAC	9	27
TGCCTCTGCG	23	55
CCCATCCGAA	48	94
CAACTAATTC	8	11
GCCGAGGAAG	97	203
ACAGTGGGGA	4	25
TAACCAATCA	7	11
ACACAGCAAG	6	19
TGGGTGAGCC	51	112
CGCCGGAACA	78	151
GCAGGGCCTC	10	35
GACTCACTTT	18	32
AATCCTGTGG	31	54
GGAATGTACG	14	19
GGTCCAGTGT	13	24
CCGACGGGCG	28	46
ACTTACCTGC	11	20
CTGTTGATTG	14	20

Labor-Daten

	Müller	Schmidt
Glucose	82	583
Kreatinin	9,8	1,2
Harnstoff	181	52
Harnsäure	9,6	
Bili ges.	0,6	
Natrium	134	132
Kalium	5,3	4,4
Calcium	2,22	2,54
Phosphat	6,6	
GOT	23	25
GPT	17	31
GGT	10	38
AP	76	128
LDH	288	246
CK		129
Cholesterin		310
Triglyceride		339
Eiweiss	6,8	
Albumin		
CRP	1,91	0,91
TPZ	84	100
PTT	41,8	28,5
Fibrinogen		
Leuko	7,17	8,14
Ery	3,55	4,99
Hb	10,6	14,3
Hkt	31,3	43,4
MCV	88,3	87
MCH	29,9	28,7
MCHC	33,8	32,9
Thrombo	419	319

Abb.1: Ausschnitte aus Datensätzen eines frühen und eines späten Krebsstadiums.

Genexpressionsprofile sind formal einem Kumulativbefund ähnlich, enthalten aber rund 1000-mal mehr Daten. Zusätzliche Komplexität ergibt sich dadurch, dass die Analyte weniger exakt definiert sind: Bei Affymetrix-Biochip-Daten sind beispielsweise Sondencodes mit einem Zusatzbuchstaben zwischen Zahl und at (anti-sense target) nicht sicher einem bestimmten Gen zuzuordnen (links). Bei SAGE-Daten können alle ermittelten Basensequenzen in mehreren Genen vorkommen und umgekehrt (Mitte).

Bei der SAGE-Technik wird dagegen das gesamte Amplifikat enzymatisch in definierte Teilstücke mit einer Länge von 14 bis 26 Basen zerlegt und nach aufwändiger Weiterverarbeitung sequenziert. Man erhält somit die Anzahl der jeweiligen Teilsequenzen in der Probe. Durch Vergleich mit Gendatenbanken kann man daraus Transkriptkonzentrationen berechnen, wobei zu berücksichtigen ist, dass dieselbe Sequenz in verschiedenen Genen vorkommen kann und umgekehrt mehrere Sequenzen aus demselben Gen stammen können.

Beide Verfahren haben Stärken und Schwächen: Microarray-Experimente liefern mit weniger Aufwand in kürzerer Zeit Ergebnisse, können aber nur bekannte Gene analysieren. SAGE ist extrem kosten- und zeitaufwändig, entdeckt aber im Prinzip jede in der Probe vorkommende mRNA. Neuere Verfahren der Hochdurchsatz-Sequenzierung bieten Zukunftsoptionen, um die Vorteile beider Verfahren zu vereinigen (9).

Bedingt durch die Vielzahl und mangelnde Standardisierbarkeit der analytischen und präanalytischen Teilschritte sind Genexpressionsprofile allerdings mit Unwägbarkeiten hinsichtlich Präzision und Richtigkeit behaftet, die letztlich zu divergierenden Aussagen führen können. Ein Transkript, das mit Microarrays hoch exprimiert erscheint, kann mit SAGE nicht nachweisbar sein und umgekehrt. Bis zur

Abklärung solcher analytischen Grundsatzprobleme wird empfohlen, diese Techniken vor allem als wertvolles Werkzeug der Forschung und Methodenstandardisierung einzusetzen (5) und für die Diagnostik nur bei entsprechender Fachkenntnis in Molekularbiologie und Bioinformatik anzubieten. Ihr enormer Wert liegt in der Möglichkeit, die Funktion kompletter Genome in verschiedenen Spezies und Geweben oder bei bestimmten Krankheiten zu analysieren. Dies hat zu einer neuartigen Betrachtungsweise geführt, die sich weniger auf den Einzelwert als auf die Analyse von Wertemustern konzentriert (2). Daraus ergeben sich in der Labordiagnostik zum Beispiel bei der Leukämietypisierung höchst interessante Ansätze (10).

Ob sich die Globalanalyse des Transkriptoms allerdings in der Routinediagnostik der Zukunft einen festen Platz erobern kann, bleibt vorerst offen. Zum einen ist noch Grundlagenarbeit zu leisten, bis die in der Labordiagnostik üblichen analytischen Qualitätskriterien erfüllt und die Vergleichbarkeit der verschiedenen methodischen Plattformen gesichert ist. Zum anderen ist fraglich, ob man in der konkreten diagnostischen Situation wirklich mit hohem Aufwand Zehntausende von Werten ermitteln muss, wenn auch ein kleiner Ausschnitt aus dem Datensatz die klinische Frage beantwortet.

Fazit und Ausblick

Selbst wenn sich die hier beschriebenen Multiplex-Techniken in der Praxis nicht voll durchsetzen sollten, haben Sie das Denken in der Labordiagnostik bereits verändert. Analysenprofile erleben im Zeitalter von DRG-Fallpauschalen und Präventivmedizin, Point-of-Care-Systemen und Lab-on-Chip-Entwicklungen derzeit eine noch bescheidene aber unverkennbare Renaissance. Mit der Auswertung von Genexpressionsprofilen leistet die AG Bioinformatik der DGKL zielgerichtet Pionierarbeit, denn wenn erst einmal 10.000 Labortests in einem Analysengang erbracht und mit bioinformatischen Verfahren ausgewertet werden können, dann sollten einige 100 Werte in einem künftigen Präventions- oder Intensivprofil kein unlösbares Problem mehr darstellen. Wir verstehen uns deshalb vor allem auch als inhaltliches und methodisches Bindeglied zwischen der bereits seit sieben Jahren bestehenden AG Chipdiagnostik und der neu gegründeten AG Diagnostische Pfade der DGKL.

Literatur

1. Müller H, Neumaier M, Hoffmann G. Biologische und analytische Grundlagen von Genexpressionsstudien mit Microarrays und SAGE. J Lab Med 2008, im Druck
2. Müller H, Hoffmann G. Bedeutung der Bioinformatik für die Auswertung von Microarray-Experimenten am Beispiel der Molekularen Onkologie. J Lab Med 2003; 27:122-30
3. Funke H, Neumaier M. Qualitätskontrolle bei Genexpressionsanalysen mit Microarrays. LaborMedizin & Diagnostik 2005;3:18-23
4. Hoffmann G. Ein mathematisches Modell des Transkriptoms. Klinische Chemie Mitteilungen 2006;37(3):64-72
5. Hoffmann G, Ostermeir R, Müller H, Bitterlich N, Martus P, Findeisen P, Neumaier M. SimChip – Simulation von Genexpressionssignalen auf der Basis von mRNA-Synthese und -Abbau. Klinische Chemie Mitteilungen 2007;38(3+4):43-48
6. Hoffmann G, Ostermeir R, Müller H, Bitterlich N, Martus P, Findeisen P, Neumaier M. SimChip – Computer Simulation of mRNA Steady States. Clin Lab 2008;54:19-24
7. Bishop J, Morton J, Rosbash M, Richardson M. Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. Nature 1974;250:199-204
8. Kuznetsov V, Knott G, Bonner R. General statistics of stochastic process of gene expression in eukaryotic cells. Genetics 2002;161:1321-32
9. Spörkel O, Müller H. High Throughput Sequenzierung – superschnelle Expressionsanalyse. Trillium-Report 2008;6(1):23
10. Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. Blood 2005;106:1189-1198

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. med. Georg Hoffmann, Trillium GmbH, Hauptstraße 12b, D-82284 Grafrath, Tel.: 08144 / 9111, E-mail: hoffmann@trillium.de

DGKL-Arbeitsgruppe: Diagnostische Pfade

J. Aufenanger, W. Guder, J. Hallbach, W. Hofmann, G. Hoffmann, K. Lackner, D. Meyer-Lüerßen, M. Müller, H. Renz, P. Sinha, L. Thomas, M. Wick

Mit der Entwicklung klinischer Pfade und den erweiterten Möglichkeiten über Labor-EDV-Systeme beleglos Laboruntersuchungen anfordern (Order-Entry) zu können, wurde die Idee geboren, den klinisch tätigen Kolleginnen und Kollegen EDV-Module anzubieten, die sie in ihrer täglichen Arbeit inhaltlich und organisatorisch unterstützen können. „Diagnostische Pfade“ als Ablaufdiagramme, implementiert in ein Order-Entry-System, könnten diese Aufgabe erfüllen. Neben der Optimierung von Abläufen und damit der Verbesserung medizinischer Behandlung könnte auch eine Senkung der Kosten verbunden sein.

