

Klinische Chemie

MITTEILUNGEN

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



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

Neupositionierung des deutschen Akkreditierungssystems Prof. Heinrich Patscheke (Karlsruhe)	64
--	----

AUS DER GESELLSCHAFT

Forschungsbericht: Stimulation der Testosteronsekretion durch Gabe von N-Propionylmannosamin in Mäusen Werner Reutter (Berlin)	73
10. Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Kloster Banz 20.-22. Juni 2010 Zusammenfassung der Vorträge	83

AUS DEM MITGLIEDERKREIS

Dissertation: Ozoniertes Low Density Lipoprotein (OzLDL) - Herstellung und Effekte auf NF- K -B-assoziierte Signalwege Dr. rer. nat. Christian Cappello (Hannover)	112
Buchbesprechung: Thema Epigenetik (1) Epigenetik - Wie Erfahrungen vererbt werden von Bernhard Kegel (2) Der zweite Code von Peter Spork Dr. rer. nat. Anna Schrader, Dr. med. Hanns-Georg Klein (Martinsfeld)	115

VERANSTALTUNGEN

Südwestdeutsches Laborleidertreffen 12. und 13. März 2010 Dieter Meißner (Dresden) York Schmitt (Darmstadt)	123
2011 ASCP Annual Meeting	129
Veranstaltungskalender	130

 PERSONALIA

Neue Mitglieder, Verschollene Mitglieder, Verstorbene Mitglieder	131
Nachruf: Victor William Armstrong	133
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Michael Oellerich, Prof. Dr. med. Nicolas von Ahsen (Göttingen)	



IMPRESSUM

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, Fax: +49 (0351) 480-3909, 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

Neupositionierung des deutschen Akkreditierungssystems

PROF. DR. HEINRICH PATSCHEKE, Schatzmeister der DGKL, Karlsruhe

EU-VERORDNUNG UND AKKREDITIERUNGSSTELLEN-GESETZ

Die EU-Verordnung Nr. 765/2008 vom 09.07.2008 legt mit Wirkung zum 01.01.2010 neue Anforderungen an die Akkreditierung und Marktüberwachung fest. Deren Umsetzung in nationales Recht erfolgte durch das Akkreditierungsstellengesetz (AkkSG) vom 01.08.2009. Kernpunkt der Neuregelung ist, dass es nur eine staatlich beliehene Stelle in Deutschland gibt, in der sowohl der geregelte als auch der bisher nicht geregelte Bereich zusammengefasst werden. Die in Länder- und Bundeshoheit fallenden gesetzlichen Akkreditierungen als auch die gesetzlich nicht geregelten Akkreditierungen sind ab 01.01.2010 von dieser Akkreditierungsstelle wahrzunehmen. Die nationale Stelle hat ohne Gewinnerzielungsabsicht und wettbewerbsfrei zu arbeiten. Die Rechtsaufsicht obliegt dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi), und die Fachaufsicht wird von verschiedenen Fachressorts ausgeübt.

Die Akkreditierungen der medizinischen Laboratorien nach ISO 15189 oder 17025 gehören in den freiwilligen, nicht geregelten Bereich und wurden bislang von den privaten Akkreditierungsstellen DACH GmbH und DAP GmbH oder der ZLG als Einrichtung der

Länder durchgeführt. DACH und DAP waren Unterzeichner des Abkommens zur Gegenseitigen Anerkennung bei der *European Co-operation for Accreditation (EA)*, das die internationale Anerkennung der von ihnen ausgesprochenen Akkreditierungen sicherstellte. Neben DACH und DAP war als dritte private, ebenfalls bei EA akkreditierte Stelle die TGA GmbH insbesondere im Bereich der Akkreditierung von Zertifizierungsstellen für Managementsysteme und Personen tätig.

Dem BMWi kam die Aufgabe zu, das Akkreditierungsstellengesetz vorzubereiten, wobei erhebliche Abstimmungsprobleme auftraten, die eine termingerechte Umsetzung der EU-Verordnung zum 01.01.2010 wiederholt in Frage stellten. Ein besonders kritischer Punkt war die Frage, ob die nationale Akkreditierungsstelle privatrechtlich oder als Behörde konstituiert werden sollte. Während das BMWi im Hinblick auf die erfolgreich agierenden privaten Akkreditierungsstellen eine privatrechtliche, staatlich beliehene Stelle favorisierte, gab es von Seiten einiger Bundesministerien und der Länder eher den Wunsch nach einer Behörde. Beide Optionen gelangten in das Gesetz vom 01.08.2009, wobei in der privatrechtlichen, beliebten Stelle je ein Drittel der Gesellschaftsanteile auf den Bund, die Länder und die Wirtschaft entfallen.

GRÜNDUNG EINER NATIONALEN AKKREDITIERUNGSTELLE

Um zum 01.01.2010 eine funktionierende, international anerkannte deutsche Akkreditierungsstelle aufzubauen, blieb nach Inkrafttreten des Akkreditierungsstellengesetzes vom 01.08.2009 eine äußerst knapp bemessene Zeitspanne. Der Bund, vertreten durch das BMWi, gründete zwar schon im Oktober 2009 die Deutsche Akkreditierungsstelle GmbH (DAkKS). Diese verfügte jedoch noch nicht über die fachlichen und materiellen Ressourcen, um zum 01.01.2010 die Akkreditierungen in Deutschland umfassend zu leisten. Nur mit dem DKD (Deutscher Kalibrierdienst) als Bundesbehörde besaß die DAkKS ein Instrument, um wenigstens einen Teilbereich der geforderten Aktivitäten zum 01.01.2010 darstellen zu können. Ziel des BMWi war es daher, die drei privaten Stellen mit ihren gesamten Ressourcen in die nationale Akkreditierungsstelle einzubinden. Den privaten Akkreditierungsstellen war andererseits mit dem Akkreditierungsstellengesetz ab 01.01.2010 der Boden für ihre Tätigkeit entzogen. Ihnen wäre nur die Abwicklung geblieben. Die Gesellschafter der drei privaten Stellen (*Abb. 1*) waren sich daher mit wenigen Ausnahmen einig und auch interessiert, an der neuen nationalen Akkreditierungsstelle mitzuarbeiten. Unmittelbar nach der Verabschiedung des Akkreditierungsstellengesetzes im August 2009 hatten sich deshalb die Gesellschafter von DACH, DAP und TGA

zu einer neuen Gesellschaft, der Deutschen Gesellschaft für Akkreditierung GmbH (DGA) vereinigt. Dies geschah mit dem Ziel, sich als privatrechtliche, beleihungsfähige Akkreditierungsstelle zu positionieren. Da DACH GmbH, DAP GmbH und TGA GmbH schon vorher nicht auf eine Gewinnerzielung ausgerichtet waren, bedeutete die Vorgabe, nur kostendeckende Gebühren zu erheben, keine Einschränkung.

Eine Hürde, an der die Integration der privaten Stellen in die DAkKS GmbH beinahe scheiterte, ergab sich aus der Forderung, dass nur solche Rechtsträger Gesellschafter der DAkKS GmbH werden dürfen, die weder selbst noch mittelbar Konformitätsbewertungsstellen betreiben. Aus Sicht von Bund und Ländern war diese Bedingung unverzichtbar, um Interessenkonflikte zwischen Akkreditierungsstelle und Konformitätsbewertungsstellen gemäß Kapitel 1, Art. 8, Nr. 1. der EU-Verordnung auszuschließen. Unter den Gesellschaftern der DGA GmbH waren jedoch einige, an prominenter Stelle der TÜV Rheinland und der Verband der TÜVs (*Abb. 2*), die diese Anforderung des Staates nicht erfüllten. Damit kam für die DGA GmbH mit ihrer anfänglichen Gesellschafterstruktur sowohl eine staatliche Beleihung als auch eine Verschmelzung mit der vom BMWi neu gegründeten DAkKS GmbH nicht in Frage. Die Gesellschafterstruktur der DGA musste zuvor entsprechend der Forderung des Staates angepasst werden. Das gelang unter hohem

Zeitdruck und großen Anstrengungen, indem schließlich am 16.12.2009 die Gesellschafter der DGA ihre Anteile auf den Bundesverband der Deutschen Industrie (BDI) als Dachverband der Wirtschaft übertrugen. Schon am Folgetag, dem 17.12.2009 wurde die DGA GmbH mit dem alleinigen Gesellschafter BDI auf die DAkKS GmbH verschmolzen. Am 21.12.2009 erfolgte die Beleihung der DAkKS GmbH durch eine Beleihungsverordnung. Damit war der Weg für eine nahtlose Fortsetzung der Akkreditierungstätigkeit in einer nationalen Akkreditierungsstelle in Deutschland zum 01.01.2010 frei.

AUFBAU DER DAkKS GMBH UND AUFGABENVERTEILUNG IM DEUTSCHEN AKKREDITIERUNGSSYSTEM

EU-Verordnung und Akkreditierungsstellenengesetz geben den Organisationsrahmen vor, nach dem sich die DAkKS konstituiert. Zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Artikels sind erst die Grundelemente etabliert. Zwei Geschäftsführer, einer von Seiten der Wirtschaft sowie einer von Seiten des Bundes sind ernannt sowie die Leiter der Fachabteilungen und der Stabsstellen und Verwaltung der DAkKS. Dadurch, dass alle Mitarbeiter der DGA bei der Verschmelzung auf die DAkKS samt aller übrigen Ressourcen der privaten Altgesellschaften in die DAkKS übergeleitet wurden, ist die operative Tätigkeit ohne Unterbrechung gegeben. Insbesondere die Akkreditierung und Reakkreditierung der medizinischen Laboratorien, die früher von DACH

und DAP durchgeführt wurden, sind nunmehr unter dem Dach der nationalen Akkreditierungsstelle zusammen gefasst und werden überwiegend von den gleichen Mitarbeitern betreut. In einer Verordnung des BMWi vom 15.12.2009 wurde das neue Akkreditierungssymbol der DAkKS festgelegt (*Abb. 3*).

Eine erste Visitation durch die European Co-operation for Accreditation (EA) hat im Januar 2010 die internationale Anerkennung für die bisher von DACH, DAP, TGA und DKD vertretenen Aktivitäten unter dem Dach der DAkKS bestätigt. Eine umfassende Evaluation durch EA ist für den Sommer 2010 geplant, nachdem die gesamte Akkreditierungstätigkeit in der DAkKS gesetzeskonform zusammen geführt wurde. Eine besondere Herausforderung für die nationale Akkreditierungsstelle ist dabei die Zusammenarbeit mit den sogenannten Befugnis erteilenden Behörden.

Der Organisationsplan der DAkKS (*Abb. 4*) umfasst sechs Fachabteilungen. Die medizinischen Laboratorien mit der In-vitro-Diagnostik, Pathologie usw. werden von der Abteilung 3 „Gesundheit / Forensik“ betreut, zu der auch Arzneimittel und Wirkstoffe, Arbeitsmedizin, Medizinprodukte, Forensische Medizin, Toxikologie, u.a. gehören (*Abb. 5*). Jeder der sechs Fachabteilungen sind Sektorkomitees zugeordnet, die mit den betreffenden, vom Akkreditierungsbeirat eingesetzten

sechs Fachbeiräten zusammenarbeiten (Abb. 4). Der beim BMWi noch einzurichtende Akkreditierungsbeirat hat nach § 5 AkkSG die Aufgabe, die Bundesregierung und die Akkreditierungsstelle in Fragen der Akkreditierung zu beraten und zu unterstützen. Er hat insbesondere die Aufgabe, allgemeine und sektorale Regeln zu ermitteln, welche die Anforderungen an Konformitätsbewertungsstellen und für Akkreditierungstätigkeiten konkretisieren und ergänzen.

MITWIRKUNG DER DGKL

Die DGKL hat seit vielen Jahren als Gesellschafter der DACH GmbH und durch seine Mitglieder in zahlreichen Gremien einen aktiven Beitrag zum Aufbau und zur Entwicklung des deutschen Akkreditierungswesens geleistet. Die DACH GmbH wurde zum führenden Akkreditierer von medizinischen Laboratorien mit einem anhaltend hohen Wachstum in diesem Bereich. Die DGKL beabsichtigt, dieses Engagement auch in der seit 01.01.2010 veränderten Akkreditierungsumgebung fortzusetzen. So hat sich die DGKL wesentlich dafür eingesetzt, dass zunächst die privaten Stellen zur DGA fusionierten und schließlich die DGA auf die DAkKS verschmelzen konnte. Dabei gab die DGKL – wie auch andere Gesellschafter der DGA – ihren Status als Gesellschafter auf, beteiligte sich aber dennoch z.B. an der Anschubfinanzierung für die DAkKS GmbH. Wichtige Positionen in der DAkKS GmbH konnten mit

führenden Mitarbeitern der früheren DACH GmbH besetzt werden: Der Leiter der für die medizinischen Laboratorien zuständigen Abteilung 3 kommt von der DACH, und der frühere Geschäftsführer der DACH ist Leiter der Stabsstellen und Verwaltung der DAkKS und ist für die Position eines der Geschäftsführer der DAkKS ab 2012 nominiert. So kann eine Fortsetzung der qualitativ hochwertigen Betreuung der medizinischen Laboratorien auch in der neuen Akkreditierungsstelle erwartet werden.

Die DACH GmbH war seit ihrer Gründung konsequent auf Qualität und Effizienz ausgerichtet. Darin waren sich die Gesellschafter VCI (Verband der Chemischen Industrie e.V.), GDCh (Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.) und DGKL (bis 2003 DGKC) stets einig. So setzte die DACH den Maßstab bei den Gebühren, indem Rationalisierungsgewinne und Überschüsse zu einer Gebührensenkung im Folgejahr verwandt wurden. Dabei sanken die Gebühren bei der DACH während 10 Jahren fast auf die Hälfte. Der Umsatzanteil des bei der Gründung der DAkKS von der DACH eingebrachten Bereiches wird auf 60 % geschätzt. Es ist daher ein zentrales Anliegen an die DAkKS gerichtetes Anliegen, dass die Möglichkeiten von Synergien in der nunmehr einzigen nationalen Akkreditierungsstelle genutzt werden und die bisherige Gebührenpolitik der DACH eine Fortsetzung erfährt. Da die DAkKS gesetzlich auf kostendeckende Gebühren ohne Gewinnerzielung festgelegt

ist, sind die Voraussetzungen dafür gegeben. Allerdings kann die neue Gebührenordnung der DAkKS noch nicht befriedigen. Einige Laboratorien aus Chemie und Medizin haben errechnet, dass die neue Gebührenordnung gegenüber den von der DACH gewohnten Gebühren zu einer Kostensteigerung für die Laboratorien von bis zu 60 % führen kann. Das hat seinen Grund darin, dass die Beträge in der neuen Gebührenordnung aus den Gebühren aller in der DAkKS nunmehr versammelten Stellen gemittelt wurden.

Die Altgesellschafter der DACH GmbH - DGKL, GDCh und VCI - haben miteinander vereinbart, ihre Möglichkeiten, Einfluss auf das Akkreditierungswesen in Deutschland zu nehmen, weiterhin abgestimmt zu nutzen. Als Mitglied des Bundesverbandes der Deutschen Industrie (BDI) ist der VCI auf Seiten der Wirtschaft in der Gesellschafterversammlung der DAkKS vertreten. Der VCI hält von den im BDI vertretenen Wirtschaftsverbänden dabei das mit Abstand größte Stimmgewicht und stellt außerdem einen Vertreter im Aufsichtsrat der DAkKS. DGKL und GDCh haben im Zuge der DAkKS-Gründung vom BDI und dem BMWi die Zusage erhalten, dass sich beide für die Wahl der von GDCh und DGKL vorgeschlagenen Kandidaten für den Akkreditierungsbeirat nach § 5 AkkSG und die Fachbeiräte 3 (DGKL), 4 (GDCh) und 5 (DGKL) einsetzen werden. GDCh und DGKL haben hochkompetente Kandidaten benannt, deren Wahl derzeit noch aussteht. Ziel von

DGKL, GDCh und VCI ist es, das hohe Maß an Qualität, Kundenorientierung und Effizienz zu wahren, für das die DACH eingetreten ist.

VERFASSER:

PROF. DR. HEINRICH PATSCHEKE
Städtisches Klinikum Karlsruhe gGmbH
Moltkestraße 90
D-76133 Karlsruhe
Tel.: +49-(0)721-971-3292
Fax: +49-(0)721-971-3293

Abb. 1: Gesellschafter der privaten Akkreditierungsstellen bis 15.09.2009

Deutsche Akkreditierungsstelle Chemie (DACH GmbH)	Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen (DAP GmbH)	Trägergemeinschaft für Akkreditierung (TGA GmbH)
Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)	Verband der Materialprüfungsanstalten e.V. (VMPA)	Bundesverband der Deutschen Industrie e.V. (BDI)
Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh)	Elbe Holdung GmbH	Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)
Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)	TÜV Rheinland Holding AG	Verband der Materialprüfungsanstalten e.V. (VMPA)
	Verband der TÜV e.V.	TÜV Rheinland Holding AG
	Verband der TÜV e.V.	Stahlinstitut (VDEh)
	Bundesverband Informationswirtschaft, Telekommunikation und neue Medien e.V. (BITKOM)	Zentralverband Elektrotechnik- und Elektronikindustrie e.V. (ZVEI)
	Deutscher Industrieverband für optische, medizinische und mechatronische Technologien e.V. (SPECTARIS)	Mineralölwirtschaft e.V.
	Bundesverband Baustoffe, Steine und Erden e.V.	Verband Deutscher Maschinen- und Anlagenbau (VDMA)

Abb. 2: Gesellschafter der Deutschen Gesellschaft für Akkreditierung GmbH (DGA)

vom 15.09.2009 bis 16.12.2009

1. Bundesverband der Deutschen Industrie e.V. (BDI)
2. Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI)
3. Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh)
4. Deutsche Vereinte Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)
5. Verband der Materialprüfungsanstalten e.V. (VMPA)
6. Elbe Holdung GmbH
7. TÜV Rheinland Holding AG
8. Verband der TÜV e.V.
9. Stahlinstitut VDEh
10. Bundesverband Informationswirtschaft, Telekommunikation und neue Medien e.V. (BITKOM)
11. Zentralverband Elektrotechnik- und Elektronikindustrie e.V. (ZVEI)
12. Deutscher Industrieverband für optische, medizinische und mechatronische Technologien e.V. (SPECTARIS)
13. Mineralölwirtschaft e.V.
14. Bundesverband Baustoffe, Steine und Erden e.V.
15. Verband Deutscher Maschinen- und Anlagenbau (VDMA)

