

41. Jahrgang | Heft 1 | März 2010

Klinische Chemie MITTEILUNGEN

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



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

Präanalytik

Für Arztpraxis und Labor

Zentrifuge LC 6



Im medizinischen Labor ist die Qualität der Analysenergebnisse maßgeblich von der Qualität der Präanalytik bestimmt.

Die Zentrifugation von Probenmaterial mit Trenngel als Diffusionsbarriere ist daher eine unabdingbare Maßnahme. Erfolgt dies frühzeitig nach der Blutentnahme – also bereits in der Arztpraxis – wird die erforderliche Probenstabilität gewährleistet und die Verfälschung empfindlicher Parameter verhindert.

Zentrifuge LC 6 – Optimieren Sie Ihre Probenqualität bereits in der Arztpraxis

- **Ausschwingrotor für beste Geltrennschichten**
- **Einfachste Bedienung**
- **Platzsparend und preiswert**

 **SARSTEDT**

SARSTEDT AG & Co. · Postfach 12 20 · D-51582 Nümbrecht
☎ Service Deutschland (0800) 0 83 30 50 · Fax (+49) 0 22 93 305-282
info@sarstedt.com · www.sarstedt.com

Technische Änderungen vorbehalten

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

PRÄSIDIUM

Präsident	Prof. Dr. K. Lackner, Mainz
Vizepräsident	Prof. Dr. T. Deufel, Jena
Schriftführer	Prof. Dr. K. P. Kohse, Oldenburg
Schatzmeister	Prof. Dr. H. Patscheke, Karlsruhe
Weitere Präsidiumsmitglieder	Prof. Dr. B. H. Brandt, Hamburg Prof. Dr. J. Aufenanger, Ingolstadt

GESCHÄFTSSTELLE

Geschäftsführer	Dr. Jens Klabunde Geschäftsstelle der DGKL Im Mühlenbach 52b, D-53127 Bonn Telefon: 02 28 - 92 68 95-22 Telefax: 02 28 - 92 68 95-27 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 52a, D-53127 Bonn Telefon: 02 28 - 92 68 95-0 Telefax: 02 28 - 92 68 95-29
-----------------	---

Wissenschaftlicher Beirat

Vorsitz	Prof. Dr. L. Siekmann, Bonn
---------	-----------------------------

MITTEILUNGEN

Schriftleitung	Prof. Dr. Dr. med. T. Demant, Dresden
----------------	---------------------------------------

INHALTSVERZEICHNIS

AUS DEM PRÄSIDIUM

Vorwort des Präsidenten der DGKL	1
Prof. Dr. K. Lackner; Mainz	

AUS DER GESCHÄFTSSTELLE

Neuheiten aus der Geschäftsstelle 2010	3
V. Dietrich, K. Steinbach; Bonn	

AUS DEM REFERENZINSTITUT FÜR BIOANALYTIK

Neuheiten aus dem Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB)	4
Dr. R. Kruse, Dr. W. J. Geilenkeuser; Bonn	

AUS DER GESELLSCHAFT

Tagung der Arbeitsgruppe Proteomics in der Klinischen Chemie zum Thema „Stem Cell - Tumor - Proteomes“	6
Hamburg, 5./6. Februar 2010, Prof. Dr. C. Wagener; Hamburg	

Zweites Banzer Minisymposium der Arbeitsgruppe „Klinische Toxikologie“	12
Kloster Banz, 15./16. Oktober 2009, Dr. B. Henschel, Dr. A. von Meyer	

Forschungsbericht: Chronische Chagas-Erkrankung: Auto-Antikörper gegen den beta1-Adrenorezeptor, beta2-Adrenorezeptor und muscarinergen Rezeptor M2 sowie Entzündungsmarker, Marker für Oxidativen Stress und Herzmarker zur Risikoabschätzung, Diagnostik und zum Monitoring	19
S. G. Munoz Saravia, Bolivien; Prof. I. Schimke; Berlin	

Forschungsbericht: Verringerung unerwünschter Arzneimittelwirkungen bei der Verabreichung von Chemotherapeutika durch eine extrakorporale Elimination entsprechender Wirkstoffträger	26
G. Pütz, J. Eckes, O. Schmah, M. J. Hug, K. Winkler, H. Wieland; Freiburg	

Forschungsbericht: Diagnostischer Wert der Serum CTGF/CCN2 Konzentrationen und einzelner CTGF-Genpolymorphismen bei fibrotischen Lebererkrankungen: Erkenntnisse aus einem geförderten Projekt der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin E. Kovalenko, R. Weiskirchen; Aachen	32
AUS DEM MITGLIEDERKREIS	
Dissertation: Polyphosphate - das natürliche Kaolin: Warum sind Thrombozyten eigentlich prokoagulant? F. Müller; Stockholm	48
Buchbesprechung: „Molekulare Onkologie“ von C. Wagener, O. Müller Prof. T. H. Brümmendorf, Dr. O. Galm; Aachen	52
Buchbesprechung: „Wörterbuch Labor / Laborator Dictionary - Deutsch-Englisch / English-German“ von T. C. H. Cole Dr. S. Holdenrieder; München	53
VERANSTALTUNGEN	
Jahrestagung der AG Genomics & Bioinformatik, Tutzingen	55
Workshop der Sektion Endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik, Leipzig	56
Minisymposium „Frühschwangerschaft-Risiken früh erkennen“, München	57
Repetitorium Klinische Chemie 2010, Bremen	58
Mikroskopische Blutzellendifferenzierung 2010, Bremen	
Veranstaltungskalender	59
PREISE	
Preisausschreibung: Gábor-Szász-Preis 2010	60
PERSONALIA	
Neue Mitglieder, Verschollene Mitglieder, Verstorbene Mitglieder	61

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

HERAUSGEBER	Prof. Dr. med. Karl Lackner, Präsident der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V., Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, Gebäude 605, 55101 Mainz, Tel: +49 (06131) 17-7190
SCHRIFTFLEITUNG UND REDAKTION	Prof. Dr. Dr. med. Thomas Demant, Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Friedrichstr. 41, 01067 Dresden, Tel: +49 (0351) 480-3900, e-Mail: demant-th@khdf.de
LAYOUT UND SATZ	Vanessa Dietrich, Geschäftsstelle der DGKL, Im Mühlenbach 52 b, 53127 Bonn, Tel: +49 (0228) 926895-22, e-Mail: geschaeftsstelle@dgkl.de
ANZEIGENVERWALTUNG	Büro-, Verlags- und Tagungsservice Dagmar Strebel, Belfortstraße 10, 76133 Karlsruhe, Tel: +49 (0721) 920-3436, e-Mail: bvt-dagmar-strebel@t-online.de
DRUCK UND VERSAND	Bonner Druck & Medien, Radzey & Wackerow GmbH, René Günther, Auguststr. 1, 53229 Bonn, Tel: +49 (0228) 467766, e-Mail: R.Guenther@bonner-druck-medien.de
AUFLAGE	ca. 1300 Stück
ERSCHEINUNGSWEISE	vierteljährlich
ISSN	0173-6647

Liebe Mitglieder der DGKL,

mit dem ersten Heft der Mitteilungen des Jahres 2010 ist es an der Zeit einen Rückblick auf die letzten beiden Jahre zu werfen, in denen der Aufbau einer neuen Geschäftsstelle in Bonn unter der Leitung unseres Geschäftsführers Herrn DR. JENS KLABUNDE stattgefunden hat. Dem vorausgegangen war die Entscheidung des Präsidiums unter der Leitung und ich darf auch sagen auf Initiative von Herrn Kollegen KLEESIEK, die DGKL zu professionalisieren. Das Hauptziel war es, die Anforderungen an eine moderne Fachgesellschaft besser erfüllen zu können, als dies ein nebenamtliches Präsidium auf Dauer alleine leisten kann. Das Präsidium hat sich die Entscheidung damals nicht leicht gemacht, da dieser Schritt natürlich auch mit einem deutlich höheren finanziellen Einsatz für die Geschäftsstelle der Fachgesellschaft verbunden war. Trotzdem schien sie uns zum damaligen Zeitpunkt zwingend, wenn die DGKL als Fachgesellschaft zukunftsfähig bleiben sollte.

Nach einem intensiven Auswahlverfahren, an dem das gesamte Präsidium teilhatte, hat Herr DR. KLABUNDE seine Stelle im April 2008 angetreten. Wir können jetzt also fast zwei Jahre überblicken und ich möchte feststellen, dass wir den Zielen, die das Präsidium mit dieser Entscheidung verbunden hatte, einen großen Schritt näher gekommen sind. In vielen Bereichen, sowohl im Inneren der DGKL

als auch in der Interaktion nach außen ist die kontinuierliche, hauptamtliche Tätigkeit des Geschäftsführers und seiner Mitarbeiter spürbar geworden. Ich glaube, dass dies – um nur einige Beispiele zu



nennen – die Arbeitsgruppen betrifft, die im letzten Jahr auf den Weg gebrachten ersten Sektionen der DGKL oder die Organisation unserer Jahrestagungen. Nach außen wurden u.a. die Verbindungen zu anderen Fachgesellschaften und Berufsverbänden intensiviert, die Basis für eine langfristige Öffentlichkeitsarbeit der DGKL gelegt und die zukünftige Rolle der DGKL in dem neu geordneten Akkreditierungswesen der Bundesrepublik gesichert. Dazu gehört auch, dass die Geschäftsstelle jetzt den Schriftleiter Professor Demant aktiv in der Erstellung der Mitteilungen unterstützt. Viele Aufgaben, denen sich das Präsidium in den letzten beiden Jahren widmen konnte und musste, wären ohne eine solche professionelle Struktur nicht angebar gewesen.

Insgesamt können wir also sagen, dass die DGKL heute deutlich besser für die Herausforderungen der kommenden Jahre gerüstet ist, als dies noch nach der Fusion von DGKC und DGLM der Fall war. Wir

wünschen uns, dass Sie - unsere Mitglieder - die Fachgesellschaft auch in Zukunft aktiv unterstützen und die Foren der DGKL von der Jahrestagung und Mitgliederversammlung über die Mitteilungen bis zum Internetauftritt von Ihnen für eine intensive Kommunikation untereinander und mit dem Präsidium genutzt werden. Auf diese Weise können wir gemeinsam dem Anspruch an eine moderne wissenschaftliche Fachgesellschaft gerecht werden.



Karl J. Lackner
Präsident der DGKL

Liebe Mitglieder,

heute halten Sie die erste „Bonner“ Ausgabe der Klinischen Chemie Mitteilung (KCM) in den Händen. Ein Meilenstein wurde erreicht - wir haben die KCM von Karlsruhe nach Bonn geholt und sie nach den DGKL Gestaltungsrichtlinien „erfrischt“.

Ganz herzlich möchten wir uns bei Herrn PROF. DEMANT, dem Schriftführer der KCM, für die Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass er unseren Vorschlägen sehr offen und zustimmend gegenüberstand. Zusätzlich zu dem neuen „Layout“ haben wir die Ringösenheftung eingeführt, damit Sie zukünftig die Mitteilungen in einem Ordner abheften können. Auf unserer Homepage www.dgkl.de finden Sie die entsprechenden ORDNERRÜCKEN als Download.

Wenn Sie sich mit einem wissenschaftlichen Bericht in die KCM einbringen wollen, steht Ihnen ein „AUTORENMANUAL“ ab sofort zur Verfügung, das Sie bei der Geschäftsstelle oder bei Herrn Prof. Demant anfordern können. Das Manual stellen wir Ihnen ebenfalls als Download auf unserer Homepage zur Verfügung.

Über Anregungen und weitere Ideen freuen wir uns.

Viel Spaß beim Lesen!

Mit freundlichen Grüßen

aus der Geschäftsstelle Bonn

VANESSA DIETRICH & KATJA STEINBACH



Neuigkeiten aus dem Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB)

Im Folgenden wollen wir Sie über Neuerungen und Änderungen im RfB informieren.

1. AKKREDITIERUNG

Fünf Jahre nach Erstakkreditierung fand, wegen der aktuellen Gesetzgebung etwas vorgezogen, die erste Reakkreditierung durch die Deutsche Gesellschaft für Akkreditierung mbH (DGA) im Oktober 2009 statt. Das RfB ist damit für weitere 5 Jahre akkreditiert. Die Akkreditierung umfasst dabei die Normen ISO/IEC Guide 43-1:1997, ILAC G13:2000, DIN ISO/IEC 17020:2004, DIN V 55394-1:2000-09 und DIN EN 14136:2004-08.

2. RINGVERSUCHE

AK ARZNEIMITTEL

Die Anzahl der Ringversuche wurde auf vier Ringversuche pro Jahr reduziert. Ferner wurde die Trennung in Gruppe 1 und Gruppe 1 + 2 aufgehoben und umgestellt auf eine Bestellung von Set 1 und Set 2 im Ringversuch "AK Arzneimittel".

AM AMMONIAK

Es werden in diesem Jahr 4 Ringversuche für Ammoniakbestimmungen angeboten

CM KARDIALE MARKER

Im Ringversuch für kardiale Marker können Sie separates Probenmaterial für die Bestimmung von BNP bestellen.

FV MOLEKULARBIOLOGIE

Im Ringversuch für Molekularbiologie kann nun auch K-RAS: Codon 12/13/61 untersucht werden.

GR GERINNUNG

In diesem Ringversuch können Sie nun zusätzlich die Faktoren XI, XII, XIII bestimmen.

HA HÄMATOLOGIE

Im Ringversuch für die Hämatologie (HA) wird eine Differenzierung der Leukozyten angeboten und Sie können hierfür separate Proben bestellen.

KS KLINISCHE CHEMIE IM SERUM

Im Ringversuch für klinische Chemie können Sie nun auch das direkte Bilirubin bestimmen.

TM TUMORMARKER

Im Ringversuch für Tumormarker können Sie nun auch die Analyte Calcitonin und Thyroglobulin bestimmen.

TC T-CELL-DIAGNOSTIK

2009 wurde ein Pilotringversuch für T-cell-

Diagnostik (CD4+) in Zusammenarbeit mit der Firma Partec durchgeführt. Dabei wurden stabile Kontrollproben an Teilnehmer in Afrika und Asien versandt (100 Laboratorien aus 20 Ländern). Dieser Ringversuch für die T-cell-Diagnostik mit Teilnehmern aus Afrika und Asien soll auch 2010 einmal angeboten werden.

In Planung bzw. in Vorbereitung sind Ringversuche auf dem Gebiet der Pathologie, Virus-Serologie und Virus-PCR-Diagnostik.

3. MITARBEITER IM RfB

Zum 1. Dezember 2009 haben wir unsere IT-Abteilung mit Herrn JOHANNES LEIDHEISER verstärkt.

HERR LEIDHEISER hat vergangenes Jahr sein Studium zum Diplom-Informatiker abgeschlossen und wird uns jetzt unter anderem bei der Weiterentwicklung unserer Internet-Applikationen unterstützen.



AUTOREN:

DR. W. J. GEILENKEUSER

DR. R. KRUSE

Referenzinstitut für Bioanalytik

Im Mühlenbach 52 a

53127 Bonn

Tagungsbericht

Tagung der Arbeitsgruppe Proteomics in der Klinischen Chemie zum Thema „Stem Cell – Tumor – Proteomes“

Hamburg, 5./6. Februar 2010

Am 5. und 6. Februar 2010 fand in Hamburg die Tagung „Stem Cell – Tumor – Proteomes“ statt.

Die Tagung wurde von der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin sowie der Deutschen Gesellschaft für Proteomforschung veranstaltet.

Organisation und Federführung lag bei CHRISTOPH WAGENER, Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Wesentliches Ziel der Tagung war es, funktionell bedeutsame Schnittmengen zwischen den Proteomen von embryonalen und Gewebstammzellen einerseits und Tumoren andererseits auszuloten.

In der Vergangenheit wurden viele Studien veröffentlicht, in denen die Proteome von Tumorzellen und Tumorgewebe mit den Proteomen der entsprechenden Normalzellen und Normalgewebe verglichen wurden. Es wurden Unterschiede, z.B. von Membranproteinen und Proteinen des Zytoskeletts gefunden, und es ist anzunehmen, dass einige dieser Proteine als Tumormarker im Blut oder in Sekreten und Exkreten diagnostische Bedeutung erlangen werden. Allerdings lässt

sich noch nicht abschätzen, ob diese neue Generation an Biomarkern mehr oder andere klinische Informationen liefern wird als die aktuell gebräuchlichen Tumormarker. Tumormarker, die zurzeit in Körperflüssigkeiten, Sekreten und Exkreten nachgewiesen werden, informieren darüber, ob ein Tumor vorhanden ist, oder ob die Tumormasse zu- oder abnimmt. Die Marker liefern allerdings in der Regel keine Hinweise auf die biologischen Eigenschaften der Tumoren.

Ein Grund dafür, dass aktuelle Tumormarker keine oder nur eingeschränkte Informationen über die Biologie des Tumors geben, mag daran liegen, dass diejenige Zellpopulation, die den Tumor unterhält, nicht spezifisch erfasst wird. Zellen dieser Population werden auch als Tumorstammzellen bezeichnet.

Die Existenz und Eigenschaften von Tumorstammzellen werden zurzeit intensiv und kontrovers diskutiert. Es gibt einige Argumente, die dafür sprechen, dass Gewebstammzellen die Ausgangszellen von Tumoren sind. Es dauert oft Jahre bis Jahrzehnte von der ersten Schädigung der DNA bis zur klinischen Diagnose von Tumoren. Unter der Voraussetzung einer klonalen

Tumorentstehung und der Mehrschrittkarzinogenese muss die Ursprungszelle von Tumoren entsprechend lange im Organismus verweilen. In regenerierenden Geweben trifft dies auf die Gewebstammzelle zu. Für die kolorektale Karzinogenese wurde kürzlich im Tierversuch gezeigt, dass die Tumoren von Gewebstammzellen ausgehen.

Die Entstehung von Tumoren aus Gewebstammzellen stützt die Tumorstammzell-Hypothese. Allerdings lässt sich diese Hypothese nicht ohne weiteres verallgemeinern. Es gibt Hinweise, dass die Eigenschaften von Tumorstammzellen und den daraus entstehenden Progenitorzellen flexibler sind als zunächst angenommen. So konnte für bestimmte Leukämien gezeigt werden, dass das für Stammzellen typische Programm der Selbsterneuerung auch in Progenitorzellen aktiviert werden kann. Dieser Mechanismus erinnert an induzierte pluripotente Stammzellen, die aus normalen Körperzellen generiert werden und durch genetische Manipulationen die Eigenschaften embryonaler Stammzellen erworben haben.

Es gibt somit eine Reihe von Gemeinsamkeiten zwischen embryonalen Stammzellen, Gewebstammzellen und Tumorstammzellen. Ob sich diese Eigenschaften auch im Proteom der Zellen mit den zurzeit zur Verfügung stehenden proteomanalytischen Methoden nachweisen lassen, wurde auf der Tagung intensiv diskutiert.

Der erste Teil der Tagung widmete sich Fortschritten auf dem Gebiet der Proteomanalytik. Ein Proteom bezeichnet die Gesamtheit der Proteine bzw. Proteinmodifikationen einer Zelle, eines Zellkompartiments, oder einer Körperflüssigkeit. In der technologischen Entwicklung der Proteomanalytik sind in den letzten Jahren quantitative massenspektrometrische Methoden und Ansätze zum Nachweis posttranslationaler Modifikationen in den Vordergrund getreten. Dieser Entwicklung wurde auf der Tagung Rechnung getragen.