Die Vereinte Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) hat hierzu 2006 eine Arbeitsgruppe zur Entwicklung „Diagnostischer Pfade“ und ihre Implementierung in eine EDV-Umgebung gegründet.

Die Kerngruppenmitglieder sind bisher:

Prof. Dr. W. Hofmann	München STKM, Institut für Klinische Chemie, Vorsitzender
Prof. Dr. J. Aufenanger	Ingolstadt, Institut für Klinische Chemie
Prof. Dr. W.G. Guder	München
Dr. J. Hallbach	München STKM, Institut für Klinische Chemie
Prof. Dr. G. Hoffmann	Grafrath, Trillium
Prof. Dr. K. Lackner	Mainz, Institut für Klinische Chemie
D. Meyer-Lüerßen	Frankfurt, VDGH
Dr. M. Müller	Oldenburg, Labor Salefsky
Prof. Dr. H. Renz	Marburg, Institut für Klinische Chemie
Prof. Dr. P. Sinha	Klagenfurth, Institut für Klinische Chemie
Prof. Dr. L. Thomas	Frankfurt, Institut für Klinische Chemie
Dr. M. Wick	München GH, Institut für Klinische Chemie

Zwischenzeitlich haben drei Sitzungen stattgefunden, in welchen versucht wurde, den Begriff „Diagnostische Pfade“ zu definieren und die weitere Vorgehensweise mit Festlegung der ersten Themenbereiche abzustimmen.

Grundtenor der Kerngruppenmitglieder war: Die Entwicklung von „Diagnostischen Pfaden“ mit dem Schwerpunkt auf Laboruntersuchungen muss ein gemeinsames Projekt klinisch tätiger Kolleginnen und Kollegen und Laboratoriumsmedizinern sein. Der Kliniker formuliert seine Fragestellung und gemeinsam wird ein „Schlachtplan“ entwickelt („Diagnostischer Pfad“), dem der aktuelle Wissensstand zu Präanalytik, Analytik und Postanalytik einzelner Messgrößen zu Grunde liegt, der in die EDV-Umgebung eingebunden ist und eine Ablaufstruktur im Sinne eines Entscheidungsbaumes darstellt.

Welche Themenbereiche sollen in der ersten Phase bearbeitet werden?

- Nephrologie
- Hämatologie
- Toxikologie
- Immunologie
- Neurologie
- Internistische-chirurgische Aufnahmeprofile
- Aufnahmeprofil Hausarzt

Die Unterarbeitsgruppen und ihre Tätigkeit sind wie folgt strukturiert:

- Pro Arbeitsgruppe werden 4 Mitglieder bestimmt: 2 autorisierte Experten der jeweiligen Fachgesellschaft (z.B. Nephrologie), 1 Experte der DGKL, 1 Kerngruppenmitglied
- Ziel: Erstellung eines gemeinsamen Arbeitspapieres
- Abschlusstreffen mit Abschlußbericht und Freigabe der Pfade durch Gruppe
- Laufzeit der Unterarbeitsgruppen max. 1 Jahr

Eine erste Bestandsaufnahme mit ersten Ergebnissen wird voraussichtlich in der 4. Sitzung der Arbeitsgruppe der DGKL im April in Frankfurt vorliegen.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. med. Walter Hofmann, Department Klinische Chemie der StKM-GmbH, Kölner Platz 1, 80804 München, Tel.: 089/3068-2670, e-mail: walter.hofmann@klinikum-muenchen.de

Aus dem Mitgliederkreis

Untersuchungen zur Synthese der extrazellulären Matrix bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalis (Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin (Direktor Prof. Dr. med. K. Kleesiek), Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, vorgelegt an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Christian Prante, Bad Oeynhausen

Zusammenfassung

Proteoglykane bilden einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix (ECM). An der Biosynthese der Glykosaminoglykan(GAG)-Ketten sind eine Vielzahl von Glykosyltransferasen beteiligt, wobei die Xylosyltransferase I (XT-I), durch den Transfer von Xylose auf spezifische Serinreste des Proteoglykan-Core-Proteins, die Synthese des Tetrasaccharid-Linkers initiiert. Im Rahmen der Doktorarbeit erfolgte eine detaillierte Analyse zur Funktion und Regulation der XT-I bei pathophysiologischer Remodellierung der ECM. Für das zur XT-I hoch homologe Protein, Xylosyltransferase II (XT-II), wurden Untersuchungen zu der bislang unbekannten physiologischen Funktion durchgeführt.

Anhand von humanen Herzgewebeproben konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) neben einer gesteigerten Expression des Enzyms auch eine vermehrte Deposition von GAG-Ketten und Proteoglykanen im Myokard aufweisen. Durch die Verwendung eines Modellsystems zur in vitro-Simulation der DCM konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Hochregulation der XT-I-Expression durch mechanischen Stress erfolgt. Als Induktor der XT-I-Genexpression wurde TGF-β1 identifiziert, welcher bei mechanischer Expansion kardialer Fibroblasten vermehrt sezerniert wird. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der TGF-β-Signalkaskade konnte nachgewiesen werden, dass die Regulation der XT-I-Transkription über den Signalweg der p38-MAP-Kinase reguliert wird. Über eine gezielte siRNA-vermittelte Degradierung der XT-I-mRNA in kardialen Fibroblasten sowie anschließende Quantifizierung des GAG-Gehalts im Zellkulturüberstand konnte zudem bestätigt werden, dass die XT-I das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der kardialen GAG-Biosynthese darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Real-Time PCR-Systemen zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression der an der Proteoglykan-Biosynthese beteiligten Enzyme und Core-Proteine etabliert. Unter Verwendung dieser Systeme konnte umfassend die Regulation der Genexpression bei der physiologischen Ausbildung der ECM während der chondrogenen und osteogenen Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht werden. Die Expressionsanalyse zeigte, dass sowohl die GAG-bildenden Enzyme als auch die Proteoglykan-Core-Proteine vielfach die gleichen Regulationsmuster aufweisen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl bei Chondrogenese als auch bei Osteogenese die XT-I, auf-

grund einer den anderen Enzymen vorgelagerten Expression, vermutlich eine Schlüsselposition bei der Assemblierung der GAG-Ketten einnimmt. Für die XT-II wurde bei beiden Differenzierungswegen jeweils eine zur XT-I differierende Expressionskinetik detektiert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Analyse der Expression von Schlüsselenzymen und Core-Proteinen der Proteoglykanbiosynthese eine Möglichkeit darstellt, die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Stammzelldifferenzierung zu kategorisieren.

Durch die Verwendung von shRNA und siRNA wurde erstmals die mRNA-Expression beider humaner Xylosyltransferasen gezielt in vitro um mehr als 80% reduziert. Durch die siRNA-vermittelte Reduktion der XT-I- und XT-II-mRNA-Expression in SW1353- und SAOS2-Zellen konnte dadurch erstmals nachgewiesen werden, dass die XT-II eine Xylosyltransferaseaktivität aufweist. Zusätzlich zeigte sich, dass die XT-II in aktiver Form in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und dort eine, im Vergleich zur XT-I, abweichende Akzeptorspezifität aufweist. Darüber hinaus wurde bei der Regulation beider Xylosyltransferasen ein Rückkopplungsmechanismus detektiert. So konnte gezeigt werden, dass bei einer singulären Reduktion eines der beiden Enzyme eine vermutlich kompensatorische Hochregulation des jeweils anderen Enzyms erfolgt.