Abb. 3: Neues Akkreditierungssymbol

Abb. 4: Organisationsplan der DAkKS GmbH

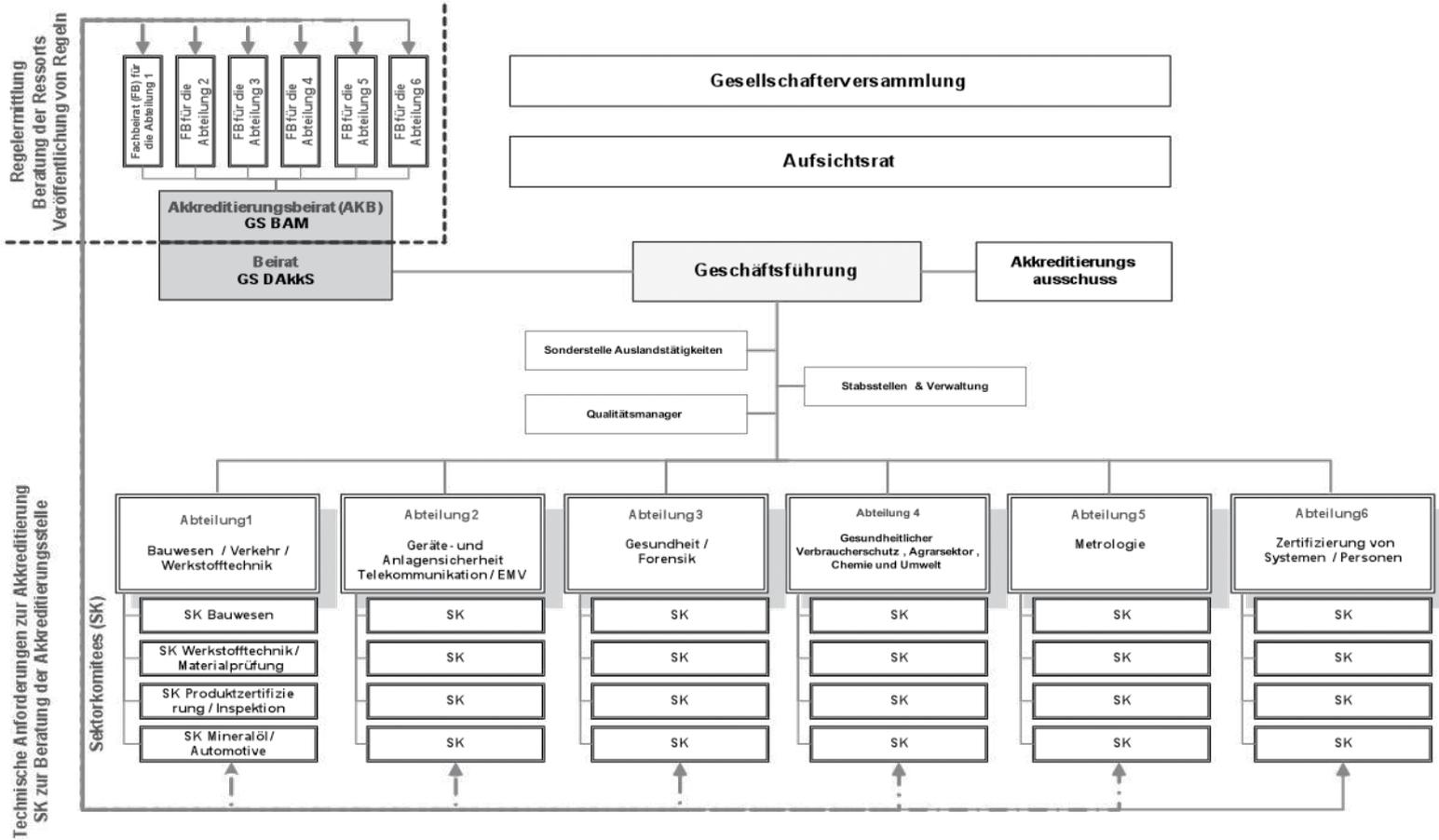
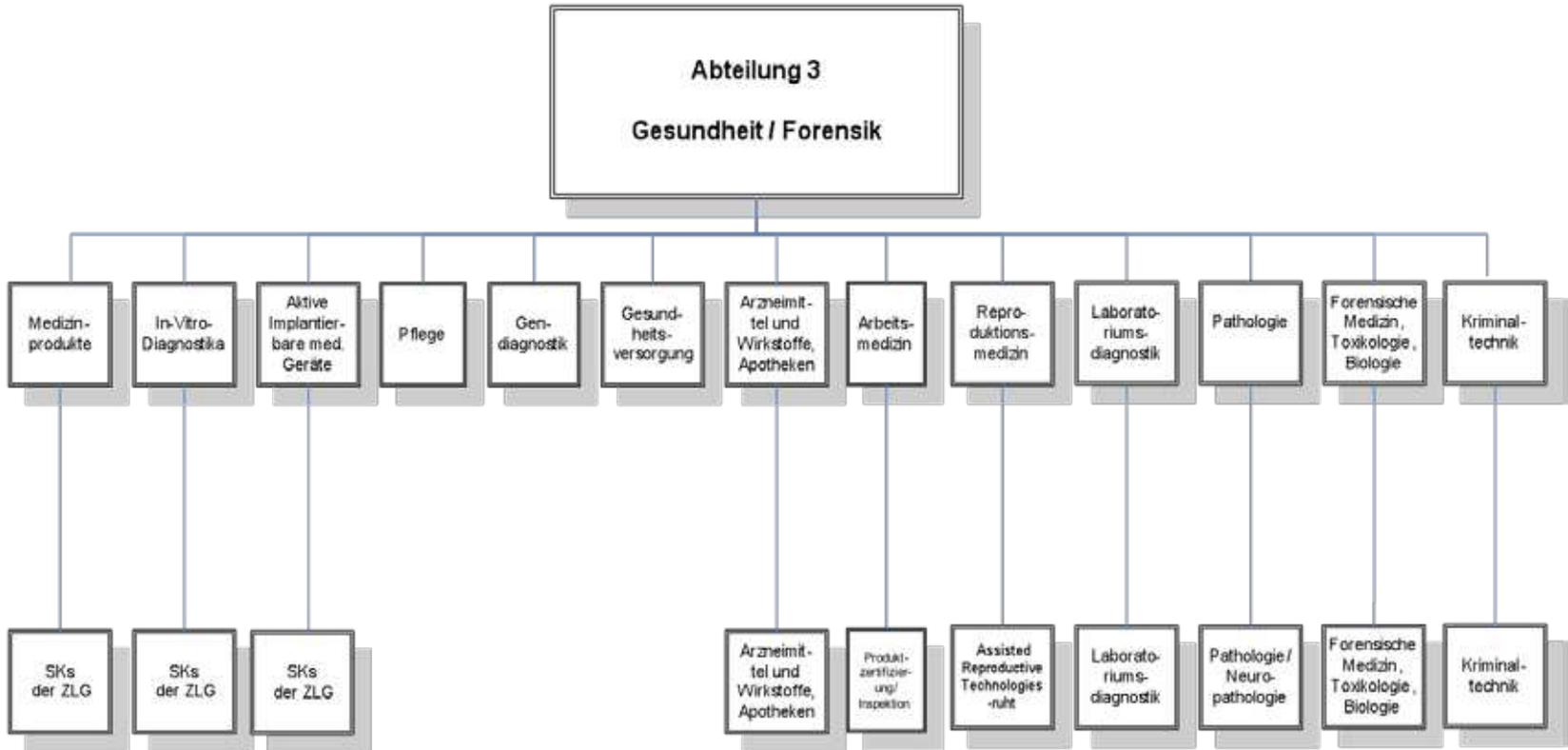


Abb. 5: Abteilung 3 mit Fachgebieten und Sektorkomitees



Forschungsbericht

Stimulation der Testosteronsekretion durch Gabe von N-Propionylmannosamin in Mäusen

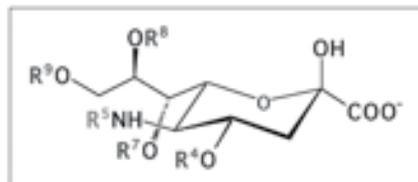
Gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL, 2006 bis 2008

WERNER REUTTER, Koautoren, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin

HINTERGRUND

Das wichtige Zielmolekül des Antrags war die N-Acetylneuraminsäure, aus der alle anderen bekannten Sialinsäuren hervorgehen (Abb. 1). Sialinsäuren befinden sich in terminaler Position von Glykanen. In Reihe

miteinander verknüpfte Sialinsäuren, wie sie vor allem im neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM und in Neuropilin nachgewiesen werden, bilden eine eigene Gruppe, die Polysialinsäuren.



Name		R ⁵	R ^{4, 7, 8, 9}
N-Acetylneuraminic acid	Neu5Ac	-CO-CH ₃	-H
N-Acetyl-9-O-acetylneuraminic acid	Neu5,9Ac ₂	-CO-CH ₃	-H -CO-CH ₃
N-Acetyl-2-deoxy-2,3-dehydro neuraminic acid	Neu5Ac2en	-CO-CH ₃	-H
N-Glycolylneuraminic acid	Neu5Gc	-CO-CH ₂ OH	-H

Abb. 1: Struktur von N-Acylneuraminsäuren. Physiologisch kommt beim Menschen nur N-Acetylneuraminsäure vor, bei Affen und anderen Säugern nur N-Glykolyneuraminsäure. Bei manchen Tumoren ist beim Menschen auch N-Glykolyneuraminsäure nachweisbar. Neu5Acen ist ein Hemmer der Neuraminidase (Sialidase)

Mit einem von uns entwickeltem neuen methodischen Vorgehen (Kayser 1992), das von drei Gruppen in den USA (C. Bertozzi; K. Yarema) und in Kanada (H. Jennings) aufgegriffen und erweitert wurde (Mahal 1997, Pon 2007, Campbell 2008), gelingt es, die N-Acetylseitenkette der Sialinsäure biochemisch zu modifizieren. Das Verfahren ist einfach, und seine Anwendung führt zu überraschenden

biologischen Veränderungen. Anstelle des physiologischen Sialinsäurevorläufers N-Acetylmannosamin werden N-Propionylmannosamin (ManNProp) oder homologe N-Acylmannosamine in Zellkulturen oder Versuchstieren eingesetzt. Sie werden von den Sialinsäure-Biosyntheseenzymen akzeptiert und in die entsprechenden neuen Sialinsäuren metabolisiert (Abb. 2).

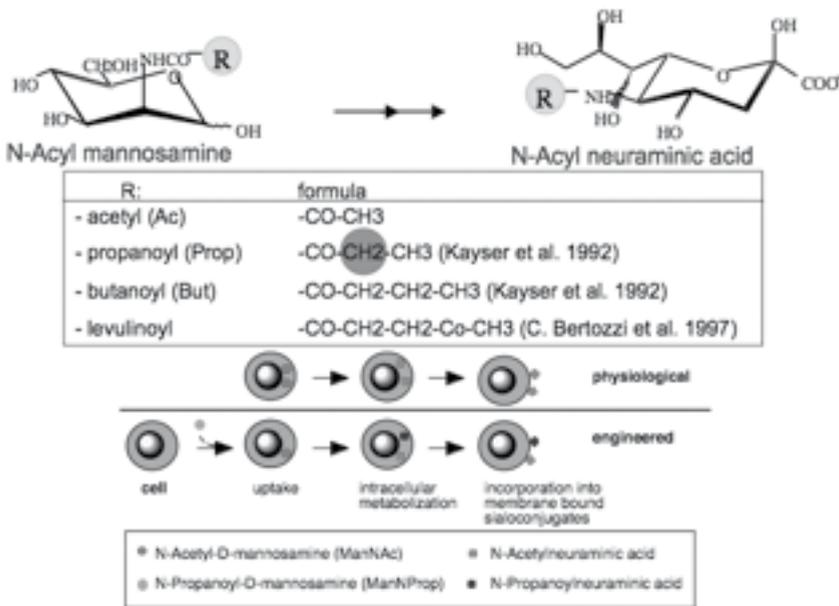


Abb. 2: Biochemical Engineering der N-Acylseitenkette der N-Acetylneuraminsäure.

Anstelle des physiologischen Vorläufers N-Acetylmannosamin werden Mannosamin-Analoga metabolisiert, deren N-Acetylseiten-Kette um eine oder mehrere Methyl- oder Cyclo-Methylen- oder Levulinoylgruppen verlängert sind

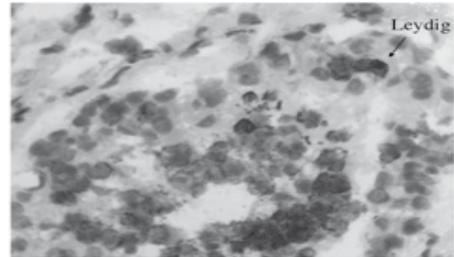
Nach diesem überraschenden biochemischen Befund zeigten sich bemerkenswerte neue biologische Eigenschaften verschiedener Zellen nach Supplementation der Medien

mit diesen neuen N-Acylmannosaminen: Stimulation des Neuritenwachstums, Hemmung der Aufnahme von Influenza A-Viren durch Vero- oder BalbJ-Zellen, Stimulation der

Differenzierung humaner T-Lymphozyten, Induktion der Expression von Sialyl-Lewis X, Stabilisierung von Sialoglykoproteinen, z. B. CEACAM1 (Zusammenfassung bei Keppler 2001). Die parenterale Gabe von ManNProp zeigte bei Ratten während dreiwöchiger Behandlung keine toxischen Zeichen.

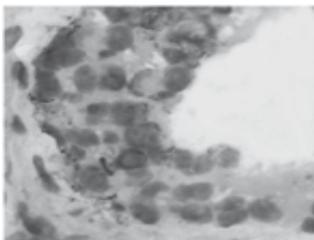
ANSTIEG DER TESTOSTERONKONZENTRATION IM SERUM BEHANDELTEN MÄUSE

Ausgangspunkt für die Versuche des Antrags waren Beobachtungen an Mäusen, die mit ManNProp behandelt wurden. Wir beobachteten ein dramatisch gesteigertes Bewegungsmuster, die Tiere waren teilweise auffällig aggressiv. Daher analysierten wir nach Gabe von ManNProp die Testes. Frau Prof. Tannapfel beschrieb eine gesteigerte Spermatogenese und eine Verbreiterung des Keimepithels (Abb. 3). Andere Organe wiesen keine Veränderungen auf.

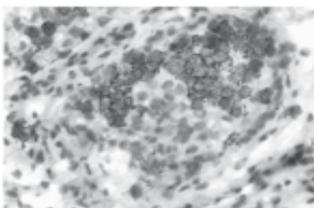


Expression in Basalzellen und ausreifenden Spermatozyten I/II
Spermaköpfe negativ
Färbung an der Zellmembran

Abb. 3: Histologie der Hoden nach ManNProp-Behandlung



Basalzellen



Pos. Zellmembranen

1. MESSUNGEN DES SERUMTESTOSTERONS: Aufgrund der Aggressivitätszunahme behandelter Tiere wurde die Serumkonzentration von Testosteron gemessen. Hierbei zeigte sich ein dramatischer Anstieg der Testosteronschwankungsbreite von 0.5–4.4 nmol/l (PBS, Mittelwert: 2.0 nmol/l) auf 0.5–54.4 nmol/l (4 Tage ManNAc, Mittelwert: 10.9 nmol/l) bzw. 1.0–53.0 nmol/l (4 Tage ManNProp, Mittelwert: 13.3 nmol/l) (Abb.4). Betrachtet man die Gesamtstreuung der gemessenen Werte, ist diese nach Behandlung um das 10fache erhöht.

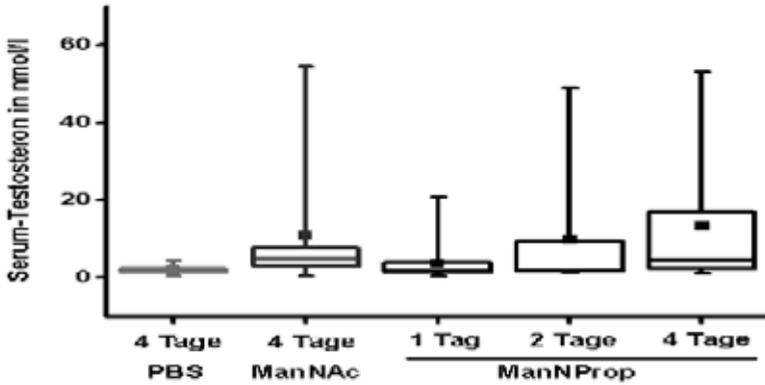


Abb. 4: Messung der Testosteronkonzentration im Serum

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) oder 1 g/kg KG ManNAc (Bahn 2) bzw. über 1, 2 und 4 Tage 200 mg/kg KG Ac4ManNProp (Bahn 3-5) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen und in Blutzellen + Serum getrennt. Die Messung der Testosteronkonzentrationen erfolgte mit Hilfe eines RIA-Kits der Firma Orion Diagnostica und einem ELISA-Verfahren, das durch unseren Kooperationspartner (Institut für klinische Chemie, Charité CBF) durchgeführt wurde. Pro Gruppe wurden mindestens 15 Tiere untersucht.

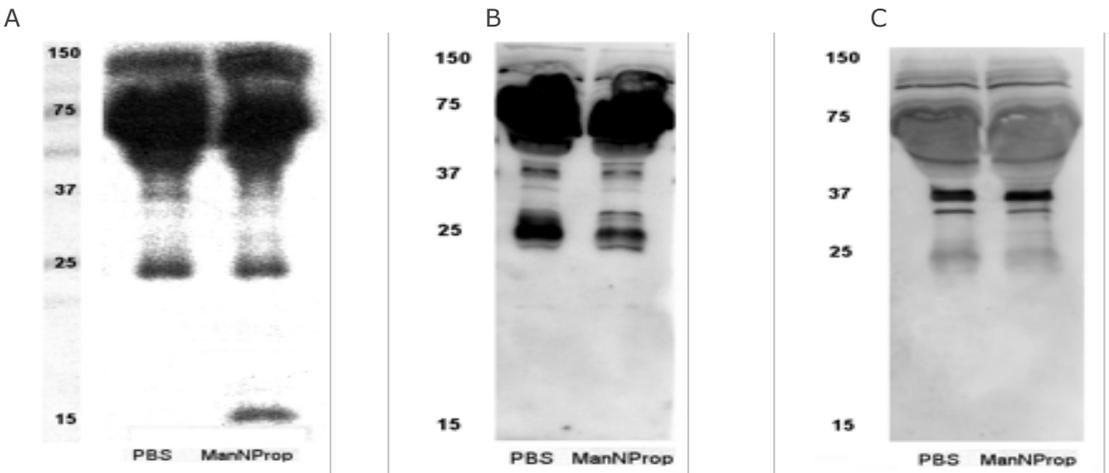


Abb. 5: Vergleich der Serumproteine PBS- bzw. ManNProp-behandelter Mäuse

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS (Bahn 1) bzw. 200 mg/kg KG Ac4ManNProp (Bahn 2) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen, die Seren wurden in 12,5%-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. A) Ponceaufärbung der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten und auf Nitrocellulosefolie übertragenen Serumproteine. B) mCgb-Antikörpertest nach 60 Tagen Immunisierung. C) mCgb-Antikörpertest nach 120 Tagen Immunisierung. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Versuche.

2. ANTIKÖRPER GEGEN β -HCG: Um einen ersten Anhaltspunkt für die Ursache des Testosteronanstiegs zu finden, wurde β -CG (Choriongonadotropin β) bzw. dessen Vertreter in der Maus mCgb (Mus musculus Choriongonadotropin β) gemessen. Hierzu führten wir zunächst einen Vergleich der Proteinsequenzen von β -hCG und mCgb durch, um zu prüfen, ob der käufliche Antikörper gegen β -hCG auch für Mäuseseren verwendbar ist. Da die Übereinstimmung allerdings nur 81,2 % betrug, entschlossen wir uns zur Gewinnung Anti-Peptid-spezifischer Antikörper. Die Analyse der mCgb-Sekundärstruktur zur Charakterisierung möglicher Epitope wurde nach der Methode von Parker und Kollegen vorgenommen (Parker 1986). NH₂-CDDPHLQASSSSKD-CONH₂ erwies sich als die geeignetste Sequenz zur Antikörpergewinnung, die käuflich erworben wurde. Mit diesem Peptid wurde sowohl ein Kaninchen und als auch ein Meerschweinchen über insgesamt 120 Tage immunisiert. Die Testung des gereinigten Antikörpers nach 60 (A) und 120 Tagen (B) ergab schließlich das in Abbildung 5 dargestellte Ergebnis. Wie erwartet zeigte sich nach 120 Tagen ein deutliches Signal bei 37 kDa (Mr des β -hCG bzw. mCgb, 36,5 kDa).

Für mCgb fand sich überraschenderweise zunächst kein Unterschied zwischen PBS- und ManNProp-behandelten Tieren. In einem anschließenden Versuch, bei dem ManNProp-behandelte Tiere mit hohen Testosteronwerten

solchen mit niedrigen Serumkonzentrationen gegenübergestellt wurden, ergab sich allerdings ein eindrucksvolles Bild. Die erhöhte Testosteronkonzentration korrelierte mit einem deutlichen mCgb-Signal (Abb. 6).

Im Rahmen dieser Untersuchung kamen zwei neue Fragen auf. Zum einen zeigte sich in der Ponceaufärbung der Serumproteine bei ManNProp-behandelten Tieren eine deutliche Bande bei 15 kDa, die bei keinem Kontrolltier gefunden werden konnte (Abb. 5). Zum anderen deutete sich nach ManNProp-Behandlung – wenngleich dies nur auf einer Kreuzreaktion des Antikörpers nach 60 Tagen Immunisierung beruhte – eine verminderte Expression eines 25 kDa großen Proteins an (Abb. 6). Die Polypeptide wurden mittels MALDI-TOF-Technik analysiert. Bei dem 25kDa-Fragment handelte es sich sehr wahrscheinlich um das Apolipoprotein A1 (Bestandteil des HDL), bei dem 15 kDa-Fragment um mTSARG1 (Testis and spermatogenesis cell related protein Mus musculus) (Abb. 7).