Das einführende Referat wurde von HANNO LANGEN, Fa. ROCHE, Basel, gehalten. Er zeigte den mühsamen Weg auf, der von der ersten Identifizierung eines möglichen Marker-Proteins (hier für Tumoren) über die technische Validierung, die Entwicklung einer quantitativen Nachweismethode bis hin zur klinischen Validierung geht. Wenn dann der diagnostische Nutzen eines Biomarkers belegt wurde, muss er eine bessere diagnostische Aussagekraft als etablierte Marker haben oder bei vergleichbarer Aussagekraft andere Vorzüge bieten (z.B. Preis, Assay-Performance).

Nach den von JACEK R. WISNIEWSKI, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, vorgestellten Daten lässt sich eine massenspektrometrische Proteomanalytik auch aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe durchführen. Dies lässt für

die nähere Zukunft wichtige klinisch relevante Daten erwarten.

PETER NOLLAU, Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, nutzt rekombinante SH2-Domänen zum sog. „Profiling“ der Tyrosin-Phosphorylierung in Zellen und Geweben. SH2-Domänen lassen sich zu Gruppen mit vergleichbarer Spezifität zusammenfassen. Die Tatsache, dass die Domänen eine Klassifizierung z.B. von Hirntumoren und akuten lymphatischen Leukämien erlauben, belegt, dass der SH2-Domänen vermittelte Nachweis von Tyrosinphosphorylierungsmustern klinisch und biologisch relevante Aussagen erlaubt.

Ein vergleichbarer Ansatz wurde von CHRISTOPH WAGENER, Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, vorgestellt. In diesem Fall werden rekombinante humane Glykorezeptoren zum Nachweis von spezifisch glykosylierten Proteinen in Tumoren und Normalgeweben verwendet. Mit dieser Methode konnten metastasierende von nicht-metastasierenden Mammakarzinomen unterschieden werden.

GERD SCHMITZ, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, berichtete über eine umfassende systembiologische Charakterisierung von Megakaryozyten und Blutplättchen, die Transkriptom, Proteom und Lipidom umfasste. Thrombozyten besitzen ein kanalikuläres System mit Verbindungen zum Blutplasma.

Daher stammen viele der in Thrombozyten nachgewiesenen Proteine und Lipide aus dem Blutplasma.

Die Sitzung zu embryonalen Stammzellen wurde von STEFAN ROSE-JOHN, Cytokine and Metalloproteinase Research Unit, Christian-Albrechts-Universität Kiel, eröffnet. Er berichtete über die Bedeutung der Faktoren LIF und IL6 für die Regulation der Eigenschaften muriner Stammzellen. In diesen Zellen ist der STAT-Signalweg für den Erhalt der Stammzelleigenschaften essentiell. Allerdings lassen sich die an murinen Stammzellen erhaltenen Befunde nicht eins zu eins auf humane embryonale Stammzellen übertragen.

NICOLE ZUR NIEDEN, Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig, widmete ihren Vortrag der Bedeutung von b-Catenin für die osteogene Differenzierung embryonaler Stammzellen. Dieser bedeutende Transkriptionsfaktor ist in bestimmten Phasen der Differenzierung an- und in anderen Phasen der Differenzierung abgeschaltet.

JEROEN KRIJGSFELD, Proteomic Core Facility, EMBL Heidelberg, berichtete über die quantitative Analyse des Phosphoproteoms nach Induktion der Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen. Funktionell bedeutsam ist der Befund, dass das Pluripotenz-assoziierte SOX2-Protein phosphoryliert und in der Folge sumoyliert wird.

THOMAS ESCHENHAGEN, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, erläuterte, wie in humanen embryonalen Stammzellen die Differenzierung zu funktionellen Cardiomyozyten induziert werden kann.

In der Sitzung über Gewebstammzellen widmete sich ANTHONY A. HO, V. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Heidelberg, der Alterung hämatopoetischer Stammzellen. An der Alterung der Stammzellen sind nicht nur die Stammzellen selbst, sondern auch die Zellen der sog. Stammzellnische beteiligt. Umgekehrt scheinen hämatopoetische Stammzellen auch die Alterung der Nischenzellen zu beeinflussen.

MARTIN RÜTZE, Fa. Beiersdorf AG, Hamburg, stellte eine Technik vor, mit deren Hilfe im Gewebsschnitt identische Zellen der Epidermis mit verschiedenen Liganden charakterisiert werden können. Es handelt sich hierbei um eine Modifikation der sog. FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching) Methode. Keine Zelle der Epidermis exprimiert alle der bisher beschriebenen epidermalen Stammzellmarker. p63 wurde als dasjenige Protein identifiziert, das am engsten mit Markern und Topologie von Stammzellen assoziiert ist.

EVELYN ORSO, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Regensburg, referierte über Ansätze zur

Gewinnung, Charakterisierung, Expansion und Differenzierung autologer mesenchymaler Progenitorzellen aus Liposuctionspräparaten. Diese Zellen sollen in der Traumatologie z.B. zur Therapie von Bindegewebsläsionen, eingesetzt werden.

Die Sitzung zum Thema ‚Tumorzellen‘ begann mit einem Vortrag von BJÖRN SCHEFFLER, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Universitätsklinikum Bonn. Hinsichtlich der Charakterisierung von Tumorstammzellen zählen Glioblastome zu den am besten untersuchten Tumoren des Menschen. Auf funktioneller Ebene besteht in diesen Tumoren an der Existenz von Tumorstammzellen kein Zweifel. Allerdings ist es noch nicht möglich, Tumorstammzellen phänotypisch eindeutig zu identifizieren.

KLAUS PANTEL, Institut für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, berichtete über die phänotypische und funktionelle Charakterisierung zirkulierender und disseminierter Tumorzellen. Die Befunde sind nicht nur aus tumorbiologischer, sondern auch aus klinischer Sicht von großem Interesse. Bei Patientinnen mit Mammakarzinomen, deren Primärtumoren den HER2/NEU-Rezeptor nicht exprimierten, wurden im peripheren Blut HER2/NEU-positive Tumorzellen identifiziert. Diese Patientinnen könnten eventuell von einer Therapie mit Herceptin profitieren.

JULIA ALMEIDA, Centro de Investigacion des Cancer, Campus Miguel de Unamuno, Spanien, berichtete über neue Ansätze einer Aufschlüsselung von Leukämiezellen durch multiparametrische Durchflusszytometrie.

HELMUT MEYER, Medizinisches Proteom-Center, Ruhr-Universität Bochum, widmete seinen Vortrag zunächst den Anforderungen an proteomanalytische Methoden, um zuverlässige, statistisch abgesicherte und vor allem auch reproduzierbare Daten zu gewinnen. Diese Maßstäbe wurden der Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern des Pankreaskarzinoms zugrunde gelegt.

BENJAMIN BALUFF, II. Medizinische Klinik, Klinikum Rechts der Isar, München, stellte die Methode der Imaging Mass Spectrometry vor, in der unter Anwendung der MALDI-TOF Massenspektrometrie Muster aus Geweben generiert werden. Nach seinen Befunden besitzt die Methode eine erstaunlich hohe Treffsicherheit bei der Differenzierung HER2/NEU positiver von HER2/NEU negativen Mamma- und Magenkarzinomen.

Der Vortrag von IVAN DIKIC, Institut für Biochemie II, Universitätsklinikum Frankfurt, bildete einen der Höhepunkte und zugleich den Abschluss der Tagung. Ubiquitinierung und Sumoylierung sind äußerst differenzierte Proteinmodifikationen, die nicht nur den Abbau von Proteinen im Proteasom, sondern auch Signaltransduktion, Apoptose und

vor allem auch Autophagie steuern. Unter Anwendung von Proteindomänen, die verschiedene Ubiquitin-Modifikationen erkennen, sollte eine differenzierte Unterscheidung funktioneller Zustände von Einzelzellen möglich sein.

Zum Abschluss zog CHRISTOPH WAGENER Bilanz. Die deutlichste Parallele zwischen den Eigenschaften embryonaler Stammzellen und menschlicher Tumoren, die sich aus den Vorträgen ergab, ist die zentrale Bedeutung des WNT-Signalwegs für die Differenzierung embryonaler Stammzellen. Andererseits gibt es nur wenige Hinweise darauf, dass Transkriptionsfaktoren, die für die Stammzeleigenschaften embryonaler Stammzellen und für die Induktion pluripotenter Stammzellen essentiell sind (OCT4, NANOG, SOX2), in der humanen Karzinogenese eine Rolle spielen. Eine prominente Ausnahme ist das MYC Protein. Bezüglich der Parallelen zwischen Gewebs- und Tumorstammzellen war vor allem der Befund von Interesse, dass die Stammzellen eher aufgrund funktioneller und topologischer als phänotypischer Merkmale identifiziert werden können.

Es gilt also, neue Instrumente der Einzelzellanalyse zur phänotypischen Charakterisierung dieser Zellpopulationen zu entwickeln. Der Einsatz von Proteindomänen (SH2, CRDs (carbohydrate recognition domains), Ubiquitin-bindende Domänen) könnte dazu beitragen, verschiedene zelluläre

Differenzierungsstadien in soliden Geweben abzugrenzen und in Tumoren diejenigen Zellpopulationen zu erkennen, die das Wachstum von Primärtumoren und Metastasen unterhalten. Wenn es gelänge, spezifische Produkte dieser Zellen oder die Zellen selbst in der Zirkulation nachzuweisen, wäre ein entscheidender Schritt auf dem Weg zu biologischen Tumormarkern getan.

AUTOR

PROF. DR. C. WAGENER,
Institut für Klinische Chemie
Zentrum für Diagnostik
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Tagungsbericht

Zweites Banzer Minisymposium der Arbeitsgruppe „Klinische Toxikologie“

Kloster Banz, 15.-16. Oktober 2009

Das diesjährige Minisymposium der Arbeitsgruppe Klinische Toxikologie der DGKL fand am 15./16. Oktober 2009 im Kloster Banz in Bad Staffelstein statt. Unter der wissenschaftlichen Leitung von Dr. Degel (Nürnberg) und Dr. Hallbach (München) wurden Themen, die Klinik und Labor betreffen, besprochen.

FRAU WOHLFARTH (Rechtsmedizin Freiburg, AK Prof. Weinmann) referierte über das Thema „LC-MS in der forensischen Toxikologie: Einsatz und Erfahrungen“. In der Praxis wird die LC-MS/MS ebenso wie die GC-MS zur Bestätigung von hinweisgebenden Immunoassays verwendet. Die LC-MS/MS-Technik bietet im Gegensatz zur Gaschromatographie die Vorteile, dass zum einen keine Derivatisierung der Proben notwendig ist und im Vergleich kürzere Analysenzeiten möglich sind. Einige Bestätigungsanalysen mit LC-MS/MS erläuterte Frau Wohlfarth im Detail, unter anderem Methoden zur Detektion von Analyten zur Heroin-Substitution, Analyten, die im Rahmen der Hirntoddiagnostik untersucht werden, Alkoholkonsummarker (EtG und EtS), Cannabinoide, klassische Missbrauchsdrogen (Amphetamin, Cocain und

Morphin), neue Designerdrogen und GHB.

Zum Schluss stellte sie eine Nachweismethode für verschiedene Phosphatidylethanoole vor. Diese entstehen bei Anwesenheit von Ethanol aus Phosphatidylcholin und sind direkte Alkoholkonsummarker wie EtG und EtS in Vollblut.

HERR DR. DEGEL (Klinikum Nürnberg) sprach über den Einsatz und die Erfahrungen mit der LC-Tandem-MS mit Ionenfalle (ABI 4000 QTrap®) in der klinischen Toxikologie. Er stellte die Software Cliquid™ Drug Screen & Quant vor. Hierbei handelt es sich um ein benutzerfreundliches Programm, mit dem einfach Multitarget-Screening-Untersuchungen auf Drogen und Medikamente und auch Quantifizierungen durchgeführt werden können. Die Software enthält eine Bibliothek mit über 1200 Massenspektren von Drogen, Pharmazeutika und deren Metaboliten. Durch einen neuen, automatischen Suchalgorithmus können die Chromatogramme nach Spektren und Retentionszeit toxikologisch relevanter Verbindungen durchsucht und mit der Datenbank abgeglichen werden. HERR DEGEL verglich bei 116 Fällen die etablierte GCMS-Analytik mit Ergebnissen

der LC-MS-QTrap® und fand in 32 Fällen kongruente, in 12 divergente und in 72 komplementäre Ergebnisse. Die Methode eignet sich nach seiner Erfahrung daher weniger als Alternative, aber sehr gut zur Ergänzung der etablierten „General-Unknown“ – Suche mittels GC/MS, vor allem für Substanzen, die gaschromatographisch nur schwer zugänglich sind. Zusätzlich zu den vorgefertigten Screening- und Quantifizierungsmethoden können mit der Software auch neue, selbst entwickelte Methoden erstellt und in das System eingebunden werden. Derzeitige Nachteile sind die ausschließliche Verwendung von absoluten Retentionszeiten (keine -Indices) und die Beschränkung auf 300 Substanzen pro Analysenlauf (mit neuer Software im "scheduled-MRM"-Modus bis zu 1000). Nachteilig ist nach seiner Erfahrung auch der erschwerte Übergang zur Basissoftware Analyst, die weitere Funktionen wie auch das manuelle Suchen in der Gesamtdatenbank ermöglicht. Die Cliqid™ -Software muss dazu verlassen werden.

Es folgte der Vortrag „Management von Vergiftungen in einer interdisziplinären Notaufnahme / Präklinik“ von Herrn PROF. DODT (Klinikum München Bogenhausen). Am Beispiel des Klinikums München Bogenhausen stellte Herr PROF. DODT die organisatorischen Aspekte einer Notaufnahme vor. Eine wichtige Aufgabe der Notaufnahme besteht darin, aus einem undiagnostizierten Notfall einen geplanten bzw. planbaren Fall zu

machen. Unmittelbar nach Eintreffen des Patienten erfolgt eine Ersteinschätzung, die die Gefährdung des Patienten bestimmt und die Dringlichkeit der Behandlung festlegt. In Anlehnung an internationale Ersteinschätzungssysteme wird am Klinikum Bogenhausen ein sogenanntes Ampelsystem verwendet. Rot bedeutet akute Lebensgefahr, gelb bedrohte Stabilität, grün stabile Organfunktionen ohne akute Bedrohung.

Bei allen Notfällen mit Bewusstseinstörung und Wesensveränderung, die immer einer unverzüglichen Behandlung bedürfen, muss auch die Möglichkeit einer Vergiftung berücksichtigt werden. Hinweise können sich aus der Konstellation von Leitsymptomen, den sogenannten Toxidromen, aus Fremdhinweisen oder den speziellen Gegebenheiten beim Auffinden des Patienten ergeben. Ist eine Vergiftung möglich, ist eine möglichst umfassende Informationsbeschaffung unabdingbar. Dazu gehören die Asservierung von Tablettenresten, Blistern und auch erbrochenem Material, sowie die Einschätzung des Gefährdungspotentials und die Berücksichtigung des Eigenschutzes. Der aufnehmende Arzt sollte rechtzeitig Rücksprache mit den Giftnotrufzentralen zur weiteren spezifischen Informationsgewinnung nehmen.

Im zweiten Teil referierte PROF. DODT über Gifteliminationsverfahren und den Einsatz von Antidota. Hier stellte er besonders heraus, dass in vielen Fällen die primäre

Giftentfernung durch eine Magenspülung die Prognose des Patienten nicht verbessert. Beim Einsatz von Antidota sind die Nebenwirkungen ebenso zu beachten wie die Tatsache, dass die Halbwertszeit der Antidota häufig deutlich kürzer ist als die der Giftstoffe.

Herr PROF. ZILKER (Klinikum der TU München) referierte über das Thema „Management vergifteter Patienten in einer spezialisierten Klinik“ am Beispiel des Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität in München. Die Vorteile einer Spezialabteilung liegen erstens in der Erfahrung der Behandlung von schweren sowie seltenen Vergiftungen, zweitens der Verfügbarkeit selten benötigter aber dann lebensrettender Antidota, dem Zugang zu einem Toxikologischen Labor zur raschen, quasi bed-side Giftanalyse sowie dem sofortigen Einsatz selten benötigter Entgiftungsverfahren. Während die Haemodialyse zur Entgiftung toxischer Alkohole, Salizylat, Valproat, Theophyllin, Lithium und bei Schwermetallen mit gleichzeitigem Nierenversagen noch relativ häufig eingesetzt wird, ist die Hämo-perfusion nur noch bei den Barbituratvergiftungen indiziert. Forcierte Diurese, forcierte Atmung und Abführmittel sind vollständig überholt. Die Magenspülung und das Auslösen von Erbrechen machen nur noch innerhalb einer Stunde nach Giftaufnahme Sinn. Die Gabe von Medizinalkohle, vor allem ihre repetitive Anwendung, sind heute die letzten

Säulen der Giftentfernung. Zu den selten gebrauchten aber lebensrettenden Antidoten, die bevorratet werden, gehören u. a. Digitalisantidot, Glukagon, Eisenhexacyanoferat, Pyridoxin, Deferoxamin, Obidoxim, Natriumthiosulfat, Silbinin DMPS, DMAP und Schlangenantiseren. Herr PROF. ZILKER wies darauf hin, wie wichtig es gerade für Notärzte ist, eine Auswahl von lebensrettenden Antidota mitzuführen. Dabei pointierte er den Einsatz von Atropin:

„Ein Mensch, der liegt in großer Not, Sein Doktor sucht das Antidot

Er reckt die Arm zum Himmel hin, So gebt mir doch bloß Atropin“

Obwohl von den sonstigen Intensivmedizinischen Verfahren wenig unterschieden, bedarf die klinische Toxikologie Spezialkenntnisse in der Respirator- und Kreislauf – Volumen-Therapie. Da bei Vergiftungen die Pumpleistung des Herzens meist mit eingeschränkt ist, muss mit Flüssigkeit vorsichtig umgegangen werden, Katecholamine sind eher früher einzusetzen. Auch in der Botanik und Zoologie bei der raschen Identifizierung von Giftpflanzen, Giftpilzen und giftigen Tieren ist der Spezialist einer klinisch toxikologischen Abteilung wichtig, um keine Zeit bis zum Einleiten der richtigen Therapie zu verlieren. Ferner ist seine Erfahrung gefragt bei den schwersten aller Medikamentenvergiftungen.

Dabei handelt es sich um Vergiftungen mit den Kardiaka vom Beta-Rezeptorenblocker über Antiarrhythmika bis hin zu den Calcium-Kanal-Blockern, die im Extremfall eine extrakorporale Aufrechterhaltung des Kreislaufes erforderlich machen. Damit bietet eine Spezialabteilung auch die Möglichkeit, rund um die Uhr schwer vergiftete Patienten aus Kliniken, die nicht über die Maximalversorgung verfügen, zu übernehmen.