Anschriften der Verfasser:

Dr. rer. nat. Christian Prante, Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Georgstr. 11, 32545 Bad Oeynhausen.

NO/cGMP und ROS-Signalwege in der Regulation der Plättchenfunktion und Megakaryozytenentwicklung

Dissertation (Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallbor des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Walter).

Antonija Begonja, Zadar, Kroatien

Blutplättchen spielen unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Hämostase. So verhindern sie ein andauerndes Bluten von Wunden, indem sie in Blutgefässen zwischen normalen Zellen des Endothels und beschädigten Bereichen unterscheiden und sich dort gezielt anheften können. Das Zusammenspiel der Plättchenagonisten und den dazugehörigen Rezeptoren wird durch intrazelluläre Signalmoleküle kontrolliert, die die Aktivierung der Blutplättchen regulieren. Äusserst wichtige intrazellulare Signalmoleküle stellen dabei die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP dar, die bei der Hemmung der Plättchen beteiligt sind. Die Bildung von cGMP und cAMP in den Blutplättchen wird durch die aus dem Endothel freigesetzten Moleküle NO und Prostacyclin (PGI2) stimuliert, die ihrerseits Blutplättchen hemmen, indem sie Proteinkinase G (PKG) und Proteinkinase A (PKA) aktivieren. Neuerdings wird vorgeschlagen, dass es sich bei ROS („reacti-

ve oxygen species“) um einen neuen Modulator bei der Signaltransduktion zwischen verschiedenen Zelltypen handelt. Die hier zusammengefasste Arbeit beschreibt die Rolle der ROS-Produktion bei der Aktivierung von Blutplättchen, die Beziehung zwischen dem NO/cGMP/PKG I Signalweg und der ROS bzw. MAP-Kinase Signaltransduktion, und die Rolle von zyklischen Nukleotiden bei der Entwicklung von Megakaryozyten und Blutplättchen. Werden Blutplättchen durch unterschiedliche Einflüsse aktiviert, so produzieren sie über die Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase nur intrazelluläres aber nicht extrazelluläres ROS. Dabei beinflusst das in den Blutplättchen produzierte ROS signifikant die Aktivierung von αIIbβ3 Integrin, nicht jedoch die Sekretion von alpha- bzw. dichten Granula oder die Gestalt der Blutplättchen. Die Thrombin-induzierte Integrin αIIbβ3-Aktivierung ist nach Behandlung der Blutplättchen mit Hemmstoffen der NAD(P)H-Oxidase oder Superoxid-Fängern signifikant reduziert. Diese Inhibitoren reduzieren auch die Aggregation der Blutplättchen bzw. die Thrombusbildung auf Kollagen, wobei diese Effekte unabhängig vom NO/cGMP Signalweg vermittelt werden. Sowohl ADP, das von dichten Granula der Blutplättchen sezerniert wird und zur Aktivierung von P2Y12-Rezeptoren führt, als auch die Freigabe von Thromboxan A2 stellen wichtige, vorgeschaltete Vermittler bei der p38 MAP Kinase-Aktivierung durch Thrombin dar. Jedoch spielt die p38 MAP-Kinase-Aktivierung keine signifikante Rolle bei der Thrombin-induzierten Kalzium-Mobilisierung, P-Selektin Exprimierung, αIIbβ3 Integrin Aktivierung oder Aggregation der Blutplättchen. Abschliessend kann festgestellt werden, dass sich die Aktivierung der PKG insgesamt klar hemmend auf die p38 and ERK MAP-Kinasen in menschlichen Blutplättchen auswirkt. Desweiteren zeigt diese Studie, dass zyklische Nukleotide nicht nur die Blutplättchen hemmen, sondern auch einen Einfluss auf die Entwicklung der Megakaryozyten und Blutplättchen haben, aber auf unterschiedliche Weise. cAMP ist an der Differenzierung von embryonalen hämatopoietischen Zellen zu Megakaryozyten beteiligt, wobei cGMP keine Rolle bei diesem Prozess spielt. Während PKA in embryonalen Zellen schon vertreten ist, steigt beim Reifungsprozess der Megakaryozyten die Expression von Proteinen, die bei der cGMP Signalverbreitung („soluble guanylyl cyclase“, sGC; PKG) mitwirken, stetig an. In der letzten Phase der Reifung von Megakaryozyten, die durch die Freisetzung der Blutplättchen charakterisiert ist, zeigen cGMP und cAMP leicht divergierende Effekte: cGMP verstärkt die Bildung von Blutplättchen, während cAMP dieselbe reduziert. Dies deutet auf einen fein abgestimmten Prozess hin, abhängig von einem Stimulus, der von den benachbarten Zellen des Sinusoid-Endothels stammen könnte. Die Ergebnisse dieser Dissertation tragen zu einen besseren Verständnis der Regulation von Blutplättchen sowie der möglichen molekularen Mechanismen bei, die eine Rolle bei der Reifung von Megakaryozyten im vaskularen Mikroumfeld des Knochenmarks innehaben.

Resultierende Publikationen der Dissertation

Begonja AJ, Gambaryan S, Geiger J, Aktas B, Pozgajova M, Nieswandt B, Walter U. Platelet NAD(P)H-oxidase-generated ROS production regulates alpha IIb beta 3-integrin activation independent of the NO/cGMP pathway (2005) BLOOD 106: 2757-2760

Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, Gambaryan S, Walter U Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS (2006) BLOOD CELLS MOLECULES AND DISEASES 36: 166-170

Begonja AJ, Geiger J, Rukoyatkina N, Rauchfuss S , Gambaryan S , Walter U Tbrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A(2) and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase (2007) BLOOD 109: 616-618

Anschrift der Verfasserin

Dr. rer. nat. Antonija Jurak Begonja, Harvard Medical School, Translational Medicine Division, Karp Family Research Building, 1 Blackfan Circle, Boston MA 02115, USA, E-mail: abegonja@rics.bwh.harvard.edu

Das Aktin Zytoskelett an endothelialen Zell-Zell-Kontakten wird durch αII-Spektrin/VASP Komplexe reguliert

Dissertation (Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallbor des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Walter).

Peter M. Benz, Scherzingen, Schweiz

Der zielgerichtete Aufbau eines kortikalen Aktin-Zytoskeletts ist die treibende Kraft für die interzelluläre Adhäsion. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) ist maßgeblich an der Bildung von Aktin-Fasern beteiligt und die VASP Aktivität wird durch seine Phosphorylierung geregelt. Wir haben in einem systematischen Ansatz nach endothelialen Proteinen gesucht, die an VASP, abhängig von seinem Phosphorylierungszustand, binden. Mit Hilfe differenzieller Massenspektrometrie konnte αII-Spectrin als neuer VASP Interaktionspartner identifiziert werden. Dabei bindet die αII-Spectrin SH3 Domäne an die drei GP5-Motive in VASP. Die Phosphorylierung von VASP durch die cAMP-abhängige Protein Kinase hemmt die αII-Spectrin/VASP Komplexbildung. Bei der Bildung von Zell-Zell Kontakten wird VASP dephosphoryliert und in konfluenten - nicht aber in vereinzelten Endothelzellen - kolokalisieren αII-Spectrin und nicht-phosphoryliertes VASP an Zell-Zell Kontakten. Die ektopische Expression der αII-Spectrin SH3 Domäne als Fusionsprotein mit Claudin-5 führt zu einer Translokation von VASP an Zell-Zell Kontakte und ist hinreichend um die Bildung von kortikalen Aktin-Fasern einzuleiten. Funktionell stabilisiert die Überexpression der αII-Spectrin SH3 Domäne Zell-Zell Kontakte und führt zu einer Abnahme der Endothelzell-permeabilität. Dementsprechend ist die Permeabilität von VASP-defizienten Zellen erhöht. In einem Hautödem-Modell zeigt sich nach Bradykinin-Stimulation eine Erhöhung der mikrovaskuläre Permeabilität von VASP-defizienten Mäusen gegenüber wild-typ Tieren. Unsere Forschungsergebnisse legen nahe, dass αII-Spectrin/VASP Komplexe den Aufbau des kortikalen Aktin-Zytoskeletts regulieren und damit für die Bildung von endothelialen Zell-Zell Kontakten und die Regulation der vaskulären Permeabilität eine Rolle spielen.