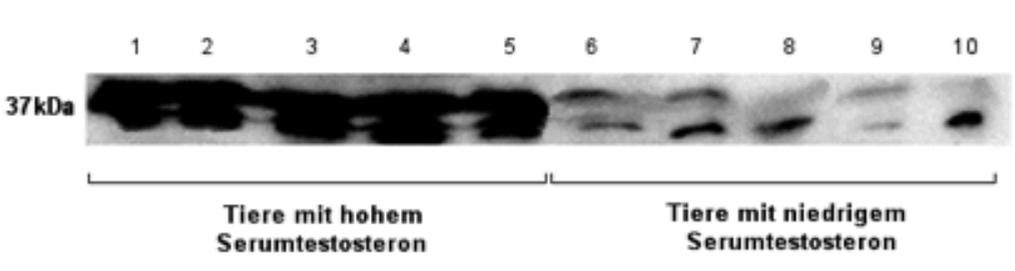


Abb. 6: mCgb-Konzentration in Relation zur Testosteronkonzentration

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich PBS, 1 g/kg KG ManNAc oder 200 mg/kg KG Ac4ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen und im Serum die Testosteronkonzentration ermittelt. Seren mit hoher Testosteronkonzentration wurden auf Bahn 1-5, Seren mit niedriger Testosteronkonzentration auf Bahn

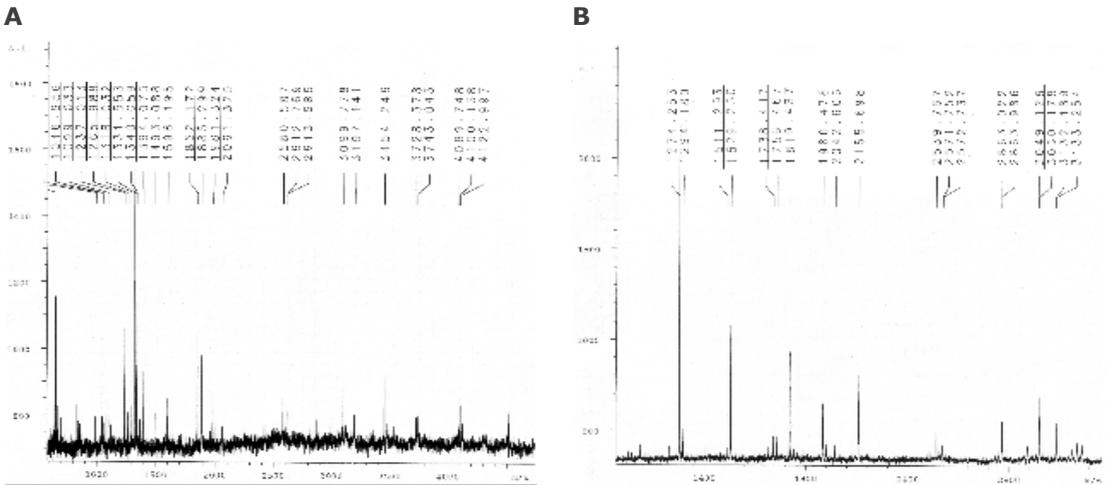


Abb. 7: Massenspektrometrische Analyse einer 25kDa- (A) und einer 15kDa- (B) Bande

Mäusen wurde über 4 Tage zweimal täglich 200 mg/kg KG Ac4ManNProp intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Blut entnommen, das Serum wurde im 12,5%-SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Danach wurden die Proteinbanden auf Höhe 25kDa (A) sowie 15kDa (B) ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-Technologie + PeptIdent einem Protein zugeordnet.

Diskussion

Aufgrund der zunehmenden Aggressivität der Tiere wurde die Testosteronkonzentration im Serum gemessen. Hierbei zeigte sich

eine beeindruckende Erhöhung um das Zehnfache gegenüber den Kontrolltieren. Auch im Vergleich mit zuvor publizierten Studien fanden sich lediglich Höchstwerte von 0.5-9 nmol/l (Jones 2003). Aufgrund der sehr

hohen Komplexität der Testosteron-Biosynthese ist eine einfache Erklärung vorerst schwierig.

Die Regulation der Testosteronbiosynthese und -sekretion wird über die Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden-Achse reguliert. Im Hypothalamus wird das luteinisierende Hormon-Releasing (LHR)-Hormon sezerniert, das die Hypophyse zur Sekretion des LH (oder Gonadoliberein) und des Follikel-stimulierenden Hormons (FSH) anregt. FSH und LH stimulieren zusammen mit Testosteron die Aktivität der Sertoli-Zellen (Eblen 2001). LH regt die Leydig-Zellen zur Androgensynthese an, wobei seine Sekretion zusätzlich durch die negative Rückkoppelung des Endproduktes kontrolliert wird. Das in den Sertoli-Zellen gebildete Glycoproteinhormon der TGF- β -Familie Inhibin B hemmt hingegen die FSH-Sekretion.

Neuerdings wurden zusätzlich Glutamyltripeptidamide der Struktur Glu-X-Pro (X=Gln, Glu, Phe) beschrieben. Sie wurden als Gonadine bezeichnet und hemmen die LH-Freisetzung in einer ähnlichen Weise wie FSH oder Inhibin B (Ruiz-Alcaraz 2005). Zudem wurde ebenfalls erst kürzlich ein weiteres inhibitorisches Polypeptid in reifen Leydig-Zellen gefunden, das Ghrelin. Der Ghrelin-Rezeptor wurde in Sertoli- und Leydig-Zellen nachgewiesen (Tena-Sempere 2005), wobei der Gesamtmechanismus im Zusammenspiel mit Leptin für die Regulation der

Energiebalance in den Gonaden verantwortlich zu sein scheint (Spicer 2001).

Die eigentliche Steroidfreisetzung wird durch Hyperpolarisierung der Sertoli-Zellen stimuliert, die durch einen Calcium-abhängigen Chloridefflux, welcher wiederum unter der Kontrolle von cAMP steht, erzielt wird (Panesar 2005). Leptin wirkt zusätzlich direkt auf die Leydig-Zellen, indem es die hCG-induzierte Testosteron-Sekretion hemmt (Spicer 2001). Des Weiteren steht die Testosteronbildung unter dem Einfluss der Schilddrüse, indem T3 die Zahl der LH-Rezeptoren von Leydig-Zellen und die mRNA-Konzentration steroidogener Enzyme bzw. Steroidsyntheseregulatorproteine, beispielsweise des Steroidogenic-Acute-Regulatory-Protein (StAR), induziert. T3-Rezeptoren wurden in frühen Keimzellen, Sertoli-, Leydig- und peritubulären Zellen nachgewiesen (Maran 2003).

Nach neueren Untersuchungen wurde der altersabhängige Abfall der Testosteronbiosynthese auch mit der Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Zusammenhang gebracht. Sie war in alten Mäusen auf das Drei- bis Vierfache angestiegen, und COX-2-Inhibitoren bewirkten einen Wiederanstieg der abgesunkenen Testosteron-Konzentration (Wang 2005). Außerdem kann die altersabhängige Zunahme des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG) die Entwicklung eines Testosteronmangels beschleunigen, da SHBG zum Abfall des ungebundenen und

damit biologisch aktiven Testosterons führt (Hammes 2005). Neben den erhöhten Testosteronwerten konnten wir auch in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Tannapfel eine bemerkenswerte Veränderung der Hodenhistologie behandelter Mäuse beobachten. So kam es nach einer 13tägigen ManNProp-Gabe zu einer deutlichen Verbreiterung der Keimzellepithelschicht und zu einer deutlichen Steigerung der Spermatogenese.

Auch hier fehlt eine überzeugende Erklärung, da es sich bei der Regulation der Spermatogenese um einen ebenfalls überaus komplexen Vorgang handelt, der durch endokrine und testikulär parakrine/autokrine Faktoren gesteuert wird. Gonadotropine regeln verschiedene parakrine Faktoren, allen voran die Interleukin-1-Familie und testikulären Hormone. Testikuläre Cytokine und Wachstumsfaktoren (IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , LIF, Inhibin B, IGF I und II, Vascular-Endothelial-Growth-Factor und Relaxin-like-Growth-Factor) steuern neben der Keimzellentwicklung die Funktion der Sertoli- und Leydig-Zellen. Die Cytokine und Wachstumsfaktoren werden in Immunzellen und in den interstitiellen, Samen-bildenden tubulären Kompartimenten der verschiedenen testikulären Zellen gebildet und sezerniert (Haider 2004; Huilehel 2004).

Einen ersten Erklärungsansatz erhofften wir uns mit der Analyse des β -Choriongonadotropin (β -CG). Dieses gehört neben

dem Luteinisierungshormon (=LH), dem Interstitialzellen-stimulierenden Hormon (=ICSH), dem Follikel-stimulierenden Hormon (=FSH) und dem Thyreoidea-stimulierenden Hormon (=TSH) zu der Familie der Glycoproteinhormone, die sowohl vom Hypophysenvorderlappen als auch von der Placenta gebildet und sezerniert werden. β -CG ist ein Heterodimer, das aus zwei nicht-kovalent verknüpften Untereinheiten besteht, der unspezifischen α -Untereinheit, die dieser ganzen Hormongruppe gemein ist, und der Hormon-spezifischen β -Untereinheit. Nur LH/CG - α / β -Dimere sind biologisch aktiv. Das CG- β -Protein weist eine 83%ige Identität mit dem LH- β -Protein auf und besitzt zusätzlich 24 Aminosäuren mit vier O-Glycosylierungsstellen. Dieser Strukturunterschied ist vermutlich für die längere Halblebenszeit bzw. biologische Aktivität von β -CG gegenüber LH verantwortlich. Die Glycanstruktur von β -CG wurde von Kobata und Takeuchi (1999) ermittelt.

Beide Hormone konkurrieren um denselben Rezeptor, der mit der Aktivierung der Proteinkinase A antwortet (Eblen 2001).

β -CG stimuliert die Leydig-Zellen der Testes zur Synthese und Sekretion von Testosteron, das für die Spermatogenese essentiell ist. Eine hohe β -CG-Konzentration führt auch in weiblichen Mäusen zu einer Steigerung der Testosteronbildung in den Ovarien (Richards 2005).

Da es zum Zeitpunkt unserer Versuche keinen käuflich erwerbbaeren Antikörper gegen den β -CG-Vertreter der Maus (mCgb) gab und die Übereinstimmung mit dem β -hCG (humanes Choriongonadotropin) nur 81,2 % betrug, stellte uns die Fa. Pineda einen speziellen Antikörper gegen mCgb her. Dieser konnte nach 120 Tagen Immunisierung verwendet werden und zeigte einen interessanten Befund. Das mCgb von PBS-Tieren mit oberhalb des Verteilungsspektrums liegenden Werten (um 4 nmol/l) stellte sich genauso hoch dar wie bei ManNac- oder ManNProp-Tieren mit oberhalb des Spektrums liegenden Werten (um 50 nmol/l). Die ManNProp-Mäuse mit niedrigem Testosteron (1-5 nmol/l) wiesen hingegen ebenso wenig mCgb auf wie die Kontrollmäuse mit wenig Testosteron (0.5-1 nmol).

Zusammengefasst könnte dies für die monatliche Schwankung der Testosteronsynthese sprechen. Eine Aufklärung, weshalb die Werte bei behandelten Tieren 10fach höher liegen, liefert diese Analyse allerdings leider nicht. Es bleibt zu vermuten, dass entweder die Halblebenszeit anderer Glycoproteinhormone oder des Transportmoleküls SHBG verlängert wird.

RESULTIERENDE PUBLIKATION:

Gagiannis D, Gossrau R, Reutter W, Zimmermann-Kordmann M, Horstkorte R. Engineering the sialic acid in organs of mice using N-propanoylmannosamine. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(2):297-306.

ANSCHRIFT DES VERFASSERS:

PROF. DR. MED. WERNER REUTTER,
Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Arnimallee 22, 14195 Berlin-Dahlem, Germany

Telefon: (030) 8445-1550

FAX: (030) 8445-1541

e-mail: werner.reutter@charite.de

ZITIERTE LITERATUR:

1. Campbell CT, Aich U, Weier CA, Wang JJ, Choi SS, Wen MW, Maisel W, Sampathkumar SG & Yarema KJ (2008). Targetting pro-invasive oncogenes with short chain fatty acid-hexosamine analogues inhibits the mobility of metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Med Chem* 51: 8135-49.
2. Eblen A, Bao S, Lei ZM, Nakajima ST & Rao CV (2001). The presence of functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human sperm. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2643-8.
3. Haider SG (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233: 181-241.
4. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lupp PB, Nykjaer A & Willnow TE (2005). Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 122: 751-62.

5. Huleihel M & Lunenfeld E (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 6: 259-68.
6. Jones RD, Pugh PJ, Hall J, Channer KS & Jones TH (2003). Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur J Endocrinol* 148: 111-20.
7. Kayser H, Zeitler R, Kannicht C, Grunow D, Nuck R & Reutter W (1992). Biosynthesis of a nonphysiological sialic acid in different rat organs, using N-propanoyl-D-hexosamines as precursors. *J Biol Chem* 267: 16934-8.
8. Keppler OT, Horstkorte R, Pawlita M, Schmidt C & Reutter W (2001). Biochemical Engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications. *Glycobiology* 11: 11R-18R.
9. Kobata A & Takeuchi M (1999). Structure, pathology and function of the N-linked sugar chains of human chorionic gonadotropin. *Biochim Biophys Acta* 1455: 315-26.
10. Mahal LK, Yarema KJ & Bertozzi C (1997). Engineering chemical reactivity on cell surfaces through oligosaccharide biosynthesis. *Science* 276: 1125-8.
11. Maran RR (2003). Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl* 49:375-88.
12. Panesar NS & Chan KW (2005). Chloride efflux in unstimulated Leydig cells causes autonomous cAMP production and stimulatory/inhibitory steroidogenesis with an efflux inhibitor. *Steroids* 70: 652-9.
13. Parker JM, Guo D & Hodges RS (1986). New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25: 5425-32.
14. Pon RA, Biggs NJ & Jennings H (2007). Polysialic acid bioengineering of neuronal cells by N-acyl sialic acid precursor treatment. *Glycobiology* 17: 249-60.
15. Richards JS (2005). Ovulation: Of new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 234: 75-9.
16. Ruiz-Alvaraz AJ & Del Rio-Garcia J (2005). Gonadins, a novel family of glutamyltripeptide amides present in the testis with activity in the hypophyseal-gonadal axis. *Regul Pept* 120: 93-101.
17. Spicer LJ (2001). Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol* 21: 251-70.
18. Tena-Sempere M (2005). Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J Endocrinol Invest* 28: 26-9.
19. Wang XJ, Shen CL, Dyson MT, Eimerl S, Orly J, Hutson JC & Stocco DM (2005). Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in teststerone biosynthesis. *Endocrinology* 146: 4202-8.

10. Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Kloster Banz 20. – 22. Juni 2010

Zusammenfassungen der Vorträge

Proteomics of Cell Lines from Disseminated Cancer from the Bone Marrow: Contribution of Cells with Stemness Phenotype to Risk of Metastasis and Therapy Resistance

KAI BARTKOWIAK, BURKHARD BRANDT and KLAUS PANTEL

Institute of Tumor Biology, University Medical Centre, Hamburg-Eppendorf, Germany

Dissemination of cancer cells from the primary tumor to secondary sites initiates distant metastasis. Disseminated tumor cells (DTC) are currently detected in bone marrow of 20 % of patients with breast and prostate cancer even in the absence of clinical signs of distant metastases. For this reason DTC detection is applied for prediction of future solid metastases using epithelial differentiation marker proteins like cytokeratins. It has been shown that DTC survive both adjuvant chemotherapy (e. g. Epirubicin) and the hostile microenvironmental conditions in the bone marrow (e. g. hypoxia) even for decades.

We performed a proteome analysis on cell lines derived from bone marrow breast, prostate and lung DTC. They share stem/progenitor cell cancer phenotypes lacking the expression of the majority of the cytokeratins.

Moreover the cells showed characteristic protein expression of "cells under stress", the unfolded protein response, which has been described as attributes of stemness. Like cancer stem cells of the primary breast tumor the DTC cell lines express only low levels of HER2 which might enable the cells to escape from anti-HER2 therapy. In consequence, the lack of cytokeratin expression grants this second population of DTC considerable escape from clinical detection so far. The immortal stem/progenitor DTCs might constantly replenish the pool of cytokeratin positive DTC in the bone marrow even years after removal of the primary tumor. Since stemness is associated with resistance against chemotherapy stem/progenitor bone marrow DTC might be the source for metastatic outgrowth many years after chemotherapy.

Lipocalin-2 (LCN2) expression in injured livers suggests novel diagnostic potential

ERAWAN BORKHAM-KAMPHORST and RALF WEISKIRCHEN

Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, RWTH University Hospital Aachen, Germany

Background and Aims: There are a number of liver function tests available to demonstrate the proper function of the liver. Moreover, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) and bilirubin are accurate markers of prolonged liver injury. However, there is a mandatory need for new markers that are indicative for early hepatic inflammatory responses. To analyse if lipocalin-2 (LCN2) is such a marker, we analysed LCN2 expression in experimental animal models of acute and chronic liver injury.

Methods: LCN2 expression was assessed through quantitative real-time PCR, Western blot and immunohistochemistry in cultured hepatic stellate cells (HSC) and primary hepatocytes that were isolated from untreated and carbon tetrachloride-injured liver. We analysed fibrotic livers from animals subjected to bile duct ligation or repetitive doses of CCl₄. We further analyzed LCN2 promoter activity in primary hepatocytes and HepG2 cells.

Results: We found LCN2 expression in early culture-activated HSC that declined at later culture times. LCN2 protein by contrast was not detectable in freshly isolated hepatocytes

but showed strong time-dependent upregulation and effective secretion upon culturing. In models of acute and chronic liver injury, LCN2 was rapidly induced. Immunohistochemistry and primary liver cell isolation identified injured hepatocytes as the main source of LCN2 production. LCN2 expression is rapidly induced by proinflammatory cytokines (i.e. IL-1 β and IL-6) but not by platelet-derived growth factor (PDGF)-BB or transforming growth factor (TGF)- β . Upregulated LCN2 levels correlated with serum AST or ALT and the inflammatory chemokine MCP-1/CCL2.

Conclusions: Down regulation of LCN2 in activated HSC suggests that this gene is not an indicator of fibrosis. However, the strong correlation of LCN2 expression with the degree of liver damage and inflammatory responses may imply a distinct diagnostic value for this lipocalin. We now analyse serum samples drawn from patients suffering from various liver diseases to evaluate if LCN2 is indicative for early inflammatory events in liver.

Molecular mechanisms of receptor activation by agonistic autoantibodies

BEATRICE BORNHOLZ (1), STEPHANIE SCHMITTMEIER (1), STEFANIE WEIDTKAMP-PETERS (2), FRITZ BOEGE (1)

(1) Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Heinrich-Heine-University, Medical School, Moorenstrasse 5, D-40225 Düsseldorf, Germany

(2) Institute of Molecular Physical Chemistry, Heinrich-Heine-University, Universitätsstr.1,40225 Düsseldorf, Germany

β 1-adrenergic hormone receptors (β 1-ARs) are the primary mediators of the ergotropic action of adrenergic agonists in the heart. Dysfunctions within this receptor pathway are associated with dilated cardiomyopathy (DCM), a heart condition characterised by left ventricular dilation and progressive loss of cardiac function. In patients with DCM, autoantibodies targeting β 1-ARs are often found, and it is becoming apparent that these antibodies can cause DCM.

Such antibodies are known to stimulate adenylate cyclase and MAP-kinases but the exact mode of action of autoantibodies on β 1-AR function is still unclear.

To address this question, we adopted a strategy previously used to measure the millisecond activation switch of G-protein coupled receptors in living cells. We incorporated a fluorescent resonance energy transfer (FRET) CFP/YFP pair into the human β 1-adrenergic receptor that via alterations of FRET efficiency detects agonist induced

conformational changes of the receptor.

This construct, stably expressed in human cells, revealed that autoantibodies purified by unselective immunabsorption from sera of DCM patients as well as healthy subjects indeed induced conformational changes in the β 1-AR to a similar extent as a full agonist isoproterenol. However, conformational changes were not specific for pathogenic autoantibodies and not stringently correlated to cAMP-stimulation. Moreover, autoantibodies did not induce internalisation of the receptors in a similar fashion as the agonistic ligand isoproterenol. To quantify effects on internalisation we used total internal reflection fluorescence microscopy (TIRF) showing that saturation concentrations of isoproterenol triggered internalisation of 20 % of the receptors. In contrast, the autoantibodies did not only fail to induce receptor internalisation themselves but were even able to completely block receptor internalisation induced by isoproterenol. Blockade of receptor internalisation was only seen with pathogenic

autoantibodies, In summary, these findings suggest that autoantibodies induce conformational changes of β 1-AR not stringently linked to G-protein coupling and that it may be the blockade of receptor internalisation that actually causes an increase in receptor

activity thought to be pathogenic in DCM. Our system appears suitable to clinically test DCM patient sera for the presence of such functionally active autoantibodies.

Der Einfluss von Mycophenolat-Mofetil auf die renale Fibrogenese

GUNNAR BRANDHORST (1), DARINKA. T. PETROVA (1), FRANZISKA BREHMER (1), OLIVER GROSS (2), NICOLAI MIOSGE (3), VICTOR W. ARMSTRONG (1), MICHAEL OELLERICH (1)

(1) Abt. Klinische Chemie / Zentrallabor, Universitätsmedizin Göttingen, (2) Abt. Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen, (3) Abt. Prothetik im Zentrum ZMK, Universitätsmedizin Göttingen

Einleitung: Mycophenolat-Mofetil (MMF) bewirkt über seinen aktiven Metaboliten Mycophenolsäure (MPA) eine potente unkompetitive Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) und damit der de novo Synthese von Guaninnukleotiden. Zusätzlich zu seiner immunsuppressiven Wirkung auf Lymphozyten wurde für MPA kürzlich auch eine Wirkung auf die Expression profibrotischer Gene sowie der Funktion und Proliferation von Fibroblasten beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von MPA auf die renale Fibrogenese untersucht.