Der zweite Tag des Symposiums begann mit dem Beitrag „LC-MS based techniques for quantification of organophosphorus compounds“ von Herrn PD DR. JOHN (Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, München). Weltweit werden phosphororganische Substanzen als Pestizide eingesetzt und befinden sich als Restbestände chemischer Kampfstoffe in militärischen Arsenalen. An mehreren Beispielen von Nervenkampfstoffen und Pestiziden stellte HERR JOHN die verschiedenen Probenvorbereitungen für die LC-MS vor. Eine optimale Probenvorbereitung ist abhängig von der Matrix und der vorhandenen Konzentration des Analyten, so dass es keine universelle Aufarbeitung geben kann, sondern immer individuell entschieden werden muss. Die chromatographische Bestimmung der phosphororganischen Verbindungen wird im Allgemeinen mit GC-FID, NPD oder EI-MS durchgeführt.

Diese Methoden haben die Nachteile, dass sie für viele Substanzen, die mehr oder

weniger polar, nicht-flüchtig oder thermisch labil sind, nur mit Einschränkungen verwendet werden können. Ergänzend erreichen moderne LC-MS Methoden hohe chromatographische Auflösung und ermöglichen zudem eine hoch-selektive Detektion. Zusammenfassend kann man sagen, dass der Nachweis von phosphororganischen Substanzen mit LC-ESI MS/MS eine hoch effiziente Methode für die Quantifizierung darstellt.

Herr PROF. MAURER (Experimentelle und Klinische Toxikologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar) sprach über das Thema Münchhausen-Syndrom: „Überwachung von Diuretika und Laxantienabusus.“ Typische Wirkstoffe beim Münchhausen-Syndrom, wie Diuretika, Laxantien, Antidiabetika und Anticoagulantien, führen zu objektiven Symptomen und Laborwertveränderungen. Hierzu stellte HERR MAURER die Wirkmechanismen der verschiedenen Stoffe vor sowie den Nachweis von Laxantien und Diuretika mittels GC-MS im Urin. Mit dieser Methode können bis jetzt mehr als 30 Diuretika und Laxantien im Urin nachgewiesen werden. Niedrigste therapeutische Dosen der maßgeblichen Substanzen können innerhalb von 24 bis 72 Stunden gefunden werden. Außerdem lässt sich die Methode leicht für zahlreiche andere saure Verbindungen adaptieren.

Anhand einer Publikation zur LC-MS/MS-Analytik von Diuretika konnte PROF. MAURER zeigen, dass diese Stoffgruppe mit

sauen und basischen Verbindungen jeweils zwei Messungen erfordert, nämlich im positiven und negativen Modus. So dauert eine Analyse trotz direkter Urin-Injektion länger als mit GC-MS nach Extraktion und Derivatisierung.

Im Anschluss folgte der Vortrag "Abklärung von Hypoglykämien beim Nicht-Diabetiker" von FRAU PD RENTSCH (Klinische Chemie, Universität Zürich). Als Hypoglykämie bezeichnet man Blutglukosekonzentrationen von unter 40 mg/dl (ohne Symptome) oder bereits unter 50 mg/dl mit Symptomen. Symptome einer Hypoglykämie können zum einen adrenerge Zeichen, wie innere Unruhe, Zittern, Heißhunger oder kalte Schweißausbrüche sein, zum anderen neuroglykopen Zeichen, wie der Kontrollverlust des Körpers, Konzentrations- und Bewusstseinsstörungen, Störungen der Bewegungskoordination und Sprachstörungen sein.

Die häufigsten Ursachen für Hypoglykämien bei Nicht-Diabetikern sind übermäßiger Alkoholkonsum ohne adäquate Nahrungszufuhr, die Verabreichung von Insulin oder Sulfonylharnstoffen durch Fremde oder beim Suizid. Die Therapie ist eine i.v. oder orale Glukosezufuhr, je nach Blutglukosekonzentration, teilweise über mehrere Tage. Im klinisch-chemischen Labor werden Blutglukose, Insulin und C-Peptid untersucht. Mit einer differenzierten Auswertung kann zwischen exogenem zugeführtem Insulin und endogenem Insulin

beim Insulinom, und der oralen Aufnahme von Antidiabetika, z.B. Sulfonylharnstoffen, differenziert werden. Der Nachweis von Insulin erfolgt immunologisch im Serum, Sulfonylharnstoffe können im Plasma mittels LC-MS bestimmt werden. Diese Methode stellte FRAU RENTSCH im Detail da. Mit Nachweisgrenzen in der Regel deutlich unterhalb des therapeutischen Bereichs lassen sich Chlorpropamid, Tolbutamid, Glipizid, Gliclazid, Glibornurid, Glibenclamid und Glimepirid erfassen. Die Methode beruht auf einer Festphasenextraktion im Sauren und einer RP-C18 HPLC. Als interner Standard werden von FRAU RENTSCH mangels Verfügbarkeit bei der Methodenetablierung keine deuterierten Verbindungen sondern für alle Analyte Tolazamid verwendet.

Über ASHT – ein Projekt der Europäischen Gemeinschaft, das ein Frühwarnsystem für Terrorgefahren durch Chemikalien darstellt, referierte HERR DR. SCHAPER (Giftinformationszentrum Nord, Göttingen) aus dem Giftinformationszentrum-Nord, das der Universität Göttingen angeschlossen ist. ASHT bedeutet „Alerting System of a Health Surveillance System for the Deliberate Release of Chemicals by Terrorists“.

Das Ziel dieses Projektes ist es, ein Konzept und eine Implementierung eines europäischen Rapid Alert System for CHEMicals (RAS-CHEM), wie es schon für übertragbare Krankheiten gibt, zu etablieren. Die

Hauptaufgabe des ASHT-Projektes besteht darin, eine Datenbank zur Detektion verdeckter Chemikalienausbringung zu erstellen, die einen kriminellen oder terroristischen Hintergrund besitzen. Ziel ist es, einzelne kleine Ereignisse in einen länderübergreifenden größeren Zusammenhang bringen zu können und damit ein schnelles Handeln zu ermöglichen. Um das Programm zu testen, wurden 37 Ereignisse sowie acht dokumentierte Massenvergiftungen eingegeben. Als Beispiel solcher Ereignisse erinnerte HERR SCHAPER an Bhopal, Halabджа und den Sarin-Anschlag in der Tokioter U-Bahn. Hierfür wurden die Funktionalität der Datenbank erklärt, Eingabefelder für die Ereignisse entwickelt, der Zugang zum Internet festgelegt und ein Alarmsystem ausgearbeitet. Die weiteren Aufgaben des ASHT-Projektes sind die Entwicklung von Testprotokollen und -prozeduren als Machbarkeitsstudie, der Nachweis, ob das „Rapid Alert System“ funktioniert, und wie der Alarm am besten weitergeleitet werden soll.

Im abschließenden Vortrag sprach Herr DR. HALLBACH (Department Klinische Chemie, Klinikum München) über Analysenstrategien bei akut-toxikologischen Fragestellungen im internationalen Vergleich. Bereits in den 90er Jahren wurden gemeinsam von DFG und DGKC Methoden der Vorfeldanalytik und des toxikologischen A-Labors publiziert. In der Literatur gibt es

einige Studien, die den Wert der toxikologischen Analytik abgesehen von wenigen Ausnahmen für die Notfallbehandlung von Patienten eher kritisch sehen, wohingegen es an Studien fehlt, die den Nutzen einer umfangreichen toxikologischen Analytik belegen. Dies hat dazu geführt, dass in der klinischen Praxis zwei extreme Meinungen aufeinander treffen: von einem minimalistischen Ansatz bis hin zum Gießkannenprinzip mit einem weit gefächerten Analysenprogramm. Je umfangreicher die toxikologische Basisanalytik ist, um so mehr lassen sich auch klinisch nicht vermutete Substanzen nachweisen. Hier ist besonders z.B. das Erkennen einer Paracetamolvergiftung von großer Bedeutung.

Klinisch geht es in den ersten Stunden der Behandlung einer schweren Intoxikation allerdings erst einmal um die Stabilisierung des Patienten und weiterführende Untersuchungen, die eine zielgerichtete Weiterbehandlung des Patienten ermöglichen, haben nach Meinung verschiedener Experten bis zu 4 Stunden Zeit. Hierfür sollen sogenannte diagnostische / toxikologische Pfade entwickelt werden, die in Form von Flussdiagrammen den Weg von der Basisdiagnostik bis hin zu detaillierten Untersuchungen angeben sollen.

In anderen Bereichen der Diagnostik sind solche Pfade bereits entwickelt worden, einen solchen Pfad aus der AG Diagnostische Pfade der DGKL für die Abklärung des

klinischen Symptoms Abdominalschmerz stellte HERR HALLBACH vor. Anschließend präsentierte er einen vorläufigen Pfad für die Paracetamolvergiftung (Degel, Desel, Felgenhauer, Hallbach), der mit den Teilnehmern intensiv diskutiert wurde.

Die Teilnehmer zeigten insgesamt großes Interesse an einer Fortsetzung der Banzer Toxikologie-Tage und gerne wurde ein neuer Termin für das nächste Symposium, zu dem alle DGKL-Mitglieder bereits jetzt herzlich eingeladen sind, von den HERRN DEGEL und HERRN HALLBACH fest geplant.

VERFASSER

DR. BIRGIT HENSCHEL und DR. ALEXANDER VON MEYER, Institut für Klinische Chemie, München

Nächstes Symposium:

28.-29. Oktober 2010

in Kloster Banz

Forschungsbericht

Chronische Chagas-Erkrankung: Auto-Antikörper gegen den beta1-Adrenorezeptor, beta2-Adrenorezeptor und muscarinergen Rezeptor M2 sowie Entzündungsmarker, Marker für Oxidativen Stress und Herzmarker zur Risikoabschätzung, Diagnostik und zum Monitoring

Gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL durch Verleihung eines Heinz-Breuer-Stipendiums an SILVIA GILKA MUNOZ SARAVIA.

SILVIA GILKA MUNOZ SARAVIA, INGOLF SCHIMKE Charité - Santa Barbara Hospital Sucre, Bolivien; Charité - Universitätsmedizin Berlin

EINLEITUNG

Die Chagas-Erkrankung als endemisch primär in Lateinamerika vorkommende Infektionskrankheit, wird durch *Trypanosoma cruzi*, die hauptsächlich durch Raubwanzenkot von Tier zu Mensch und über Bluttransfusion von Mensch zu Mensch übertragen werden, verursacht.

Nach WHO-Angaben leben ca. 100 Millionen Einwohner bzw. 25 % der Gesamtbevölkerung Lateinamerikas in endemischen Gebieten, wovon nach Angaben aus dem Jahre 2000 elf Millionen Menschen chronisch infiziert waren, was zu mehr als 21 000 Todesfällen im Jahr führte.

Diaplazentale und perinatale Übertragung von *Trypanosoma cruzi*, Übertragungen durch verunreinigte Lebens- und Genussmittel sowie durch Organspende sind ebenfalls beschrieben. Durch zunehmende

Migrationsprozesse und internationalen Tourismus beginnt die Chagas-Erkrankung ein weltweites Problem zu werden.

Die unmittelbar der Infektion folgende akute Krankheitsphase ist in der Regel unspektakulär. Symptomatisch wird die akute Phase vorwiegend bei Kindern insbesondere durch Myokarditis und Meningoenzephalitis, was mit einer Mortalität von 2-6 % verbunden ist.

In der anschließenden chronischen Chagas-Erkrankung bleiben trotz der lebenslangen Parasitenpersistenz 70 % der Patienten klinisch unauffällig (asymptomatische Phase, Indeterminate Phase, Latenz-Phase), bei den restlichen 30 % der Patienten manifestiert sich die chronische Chagas-Erkrankung als Erkrankung des Herzens (ca. 90 % der Patienten), hauptsächlich als Kardiomyopathie sowie als Erkrankung des Intestinaltraktes

(Megakolon, Megaösophagus) und des Nervensystems.

Die chronische Chagas-Erkrankung stellt damit für die betroffenen Länder Lateinamerikas ein gewaltiges sozio-ökonomisches Problem dar. Beispielhaft für Brasilien berechnet, ergibt sich aus Therapiekosten und Lebensarbeitszeitverlust ein finanzieller Verlust von ca. 240 Mill. US Dollar jährlich.

Bei der Hauptmanifestationsform der chronischen Chagas-Erkrankung, der Chagas-Herzkrankheit, stehen Rhythmusstörungen, Thromboembolien, plötzlicher Herztod und Kardiomyopathie im Vordergrund. Mikroskopisch lassen sich fokale, später diffuse Entzündungsprozesse und interstitielle Fibrose in allen Herzarealen nachweisen. Typisches radiologisches Zeichen von Megakolon und Megaösophagus ist deren Dilatation. Klinisches Zeichen für das Megakolon ist die chronische Obstipation als Folge der Darmhypokinesie.

Die Pathogenese der Chagas-Manifestationsformen wird heute hauptsächlich als Zusammenspiel von inflammatorischen, immunologischen und autoimmunologischen Mechanismen gesehen. Insbesondere für die Chagas-Kardiomyopathie aber auch immer mehr für das Megakolon werden auto-immune Schädigungsmechanismen in den Mittelpunkt der Pathogenese gerückt. Diskutiert wird, dass durch *T. cruzi* spezifische Antigene die Bildung von Auto-Antikörpern

induziert wird. Die Auto-Antikörper richten sich gegen kreuzreagierende Wirtsantigene (Molekulares Mimicry) und/oder Antigene des Wirtes, die im Verlauf der Parasiten-induzierten Gewebeschädigung dem Immunsystem zugänglich werden.

Unter den Auto-Antikörpern werden zunehmend solche als pathogen angesehen, die gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren gerichtet sind, insbesondere gegen beta1-, beta2-Adrenorezeptor (beta1-AAB, beta2-AAB) und muscarinergen M2-Rezeptor M2-AAB).

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gehören zu den Transmembranproteinen. Sie sind an der Signalverarbeitung von Sinnesreizen aber auch bei Entzündungsprozessen, Chemotaxie, Endo- und Exozytose, Zellwachstum und -differenzierung sowie an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt und damit zentrale Stellglieder sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse. Die transmembrane Signalübertragung von Katecholaminen und Acetylcholin wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Eindrucksvoll lässt sich die Wirkung von beta1-AAB, beta2-AAB und M2-AAB an ihrer positiven bzw. negativen Chronotropie auf neonale Rattenkardiomyozyten zeigen.

PROBLEMSTELLUNG

Gegenwärtig existiert kein kausales therapeutisches Konzept, um den Übergang von der asymptomatischen zur

symptomatischen Phase der Chagas-Erkrankung zu verhindern. Deshalb wäre es notwendig, die Patienten in der asymptomatischen Phase herauszufinden, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Chagas-Herzkrankheit und intestinaler Krankheit besitzen. Diese Patienten sollten frühzeitig auf den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung getestet werden, um sie früher als bisher den etablierten Therapieverfahren für Kardiomyopathie und Megakolon zuzuführen.

Ausgehend von der Autoimmunhypothese der chronischen Chagas-Erkrankung und speziell von der pathogenetischen Funktion von beta1-AAB, beta2-AAB und M2-AAB postulieren wir, dass sich Chagas-Herzkrankheit und intestinale Krankheit durch ein unterschiedliches Auto-Antikörpermuster unterscheiden sollten. Solche Muster könnten dann bereits in der asymptomatischen Phase sichtbar sein und bei diesen Patienten das Risiko für den Übergang in die manifeste Phase kennzeichnen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb das Muster von beta1- und beta2- und M2-AAB in asymptomatischen chronischen Chagas-Patienten (Indeterminate Phase) und symptomatischen Patienten mit Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon bestimmt.

Im Hinblick auf die frühzeitige Diagnose des Überganges von der asymptomatischen

zur symptomatischen chronischen Chagas-Erkrankung wurde geprüft, ob laboratoriumsmedizinische Untersuchungen einen Beitrag dazu leisten können. Untersucht wurden Herzmarker (B-Typ Natriuretisches Peptid; kardiales Troponin T), Entzündungsmarker (CRP, Interleukine, TNF α , Myeloperoxidase) und Marker für Oxidativen Stress (Myeloperoxidase, Malondialdehyd, Lipidperoxide).

MATERIAL UND METHODEN

Von 2005 bis 2007 wurden insgesamt 228 Patienten mit dem Nachweis von Antikörpern gegen *Trypanosoma cruzi* und zusätzlich 29 gesunde Probanden als Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden nach Anamnese, EKG und radiologischer Diagnostik der Latenz- (96 Patienten), Kardiomyopathie (57), Megakolon- (30) und Megakolon plus Kardiomyopathie-Gruppe (45) zugeordnet. Die Patienten mit Kardiomyopathie wurden zusätzlich nach dem Schweregrad subklassifiziert. Von den Studienteilnehmern wurde Blut gewonnen, portioniert und bei -20 °C bis zur Bestimmung gelagert.

Die Bestimmung der Autoantikörper-Aktivität erfolgte in einem von uns zuvor standardisierten Bioassay, in dem die Änderung der Schlagfrequenz von kultivierten spontan schlagenden neonatalen Rattenherzzellen nach Zugabe der Serum-IgG-Präparation der Patienten gemessen wurde. Durch selektive Zugabe von Antagonisten zum Bioassay,

wurden die verschiedenen AAK-Aktivitäten differenziert. Die Bestimmung der laboratoriumsmedizinischen Messgrößen erfolgte automatisiert bzw. halbautomatisiert mit kommerziell verfügbaren Analysengeräten und Assays.

ERGEBNISSE

Unter den Studienteilnehmern waren 156 Frauen und 101 Männer. In der Kontrollgruppe, der Latenz- und Megakolon-Gruppe überwogen Frauen. In der Kardiomyopathie-Gruppe überwogen Männer. Ein Einfluss des Geschlechts auf die Untersuchungsergebnisse wurde nicht festgestellt. Nach Analyse von Geburts- und Wohnort zeigte sich die für Südamerika typische Bevölkerungsbewegung in die Städte.

Obwohl die Studienteilnehmer der Kontrollgruppe und Latenz-Gruppe jünger als die Patienten der anderen Gruppen waren, wurden keine altersabhängigen Einflüsse auf die untersuchten Parameter festgestellt.

Von den 102 Patienten mit Kardiomyopathie hatten 8 Patienten eine milde, 52 eine moderate Kardiomyopathie und 42 eine schwere Kardiomyopathie.

Die Blutabnahme erfolgte bei einem Teil der Patienten mit manifester chronischer Chagas-Erkrankung nach einer chirurgischen Intervention (Schrittmacherimplantation, Kolonchirurgie). Für diese Patienten wurde jeweils der Einfluss der chirurgischen

Intervention auf die untersuchten Parameter geprüft und wenn notwendig diese Patienten von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Basierend auf dem von uns in Voruntersuchungen ermittelten cut off von 4 U für beta1- und beta2-AAB und -4 U für M2-AAB waren von den Patienten mit Kardiomyopathie nahezu alle positiv für beta1-AAK und M2-AAK sowie ein großer Teil positiv beta2-AAK. Unter den Megakolon-Patienten zeigten alle Positivität für beta2-AAK und M2-AAK aber nur zu 1/3 für beta1-AAK. Damit bestand ein signifikanter Unterschied im Auftreten von beta1-AAK bei den Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon. Patienten mit Megakolon und Kardiomyopathie besaßen alle 3 Auto-Antikörper.