Resultierende Publikationen der Dissertation

Blume C, Benz PM, Walter U, Ha J, Kemp BE, Renne T. AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein (2007) JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 282: 4601-4612

Benz PM, Blume C, Moebius J, Oschatz C, Schuh K, Sickmann A, Walter U, Feller SM, Renné T. Cytoskeleton assembly at endothelial cell – cell contacts is regulated by αII-spectrin – VASP Complexes. (2008) J Cell Biol 180: 205-219

Anschrift des Verfassers

Dr. rer. nat. Peter Benz, Physiologisches Institut, Röntgenring 9, D-97070 Würzburg, E-mail: p.benz@uni-wuerzburg.de

Identifizierung Genetischer Defekte der Familiären Dilatativen Kardiomyopathie

Dissertation (Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallbor des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Walter).

Leif H. Kühler, Esslingen a. N.

Herzinsuffizienz ist eine Krankheit mit wachsender medizinischer und ökonomischer Bedeutung. Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist eine der Hauptursachen für Herzversagen und führt in den meisten Fällen zu einer Herztransplantation. 20-30 % der DCM-Erkrankungen haben einen genetischen Hintergrund. Durch die Anwendung molekulargenetischer Methoden konnte bereits eine Reihe DCM-verursachender Gene identifiziert werden. Mutationen in Zytoskelettproteinen führten zu der Hypothese, dass eine Beeinträchtigung der Kraftübertragung vom Sarkomer auf be-nachbarte Myozyten eine Ursache für die DCM sein könnte. Zusätzlich scheint auch eine reduzierte Kraftentwicklung, ausgelöst durch Mutationen in den Proteinen des Sarkomers die Entwicklung der DCM zu begünstigen. Darüber hinaus wurden Mutationen in Proteinen gefunden, wie z.B. im Lamin A/C- oder Tafazzin-Gen, deren Rolle in der Pathophysiologie der DCM noch nicht geklärt sind. Um die Komplexität der genetischen Defekte, die eine DCM verursachen, besser zu verste-hen, ist es notwendig weitere krankheitsverursachende Gene zu identifizieren.

Im ersten Projekt untersuchten wir eine Familie (DCM-I) mit 16 an DCM erkrankten Familienmit-gliedern. Der Phänotyp folgte einem autosomal-dominanten Erbgang. Nach Ausschluss aller be-kannter DCM-Loci, führten wir eine genomweite genetische Suche mit den Mikrosatellitenmarkern der 10. Version des Weber-Screeningsets durch. Durch die Kopplungsanalyse war es möglich, ge-netische Kopplung für 80 % des Genoms auszuschließen. Mehrere benachbarte Marker auf dem langen Arm von Chromosom 7 zeigten hingegen Kosegregation mit dem Krankheitsstatus. Ein maximaler LOD-Score von 4,20 wurde für die Marker D7S471 und D7S501 erzielt. Die Feinkartie-rung mit zusätzlichen Markern identifizierte eine Kandidatenregion, die von den beiden Markern D7S2545 und D7S2554 begrenzt wird und ein Intervall von 9,73 Mb umschließt. In dem minima-len Intervall sind 32 Gene sowie 6 aufgrund von Sequenzvergleichen vorhergesagte Transkripte kodiert. Keines dieser Gene kodiert für ein Zytoskelett- oder Sarkomerprotein. Durch Sequenzana-lyse konnten wir eine neue DCM-verursachende Mutation (A100G) in Exon 2 des Gens DLD i-den-tifizieren, das für das mitochondriale Protein Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3) kodiert. Die Mutation veränderte die vorletzte Aminosäure des Signalpeptids, das den Import des Proteins in die Mitochondrien dirigiert. Daher hatten wir die Hypothese, dass möglichweise der Transport oder die Prozessierung des Signalpeptids beeinträchtigt sein könnte. Dazu haben wir das DLD-Signalpeptid mit GFP markiert und die Verteilung des Fusionsproteins in transfizierten humanen Zellen und in isolierten Mitochondrien untersucht. Die Resultate zeigten, dass die Fusionsproteine mit dem mutierten Signalpeptid genauso in die Mitochondrien transportiert und prozessiert wurden, wie die Fusionsproteine mit dem Wildtyp-Signalpeptid. Die Enzymaktivität der Dihydrolipoamid-Dehydrogenase in Lymphozyten mit der Mutation A100G liegt innerhalb der normalen Brandbreite und ist im Vergleich zu der Enzymaktivität in Kontroll-Lymphozyten nicht reduziert. Die Identifikation von DLD, einem Protein des Energiemetabolismus, als neues

DCM-verursachendes Gen in Familie DCM-I, kann zu einem besseren Verständnis der komplexen Pa-thophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie beitragen. Im zweiten Projekt haben wir eine Familie (DCM-II) untersucht, in der die erkrankten Familien-mitglieder eines oder meherer der folgende Symptome aufwiesen: Reizleitungsstörungen, Schlag-anfall, dilatative Kardiomyopathie, Gliedergürtel-Muskeldystrophie. Dilatative Kardiomyopathie assoziiert mit Reizleitungsstörungen und Skelettmyopathie ist mit Mutationen im Gen für Lamin A und Lamin C (LMNA) korreliert. Zusätzlich wurden Mutationen im LMNA in Zusammenhang mit der Emery-Dreifuss-Muskeldystrophie, der Gliedergürtel-Muskeldystrophie, Lipodystrophie, dem Charcot-Marie-Tooth-Syndrom und der Hutchinson-Gilford Progerie beschrieben. Da über 90 % der LMNA-Mutationen Missense-Mutationen sind, resultierte daraus die Hypothese, dass die mutierten Proteine über einen dominant-negativen Effekt die dreidimensionale Struktur der Lamin-Intermediärfilamente zerstören. Durch Sequenzanalyse der proteinkodierenden Exons des LMNA konnten wir einen Basenpaaraustausch von C nach T an Position 700 (C700T) in Exon 4 identifizieren, der mit dem Phänotyp in der Familie segregierte. Die Mutation führte zum Einbau eines vorzeitigen Stop-Codons (PTC) an Position 234 (Q234X) der Aminosäuresequenz. Bei der Sequenzanalyse der Lamintranskripte aus Lymphozyten von erkrankten Individuen konnten wir nur das Wildtyp-Allel detektieren, aber nicht das mutierte Allel, was darauf schließen ließ, dass das mutierte Allel möglicherweise durch einen Kontrollmechanismus (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) degradiert wurde. Nach Inhibition des NMD durch Inkubation der Lymphozyten mit Cycloheximid oder Emetin, akkumulierte das mutierte Transkript wieder in der Zelle. Die Quantifizierung der Lamintranskripte durch Amplifi-kation mittels Real-Time-PCR zeigte eine deutliche Reduktion der Menge an Transkripten in Fi-broblasten von erkrankten Familienmitgliedern. Die Western-Blot-Analyse konnte eine reduzierte Expression von Lamin A und Lamin C bestätigen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Transkript mit dem PTC durch die NMD-Maschinerie degradiert wird und eine Haploinsuffizienz von Lamin A und Lamin C die DCM in dieser Familie verursacht.

Resultierende Publikation der Dissertation

Schonberger J, Kuhler L, Martins E, Lindner TH, Silva-Cardoso J, Zimmer M . A novel locus for autosomal-dominant dilated cardiomyopathy maps to chromosome 7q22.3-31.1 (2005) HUMAN GENETICS 118: 451-457

Anschrift des Verfassers

Dr. rer. nat. Leif Kühler, Roche Diagnostics GmbH, Molecular Diagnostics, Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg, E-mail: leifkühler@gmx.net

Stromabwärts der cGMP-abhängigen Proteinkinase in Thrombozyten: Physiologische und diagnostische Relevanz von VASP und Identifikation neuer Substrate

Dissertation (Dr. med.) aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie-Zentrallbor des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Walter).

