

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

PRÄSIDIUM

Präsident	Prof. Dr. K. Lackner, Mainz
Vizepräsident	Prof. Dr. J. Thiery, Leipzig
Schriftführer	Prof. Dr. K. P. Kohse, Oldenburg
Schatzmeister	Prof. Dr. H. Patscheke, Karlsruhe
Weitere Präsidiumsmitglieder	Prof. Dr. R. Lichtinghagen, Hannover Prof. Dr. J. Aufenanger, Ingolstadt

GESCHÄFTSSTELLE

Geschäftsführer	Dr. Jens Klabunde Geschäftsstelle der DGKL Friesdorferstr. 153, D-53175 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. C. Knabbe, Stuttgart

REFERENZINSTITUT FÜR BIOANALYTIK

Geschäftsstelle	Dr. R. Kruse Dr. W.- J. Geilenkeuser Friesdorferstr. 153, D-53175 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

Labormanagement - eine immerwährende Herausforderung	105
Prof. Dr. J. Aufenanger; Ingolstadt	

AUS DER GESCHÄFTSSTELLE

Nutzen Sie Ihren kostenlosen online-Zugang zur CCLM!	108
--	-----

AUS DER GESELLSCHAFT

Arbeitsgruppe Porphyrien: Gründung der DGKL-Arbeitsgruppe Porphyrien	109
Prof. Dr. M. Vogeser; München	

Sektion Immundiagnostik: Gründung der Sektion „Immundiagnostik“ der DGKL	111
Dr. K. Conrad; Dresden	

Protokoll der Mitgliederversammlung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL) vom 17. Mai 2011	115
Prof. Dr. Dr. K. Kohse; Oldenburg	

Forschungsbericht: IT-Werkzeuge zur Auswertung großer labordiagnostischer Datensätze	124
Prof. Dr.G. Hoffmann; Grafrath	

Forschungsbericht: Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie mittels UPLC-MS-TOF zur Labordiagnostischen Erfassung und Beurteilung von Vergiftungen	131
B. Henschel, A. von Meyer, Dr. J. Hallbach; München	

AUS DEM MITGLIEDERKREIS

Dissertation: Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN 2) in kultivierten hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten der Rattenleber unter Einfluss von Zytokinen und Signalinhibitoren	140
I. Demirci; Aachen	

Dissertation: Gewebstransglutaminase und Autoantikörper gegen Gewebestransglutaminase in humanen Liquor-Serum-Probenpaaren	142
A. Taubert; Leipzig	

Dissertation: HPLC-Analytik des Vitamin C - Methodenoptimierung und Referenzwerterstellung C. M. Focke; Lübeck	143
Dissertation: Mechanisms of monocyte activation and differentiation J. D. Kandemir; Pfaffenhofen	144
Dissertation: Methodenentwicklung zur Analyse von bioaktiven Lipiden mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie M. Scherer; Regensburg	149
Habilitation: Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Bedeutung für Proliferation und Invasion P. Neth; München	152
VERANSTALTUNGEN	
Laborleitertreffen Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern 2011 Dr. K.-G. Heinze; Berlin	155
Kongressankündigung der DGKL-Sektion Immundiagnostik Dr. K. Conrad; Dresden	163
Veranstaltungskalender	166
PREISE	
Laudatio: Preis für Biochemische Analytik an Prof. Dr. Svante Pääbo Prof. Dr. J. Thiery; Leipzig	167
Laudatio: Biochemical Analysis Prize to Dr. Jonathan Rothberg Prof. Dr. K. Lackner; Mainz	171
PERSONALIA	
Neue Mitglieder, Verschollene Mitglieder	173
Antrag auf DGKL Mitgliedschaft /Änderung der Anschrift	174
STELLENAUSSCHREIBUNGEN	175

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
SCHRIFTLEITUNG UND REDAKTION	Prof. Dr. Dr. med. Thomas Demant, Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Friedrichstr. 41, 01067 Dresden, Tel: +49 (0351) 480-3900, e-Mail: demant-th@khdf.de
LAYOUT UND SATZ	Vanessa Dietrich, Geschäftsstelle der DGKL, Friesdorfer Str. 153, 53175 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, Martin-Luther-Straße 2-6, 53757 Sankt Augustin, Tel: +49 (02241) 9133-0, e-Mail: guenter@sz-druck.de
AUFLAGE	ca. 1200 Stück
ERSCHEINUNGSWEISE	vierteljährlich
ISSN	0173-6647

Labormanagement – eine immerwährende Herausforderung

Gründung einer neuen Sektion „Labormanagement“

PROF. DR. J. AUFENANGER, Ingolstadt

Obwohl die Kosten für die Labormedizin im Verhältnis zu den Gesamtausgaben im Gesundheitssystem verschwindend gering sind, führt der Kostendruck dazu, dass vor allem am Krankenhauslabor gespart wird. Nur 7,3 % der Krankenhäuser in Deutschland haben eine fachärztliche Leitung des Labors. Die Anzahl der Krankenhauslaborärzte nimmt ständig ab.

Hinzu kommt, dass die zunehmende politisch gewollte Verschmelzung sektoraler Grenzen in den Versorgungsstrukturen eine besondere Herausforderung an die medizinischen Labore der Krankenhäuser und an die Krankenhauslabormedizin per se darstellt. Bedingt durch die ambulante Öffnung der Krankenhausstrukturen (MVZ, integrierte Versorgung, ambulante Behandlung im Krankenhaus (§116b SGB V), (Teil-)Zulassungsmöglichkeiten von Krankenhauslaborärzten (§20 Abs. 1, Ärzte-ZV)) müssen die Krankenhauslabore in Zukunft den ökonomischen Spagat bewältigen zwischen medizinisch-fachlicher und apparativ hochaufwendiger stationären z. T. intensivmedizinischen Versorgung bei gleichzeitiger ständigen Verfügbarkeit auch für den vertragsärztlichen Bereich (ambulante Notfallversorgung rund um die Uhr und an Wochenenden) und der

wesentlich ökonomischer darstellbaren laborärztlichen Versorgung der Patienten im niedergelassenen Bereich u.v.m. - und das alles vor dem Hintergrund der sich nach unten entwickeln-

den Gebührenstrukturen infolge der zu erwartenden Änderungen der GOÄ und des EBM. Sinkende Erlöse bei steigenden Kosten beflügeln die Outsourcings Gedanken der Krankenhausträger mit dem mutmaßlichen Ziel, bis 2015 über 70% der Krankenhauslabore in fremde Betreiberstrukturen auszugliedern (Aktiva, 2011).