Material und Methoden: COL4A3-defiziente Mäuse dienten als Modell für eine progrediente, renale Fibrose im Sinne des humanen Alport-Syndroms. 5 Gruppen mit je

n=7 Mäusen wurden ab der 6. Woche postnatal mit unterschiedlichen Dosen oral verabreichtem MMF behandelt (Placebo, 10, 50, 100 oder 150 mg/kg/d). Bei Einsetzen der terminalen Niereninsuffizienz, erkennbar durch die zunehmende Somnolenz, wurden die Tiere euthanasiert. Nach kardialer Punktion wurden MPA, MPAG, Kreatinin, Harnstoff und Gesamt-Protein im Serum bestimmt. Die Nierenhistologie wurde nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Trichrom nach Goldner sowie immunhistochemisch mit Darstellung des EHS-Laminins beurteilt. Proteinlysate der Nieren wurden in einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese separiert und differentiell exprimierte Proteine massenspektrometrisch identifiziert.

Ergebnisse: Bezüglich der Überlebenszeit der Versuchstiere zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der MMF-Dosis. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 65.9 (± 6.1) Tage. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff mit steigender Dosis signifikant erniedrigt im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Kreatinin -54% für 150 mg/kg/d im Vergleich zu Placebo). Es konnte eine hochsignifikante reziproke Korrelation zwischen den MPA-Talkonzentrationen und den Kreatininkonzentrationen festgestellt werden ($p < 0.01$, $r = -0.655$, Spearman-Rangkorrelation). MPA- und MPAG-Talkonzentrationen zeigten eine erhebliche interindividuelle Variabilität. Bei der histopathologischen Beurteilung zeigte sich kein wesentlicher Unterschied bezüglich der glomerulären Sklerose, jedoch war die tubulointerstitielle Fibrose mit steigender Dosis weniger ausgeprägt ($p < 0.05$, Chi-Quadrat-Test). Über eine massenspektrometrische Untersuchung konnten Proteine identifiziert werden, die in Abhängigkeit von der MMF-Dosis unterschiedlich reguliert werden und vermutlich bei der Regulation der epithelialen-mesenchymalen Transition beteiligt sind (Verringerte Expression unter MMF: ATPO, TAGL2, CAH1, TPD52, VA0D1, SERPH, GNAL, PSB6, EF1D, OTUB1, NDUS8, NAPSA, erhöhte Expression unter MMF: ACADM, ACY3, CK054, ACTB/G, ACTB, UBP5, ACY1).

Zusammenfassung: Die bisherigen Ergebnisse belegen keinen lebensverlängernden Effekt für MMF in einem Tiermodell für progrediente Nierenfibrose. Allerdings zeigte sich mit steigender MMF-Dosis eine deutlich verbesserte Nierenfunktion. In Übereinstimmung dazu konnte histologisch eine Verbesserung der tubulo-interstitiellen Fibrose nachgewiesen werden. Die Untersuchungen zur differentiellen Proteinexpression deuten daraufhin, dass MMF die interstitielle Fibrose über die Regulation der epithelialen-mesenchymalen Transition beeinflussen könnte.

Depletion of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) sensitizes towards apoptosis via p53 family-dependent mechanisms.

MAIK BRUNE (1), **MARTINA MÜLLER** (2), **PETER NAWROTH** (1), **ANGELIKA BIERHAUS** (1), **TOBIAS SCHILLING** (1)

(1) Department of Internal Medicine I, Endocrinology and Clinical Chemistry, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 410, 69120 Heidelberg, Germany

(2) Department of Internal Medicine IV, Hepatology and Gastroenterology, University of Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 410, 69120 Heidelberg, Germany

Background: The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is involved in osteoporosis, diabetic complications and chronic inflammation, conditions known to affect the sensitivity towards apoptosis [1,2]. Ligation of RAGE can lead into fundamentally different directions, promoting either survival or cell death, depending on tissue specific RAGE-expression and ligand availability. RAGE signaling below the threshold for induction of apoptosis generally confers proliferation and survival. Perpetuated expression of RAGE is implicated in linking chronic inflammation and cancer. RAGE expression was also found to be upregulated in many tumors and has been linked to increased malignancy [3]. This in vitro study investigated the influence of RAGE deficiency on the susceptibility towards apoptosis and the underlying molecular mechanisms of RAGE-mediated apoptosis regulation.

Results: Murine osteoblastic cells (MOC) were isolated from WT and RAGE-deficient

(Rage^{-/-}) mice and incubated in the absence of specific ligands of RAGE. Flow-cytometry analysis demonstrated that spontaneous and chemotherapy-induced apoptosis were significantly increased in Rage^{-/-} MOC, along with decreased protein levels of anti-apoptotic Bcl-2 and increased induction of intrinsic apoptosis. The individual cell surface density of the death receptor CD95 and CD95-mediated induction of apoptosis were significantly increased in Rage^{-/-} cells, whereas activation of NF- κ B-p65 was diminished. Western blot and luciferase assays indicated an increased activation of p53 and p73 in Rage^{-/-} MOC, ChIP analysis demonstrated increased binding of p53 and p73 to the CD95 promoter. RNA interference indicated a central role of increased p53 and p73 activity in the increased apoptosis in Rage^{-/-} cells.

Conclusion: Our data demonstrate a considerable increase in intrinsic and extrinsic apoptosis in the absence of RAGE, underlying the fundamental impact of RAGE on

cell survival, even in the absence of specific ligands. As RAGE-deficiency lowered the threshold for induction of apoptosis, conversely, expression of RAGE effectively favored cell survival in MOC. This RAGE-dependent inhibition of apoptosis involved repression of p53 and p73 activity. Investigating the RAGE-dependent regulation of apoptosis in primary cells - previous studies mainly focused on immortalized or cancer cell lines - allows an interpretation of our results on tissue affected by (chronic) inflammation. Therefore, the observed inhibition of apoptosis via p53/p73-dependent mechanisms further supports a central role for RAGE in setting the path from chronic inflammation to cancerogenesis [4–6]. Furthermore, the decreased surface density of CD95 may provide an additional mechanism for RAGE expressing pre-malignant cells to evade the immunologic anti-tumor response, since efficient eradication of cancer-prone cells by natural killer cells and cytotoxic T-cells depends on Summary: Our data provide evidence for RAGE modulating cell survival via p53 family regulation and identify p73 as a hitherto unrecognized factor contributing to the RAGE-mediated inhibition of apoptosis.

References:

1. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP (2005) Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *Journal of Molecular Medicine* 83: 876-886.
2. Philip BK, Childress PJ, Robling AG, Heller A, Nawroth PP, Bierhaus A, Bidwell JP (2010) RAGE supports parathyroid hormone-induced gains in femoral trabecular bone. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298: E714-E725.
3. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu CF, Hofmann MA, Kisslinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405: 354-360.
4. Bierhaus A, Nawroth PP (2009) Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 52: 2251-2263.
5. Gebhardt C, Riehl A, Durchdewald M, Nemeth J, Fursenberger G, Muller-Decker K, Enk A, Arnold B, Bierhaus A, Nawroth PP, Hess J, Angel P (2008) RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *Journal of Experimental Medicine* 205: 275-285.
6. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, Tang DL, Amin N, Im J, Rutledge R, Lin B, Amoscato AA, Zeh HJ, Lotze MT (2009) RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands, and their role in Cancer and Inflammation. *Journal of Translational Medicine* 7.

Die Rolle des Interleukin-6 bei der Regulation der hepatischen Glukoneogenese unter Fasten und körperlicher Aktivität

LOUISE FRITSCHÉ, MIRIAM HOENE, RAINER LEHMANN, HELGA ELLINGSGAARD, ANITA HENNIGE, ANN KATHRIN POHL, ERWIN D. SCHLEICHER, HANS U. HÄRING, CORA WEIGERT

Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung Innere Medizin IV, Zentrallabor, Otfried-Müller-Str 10, 72076 Tübingen

Fragestellung: Interleukin (IL)-6 ist ein inflammatorisches Zytokin, welches vor allem als wichtiger Marker für Sepsis und Trauma bekannt ist. Darüber hinaus wird IL-6 auch vom Fettgewebe freigesetzt und seine Rolle bei der Entstehung von hepatischer Insulinresistenz wurde gezeigt. Auf der anderen Seite wurde in den letzten Jahren postuliert, dass IL-6 als Trainingsfaktor fungiert, welcher, vom arbeitenden Muskel freigesetzt, in anderen Geweben metabolische Prozesse moduliert, die zur Bereitstellung von Energie in Form von Glukose und freien Fettsäuren führen. Hier wurde untersucht, welche Rolle IL-6 bei der hepatischen Glukoseproduktion während Fasten oder körperlicher Aktivität spielen könnte.

Methodik: Um den Einfluss von IL-6 auf die hepatische Glukoneogenese zu untersuchen, wurden Ratten Hepatoma Zellen unter Glukose-freien Bedingungen mit IL-6 stimuliert. Weitergehende Untersuchungen wurden in C57Bl6 und IL-6 knock out Mäusen durchgeführt, welche mit IL-6 behandelt bzw. gefastet wurden und in einem weiteren Experiment moderat anstrengendes Training

absolvieren mussten (Laufband, 60 Minuten). Es wurden verschiedene Metabolite gemessen und quantitative real-time PCR und Western Blot Analysen durchgeführt.

Ergebnisse: Die IL-6-Behandlung von Ratten Hepatoma Zellen führte zu einer erhöhten Glukoseproduktion und die Injektion des Zytokins in Wildtyp Mäuse erhöhte die Expression der hepatischen Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK), einem Schlüsselenzym der Glukoneogenese. Eine 16-stündige Nahrungskarenz in IL-6 knock out Mäusen zeigte keine veränderte hepatische Glukoseproduktion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen was sich in ähnlichen Plasma Glukosewerten sowie vergleichbarer PEPCK und Peroxisome-proliferator-activated receptor γ Coactivator (PGC1)- α Expression widerspiegelte. Moderate körperliche Aktivität führte zwar zu einem Anstieg der Plasma-IL-6 Spiegel in Wildtyp Mäusen, dennoch waren Glukose, Insulin, freie Fettsäuren und der hepatische Glykogengehalt zwischen Wildtyp und IL-6 knock out Mäusen nicht zu unterscheiden. In der Leber war die Expression eines weiteren Schlüsselenzyms der Glukoneogenese,

nämlich der hepatischen Glukose-6-Phosphatase, sowie die Expression von PGC-1 α , Insulin Rezeptor Substrat (IRS)-2 und Insulin like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)1 in beiden Gruppen nach der Laufbandbelastung gleichermaßen erhöht. Im ungestauten Zustand bei freiem Nahrungszugang waren in den IL-6-knock out Mäusen leichte metabolische Veränderungen zu verzeichnen, die sich in erhöhten Blutglukosewerten, erhöhten Insulin und freien Fettsäuren im Plasma, sowie erhöhtem hepatischem PEPCK Proteingehalt zeigten.

Schlussfolgerung: Unsere Untersuchungen belegen, das IL-6 nicht zwingend notwendig ist um unter physiologischen Bedingungen wie Fasten und körperliche Aktivität eine erhöhte Glukoseproduktion der Leber bewirken. Die IL-6 knock out Mäuse weisen jedoch einen metabolischen Phänotyp auf, dem eine milde Insulinresistenz zugrunde liegen könnte.

Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Simultanbestimmung von Tyrosinkinaseinhibitoren im Patientenplasma

LUTZ GÖTZE, HARALD RENZ, ANDREAS NOCKHER

Institut für klinische Chemie und molekulare Diagnostik, Phillips-Universität Marburg

Einleitung: Bei Tumorerkrankungen liegen oft Fehlregulationen, Überexpression oder genetische Aberration von intrazellulären oder Rezeptor-Tyrosinkinasen vor, die zu Defekten in der Zelldifferenzierung und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Daher wurden synthetische Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) entwickelt, die zur spezifischen Hemmung einzelner Kinasen bei verschiedenen Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Der gemeinsame Wirkmechanismus dieser Substanzen besteht in der Unterbrechung der entsprechenden Signalkaskade und Reduzierung der pathologisch gesteigerten

Zellproliferation. Der klinische Einsatz dieser Inhibitoren in der Onkotherapie erfolgt bisher meist ohne Bestimmung der Plasmaspiegel, da eine Quantifizierung nur mittels aufwendiger chromatographischer Bestimmungsmethoden möglich ist. Die Tandem-Massenspektrometrie ist eine empfindliche und hochselektive Analysenmethode, die im multiple reaction monitoring-Modus die gleichzeitige selektive Bestimmung und Quantifizierung von molekular sehr heterogenen Proteinkinaseinhibitoren erlaubt. Neuere Untersuchungen belegen, dass die Konzentrationsbestimmung der TKI im Patienten

entscheidende klinische Vorteile im Hinblick auf Therapie und Nebenwirkungen bietet.

Methoden: Ein neuer LC-Elektrospray Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) Test zur simultanen Bestimmung von 7 aktuell zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitoren (Dasatinib, Erlotinib, Imatinib, Lapatinib, Nilotinib, Sorafenib und Sunitinib) im Plasma zur Behandlung von CML, Bronchialkarzinom, gastrointestinalen Stromatumoren, Nierenzell-, Mamma- und Pankreaskarzinom wurde entwickelt und validiert. Nach Proteinpräzipitation mit Methanol wird eine chromatographische Trennung auf einer RP18-Säule durchgeführt. Die Retentionszeiten der Substanzen liegen zwischen 5 und 9 Minuten bei einer Gesamtlaufzeit von 12 Minuten. Die Wiederfindungen der Einzelanalyten liegen zwischen 80-120 %. Im Rahmen der Methodvalidation werden verschiedene

Probenmaterialien (Serum, Plasma) sowie Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Ein weiterer Schwerpunkt ist die Untersuchung pharmakokinetischer Interaktionen bei kombinierter Gabe verschiedener TKI.

Diskussion: Die Anwendung der TKI hat deutliche Fortschritte in der Tumorthherapie gebracht. Allerdings weisen diese Medikamente eine geringe therapeutischen Breite und teilweise erhebliche Nebenwirkungen auf. Interaktionen mit anderen Medikamenten und individueller Metabolismus können zu Wirkungsabschwächung mit unzureichender Antitumorwirkung oder aber zu toxischer Wirkungsverstärkung führen. Die quantitative Bestimmung der Plasmaspiegel von TKI soll dazu beitragen, die Anwendung dieser Medikamente hinsichtlich Therapieerfolg und Nebenwirkung zu optimieren.

Role of human xylosyltransferases in fibrotic extracellular matrix remodelling

DORIS HENDIG, CHISTINA ROCH, ARNE POTTHAST, BEMJAMIN MÜLLER, JOACHIM KUHN, CHRISTIAN PRANTE, CHRISTIAN GÖTTING AND KNUT KLEESIEK

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, 32545 Bad Oeynhausen, Germany

The family of proteoglycans represents polyanionic glycoproteins localized on the cell surface and in the extracellular matrix (ECM). Proteoglycans are involved in important

biological processes including cell-cell interaction, ligand-receptor binding as well as signal transduction. The characteristic hallmark of proteoglycans is the variety in number and

type of glycosaminoglycan chains which are covalently attached to a core protein via a tetrasaccharide linker. Biosynthesis of this tetrasaccharide linker is initiated by xylosyltransferase I (XYLT1, XT-I) and the homologous protein xylosyltransferase II (XYLT2, XT-II) and was found to be the rate-limiting step in glycosaminoglycan biosynthesis. Fibrotic diseases affecting heart, liver, lung and skin are often accompanied by increased biosynthesis and subsequent accumulation of proteoglycans in the ECM. Serum xylosyltransferase activity is a biochemical marker for the actual proteoglycan biosynthesis rate and can be used in clinical chemical diagnostics of fibrotic tissue alterations. The aim of our present study was to establish an in-vitro cell culture system to investigate the role of xylosyltransferase I and II in fibrotic ECM remodelling processes. Primary human dermal fibroblasts (NHDF) were cultured as conventional monolayer and in a three-dimensional collagen gel matrix. NHDF were then treated with the profibrotic cytokine transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1). Xylosyltransferase expression and activity was monitored by quantitative real-time PCR and by measuring enzymatic activity. Relative mRNA transcript levels were determined for selected proteoglycan core proteins and enzymes playing key roles in GAG biosynthesis and fibrotic ECM remodelling. Moreover, we quantified GAG composition using reverse-phase high performance

liquid chromatography. TGF- β 1 treatment enhanced gene expression of collagens I, II and III in NHDF in both culture systems pointing to an activation of fibrotic ECM remodelling. Proteoglycan core protein biosynthesis was also altered with increased gene expression of syndecan and versican whereas transcript levels of decorin and aggrecan were diminished. XYLT1 transcript levels were found to be significantly increased up to 6-fold by TGF- β 1-treatment in NHDF whereas XYLT2 mRNA expression was only marginally affected. This effect was much more pronounced in NHDF which were cultured in the three-dimensional collagen gel matrix. Correlative to these results, XT enzymatic activity was also enhanced up to 5-fold compared to the untreated controls in both cell culture systems. We further observed an increase in total GAG content. Here, preliminary results revealed enhanced chondroitin and heparan sulphate concentrations. In conclusion, our results strengthen the significance of XT expression and activity in active fibrotic ECM remodelling. Moreover, this easily accessible model now opens opportunities to develop strategies to control and inhibit fibrotic ECM remodelling by interfering with XT expression and activity, e.g. using siRNA, aptamers or inhibitory molecules.

Pathogen specific gene expression profile of polymorphonuclear neutrophils after coincubation with bacterial agents - prospects for a new way to diagnose bacterial infections?

SEBASTIAN HESSE (1), MANUELA BASTIAN (1), DIRK KOCZAN (2), BERND KREIKEMEIER, PETER SCHUFF-WERNER (1)

(1) Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; (2) Institute of Immunology; (3) Institute of Microbiology; University of Rostock, 18057 Rostock, Germany

Introduction and Aim: Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are the first line of cellular defense against pathogenic microorganisms, thus playing a crucial role in the innate immunity. The aim of our investigations was to analyze gene expression profiles of PMNs after in vitro coincubation with bacteria, comparing different species as well as antibiotic resistant strains.

Methods: Human PMNs were isolated from heparinized venous blood of healthy individuals using density gradient centrifugation. Staphylococcus aureus, Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Extended spectrum β -lactamase expressing Escherichia coli and Streptococcus pyogenes - all in the exponential growth phase - were coincubated at a ratio of 10:1 with PMNs. RNA was then purified 60 and 120 minutes afterwards. The RNAs from PMN with Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes and Escherichia coli were analyzed using Human Genome U133 plus 2.0 arrays (Affimetrix) and BiblioSphere (Genomatix). TaqMan quantitative real time PCR

(Affimetrix) was used for confirmation and validation of the microarray findings, focusing on transcription factors, signal transduction, cell cycle, apoptosis and DNA-damage, chemokine ligands, immune response and protein metabolism in all isolated RNAs.

Results: The number of regulated genes differed between the bacteria strains. The greatest positive regulation was observed after infection by E.coli (82 genes). The strongest downregulation occurred after infection with S. pyogenes (46 genes). In all infected PMN we found unified regulations like for EGR1 (transcription factor) and CXCL20 (chemokine ligand). As an example for pathogen specific patterns we found LYPD3 and ICAM4 being uniquely upregulated with E.coli.

Conclusion: The analysis of the host response on the level of PMN gene expression might have the potential not only for detecting bacterial infections but also for identifying mechanisms involved in pathogenicity and resistance to immunological defense.

Using DNA-Residence times of DNA Topoisomerases for Genotoxic Risk Assessment

FAIZA M. KALFALAH, CHRISTIAN MIELKE, MORTEN O. CHRISTENSEN and FRITZ BOEGE

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, University of Duesseldorf, Moorenstreet 5; D- 40225 Duesseldorf

Human DNA topoisomerases are ubiquitous enzymes that remove topological constraints from the cellular DNA, and are thus essentially required for DNA metabolism. They transiently cleave one or both strands of DNA. Although the strand breaks generated by these enzymes are transient in nature, they could be converted into permanent breaks when the topoisomerase catalytical cycle is inhibited. Several identified topoisomerase-inhibitory drugs are in wide clinical use as anticancer therapeutics since they represent some of the most successful drugs used for the treatment of human malignancies. On the other hand, the DNA-damaging and recombinogenic potential of topoisomerases is detrimental, since it eventually leads to the development of secondary leukemias in patients treated with regimens including topoisomerase directed drugs. In addition, a source of environmental topoisomerase toxication could be the diverse group of bioflavonoids, these polyphenols the most abundant source of natural antioxidants are also known to be potent topoisomerase inhibitors. Therefore, they are suspected to have profound genotoxic potential.

We characterized the activity and mechanism of action of some polyphenols against topoisomerases in living, cultivated cells in comparison to standard topoisomerase toxins widely applied in cancer therapy. Since DNA is an immobile component of the nucleus while Topoisomerase II is highly mobile, Topoisomerase II poisoning results in an immobilization of the enzymes. This has been previously demonstrated by photobleaching techniques in cells expressing biofluorescent Topo II α or II β by confocal microscopy. The recovery of Topoisomerase II-associated fluorescence after photobleaching (FRAP) was much slower in the presence of the strong Topoisomerase II poison and that at high doses of this drug the enzymes became virtually immobile. The genotoxicity appeared to result from a longer persistence of cleavage complexes induced by clinically used topoisomerases inhibitors (Etoposide) as compared to Bioflavonoides (Genistein). Here we can determine by the use of FRAP technique the genotoxicity. In summary, these findings make it unlikely that food constituents such as genistein or quercetin are efficient Topo II poisons in vivo.