Lino L. Teichmann, Köln

Clopidogrel hat sich als potentes Medikament zur Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse sowohl bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne ST-Hebung (non-STEACS) als auch bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit ST-Hebung (STEMI) erwiesen (CURE- und COMMIT-Studie). Insbesondere der Nutzen einer Vorbehandlung mit Clopidogrel bei perkutaner Koronarintervention ist bei Patienten mit non-STE-ACS und STEMI gut belegt (PCI-CURE- und PCI-CLARITY-Studie). Ein beträchtlicher Anteil der Patienten zeigt allerdings kein adäquates Ansprechverhalten auf Clopidogrel. Wir etablierten deswegen zusätzlich zu einem bereits bestehenden FACS-Assay, der den Effekt von Clopidogrel anhand der Phosphorylierung des Proteins VASP quantitativ bestimmt, einen neuartigen auf dem gleichen Prinzip beruhenden enzyme-immuno assay (EIA). In einer Doppelblindstudie mit gesunden Probanden spiegelten im systematischen Vergleich von VASP-EIA, VASP-FACS und anderer verbreiteter Verfahren (Aggregation, p-Selektin Expresssion, PFA100) sowohl die VASP-Assays als auch die Aggregation die Plättchen-Inhibition deutlich wider. Demgegenüber waren weder die p-Selektin Expression noch der PFA100 ein Indikator für den Clopidogrel-Effekt. Die VASP-Assays zeichneten sich im Vergleich zur Aggregation durch bessere Quantifizierbarkeit und eine hohe Spezifität für den Angriffspunkt des Clopidogrels, den P2Y12-Rezeptor, aus. So hatte eine Medikation mit Acetylsalicylsäure keinen Einfluss auf die VASP-Assays, verminderte allerdings die Aggregation.

Weiterhin konnten wir im Rahmen der Probandenstudie durch Verwendung PAR- (proteaseactivated receptor) spezifischer Peptide (SFFLRN, AYPGKF) und dem stabilen Thromboxan A2 Analog U46619 in ex-vivo Versuchen nachweisen, dass die antithrombozytären Eigenschaften des Clopidogrels zum Teil auf der indirekten Hemmung der Thrombin- und Thromboxan-induzierten Plättchenaktivierung beruhen. Diese Ergebnisse betonen die zentrale Bedeutung Gai-vermittelter Signalwege in Thrombozyten.Im zweiten Teil dieser Arbeit strebten wir an, neue Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinase zu identifizieren und das bekannte Substrat VASP weiter zu charakterisieren. Die Plättchenadhäsion und -aktivierung an der Zellwand sind initiale Ereignisse der arteriellen Thrombose. Prostacyclin und NO erhöhen die intrazelluläre Konzentration zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP). Dies führt zu einer umfassenden Inhibition der Thrombozyten, hauptsächlich durch Aktivierung der cAMP- bzw. cGMP-abhängige Proteinkinase (cAK, cGK). Es liegt bisher kein schlüssiges Bild davon vor, wie die Substrate der cAK und cGK die Plättcheninhibition regulieren. Wir identifizierten zunächst das adenylylcyclase-associated protein (CAP1) anhand der Analyse des humanen Plättchen-Phosphoproteoms als neues Substrat der cGK, das innerhalb von Sekunden nach SNP-Stimulation phosphoryliert wird. Die Separation des Phosphoproteoms erfolgte durch 2D-Gelelektrophorese. Wildtyp-CAP1 und Mutanten, bei denen an putativen Phosphorylierungsstellen Serin bzw. Threonin durch Alanin

ausgetauscht wurde, wurden anschließend in PtK2-Zellen exprimiert. Bisher konnte die Ko-Transfektion von PtK2-Zellen mit CAP1 und cGK eine Phosphorylierung von CAP1 durch die cGK in-vivo nicht bestätigen.Weitere Anstrengungen werden nötig sein, CAP1 als cGK-Substrat zu etablieren.

Flusskammerversuche zeigten, dass die Hemmung der Thrombusformation durch SNP bei VASP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) ineffektiv ist und belegen, dass die Inhibition der Agonisten-induzierten Thrombusformation durch den NO/cGMP-Signalweg in VASP-defizienten Plättchen gestört ist. VASP hatte keinen Einfluss auf die GPIIbIIIa-Aktivierung (gemessen mit dem monoklonalen Antikörper JON/A), die Serotonin-Sekretion (d-Granula) und die p-Selektin-Expression (a-Granula).Die Ergebnisse legen nahe, dass die VASP-Deletion zu subtilen Störungen von Thrombozytenfunktionen führt, die erst im Zusammenspiel deutlich zu Tage treten.

Resultierende Publikationen der Dissertation

GeigerJ*, Teichmann L*, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, Schinzel R. Monitoring of clopidogrel action: Comparison of methods (2005) CLINICAL CHEMISTRY 51: 957-965 (*, first authors)

Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, Gambaryan S, Walter U Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS (2006) BLOOD CELLS MOLECULES AND DISEASES 36: 166-170

Anschrift des Verfassers

Dr. med. Lino Lars Teichmann, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Klinikum der Universität Regensburg, D-93042 Regensburg, E-mail: llt05@web.de

Strukturelle und funktionelle Analyse der Interaktion des Blutgerinnungsfaktors XI mit H-Kininogen

Dissertation (Dr. med., zusätzlich zum bereits vorhandenen Dr. rer. nat. und zur Habilitation für Klinische Biochemie) aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallbor des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Walter).

Thomas Renné, Kusel

Im Blutplasma und auf Zelloberflächen bildet H-Kininogen entweder mit dem Blutgerinnungsfaktor XI oder Plasmakallikrein Komplexe. Die beiden Proteasenvorstufen binden über ihre homologen schweren Ketten, die jeweils aus vier Apple Domänen bestehen (F1-F4 bei Faktor XI und P1-P4 bei Kalllikrein), an HK. Die Kalllikrein/Kininogen Interaktion wird über Domäne P2 vermittelt. Im Gegensatz dazu soll FXI über F1 an Kininogen binden. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Lokalisation der Kininogen-Bindungsstelle des Faktors XI und ein funktioneller Vergleich der Kalllikrein/Kininogen und Faktor XI/Kininogen Komplexe. Es zeigt sich, dass die relative Bindungsaffinität von HK an rekombinante Faktor XI-Einzeldomänen in der Reihenfolge F2 >> F4 > F1 >> F3 abfällt. Die Bedeutung der F2 Domäne für die Kininogen

Bindung wird durch den monoklonale Antikörper αP2 unterstrichen, der die Faktor XI/Kininogen und die Kalllikrein/Kininogen Bindung mit einem apparenten IC50 von 8 nM blockiert und dessen Epitop auf die F2 Domäne kartiert wird. Eine Thrombozyten-spezifische Faktor XI-Splicevariante, der die N-terminale Hälfte der F2 Domäne fehlt, bindet 5-fach schlechter als Faktor XI an Kininogen. Nach Aktivierung wird Kallikrein und ein chimäres Faktor XI-Protein, bei dem F2 durch P2 ersetzt wurde, in P2 gespalten, was zur Verlust der Bindungsaffinität zu Kininogen führt. Im Gegensatz bleibt die Bindung von aktiviertem Faktor XI oder einem chimärem Kalllikrein-Protein, bei dem die P2 Domäne durch F2 ersetzt wurde, nach Aktivierung an Kininogen gebunden. Diese Daten zeigen, dass Faktor XI und Kallikrein über ihre Domänen 2 an Kininogen binden. Trotz homologer Bindungsmotive unterscheiden sich Faktor XI/Kininogen und Kallikrein/Kininogen Komplexe in ihrer Stabilität nach Aktivierung. Die Daten tragen dazu bei, die Regulation der Kallikrein-vermittelten Bradykininbildung bei Entzündungsprozessen und die Faktor XI-getriebene Fibrinbildung besser zu verstehen.