Um diese Entwicklung aufzuhalten muss sich das Krankenhauslabor einem Paradigmenwechsel unterziehen und sich vom Cost-Center zum Kompetenz- und Service-Center wandeln. Hierzu gehört es, den Mehrwert des Krankenhauslabors und seine Stellung in der Wertschöpfungskette des Gesamtunternehmens Krankenhaus besser darzustellen und zur Geltung zu bringen.

Das stellt für das Krankenhausmanagement neue Herausforderungen dar. Besonders vor



dem Hintergrund der im Jahre 2003 eingeführten diagnosebezogenen Fallgruppen (DRG) als neues Entgeltsystem für Krankenhausleistungen, aber auch unter Betrachtung der demographischen und gesellschaftlichen Entwicklungen auf dem Gesundheitsmarkt, gewinnt die Optimierung der Prozessabläufe, mit den Zielen einer erhöhten Kostentransparenz und gleichzeitiger Qualitätssteigerung der Leistungserbringung, immer mehr an Bedeutung.

Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, rücken entlang der Wertschöpfungskette bewusst gestaltete und transparent gemachte Leistungsprozesse zunehmend in den Vordergrund. Ausgangspunkt ist die Erkenntnis, dass unzureichend abgestimmte Leistungsprozesse sowohl eine enorm kostentreibende Wirkung entfalten können, als auch mit dem Risiko von Qualitätseinbußen verbunden sind.

Transparenz und Nachvollziehbarkeit der diagnostischen Prozesse bewirken, dass

- die Diagnosefindungen nach einem festgelegten und einheitlichen Qualitätsstandard erfolgen, der sektorübergreifend den gesamten Prozess berücksichtigt,
- eine Plattform der interdisziplinären Kommunikation für die beteiligten Berufsgruppen geschaffen wird,
- Verbesserungspotenziale in den aktuell

existierenden diagnostischen Prozessen aufgezeigt werden,

- Defizite in der Diagnostik schneller erkannt und erforderliche Veränderungen angeregt werden,
- Art und Umfang des Ressourcen-Verbrauchs benannt werden können,
- Grundlagen für Mitarbeiterschulungen geschaffen und damit einheitliche Diagnosestandards durchgesetzt werden,
- die Fachabteilungen effektive und valide Daten zur Prozesssteuerung erhalten,
- und eine weitgehende Rechtssicherheit geschaffen wird.

Zur Umsetzung aller dieser Ziele und zur Abstimmung sowie Transparenzmachung der Leistungsprozesse werden zum Beispiel diagnostische Pfade und Workflow-Management-Systeme ausgehend vom Krankenhauslabor als strategische Instrumente eingesetzt.

Wegen der Vielfalt der notwendigen Untersuchungen bieten sich Laboruntersuchungen in hohem Maße für eine Erbringung in Netzwerkstrukturen an. Solche Netzwerke sollten regional und sektorübergreifend organisiert sein, d.h. den ambulanten und stationären Versorgungsbereich verzahnen. Auf diesem Weg könnte einerseits unnötige Doppelanalytik vermieden werden und andererseits eine bessere Vergleichbarkeit von Untersuchungsergebnissen aus verschiedenen

Laboratorien erreicht werden. Eine weitere Folge von Netzwerken und Kooperationen wäre eine Mittelfreisetzung für andere Bereiche der Versorgung mit Gesundheitsleistungen. Qualitäts- und Wirtschaftlichkeitsaspekte könnten gleichgerichtete Impulse erzeugen. Seltene Untersuchungen sollten kompetent und wirtschaftlich in einzelnen Fachlaboratorien bearbeitet werden, häufige und zeitkritische Untersuchungen dagegen patientennah im Krankenhaus. Nicht nur am Beispiel der Mikrobiologie lassen sich die Vorteile eines Labors vor Ort im Krankenhaus auch ökonomisch darstellen. Die Entscheidung über die Vergabe von Laborleistungen an externe Laboratorien muss aber immer unter Berücksichtigung der Gesamteffizienz eines Krankenhauses getroffen werden. Denn Krankenhauslaboratorien müssen für Eil- und Notfälle und darüber hinaus, je nach Versorgungsstufe, in unterschiedlicher Breite kompetent bleiben.

So lag und liegt es nahe, dass die DGKL viele dieser Herausforderungen bereits in Arbeitsgruppen thematisiert hat. Um der besonderen Bedeutung dieser zukünftigen Anforderungen Rechnung zu tragen, sollen die thematisch verwandten Arbeitsgruppen, die sich mit der Bearbeitung ähnlicher Fragestellungen beschäftigen:

- Labormanagement
- Öffentlichkeitsarbeit
- Diagnostische Pfade

- Multimediale Lehre
- POCT
- In-/Outsourcing

mit dem Ziel der Synergiebündelung unter dem gemeinsamen Dach einer Sektion „Labormanagement“ zusammengefasst werden. Als Leiter dieser Sektion wurde Priv. Doz. Dr. Matthias Orth, Stuttgart vorgeschlagen.

PROF. DR. JOHANNES AUFENANGER

Mitglied des Präsidiums

Mitglied des Vorstands der Berufsverbands Dt. Laborärzte (BDL e.V.)

Literaturzitate können beim Autor angefordert werden.

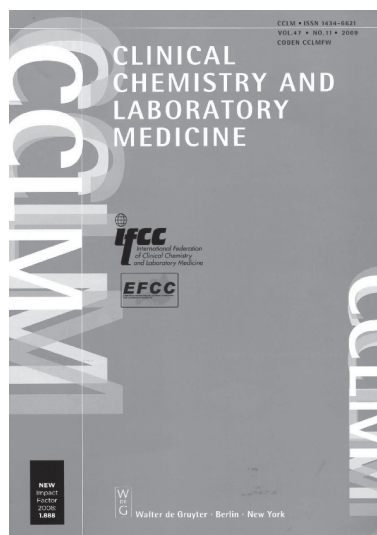
Nutzen Sie Ihren kostenlosen online-Zugang zur CCLM!

Zu den Vorteilen der DGKL-Mitgliedschaft zählen die stark vergünstigten Abonnements der LaboratoriumsMedizin und der **freie Zugang** zur online Ausgabe von LaboratoriumsMedizin und CCLM.

Die Partnerschaft zwischen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL) und dem Verlag De Gruyter besteht seit 2003.

De Gruyter gibt die Zeitschrift *LaboratoriumsMedizin / Journal of Laboratory Medicine* als offizielles Organ der DGKL heraus. Der Verlag publiziert außerdem das Journal Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), in Zusammenarbeit mit der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) und der European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFCC). CCLM ist ebenfalls offizielles Organ der DGKL. Beide Journals werden auf De Gruyter's online Plattform **www.reference-global.com** bereitgestellt.