Entwicklung und Validierung einer Isotopenverdünnungs-Referenzmethode für freies Cortisol im Serum basierend auf Equilibrium Dialyse mit on-line Festphasenextraktion und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

FABIAN KIRCHHOFF, MICHAEL VOGESER

Klinikum der Universität München, Institut für Klinische Chemie

Hintergrund: Die biologisch und analytisch akurate Charakterisierung der adrenocorticalen Funktionslage ist für eine Vielzahl medizinischer Fragestellungen von wesentlicher Bedeutung; dies gilt insbesondere für die Objektivierung von Streßeffekten und für die Intensivmedizin. Hierbei ist die Bestimmung des freien, nicht proteingebundenen Serum Cortisols (FSC) von besonderer Relevanz, wie inzwischen zahlreiche Untersuchungen zeigen. Da die FSC-Bestimmung grundsätzlich ein mehrschrittiges und komplexes Analysenverfahren darstellt, ist die Vergleichbarkeit von Studienresultaten bislang fraglich. Unser Ziel war daher die Entwicklung, Beschreibung und Validierung einer gut praktikablen Kandidaten-Referenzmethode als Voraussetzung für die Standardisierung der FSC-Analytik.

Methodik: Freies Cortisol wurde mittels Equilibrium-Dialyse (Verhältnis Probe zu Puffer 1:1, MWCO \sim 8000 Da, 16 h Inkubation bei 37°C) in einem proteinfreien Dialysatpuffer aus Serum gewonnen. Zum Dialysat wurde Fällungsreagenz, versetzt mit deuteriertem Cortisol als internem Standard gegeben.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand zur Analytik verwendet. Die Quantifizierung von Cortisol erfolgte mittels on-line Festphasenextraktion gekoppelt mit HPLC und Tandem-Massenspektrometrie. Quantifiziert wurde im positiven Ionisations-Modus im Multiple Reaction Monitoring (Massen-Übergang 363>121 für Cortisol und 366>121 für d3-Cortisol).

Resultate: Die Validierung erfolgte in 12 Analyseserien. Dabei wurde die Linearität der Methode im Konzentrationsbereich von 0,8 – 50 μ g/L bestätigt ($r > 0,999$ in allen Läufen). Freies Cortisol konnte mit einer mittleren Richtigkeit von 98,3% (range: 91,5%–109,9% in 3 Qualitätskontrollmaterialien) und einem mittleren Variationskoeffizienten von 4,7% (interassay) bzw. 3,4% (intraassay) bestimmt werden. Bei drei Serum-Proben (Probe 1: nächtliche Blutabnahme; Probe 2: morgendliche Blutabnahme; Probe 3: Proben-Pool von Intensivpatienten) lagen die interassay VK-Werte bei 9,4% (Probe 1), 7,8% (Probe 2), bzw. 3,2% (Probe 3).

Die Methode zeigte sich als spezifisch gegenüber relevanten bekannten isobaren

Molekülen von Cortisol. Im Rahmen einer umfangreichen sportmedizinischen Untersuchung erwies sich die Methode als gut praktikabel und robust.

Schlußfolgerung: Die von uns entwickelte ED-SPE-LC-MS/MS- erfüllt die

Voraussetzungen für die Etablierung eines Referenzsystems zur Messung von freiem Serum-Cortisol.

Die Konzentration von Folsäure ist positiv assoziiert mit 5-Methyltetrahydrofolat und Tetrahydrofolat im Plasma von folsäuresupplementierten älteren Menschen

SUSANNE H. KIRSCH, WOLFGANG HERRMANN, RIMA OBEID

Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin – Zentrallabor, Universitätsklinikum des Saarlandes, 66421 Homburg/Saar

Folate agieren als Coenzyme für viele biologische Stoffwechselreaktionen, unter anderem bei der de novo-Synthese von Purinen und Thymidylaten und der Methylierung von Homocystein zu Methionin. Häufig wird jedoch die empfohlene Tageseinnahme von 400 µg Folsäure nicht erreicht - die Supplementierung mit Folsäurepräparaten ist aufgrund des häufigen Mangels weit verbreitet. Jedoch gibt es Bedenken, ob die erhöhte Einnahme von Folsäure das Auftreten von unmetabolisierter Folsäure im Plasma herbeiführt. Dies könnte einen Cobalaminmangel maskieren, zu unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen führen oder das Entstehen von Krebs beschleunigen. Ein direkter Zusammenhang zwischen unmetabolisierter

Folsäure und einer Krankheitsentstehung konnte bislang nicht gezeigt werden.

Wir haben die Hypothese untersucht, ob eine therapeutische Gabe von Folsäure zu einer geminderten Reduktion von Folsäure zu Tetrahydrofolat (THF) und somit zu einer geringeren Bildung von 5-Methyltetrahydrofolat (5-MeTHF) führt. Dazu wurden 74 scheinbar gesunde ältere Menschen in einer 3-Wochen langen, randomisierten, triple-blinden, placebo-kontrollierten Studie untersucht. Die Probanden erhielten entweder einen Placebo oder eine Kombination von B-Vitaminen (täglich: 5 mg Folsäure und 40 mg Vitamin B6 (oral); dreimal pro Woche: 1,1 mg Folsäure, 1 mg Cyanocobalamin und 5 mg Vitamin B6 (Injektion s.c.)).

Die wichtigsten Folatformen (5-MeTHF, THF und Folsäure) sowie andere Parameter des Methionin- und Cholinreislaufes wurden mittels UPLC-MS/MS untersucht. In 26% der Probanden konnten messbare Konzentrationen an unmetabolisierter Folsäure vor Studienbeginn detektiert werden. Nach der Behandlung zeigten sich bei 41% der Placebogruppe und bei fast allen Probanden der Vitamingruppe unmetabolisierte Folsäure

(Median = 15,3 nmol/l). Plasmakonzentrationen von 5-MeTHF korrelierten vor der Behandlung positiv mit Folsäure und waren nach Supplementierung 10-fach erhöht. Höhere Konzentrationen an unmetabolisierter Folsäure korrelierten zu höheren Konzentrationen von THF und 5-MeTHF. Dies deutet darauf hin, dass supplementierte Folsäure effektiv zu THF bzw. 5-MeTHF konvertiert wurde.

Differentiation of the genus *Campylobacter* on the level of species and strains by surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

FRANKA MELCHER (1), HERBERT TOMASO (2), INGRID HÄNEL (2), THOMAS DEUFEL (1), MICHAEL KIEHNTOPF (1)

(1) Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics/Friedrich-Schiller-Universität Jena, Erlanger Allee 101, D-07747 Jena, Germany; (2) Friedrich Loeffler Institute, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Naumburgerstr. 96a, D-07743 Jena, Germany

Introduction: The genus *Campylobacter* contains several, widespread pathogens causing food-borne diseases of zoonotic character in humans as well as severe genital diseases of veterinary concern. In case of outbreaks the differentiation of closely related *Campylobacter* is essential for epidemiological studies, which investigate the routes of geographical spread and ways of transmission. Recent advances in spectrometry based methods e.g. SELDI-TOF-MS have shown that differentiation of bacterial isolates at

the level of species, subspecies and even strains is possible [1, 2]. Therefore the aim of this study was to use SELDI-TOF mass spectrometry for discrimination of *Campylobacter* species and strains from each other.

Methods: *Campylobacter* type-strains and isolates from different regions were cultured and subsequently subjected to physicochemical lysis. Protein lysates were then applied on CM10 and IMAC30 ProteinChip Array surfaces and analyzed using a PCS 4000 SELDI Protein Chip System (Bio-Rad Laboratories).

Results: By comparison of the spectra from *Campylobacter* (*C.*) *jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* and *C. lari* 166 and 160 peaks were differentially expressed ($P < 0.05$) on CM10 and IMAC30 chips, respectively. Differentially expressed peaks were used for development of classification trees that allow the discrimination of different *Campylobacter* species and even strains. Moreover species and strains can be sufficiently separated from each other by principal component (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). Spectra are highly reproducible since independent preparations of lysates of the single strains almost always grouped together.

Conclusions: Plasma protein profiling allows reproducible discrimination between species and even strains within the genus *Campylobacter* with high sensitivity and specificity. Thus SELDI-TOF mass spectrometry is an appropriate tool to differentiate species and even strains that can be instrumental for epidemiological studies.

References:

1. Al Dahouk S, Nöckler K, Scholz HC, Tomaso H, Bogumil R, Neubauer H, *J Immunol Methods* 2006; 309 (1-2): 34-47
2. Seibold E, Bogumil R, Vorderwülbecke S, Al Dahouk S, Buckendahl A, Tomaso H, Spletstoeser W, *Immunol Med Microbiol* 2007; 49 (3): 364-73

Identifizierung gering konzentrierter diagnostischer Glykoproteine in humanem Plasma mittels Affinitäts-Chromatographie und Massenspektrometrie

NAGHMEH MORTEZAI, CHRISTOPH WAGENER, FRIEDRICH BUCK

Institut für klinische Chemie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinstraße 52, 20246 Hamburg

Durch die Analyse der in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Plasma enthaltenen Peptide und Proteine können wichtige Aufschlüsse über Diagnose und Therapieverlauf von Krankheiten erhalten werden. So können etwa bestimmte Tumoren durch die Bestimmung charakteristischer Proteine, die sie in die Blutbahn abgeben, in einem früheren Stadium diagnostiziert oder im Therapieverlauf überwacht werden. Da es sich bei

den meisten bisher entdeckten diagnostisch relevanten Proteinen um glykosylierte Proteine handelt, kann das Glykoproteom des Blutes als vielversprechendes Proteom zur Entdeckung weiterer krankheits-spezifischer Proteine angesehen werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit die Suche nach diagnostisch relevanten Proteinen auf glykosylierte Plasmaproteine beschränkt werden. Die Analyse dieser meist gering konzentrierten

Glykoproteine erfordert allerdings aufgrund der großen Unterschiede in der Konzentration der einzelnen Plasmaproteine (109 -1010) zwingend eine Abreicherung der hoch abundanten Plasmaproteine, da der dynamische Bereich (also der Bereich, in dem eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Signalintensität besteht) für das derzeit empfindlichste Detektionsverfahren, die LC-MS, bei nur etwa 102-104 liegt.

Um die Analyse diagnostisch relevanter Glykoproteine in humanem Plasma zu ermöglichen, wurden in dieser Arbeit durch den Einsatz von Lektinen und Antikörpern zwei affinitätschromatographische Schritte miteinander kombiniert werden. Dafür wurde zunächst die Glykoproteomfraktion eines Plasmapools gesunder Kontrollpersonen über die affinitätschromatographische Aufarbeitung mit dem Pflanzenlektin Wheat Germ Agglutinin (WGA) gewonnen. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-Glukosamin- und Sialinsäure-Reste (sowohl von N- als auch von O-glykosidisch gebundenen Glykanen). Durch die Anreicherung glykosylierter Plasmaproteine über eine WGA-Affinitäts-Chromatographie wird somit eine entsprechende Abreicherung von Albumin, von anderen nicht glykosylierten Plasmaproteinen und von Glykoproteinen, die nicht spezifisch vom WGA-Lektin gebunden werden, erreicht. Die massenspektrometrische Analyse unbekannter gering konzentrierter Plasmaproteine ist jedoch durch die alleinige Anreicherung von Glykoproteinen

nicht möglich, da höher konzentrierte Plasmaproteine des untersuchten Glykoproteoms ihre Analyse erschweren, indem sie durch Überlagerungen eine massenspektrometrische Analyse niedrig konzentrierter Proteine nicht zulassen. Die Identifizierung niedrig konzentrierter krankheits-spezifischer Glykoproteine des Plasmas erfordert daher eine zusätzliche Abreicherung der hoch abundanten Plasmaproteine des untersuchten Teilglykoproteoms. Um eine zweite Reduktion der Plasmakomplexität zu erzielen, wurden gegen die WGA-gebundene Proteinfraktion aus Normalplasma Antikörper in einem Lama gewonnen und für eine zweite affinitätschromatographische Aufarbeitung des Plasmas eingesetzt. Cameliden (Kamele und Lamas) bilden neben konventionellen Antikörpern auch Antikörper, denen die leichte Kette und die CH1-Domäne fehlen. Im Vergleich zu konventionellen Antikörpern besitzen diese sogenannten Schwereketten-Antikörper eine höhere chemische und thermische Stabilität. Deshalb wurden aus dem Lama-Antiserum nur die Schwereketten-Antikörper isoliert und auf eine Matrix immobilisiert.

Nach Herstellung des Immunabsorbens wurde zum Nachweis unbekannter, gering konzentrierter, diagnostisch relevanter Glykoproteine im Blutplasma wie folgt vorgegangen werden: Das Blutplasma des Patienten wurde ebenfalls an das WGA-Lektin gebunden. Die WGA-gebundene Plasmaproteinfraktion des Patienten wurde dann weiter

über das Immunabsorbens passiert. Da die Cameliden-Antikörper nur gegen Glykoproteine gerichtet sind, die im Normalplasma vorkommen, sollten Proteine, die bedingt durch eine Krankheit ins Blut abgegeben werden, nicht gebunden werden. Diagnostisch relevante Glykoproteine sollten sich demnach in der nicht gebundenen Fraktion der Antikörper-Chromatographie (Durchfluss) befinden und sollten dann mittels einer LC-MS-Analyse identifiziert werden können.

Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurde ein glykosyliertes Testprotein eingesetzt, das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das im Plasma Gesunder nur in sehr geringen Mengen vorkommt, dessen Plasmakonzentration jedoch beim Kolonkarzinom erhöht ist. Das Normalplasma wurde hierfür mit CEA (20 pmol/ml) versetzt, die WGA-gebundene Glykoproteinfraktion isoliert und eine Abreicherung der Proteine des Normalplasmas mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Matrix aus immobilisierten

Cameliden-Schwerketten-Antikörpern durchgeführt. Hierbei wurde das CEA nicht signifikant vom Immunabsorbens gebunden. Im Durchfluss der Immun-Affinitäts-Chromatographie konnte das CEA mittels einer LC-MSE-Analyse detektiert werden. Anschließend wurden Plasmaproben von zwei Kolonkarzinompatienten über das Verfahren und unter den gleichen Bedingungen aufgearbeitet. Auch in diesem Fall konnte das CEA im Durchfluss der Affinitäts-Säule angereichert und mittels der LC-MSE-Analyse detektiert werden. Durch den Einsatz derartiger Affinitäts-Säulen eröffnet sich daher die Möglichkeit, durch die Abreicherung der im Plasma Gesunder regulär vorkommender Glykoproteine eine entsprechende Anreicherung von diagnostisch relevanten gering konzentrierten Markerproteinen zu erreichen und somit neue diagnostisch relevante gering konzentrierte Proteine zu entdecken.

Cardiac troponin release during exercise. What does it mean?

SILVIA GILKA MUNOZ SARAVIA, ANNEKATHRIN HABERLAND and INGOLF SCHIMKE

Charité – Universitätsmedizin Berlin

The cardiovascular benefit of exercise is well accepted. Consequently, million of people worldwide from youngsters to seniors

are now engaged in recreational running and other types of regular exercise. However, increasing ambition of amateur athletes has

resulted in more and more excessive training and participation in competitions such as half and regular marathons. This is clearly documented e.g. by the ten thousands of runners of the city marathons in Berlin and Boston. Although extremely rare, recently at the Berlin half marathon, one runner died immediately before finishing the race. Fatalities, mainly due to myocardial infarction or sudden death following pre-existing heart alterations or induced by the strenuous exercise independent of pre-existing heart disease cannot be completely prevented. Consequently, exercise induced chronic and acute stressing of the heart and its relationship to cardiac dysfunction is a current topic of discussion which needs more insight to prevent fatalities. Mainly the consequences of the cardiac troponin increase above the 99th percentile of the reference population seen in some of the athletes performing strenuous exercise are frequently debated.

In the present study, we used two different assays (4th generation cTnT assay, hs cTnT) to measure cTnT in 78 male marathon runners three times (pre-race, post-race, after two weeks of rest). To find the possible reason for cTnT increases induced by exercise, we analysed in parallel inflammation markers and markers for oxidative stress. To find any relationship between heart marker increase and cardiac dysfunction, all runners were echocardiographically examined at parallel time points.

Pre-race, in agree with recent studies, the 4th generation assay failed to demonstrate cTnT positivity ($>$ test specific LLD). In contrast using the highly sensitive assay, 28 % of the participants were positive for cTnT ($>$ LLD of hs cTnT assay).

Post-race, cTnT as measured with the 4th generation assay was detectable in 43 % of the runners ($>$ LLD = 99th percentile cut off), but all runners had detectable cTnT values ($>$ LLD) when measured with the highly sensitive assay. In even 94 % of these cTnT-positive runners, the value exceeded the 99th percentile cut off found for the highly sensitive assay (13 ng/L).

The cTnT release correlated significantly with inflammation induced by the exercise which was indicated by post-race leukocytosis and IL-6 increase. Faster runners presented significantly stronger cTnT releases and inflammation signs. As evidenced by the echocardiographic examination immediately after finishing the race, only minor signs of temporary altered right heart myocardial function were seen.

Consequently, there was no profound indication that the cTnT release was related to distinct irreversible cardiac alteration. However, echocardiographic examination – although performed directly after the race – reflects rather the heart function at the time point, the rest period has already started. In contrast, high cardiac troponin concentration

found immediately after the race informs retrospectively about the heart stress during race.

Our data support the hypothesis that especially inflammation could be an inductor for the release of cardiac troponin in exercise. Consequently, cTnT formerly considered to be a necrosis marker, must be now more and more accepted to be a potential indicator for mild or transient heart stress reactions such as induced by inflammation. However, we can not absolutely exclude that

- beside reversible cardiac membrane leakage suggested as reason for mild cardiac troponin release – there is anyhow irreversible cardiac cell loss induced by the exercise associated inflammation, not relevant for ECG and echocardiography examination but detectable now with the highly sensitive cardiac troponin assays. In this case in our view, it seems to be necessary to answer the question: Is there any bad prognosis for subjects who are frequently affected by low level cardiac troponin release following exercise?

A Novel Method of vWF-Multimers-Analysis by High-Sensitivity Fluorescence Detection

HELMUT W. OTT, GÜNTER WEIGEL, ANDREA GRIESMACHER

Institute for Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University Innsbruck

Background: von Willebrand Factor (vWF) is a large multimeric glycoprotein that circulates in plasma as a series of multimers. Quantitative and/or qualitative abnormalities of vWF result in a bleeding disorder named von Willebrand's disease. vWF disease is characterized essentially by prolonged bleeding time and is classified into three main types: type 1 is a partial quantitative deficiency; type 2 is a qualitative defect which is further subdivided into four categories: 2A, 2B, 2N, 2M. Type 3 is characterized by a complete loss of vWF protein in plasma. Multi-mer-analysis allows for the classification of

the various types of von Willebrand disease in human plasma.

Methods: vWF is separated by two-chamber-vertical SDS-gel electrophoresis through high- and low-resolving agarose gels. Electrophoretic separation is followed by Western-Blotting and a newly developed high-sensitivity fluorescence detection (HSFD) method using an anti-vWF primary antibody (DAKO), a Cy5-labeled secondary antibody (Amersham) and fluorescence scanning on a Typhoon imager (Amersham).

Results and Conclusion: The high-sensitivity fluorescence detection presented here allows for the visualization of all types of vWD and also for a rapid classification of all vWD types. The relative simplicity to directly compare high and low resolving gels, the

high sensitivity especially for the detection of satellite bands within the multimeric pattern as well as the fast turnaround time favor the presented method for the application in a clinical routine setting.

Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids and may be treatable by L-serine supplementation

ANKE PENNO (1), FLORIAN EICHLER (2), ARNOLD VON ECKARDSTEIN (1), THORSTEN HORNEMANN (1)

(1) Institute for Clinical Chemistry, University Hospital Zurich, Raemistrasse 100, CH-8091 Zurich, Switzerland; (2) MGH Neuroscience Center, Harvard Medical School, 2Day Laboratory for Neuromuscular Research

HSAN1 is an inherited neuropathy found to be associated with several missense mutations in the SPTLC1 subunit of serine palmitoyltransferase (SPT). SPT catalyzes the condensation of serine and palmitoyl-CoA, the initial step in the de novo synthesis of sphingolipids. We found that the HSAN1 mutations induce a shift in the catalytic activity of SPT which leads to the formation of the two atypical deoxy-sphingoid bases (DSB) 1-deoxy-sphinganine and 1-deoxymethyl-sphinganine. Both metabolites lack the C1 hydroxyl group of sphinganine, and can therefore neither be converted to complex sphingolipids nor degraded. Consequently, they accumulate in the cell, as demonstrated in HEK293 cells overexpressing mutant

SPTLC1 and lymphoblasts of HSAN1 patients. Elevated DSB levels were also found in the plasma of HSAN1 patients, and confirmed in three groups of HSAN1 patients with different SPTLC1 mutations. In addition, mice expressing mutant SPTLC1 show elevated levels of the DSBs in plasma and tissue and also develop an age dependent peripheral neuropathy. The DSBs show pronounced neurotoxic effects on cultured sensory neurons in vitro. Based on these observations we proposed that HSAN1 is a gain of function disorder, which is caused by the formation of atypical and neurotoxic sphingolipid metabolites. Interestingly the generation of the DSBs can efficiently be suppressed by an increased L-serine media concentration

in cell culture. Furthermore, HSAN1 mutant mice which received a 10% enriched serine diet showed a reduction in plasma DSBs to wild type levels after only two days of feeding. This data could be confirmed in a first human trial in which HSAN1 patients received 200 or 400 mg L-serine/kg bodyweight/

day for 10 weeks. The plasma DSBs dropped significantly during the supplementation period, reached healthy reference levels and increased again in the two weeks wash-out phase. We therefore conclude that HSAN1 may be treatable by a life-long serine supplementation therapy.