Resultierende Publikationen der Dissertation

Renne T, Gailani D, Meijers JCM, Muller-Esterl W. Characterization of the H-kininogen-binding site on factor XI - A comparison of factor XI and plasma prekallikrein (2002) JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 277: 4892-4899

Renne T, Sugiyama A, Gailani D, Jahnen-Dechent W, Walter U, Muller-Esterl W. Fine mapping of the H-kininogen binding site in plasma prekallikrein apple domain 2 (2002) INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY 2: 1867-1873

Anschrift des Verfassers

PD Dr. rer. nat. Dr. med. Thomas Renné, Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallabor, Universitätsklinikum Würzburg, Josef-Schneider-Str. 2, D-97080 Würzburg, E-mail: thomas@renne.net

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

Prüfungstermine für die Abschlussprüfung zur Klinischen Chemikerin / zum Klinischen Chemiker 2008

22. / 23. Oktober 2008 (Ort wird noch bekannt gegeben)
Anmeldeschluss: 15. Juli 2008

Die vollständigen Unterlagen für die Anmeldung zur Prüfung sind zu richten an den Sekretär der Anerkennungskommission:

Herrn Dr. med. G. Weidemann, Klinikum Nürnberg, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Prof.-Ernst-Nathan-Str. 1, D-90419 Nürnberg

Tagungs- und Kursankündigungen

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

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

Einfügung: pdf-Datei mit dem gth-Anmeldeformular

Repetitorium Klinische Chemie 2008

Beginn:	Montag, 24.11.2008, 12.00 Uhr
Ende:	Samstag, 29.11.2008, 13.00 Uhr
Inhalt:	Alle Kapitel des Gegenstandskataloges der Weiterbildung in Klinischer Chemie
Ort:	Klinikum Links der Weser/Visit Academy, Fortbildungszentrum am Klinikum LDW, Bremen
Organisation und Leitung:	Herr Prof. Dr. E. Gurr, Bremen
Teilnahmegebühr:	Mitglieder der DGKL: € 590,-, Nichtmitglieder der DGKL: € 650,-
	Die Kosten für Übernachtung und Verpflegung sind in der Teilnahmegebühr enthalten. Die max. Teilnehmerzahl beträgt 22. Die Vergabe der Plätze erfolgt in der Reihenfolge der Anmeldungen.
Anmeldung und Auskunft:	Klinikum Links der Weser gGmbH, Zentrallabor, Frau K. Horstmann, D-28277 Bremen, Tel: 0421-879-1671, Fax: 0421-879-1672, E-Mail: kathrin.horstmann@klinikum-bremen-ldw.de

Mikroskopische Blutzelldifferenzierung 2008

Beginn:	Samstag, 29.11.2008, 14.00 Uhr
Ende:	Sonntag, 30.11.2008, 13.00 Uhr
Inhalt:	Übungen zur mikroskopische Blutzelldifferenzierung
Ort:	Klinikum Links der Weser/Visit Academy, Fortbildungszentrum am Klinikum LDW, Bremen
Organisation:	Herr Prof. Dr. E. Gurr, Bremen
Leitung:	Herr Prof. Dr. med. Schuff-Werner, Rostock
Teilnahmegebühr:	€ 160,-
	Die Kosten für Übernachtung und Verpflegung sind in der Teilnahmegebühr enthalten. Die max. Teilnehmerzahl beträgt 20. Die Vergabe der Plätze erfolgt in der Reihenfolge der Anmeldungen.
Anmeldung und Auskunft:	Klinikum Links der Weser gGmbH, Zentrallabor, Frau K. Horstmann, D-28277 Bremen, Tel: 0421-879-1671, Fax: 0421-879-1672, E-Mail: kathrin.horstmann@klinikum-bremen-ldw.de

Kongressbericht

17. Sächsisch-Thüringisches Laborleitertreffen Burgstädt, 4. - 5. April 2008

Dieter Meißner und Thomas Demant, Dresden

Auch im Jahre 2008 trafen sich die Laborleiterinnen und Laborleiter aus Sachsen und Thüringen im Hotel „Alte Spinnerei“ in Burgstädt zu ihrem jährlichen Treffen. Zu dem sehr anspruchsvollen und interessanten Programm, von der wissenschaftlichen Leitung - Herrn Demant (Dresden), Frau Schauer (Erfurt) und Herrn Thiery (Leipzig) - sorgfältig vorbereitet, konnte Herr Demant wieder mehr als 70 Kolleginnen und Kollegen begrüßen.

Der erste Themenkomplex, der von Frau *G. Siegert (Dresden)* moderiert wurde, begann mit einem Vortrag von *T. Arndt (Ingelheim)* **„Drogenanalytik im Klinisch-chemischen Labor“.** Der Referent befasste sich zunächst ausführlich mit der Probennahme und der Präanalytik, die insbesondere wegen der Gefahr der Manipulation der Probe eine wichtige Rolle spielen. Zur Untersuchung gelangt je nach Fragestellung unterschiedliches Material: im Akutfall Blut oder auch Schweiß, bei Tage bis Wochen zurückliegenden Ereignissen eher Urin und bei Fällen, die Wochen bis Monate zurückliegen, Haare oder auch Nägel. Manipulationen werden besonders beim Urin versucht, z. B durch reichliches Trinken, Verdünnen, Chemikalienzusatz oder Abgabe von Fremdurin. Die Analytik erfolgt in zwei Stufen, einem Screening mit Teststreifen oder Immunoassays über ein bestimmtes Panel und bei positivem Ausfall einer Bestätigungsanalyse, vorzugsweise mit einem massenspektrometrischen Verfahren wie GC-MS oder LC-Tandem-MS. Die Verfahren, die aus einem dreistufigen Prozess aus Trennung, Fragmentbildung und Detektion bestehen, wurden besprochen. Anhand von Falldarstellungen wurde die Problematik der Interpretation der Ergebnisse erläutert, die nur von geschultem Personal durchgeführt werden sollte. Speziell auf die Gamma-Hydroxy-Buttersäure (K.o.-Tropfen) und die Rauschpilze sowie auf die Schwierigkeiten beim Opium-Nachweis (Mohnbrötchen, Kodein im Hustensaft) wurde eingegangen.

Es folgte der Vortrag **„Monitoring von Clopidogrel und ASS bei kardiologischen Patienten“** von Frau *I. Schauer (Erfurt).* Dabei ging es um die Frage, ob ein Drug Monitoring für Thrombozytenfunktiondhemmer überhaupt notwendig ist und wenn ja, welche Methode angewendet werden und wer die Messungen ausführen soll. Obwohl die klinische Bedeutung des TDM noch nicht eindeutig bewiesen ist, scheint es doch zweckmäßig, da die nicht seltenen Non-responder offenbar ein erhöhtes Risiko für AMI, Schlaganfall oder Tod haben. Dabei scheint es so zu sein, dass die Mehrzahl der Untersuchungen bettseitig durchgeführt wird. Da es bisher noch keine Standardmethode gibt, wurden in eigenen Versuchen bei Patienten der Klinik für Kardiologie Messungen am PFA-100, am Multiplate-Aggregometer und mittels Durchflusszytometrie am FACS-Gerät miteinander verglichen. Dabei erwies sich das PFA-100 als ungeeignet. Bei den beiden anderen Geräten zeigten die Ergebnisse sowohl bei Clopidogrel als auch bei ASS jeweils etwa ein Drittel Non-responder, wobei die Übereinstimmung zwischen beiden Techniken noch unbefriedigend war. Die Ursachen dafür konnten bisher nicht geklärt werden. Deshalb wurde diskutiert, ob es zweckmäßig wäre, statt eines cut-off von individuellen Basiswerten auszugehen.

Danach referierte *S. Baldus (Hamburg)* über **„Myeloperoxidase - Marker und Mediator vaskulär inflammatorischer Erkrankun-**

gen“. Myeloperoxidase (MPO) ist ein von den neutrophilen Granulozyten exprimiertes Enzym, das die Oxidation von Chlorid durch Wasserstoffperoxid zu unterchloriger Säure katalysiert. Den dabei entstehenden Hypochlorit-ionen konnte keine bakterizide Wirkung nachgewiesen werden, aber es kommt bei erhöhter MPO zur Akkumulation in subendothelialen Bereichen, zur Reaktion mit der Gefäßwand und zur Schädigung der Endothelzellen. Darüber hinaus wird die Oxidation des Stickstoffmonoxids katalysiert. Koronarkranke setzen mehr MPO frei als Gesunde, auch ein Heparin-Bolus führt zu einem Anstieg des zirkulierenden MPO. In retrospektiven Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom bei einer erhöhten MPO ein erhöhtes Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis (AMI, Schlaganfall oder Tod) haben. Dabei korreliert die MPO-Erhöhung nicht mit den traditionellen Markern, wie Toponin, CRP, EKG, vielmehr scheint die MPO der Myokardnekrose voranzugehen. MPO ist also aufgrund der Risikoerkennung ein Marker und aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkung auch ein Mediator für kardiovaskuläre Ereignisse (Stefan Baldus u. a., Circulation 2003; 108: 1440).