Ihre DGKL Geschäftsstelle



Arbeitsgruppenbericht

Gründung der DGKL-Arbeitsgruppe Porphyrien

PROF. DR. MED. MICHAEL VOGESER, München

Im Mai 2011 hat sich die DGKL-Arbeitsgruppe Porphyrien mit einem Auftakt-Meeting in München formiert.

Porphyrien stellen eine sehr vielfältige Gruppe von Erkrankungen dar, die jeweils ätiologisch auf Störungen in der Häm-Synthesekette zurückzuführen sind. Die akuten Porphyrie-Formen können lebensbedrohliche Verläufe zeigen; eine rasche und sichere Diagnostik ist Voraussetzung für eine effiziente Therapie. Chronische Porphyrien manifestieren sich überwiegend als Hautleiden. Allen Porphyrien ist gemeinsam, dass sie letztlich laborchemisch diagnostiziert werden. Da es sich insgesamt um seltene Erkrankungen handelt, stellt die korrekte Diagnostik der Porphyrien immer wieder eine Herausforderung dar. Gerade die durch die DGKL repräsentierten Labordiagnostiker sind typischerweise durch die Primärberatung bei Fällen von Porphyrie-Verdacht gefordert; daher besteht ein wesentlicher Bedarf an Hintergrundkenntnissen in diesem Bereich.

Entsprechend hat sich die AG folgende ZIELE gesetzt:

- Verbesserung der Versorgung von Porphyrie-Patienten, vor allem durch eine Verbesserung der Effizienz in der Porphyrie-Diagnostik

- Expertenwissen soll den Mitgliedern der DGKL gut zugänglich gemacht werden
- Kontaktaufnahme zu deutschsprachigen Porphyrie-Experten und Zugang zu geeigneter Diagnostik soll über die Internetpräsenz der DGKL optimiert werden
- Aufrechterhalten und Ausbau von Expertenwissen zu Porphyrien in Deutschland
- Prospektiv Erfassung und wissenschaftliche Aufarbeitung von Porphyrie-Fällen in Deutschland
- Verbesserung des Kenntnisstandes der Ärzteschaft (über die DGKL hinaus) im Bereich der Porphyrien

PROJEKTE:

- Darstellung etablierter diagnostischer Leitlinien zum Vorgehen bei Porphyrie-Verdacht in klar strukturierter Form im Rahmen der DGKL-Internetpräsenz.
- Ausbau der AG-Internetseite mit Darstellung dieser Leitlinien, Verzeichnis von relevanten Internet-Links, Laborverzeichnis und Einrichtung eines Forums

- Verfassen von Übersichtsartikeln (Dt. Ärzteblatt, Landesärzteblätter, etc.)
- Ausrichtung von Fortbildungsveranstaltungen, besonders auch im Rahmen der DGKL-Jahrestagung 2012
- Umfrage zur Porphyrie-Diagnostik anhand der Laborliste der DGKL
- Etablierung bzw. Vorbereitung eines deutschen Porphyrie-Fall-Registers mit Eingabemöglichkeit über die DGKL-Homepage; hierfür zunächst Ausarbeitung eines Internet-basierenden case report files

MITGLIEDER:

PROF. DR. MED. MICHAEL VOGESER (SPRECHER)

Institut für Klinische Chemie
Klinikum der Universität München
Marchioninstr. 15, 81377 München

BIRGIT BARYSCH

Produktspezialistin
Orphan Europe (Germany) GmbH
Max-Planck-Straße 6, 63128 Dietzenbach

PROF. DR. MED. MANFRED O DOSS

Em. Direktor des Instituts für
Klinische Biochemie am
Klinikum der Philipps-Universität Marburg
Postfach 1220, 35002 Marburg an der Lahn

DR. NICOLE JACHMANN

MVZ Dr. Eberhard & Partner
Brauhausstr. 4
44137 Dortmund

PROF. DR. KLAUS G. PARHOFER

Medizinische Klinik II - Grosshadern
Klinikum der Universität München
Marchioninstr. 15, 81377 München

PROF. DR. PETRO E. PETRIDES

Zweibrückenstr. 2, 80331 München

DR. THOMAS STAUCH

Klinische Chemie
- Porphyrie-Speziallabor EPNET -
MVZ Labor Prof. Seelig
Kriegsstr. 99, 76133 Karlsruhe

PROF. DR. ULRICH STÖLZEL

Klinikum Chemnitz / Med. Klinik II
Flemmingstr. 2, 09116 Chemnitz

VERFASSER:

PROF. DR. M. VOGESER

Klinikum Großhadern der LMU
Institut für Klinische Chemie -
Bereichsleiter Endokrinologie
Marchioninstr. 15
81377 München

14.Juni 2011

Sektionsbericht

Gründung der Sektion „Immundiagnostik“ der DGKL

KARSTEN CONRAD, ROBERT LANGE und DIRK REINHOLD

Auf Anregung des Vorstandes der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin und in Absprache mit dem Beirat der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V. wurde am 30. September 2010 die Sektion „Immundiagnostik“ gegründet. Die konstituierende Sitzung fand im Rahmen der Jahrestagung der DGKL in Mannheim statt. Neben den 16 Gründungsmitgliedern nahmen an der Gründungsversammlung auch der Präsident der DGKL Herr PROF. DR. KARL LACKNER und der Geschäftsführer der DGKL Herr DR. JENS KLABUNDE teil.

Die Immundiagnostik ist ein Spezialgebiet der Laboratoriumsdiagnostik mit fließenden Übergängen in andere Spezialgebiete (z. B. endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik; J Lab Med 2010;34:93–94). Der Begriff „Immundiagnostik“ ist nicht einheitlich definiert und umfasst nach früheren Vorstellungen die Diagnostik mittels immunologischer Nachweisverfahren, nach neuerer Auffassung jedoch die Analytik aller das Immunsystem betreffender Parameter (Immunzellen, Immunmediatoren, Antikörper, Immungene) zur Diagnostik von Immunerkrankungen (Allergien, Autoimmunerkrankungen, autoinflammatorische Erkrankungen,

Immundefekterkrankungen) oder pathologischen bzw. nicht erwünschten Immunreaktionen (Transplantatabstoßung, Graft-versus-Host-Disease, rezidivierende Aborte). Von immungenetischen, serologischen (klassische substratgebundene Immunfluoreszenzmethoden, Immundiffusion bzw. –präzipitation, spezifische Immunoassays wie ELISA oder RIA) bis hin zu zellulären Verfahren (Durchflusszytometrie, Elispot, IGRA) steht heute eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, um Krankheiten zu erkennen und Therapien zu begleiten. Auf Grund der interdisziplinären Ausrichtung (so ist z. B. die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen für alle medizinischen Teilgebiete relevant!) gibt es bisher kein Gremium, welches anstrebt, alle Aspekte der Immundiagnostik zu bündeln. Eine interdisziplinäre Zusammenarbeit unter dem Dach der DGKL soll nun Impulse zur Optimierung dieses Spezialgebietes geben.