Anwendung der Oberflächenplasmonresonanz-Biosensorik zur Analyse von Antiphospholipid-Antikörpern

MARKUS THALER, CAROLIN MÜLLER, ALICE SCHLICHTIGER, PETER B. LUPPA

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) ist eine Autoimmunerkrankung, die klinisch durch Thrombosen und Schwangerschaftskomplikationen charakterisiert ist. Sog. Antiphospholipid-Antikörper (aPL) bilden das serologische Korrelat des APS, wobei Cardiolipin (CL) und das Phospholipid-bindende Serumprotein β 2-Glykoprotein I (β 2-GPI) als die beiden Hauptantigene gelten. In der aktuell gültigen Sydney-Klassifikation werden daher der Nachweis von Auto-Antikörpern gegen CL (anti-CL) oder β 2-GPI (anti- β 2-GPI) als diagnostische Kriterien für das APS geführt.

Die Bestimmung von anti- β 2-GPI stellt aufgrund mangelhafter Standardisierung nach wie vor eine analytische Herausforderung dar. Es wurde daher untersucht, welchen

Einfluss die verwendete β 2-GPI-Präparation auf die Ergebnisse von anti- β 2-GPI-ELISAs hat. Alle β 2-GPI-Präparationen trennen vergleichbar gut zwischen krank und gesund auf. Jedoch variieren, trotz Verwendung der international empfohlenen monoklonalen Kalibratoren, die ermittelten anti- β 2-GPI-Titer abhängig von der eingesetzten β 2-GPI-Präparation sehr stark. Zur Klärung der Ursache wurde ein Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR)-Biosensorsystem zur Detektion von anti- β 2-GPI eingesetzt [1]. Dieses wurde im Rahmen eines von der DGKL geförderten Projektes entwickelt. Unterschiedliche Reaktivitäten sowohl der monoklonalen Kalibratoren als auch der in den Seren enthaltenen anti- β 2-GPI gegenüber den verschiedenen

β 2-GPI-Präparationen konnten letztendlich als Hauptursachen für die beobachtete mangelhafte Inter-Assay Vergleichbarkeit identifiziert werden [2].

Zur Verbesserung der Labordiagnostik des APS wurden β 2-GPI-abgeleitete Hexapeptide als ELISA-Antigene vorgeschlagen. Mehrere Hexapeptide wurden daher synthetisiert bzw. rekombinant exprimiert und im ELISA auf ihre Fähigkeit hin untersucht, kranke von gesunden Seren zu unterscheiden. Alle Peptide waren dabei dem β 2-GPI unterlegen. Als zweite, unabhängige Methode wurden die gleichen Peptide auch im SPR-Biosensor eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine unspezifische Bindung aller Seren, d.h. sowohl der von APS-Patienten als auch der von gesunden Kontrollen, an die Hexapeptide. Die Ergebnisse der ELISA-Experimente wurden damit bestätigt. β 2-GPI-abgeleitete Peptide bringen daher keinen über den konventionellen anti- β 2-GPI-ELISA hinausgehenden Nutzen für die Primärdiagnostik des APS.

Um das diagnostische Panel zu komplettieren, wurde weiterhin an der Etablierung einer Oberfläche zur Detektion von anti-CL im SPR-Biosensor gearbeitet. Hierzu wurde ein neuartiges CL-Derivat mit einer endständig an eine der Fettsäuren gebundenen Amino-Gruppe [3] kovalent auf einer funktionalisierten n-Alkanthiol self assembling monolayer immobilisiert. Vorläufige Experimente mit dieser innovativen Chip-Oberfläche konnten

zeigen, dass Seren von Patienten mit anti-CL eine signifikante Bindung aufweisen, während Seren gesunder Probanden keine Anbindung zeigen.

Zusammenfassend stellt die SPR-Biosensorik eine geeignete Methode zur Untersuchung der Interaktion von aPL mit einer Vielzahl möglicher Antigene dar. Die hierbei gewonnenen Informationen über Affinität und Spezifität der aPL können dazu dienen, die Ursachen für Probleme der konventionellen ELISA-Systeme zu klären und damit zu einer Verbesserung der Diagnostik des APS beizutragen.

Referenzen:

1. Metzger J, von Landenberg P, Kehrel M, Buhl A, Lackner KJ, Lippa PB. Biosensor analysis of beta2-glycoprotein I-reactive autoantibodies: evidence for isotype-specific binding and differentiation of pathogenic from infection-induced antibodies. *Clin Chem* 2007;53:1137-43.
2. Müller C, Schlichtiger A, Balling G, Steigerwald U, Lippa PB, Thaler M. Standardized antigen preparation to achieve comparability of anti- β 2-glycoprotein I assays. *Thrombosis research*, in Druck.
3. Johns MK, Yin MX, Conway SJ, Robinson DE, Wong LS, Bamert R, Wettenhall RE, Holmes AB. Synthesis and biological evaluation of a novel cardiolipin affinity matrix. *Org Biomol Chem* 2009;7:3691-7.

Pathobiochemical mechanisms of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* infection in endocarditis

TANJA VOLLMER, DENNIS HINSE, KNUT KLEESIEK and JENS DREIER

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

Viridans streptococci are the most important pathogens responsible for native valve infective endocarditis (IE). However PCR analysis of surgically removed heart valves from patients with IE revealed a significant incidence of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*S. gallolyticus*) as a causative agent. Numerous reports also demonstrated an association between *S. gallolyticus* IE and gastrointestinal neoplasia. The adherence of circulating bacteria to damaged heart tissues and subsequent colonization and persistence of bacteria are the crucial factors in streptococcal IE. Pathogenesis and several virulence factors have been examined for other streptococci, however, the knowledge of similar mechanisms that contribute pathogenesis in *S. gallolyticus* IE is limited. In the present study, we analyzed 23 *S. gallolyticus* strains from different origins (human IE-derived isolates, other human clinical isolates, animal isolates) for the presence of virulence factors by Southern Blot or PCR analysis. We confirmed the presence of the genes of two known virulence factors from nearly related species (*fimB* [fibrinogen-binding protein]: all strains, *gtf* [glycosyltransferase]:

19 of 23 strains) and demonstrated the presence of the gene of one new virulence factor (*pilB* [pilus-associated protein]: 9 of 23 strains). To elucidate further potential virulence genes of this bacterium, we performed ultra-high-throughput DNA sequencing using the 545 sequencing platform (genome sequencer FLX, Roche). Preliminary analysis of the *S. gallolyticus* draft genome sequence revealed a genome size of 2.3 mbp with a GC-content of 37.5 % and 2283 predicted genes, including 225 genes with a putative virulence function. To investigate the bacterial adhesion and invasion characteristics of these strains, we established an experimental in vitro IE cell culture model using the human endothelial cell line EA.hy926. With the exception of one animal isolate, all strains had the capacity to adhere to and invade endothelial cells, significantly differing among themselves. The usage of three different in vitro models (EA.hy926 cells, primary endothelial cells [HUVECs], mechanical stretched cells) revealed no influence on the adhesion and invasion ability. Adhesion to eight components of the extracellular

matrix (ECM) and the ability to form biofilms in vitro was examined in order to reveal features of *S. gallolyticus* endothelial infection. All isolates showed the capability to form biofilms. Adherence to the ECM proteins collagen I, II and IV revealed the highest values, followed by fibrinogen, tenascin and laminin. Moreover, a strong correlation was observed in binding to these proteins by the analyzed strains. In summary, our study provides the first description of *S. gallolyticus* adhesion and invasion of human endothelial

cells demonstrating important initial information of strain variability, behaviour and characteristics of this as yet barely analyzed pathogen. Further studies are now required for identification and functionality testing of predicted virulence genes to gain inside the pathomechanisms of *S. gallolyticus* IE.

Financial support of the "FoRUM-Stiftung" of the Ruhr-Universität Bochum is gratefully acknowledged.

A novel interaction of protease activated receptor 3 and 2 mediates protective signaling of activated protein C in human podocytes

HONGJIE WANG, THATI MADHUSUDHAN, PETER P. NAWROTH, BEREND ISERMANN

Section of Clinical Chemistry, Department of Internal Medicine I and Clinical Chemistry, University of Heidelberg

Background: The cytoprotective effects of activated protein C (aPC) are well established 1. In contrast, the receptors and signaling mechanism through which aPC conveys cytoprotection remain incompletely defined. Endothelial dysfunction with impaired protein C (PC) activation is mechanistically linked to diabetic glomerulopathy 2. Activated PC inhibits glucose induced apoptosis in endothelial cells via the protease activated receptor-1 (PAR-1) and the endothelial protein C receptor (EPCR), while the signaling mechanism

through which aPC prevents podocyte apoptosis remains unknown.

Experimental Approach: Human immortalized podocytes were used for in vitro analyses of aPC dependent signaling. Expression of PARs, Thrombomodulin (TM), and EPCR was determined by RT-PCR, immunoblotting and immunohistochemical staining. Protease dependent signaling was modulated using activating peptides, blocking antibodies, and shRNA. Co-immunoprecipitation experiments were performed to characterize receptor

interactions. Histological sections of diabetic patients with various degrees of diabetic nephropathy were analyzed to gain insights into the physiological relevance of the in vitro findings for glomerular disease in humans.

Results: We describe a novel aPC / PAR dependent antiapoptotic signaling mechanism in human podocytes. In podocytes aPC inhibits apoptosis through proteolytic activation of PAR-3 and induced heterodimerization of PAR-2 / PAR-3 independent of EPCR and PAR-1. PAR-3 is not signaling competent itself in podocytes as heterodimerization with PAR-2 is strictly required. This dynamic receptor rearrangement depends on caveolin-1 and is associated with PAR-2 / PAR-3 dissociation from caveolin-1 and dephosphorylation of caveolin-1. PAR-3 activation and heterodimerization with PAR-2 activates ERK1/2 and RhoA, which are required for aPC's antiapoptotic effect in podocytes.

Summary and Discussion: These results identify a novel interaction of PAR's and a new aPC dependent signaling pathway in podocytes, demonstrating the cell specificity and plasticity of the mechanisms underlying the phenomenon aPC mediated cytoprotection. The evidence of specific, dynamic signaling complexes underlying aPC mediated cytoprotection may allow the design of cell type specific targeted therapies.

Acknowledgement: This work was supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (IS 67/2-4) and a grant from the Stiftung Pathobiochemie.

References:

1. Mosnier, L.O., Zlokovic, B.V., & Griffin, J.H. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 109, 3161-3172 (2007).
2. Isermann, B. et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat. Med.* 13, 1349-1358 (2007).

Lipidom-Analyse mit Hilfe von LC-MS/MS

JAN WÖHRL, KARL WINKLER, GERHARD PÜTZ

Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum Freiburg

Einleitung: Liposome als Wirkstofftransporter werden im klinischen Bereich bereits mehrfach eingesetzt. Durch einfache Oberflächenmodifizierungen können diese für verschiedenste Applikationen angewandt

werden. In unserem Arbeitskreis wurde mit Hilfe eines Zellproliferationsassays (MTT-Test) die zeitabhängige Wirkung synthetischer Diacyl-Phosphatidylcholins mit Acylresten zwischen 12 und 22 Kohlenstoffatomen

und unterschiedlichen Sättigungsgraden auf CHO-Zellen getestet. Einige Diacyl-Phosphatidylcholine zeigten toxische Wirkungen auf die Zellen. Um die Wirkung der Diacyl-Phosphatidylcholine auf das Lipidom der Zelle besser verstehen zu können, wurde ein LC-MS/MS-Verfahren entwickelt.

Methodenteil: Die Lipide wurden aus CHO – Zellen mit dem MTBE – Extraktionsverfahren nach Shevchenko und Schwudke extrahiert und mit Hilfe eines LC-MS/MS (Agilent 1100 HPLC-Anlage, Applied Biosystems API 2000 Triplequadrupolmassenspektrometer) im MRM-Modus analysiert. Gemessen wurde im negativen und positiven Ionenmodus. Als HPLC-Säule kam eine Kinetex 2.6u HILIC 100A (100 x 2,1 mm) der Firma Phenomenex zum Einsatz. Die Lipide wurden mit dem Gradientenverfahren getrennt und die mobile Phase bestand aus Acetonitril/

Methanol (versetzt mit 0.24 % Ammoniumformiat). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Analyst 1.5 – Software.

Ergebnisse: Durch Wahl eines entsprechenden Gradienten aus Methanol (versetzt mit 0.24 % Ammoniumformiat) und Acetonitril konnten die Lipide sowohl chromatographisch, als auch durch Bildung spezifischer Massenfragmente separiert und quantifiziert werden. Mit dem Verfahren konnten aus Aliquoten von 106 – CHO - Zellen Phosphatidylcholine, Lysophosphatidylcholine, Phosphatidsäuren, Phosphatidylinositole, Phosphatidylserine, Phosphatidylglycerole, Plasmalogene, Triacylglycerole, Diacylglycerole, Sphingomyeline, Ceramide und Sphingosine analysiert werden. Das Verfahren eignet sich sehr gut für Lipidomanalysen von Zellen, aber auch von Plasma.

Targeted Proteomics for Metabolic Diseases

ALEXANDER LEICHTLE, MARTIN FIEDLER, JOACHIM THIERY, UTA CEGLAREK

University Hospital Leipzig, Leipzig

Purpose: The incidence of lifestyle-based metabolic diseases is growing to epidemic proportions, and current trends suggest further increase worldwide. Early detection and treatment of metabolic disorders are

thus imperative to improve global health. However, the complex multifactorial disease processes involve multiple pathways that can be influenced by both genetic and environmental factors. Recent GWA studies pointed

at several loci associated with metabolic diseases and their phenotypes - nevertheless there is still a gap between genome and transcriptome on the one and the routinely assessed metabolome and phenotype on the other side. In-depth knowledge of the proteomic link between both is necessary to pin down the statistical associations onto the underlying pathways.

Methods: We identified promising proteomic targets for metabolic diseases by a comparative meta-analysis of published GWAs, known marker proteins, and candidates from our Leipzig Heart Study. To quantify the target peptides we applied innovative analytical strategies including fast liquid chromatography and quadrupole/linear ion trap mass spectrometry (QTRAP LC/MS/MS system) using proteotypic peptides and isotope-labeled standards after tryptic digestion.

Results: Preliminary results show the great potential of the approach. Even without depletion we could quantify CrP, ApoA1, Apo B100 and Apo E in only 100µL of serum, further candidate peptides as e.g. Sortilin1, NT-proBNP etc. are currently targeted.

Outlook: Targeting proteomics on the candidate peptides of metabolic diseases emerging from GWAs, epidemiological studies and clinical evidence might be a promising approach to fortify the associations between transcriptome and metabolome with functional knowledge. Quantitative data on

these proteomic links may elucidate the pathways whereon disease-related loci affect the metabolic phenotype.

Dissertation

Ozoniertes Low Density Lipoprotein (OzLDL) - Herstellung und Effekte auf NF- κ -B-assoziierte Signalwege

Dissertation von (Dr. rer. nat.) CHRISTIAN CAPPELLO am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München (Direktor: PROF. DR. MED. DIETER NEUMEIER) und dem Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: PROF. DR. MED. KORBINIAN BRAND)

NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren spielen sowohl bei immunologischen und entzündlichen Prozessen als auch bei Proliferation und Apoptose eine zentrale Rolle. Es wird angenommen, dass eine Dysregulation des NF- κ B-Systems auch bei der Entstehung von Arteriosklerose eine wichtige Bedeutung besitzt. Neuere Studien geben Hinweise auf eine Produktion von Ozon durch Antigen-Antikörper-Komplexe als Teil der Immunabwehr des menschlichen Körpers. Außerdem liegen Daten vor, die für das Vorkommen von Ozon in arteriosklerotischem Gewebe sprechen.

In dieser Arbeit sollten die Modifikationen von Low density-Lipoprotein (LDL) charakterisiert werden, die bei einer Reaktion mit Ozon entstehen. Im Zentrum des vorgestellten Projekts stand die Untersuchung der modulatorischen Effekte von ozoniertem LDL (ozLDL) auf die durch LPS (bakterielles Lipopolysaccharid) sowie durch das Zytokin TNF induzierte NF- κ B-assoziierte Signalübertragung/Transkription in monozytären Zellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ozLDL erstmals hergestellt und charakterisiert. Es konnte dargestellt werden, dass sich das mit der hier beschriebenen Ozonierungsmethode erhaltene ozLDL deutlich von dem schon relativ gut erforschten oxidierten LDL (oxLDL) unterscheidet. So zeigten TBARS-Untersuchungen der Experimente eine starke Oxidation, die zu einer deutlich niedrigeren Cholesterinkonzentration in ozLDL führte im Vergleich zu LDL bzw. oxLDL (Cholesterinoxidase-Methode). Zusätzlich demonstrierte die massenspektrometrische Untersuchung von ozLDL das Verschwinden des Cholesterinpeaks und die Bildung eines neuen Produkts. Letztere Ergebnisse verdeutlichen, dass bei der Ozonierung von LDL ein Secosterol, namentlich das 3,5-Dioxo-5,6-secocholestan-6-al (Ketoatheronal A), entsteht. Weiterhin wurden im Rahmen von Vorversuchen die idealen Bedingungen für die weiteren Experimente ausgearbeitet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von ozLDL auf das NF- κ B-System

eingehend untersucht. Die Vorinkubation mit ozLDL führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelltypen, die mit Arteriosklerose assoziiert sind. Eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung konnte sowohl in monozytären Zellen als auch in Endothelzellen dargestellt werden. Durch verschiedene Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, dass die oben genannte Hemmung nicht auf einem Effekt von gelöstem Ozon oder Lipoprotein allein beruht. Verschiedene Experimente demonstrierten außerdem, dass die Inhibierung der NF- κ B-Stimulierbarkeit durch LPS nicht durch einen toxischen Effekt hervorgerufen wird. Durch Langzeitexperimente konnte auch die Reversibilität des Effekts demonstriert werden. Die dargestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht für den Hemmeffekt verantwortlich sind, da keine Zunahme der Radikale in ozLDL-vorinkubierten Proben stattfand. Außerdem konnte keine direkte Korrelation der TBARS („thiobarbituric acid reactive substances“)-Werte mit den beobachteten Effekten von ozLDL auf die Zellen festgestellt werden. Da ozLDL die NF- κ B-Aktivierung nur dann inhibierte, wenn LPS als Stimulus verwendet wurde, wohingegen sich auf den TNF-induzierten Signalweg kein Einfluss zeigte, postuliert die vorliegende Arbeit, dass ozLDL selektiv die LPS-vermittelte Signalübertragung hemmt. Die funktionelle Relevanz der Hemmung wurde auf

NF- κ B-Zielgen- und auf Transkriptionsebene demonstriert. Eine Präinkubation mit ozLDL inhibierte außerdem die LPS-vermittelte Proteolyse des NF- κ B-Inhibitors I κ B α sowie die Kinaseaktivität des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes. Weiterhin zeigten Untersuchungen von IRAK-1 (IL1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1) ebenfalls eine Hemmung der LPS-induzierten Phosphorylierung und der anschließenden Degradierung des Proteins. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass eine mögliche direkte Wechselwirkung von ozLDL mit LPS bzw. eine Modifikation des LPS-Bindungsverhaltens an die Zelloberfläche nicht für die beobachteten Wirkungen auf den NF- κ B-Signalweg verantwortlich sind. Unsere Experimente lassen den Schluss zu, dass der hemmende Effekt von ozLDL auf die LPS-vermittelte Signalübertragung auf Ebene des IRAK-1-Proteins oder oberhalb aber unterhalb der Zellbindungsebene stattfindet.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die Effekte von durch Ozon modifiziertem Cholesterin (ozChol) und einzelnen Produkten der Ozonierung von Cholesterin untersucht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit ozChol führte zu einer Hemmung der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B. Diese Inhibierung konnte auch mit 5 α ,6 α -Cholesterinepoxid und mit 3- β -Hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al dargestellt werden. Somit wurden Ozonierungsprodukte von Cholesterin, die so genannten Secosterole, als aktive Komponenten von ozLDL identifiziert, die für die

Inhibierung der LPS-induzierten Signalübertragung verantwortlich sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Hemmung von Mechanismen der angeborenen Immunität durch ozLDL und ozChol nicht nur für die Entwicklung von Arteriosklerose sondern auch für die Entstehung anderer entzündlicher und maligner Krankheiten von entscheidender Bedeutung sein könnte. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten und charakterisierten Substanzen liefern möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Strategien.