Das typische Zeichen für Patienten mit Kardiomyopathie war damit das Auftreten von beta1-AAK gemeinsam mit M2-AAK, für die Patienten der Megakolon-Gruppe der Nachweis von beta2-AAK gemeinsam mit M2-AAK.

In der Latenz-Gruppe sind jeweils 1/3 positiv entweder für beta1-AAK und M2-AAK oder beta2-AAK und M2-AAK.

Zusätzlich zum unterschiedlichen AAK-Muster wiesen die Kardiomyopathie-Patienten im Vergleich zu den Megakolon-Patienten höhere beta1-AAK- und M2-AAK-Aktivitäten auf, während bei letzteren höhere beta2-Aktivität gefunden wurde. Dabei trennte ein cut-off von 9,6 U für die beta1-AAK-Aktivität

mit höchster Effizienz Kardiomyopathie und Megakolon-Patienten.

Wendet man den cut off von 9.6 U für beta1-AAK zur Unterscheidung von Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie bzw. Megakolon nun auf das 1/3 der Patienten der Latenz-Gruppe an, für die wir aufgrund ihres AAK-Musters ein Risiko für die Entwicklung von Spätschäden postuliert haben, lassen sich 85 % dieser Risiko-Patienten dem Kardiomyopathie-Muster und 15 % dem Megakolonmuster zuordnen. In den Chagas-Patienten mit Kardiomyopathie korrelierte insbesondere die beta1-AAK-Aktivität mit dem Schweregrad der Kardiomyopathie.

Für die Entzündungsmarker zeigen sich zusammenfassend höhere Werte in der Kardiomyopathie und Megakolon/Kardiomyopathie-Gruppe verglichen mit der Latenz-Gruppe und der Gruppe mit Megakolon. Zusätzlich existierte eine Korrelation der Entzündungsmarker zum Schweregrad der Kardiomyopathie. Wenig aussagekräftig sind die Ergebnisse zur Myeloperoxidase, die sowohl als Entzündungsmarker als auch als Marker für den Oxidativen Stress gilt. Auch die eigentlichen Marker für den Oxidativen Stress liefern keine Hinweise, dass deren Bestimmung frühzeitig den Übergang von der asymptomatischen zur symptomatischen Phase anzeigen kann. Entweder wurden keine Unterschiede in den verschiedenen Patientengruppen gefunden oder aber Hinweise auf gesteigerten

Oxidativen Stress vor allem in der Latenz-Gruppe. Die Megakolon-Gruppe scheint unter den verschiedenen Patientengruppen am wenigsten von Oxidativem Stress betroffen zu sein.

Patienten mit Kardiomyopathie sowie Megakolon und Kardiomyopathie wiesen höhere NT-proBNP-Konzentrationen als die Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe auf. Dabei hatten Patienten mit schwerer Kardiomyopathie höhere NT-proBNP-Werte als Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie. Wurde ein cut off von 125 pg/ml zugrunde gelegt, lassen sich 1/3 der Patienten der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie mit diesem Herzmarker identifizieren. Allerdings besaßen auch einige Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe NT-proBNP über der Nachweisgrenze. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine Herzschädigung bei diesen Patienten, die mit der zur Patienteneinteilung genutzten EKG-Diagnostik nicht erkannt wurde.

Mit Hilfe eines hochsensitiven Testes zur Bestimmung von cTnT wurden die höchsten Konzentrationen für diesen Herzmarker in den Patientengruppen mit Kardiomyopathie gefunden, wobei eine Beziehung zum Schweregrad der Kardiomyopathie offensichtlich war. Etwa 1/3 der Patienten mit milder/moderater Kardiomyopathie ließen sich identifizieren, wenn die untere Nachweisgrenze

des Assays als cut off gewählt wurde.

Wiederum hatten einige wenige Patienten der Latenz-Gruppe und der Megakolon-Gruppe cTnT-Werte über dem gewählten cut off, was wiederum als Zeichen von bisher nicht erkannter Herzschädigung gewertet werden könnte. Werden NT-proBNP- und cTnT-Bestimmung kombiniert, lässt sich der Anteil an Marker-positiven Patienten insbesondere in der Latenz- und Megakolon-Gruppe steigern.

DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Die von uns beschriebenen unterschiedlichen AAK-Muster bei Chagas-Kardiomyopathie und Megakolon und der Nachweis derartiger Muster bereits in der asymptomatischen Phase der Erkrankung stützen die Autoimmunhypothese der symptomatischen Chagas-Erkrankung.

Das gezeigte Auftreten von AAK-Mustern bei ca. 30 % der Patienten in der asymptomatischen Phase steht in guter Übereinstimmung mit epidemiologischen Daten, die belegen, dass 30 % der mit *Trypanosoma cruzi* infizierten Patienten eine symptomatische Chagas-Erkrankung entwickeln.

Mit Hilfe der beta1-AAK-Aktivität konnten wir die AAK positiven Patienten der asymptomatischen Phase zu ca. 85 % dem Kardiomyopathie-spezifischen Muster zuzuordnen, den Rest zum Megakolon-spezifischen Muster. Auch dies stimmt gut mit

den epidemiologischen Daten überein, nach denen der überwiegende Teil der symptomatisch werdenden Patienten eine Kardiomyopathie entwickelt, während nur ca. 10 % eine gastrointestinale Schädigung herausbilden.

Die Bestimmung des AAK-Musters in den asymptomatischen Patienten könnte damit eine Möglichkeit darstellen, die Patienten mit dem Risiko für die Entwicklung von Kardiomyopathie und Megakolon zu identifizieren und so frühzeitig in Kontrollprogramme einzuschließen.

Zukünftig muss die Validität dieses von uns postulierten Konzeptes in prospektiven Studien geprüft werden.

Die Ergebnisse zu den Entzündungsmarkern weisen auf die Kardiomyopathie als die Chagas-Manifestation hin, bei der eine entzündliche Komponente in der Pathogenese besonders deutlich sichtbar wird. Dies steht in Übereinstimmung mit einer Reihe bereits vorliegender Untersuchungen.

Mit Hilfe der Herzmarker NT-proBNP und cTnT konnte ein erheblicher Teil der Patienten, die wir aufgrund der EKG-Diagnostik der Gruppe mit milder/moderater Kardiomyopathie zugeordnet hatten, erkannt werden. Dies erscheint umso wichtiger, da in der Regel milde/moderate Kardiomyopathie nicht bekannt sind, da die logistischen und ökonomischen Bedingungen in Südamerika es gegenwärtig nicht zulassen, flächendeckend mittels EKG oder besser noch mittels Echokardiographie

T. cruzi infizierte Personen flächendeckend nach frühen Zeichen für eine Herzmanifestation der Chagas-Erkrankung zu untersuchen.

Die Bestimmung der Herzmarker zum Monitoring der Chagas-Patienten mit bekannter Kardiomyopathie stellt eine praktikable, der kosten- und personalintensiven Diagnostik mittels EKG und Echokardiographie überlegene Möglichkeit dar. Die klinisch-chemische Diagnostik und Verlaufsbeurteilung bei Chagas-Herzkrankung erlaubt eine für den Patienten kostengünstige dezentrale Probengewinnung in unmittelbarer örtlicher Nähe des Patienten (keine Reise zum Untersuchungsort) und ermöglicht eine gegenüber der üblichen kardiologischen Diagnostik hochstandardisierte und zentralisierte, damit qualitätsgesicherte und kostenminimierte Marker-Analytik in wenigen Zentren.

RESULTIERENDE PUBLIKATION:

Wallukat G, Muñoz Saravia SG, Haberland A, Bartel S, Araujo R, Valda G, Duchon D, Diaz Ramirez I, Borges AC, Schimke I. Distinct patterns of autoantibodies against G-protein-coupled receptors in Chagas' cardiomyopathy and megacolon. Their potential impact for early risk assessment in asymptomatic Chagas' patients. - J Am Coll Cardiol. 2010; 55(5):463-8

KONTAKTADRESSE:

SILVIA GILKA MUNOZ SARAVIA, Santa Barbara Hospital Sucre, Bolivien; Medizinischen Klinik (Kardiologie), Charité – Universitätsmedizin Berlin, Schumannstr. 20-21, 10098 Berlin, e-mail: ingolf.schimke@charite.de

Forschungsbericht

Verringerung unerwünschter Arzneimittelwirkungen bei der Verabreichung von Chemotherapeutika durch eine extrakorporale Elimination entsprechender Wirkstoffträger

Gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL

GERHARD PÜTZ, JÜRGEN ECKES, OLIVER SCHMAH, MARTIN J. HUG, KARL WINKLER und HEINRICH WIELAND. - Universitätsklinik Freiburg, Abteilung Klinische Chemie

ZUSAMMENFASSUNG

Anthrazykline sind hochwirksame, sehr toxische Chemotherapeutika. Die Verwendung von partikulären Wirkstoffträgern wie Liposomen gepaart mit einer gezielten Elimination der im Plasma zirkulierenden Wirkstoffträger zu einem therapeutisch günstigen Zeitpunkt könnte die Nebenwirkungen einer Chemotherapie deutlich verringern. Im ersten Abschnitt des Projektes wurden verschiedene Aphereseverfahren zur Elimination von Liposomen verglichen. Die Untersuchungen führten zur Auswahl der Kaskadenfiltration für die weiteren Untersuchungen. Im zweiten Projektabschnitt wurden Untersuchungen zur Sicherheit und Effizienz der Apherese in vitro und unter in vivo-Bedingungen durchgeführt. Die klinisch angewandte Kaskadenfiltration kann anhand dieser Versuche als effizient und sicher angesehen werden, um in einem therapeutischen Ansatz liposomale Wirkstoffträger bzw. liposomales Doxorubicin aus dem

Plasma zu entfernen. Diese Versuche legten den Grundstein für eine Übertragung des Projektes in die Klinische Phase, die derzeit im Rahmen einer Pilotstudie in Freiburg läuft.

HINTERGRUND

Anthrazykline sind hochwirksame, jedoch auch sehr toxische Chemotherapeutika. Ihrer hohen Wirksamkeit in der Bekämpfung von Neoplasien stehen die schwerwiegenden Nebenwirkungen gegenüber, die sowohl die Einzeldosis als auch die lebenslange Kumulativdosis der Anthrazykline begrenzen. Eine Möglichkeit, die akute und chronische Kardiotoxizität von Anthrazyklinen zu verringern, ist die Verwendung von lang zirkulierenden Liposomen. Liposomales Doxorubicin (Doxil®/Caelyx®) wird seit vielen Jahren in der Klinischen Praxis erfolgreich angewandt. Das in den Liposomen enthaltene Doxorubicin richtet jedoch weiterhin schwere Schäden im Organismus des Patienten an. Dosis limitierende unerwünschten Arzneimittelwirkungen

von liposomalem Doxorubicin sind schwere Hautschäden (palmar-plantare Erythrodysesthesie (PPE), auch Hand-Fuß-Syndrom genannt). Diese treten bei der empfohlenen Dosis von 50mg/m² alle 4 Wochen bei ca. 50 % aller Patienten auf.

Gewöhnlich erreicht nur ein sehr geringer Teil einer gegebenen Dosis tatsächlich das Zielgewebe, der weitaus überwiegende Teil des gegebenen Wirkstoffes findet sich in anderen Geweben wieder. Lang zirkulierende Liposomen reichern sich auf Grund der veränderten Endothelstruktur in den Blutgefäßen, die den Tumor versorgen, zu einem gewissen Teil (ca. 0,3-3,6 % der initialen Gesamtdosis) im Tumorgewebe an. Diese Anreicherung im Tumorgewebe, „enhanced permeation and retention effect“ genannt, 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. 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. Das Projekt CARL (Controlled application and removal of liposomal therapeutics) untersucht die Möglichkeit, durch eine gezielte extrakorporale Elimination liposomale Chemotherapeutika aus dem Plasma des Patienten zu entfernen. Eine Möglichkeit, die 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.

UNTERSUCHUNGEN ZU DEN VERSCHIEDENEN APHERESEVERFAHREN

Im Rahmen des ersten Projektabschnittes wurden die verschiedenen Apheresetechniken bezüglich ihrer Interaktion mit Modellliposomen im Detail untersucht. Die Elimination von partikulären Wirkstoffträgern nach dem Prinzip der Kaskadenfiltration ist prinzipiell für Partikel entsprechender Größe unabhängig von deren Ladung oder Komposition gut durchführbar. Bei der Verwendung von Liposomen kann es zu einer filtrationsbedingten Freisetzung von verkapselten Inhaltsstoffen kommen. Eine mögliche Freisetzung von Inhaltsstoffen sollt jedoch für die jeweilige Kombination aus Wirkstoffträger und Apherese-system überprüft werden.

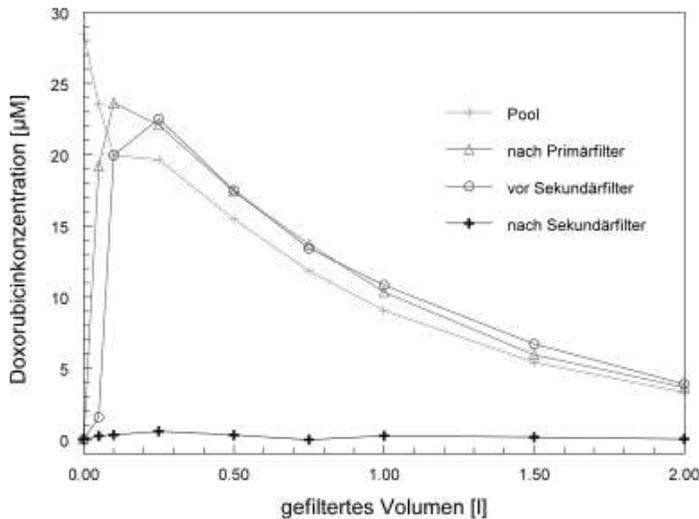
Eine extrakorporale Elimination von partikulären Wirkstoffträgern durch Präzipitationsverfahren erscheint wenig ratsam.

Neben der Notwendigkeit einer zumindest induzierbaren positiven Nettoladung verringert die Wechselwirkung mit Plasmakomponenten die Präzipitationseffizienz. Darüber hinaus induziert die Präzipitation in wesentlich stärkerem Ausmaß die Freisetzung von verkapseltem Material als eine vergleichbare Filtration der Partikel.

Auch eine extrakorporale Elimination von partikulären Wirkstoffträgern durch die klinisch eingesetzten Adsorptionsverfahren erscheint wenig sinnvoll, da die

Adsorptions-effizienz für Liposomen zumindest unter den untersuchten Bedingungen sehr gering war.

Grundsätzlich scheint auf der Grundlage der bisher durchgeführten Experimente das Filtrationsprinzip für die extrakorporale Elimination von partikulären und insbesondere von liposomalen Wirkstoffträgern sehr gut geeignet. Deshalb wurden die im nächsten Abschnitt des Projektes durchgeführten Untersuchungen an Filtrationsverfahren durchgeführt.



Elimination von liposomalem Doxorubicin durch eine Kaskadenfiltration. Liposomales Doxorubicin (8,5 ml Caelyx®) wurde mit 2 l einer Pufferlösung vermischt. Für die Kaskadenfiltration wurde ein therapeutisch eingesetztes Apheresesystem (OctoNova, Diamed GmbH, Köln) verwendet. Das System bestand aus einem Primärfilter (OP-02) zur Trennung von Blutzellen und Plasma und einem Sekundärfilter (EC-50), in dem die partikulären Bestandteile zurückgehalten werden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden vor und nach den Filtern Proben entnommen und auf ihren Doxorubicingehalt untersucht.

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANWENDBARKEIT VON THERAPEUTISCH EINGESETZTEN LIPOSOMEN UND APHERESEVERFAHREN

Die Untersuchungen im 2. Projektabschnitt wurden als Vorbereitung auf eine klinische Anwendung des zu Grunde liegenden Prinzips („Kinetisches Targeting“) durchgeführt. Deshalb wurden schwerpunktmäßig bereits zugelassene Apheresesysteme und in der Krebstherapie verwendete Liposomen untersucht. Da pegyliertes liposomales Doxorubicin (PLD) klinisch die weitaus größte Bedeutung hat, wurde Doxil®/Caelyx® für die Untersuchungen verwendet. Seitens der Apheresesysteme wurden 2 Doppelmanbranfiltrationssysteme untersucht (Diamed/Asahi-Kasei und Infomed/Kawasumi).

In einem einfachen Versuchsaufbau wurde die Filtrierbarkeit von PLD untersucht. PLD ist gut filtrierbar und zeigt unter den verwendeten Bedingungen keine Freisetzung von Doxorubicin. Da für die Beurteilung der Sicherheit einer klinischen Apherese detaillierte Kenntnisse über das Filtrationsverhalten von PLD bei erhöhten Drücken notwendig sind, wurde dieses eingehend untersucht. Zur Untersuchung wurden die Unterschiede im Fluoreszenzspektrum von freiem und verkapseltem Doxorubicin ausgenutzt. Bei Drücken ab ~1500 mbar kann PLD (ca. 85 nm Durchmesser) durch Membranen mit einem Ausschlussvolumen von 500 kD (abgeschätzt ca. 15 nm Porendurchmesser) gepresst werden, ohne dass es zu einer Freisetzung

von verkapseltem Doxorubicin kommt. Erst bei der Verwendung von Membranen mit kleineren Poren (100 kD Ausschlussvolumen bzw. abgeschätzt ca. 8 nm Porendurchmesser) und höheren Drücken (~2000 mbar) kommt es zu einer Freisetzung von Doxorubicin. Der Porendurchmesser der bei der Apherese verwendeten Filter liegt bei ca. 20 nm. Bei der therapeutischen Apherese wird der Druck im Sekundärfilter laufend geprüft, er sollte bei normalen Einstellungen nicht über 400 mbar ansteigen. Auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse ist demnach unter normalen Apheresebedingungen nicht mit einer induzierten Freisetzung von Doxorubicin während der Filtration zu rechnen.

Die Untersuchungen an therapeutisch eingesetzten Apheresesystemen mussten wegen der Größe der kommerziellen Filter mit entsprechend großen Volumina durchgeführt werden. In einer ersten Versuchsreihe wurden Fluoreszenz markierte Modellliposomen verwendet, und es konnte gezeigt werden, dass die therapeutischen Systeme die Liposomen mit hoher Effizienz entfernen. Die Liposomen werden praktisch vollständig im Lipidfilter zurückgehalten. Verkapselter Marker wird nur in minimalen Mengen freigesetzt. Bei der Verwendung von PLD wurde eine gleichfalls hohe Eliminationseffizienz gefunden. Eine Freisetzung von Doxorubicin fand im Rahmen der Detektionsgrenzen nicht statt. Um die klinische Situation abzubilden, wurden neben den Versuchen mit

Pufferlösungen Versuche mit rekonstituiertem humanem Blut durchgeführt.