ZIELE

Wesentliches Ziel der Sektion Immundiagnostik ist die Etablierung eines Kompetenznetzwerkes für immunologische Diagnostik und damit die Bündelung interdisziplinärer Aktivitäten auf dem Gebiet der Immundiagnostik.

In der Vergangenheit konnte oftmals gezeigt werden, dass konsekutiv gesammelte Befundkonstellationen, die im Dialog mit klinisch tätigen Kollegen diskutiert wurden, an Bedeutung gewonnen und eine hohe Evidenz ermöglicht haben. Die Sektion Immundiagnostik möchte daher innerhalb der DGKL Labormedizinern, klinischen Immunologen, interessierten Ärzten aller medizinischen Teildisziplinen sowie Grundlagenwissenschaftlern eine Plattform bieten, die es erlaubt,

- fachliche Diskussionen zu führen und Kooperationen anzubahnen,
- die Aus- und Weiterbildung in diesem wichtigen Querschnittsfach sowohl auf medizinisch-technischer als auch wissenschaftlicher Basis zu fördern,
- die Ausrichtung von Veranstaltungen und Fortbildungen zusammen mit anderen Sektionen und Arbeitsgruppen immunologisch ausgerichteter Fachgesellschaften zu ermöglichen sowie
- die Standardisierung der Methoden voranzutreiben und die Qualitätssicherung fortzuentwickeln.

Zur Umsetzung dieser Ziele sollen drei Aufgabenbereiche entwickelt werden:

1. Fortbildung/Kongresse/Publikationen (Leitung: DR. ROBERT LANGE, Bernau). Die Sektion wird Workshops im Rahmen der Jahrestagung der DGKL

sowie anderer Fachgesellschaften veranstalten sowie sich als Kooperationspartner an bereits etablierten Veranstaltungsreihen (Immundiagnostische Meetings, Autoimmuntage in Bernau, Dresden Symposium on Autoantibodies) beteiligen.

2. Qualitätsmanagement/Standardisierung (Leitung: PROF. DR. ULRICH SACK, Leipzig; DR. THORSTEN KRIEGER, Hamburg).
3. Studien/Projekte/Biobanken (Leitung: DR. JÖRG HOLLIDT, Henningsdorf).

Um die Arbeit der Sektion mit Leben zu erfüllen, ist die aktive Mitarbeit der Mitglieder sowie die Gewinnung weiterer Mitglieder (v.a. für bestimmte Spezialgebiete wie Immunogenetik, Immundefektdiagnostik) erforderlich. Herzlich möchten wir alle an den genannten Themen interessierten Kolleginnen und Kollegen, die Mitglieder der DGKL sind, zur Mitarbeit anregen. Sie können der Sektion über die Geschäftsstelle der DGKL offiziell beitreten. Das kann entweder über ein Formblatt, das auf der Homepage der DGKL zum Download bereitsteht, geschehen oder auch formlos per E-Mail. Nichtmitglieder der DGKL sind herzlich eingeladen, über themenbezogene Arbeitsgruppen die Sektionsarbeit mitzugestalten.

Mit kollegialen Grüßen im Namen der Gründungsmitglieder

KARSTEN CONRAD, ROBERT LANGE UND
DIRK REINHOLD

STRUKTUR

1. BEIRAT

PD DR. KARSTEN CONRAD, Dresden
(Vorsitzender)
e-mail: karsten.conrad@tu-dresden.de

PROF. DR. MED. ULRICH SACK, Leipzig
e-mail: ulrich.sack@medizin.uni-leipzig.de

PROF. DR. MED. HARALD RENZ, Marburg
e-mail: renzh@med.uni-marburg.de

2. ARBEITSBEREICHE

Fortbildungen/ Kongresse/ Publikationen

DR. RER. NAT. ROBERT LANGE, Bernau
e-mail: rlange@hospital-laborverbund.de

Qualitätsmanagement/Standardisierung

PROF. DR. MED. ULRICH SACK, Leipzig
e-mail: ulrich.sack@medizin.uni-leipzig.de

DR. MED. THORSTEN KRIEGER, Hamburg
e-mail: Thorsten.Krieger@ae-
sculabor-hamburg.de

Studien/Projekte/Biobanken

DR. RER. NAT. JÖRG HOLLIDT, Hennigsdorf
e-Mail: jm.hollidt@inventdiagnostica.de

3. MITGLIEDER

DR. MED. CARMEN BARTHUBER, Düsseldorf
e-mail: Carmen.Barthuber@med.uni-duesseldorf.de

DR. RER. NAT. MARTIN BLÜTHNER, Karlsruhe
e-mail: bluethner@seelig.de

PROF. DR. MED. FRANK BÜHLING, Cottbus
e-mail: f.buehling@ctk.de

DR. MED. STEFAN BARLAGE, Schüttorf
e-mail: stefan.barlage@labor-nordwest.de

PROF. DR. RER. NAT. ELENA CSERNOK,
Bad Bramstedt
e-mail: e.csernok@klinikumbb.de

PD DR. MED. EUGEN FEIST, Berlin
e-mail: eugen.feist@charite.de

PROF. DR. MED. RUDOLF GRUBER, Weiden
e-mail: rudolf.gruber@synlab.de

PROF. DR. MED. KLAUS HARTUNG, Bremerhaven
e-mail: klaus.hartung@zkr.de

PROF. DR. MICHAEL KIRSCHFINK, Heidelberg
e-mail: Michael.Kirschfink@urz.uni-heidelberg.de

PD DR. RER. NAT. ARNO KROMMINGA, Hamburg
e-mail: arno.kromminga@ipm-biotech.de

DR. MED. RICHARD MAUERER, Weiden
e-mail: richard.mauerer@synlab.com

PROF. DR. MED. DIRK REINHOLD, Magdeburg
e-mail: dirk.reinhold@med.ovgu.de

DR. RER. NAT. DIRK ROGGENBUCK, Dahlewitz
e-mail: dirk.roggenbuck@genericassays.com

DR. MED. BERNHARD SCHLÜTER, Münster
Bernhard.schlueter@ukmuenster.de

PD DR. MED. MICHAEL SCHMOLKE, München
pd-mischmo@gmx.de

PROF. DR. MED. MATTHIAS SCHOTT,
matthias.schott@med.uni-duesseldorf.de

PROF. DR. RER. NAT. HABIL ATTILA TARNOK, Leipzig
tarnok@medizin.uni-leipzig.de

PROF. DR. MED. PHILIPP VON LANDENBERG,
Olten (CH)
e-mail: philipp.landenberg@spital.so.ch