RESULTIERENDE PUBLIKATIONEN UND ABSTRACTS:

1. Huth, K.C., Saugel, B., Jakob, F.M., Cappello, C., Quirling, M., Paschos, E., Hickel, R. und Brand, K. (2007). Effect of aqueous ozone on the NF- κ B-system. *J. Dent. Res.* 86(5): 451-6.
2. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2007). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B- and IRAK-1-associated signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 226-32.
3. a) Cappello, C., B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, D. Neumeier, K. Brand. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Poster). XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rom (Italien). Abstract book.

b) Cappello, C., B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, D. Neumeier, K. Brand. (2006). Ozonized low density lipopro-

tein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling. *Atherosclerosis Supplements*, 7(3): 526.

4. a) Cappello, C., B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, D. Neumeier, K. Brand. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. Abstract book.

b) Cappello, C., B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, D. Neumeier, K. Brand. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. *Klin. Chem. Mitt.* 37(3): 44.
5. Huth, K.C., Jakob, F.M., Saugel, B., Cappello, C., Paschos, E., Hollweck, R., Hickel, R. und Brand, K. (2006). Effect of ozone on oral cells compared to established antimicrobials. *Eur. J. Oral. Sci.*, 114(5): 435-40.
6. Huth, K.C., Quirling, M., Saugel, B., Cappello, C., Kamereck, K., Jakob, F.M., Meyer, S., Lenzke, S., Bolz, D., Hickel, R. und Brand, K. (2006). Wirksamkeit von Ozon gegen oralpathogene Mikroorganismen und Abklärung einer möglichen Toxizität auf ortständige orale Zellen (Poster). 5. Berichtskolloquium FöFoLe.

ANSCHRIFT DES AUTORS:

DR. RER. NAT. CHRISTIAN CAPPELLO, Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover

Tel.: 0511-532 3078, Fax.: 0511-532 5671, cappello.christian@mh-hannover.de

Buchbesprechung

Zum Thema Epigenetik sind letztes Jahr zwei interessante Bücher erschienen, die wir Ihnen hier vorstellen wollen:

(1) Epigenetik - Wie Erfahrungen vererbt werden von Dr. rer. nat. Bernhard Kegel

Dumont Verlag; Köln 2009, 368 Seiten, ISBN-10: 3832195289, Preis: EUR 19,90

Der Wissenschaftspublizist und freie Autor DR. BERNHARD KEGEL studierte in Berlin Chemie und Biologie und absolvierte eine agrarökologische Promotion. In seinem Buch „Epigenetik - wie Erfahrungen vererbt werden“ versucht DR. BERNHARD KEGEL genau dieses seinen Lesern zu vermitteln. Sein Buch ist ein Bestreben, auch Laien in diese äußerst komplexe Wissenschaft einzuführen und sämtliche Forschungsergebnisse zu vereinen. Dieses Vorhaben gelingt Kegel generell gut, obwohl sich das Skript an einigen Stellen etwas mühsam (weil detailverliebt) liest, was den Eindruck erweckt, dass er versucht, sehr viel Information in seinem Buch unterzubringen.

Wie der Klappentext schon deutlich macht: „Das Humangenom ist nun entschlüsselt - „Das Buch des Lebens“ liegt aufgeschlagen vor uns. Doch es enthält bei weitem nicht so viele Informationen wie erwartet. Eine zweite Ebene jenseits der Gene ist in den Fokus der Wissenschaft gerückt: die Epigenetik.“ Schon mit der Bekanntgabe des

Humangenomprojekts wurde eine Revolution für die Biomedizin mit neuartigen Therapieansätzen vorausgesagt, mit denen man Krebs und andere Krankheiten heilen wollte. Die große Revolution blieb jedoch aus und an die Stelle dessen sei nun die Epigenetik gerückt, so Kegel.

Der Begriff „Epigenetik“ mag der Mehrheit der Leser eher fremd erscheinen, jedoch gewinnt er in der modernen Wissenschaft immer mehr an Bedeutung. Kegel lehnt sich an der Terminologie Felsenfelds an und definiert die Epigenetik als „das Studium von mitotisch und / oder meiotisch vererbaren Veränderungen der Genfunktion, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz erklärt werden kann“. Um angemessen in die Epigenetik einzuführen, geht der Autor sehr ins Detail und stellt die elementaren Akteure epigenetischer Mechanismen, wie die verschiedenen hierarchischen Ebenen des Chromatins (= Verpackung eukaryotischer DNA im Zellkern) mit seinen Nukleosomen (bestehend aus Histonproteinen), Methylgruppen,

Histonmodifikationen, Nukleosomen, Chromatin-Remodeling, nicht-kodierenden RNAs und weiteren Komponenten vor. Für den Laien mag das von Kegel vorausgesetzte biologische Grundwissen stellenweise zu hoch angesetzt sein, denn der Autor versucht seinem wissenschaftlichen Anspruch entsprechend, kein beteiligtes Molekül und dessen Wechselwirkungen mit anderen epigenetischen Prozessen unerwähnt zu lassen. So verliert sich der Autor stellenweise in Details und der nicht wissenschaftlich ausgebildete Leser könnte in der Welt der Moleküle verloren gehen. Der Leser spürt in jeder Zeile die Intention des Autors vermittelt: möglichst alles soll erklärt, Details vermittelt und dem Leser nichts vorenthalten werden. Dabei führt er den Leser durch eine immense Anzahl von Forschungslaboratorien und komplexen Datensätzen, denen nur der Experte folgen kann. Diejenigen, die mit der Epigenetik vertraut sind, wissen, dass es eine schwierige Herausforderung ist, Einblicke in diesen neuartigen Wissenschaftszweig in all seiner Komplexität zu vermitteln.

Kegel begleitet den Leser auf eine Reise durch die „Welt der Epigenetik“, welche als Knotenpunkt zwischen unseren Genen, der Umwelt und der Psyche angesehen werden kann. Er wagt es, dem Leser diese neuartigen und übergeordneten Ideen der Epigenetik heranzutragen, deren Grundgedanke es ist, über Psyche und Umwelt Genaktivität zu beeinflussen. Das Buch traut sich an

Fragen heran, die sich rund um die Vererbung von Erfahrungen drehen. Hier geht es jedoch nicht nur allein um die Tatsache, dass Erfahrungen vererbt werden, auch der Einfluss von Vorfahren auf diese wird hier diskutiert. Die Schwachstellen dieser Theorien werden jedoch nur gestreift, obwohl es einige Ungereimheiten gibt.

Das Buch unterteilt die 320 Seiten auf 16 Kapitel. An diese schließen sich sehr übersichtlich gestaltet ein Literaturverzeichnis, ein Glossar und ein Sachregister an. Abbildungen tauchen selten auf und sind eher einfach und farblos gehalten. DR. BERNHARD KEGEL beginnt sein Buch in einem schwedischen Dorf namens Överkalix. Dieses Dorf ist von besonderem Interesse, da es über eine Dorfchronik verfügt, die sämtliche Ereignisse der letzten 200 Jahre dokumentiert. So wurde herausgefunden, dass es eine Assoziation zwischen der Ernährung der Großelterngeneration und der Lebenserwartung der Enkel geben könnte. Eine Hungersnot im Leben der männlichen Bewohner führte beispielsweise zu einer höheren Lebenserwartung ihrer Enkel im Vergleich zu einer guten Ernährungslage.

An weiteren Beispielen für die enge Kommunikation der Umwelt mit den Genen mangelt es Kegel nicht. Er berichtet in enthusiastischem Erzählstil von faszinierenden Ereignissen aus dem Tierreich. So wird zum Beispiel durch die Temperatur determiniert,

wie sich das Muster von Schmetterlingen entwickelt oder welche Färbung das Fell einer Siamkatze annimmt. Bei Bienen entscheidet das Nahrungsangebot darüber, ob sich aus dem genetisch identischen Erbgut der Eier sterile Arbeiterinnen oder fertile Königinnen entwickeln.

Im letzten Kapitel schließt Dr. BERNHARD KEGEL sein Buch ab, indem er Darwins Evolutionstheorie mit den jüngsten Erkenntnissen der bedeutendsten Forscher neu beleuchtet. Hier verdeutlicht der Autor, dass es nicht nur ein genetisches Programm gibt, welches über den Phänotyp entscheidet, sondern viele Programme, welche durch genetische Komponenten und Umwelteinflüsse zugleich gesteuert werden. Der Einfluss der Epigenetik wird anhand von Beispielen wie z.B. der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-Schmalwand) veranschaulicht, in der siRNAs und DNA Methylierung eine große Rolle spielen. Jedoch weist er auch explizit darauf hin, dass den Forschern noch viel Arbeit bevorsteht, um die komplexen Mechanismen der Epigenetik im Detail aufzuklären. Zitiert wird der Wissenschaftsphilosoph Lenny Moss, der prophezeit, dass sich die epigenetischen Mechanismen gerade beim *Homo sapiens*, dessen herausragendstes Merkmal seine immense Anpassungsfähigkeit und Flexibilität ist, als bedeutsam herausstellen werden.

In einer Schlussbemerkung appelliert der Autor direkt an die Leser und warnt

ausdrücklich vor einem Epigenetik-Hype nach dem „gescheiterten“ Genom-Hype. Die Entdeckung der biomedizinischen „Wundermittel“ wird in Frage gestellt und manche Ansicht in Bezug auf eine gesunde, maßhaltende Ernährung relativiert. Des Weiteren verdeutlicht er die enge Zusammengehörigkeit von Genomen und Umwelt. Bernhard Kegel beendet „Epigenetik“ mit einem sehr gelungenem Vergleich der Wissenschaft mit einem Krimi, der immer neue Wendungen einnimmt und dabei in den wenigsten Fällen das Ziel erreicht. Er bittet seine Leser, die Epigenetik weiterhin kritisch zu verfolgen, gerade unter der Prämisse, dass sich diese in Zukunft auf unser Leben auswirken wird und fordert des Weiteren, Wissenschaftler lediglich anhand Ihrer Resultate zu beurteilen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Kegel die Kombination aus narrativem Talent und fundiertem Sachwissen generell gelingt. „Epigenetik“ ist ein Buch, das trotz einiger, besonders für den Laien, zu detaillierter Passagen einen guten Einblick in das Thema gewährt.

(2) Der zweite Code

von Dr. rer. nat. Peter Spork

Rowohlt Verlag GmbH; Reinbek 2009, 2. Auflage, 300 Seiten,
ISBN: 978 3498 064075, Preis: EUR 19.90

Mit dem Begriff „Epigenetik“ definierte CONRAD WADDINGTON 1942 ursprünglich den Wissenszweig der Biologie, der sich mit der kausalen Wechselwirkung von Genen mit ihrer Umwelt beschäftigt, wodurch der Phänotyp in Erscheinung tritt. Im 21. Jahrhundert wird der Terminus Epigenetik hauptsächlich verwendet, um das „Studium der vererbba- ren Veränderungen in der Genomfunktion, die ohne eine Änderung der DNA-Sequenz auftreten“ zu definieren.

In der eukaryotischen Zelle liegt der DNA-Faden im Zellkern verpackt in einer Struktur namens Chromatin vor. Die Organisation der DNA in Chromatin gewährleistet einerseits eine hohe Kompaktierung, andererseits wird eine Fluidität (Dynamik) sichergestellt, um DNA-abhängige Prozesse (wie z.B. Transkription, Replikation und Rekombination) zuzulassen. Ein durch Modifikationen bedingter hoher Verpackungsgrad (geschlossenes Chromatin) ist beispielsweise für die Stilllegung von Genen verantwortlich, wogegen ein geringer Verpackungsgrad (offenes Chromatin) Genaktivität ermöglicht. Die Epigenetik untersucht weiterhin, wie Genexpressionsmuster von einer Zelle auf ihre Tochterzellen weitergegeben werden, wie sich die

Genexpression während der Zelldifferenzierung von einer Zellart zur nächsten verändert und wie Umweltfaktoren die Art der Genexpression verändern können. Epigenetische Forschung verspricht entscheidende Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Zelltypidentität, des molekularen Charakters von Stammzellen, zur Erklärung genetisch nicht definierbarer Krankheiten und auch Krebs und zum Alter zu liefern.

„Der zweite Code“ stellt in sehr anschaulicher Weise die weitreichende Bedeutung der Epigenetik dar. Die Idee, dass sowohl die Umwelt, wie auch jedes Individuum selbst, seine Gene beeinflussen kann wird dargestellt. Diese neuartige Theorie, die gegen Darwins Evolutionstheorie spricht, wird von DR. PETER SPORK durch eine sorgfältige Auswahl bzw. Beschreibung alltäglicher Beispiele erläutert. Dadurch wird das Buch auch für Laien verständlich und gewährt dem Leser Einblicke in diese innovative und rasch expandierende Forschungsrichtung. Der Leser taucht in die spannende Welt der „post-genomischen Ära“ ein, in dem ihm die chemischen und strukturellen Modifikationen des Chromatins sehr bildlich vermittelt werden.

Das vorliegende Buch unterteilt die rund 250 Seiten in sieben abgeschlossene Kapitel. In einem Vorwort verweist der Autor auf die „revolutionäre“ Bedeutung der Epigenetik, welche in der Einleitung als der zweite Code, einer Informationsebene jenseits der Gene, vorgestellt wird. Obwohl die genetische Information absolut identisch ist, zeichnen sich verschiedene Zelltypen (z.B. Nerven- und Hautzellen) durch sehr unterschiedliche Funktionen aus, was durch den epigenetischen Code bedingt ist. Der Autor schließt das Buch mit einem Resümee ab, welches Vorschläge enthält, in welcher Art und Weise jeder Einzelne Einfluss auf sein Epigenom nehmen kann. Personen- und Sachregister im Anhang liefern weitere Informationen zu den führenden Wissenschaftlern aus dem Bereich der Epigenetik und zu spezifischen Fachbegriffen.

Generell sind alle Kapitel in packendem Stil geschrieben und decken verschiedenste Bereiche ab, in denen die Epigenetik eine Rolle spielt. DR. PETER SPORK ermöglicht dem Leser, gemeinsam mit ihm in das molekulare Reich des Zellkerns mit seiner um basische Histonproteine gewundene DNA (Nukleosomen) einzutauchen. Man schlüpft mit dem Autor durch eine Kernpore in den Zellkern, die phantasievolle Beschreibung ermöglicht eine bildliche Vorstellung. Anhand von übersichtlichen Grafiken werden komplizierte molekularbiologische Prozesse und bedeutende Entdeckungen der Epigenetik

illustriert. Die Reise führt dabei auch in die Laboratorien von führenden Wissenschaftlern, wodurch der Leser mit diesen, ihren Forschungsschwerpunkten und den neuesten Erkenntnissen vertraut wird. Durch die Darstellung historisch bedeutsamer Ereignisse, wie z.B. der Präsentation des Humangenomprojektes aus der Perspektive der Wissenschaftler, kann der Leser die Prägnanz dieser Momente nachfühlen. Peter Spork macht sehr deutlich, dass viele Fragen durch die Entschlüsselung der Gene, in die ursprünglich sehr viel Hoffnung gesetzt wurde, alleine nicht beantwortet werden können. Für den Leser, der mit dem Gebiet der Epigenetik bereits vertraut ist und die Wissenschaftler zum Teil persönlich kennt, sind deren Sichtweise und epigenetische Zukunftsvisionen besonders interessant.

Zu den wenigen Schwächen des Buches gehört, dass teilweise Gebiete, welche in Realität stark miteinander verknüpft sind, etwas zu isoliert dargestellt werden. So wird z.B. das enge Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen nicht ganz ideal herausgearbeitet. Auch werden einige Gegebenheiten auch häufiger wiederholt und /oder ungeordnet dargestellt, wodurch es an einigen Stellen etwas unübersichtlich wird.

DR. PETER SPORK gelingt es, die Komplexität der Epigenetik anhand von gelungenen Metaphern darzustellen. So wählt er beispielsweise in Kapitel 1 den Vergleich epigenetischer

Modifikationen mit Schaltersystemen, in denen die Schalter gezielt an bestimmte Stellen des Erbguts andocken und entscheiden, welche Gene eine Zelle überhaupt ablesen soll.

In Kapitel 2 wird der Einfluss der Umwelt auf die Ausprägung des epigenetischen Musters anhand von mehreren Beispielen, wie z.B. der Metamorphose einer Raupe zum Schmetterling, erörtert. Diese geht mit der Veränderung von epigenetischen Programmen einher, was von Peter Spork sehr lebendig dargestellt wird. Auch die von Waddington geprägte Vorstellung einer epigenetischen Landschaft, welche mit zunehmendem Alter durch eine Änderung der Lebensweise immer weniger beeinflussbar wird, findet angemessene Beschreibung. Nach dieser sind die epigenetisch prägsamsten Phasen jene vor, während und nach der Geburt, in denen viele epigenetischen Schalter dauerhaft eingestellt werden.

Der Autor weist klar darauf hin, dass es mittlerweile als bewiesen gilt, dass epigenetische Faktoren neben den genetischen Komponenten eine übergeordnete Rolle bei der Entstehung von Krankheiten wie Alzheimer, Krebs und Parkinson spielen. Durch Ernährung, Verhalten, Toxin-Exposition und Stress hat der einzelne Mensch die Möglichkeit den epigenetischen Zustand seiner Zellen zu beeinflussen. Studien zeigten, dass epigenetische Muster durch die Ernährung „eingefroren“ werden können. Teilweise wird dem Leser jedoch der Eindruck vermittelt,

als wären die Auswirkungen schon hinreichend erforscht, so dass es jetzt schon möglich wäre, mit einem Patentrezept seine Gesundheit zu steuern. Dieses ist jedoch nicht der Fall: Die Bedeutung der Epigenetik für die Biomedizin steht gerade erst am Anfang der Aufklärung. Zwillingstudien dienen als beliebtes Instrument, um den Einfluss von Umweltfaktoren zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei genetisch identischen, eineiigen Zwillingen, welche unter verschiedenen Umwelteinflüssen lebten, sich die epigenetischen Muster mit zunehmendem Alter veränderten.

Kapitel 3 beschreibt den Einfluss von epigenetischen Faktoren auf die Persönlichkeitsentwicklung. Anhand von Studien an Ratten konnte nachgewiesen werden, dass sich das epigenetische Muster (DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen) von Gehirnzellen bei Tieren, die kurz veränderte, nach der Geburt von ihren Müttern getrennt wurden, anders ausgeprägt, als dies bei Tieren, die bei ihren Müttern aufgewachsen, der Fall war. Vernachlässigte Tiere zeigten häufig ein aggressives, ängstliches, reizbares und ungeselliges Verhalten und reagierten anfälliger auf Stress, wobei eine Assoziation mit einem Gen gefunden wurde, welches als Andockstelle für Cortisol dient. Auch im Menschen wurde gezeigt, dass sich Stress während der Schwangerschaft auf das Epigenom des Kindes auswirken, was erneut mit dem Cortisolgehalt im Zusammenhang steht. Studien

belegen zudem, dass eine Vernachlässigung in der Kindheit zu einem erhöhten Selbstmordrisiko, bedingt durch zu wenig Bindestellen für Cortisol aufgrund von DNA Methylierung führen kann. Des Weiteren können erhöhte seelische Belastungen, Alkohol, Koffein, Nikotin und Drogen während der Schwangerschaft Epimutationen hervorrufen, die dann für eine später auftretende Schizophrenie des Kindes mit verantwortlich sein könnten.

In Kapitel 4 und 5 wird zunächst aufgezeigt, dass eine werdende Mutter bereits im Mutterleib Einfluss darauf nehmen kann, wie sich die Epigenetik ihres Kindes entwickelt. So kann durch Lebensbedingungen, Ernährung oder körperliche Aktivität der Methylierungsstatus im Promotorbereich der Gene verändert werden. Ein Mangel an Methylgruppendonoren aus der Nahrung kann das Epigenom in eine aberrante Richtung umprogrammieren. Anschließend stellt Spork das Geheimnis der Langlebigkeit mit einer gesunden Ernährung (Fisch, Sojaprodukte) und der Meidung von „Extremen“ in Zusammenhang. Es konnte beobachtet werden, dass mit zunehmendem Alter DNA- und Histon-Modifikationen an „falschen“ Stellen zunehmen, während dies bei langlebigen Menschen nicht in diesem Maße auftrat.

In Kapitel 6 betont der Autor, dass wir unsere epigenetischen Informationen nicht nur direkt auf unsere Nachkommen übertragen, sondern mit diesen auch ein epigenetisches

Gedächtnis, wodurch die Möglichkeit besteht, epigenetische Informationen über mehrere Generationen hinweg vererben. Hierdurch kann auf Umwelteinflüsse „sinnvoll“ reagiert werden und diese Adaption an die nächste und weitere Generation übertragen werden. Als bekanntes Beispiel wird die Bevölkerung von Överkalix in Schweden erwähnt: Aben die Väter und Großväter in der Zeit vor der Pubertät viel, stellte sich heraus, dass die Kinder bzw. Enkel kürzer lebten und teilweise Diabetes und Herzinfarkte entwickelten.