Für diese Versuche wurden aus ethischen Gründen nur bereits abgelaufenen Blutkonserven (Erythrozytenkonzentrat und frisch eingefrorenes Humanplasma) verwendet. In einem klinischen Einsatz wird die Apherese vorrausichtlich ca. 36-48 h nach der Gabe des liposomalen Therapeutikums erfolgen. Aus diesem Grund wurde das in den Experimenten verwendete Caelyx vor dem Experiment 48 h lang bei 37 °C mit frischem Humanplasma versetzt. Auch in diesen Experimenten zeigten die untersuchten Aphereseverfahren eine gute Eliminationseffizienz. Allerdings zeigte der Plasmafilter (Primärfilter) eine geringere Durchtrittseffizienz (Ca.60-80%) für die Liposomen. Dies ist vermutlich auf die moderate Qualität der verwendeten Blutprodukte zurückzuführen. Im Lipidfilter (Sekundärfilter) fand weiterhin eine vollständige Elimination der in den Sekundärkreislauf gelangenden Liposomen statt. Eine Freisetzung von Doxorubicin wurde auch in diesen Versuchen nicht beobachtet.

Grundsätzlich kann die extrakorporale Elimination von therapeutisch eingesetztem liposomalem Doxorubicin (Doxil®/Caelyx®) somit als effizient und sicher angesehen werden.

AUSBLICK

Die mit Hilfe der gewährten Mittel durchgeführten Untersuchungen zur Sicherheit und Effizienz der Apherese in vitro legten den Grundstein für eine Übertragung des Projektes in die Klinische Phase. Derzeit läuft eine Pilotstudie in Freiburg, in der Patientinnen mit Brustkrebs und Caelyx-Therapie zusätzlich mit einer Apherese behandelt werden. Auch in der klinischen Situation kann die extrakorporale Elimination von liposomalem Doxorubicin bisher als effizient und sicher angesehen werden. Bis dato trat bei vergleichbarer Wirkung bei keiner der behandelten Patientinnen eine Hauttoxizität auf, während die Wahrscheinlichkeit für diese teilweise Dosis limitierende Nebenwirkung bei normal behandelten Patientinnen bei etwa 50 % liegt. Nach Abschluss der Pilotstudie ist die Erprobung des Einsatzes einer Apherese zur gezielten Wirkstoffentfernung in der Chemotherapie an einem größeren Patientenkollektiv geplant.

DANKSAGUNG

Frau Sibylle Rall und Frau Manuela Groß gebührt unser Dank für die fachkundige Umsetzung unserer Ideen in die Praxis. Der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gebührt unser Dank für die großzügige finanzielle Unterstützung des Projekts.

RESULTIERENDE PUBLIKATION:

Pütz G, Eckes J, Schmah O, Winkler K, Wieland H. Elimination of liposomes by different separation principles used in low-density lipoprotein apheresis. *Ther Apher Dial.* 2008;12(1):2-12.

KONTAKTANSCHRIFT:

DR. GERHARD PÜTZ
Universitätsklinik Freiburg
Abteilung Klinische Chemie
Hugstetterstr. 55
79106 Freiburg
e-mail: gerhard.puetz@uniklinik-freiburg.de

ZITIERTE LITERATUR:

1. Gabizon A. A. (2001) Pegylated Liposomal Doxorubicin: Metamorphosis of an old Drug into a New Form of Chemotherapy, *Cancer Investigation* 19(4), 424-436
2. Lorusso D, Di Stefano A, Carone V, Fagotti A, Pisconti S, Scambia G. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Ann Oncol* 2007;18:1159-64.
3. Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, et al. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 2001;7:243-54.
4. Charrois GJR, Allen TM. Multiple injections of pegylated liposomal doxorubicin: pharmacokinetics and therapeutic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306(3):1058-67.
5. Pütz G, Eckes J, Schmah O, Winkler K, Wieland H. Elimination of liposomes by different separation principles used in LDL-apheresis, *Ther. Apher.* 12(1) (2008) 2-12.
6. G. Putz, O. Schmah, J. Eckes, M.J. Hug, K. Winkler, Controlled Application and scheduled Removal of Nanoparticle based Chemotherapeutics (CARL) will reduce Dose Limiting Adverse Events in Anticancer Chemotherapy, *Med. Hypotheses* 72 (2009) 393-397.

Forschungsbericht

Diagnostischer Wert der Serum CTGF/CCN2 Konzentrationen und einzelner CTGF-Genpolymorphismen bei fibrotischen Lebererkrankungen: Erkenntnisse aus einem geförderten Projekt der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL

EVGENIA KOVALENKO und RALF WEISKIRCHEN, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Aachen

EINLEITUNG

Der Connective Tissue Growth Factor (CTGF) ist ein cysteinreiches Protein, das aus 349 Aminosäuren besteht. Er gehört zu einer konservierten Proteinfamilie, denen zahlreiche wichtige biologische Funktionen zugeordnet werden. Prototypische und zugleich namensgebende Mitglieder dieser so genannten CCN Proteinfamilie sind das cysteinreiche Protein 61 (CYR61), CTGF und das Nephroblastoma-Overexpressed Protein (NOV). Für sie charakteristisch ist ihr modularer Aufbau, in der eine N-terminale Signalsequenz, eine Insulin like Growth Factor bindende Domäne, eine von Willebrand Faktor Typ C Domäne, eine Thrombospondin Typ 1 Domäne und ein C-terminal gelegenes Cystein-Knotenmotiv aufeinander folgen. Neuere Arbeiten zeigen, dass eine veränderte Expression und Sekretion einzelner CCN Proteine ursächlich bei der Entstehung und

Vermittlung einzelner Krankheiten beteiligt ist. Daher könnten diese Proteine prinzipiell als diagnostische Indikatoren genutzt werden. So lassen Arbeiten unterschiedlicher Arbeitsgruppen vermuten, dass die Konzentration von CTGF im Serum insbesondere zur Erfassung fibrosierender Erkrankungen genutzt werden könnte. Weiterhin wird angenommen, dass einzelne Genpolymorphismen innerhalb des CTGF Gens zu einem veränderten Reaktionsmuster bei der Entstehung fibrosierender Erkrankungen führen.

In diesem Beitrag soll diskutiert werden, ob CTGF ein Surrogatmarker der Leberfibrose ist und ob genetische Polymorphismen- oder Haplotypen-Untersuchungen des humanen CTGF Gens geeignet sind, um Prädispositionen für fibrosierende Lebererkrankungen zu diagnostizieren.

STRUKTUR, FUNKTION UND REGULATION VON CTGF

CTGF wurde erstmalig im Jahre 1991 im Überstand kultivierter humaner Endothelzellen nachgewiesen [1]. In späteren Analysen konnte die Expression in anderen Zellen mesodermalen sowie epidermalen Ursprungs nachgewiesen werden [2]. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten und einer hohen Sequenzidentität wird CTGF der CCN-Proteinfamilie zugeordnet, wobei sich die Bezeichnung CCN von den Abkürzungen der drei erstbeschriebenen Proteine (Cyr61, CTGF, NOV) dieser Gruppe ableitet. Inzwischen umfasst die CCN Familie insgesamt sechs Mitglieder CCN1/Cyr61, CCN2/CTGF, CCN3/NOV, CCN4/WISP-1, CCN5/WISP-2 und CCN6/WISP-3, die nach der neueren Konvention durchnummeriert werden [3]. Sie alle sind sezernierte, mit der extrazellulären Matrix assoziierte Proteine, die wichtige Funktionen bei der Steuerung von Adhäsion, Migration, Mitogenese, Differenzierung und Regulation von Apoptose übernehmen [4]. Neuere Befunde deuten zudem daraufhin, dass CTGF an der Regulation von epidermalen-mesenchymalen Transitionen beteiligt ist [5], einem Prozess der die phänotypische Umwandlung von epithelialen zu fibroblasten-ähnlichen Zellen beschreibt.

Das humane CTGF-Gen besitzt insgesamt 5 Exons, die eine nur kurze etwa 3,2 kbp umfassende Region umspannen und für ein 38-kD Protein aus insgesamt 349

Aminosäuren kodieren. Die genaue Position des CTGF-Genlokus konnte durch eine kombinierte Analyse von somatischen Mausemensch-Zellhybriden sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) festgelegt werden und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 6 in der Subregion q23.1 [6]. Wie andere CCN Proteine besitzt CTGF fünf charakteristische Sequenzmotive [7, 8]: (i) ein N-terminales Signalpeptid, (ii) eine Insulin-like Growth Factor bindende Domäne, (iii) eine von Willebrand Faktor Typ 1C Sequenzrepetition, (iv) eine Thrombospondin Typ 1 Repetition, sowie (v) ein C-terminal gelegenes Cystein Knotenmotiv. Interessanterweise werden die einzelnen Motive durch je ein Exon des CTGF Gens codiert. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass dieses Protein während der Evolution durch Exon shuffling hervorgegangen ist. Die einzelnen Regionen zwischen diesen Proteindomänen sind gegenüber Proteolyse stark anfällig, was zur Bildung stabiler, bioaktiver Bruchstücke mit reduzierten Molekulargewichten führt [9], die sich in den verschiedenen Körperflüssigkeiten nachweisen lassen [10]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humanes CTGF im Vergleich zu dem anderer Spezies glykosyliert ist, was jedoch dessen funktionelle Eigenschaften nicht beeinflusst [11].

Der CTGF Promoter trägt eine hohe Dichte möglicher Bindungsstellen für diverse Transkriptionsfaktoren, die prinzipiell eine

Vielzahl differenzieller Regulationen vermitteln können. Obwohl die funktionelle Signifikanz entsprechender Bindungsstellen für die CTGF Expression noch nicht völlig verstanden ist, besteht in vielen Zelltypen eine direkte Abhängigkeit von dem Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Ein im Jahre 1996 beschriebenes TGF- β responsives Sequenzelement soll die Basalaktivität des CTGF Gens vermitteln [7]. Spätere Analysen haben weitergehend gezeigt, dass diese Bindungsstelle unabhängig von den Transkriptionsfaktoren AP-1, CREB und Sp1 die beschriebene basale Expression vermittelt [12]. Ebenso konnte ein Smad-Bindungsselement identifiziert werden, das direkt durch TGF- β stimuliert wird und die Voraussetzung für die Aktivierbarkeit des CTGF Gens durch dieses Zytokin ist [13]. Interessanterweise ist die Funktion einiger Bindungsstellen streng zelltypabhängig. So ist z. B. eine Sp1 Bindungsstelle in Fibroblasten der Haut für die basale CTGF Transkription notwendig, wohingegen in anderen Zellen keine Abhängigkeit von diesem Bindungsmotiv besteht [14].

Neben den bekannten Aktivatoren wurden auch CTGF Suppressoren wie der Wilms Tumor Suppressor (WT1), der durch Bindung an ein „Nicht-WT1-Konsensussequenz“ innerhalb des Promoters die Transkription des CTGF Gens inhibiert, identifiziert [15]. Ebenso ist eine posttranslationale Regulation der CTGF Expression beschrieben. In der 3'-untranslatierten Region der ~2.4 kb langen

CTGF mRNA liegen negativ regulierte cis-Elemente, die ähnlich wie AT-reiche Regionen auf die Stabilität der gebildeten RNA Einfluss nehmen [16].

CTGF ALS PROFIBROGENER MARKER

Es ist verständlich, dass die Vielzahl dieser Regulationsmechanismen zu einer komplexen Gesamtregulation des CTGF Gens führen. Insbesondere die Assoziation mit dem profibrogenen Wachstumsfaktor TGF- β hat vermuten lassen, dass das CTGF Protein ein guter Parameter zur Erfassung TGF- β -getriebener Erkrankungen darstellen könnte. Im Rahmen von fibrosierenden Erkrankungen der Haut und Niere liegt eine erhöhte CTGF Expression in aktivierten Fibroblasten (Myofibroblasten) vor, die mit einer exzessiven Produktion extrazellulärer Matrix in Verbindung steht [17]. Gleichmaßen findet man in atherosklerotischen Läsionen eine gesteigerte CTGF Expression [18]. Es ist jedoch derzeit völlig unklar, welche regulatorischen Mechanismen zu der beobachteten Veränderung der Expression führen und welche Funktionen CTGF für die Pathogenese der entsprechenden Krankheiten besitzt. Es ist jedoch sicher, dass die multimodulare Architektur des CTGF ein breites Spektrum verschiedener Proteinwechselwirkungen erlaubt [19]. Es konnte gezeigt werden, dass CTGF mit einzelnen Signalmolekülen, extrazellulären Matrixproteinen, verschiedenen Rezeptoren, Kalziumbindenden Proteinen,

Ionenkanälen und einer Fülle von Zytokinen physikalisch interagiert und deren biologische Aktivität verändern kann. Die Bindung von CTGF an das Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) z. B. bewirkt dessen biologische Inaktivierung. Umgekehrt ist beschrieben, dass die Bindung an TGF- β 1 dessen Affinität zur Bindung spezifischer, Signal-auslösender Rezeptoren erhöht [20]. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass CTGF ein wichtiger extrazellulärer Modulator der Signalvermittlung des TGF- β darstellt. Frühere Analysen haben zudem gezeigt, dass die CTGF Expression selber durch TGF- β 1 stimuliert wird. Dies wurde mit der Erhöhung der CTGF Expression in fibrosierenden Lebererkrankungen in Verbindung gebracht.

In hepatischen Sternzellen (HSC), dem profibrogenen Zelltyp der Leber, konnte weiterhin belegt werden, dass auch der Platelet-derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) indirekt über TGF- β eine Expressionssteigerung von CTGF induziert. In dem postulierten Mechanismus soll PDGF-BB zunächst die Expression von TGF- β 1 induzieren, dass dann in der Folge die Expression von CTGF steigert [21, 22]. Es ist beschrieben, dass die Expression von CTGF auf RNA- und Proteinebene im Rahmen der zellulären Aktivierung von HSC drastisch gesteigert wird und mit der Induktion der Kollagensynthese korreliert [22, 23]. Gleichzeitig nimmt auch die CTGF Expression in Hepatozyten im Rahmen entzündlicher und fibrosierender

Prozesse stark zu [24].

Aufgrund der beobachteten Korrelation von CTGF und dem Auftreten fibrosierender Organerkrankungen ist es daher sehr wahrscheinlich, dass eine erhöhte CTGF Konzentration als genereller Surrogat-Marker fibrosierender Krankheiten angesehen werden kann. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde eine Zunahme der CTGF Konzentration im Plasma, Serum und Urin bei fibrosierenden Hauterkrankungen, pulmonalen Fibrosen und diversen Nephropathien beschrieben [25-27].

CTGF MESSUNGEN UND KLINISCHER WERT BEI LEBERERKRANKUNGEN

In fast allen Studien, in denen die CTGF Konzentration beschrieben wird, wurden meist selbst gefertigte (in-house) ELISA- oder semiquantitative Westernblot-Verfahren zur Quantifizierung von CTGF verwendet. Diese Methoden sind zwar qualitativ geeignet um CTGF zu erfassen, aber genügen nicht den notwendigen strengen Ansprüchen an eine standardisierte klinisch-chemische Verfahrenstechnologie zur routinefähigen Proteinbestimmung. Viele dieser Studien beinhalten zudem nur kleine Fallzahlen, sodass die Generalisierung der erhobenen Befunde nicht zwingend ist. Daher haben wir uns in einem durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin geförderten

Forschungsprojektes u. a. mit der Etablierung eines geeigneten Messverfahrens zur CTGF Messung beschäftigt. Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein CTGF Sandwich ELISA, der eine inter- und intra-Assay Impräzision von 8.7 bzw. 12% (134 µg/L) besitzt [28]. Im Rahmen der Arbeiten wurde dieser ELISA weiterentwickelt und in eine Form gebracht, der eine zuverlässige Messung von CTGF aus Serum erlaubt [29]. In dem Test werden die Analyseplatten zunächst mit einem monoklonalen Maus IgG Antikörper, der gegen humanes CTGF gerichtet ist, beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen werden geblockt und die zur Messung vorgesehenen Proben für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

In einem zweiten Schritt wird eingefangenes CTGF mit einem polyklonalen Antiserum gegen humanes CTGF aus der Ziege inkubiert und das Signal über ein polyklonales IgG aus dem Kaninchen amplifiziert und in der Folge mit einem biotinylierten Schweine-anti-Kaninchen Antikörper und einem Streptavidin-HRP-Konjugat mittels kolorimetrischer Messung bestimmt [29]. Die inter- und intra-Assay Ungenauigkeit des erstellten ELISAs beträgt 5.9 % (100 µg/L)/ 6.1 % (40 µg/L) bzw. 7.4 % (100 µg/L)/ 8.3 % (40 µg/L). Die Nachweisgrenze des entsprechenden Tests für CTGF liegt bei 0.9 µg/L.

Die geeigneten Kontrollen für diesen ELISA müssen derzeit noch käuflich erworben

werden, doch ist geplant diese demnächst über rekombinante Expressionstechnologie zu erzeugen. Dazu wurden bereits adeno-virale Expressionsvektoren generiert, die genutzt werden können, um eine hohe heterologe CTGF Expression aus Mensch, Ratte und Maus zu ermöglichen. Ebenso wurden stabile Zellklone etabliert, die eine hohe CTGF Expression steuern und als Ausgangspunkt zur Reinigung großer Mengen von rekombinantem Protein genutzt werden können. Entsprechende Reinigungsprotokolle, die die Affinität zu Heparin [30] sowie andere physikalische Eigenschaften des CTGF ausnutzen, wurden bereits erfolgreich im Labor etabliert (Wilhelm Bohr, Evgenia Kovalenko und Ralf Weiskirchen, unveröffentlicht, siehe Abb.1, Seite 37).

Der klinischen Wert der CTGF Messung wurde in einer großen Anzahl von Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion (n = 138) und einer getrennten Patientenkohorte mit diversen anderen Lebererkrankungen (n = 129) sowie entsprechenden Kontrollprobanden analysiert [29]. In diesen Analysen zeigte sich, dass die CTGF Messung geeignet ist, um fibrosierende Lebererkrankungen zu identifizieren und zudem mit der histologischen Aktivität der Erkrankung korreliert. Detaillierte statistische Analysen zeigten weiter, dass sich die CTGF Messung insbesondere dazu eignet um den Krankheitsverlauf bei Patienten mit HCV Infektion zu erkennen und Aussagen über die

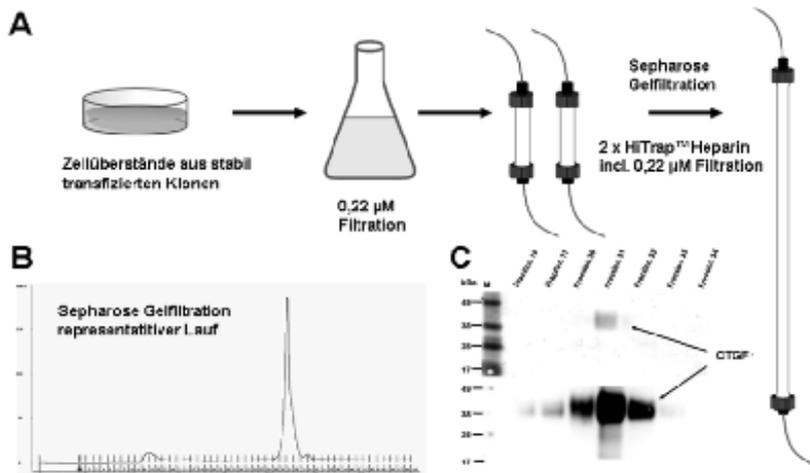


Abb. 1: Rekombinante Expression und Reinigung von humanem CTGF. (A) Als Ausgangsquelle für humanes CTGF wurden HEK-293 Zellen etabliert, die humanes CTGF stabil überexprimieren. Konditioniertes Medium dieser Zellen enthält große Mengen des sezernierten CCN Proteins. Um das rekombinante Protein zu gewinnen, wird das Medium zunächst filtriert, zweimal über eine Heparinsäule gegeben und anschließend über Gelfiltration zur Homogenität aufgereinigt. (B) Chromatogramm eines repräsentativen Gelfiltrationslaufes zur Reinigung von humanem CTGF. (C) Westernblot-Analyse des gereinigten CTGF Proteins. Im oberen Teil ist eine Coomassie Färbung gezeigt, im unteren Teil der zugehörige Westernblot nach Detektion von CTGF. Das gereinigte Protein hat eine Größe von 38 kDa.