4. PROJEKTE UND AKTIVITÄTEN

In der Zwischenzeit hat die Sektion mit der aktiven Arbeit begonnen, derzeit gehören ihr 24 Mitglieder an. Eine weitere Sektionssitzung fand am 25. März 2011 im Rahmen des 7. Immundiagnostischen Meetings der GFID/DGKL statt. Folgende Veranstaltungen wurden oder werden von der Sektion mitgestaltet:

- **7. Immundiagnostisches Meeting** in Hamburg, 25.-27. März 2011 (Leitung: PD DR. K. CONRAD; <http://www.gfid-ev.de>)
- **13. Autoimmuntage in Bernau**, 19.-20. Mai 2011 (Leitung: DR. R. LANGE;

<http://www.hospital-laborverbund.de/veranstaltungen/13.-autoimmuntage-in-bernaue>)

- **10th Dresden Symposium on Auto-antibodies**, 22.-25. September 2011 (Leitung: PD DR. K. CONRAD; <http://www.gfid-ev.de>))
- **8. Immundiagnostisches Meeting** in Essen, 15.-17. März 2012 (Leitung: PD DR. K. CONRAD; <http://www.gfid-ev.de>)

VERFASSER:

PD Dr. med. KARSTEN CONRAD

Institut für Immunologie
Medizinische Fakultät „Carl Gustav Carus“
der Technischen Universität Dresden
Fetscherstrasse 74
01307 Dresden
Tel.: 0351 458 6540
Fax: 0351 458 6308
e-mail: k_conrad@mail.zih.tu-dresden.de

Protokoll der Mitgliederversammlung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)

Dienstag, 17. Mai 2011, 17:00 Uhr – 18:30 Uhr

Internationales Congress Center Berlin, Raum 43,
Neue Kantstr. / Ecke Messedamm 22, 14057 Berlin

TOP 1 FESTSTELLUNG DER ORDNUNGSGEMÄSSEN LADUNG UND DER BESCHLUSSFÄHIGKEIT DER MITGLIEDERVERSAMMLUNG

Der Präsident stellt die satzungs- und fristgemäße Ladung und die Beschlussfähigkeit der Mitgliederversammlung fest. Dem wird nicht widersprochen. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich 79 stimmberechtigte Mitglieder im Raum. Gäste melden sich auf Befragen nicht.

TOP 2 ANNAHME DER TAGESORDNUNG

Die Tagesordnung wird ohne Änderungswünsche angenommen.

TOP 3 BERICHT DES PRÄSIDENTEN UND AUSSPRACHE ÜBER DEN BERICHT

Im Folgenden ist der Bericht des Präsidenten in wörtlicher Rede wiedergegeben.

„Sehr geehrte Damen und Herren, liebe Kolleginnen und Kollegen,

der Bericht des Präsidenten fällt in diesem Jahr naturgemäß etwas kürzer aus, weil unsere letzte Mitgliederversammlung erst 7 Monate zurückliegt. Die Periode war

erwartungsgemäß von der Vorbereitung der Tagung in Berlin geprägt, die das Präsidium und mich intensiv beschäftigt hat. Ich gehe davon aus, dass die meisten von Ihnen ja Gelegenheit gehabt haben, sich von der Qualität der Tagung selbst zu überzeugen. Aus Sicht des Präsidiums stellt sich der Kongress als ganz großer Erfolg dar. Wir haben derzeit über *4.500 Teilnehmer* und es ist nicht auszuschließen, dass wir bis zum Ende der Tagung die 5.000 überschreiten werden. Diese Zahl bedeutet einen neuen Rekord für die WorldLab. Ich denke, dass man das hervorragende Interesse auch an den Sitzungen und der Industrieausstellung spüren kann. Auch die Beteiligung der Industrie an der WorldLab hat alle Erwartungen erfüllt, wenn nicht übertroffen, was sich an der umfangreichen Ausstellung auch direkt ablesen lässt. Ich möchte deshalb hier den beiden Kongresspräsidenten HARALD RENZ und RUDOLF TAUBER meinen herzlichen Dank im Namen des gesamten Präsidiums, und ich denke auch aller Mitglieder, für die geleistete Arbeit aussprechen. Sie haben erheblich zum Ansehen der DGKL in der Welt beigetragen.

Für die, die keine Gelegenheit hatten, heute der **Preisverleihung** des *Preises Biochemische Analytik* beizuwohnen, möchte ich sagen, dass wir in diesem Jahr mit Dr. JONATHAN ROTHBERG und PROF. SVANTE PÄÄBO zwei absolut herausragende Preisträger geehrt haben. Die Vorträge der beiden stellen sicher einen Höhepunkt der WorldLab dar. Dr. ROTHBERG ist für die *Entwicklung des Next-Generation-Sequencing* geehrt worden, Prof. PÄÄBO für die *Begründung der Evolutionsgenetik*, die in der Entzifferung des Neanderthaler-Genoms gipfelte.

Ich möchte dann zur aktuellen **Situation der Sektionen** kommen. Momentan sind 3 Sektionen gegründet und haben ihre Arbeit aufgenommen. Es sind dies die *Endokrinologische Diagnostik*, die *Molekulare Diagnostik* und die *Immunologische Diagnostik*. In der Gründung befinden sich eine Sektion für Pädiatrische Diagnostik, die jetzt durch den Vorkongress einen neuen Schub bekommen hat, und eine Sektion für Labormanagement. Interessenten für diese beiden Initiativen sollten sich mit unserem Präsidiumsmitglied Prof. LICHTINGHAGEN in Verbindung setzen. Es wird auch einen entsprechenden Bericht im kommenden Heft der Mitteilungen geben.

Ich möchte dann kurz auf die **Situation der Lehrstühle** eingehen. Wir gehen davon aus, dass das Berufungsverfahren an der LMU in München noch in diesem Jahr erfolgreich abgeschlossen werden wird. Auch

das Verfahren an der TU München ist im Gang. Hier ist es aber zu früh, weiteres zu sagen. Besonders freut mich, dass Herr Kollege ISERMANN am 1. April 2011 die Nachfolge von HERRN LULEY in Magdeburg angetreten hat. Etwas länger zurück liegt der Wechsel von HERRN KNABBE von Stuttgart auf die Nachfolge von HERRN KLEESIEK in Bad Oeynhausen, die im letzten Herbst erfolgte.