Frau *S. Rüsch-Gerdes (Borstel)* sprach über **„γ-Interferon-Tests – neue Möglichkeiten zur schnellen Tb-Diagnose?“**, ein Thema, das trotz rückläufiger Tendenz bei immer noch 5400 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und zunehmenden Resistenzen (2-3 % der Patienten sind überhaupt nicht therapierbar!) stets aktuell ist. Bislang stand zur Diagnostik nur der Tuberkulin-Hauttest (THT) mit dem Nachteil ungenügender Spezifität (Kreuzreaktion mit BCG) zur Verfügung. Der Diavita-Schnelltest, ein serologischer, auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Mykobacterium tuberculosis beruhender Test, ist nur begrenzt einsetzbar, da er für die latente Tuberkulose nicht anwendbar und als Sreeningmethode nicht geeignet ist. Als Alternative bieten sich die Interferon-γ-Tests, der Quantiferon-TB-Gold-Test (ELISA) und der T-SPOT-TB-Test (ELISPOT) an, die als immunologische Verfahren auf der Interferon-γ-Produktion sensibilisierter T-Lymphozyten basieren. Beide Tests werden als gleichwertig angesehen, sie haben hohe Sensitivität und Spezifität (annähernd 100%) und werden zur initialen Diagnostik empfohlen (C. Lange et al., Dtsch Med Wschr 2006; 131: 341). Das betrifft z. B. den Verdacht auf aktive oder latente Tb, die Untersuchung von Kontaktpersonen oder das Screening bei Mitarbeitern des Gesundheitswesens und Patienten vor immunsuppressiver Therapie. Den THT bereits zum jetzigen Zeitpunkt komplett zu ersetzen wird jedoch wegen fehlender Erfahrungen als verfrüht angesehen (B. Hauer; Pneumologie 2006; 60: 29). Die mikrobiologischen Verfahren sind zur Resistenzbestimmung weiterhin notwendig.

Der zweite von Herrn *T. Demant (Dresden)* moderierte Teil begann mit dem Beitrag **„Eine neue Funktion der „intrinsischen“ Gerinnungskaskade: Der Blutgerinnungsfaktor XII ist essentiell für die pathologische Thrombusbildung hat aber keine Funktion für die Blutstillung“** von *T. Renné (Würzburg).* Er führte aus, dass der Faktor XII (auch Hagemann-Faktor) als aktivierter Faktor in der Gerinnungskaskade zwei Wirkungen entfaltet. Einerseits wird durch F XIIa auf Zelloberflächen das Prokallikrein und damit das Kallikrein-Kininsystem aktiviert und dadurch die Entstehung von Bradykinin bewirkt, eine Reaktion, die normalerweise durch den C1-Inhibitor gehemmt wird. Das Bradykinin ruft Blutdruckabfall, Schmerzen und eine erhöhte endotheliale Permeabilität hervor. Ein Mangel oder ein Fehlen des C1-Inhibitors, wie er beim hereditären Angioödem (eine Punktmutation Thyr-328-Lys im FXII-Gen) auftritt, kann infolge überschießender Bildung von Bradykinin zu lebensbedrohlichen Situationen führen. Andererseits aktiviert F XIIa auf Oberflächen von Thrombozyten den Faktor XI und löst somit die Gerinnungskaskade aus, die in vitro zur Bildung von Blutgerinnseln führen kann. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die durch F XII hervorgerufene Thrombenbildung nur im pathologischen Fall auftritt und F XII im Normalfall keine Bedeutung für die Blutgerin-

nung hat. Mäuse mit F XII-Defizit zeigten weder Gefäßthromben und Schlaganfälle noch erhöhte Blutungsneigung trotz stark verlängerter aPTT. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Blockierung des F XII zur Verhütung von Thrombosen Bedeutung erlangen könnte (T. Renné, D. Gailani, Expert Rev Cardiovasc Ther 2007; 5: 733).

T. Berg (Berlin) sprach dann zum Thema **„Hepatologie: HCV- und HBV-Diagnostik“** und hob einleitend die Bedeutung einer guten Zusammenarbeit zwischen Klinik und Labor in Diagnostik und Therapieüberwachung bei chronischen Leberkrankheiten hervor. Bei der chronischen Hepatitis B wurde die Indikation zur antiviralen Therapie bisher von der Höhe der ALAT abhängig gemacht, nach der neuen Leitlinie steht die Viruslast, bestimmt als HBV-DNA an erster Stelle. Als Grenzwert für die Therapieempfehlung gelten 104 Kopien/ml, was 2000 IU/ml entspricht. Um Serokonversion, intermittierenden Verlauf oder zufällig einmalige Erhöhungen zu berücksichtigen, werden 3 bis 4 Messungen pro Jahr empfohlen. Darüber hinaus sollte der Genotyp Beachtung finden. Auch in der Überwachung der Therapie und für die Prognose ist die HBV-DNA der beste Parameter, der innerhalb eines Jahres unter die Nachweisgrenze fallen sollte. Kontrollen sind alle 3 Monate, später seltener notwendig. Ein Ansprechen der Therapie innerhalb der ersten 3 Monate ist prognostisch günstig. - Bei der chronischen Hepatitis C ist zunächst der Nachweis des Virus (Anti-HCV als Screening und HCV-RNA zur Bestätigung, evtl. Histologie) zu führen und für die Therapiewahl der Genotyp zu bestimmen. Die quantitative HCV-RNA Bestimmung ist für die Therapieüberwachung von besonderer Bedeutung, wobei ein ultrasensitiver HCV-RNA-Test anzuwenden ist. Die Entscheidung über Fortführung und Dauer der IFN-Behandlung hängt maßgeblich vom Erreichen eines virusfreien Serumbefundes ab (Lit. siehe Hep-Net).

Der erste Tag wurde mit einem hochinteressanten, das Klinische Labor nicht direkt betreffenden Vortrag **„Paläogenetik: Über genomische Fossilien und fossile Genome“** von *T. Schöneberg (Leipzig)* abgeschlossen. Das Aufgabengebiet der Paläogenetik ist die Analyse genetischer Proben fossiler, subfossiler oder prähistorischer Herkunft. Untersuchungsgegenstand ist die aDNA (ancient = alte DNA), die aus Knochen oder Zähnen, aber auch aus Gewebeproben oder anderem Material gewonnen wird. Aus DNA oder DNA-Bruchstücken, die zum Teil sehr klein (50-20 Basen) sind, werden mittels PCR Erbinformationen gewonnen und daraus Rückschlüsse auf zurückliegende evolutionäre Prozesse gezogen. Daraus sind, zumindest teilweise, sowohl die historische Rekonstruktion von Entwicklungsprozessen über viele Jahrtausende und die Untersuchung ausgestorbener Spezies möglich, als auch medizinisch relevante Informationen zu erhalten. So wurden Gene, wie z. B. ein Riechgen (GPR 33) gefunden, die beim Menschen nicht mehr funktionieren, und es wurde ermittelt, dass dieses Gen zur Zeit der Auswanderung der Hominiden aus Afrika (vor etwa 800 000 Jahren) bereits inaktiv war. Weitere Beispiele sind die Untersuchungen an Knochen von Mammuts, die 40000 Jahre im sibirischen Dauerfrost gelegen haben, oder an Proben aus Höhlen am Dachstein. Aus den Analysen des Gens für Melocortin geht hervor, dass es auch hellhaarige Mammuts und rothaarige oder blonde Neandertaler gegeben haben muss. Ziel der europäischen Forscher ist es, das Erbgut des Neandertalers vollständig zu entschlüsseln.