Prognose des Krankheitsgeschehens zu treffen.

SNPs, MUTATIONEN UND HAPLOTYPEN

Unzweifelhaft stellen Genpolymorphismen (SNPs) und Mutationen wichtige genetische Komponenten dar, die unmittelbar Einfluss auf Expression und Funktion eines Gens sowie seines Proteinproduktes haben können [31]. Es gibt zahlreiche Beispiele in der eine Mutation zu einem inaktiven Genprodukt

führt. Ähnlich führen Polymorphismen in Promotoren, Enhancer- oder Silencerelementen zu einer quantitativen Veränderung des Genproduktes. Neuere, weiterführende Assoziationsstudien haben zudem ergeben, dass es viele Polymorphismen gibt, die in Form von sog. Haplotypen vererbt werden, die während der Evolution mehr oder weniger konserviert wurden. Nach diesem Konzept ist es, vereinfacht dargestellt, vielmehr die Summe einzelner vererbter SNPs,

die zu einer Beeinträchtigung eines genetischen Merkmals führt als die Vererbung nur eines singulären SNPs. Jede einzelne Normvariante nimmt dabei nur geringen Einfluss auf die Ausprägung eines entsprechenden Merkmals. Falls bei einem Individuum multiple ungünstige Normvarianten gleichzeitig vorkommen, kann dies zum Beispiel zu einer insgesamt deutlich veränderten Expression des untersuchten Gens führen. Bezogen auf eine Gesamtpopulation haben die häufig vorkommenden klinisch niedrig penetranten Allele vermutlich einen wesentlich größeren Anteil an der Beeinflussung des genetischen Merkmals als seltene Allele mit hoher klinischer Penetranz.

Die in der Vergangenheit durchgeführten Studien zur Ermittlung von Kandidatengenen des Fibrosegeschehens gehen von der sog. „common disease / common variant“ Hypothese aus [32]. Nach dieser Hypothese wird das genetische Risiko für häufige und komplexe Erkrankungen durch genetische Normvarianten von Suszeptibilitätsgenen vermittelt, die mit einer gewissen Minimalwahrscheinlichkeit in der betrachteten Population vorkommen und in ihrer Gesamtheit den wesentlichen Anteil an genetischer Variation in einer Population ausmachen. Die meisten dieser Genvarianten resultieren aus Veränderungen eines einzelnen SNPs, von denen es vermutlich mehr als 107 im menschlichen Genom gibt [33]. Falls ein SNP mit einer erhöhten Suszeptibilität für

eine Erkrankung (oder auch veränderte Genexpression) assoziiert ist, dann ist diese Nukleotidveränderung, anders als bei den nach den Mendel'schen Regeln vererbten monogenen Erberkrankungen, weder notwendig noch hinreichend für das Auftreten der Erkrankung. Stattdessen vermitteln sie für den einzelnen Patienten nur eine geringe Erhöhung des relativen Risikos. Bezogen auf ein Individuum kann die Kombination mehrerer solcher ungünstiger Genvarianten zu einem deutlich erhöhten Erkrankungsrisiko führen.

Die Identifikation von Genvarianten, die eine Krankheitssuszeptibilität nach der „common disease/common variant“ Hypothese vermitteln, geschieht durch Assoziationsstudien [34]. Dabei wird üblicherweise die Frequenz einer genetischen Variante zwischen verschiedenen Gruppen verglichen, z.B. zwischen Patienten und gesunden Kontrollen in einer Fall-Kontroll-Studie, oder es wird ein quantitativ messbarer Phänotyp zwischen Individuen mit und ohne Genvariante verglichen. Eine Möglichkeit zur Analyse von Familien bietet der „transmission disequilibrium test“, bei dem die überzufällig häufige Vererbung assoziierter Haplotypen von den Eltern der Patienten auf die Patienten nachgewiesen wird [35, 36]. Notwendige Vorbedingung für solche Studien ist die Identifikation der Genvarianten in den Kandidatengenen, für die eine Beteiligung an der Krankheitsentstehung vermutet wird. Anschließend werden die Allelfrequenzen in Patienten und

Kontrollen bzw. in den Familien bestimmt. Der wesentliche Vorteil von Assoziationsstudien gegenüber genetischen Kopplungsanalysen liegt in der besseren Sensitivität für Effekte, die mit einem nur geringen relativen Risiko einhergehen, wie man sie nach der „common disease/common variant“ Hypothese erwartet [34-36]. Gegenüber der Verwendung einzelner SNPs führt die Verwendung von Haplotypen, der Kombination mehrerer SNPs, in genetischen Assoziationsstudien häufig zu einer höheren statistischen Aussagekraft [37, 38].

Im Rahmen des so genannten HapMap Projekts (siehe <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die Allelfrequenzen von über einer Millionen SNPs aus vielen verschiedenen Referenzpopulationen untersucht und öffentlich verfügbar gemacht. Aufgrund des im Genom vorhandenen Kopplungsungleichgewichts („linkage disequilibrium“) werden einander nahe gelegene SNPs häufig nicht unabhängig voneinander vererbt [39]. Das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichts für die einzelnen Referenzpopulationen kann aus den HapMap-Daten ersehen werden und stimmt gut mit ethnisch ähnlichen Populationen überein [40, 41]. Mit der Information über die Allelfrequenzen der SNPs und dem Kopplungsungleichgewicht zwischen einzelnen SNPs können für eine genetische Region durch spezielle Auswahlalgorithmen sog. „tag SNPs“ bestimmt werden. Ihre Anzahl ist oft deutlich kleiner als die Gesamtmenge

der SNPs, sie bilden aber die genetische Variabilität fast ohne Verluste ab [42]. Da für Assoziationsstudien dann üblicherweise nur die „tag SNPs“ bestimmt werden, führt dies zu einer drastischen Reduktion des Arbeitsaufwandes bei gleichzeitig nur geringem Informationsverlust.

CTGF-HAPLOTYPENANALYSE

Man kennt heute eine Vielzahl von Polymorphismen innerhalb des humanen CTGF Gens [43] aber keine aussagekräftigen Assoziationsstudien, die diese Genvarianten mit der Expression dieses Gens korrelieren. Aus verschiedenen Studien weiß man jedoch, dass keiner der bereits bekannten Polymorphismen mit dem Auftreten diabetischer Nephropathien [44] oder der Fibrosierung/Kalzifizierung von Herzklappen [45, 46] assoziiert ist. Insbesondere der Polymorphismus an der Position -945 und seine Verwicklung bei der Entstehung der systemischen Sklerose wird derzeit heftig und kontrovers diskutiert [47, 48]. Es ist zudem Tatsache, dass die bisher durchgeführten genetischen Assoziationsstudien erhebliche methodische Schwächen bei der Erhebung und Analyse der Genotypen besitzen. In den bisherigen Studien wurden nur einzelne SNPs aber keine Haplotypen analysiert. Weiterhin konzentrieren sich alle Studien auf SNPs in den Exons oder in Exon-nahen Bereichen der Introns. Hintergrund ist vermutlich die Annahme, dass SNPs, die die Aminosäuresequenz

oder das Spleißverhalten beeinflussen, eher funktionell wirksame Varianten eines Gens darstellen. Die 5' gelegenen regulativen Sequenzen wurden praktisch bisher nicht berücksichtigt. Wesentlich sinnvoller für die Analyse wäre ein Ansatz, in dem die gesamte bekannte genomische Variabilität für einen Genlocus untersucht wird. Ein SNP, der mit einem bestimmten Phänotyp assoziiert ist, muss nicht notwendig selber funktionell wirksam sein. Falls dieser SNP in einem Kopplungsungleichgewicht mit z.B. einem einzelnen funktionell wirksamen SNP ist, markiert er den Phänotyp ohne ihn selber zu verursachen [35, 36]. Eine weitere methodische Schwäche, die in vielen Studien vorhanden ist, ist die Analyse von SNPs, bei denen das weniger häufige Allel mit einer Frequenz von deutlich weniger als 10% vorhanden ist. Die Frequenzen dieser Allele sind sehr anfällig für normale statische Schwankungen, die eine nicht-vorhandene Assoziation suggerieren können [35]. Zusammenfassend sind daher die bis dato durchgeführten genetischen Assoziationsstudien, nach heutigem Stand der Forschung, nur unzureichend um eine mögliche Assoziation des CTGF-Gens mit Erkrankungen nachzuweisen.

Daher haben wir uns entschieden eine gezielte Haplotypenanalyse für das humane CTGF Gen durchzuführen und die Frage zu bearbeiten, ob die von uns in der Folge definierten Haplotypen als mögliche neue

Marker genutzt werden können, um eine Aussage über die Progression fibrosierender Lebererkrankungen zu machen [29].

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass sich das auf Chromosom 6 befindliche CTGF Gen durch sechs Polymorphismen (rs6917644, rs9399005, rs6918698, rs9493150, rs2151532 und rs11966728) abbilden lässt (siehe Abb.2).

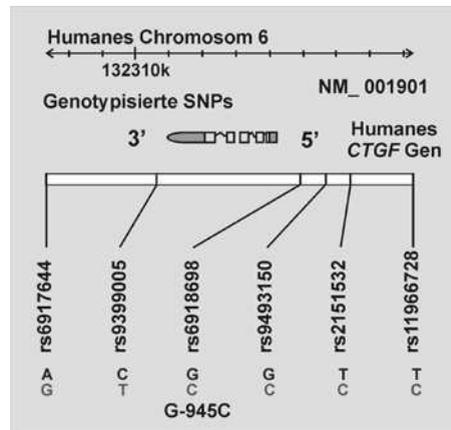


Abb. 2: CTGF-Haplotypen Analyse. Das humane CTGF Gen (NM_001901) ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert und beinhaltet fünf Exons. Der gesamte Genlocus umfasst einen Sequenzbereich von etwa 3 kbp. Die sechs Polymorphismen rs6917644, rs9399005, rs6918698, rs9493150, rs2151532 und rs11966728 umspannen den kompletten CTGF Genlocus.

In der Folge haben wir getestet, ob einzelne, dieser von uns definierten populations-spezifischen Haplotypen mit der Schwere

oder der Progressionsrate einer HCV induzierten Leberfibrose assoziiert sind. Dazu haben wir in einem großen Kollektiv von insgesamt 365 HCV erkrankten Patienten (Durchschnittsalter 38 Jahre, Altersbereich von 16–60 Jahren, 241 Männer und 124 Frauen) genomische DNA isoliert und diese sechs varianten Stellen genotypisiert und zu den jeweiligen Krankheitsverläufen der Patienten korreliert. Die Analyse ergab, dass keiner dieser SNPs eine allelische Assoziation mit dem Schweregrad der hepatischen Fibrose besitzt. Da die sog. „Minor Allel Frequenzen“ der Marker in einem vernünftigen Bezug zu den im HapMap niedergelegten SNP Genfrequenzen standen, kann man davon ausgehen, dass das von uns gewählte Kollektiv aus statistischer Sicht geeignet ist, um solche aussagekräftigen Assoziationsdaten zu erheben. Es ist daher wahrscheinlich, dass die untersuchten CTGF Haplotypen keinen direkten Einfluss auf den Erkrankungsverlauf nehmen. Dies ist insofern interessant, da einer dieser Marker (rs6918698) in früheren umstrittenen Arbeiten als Marker für fibrosierende Erkrankungen der Lunge beschrieben wurde. Daher lässt sich vermuten, dass die einzelnen CTGF Haplotypen entweder nur in einzelnen Populationen eine Aussagekraft besitzen oder dass sie nicht generell bei allen fibrosierenden Erkrankungen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen nehmen.

DER G-945C CTGF-PROMOTERPOLYMORPHISMUS

Es gibt kaum einen Polymorphismus, dessen Einfluss so kontrovers diskutiert wird wie der G-945C Polymorphismus innerhalb des CTGF Gens [45, 46]. Um abzuklären, ob dieser SNP (rs6918698) einen Einfluss auf die Transkriptionsrate von CTGF nimmt, haben wir in neueren, bisher nicht veröffentlichten Studien die beiden Varianten (G-945, C-945) umfassende Sequenzbereiche isoliert und in Reporterkonstrukte inkloniert und deren Einfluss auf die Transkriptionsrate in einer humanen hepatischen Sternzelllinie (LX-2) und einer humanen Hepatomzelllinie (HepG2) untersucht. Es ergab sich, dass der Reporter mit der -945G Variante in beiden Zelllinien eine signifikant höhere Aktivität entfaltet als die -945C Variante (Abb. 3).

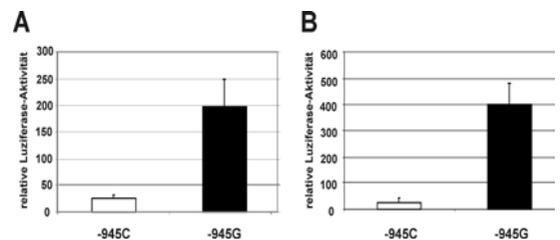


Abb. 3: Reporteragen-Assays. Die beiden CTGF-Varianten (-945C, -945G) wurden in LX-2 (A) bzw. HepG2 (B) transfiziert und die relative Luziferaseaktivität bestimmt. Deutlich zeigte sich, dass die -945G Variante in beiden Zelllinien eine höhere Aktivität besitzt.

Weitergehende Analysen haben zudem gezeigt, dass die Aktivität der beiden Konstrukte in unterschiedlichem Maße durch einzelne Zytokine moduliert wird und von dem jeweiligen Zellsystem abhängt, in dem die Untersuchungen durchgeführt werden. So lässt sich zwar die Aktivität beider Reportervarianten durch BMP-7, einem

Inhibitor der TGF- β Aktivität [49], in HepG2 Zellen deutlich inhibieren, wohingegen sie in LX-2 Zellen vollkommen unbeeinflusst bleibt (Abb. 4). Diese Befunde sind insofern wichtig, da sie noch einmal verdeutlichen, dass die Regulation des CTGF Gens sehr komplex und zudem Zelltyp-abhängig ist. (Abb.4)

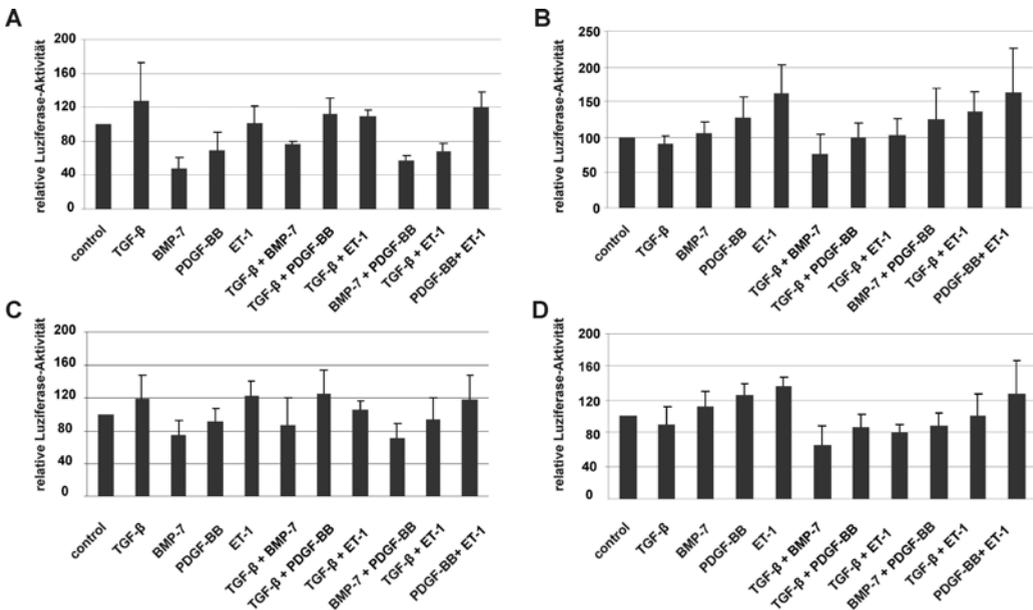


Abb. 4: Aktivität der CTGF-Reporter in Ko-Stimulationsexperimenten in LX-2 und HepG2 Zellen. HepG2 Zellen (A, C) und LX-2 Zellen (B, D) wurden mit dem -945G Reporter (A, B) oder dem -945C Reporter (C, D) transfiziert und mit den dargestellten Zytokinkombinationen behandelt. In HepG2 Zellen ist eine deutliche Suppression der -945G Luziferaseaktivität nach BMP-7 Stimulation zu beobachten. In LX-2 Zellen hat BMP-7 keinen messbaren Effekt auf die Aktivität der Reporter.

FAZIT

Im Rahmen des Projektes wurde ein ELISA Test für humanes CTGF erstellt. Aus unserer Sicht reichen die Erfahrungen, die wir mit diesem neuen Test gemacht haben aus, um die Aussage zu treffen, dass er den notwendigen strengen Ansprüchen an ein standardisiertes klinisch-chemisches Verfahren zur genauen und routinefähigen Bestimmung von CTGF durchaus genügt. Obwohl einzelne Polymorphismen des CTGF Gens, wie z. B. der G-945C Polymorphismus, Einfluss auf die Aktivität des Gens nehmen, konnten wir keine Assoziation mit fibrosierenden Erkrankungen der Leber nachweisen.

DANKSAGUNG

Unser besonderer Dank gilt der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin für die finanzielle Unterstützung des Projektes „Zur klinischen Bedeutung von Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) bei Lebererkrankungen: Quantifizierung von CTGF/CCN2 im Serum und Polymorphismusanalysen des CTGF-Gens bei posthepatischen fibrotischen Lebererkrankungen zur Abschätzung der fibrogenen Progressionsrate“. Mit einer Fördersumme von 80.000€ konnten in dem Förderungszeitraum von zwei Jahren insgesamt 5 Originalarbeiten, 2 Übersichtsartikel, 1 Handbuchartikel und 8 zitierbare Abstrakte erstellt werden.

ZITIERTE LITERATUR

1. Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L., Grotendorst, G.R. (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol.* 114:1285-1294.
2. Chaqour, B., Goppelt-Struebe, M. (2006) Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J.* 273:3639-3649.
3. Perbal, B. (2004) CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363:62-64.
4. Bleau, A.M., Planque, N., Perbal, B. (2005) CCN proteins and cancer: two to tango. *Front Biosci.* 10:998-1009.
5. Burns, W.C., Twigg, S.M., Forbes, J.M., Pete, J., Tikellis, C., Thallas-Bonke, V., Thomas, M.C., Cooper, M.E., Kantharidis, P. (2006) Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: Implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 17:2484-2494.
6. Martinerie, C., Viegas-Pequignot, E., Guenard, I., Dutrillaux, B., Nguyen, V.C., Bernheim, A., Perbal, B. (1991) Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene* 7:2529-2534.
7. Grotendorst, G.R., Okochi, H., Hayashi, N. (1996) A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ.* 7:469-480.