Ein weiterer sehr positiver Aspekt ist die kontinuierlich hohe **Forschungsförderung** durch die Stiftung und die DGKL, die sich weiterhin in einer Größenordnung von ca. 1 Million Euro bewegt. Sie alle wissen, dass diese Förderung natürlich Ergebnis der erfolgreichen Arbeit des RfB ist und einerseits unmittelbar von unserer Gemeinnützigkeit abhängt, aber andererseits natürlich eine der Säulen unserer Gemeinnützigkeit ist, weil wir mit dieser Förderung natürlich wesentlich unseren Gesellschafts- und Stiftungszweck erfüllen. Ich darf daran erinnern, dass wir Projekte oder Stipendiaten nur nach positiver Begutachtung durch unabhängige Gutachter fördern, wobei wir uns eng an die Regularien der DFG anlehnen. Der Hauptunterschied besteht vor allem darin, dass wir stärker labordiagnostisch relevante Themen und weniger „Basic Science“ fördern als die DFG. An dieser Stelle gilt mein Dank ULRICH WALTER aus Würzburg, der als Sekretär der Stiftung ganz entscheidend dazu beigetragen hat, dass die Stiftung ihre Arbeit tun kann. Er wird seine Tätigkeit an HERRN BRAND aus

Hannover übergeben, der die nächsten Jahre der DGKL als *Stiftungssekretär* zur Verfügung stehen wird. Wie immer möchte ich auch diesmal wieder daran erinnern, dass wir nur Projekte fördern können, wenn auch entsprechende Anträge vorliegen, und sie ermuntern, hier aktiv zu werden. Die Stiftung hat bisher noch jedes positiv begutachtete Projekt fördern können, auch das ist nicht selbstverständlich.

Sie wissen, dass die **Geschäftsstelle** im Frühjahr in neue Räume **in Bonn** umgezogen ist, nachdem die alten viel zu beengt gewesen waren und das RfB seine Arbeit kaum noch adäquat durchführen konnte. Die neuen Räume sind – wie bisher auch – angemietet. Wir haben uns nach reiflicher Überlegung gegen einen durchaus möglichen Kauf einer Immobilie entschieden, da die gesamtwirtschaftliche Betrachtung für ein Mietobjekt die günstigere war. Die neuen Räume sind gut gelegen, funktionell und ich denke, dass die Mitarbeiter gerne umgezogen sind und auch gute Arbeit beim Umzug und der Planung der neuen Räume geleistet haben. Somit ist die Raumsituation jetzt wieder zukunftsfest, was sie zuletzt nicht mehr war.

Sie alle haben in der Tagesordnung gesehen, dass heute einige **Wahlen** anstehen. Im Vorfeld wurde von einem Mitglied der Antrag gestellt, dass die Kandidaten zukünftig eine eidesstattliche Erklärung abgeben sollten, dass sie keinerlei Beraterverträge mit

der Industrie haben. Da dies eine Satzungsänderung erfordern würde, möchte ich dazu kurz Stellung nehmen. Die Vorstandsmitglieder sind ausschließlich ehrenamtlich tätig. Es ist nicht angebracht – nachdem wir bisher an dieser Stelle noch kein Problem hatten – jetzt einen solchen administrativen Aufwand zu treiben, der ja auch ein erhebliches Misstrauen gegenüber den Kandidaten zum Ausdruck bringt. Seitens des Vorstandes würden wir einen solchen Antrag deshalb nicht unterstützen, da auch die Auswirkungen auf die Bereitschaft, sich zur Wahl zu stellen nicht absehbar wäre. Letztlich bleibt es aber den Mitgliedern freigestellt einen entsprechenden Antrag auf Satzungsänderung zu stellen.

Ein weiterer Tagesordnungspunkt, den Sie gesehen haben, befasst sich mit dem Ergebnis einer Diskussion zwischen der Weiterbildungskommission und dem Vorstand zur **Änderung der Weiterbildungsordnung**. Ich werde dazu jetzt nichts weiter sagen, weil wir diesen Punkt nachher noch einmal besprechen können.

Damit bin ich am Ende meines Berichts und stehe Ihnen für die Aussprache zur Verfügung.“

Es erfolgen keine weiteren Wortmeldungen zum Bericht des Präsidenten.

TOP 4 BERICHT DES SCHATZMEISTERS (GESCHÄFTSJAHR 2010)

Der Jahresbericht für 2010 ist der erste nach der Überführung des Zweckbetriebs „Referenzinstitut für Bioanalytik“ in die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik und der letzte, den HERR PATSCHEKE im Amt des Schatzmeisters den Mitgliedern erstattet. Ende 2011 wird seine Amtszeit nach 15 Jahren, 6 als Schatzmeister der DGKC und 9 als Schatzmeister der DGKL, enden. Im Jahr 2010 wurde wie in allen Jahren zuvor ein ausgeglichenes Ergebnis der Einnahmen und

Ausgaben und erneut ein Zuwachs des Vermögens der Gesellschaft erzielt. Die Aufwendungen für die Forschungsförderung durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik sind nunmehr vollumfänglich bei der Stiftung gebucht, außerdem die Aufwendungen für wissenschaftliche Preise.

HERR PATSCHEKE erläutert die nachstehend wiedergegebene Einnahmen-Ausgabenrechnung für das Jahr 2010.

I. EINNAHMEN	Euro
Mitgliedsbeiträge natürliche Personen	72.780
Mitgliedsbeiträge juristische Personen	33.435
Repetitorium Bremen	17.590
Tagungen	72.367
Erträge Rechteüberlassung	81.568
Kapitalerträge	82.862
Zuwendungen aus der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik	250.000
Summe	610.602
II. AUSGABEN	Euro
Administration Geschäftsstellen BN und KA	-63.328
Personal	-37.870
Vorstand, Beiträge, etc.	-25.953
AfA	-3.427
Mitgliederzeitschriften	-60.764
Tagungen	-87.071
Repetitorium	-22.754
AGs und Kommissionen	-48.969
Delegierte	-5.609
Stiftungsprofessur	-128.485
	-484.846
Freie Rücklage	-99.427
Rücklage, zeitnah zu verwenden	-26.000
Summe	-609.658
III. JAHRESABSCHLUSS	944

HERR PATSCHEKE hebt in einem kurzen Rückblick einige Meilensteine der strukturellen Entwicklung der DGKC und DGKL im Zeitraum

von 1997 bis 2011 aus Schatzmeister-Sicht hervor.