Der zweite Tag begann unter der Moderation von Frau *I. Schauer, Erfurt,* mit dem Beitrag **„Toxikologische Analytik / GC-MS“** von *J. Hallbach, München.* Er hob die Bedeutung der Toxikologie unter dem Gesichtspunkt hervor, dass in Deutschland jährlich etwa 200.000 Vergiftungsfälle registriert werden und erläuterte das Vorgehen am Beispiel des Städtischen Klinikums München. Bei Vergiftungsverdacht wird die sog. „Systematische Toxikologische Analyse“ (STA), d. h. die Suche nach dem Gift mittels Immunoassay und GC-MS in einem Stufenverfahren, das aus Anreicherung, Trennung und einer möglichst sensitiven Detektion

besteht, durchgeführt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer Spektrendatei (z.B. von Maurer), über die Massen (Lage und Intensität der Linien) und die Retentionszeit. Vom Referenten wurden die Verfahren im Einzelnen dargestellt und die Probleme, Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten an Beispielen erläutert. In der Praxis ist die qualitative Analyse häufig ausreichend, gegebenenfalls mit einer groben Mengenabschätzung. Ist in speziellen Fällen, z. B. bei Substanzen, die bei der Standardanalyse nicht erfasst werden, eine Quantifizierung notwendig, wird die SIM-Technik (Single Ion Monitoring) angewendet. Dabei werden nur charakteristische Fragmente analysiert, Normalwerte oder cut-off-Werte sind möglich, wie am Beispiel der Gammahydroxybuttersäure (GHB = Liquid Ecstasy) gezeigt wurde. Als zukünftige Techniken wurden die HPLC-MS/MS und die Time-Of-Flight-Technologie (HPLC-MS/MS-TOF), welche sich zur Identifizierung, zur Quantifizierung und zum TDM eignet, vorgestellt.

Die **„Automatische Blutbilddifferenzierung“** war das Thema von *T. Zerfaß (Erlangen).* Als Computerspezialist stellte er ausgehend von den jetzigen Möglichkeiten der Automatisierung in der Hämatologie die „computer assisted microscopy“ (CAM) als den nächsten Schritt der Entwicklung vor. In den CAM-Systemen (z. B. HemaCAM) erfolgt nach automatischer Erstellung des Ausstrichs über einen automatischen Trägertransport die Erkennung und Lokalisierung der Leukozyten unter dem Mikroskop und anschließend die automatische Bildverarbeitung, die nach dem Vergleich mit einer Datenbank zur Klassifizierung der Leukozyten und schließlich zu einem Diagnosevorschlag führt. Für die Bewertung von 100 Zellen benötigt das System etwa drei Minuten. Die Zellen werden abgebildet, wobei die Zellansicht frei konfigurierbar ist, so dass Re- und Nachklassifizierung und Bewertung durch Experten möglich sind. Die Digitalisierung der Bilder lässt die virtuelle Mikroskopie mit ihren vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten Wirklichkeit werden, wie für die Nachprüfung von Befunden, die Konsultation durch Experten, die Durchführung digitaler Ringversuche, mit dem Vorteil, dass alle Ringversuchsteilnehmer den exakt gleichen Ausstrich erhalten, oder die Erstellung von Referenzdatensätzen, die zu Demonstrations- und Trainingszwecken oder als Einzelfalldarstellung nutzbar sind. Es wird angestrebt, das Verfahren auch auf andere Materialien (Knochenmark, Zervixproben, Liquor) und andere Anwendungen (Malariadiagnostik, Histologie) zu erweitern.

Über **„Genomweite Assoziationsstudien (GWA)“** referierte *D. Teupser (Leipzig).* Im Gegensatz zu monogenen Krankheiten, die nur durch ein Gen bedingt sind und bei denen deshalb nur ein genetischer Marker erkannt werden muss, was Aufgabe der Humangenetik ist, geht es bei den GWA um die Identifizierung der genetischen Faktoren von komplexen Erkrankungen, wie sie z. B. die sog. Volkskrankheiten (Diabetes mellitus, Gefäßerkrankungen) darstellen. Grundlage dafür bilden das humane Genomprojekt und die Kenntnisse über 20-25.000 Proteine codierende Gene. Durch Assoziationsuntersuchungen gelingt es, Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp der Erkrankung herzustellen. Dazu bedient man sich sog. Genchips, die bis zu 1 Million Genvarianten eines Patienten erfassen können. Problematisch ist, dass diese Chips mit einer Sicherheit von 95% arbeiten und demzufolge viele falsch positive Ergebnisse entstehen. Die Anwendung wurde an Beispielen wie der koronaren Herzkrankheit oder der Phytosterolmetabolismus erläutert. Im klinischen Labor sollten Genchips bis auf weiteres nicht eingesetzt werden, da sie für die Diagnose manifester Erkrankungen nicht notwendig sind und eine Handlungskonsequenz bei genetischen Prädispositionen meistens nicht gegeben ist. Daher wird die Erstellung von Genprofilen als ethisch sehr problematisch eingeschätzt, gerade wenn in Zukunft bis zu 1 Milliarde Basenpaare in einem Analysengang bestimmt werden können.

Im abschließenden Vortrag sprach *W. Hofmann (München)* über die **„Laborkonsolidierung von vier Städtischen Krankenhäu-**

sern – Quo Vadis?“ in der bayrischen Landeshauptstadt. Die Labors der städtischen Eigenbetriebe in Bogenhausen, Harlaching, Neuperlach und Schwabing wurden im Zuge der Bildung der „Städtisches Klinikum München GmbH“ von 2005 bis 2007 in einem Institut vereinigt. Dabei galt es, einerseits die Notfall-Versorgung an den vier Standorten zu sichern und andererseits die Kompetenz und Leistungsfähigkeit der Labors zu bündeln und weiterzuentwickeln. Durch Veränderung der Organisationsstruktur mit der Einrichtung einer Zentrale in Schwabing, Zentralisierung der Spezialmethoden und Methodenverlagerung an bestimmte Standorte, Vereinheitlichung der Geräte- und der EDV-Technik mit Zentralrechner und drei Außenrechnern, gemeinsamen Einkauf, Umsetzung von Personal in einigen Fällen und Einrichtung eines gut organisierten Fahrdienstes konnten wichtige Ziele erreicht werden. Die Patientenversorgung wurde durch Erweiterung des Untersuchungsspektrums, Erhöhung der fachlichen Kompetenz und Verringerung der TAT verbessert. Das Personal konnte gegenüber 2001 um 28% reduziert werden, wodurch 1 Mio an Personalkosten eingespart wurden; darüber hinaus sanken die Sachkosten und der Kostenaufwand pro Punkt. Die Zielstellung, bis 2009 30% Kosten, das sind 5 Mio €, einzusparen, wird erreicht werden. Das Projekt wurde mit dem Qualitätspreis 2007 der Stadt München ausgezeichnet.

Zum Abschluss der Tagung, aus der die Teilnehmer viele neue Erkenntnisse und höchst interessantes Wissen mitnehmen konnten, dankte Herr *Demant* den Referenten, Diskussionsrednern und Teilnehmern für ihr Engagement und den Sponsoren BD Diagnostics Preanalytical Systems, Roche Diagnostics und Siemens Medical Solutions Diagnostics für die großzügige Unterstützung. Ganz besonderer Dank gilt Frau *Rothermel* von BD für die wiederum hervorragende Vorbereitung und Organisation des Tagungsablaufs.

Anschriften der Verfasser:

Prof. Dr. rer. nat. Dieter Meißner, Sadisdorfer Weg 2, D-01189 Dresden

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

Positionen

Veranstaltungskalender

2008

06. 09. 2008
Rostock
Germany

15. Rostocker Gerinnungssymposium – Klinische Probleme in der Hämostaseologie – „Plättchen und ihre klinische Bedeutung“
Sekr.: 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)
Sekr.: 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.
Sekr.: Frau Prof. Dr. B. Kemkes-Matthes, ISP für Hämostaseologie, Klinikstr. 36, 35385 Gießen, Telefon: 0641/ 99 42702 oder 0641/ 99 24726 (Sekret.), Telefax: 0641/ 99 42728, E-mail: GTH.Crashkurs@innere.med.uni-giessen.de

2009

13. – 15. 03. 2009
Sydney
Australia

Pathology Update 2009 in conjunction with XXV WASPaLM - World Congress of Pathology and Laboratory Medicine.
Sekr.: The Royal College of Pathologists of Australasia, Durham Hall, 207 Albion Street Surry Hills 2010 AUSTRALIA, Telefon: +61 2 8356 5858, Telefax: +61 2 8356 5828, Email: pathologyupdate@rcpa.edu.au, www.rcpa.edu.au/pathologyupdate

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

DGKL
Deutsche Vereinte Gesellschaft
für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V.

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