8. Lau, L.F., Lam, S.C. (1999) The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res.* 248:44-57.
9. Ball, D.K., Surveyor, G.A., Diehl, J.R., Steffen, C.L., Uzumcu, M., Mirando, M.A., Brigstock, D.R. (1998) Characterization of 16- to 20-kilodalton (kDa) connective tissue growth factors (CTGFs) and demonstration of proteolytic activity for 38-kDa CTGF in pig uterine luminal flushings. *Biol Reprod.* 59:828-835.
10. Yang, D.H., Kim, H.S., Wilson, E.M., Rosenfeld, R.G., Oh, Y. (1998) Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF- β in Hs578T human breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:2593-2596.
11. Kim, H.S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T. Jr, Rosenfeld, R.G. (1997) Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12981-12986.
12. Blom, I.E., Goldschmeding, R., Leask, A. (2002) Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol.* 21:473-482.
13. Holmes, A., Abraham, D.J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C.M., Leask, A. (2001) CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem.* 276:10594-10601.
14. Holmes, A., Abraham, D.J., Chen, Y., Denton, C., Shiwen, X., Black, C.M., Leask, A. (2003) Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem.* 278:41728-41733.
15. Stanhope-Baker, P., Williams, B.R. (2000) Identification of connective tissue growth factor as a target of WT1 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 275:38139-38150.
16. Kubota, S., Hattori, T., Nakanishi, T., Takigawa, M. (1999) Involvement of cis-acting repressive element(s) in the 3'-untranslated region of human connective tissue growth factor gene. *FEBS Lett.* 450:84-88.
17. Lorena, D., Uchio, K., Costa, A.M, Desmouliere, A. (2002) Normal scarring: importance of myofibroblasts. *Wound Repair Regen.* 10:86-92.
18. Cicha, I., Yilmaz, A., Klein, M., Raithel, D., Brigstock, D.R., Daniel, W.G., Goppelt-Struebe, M, Garlich, C.D. (2005) Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1008-1013.
19. Rachfal, A.W., Brigstock, D.R. (2003) Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatology Res.* 26:1-9.
20. Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., De Robertis, E.M. (2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nat Cell Biol.* 4:599-604.
21. Paradis, V., Dargere, D., Vidaud, M., De Gouville, A.C., Huet, S., Martinez, V., Gauthier, J.M., Ba, N., Sobesky, R., Ratzju, V., Bedossa, P. (1999) Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 30:968-976.
22. Paradis, V., Dargere, D., Bonvoust, F., Vidaud, M., Segarini, P., Bedossa, P. (2002) Effects and regula-

- tion of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest.* 82:767-774.
23. Sedlacek, N., Jia, J.D., Bauer, M., Herbst, H., Rühl, M., Hahn, E.G., Schuppan, D. (2001) Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 158:1239-1244.
24. Gressner, O.A., Lahme, B., Demirci, I., Gressner, A.M., Weiskirchen, R. (2007) Differential effects of TGF- β on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol.* 47:699-710.
25. Dziadzio, M., Usinger, W., Leask, A., Abraham, D., Black, C.M., Denton, C., Stratton, R. (2005) N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *QJM* 98:485-492.
26. Sato, S., Nagaoka, T., Hasegawa, M., Tamatani, T., Nakanishi, T., Takigawa, M., Takehara, K.. (2000) Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol.* 27:149-154.
27. Riser, B.L., Cortes, P., DeNichilo, M., Deshmukh, P.V., Chahal, P.S., Mohammed, A.K., Yee, J., Kahkonen, D. (2003) Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int.* 64:451-458.
28. Gressner, A.M., Yagmur, E., Lahme, B., Gressner, O., Stanzel, S. (2006) Connective tissue growth factor in serum as a new candidate test for assessment of hepatic fibrosis. *Clin Chem.* 52:1815-1817.
29. Kovalenko, E., Tacke, F., Gressner, O.A., Zimmermann, H., Lahme, B., Janetzko, A., Wiederholt, T., Berg, T., Müller, T., Trautwein, C., Gressner, A.M., Weiskirchen, R. (2009) Validation of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) and its gene polymorphisms as noninvasive biomarkers for the assessment of liver fibrosis. *J Viral Hepatitis* 16:612-620.
30. Brigstock, D.R., Steffen, C.L., Kim, G.Y., Vegunta, R.K., Diehl, J.R., Harding, P.A. (1997) Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem.* 272:20275-20282.
31. Sladek, R., Hudson, T.J.. (2006) Elucidating cis- and trans-regulatory variation using genetical genomics. *Trends Genet.* 22:245-250.
32. Lander, E.S. (1996) The new genomics: global views of biology. *Science* 274:536-539.
33. Kruglyak, L., Nickerson, D.A. (2001) Variation is the spice of life. *Nat Genet.* 27:234-236.
34. Cordell, H.J., Clayton, D.G. (2005) Genetic association studies. *Lancet* 366:1121-1131.
35. Cardon, L.R., Bell, J.I. (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet.* 2:91-99.
36. Rebbeck, T.R., Spitz, M., Wu, X. (2004) Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet.* 5:589-597.
37. de Bakker, P.I., Yelensky, R., Pe'er, I., Gabriel, S.B., Daly, M.J., Altshuler, D. (2005) Efficiency and power in genetic association studies. *Nat Genet.* 37:1217-1223.
38. Hillebrandt, S., Wasmuth, H.E., Weiskirchen, R., Hellerbrand, C., Keppeler, H., Werth, A., Schirin-Sokhan, R., Wilkens, G., Geier, A., Lorenzen, J., Kohl, J., Gressner, A.M., Matern, S., Lammert, F. (2005) Complement factor 5 is a quantitative trait gene that

- modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet.* 37:835-843.
39. Wall, J.D., Pritchard, J.K. (2003) Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 4:587-597.
 40. Altshuler, D., Brooks, L.D., Chakravarti, A., Collins, F.S., Daly, M.J., Donnelly, P. and the International HapMap Consortium. (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437:1299-1320.
 41. Ribas, G., Gonzalez-Neira, A., Salas, A., Milne, R.L., Vega, A., Carracedo, B., Gonzalez, E., Barroso, E., Fernandez, L.P., Yankilevich, P., Robledo, M., Carracedo, A., Benitez, J. (2005) Evaluating HapMap SNP data transferability in a large-scale genotyping project involving 175 cancer-associated genes. *Hum Genet.* 2:1-11.
 42. Stram, D.O. (2004) Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol.* 27:365-374.
 43. Blom, I.E., van Dijk, A.J., de Weger, R.A., Tilanus, M.G., Goldschmeding, R. (2001) Identification of human *ccn2* (connective tissue growth factor) promoter polymorphisms. *Mol Pathol.* 54:192-196.
 44. McKnight, A.J., Savage, D.A., Patterson, C.C., Brady, H.R., Maxwell, A.P. (2006) Resequencing of the characterised CTGF gene to identify novel or known variants, and analysis of their association with diabetic nephropathy. *J Hum Genet.* 51:383-386.
 45. Ortlepp, J.R., Schmitz, F., Mevissen, V., Weiss, S., Huster, J., Dronskowski, R., Langebartels, G., Autschbach, R., Zerres, K., Weber, C., Hanrath, P., Hoffmann, R. (2004) The amount of calcium-deficient hexagonal hydroxyapatite in aortic valves is influenced by gender and associated with genetic polymorphisms in patients with severe calcific aortic stenosis. *Eur Heart J.* 25:514-522.
 46. Ortlepp, J.R., Graf, J., Vesper, K., Schmitz, F., Mevissen, V., Sucigan, S., Kersten, A., Weber, C., Janssens, U. (2005) Relationship of five inflammatory gene polymorphisms with morbidity and mortality in 533 patients admitted to an ICU. *Inflammation* 29:1-7.
 47. Fonseca, C., Lindahl, G.E., Ponticos, M., Sestini, P., Renzoni, E.A., Holmes, A.M., Spagnolo, P., Pantelidis, P., Leoni, P., McHugh, N., Stock, C.J., Shi-Wen, X., Denton, C.P., Black, C.M., Welsh, K.I., du Bois, R.M., Abraham, D.J. (2007) A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 357:1210-1220.
 48. Rueda, B., Simeon, C., Hesselstrand, R., Herrick, A., Worthington, J., Ortego-Centeno, N., Riemekasten, G., Fonollosa, V., Vonk, M.C., van den Hoogen, F.H., Sanchez-Román, J., Aguirre-Zamorano, M.A., García-Portales, R., Pros, A., Camps, M.T., Gonzalez-Gay, M.A., Gonzalez-Escribano, M.F., Coenen, M.J., Lambert, N., Nelson, J.L., Radstake, T.R., Martin, J. (2009) A large multicentre analysis of CTGF -945 promoter polymorphism does not confirm association with systemic sclerosis susceptibility or phenotype. *Ann Rheum Dis.* 68:1618-1620.
 49. Weiskirchen, R., Meurer, S. K., Gressner, O. A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E., Gressner, A. M. (2009) BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front. Biosci.* 14:4992-5012.

ANGABEN ZU DEN VERFASSERN:

UNIV.-PROF. DR. RER. NAT.

RALF WEISKIRCHEN und

DR. MED. EVGENIA KOVALENKO

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Aachen, Pauwelsstr. 30, D-52074 Aachen, Tel.: 0241-8088683, Fax: 0241-8082512; E-Mail: rweiskirchen@ukaachen.de

RALF WEISKIRCHEN ist seit dem 1. August 2009 kommissarischer Leiter des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie des Klinisch-Chemisches Zentrallaboratoriums des Universitätsklinikums Aachen. Zudem leitet er das Lehr- und Forschungsgebiet „Molekulare Pathobiochemie und Experimentelle Gentherapie“. Schwerpunkt seiner wissenschaftlichen Tätigkeit ist die Erforschung molekularer und zellulärer Prozesse, die fibrosierenden Lebererkrankungen zugrunde liegen.

EVGENIA KOVALENKO wurde im Rahmen des Projektes finanziell aus Geldern der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin unterstützt. Im Rahmen des Projektes hat sie an dem RWTH Universitätsklinikum Aachen ihren medizinischen Dokortitel mit Auszeichnung (summa cum laude) erworben.

Dissertation

Polyphosphate – das natürliche Kaolin:

Warum sind Thrombozyten eigentlich prokoagulant?

Dissertation (Dr. rer. nat.) von FELICITAS MÜLLER am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Karolinska Institut, Stockholm (Leiter: Prof. Thomas Renné), in der Graduate School of Life Sciences, Würzburg, 2009

Die Blutgerinnung ist ein komplex regulierter Prozess, bei dem die Gefäßwand, Thrombozyten und plasmatische Gerinnungsfaktoren miteinander interagieren. Die plasmatische Gerinnung kann entweder durch den "extrinsischen" oder "intrinsischen" Weg gestartet werden und führt zur Bildung von Fibrin. Die extrinsische Blutgerinnung wird durch Tissue factor (TF, Gewebsthrombokinase) an Gefäßwandverletzungen initiiert. Die intrinsische Gerinnungskaskade wird durch Kontakt von Faktor XII (FXII, Hageman Faktor) mit negativ geladenen Oberflächen gestartet. Faktor XII, Plasmakallikrein und Kininogen bilden das Kontaktsystem. In vivo wird die Blutgerinnung durch die extrinsische Kaskade vermittelt, da ein Mangel an Tissue Factor zu einem erhöhtem Blutungsrisiko führt. Im Gegensatz dazu führt das Fehlen von Kontaktsystemfaktoren nicht zu einer erhöhten Blutungsneigung. Trotzdem wird die Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnung durch artifiziale, nicht-physiologische Materialien, wie Kaolin, Kieselerde (Celite) oder Ellagic

acid zum Starten der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) im Gerinnungslabor genutzt. Ein Mangel an Kontaktsystemfaktoren führt zu einer deutlichen Verlängerung der aPTT.

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Thrombose, der Blutstillung und bei Entzündungsprozessen. Schon seit Jahrzehnten war bekannt, dass die Aktivierung von Thrombozyten (z.B. durch Thrombin oder ADP) die Blutgerinnung fördern. Dies führte zum Konzept der "prokoagulanten Thrombozyten". Im Plasma, im Reagenzglas, können aktivierte Thrombozyten aber nur dann die Blutgerinnung beschleunigen, wenn Faktor XII anwesend ist. Das heißt, dass die prokoagulanten Eigenschaften von Thrombozyten über die Aktivierung von Faktor XII vermittelt werden. Da die intrinsische Gerinnung auf Thrombozyten gestartet wird und Faktor XII durch Kaolin aktiviert wird, haben wir uns die Frage gestellt, ob aktivierte Thrombozyten eventuell "etwas ähnliches wie Kaolin" sekretieren und so die Faktor XII-getriebene intrinsische

Blutgerinnungskaskade starten. Hat der klassische aPTT Assay ein Äquivalent im lebenden Menschen und für was kann die Aktivierung von Faktor XII in vivo wichtig sein?

Diese Fragen hat Frau FELICITAS MÜLLER im Rahmen ihrer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit bearbeitet.

Wir konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten Polyphosphate mit einer Kettenlänge von 60-100 Phosphatuntereinheiten sekretieren. Polyphosphate stellen langkettige lineare Polymere dar, deren einzelne Phosphatuntereinheiten wie im ATP durch Phosphorsäureesterbindungen verknüpft sind. Welche biologische Funktion haben

thrombozytäre Polyphosphate? Polyphosphate aktivieren die intrinsische Blutgerinnungskaskade im Plasma mit annähernd gleicher Aktivität wie Kaolin. Haben Polyphosphate auch Relevanz für die Fibrinbildung in vivo? Diese Frage haben wir mittels eines Lungenembolie-Modells an genetisch veränderten Mäusen adressiert. Faktor XII-defiziente Mäuse und mit einem Faktor XII-Inhibitor behandelte Wildtyp-Mäuse, waren im Gegensatz zu Wildtyp- und FXII-defizienten Tieren, bei denen wir den menschlichen Faktor XII infundiert haben, vor einer Polyphosphat-vermittelten Lungenembolie geschützt (Abbildung 1).

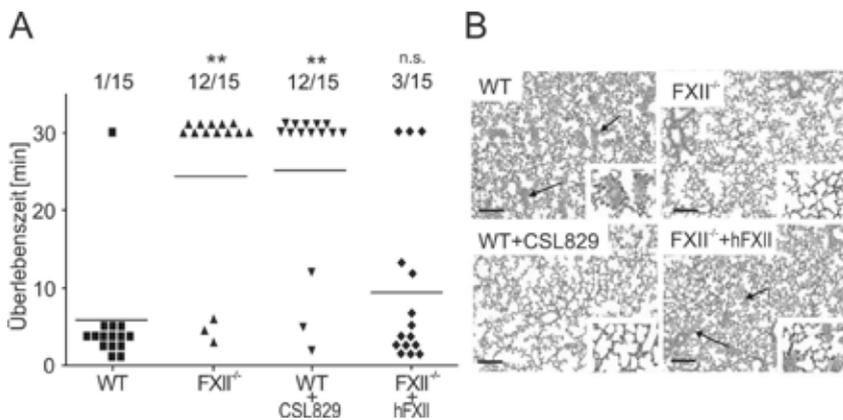


Abbildung 1: Polyphosphate führen zur Lungenembolie. (A) Wildtyp (WT), FXII-defiziente (FXII^{-/-}), mit humanem FXII rekonstituierte FXII^{-/-} (hFXII), und WT-Mäusen die mit einem FXII-Inhibitor (CSL829) behandelt wurden, wurde über die vena cava inferior Polyphosphate verabreicht und die Überlebensrate der behandelten Tiere dokumentiert. (B) Fibrinablagerungen (Pfeile) in der Lunge von WT- und rekonstituierten FXII^{-/-}-Tieren. Im Gegensatz dazu sind bei FXII^{-/-} und Inhibitor behandelten WT-Mäusen keine Thromben nachweisbar.

AUS DEM MITGLIEDERKREIS

Die Daten zeigen, dass Polyphosphate die lang gesuchten Fremdoberflächen sind, die die intrinsische Gerinnung auf Thrombozyten starten. Kann man durch Inhibition der Polyphosphate die Fibrinbildung blockieren? Wir konnten zeigen, dass spezifische Enzyme, sogenannte Phosphatasen, Polyphosphate effizient abbauen. Im Plasma blockieren diese Phosphatasen die prokoagulative Aktivität von stimulierten Thrombozyten im Mensch und Versuchstier (Abbildung 2).

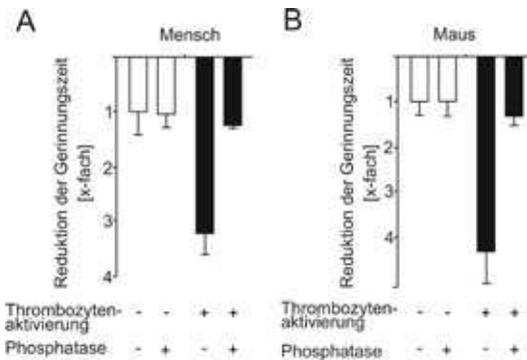


Abbildung 2: Gerinnungszeiten wurden in plättchenreichem menschlichem bzw. Maus-Plasma nach Stimulation von Thrombozyten in der An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von Phosphatase, welche Polyphosphate abbaut, bestimmt. Die Reduktion der Gerinnungszeiten in behandeltem Plasma wurde relativ zu unbehandeltem Plasma aufgetragen.

Ganz analog zu den Plasmadaten waren mit Phosphatase behandelte Mäuse vor einer letalen Lungenembolie geschützt.

Haben die Mausmodell Daten auch Relevanz für die Fibrinbildung auf Thrombozyten beim

Menschen? Das Hermansky-Pudlack Syndrom (HPS) ist eine seltene Erbkrankheit, bei der die Speicherorganellen für Polyphosphate in Thrombozyten reduziert sind. Diese Patienten haben eine gestörte Blutgerinnung. Durch Zugabe von Polyphosphaten konnten wir die Fibrinbildung wiederherstellen, was dann die verlängerte Blutgerinnungszeit normalisierte (Abbildung 3).

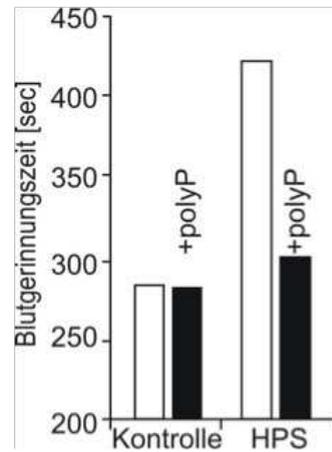


Abbildung 3: Polyphosphate normalisieren die verlängerte Blutgerinnungszeit in plättchenreichem Plasma (PRP) von Hermansky-Pudlak Patienten (HPS). Humane Thrombozyten von gesunden Menschen (Kontrolle) und Patienten (HPS) wurden stimuliert und die Blutgerinnungszeit in Normalplasma nach Zugabe der stimulierten Thrombozyten in Anwesenheit (weiß) oder in Abwesenheit (schwarz) zusätzlicher Polyphosphate bestimmt.