Meilensteine der strukturellen Entwicklung 1997-2011 aus Schatzmeister-Sicht	
DGKC 1997-2002	
1998	Kooperationsvertrag DGKC/DGLM
1998	Strukturgutachten für das Referenzinstitut für Bioanalytik durch Patscheke und Wissner und Umzug des Referenzinstituts für Bioanalytik in neue Räume
1999	Errichtung der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik
2001	Präsidium der DGLM und Vorstand der DGKC beauftragen eine Zweierkommission, bestehend aus Patscheke(DGKC) und Vogt (DGLM), konkrete Schritte zu einer Fusion zu sondieren
2002	Mitgliederversammlungen von DGLM und DGKC beschließen die Verschmelzung beider Gesellschaften zur DGKL
2002	Die DGKC erwirbt Gesellschaftsanteile an der DACH GmbH
DGKL 2002-2011	
2003	Errichtung der Geschäftsstelle der DGKL in Karlsruhe
2008	Bestellung eines hauptamtlichen Geschäftsführers und Errichtung der DGKL-Geschäftsstelle in Bonn
2010	Überführung des Referenzinstituts für Bioanalytik in die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik
Jan 2011	Zusammenführung aller zentralen Aktivitäten von DGKL und Stiftung in einem neuen Gebäude in Bonn
April 2011	Etablierung eines hauptamtlichen Vorstands sowie eines Stiftungsrates in der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik

Die strukturellen Entscheidungen in den letzten beiden Jahren tragen dem ökonomischen Wachstum der Gesellschaft und ihrer Stiftung (siehe Abbildung) sowie der

Notwendigkeit Rechnung, Teile der Führungsaufgaben zunehmend auf hauptamtliche Mitarbeiter zu verlagern.

Ökonomische Entwicklung 1997-2011 (DGKL und Stiftung zusammen)	
• Bilanzsumme:	verfünffacht
• Freies Vermögen:	mehr als verzehnfacht
• Forschungsförderung:	ca. 1 Mio € pro Jahr

HERR PATSCHEKE sieht die Gesellschaft und ihre Stiftung zum Ende seiner Amtszeit in einer robusten ökonomischen und zukunftsweisenden strukturellen Verfassung. Dieses Resultat wäre ohne das Referenzinstitut für Bioanalytik undenkbar. Herr Patscheke nennt

als diejenigen, ohne die das nicht gelungen wäre:

- die „Altvorderen“, wie Stamm, Büttner, Breuer, Laue, die die Fundamente gelegt haben,

- diejenigen Mitglieder, die ehrenamtlich dem Referenzinstitut dienen, wie die Ringversuchsleiter, die wissenschaftlichen Berater der Ringversuche, die Leiter der Referenzlaboratorien und Mitglieder des wissenschaftlichen Beirates des RfB,
- die hauptamtlichen Mitarbeiter, die hochmotiviert in Teamarbeit eine exzellente Arbeit geleistet haben, und
- schließlich die Kunden, insbesondere die Mitglieder als Kunden des Referenzinstituts.

HERR PATSCHEKE weist auf das Privileg der Gemeinnützigkeit der Gesellschaft und ihrer Stiftung hin und erläutert den bedeutenden ökonomischen Nachteil, den ein Verlust der Gemeinnützigkeit wegen der dann anfallenden Ertragssteuern und ungeminderter Mehrwertsteuer für die Gesellschaft, ihre Mitglieder und alle Kunden des Referenzinstituts hätte. Er erinnert an die satzungsgemäßen Voraussetzungen für die Gemeinnützigkeit, dass nämlich die Gesellschaft und die Stiftung „selbstlos tätig“ sein müssen und „kein Mitglied begünstigt“ werden dürfen, was angesichts der erheblichen Umsätze der Gesellschaft und Stiftung eine besondere Herausforderung sei. Nach dem Urteil der Wirtschaftsprüfer wird dem die DGKL und ihre Stiftung in vorbildlicher Weise gerecht.

HERR PATSCHEKE schließt seinen Bericht mit dem Dank an alle Mitglieder, die ihm im

Schatzmeister-Amt ihr Vertrauen gewährt haben und den Vorstands- und Präsidiumscollegen, mit denen allen er in den 15 Jahren stets harmonisch und geprägt von der gemeinsamen Verantwortung für die Gesellschaft zusammen arbeiten durfte. Seinem Nachfolger und den künftigen Präsidien wünscht er, dass sie in dieser Weise zum Wohle der Fachgesellschaft erfolgreich weiter arbeiten können.

TOP 5 BERICHT DES KASSENPRÜFERS (GESCHÄFTSJAHR 2010)

HERR DEMANT berichtet, dass er im Rahmen der Kassenprüfung am 23.03.2011 in der Geschäftsstelle der DGKL in Bonn Einsicht in die Unterlagen genommen habe. Sämtliche Belege lagen vor; der Schatzmeister, FRAU STEUERNAGEL und FRAU STEINBACH für die Buchhaltung sowie HERR DR. KLABUNDE als Geschäftsführer waren bei der Prüfung vor Ort zugegen und standen für Erläuterungen und Fragen zur Verfügung. Der Jahresabschluss war vom Schatzmeister mit Unterstützung der Badenia Treuhand Revision GmbH in Karlsruhe, vertreten durch Herrn DR. STREICHER, erstellt worden. Letzterer versichert die ordnungsgemäße Ableitung des Jahresabschlusses aus den Büchern und Unterlagen des Vereins.

Die Ein- und Ausgaben wurden von HERRN DEMANT stichprobenartig geprüft. Er bestätigt die ordnungsgemäße Verbuchung und Einhaltung der Bestimmung der Satzung; die

Ableitung des Jahresabschlusses aus den Konten und Einzelbelegen sei nachvollziehbar. Er habe keine Beanstandungen.

TOP 6 AUSSPRACHE ÜBER DIE BERICHTE VON TOP 4 UND TOP 5

Es erfolgen keine Wortmeldungen.

TOP 7 ENTLASTUNG DES PRÄSIDIUMS

HERR DEMANT stellt den Antrag auf Entlastung des Präsidiums. Das Präsidium wird ohne Gegenstimmen und bei 6 Enthaltungen entlastet.

TOP 8 BEITRAGSORDNUNG 2012 (SIEHE ANLAGE 1)

HERR LACKNER stellt die gegenüber dem Vorjahr unveränderte Beitragsordnung zur Abstimmung, die satzungsgemäß in jedem Jahr beschlossen werden muss. Zur Frage des Mitgliedsbeitrags für Ruheständler ohne online-Bezug der CCLM erläutert der Präsident, dass die Nutzung des Zugangs durch den De Gruyter-Verlag derzeit quantitativ erfasst wird und nach Auswertung dieser Daten über das weitere Vorgehen hinsichtlich der Beitragsgestaltung im Präsidium beraten wird.

Die Beitragsordnung wird in der vorliegenden Form einstimmig ohne Enthaltungen und Gegenstimmen angenommen.