In Kapitel 7 werden verschiedene Zukunftsprojekte der Epigenetik vorgestellt und die möglichen Applikationen aufgezeigt. So wäre eine individuelle Therapie zur Beeinflussung des Methylierungsmusters durchaus denkbar. Des Weiteren könnte in Zukunft das Epigenom in den Zustand von induzierten pluripotenten Stammzellen zurückgesetzt werden, die dann therapeutisch nutzbar wären. Das Buch schließt mit Ratschlägen, wie man durch gesunde Lebensweise sein Erbgut beeinflussen kann. Abschließend werden einige proklamierte Visionen relativiert. Außerdem wird deutlich gemacht, dass die Epigenetik noch in ihren Kinderschuhen steckt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DR. PETER SPORK in diesem Buch sehr präzise die bedeutsamsten Forschungsergebnisse der Epigenetik resümiert hat und diese mit alltäglichen Gegebenheiten in Zusammenhang bringt. Durch seinen begeisternden

Schreibstil schafft er es, den Leser in den Bann der Epigenetik zu ziehen und ihm darzulegen, dass das Epigenom die Sprache ist, mit der das Genom mit der Umwelt kommuniziert. Die zentrale Botschaft, dass unser eigenes Handeln Spuren im epigenetischen Fundament unseres Körpers hinterlässt, wird hier klar übermittelt. Jeder, der sich für die neusten biomedizinischen Erkenntnisse und den damit verbundenen Anwendungen und Hoffnungen interessiert, sollte sich dieses Buch nicht entgehen lassen.

VERFASSER:

DR. RER. NAT. ANNA SCHRADER,
DR. MED. HANNS-GEORG KLEIN

Zentrum für Humangenetik und
Laboratoriumsmedizin

Lochhamer Str. 29, 82152 Martinsried

e-mail: klein@medizinische-genetik.de

Südwestdeutsches Laborleitertreffen 12. und 13. März 2010

Die Organisatoren, PRIV. DOZ. DR. MED. YORK SCHMITT und PROF. DR. MED. JOHANNES AUFENANGER, hatten zum zweiten Mal in das neue Kongresszentrum „darmstadtium“ in Darmstadt eingeladen und 60 Laborleiterinnen und Laborleiter, die ein interessantes und vielfältiges Programm erwartete, waren dieser Einladung gefolgt. In seiner Eröffnung stellte HERR SCHMITT das Programm vor und dankte der FA. ROCHE DIAGNOSTICS GMBH sowie HERRN DANIEL und den Damen FRAU KOHL und FRAU FILLINGER für die Unterstützung der Tagung und die hervorragende Organisation. Es ist erfreulich, dass die Gastgeberstadt dieser Veranstaltung auch in diesem Jahr Aufmerksamkeit schenkte. Ihr Gesundheitsdezernent, DR. MOLTER, begrüßte die Teilnehmer mit herzlichen Worten und hob die Bedeutung der Laborärzte im Prozess der medizinischen Versorgung hervor, was nach seiner Meinung oft nicht ausreichend gewürdigt wird, und betonte die neuen großen Herausforderungen, die die Labormedizin zu bewältigen hat. Er lud dazu ein, Darmstadt als kulturelles Zentrum des Jugendstils und als Hochburg für Wissenschaft und Forschung zu besuchen.

Das Programm begann mit dem Vortrag von HERRN THOMAS, Frankfurt, „Serum Heparin 25 - ein neuer Marker zur Differenzierung von Störungen im Eisenstoffwechsel“.

Er erklärte zunächst die Bedeutung des Heparins, ein fast ausschließlich in der Leber synthetisiertes niedermolekulares Protein, das zusammen mit Ferroportin als regulatorisches Protein im Eisenstoffwechsel mit dem Ziel, den Eisengehalt in der Zelle aufzufüllen, wirksam ist. Es gehört zu den sog. Typ II - Akute Phase Proteinen. Bei Entzündungen bewirken Zytokine, besonders IL-6, eine Steigerung der Heparinsynthese mit einer Erhöhung der Konzentration im Blut, was eine Hemmung der Eisenresorption und verminderte Eisenspiegel zur Folge hat. Dagegen führt eine vermehrte Aufnahme von Eisen zur Steigerung der Heparinbildung. Der Referent zeigte die Komplexität der Heparinwirkung auf und beschrieb die Korrelationen zu anderen Markern des Eisenstoffwechsels. Heparin-Werte < 4 nmol/L weisen auf Eisenmangel hin. Mit Hilfe einer Vier-Felder-Tafel, in der Retikulozyten-Hb (Grenze: 28 pg) über Heparin (Grenze: 4 nmol/L) aufgetragen sind, lassen sich Eisenmangel und andere Formen der Anämie differenzieren und Therapie-Entscheidungen ableiten.

HERR LORETH, Kaiserslautern, sprach über „Neue direkte Xa- und Thrombininhibitoren - neue Probleme in der Gerinnungsdiagnostik“ und hob die große Bedeutung der perioperativen Thrombose-prophylaxe hervor. Wurden bisher - der historischen Entwicklung folgend

- Heparin, Kumarine und ab den 80er Jahren NMH eingesetzt, stehen in der Zukunft direkte und indirekte Faktor-Xa-Inhibitoren, z. B. Rivaroxaban, und direkte Thrombin-Inhibitoren wie Dabigatran zur Verfügung, deren hohe Effizienz gegenüber den bisherigen Antikoagulanzen in Studien nachgewiesen wurde. Ihre Vorteile bestehen in der oralen Applikation, dem raschen Erreichen des Wirkspiegels und der selektiven Wirkung auf freies und fibrin gebundenes Thrombin. Nachteilig ist einerseits, dass es bei Überdosierung kein Antidot gibt und andererseits, dass zahlreiche Labortests beeinflusst werden. Deshalb ist ein Monitoring (z. B. aPTT oder INR) nicht möglich, obwohl trotz des relativ großen therapeutischen Bereichs bei bestimmten Patienten das TDM als notwendig erachtet wird. Von der Industrie wird gefordert, Handlungsanweisungen unter dem Aspekt der Störung der Gerinnungsuntersuchungen herauszugeben.

Neue Aspekte in der Labormedizin stellte der Vorsitzende des BDL, HERR BOBROWSKI, Lübeck, in den Mittelpunkt seines Beitrags „Die Zukunft der laborärztlichen Honorierung in Deutschland“. Das sind z. B. neue Entwicklungen wie das Mini-Labor, die in Zukunft stärker zu beachten sind. Ein weiteres schwerwiegendes Problem entsteht durch den Mangel an Nachwuchs und die stark sinkenden Zahlen an Absolventen insgesamt und speziell auch an Kolleginnen und Kollegen, die eine Weiterbildung in unserem

Fachgebiet anstreben, was Anlass zu echter Sorge gibt. Weitere Probleme stehen mit der zu fordernden Honorargerechtigkeit im Zusammenhang. Das betrifft u. a. den Wirtschaftlichkeitsbonus für Ärzte, das Akutlabor bei niedergelassenen Ärzten, die unverhältnismäßig hohe Zahl an genehmigten Speziallabors für die verschiedensten Ärzteguppen auf der einen und die Absenkung der Vergütung der Laborärzte auf der anderen Seite (Transportkosten, Streichung „Sonstige“ oder Speziallabor). Kritisch wurde vom Referenten auch der Umstand bewertet, dass bestehende Gesetze und Richtlinien zur Durchführung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, z. B. Qualitätsstandards od. ä., zwar bestehen, vielerorts aber nicht eingehalten und auch nicht kontrolliert werden.

Danach behandelte HERR KLEINE, Marburg, die Frage „Eignen sich Hämatologie-Analyser zur Zellzählung im Liquor – Folgerungen aus Ringversuchen“. Zur Auswertung gelangten 10 Ringversuche der DGKL in den Jahren 2004 bis 2008, bei denen die Messungen an nativen Zellen an 6 verschiedenen Geräten vorgenommen worden waren. Die Werte für RBC, WBC und Leukozytendifferenzierung wurden mit der mikroskopischen Zählung verglichen. Obwohl von den Herstellern einige der eingesetzten Geräte als für Liquoruntersuchungen geeignet deklariert waren, sind die Ergebnisse insgesamt sehr differenziert zu bewerten. So zeigten die Geräte LH 750 (Beckman Coulter), Cell-Dyn 3200, 3500

und 4000 (Abbott) ADVIA 120 (Siemens), XE 2100 und XE 5000 (Sysmex Deutschland) nur zum Teil zufrieden stellende Übereinstimmungen und Schwierigkeiten vor allem bei den Erythrozyten. Als positiv wurde vom Referenten hervorgehoben, dass durch die Ergebnisse Kenntnisse darüber gewonnen wurden, welche Verbesserungen in der Zukunft noch notwendig sind.

HERR RENZ, Marburg, referierte über „Allergiediagnostik“ und zeigte, dass chronisch-entzündliche Erkrankungen einen dramatischen Anstieg, akute Infektionen dagegen den gegenläufigen Trend aufweisen. „Der Erfolg auf der einen Seite (Hygiene, Impfung, Antibiotika) fordert seinen Preis auf der anderen“. Betroffen sind vor allem Atemwege (Heuschnupfen, Asthma bronchiale), Haut (Neurodermitis) und Gastrointestinaltrakt (Schleimhautentzündungen). Neu sind der Beginn im frühen Kindesalter, genetische Aspekte und die Luftverschmutzung als Risikofaktor (Ozon, SO₂, Feinstaub, Tabakrauch). Protektive Faktoren sind Hygiene auf der einen und gewisse mikrobielle und Umweltbelastungen, die zur Immunisierung führen, auf der anderen Seite. Die Diagnostik beruht auf der Leitlinie „In-vitro-Allergiediagnostik“ (061/017 AWMF) mit den Schwerpunkten Gesamt-IgE, allergenspezifische IgE, zelluläre Testsysteme (Mastzellen, baso- und eosinophile Granulozyten) und Sensibilisierung. Perspektivisch kommen auch allergenspezifische IgG oder IgG4, Entzündungsmediatoren

und die zelluläre Allergie-diagnostik (Komponenten der Allergene) in Betracht.

Mit dem Vortrag „Schweinegrippe - Hysterie oder Realität“ von HERRN SCHWARZ, Würzburg, endete der erste Tag. Er verteidigte den Umgang mit dem Problem in Deutschland, der zweifellos richtig war, ohne Hektik aber mit der gebotenen Vorsicht aufgrund der Erfahrungen mit den letzten großen Epidemien (1918, 1957, 1968) und der Möglichkeit, dass neue Stämme als Folge von Antigenshift auftreten, gegen die niemand immun ist. Neu war, dass gegenüber der saisonalen Grippe tiefere Atemwegsschichten betroffen, vorwiegend junge Menschen erkrankt, die Inkubationszeiten sehr kurz und die Infektionen schwerwiegend waren. Trotz des insgesamt milden Verlaufs und der im Vergleich zur allgemeinen Grippe geringen Zahl an Todesfällen in Deutschland ist nicht auszuschließen, dass der ersten Welle eine zweite folgt, was auch 2011 noch möglich ist, die dann meist viel schwerer verläuft als die erste. Deshalb ist jeder gut beraten, der bereits geimpft ist. Der Referent lobte die Entwicklung und Zulassung des Impfstoffs in extrem kurzer Zeit als eine große Kraftanstrengung für Industrie und Behörden, kritisierte die teilweise falschen Diskussionen (Zahl der Impfungen, mit oder ohne Adjuvans) in den Medien, die zur Verunsicherung beigetragen haben, und betonte, dass alle Impfstoffe sicher sind.

Die Vorträge des zweiten Tages wurden von HERRN AUFENANGER, Ingolstadt, moderiert. Zuerst gab HERR ORTH, Stuttgart, „Informationen zum Gendiagnostikgesetz“. Das Gesetz ist am 01.02.2010 in Kraft getreten, mit Ausnahme § 5 (Klärung der Abstammung), der am 01.02.11 und § 7 Abs. 3 (genetische Beratungen nur durch Ärzte/innen, die hierfür qualifiziert sind), der am 01.01.12 in Kraft tritt. Es gilt für genetische Analysen bei Menschen, Foeten und Embryonen, jedoch nicht für Forschung, Strafsachen und im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes. Der Referent benannte die Probleme, die auf die Labors zukommen, wie Qualitätssicherung (Akkreditierung), Arztvorbehalt, Einwilligung des Patienten, Aufklärung, genetische Beratung oder Befundmitteilung und benannte die angedrohten Strafen. Eine besondere Schwierigkeit ist, dass es noch offene Fragen bezüglich der Zuordnung von Analysen zur Gendiagnostik gibt, die bisher von der GEKO nicht beantwortet wurden, z.B. Blutgruppen, Faktor-V-Leiden, Tripeldiagnostik oder Neugeborenenenscreening. HERR BOBROWSKI gab in der Diskussion bekannt, dass GKV und BDL das BMG um eine Aussetzung des Gesetzes ersucht haben, bis diese Unklarheiten beseitigt sind.

HERR KLOSSON, Hanau, sprach dann in Fortsetzung seiner früheren Ausführungen über „Chancen und Risiken der Steuerung von Krankenhauslaboratorien mit Kennzahlen“. Er machte deutlich, dass die Verwendung von

Kennzahlen (z. B. Anzahl, Kosten/Fall, Kosten/Leistung od.dgl.) nur sinnvoll ist, wenn sowohl die Inhalte als auch die Erfassung und Verarbeitung der Daten standardisiert sind und wenn die Struktur der Einrichtung berücksichtigt wird. Als neuen Ansatz stellte er die Anwendung der InEK-Matrix und die Berechnung der Kosten pro Punkt über DRG und GOÄ-Punkte vor, was einen Fortschritt bedeutet, aber mit dem Nachteil behaftet ist, dass nicht analytische Leistungen, POCT und Schnittstellen nicht erfasst werden. Nach der Devise „nicht nur zählen, sondern auch steuern“ sind Anpassungen unter Berücksichtigung der Effektivität notwendig. Danach sind die nicht analytischen Leistungen sowie krankenhauspezifische Faktoren einzubeziehen und die Laborleistungen im Kontext mit dem medizinischen Ergebnis zu bewerten, das heißt z. B. Verbesserungen in der Prä- und Postanalytik, Folgeprozesse und Folgekosten auf Station, Patienten-Outcome und weitere Daten bei der Laborbudgetierung zu berücksichtigen.

„Präeklampsie - eine Multimarkererkrankung in der Schwangerschaft“ war das Thema von HERRN JANK, Leipzig. Die Krankheit, die durch Hypertonie, Ödeme und Proteinurie gekennzeichnet ist, stellt eine Gefahr für Mutter und Foet dar, da sich daraus eine Eklampsie oder das HELLP-Syndrom entwickeln können. Der Referent erläuterte die zahlreichen dabei ergebenden Risiken und hob die Bedeutung einer raschen Diagnostik

hervor. Standen bisher neben der Doppler-Sonographie (20. SSW) nur Blutdruck und Urin-Protein zur Verfügung, kann die Diagnostik durch Bestimmung der Angiogenesefaktoren PIGF (Placental Growth Factor) und sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosinkinase-1) deutlich verbessert werden. Bei Präeklampsie ist PIGF erniedrigt und sFlt-1 erhöht (über 2000, normal: < 500 pg/mL). Der Faktor sFlt-1/IGF erlaubt mit hoher Spezifität und Sensitivität eine sichere Unterscheidung zwischen Präeklampsie und anderen Erkrankungen. Weitere neue Frühmarker sind sEng (soluble endoglin), PP 13 (placental protein 13), PAPP-A (pregnancy associated plasma protein A) und PTX 3 (Pentraxin 3).

Den wohlklingenden Vortragstitel „Von vielen Solisten zum Symphonieorchester - Kann schon jetzt die Routineanalytik in der Hämatologie das Zusammenspiel zwischen Klinik und Labor verbessern?“ hatten FRAU FORSTREUTER und HERR HOFMANN, Sysmex Hamburg, gewählt. Am Beispiel eines akuten Notfalls bei einem Kind wurde dargestellt, wie wichtig das Zusammenspiel der Kriterien „Richtige Fragestellung durch den Arzt, richtiges Verstehen der Frage im Labor, richtige Kommunikationswege“ sein kann. Nur so werden eine kritische Befundbewertung ermöglicht und durch zusätzliche Befunde möglicherweise unerwartete Diagnosen erkannt, was im vorgetragenen Fall sogar lebensrettend war. In dieser Richtung wurde auch über IPF (immature platelet fraction)

und dessen klinische Bedeutung berichtet. Diese neue Messgröße, ein Maß für den Anteil an unreifen Thrombozyten, liegt normalerweise zwischen 1,1 und 6,1 % (Mittel: 3,4 %, Sysmex 2100 oder 5000) und erlaubt eine Differenzierung der Thrombozytopenie: erhöht bei erhöhtem Verbrauch, erniedrigt oder normal bei verminderter Bildung. Klinisch relevante Informationen sind in die Software eingearbeitet und können auf Wunsch abgerufen werden. Als Anwendungen wurden ITP, Präeklampsie, HELLP-Syndrom, TTP, aplastische Anämie oder die May-Hegglin-Anomalie diskutiert.

Im letzten Vortrag sprach HERR BACH, Bielefeld, über „Biomarker bei kritisch Kranken“ und stellte die Sepsis in den Mittelpunkt seiner Ausführungen. Wichtig sind rasche Diagnose und frühzeitiger Beginn der Therapie, denn 1 Stunde Zeitverzögerung bedeutet einen Abfall der Überlebensrate um 7 %. Neben Temperaturerhöhung und Leukozytenzahl und -differenzierung (Neuros, Monos) sind die Entzündungsmarker für Differenzialdiagnose, Therapieentscheidung und Monitoring von Bedeutung. CRP hat eine relativ geringe Sensitivität und Spezifität und reagiert träge (36-48 Stunden). Es ist für die Unterscheidung von SIRS und Sepsis und die Risikostratifizierung wenig, für die Verlaufskontrolle und Prognose dagegen gut geeignet. PCT hat eine Induktionszeit von 6-12 Stunden und ist besonders wichtig bei bakteriellen Infektionen. Es ist sensitiv und spezifisch

(88 bzw. 81 %) und erlaubt die Differenzierung SIRS / Sepsis bei einem cut-off von 1,1 ng/mL. Es korreliert mit dem Schweregrad und eignet sich zur Therapiesteuerung (Beginn > 0,5; Beendigung < 0,25 ng/mL) mit einer positiven Auswirkung auf Antibiotikaverbrauch, Liegezeit und Kosten. IL-6 reagiert mit 1-3 Stunden am schnellsten, eignet sich weniger für die Verlaufskontrolle, dagegen mehr für die Trennung SIRS / Sepsis, zur Einschätzung von Risiko und Prognose und zur Detektion von lokalen Herden. Zusätzlich sind mikrobiologische Tests und bildgebende Verfahren notwendig. LBP ist nach Ansicht des Referenten weniger aussagefähig und hat nur bei hohen Werten Bedeutung.

HERR SCHMITT dankte zum Schluss nochmals den Referenten, Diskussionsrednern, Zuhörern und dem Sponsor, bat um Vorschläge für Themen und Referenten für das nächste Jahr und erhielt das Votum, auch 2011 wieder ein Laborleitertreffen in Darmstadt vorzubereiten.

VERFASSER:

DIETER MEISSNER, Dresden
YORK SCHMITT, Darmstadt



American Society for
Clinical Pathology



**2011 ASCP Annual Meeting
is proud to host the
XXVI World Congress of the
World Association of Societies of
Pathology and Laboratory Medicine
(WASPALM)**

October 19-23, 2011
Venetian-Palazzo
Resort Hotel Casinos
Las Vegas, Nevada USA



www.ascp.org

Veranstaltungskalender

DATUM, ORT	VERANSTALTUNG
08.07. - 09.07.2010 Berlin	VI. Innovationskongress der deutschen Hochschulmedizin
29.08. - 02.09.2010 Nürnberg	3rd EuCheMS Chemistry Congress
29.09. - 02.10.2010 Mannheim	7. Jahrestagung der DGKL
30.09. - 02.10.2010 Griechenland	5th Santorini Conference 2010 Functional Genomics towards Personalized Health Care
01.10. - 05.10.2010 Berlin	Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie 2010
05.10. - 07.10.2010 Hannover	Molecular Diagnostics Europe
21.10. - 22.10.2010	Abschlussprüfung zum/zur Klinischen Chemiker/in
13.10. - 16.10.2010 Lisbon, Portugal	First European Joint Congress of EFCC and UEMS Laboratory Medicine in Healthcare
26.10.2010 Frankfurt am Main	Qualitätssicherung im analytischen Labor, Teil I Akkreditierung, Zertifizierung und Anerkennung (gemeinsam veranstaltet mit EUROLAB/Deutschland)
27.10.2010 Frankfurt am Main	Qualitätssicherung im analytischen Labor, Teil II Elemente der Qualitätssicherung und Qualitätslenkung in der Analytik (gemeinsam veranstaltet mit EUROLAB/ Deutschland)

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