Durch die vorliegende Arbeit wurde der Mechanismus identifiziert durch den Thrombozyten prokoagulant wirken. Polyphosphate von stimulierten Thrombozyten aktivieren

das Kontaktsystem und stellen das natürliche "Pendant" des Kaolin dar. Sie führen über die intrinsische Gerinnungskaskade in Mausmodellen und beim Menschen zur Fibrinbildung. Eine Inhibition der Polyphosphate stellt einen völlig neuen therapeutischen Angriffspunkt der Antikoagulation mit weitreichender medizinischer Indikation dar.

RESULTIERENDE PUBLIKATION:

Müller, F., Mutch, N.J., Schenk, W.A., Smith, S.A., Esterl, L., Spronk, H.M., Schmidbauer, S., Gahl, W.A., Morrissey, J.H., and Renne, T. (2009). Platelet polyphosphates are pro-inflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 139, 1143-1156.

ANSCHRIFT DES VERFASSERS:

FELICITAS MÜLLER, Karolinska Universitätsklinikum und Karolinska Institut, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, S-17 176 Stockholm, Schweden, E-mail: felicitas.muller@ki.se

Buchbesprechung

Molekulare Onkologie

von Christoph Wagener, Oliver Müller

Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 2010, 3. Auflage, 404 Seiten, 360 Abb., 95 Tabellen, ISBN 978-3-131-03513-4, Preis: 99,95 EUR

Seit der letzten Auflage von „Molekulare Onkologie“ sind mehr als zehn Jahre vergangen, in denen sich das Wissen um die molekularen Grundlagen von Tumorerkrankungen enorm erweitert hat. Auf mehr als 400 Seiten gibt das Werk eine sehr gut gelungene, aktuelle Übersicht über die Eigenschaften von Tumoren sowie molekulare Ursachen und Mechanismen der Kanzerogenese. Neben experimentellen und diagnostischen Methoden der molekularen Onkologie stehen die Bedeutung der transkriptionellen Regulation des Zellwachstums sowie die Rolle fundamentaler zellulärer Signalwege für die Entstehung und Progression von Krebserkrankungen auch im Mittelpunkt der 3. Auflage. Neben somatischen und hereditären genetischen Aberrationen, welche für die molekulare Pathogenese von entscheidender Bedeutung sind, wird auch der Beitrag von epigenetischen Veränderungen zur Entstehung und Progression maligner Tumoren umfassend erläutert. Ein weiterer Schwerpunkt liegt auf Mechanismen von Invasion und Metastasierung.

Molekulare Alterationen in Tumorzellen als Grundlage für diagnostische Verfahren sowie für innovative zielgerichtete Therapien in der Onkologie sind durch einen Aeskulapstab gekennzeichnet. Hierbei werden beispielhaft therapeutische Ansätze mit monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinaseinhibitoren aufgeführt. Befunde, die in Tiermodellen erhoben wurden, sind ebenfalls hervorgehoben.

Der Text ist klar geschrieben und wird durch 360 Abbildungen und 95 Tabellen unterstützt. Eine besonders anschauliche Vertiefung komplexer zellulärer Zusammenhänge wie z.B. die Darstellung der Apoptose oder des WNT-Signalwegs werden durch frei verfügbare Videos aus dem Videportal www.onkoview.com erreicht.

Das hervorragende Fachbuch richtet sich nicht nur an Studierende der Naturwissenschaften und Medizin, sondern auch an Naturwissenschaftler und onkologisch tätige Ärzte/Ärztinnen. Darüber hinaus kann es all denen nachhaltig empfohlen werden, die sich für die molekularen Grundlagen von

Pathogenese, Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen interessieren.

VERFASSER:

PROF. DR. MED. TIM H. BRÜMMENDORF,
PD DR. MED. OLIVER GALM
Medizinische Klinik IV
Universitätsklinikum Aachen

Buchbesprechung

Wörterbuch Labor / Laboratory Dictionary

- Deutsch-Englisch / English-German

herausgegeben von Theodor C. H. Cole

Springer Verlag; Berlin - Heidelberg 2009, 2. Auflage, 453 Seiten,
ISBN 978-3-540-88579-5, Preis: 49,95 EUR

Wüssten Sie die englische Entsprechung für eine „Storchschnabelzange“ oder einen „Uhrmacherschraubenzieher“? Oder sind Ihnen Vokabeln wie „squeegee“ oder „mortar grinder mill“ vertraut? Zugegeben, nicht alle Begriffe des Laboralltags sind so speziell – und häufig kommt man mit soliden Sprachkenntnissen schon relativ weit. Doch nicht selten sind es labor-technische Begriffe, die einen beim Lesen von Bedienungsanleitungen und experimentellen Vorschriften oder bei einem Auslandsaufenthalt in einem Gastlabor vor Probleme stellen. Angesichts der zahlreichen internationalen Kooperationen, der Zusammenarbeit mit Mitarbeitern aus verschiedenen Ländern, angesichts

von fachlichen Gesprächen und Auslands-Kongressreisen ist ein gegenseitiges Verständnis und eine effektive Kommunikation Voraussetzung für ein erfolgreiches Arbeiten im Labor. Auch für die Literaturrecherche sowie die Vorbereitung von Publikationen und Berichten ist ein englischer Fachwortschatz unabdingbar. Doch gerade hierfür herrscht in vielen gängigen Wörterbüchern gähnende Leere.

Erfreulicherweise hat sich Theodor C.H. Cole diesem Missstand gewidmet und ein Wörterbuch Labor / Laboratory Dictionary aufgelegt, das nun bereits in der zweiten Auflage erschienen ist. Als zweisprachiger Deutsch-Amerikaner, ausgewiesener

Wissenschaftler auf dem Gebiet der Biologie und Chemie, Dozent, Übersetzer und Lexikograf ist er zweifellos einer der am besten geeigneten Autoren für dieses Vorhaben. Das Wörterbuch ist im Rahmen der Vorbereitung einer Akademie für junge Nachwuchswissenschaftler zu einem Forschungsaufenthalt in den USA entstanden. Deshalb ist es sehr praxisnah gestaltet und beinhaltet neben Fachtermini viele Begriffe der alltäglichen Laborarbeit. In der zweiten Auflage wurde der Inhalt erweitert und aktualisiert und umfasst nun einen Wortschatz von ca. 25000 Begriffen zur allgemeinen und speziellen Labor-Terminologie in den Bereichen:

- Laborbedarf (Zubehör, Geräte, Werkzeuge, Laborglas)
- Laborausstattung und -einrichtung
- Laborbau, Sanitär, Elektrik, Lüftung
- Basischemikalien (allgemein Grundstoffe)
- Laborsicherheit (Arbeits-/Personenschutz, Notfall, Vorsorge)
- Methoden und Analytik

Besonders angenehm ist neben der alphabetischen Auflistung der Begriffe die zusätzliche Zusammenfassung thematisch verwandter Begriffe zu „Wortfeldern“ unter jeweils übergeordneten Hauptstichwörtern. So finden sich beispielsweise unter dem Hauptstichwort „Pumpe“ alle entsprechenden Pumpenarten sowie Begriffe, die in diesem Zusammenhang relevant sind; unter dem

Eintrag „Chromatographie“ sind alle gängigen Chromatographieverfahren gelistet. Dies erleichtert das Auffinden thematisch ähnlicher Begriffe, die sonst einzeln in alphabetischer Reihenfolge gesucht werden müssten.

Das Wörterbuch eignet sich zur Verwendung in biochemischen, molekularbiologischen, medizinischen, pharmazeutischen und chemischen Laboren. In der aktuellen Auflage sind die derzeitigen Versionen der deutschen und englischen Rechtschreibung berücksichtigt. Konstruktiv für zukünftige Ausgaben ist anzumerken, dass die Angabe der Silbentrennung sowie der Lautsprache nützliche Ergänzungen wären. Ferner wäre eine Erweiterung des Abkürzungsverzeichnisses und der Umrechnungstabellen für Maße und Gewichte sowie die verstärkte Berücksichtigung von klinisch-chemischen Begriffen wünschenswert.

Insgesamt ist das Wörterbuch Labor / Laboratory Dictionary von Theodor C. H. Cole ein nicht ganz preiswertes, jedoch empfehlenswertes Buch, das im Ausland tätige Wissenschaftler sehr schätzen werden und das als hilfreicher Ratgeber in den Regalen vieler Labore kaum Staub ansetzen dürfte.

VERFASSER:

PD Dr. STEFAN HOLDENRIEDER,
 Institut für Klinische Chemie
 Klinikum Großhadern der LMU München

Jahrestagung der AG GENOMICS (vormals AG Chipdiagnostik) & AG BIOINFORMATIK (aus der Sektion Molekulare Diagnostik der DGKL)

06. - 07. Mai 2010, Tutzing/Starnberger See

Auditorium: Evangelische Akademie Tutzing, Schloßstrasse 2 + 4, 82327 Tutzing



EINLADUNG

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

die Abklärung genetisch bedingter Erkrankungen ist heute für zahlreiche Indikationen aus technischer Sicht bereits Routine. Dennoch wird besonders im deutschsprachigen Raum die genetische Diagnostik von breiten Schichten der Gesellschaft kritisch betrachtet. Aus diesem Grund sollten deren ethische und rechtliche Aspekte besonders klar definiert werden. Der Schwerpunkt der diesjährigen Tagung liegt daher auf den ethischen und rechtlichen Rahmenbedingungen der Gendiagnostik und den Auswirkungen des kürzlich in Kraft getretenen Gendiagnostik-Gesetzes (GenDG).

In den ersten beiden Sitzungen werden ethische und normative Aspekte der genetischen Diagnostik aus technologischer, soziologischer, philosophischer und gesellschaftskritischer Sicht diskutiert, sowie der rechtliche Rahmen der massiv parallelen Diagnostik unter besonderer Berücksichtigung der Deutschen Gesetzgebung behandelt. Die dritte Sitzung wird von der Arbeitsgruppe Bioinformatik ausgerichtet und stellt verschiedene Techniken zur Analyse der Genome von Mensch und Mikroben vor. Insbesondere bei labormedizinischen und mikrobiologischen Fragestellungen gewinnt die hochparallele molekulare Diagnostik immer mehr an Bedeutung, was eine zunehmend effiziente Bioinformatik im Bereich Data-Mining-Algorithmen erfordert. Zum Abschluss der Tagung werden in der vierten Sitzung die technischen Aspekte und verschiedene Anwendungen der massiv parallelen genetischen Diagnostik beschrieben. Wie immer wird eine Zusammenfassung der Tagung im Journal of Laboratory Medicine veröffentlicht. Wir wünschen Ihnen zwei informative Tage am Starnberger See.

Prof. Dr. Paul Cullen (Vorsitz AG Genomics), Prof. Dr. Georg Hoffmann (Vorsitz AG Bioinformatik)
Dr. Hanns-Georg Klein (Gastgeber und Organisation)

Für weitere Informationen oder Anmeldungen kontaktieren Sie bitte das Tagungsbüro:

Dipl.-Biol. Heidrun Bock, Tel.: 089 / 89 55 78 - 0, Fax: 089 / 89 55 78 -780,

e-Mail: bock@medizinische-genetik.de

Sektion Endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik der DGKL

PROGRAMM FÜR DEN WORKSHOP am 7. Mai 2010 in Leipzig

„AKTUELLE PROBLEME DER LABORDIAGNOSTIK VON SCHILDDRÜSENERKRANKUNGEN“

Zielstellung des Workshops ist eine Bestandsaufnahme zu den klinischen Problemen, analytischen Möglichkeiten und labordiagnostischen Problemen bei der Diagnostik der Schilddrüsenfunktion sowie eine aktuelle Erörterung der Anwendung von Calcitoninbestimmungen als Tumormarker für das Medulläre Schilddrüsenkarzinom. Die Teilnehmer sind deshalb aufgerufen aktiv mit eigenen Kurzbeiträgen zur jeweiligen Thematik in die Diskussion einzugreifen. Als Konsequenz sollen neue Empfehlungen für die praktische Durchführung der entsprechenden endokrinologischen Laboruntersuchungen erarbeitet werden.

TAGUNGSORT

Konservatives Zentrum des Klinikum der Universität Leipzig AöR; 04103 Leipzig, Eingang Liebigstr.20; Vortragsraum 15/16

ZEITPLAN

09:00-09:15 Uhr Begrüßung durch Martin Bidlingmaier, Sprecher der Sektion „Endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik der DGKL. Ende der Veranstaltung 15:30 Uhr.

ORGANISATORISCHES

Bitte wenden Sie sich für Anmeldungen oder weitere Informationen an
Herrn PROF. JUERGEN KRATZSCH:

Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik; Paul-List-Str.13-15, 04103 Leipzig, Telefon: 0341-97-22241; Telefax: 0341-97-22249; email: kraj@medizin.uni-leipzig.de



Minisymposium „Frühschwangerschaft - Risiken früh erkennen“

am 5. Mai 2010 von 17:00 - 20:00 Uhr, München

Ort: im Hörsaal D des Klinikums rechts der Isar
Ismaninger Str. 22
81675 München

Themen dieses Symposiums:

- Endokrinologie der Fertilität - Risiken früh erkennen,
- Moderne Konzepte in der Kinderwunschbehandlung,
- Update Ersttrimesterscreening - gibt es neue Parameter?
- Präeklampsie - Prädiktion, Prävention und Therapie,
- Biochemische Marker zur Diagnostik der Präeklampsie im 2. und 3. Trimenon.

Für weitere **Informationen** und für **Anmeldungen** wenden Sie sich bitte an
Herrn PROF. LUPPA:

Klinikum rechts der Isar der TU München
Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
Ismaninger Str. 22
81675 München
Telefon: 089/41404759
E-Mail: luppa@klinchem.med.tum.de

Repetitorium Klinische Chemie 2010

Beginn:	Montag, 22.11.2010, 12.00 Uhr
Ende:	Samstag, 27.11.2010, 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: € 600,- Nichtmitglieder der DGKL: € 670,-
Max. Teilnehmerzahl:	22

Mikroskopische Blutzellendifferenzierung 2010

Beginn:	Samstag, 27.11.2010, 14.00 Uhr
Ende:	Sonntag, 28.11.2010, 13.00 Uhr
Inhalt:	Übungen zur mikroskopische Blutzellendifferenzierung
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:	€ 190,-
Max. Teilnehmerzahl:	20

Die Kosten für Übernachtung und Verpflegung sind in der Teilnahmegebühr enthalten.
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

Veranstaltungskalender

DATUM, ORT	VERANSTALTUNG
08.04.-10.04.2010 Mosbach/Baden	61. Mosbacher Kolloquium
11.04.-14.04.2010 Rotterdam, Niederlande	ISBER 2010 Annual Meeting & Exhibits
16.04.-17.04.2010 London	Professor David W Holt - 40 years of Drug Use and Abuse
23.04.-24.04.2010 Mainz	DELAB-/DGKL-Fortbildungs-Reihe Interdisziplinäre molekulargenetische Diagnostik, Block 4
29.04.-30.04.2010 Igls, Österreich	JUBILÄUMS - TAGUNG 30 JAHRE ÖQUASTA
06.05.-07.05.2010 Tutzingen, Starnberger See	Jahrestagung der AG GENOMICS & AG BIOINFORMATIK der Sektion Molekulare Diagnostik der DGKL
07.05.2010 Leipzig	Workshop der Sektion Endokrinologische Laboratoriums- diagnostik der DGKL zum Thema „Aktuelle Probleme der Labordiagnostik von Schilddrüsenerkrankungen“
09.05.-12.05.2010 Basel, Schweiz	3rd European Conference for Clinical Nanomedicine „Trans- lating the Knowledge to Practice“, Exhibition and „Univer- sity Village“
27.05.-29.05.2010 Mainz	DELAB-/DGKL-Fortbildungs-Reihe Interdisziplinäre molekulargenetische Diagnostik, Block 5 und 6
23.06.-26.06.2010 Gürzenich, Köln	KIT 2010 10. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin

Weitere Informationen zu den Veranstaltungen finden Sie unter www.dgkl.de.

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

GÁBOR-SZÁSZ-PREIS

FÜR KLINISCHE CHEMIE UND PATHOBIOCHEMIE 2010

Die Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin wird auf der 7. Jahrestagung der DGKL (29. September – 2. Oktober 2010) den Gábor-Szász-Preis verleihen. Dieser Preis ist mit

€ 15.000,-- EUR

dotiert und wird für hervorragende wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Klinischen Chemie und Pathobiochemie von der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. gestiftet. Für die Bewerbung um den Preis können eingereicht werden:

- Arbeiten, die nach dem 15.06.2007 publiziert oder zur Publikation angenommen wurden,
- mehrere Arbeiten, die in hervorragender Weise ein bestimmtes Arbeitsgebiet umfassen
- oder ein Vorschlag für einen Preisträger durch ein Mitglied der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin mit einer ausführlichen Begründung und entsprechenden Unterlagen.

Bewerbungen (bei Publikationen mit mehreren Autoren bitte Bewerber deutlich angeben) und Vorschläge können in dreifacher Ausfertigung bis spätestens 15. Juni 2010 eingereicht werden an:

Prof. Dr. Joachim Thiery, Sekretär für den Gábor-Szász-Preis
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Universitätsklinikum Leipzig, AöR, Liebigstr. 27, 04103 Leipzig
Tel.: 0341/9722200, Fax: 0341-9722209, E-Mail: thiery@medizin.uni-leipzig.de


Geschäftsstelle der DGKL

Im Mühlenbach 52 b
53127 Bonn
Tel. 0228 – 92 68 95 - 17

- ANTRAG auf Mitgliedschaft
 ÄNDERUNG der Anschrift

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

Ich möchte folgender **DGKL-Sektion** beitreten: (Informationen auf www.dgkl.de, „Sektionen“)

Der Antrag wird befürwortet von den ordentlichen Mitgliedern:

1. _____
Name Datum Unterschrift

2. _____
Name Datum Unterschrift



Invitation

EFCC-Labs are Vital Award for Excellence in Outcomes Research in Laboratory Medicine



Announcement

EFCC and Labs are Vital™ are pleased to announce the EFCC-Labs Are Vital Award for Excellence in Outcomes Research in Laboratory Medicine, sponsored by Abbott. The Award will be given to the best published paper, as judged by an independent panel of experts, which demonstrated improved outcomes (clinical and/or economic) arising out of the application or improved utilisation of an in-vitro diagnostics test.

The award is launched at EUROMEDLAB 2009 in Innsbruck, and will be presented for the first time at IFCC/Euromedlab 2011 in Berlin. Thereafter it will be awarded every two years at an EFCC conference. The Award will consist of a certificate and the sum of 15,000 Euro.

For criteria and submission procedure please visit us at:
www.efccim.eu/about_efcc/downloads/efcc-lavaward.pdf



7. Jahrestagung Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Biomarker – Schlüssel zu
Prävention und Früherkennung

**29. September bis 2. Oktober 2010
Mannheim**



www.dgkl2010.de