TOP 9 RICHTLINIEN ZUR ERTEILUNG DER ANERKENNUNG ALS KLINISCHER CHEMIKER (SIEHE ANLAGE 2)

HERR LACKNER erläutert die Motivation für die Überarbeitung sowie die Inhalte des vorliegenden vom Präsidium beschlossenen Textes der geänderten Richtlinien. In der folgenden Aussprache wird kurz über die Bedeutung des Begriffs „oder ähnliche Bezeichnung“ bei den Universitätsabschlüssen diskutiert. Die Frage nach den zukünftig erforderlichen inhaltlichen Änderungen der Richtlinien wird an die Anerkennungskommission weitergegeben. Auf Anfrage eines Mitglieds wird erläutert, dass Absolventen von Fachhochschulen mit einem Diplom nicht zur Weiterbildung zugelassen werden können, da diese nicht die Mindestanforderungen an einen Diplom- oder Masterabschluss einer Universität erfüllen.

In der folgenden Abstimmung stimmen die Mitglieder den vorgelegten Änderungen ohne Gegenstimmen bei 5 Enthaltungen zu.

TOP 10 WAHLEN

HERR VOGT wird als Wahlleiter vorgeschlagen, was per acclamationem bestätigt wird. Herr Vogt übernimmt für diesen Tagesordnungspunkt die Versammlungsleitung.

Wahl des Präsidenten (Amtsperiode 2012/2013). Vorschlag des Präsidiums: PROF. DR. J. THIERY, Leipzig, der derzeitige Vizepräsident. Auf Befragen werden keine weiteren Kandidaten benannt. HERR THIERY erläutert kurz seine Vorstellungen für das

Amt des Präsidenten. Bei der anschließenden schriftlichen Wahl entfallen auf Herrn THIERY 72 Stimmen, 3 Mitglieder stimmen gegen den Wahlvorschlag, und 4 Enthaltungen werden registriert. Damit ist HERR THIERY für die Amtsperiode 2012/2013 zum Präsidenten gewählt. Er nimmt die Wahl mit Dank für das in ihn gesetzte Vertrauen an.

Wahl des Vizepräsidenten (Amtsperiode 2012/2013). Vorschlag des Präsidiums: PROF. DR. M. NEUMAIER, Mannheim, dessen Kurz-Lebenslauf mit der Einladung zur Mitgliederversammlung verschickt worden war. Auf Befragen werden keine weiteren Kandidaten benannt. HERR NEUMAIER erläutert kurz seine Vorstellungen für das Amt des Vizepräsidenten. Bei der anschließenden schriftlichen Wahl entfallen auf HERRN NEUMAIER 60 Stimmen, 9 Mitglieder stimmen gegen den Wahlvorschlag, und 2 Enthaltungen sowie eine ungültige Stimme werden registriert. Damit ist HERR NEUMAIER für die Amtsperiode 2012/2013 zum Vizepräsidenten gewählt. Er nimmt die Wahl mit Dank für das in ihn gesetzte Vertrauen an.

Wahl des Schatzmeisters (Amtsperiode 2012-2015); Vorschlag des Präsidiums: PROF. DR. DR. TH. DEMANT, Dresden, dessen Kurz-Lebenslauf ebenfalls mit der Einladung zur Mitgliederversammlung verschickt worden war. Auf Befragen werden keine weiteren Kandidaten benannt. Bei der anschließenden schriftlichen Wahl entfallen auf HERRN DEMANT

68 Stimmen, 3 Mitglieder stimmen gegen den Wahlvorschlag und eine Enthaltung wird registriert. Damit ist HERR DEMANT für die Amtsperiode 2012/2015 zum Schatzmeister gewählt. Er nimmt die Wahl mit Dank für das in ihn gesetzte Vertrauen an.

Wahl des Schriftführers (Amtsperiode 2012-2015); Vorschlag des Präsidiums: PROF. DR. DR. K. P. KOHSE, der bisherige Schriftführer. Auf Befragen werden keine weiteren Kandidaten benannt. Bei der anschließenden schriftlichen Wahl entfallen auf HERRN KOHSE 67 Stimmen, 2 Mitglieder stimmen gegen den Wahlvorschlag und eine Enthaltung wird registriert. Damit ist HERR KOHSE für die Amtsperiode 2012/2015 zum Schriftführer gewählt. Er nimmt die Wahl mit Dank für das in ihn gesetzte Vertrauen an.

HERR VOGT gibt im Anschluss an die Wahl der Präsidiumsmitglieder die Leitung der Mitgliederversammlung wieder an den Präsidenten zurück.

Wahl des Kassenprüfers für 2011 und 2012: Vorschlag des Präsidiums: PROF. BAUER, (Ludwigshafen). Es werden keine weiteren Kandidaten benannt. In der anschließenden offenen Wahl stimmen 67 Mitglieder per Handzeichen für den Vorschlag. Es werden drei Enthaltungen registriert; Gegenstimmen sind nicht zu verzeichnen. HERR BAUER ist somit für das Amt des Kassenprüfers gewählt und nimmt es an.

TOP 11 SONSTIGES

Der Präsident weist auf die nächsten Tagungen der EFCC (EuroMedLab Mailand 2013 und Paris 2015) und der IFCC (WorldLab Istanbul 2014 und Durban (Südafrika) 2017) hin.

Da keine weiteren Wortmeldungen bestehen, schließt der Präsident um 18:30 Uhr die Mitgliederversammlung.

Oldenburg, den 20. Mai 2011

PROF. DR. MED. DR. K. P. KOHSE

- Schriftführer -

Mainz, Mai 2011

PROF. DR. MED. K. LACKNER

- Präsident -

Forschungsbericht

IT-Werkzeuge zur Auswertung großer labordiagnostischer Datensätze

PROF. DR. GEORG HOFFMANN, Grafrath

ZUSAMMENFASSUNG

Im April 2010 genehmigte die DGKL ein Forschungs- und Softwareentwicklungsprojekt

zum Thema Data Mining (1). Nach einem Jahr Entwicklungsarbeit ist ein Projektstatus erreicht, in dem zwei Programme (Trillium Reader und Trillium Explorer) kostenlos zur Verfügung gestellt werden können. Sie sind unter MS Excel auf jedem PC ohne spezielle Systemvoraussetzungen lauffähig und ohne Informatikkenntnisse bedienbar.

Das Hauptziel ist die Erkennung von potenziell interessanten Strukturen und Zusammenhängen in klinischen Datensätzen, ein wichtiges Nebenziel die Normalisierung von Laborwerten. Dies wird in der vorliegenden Arbeit an einem Praxisbeispiel aus der Nierendiagnostik demonstriert, bei dem das Programm einen bislang zu wenig beachteten Zusammenhang zwischen Entzündung (CRP) und tubulären Schäden (alpha-1-Mikroglobulin im Urin) aufdeckte ($p < 0,001$).

Im ersten Schritt wurden die Rohdaten mit dem „Reader“ eingelesen und dabei semi-quantitative Teststreifenergebnisse in Zahlen umgewandelt (z.B. – in 0, ++ in 2). Mit dem

„Explorer“ wurden dann alle Werte auf Mittelwert 0 und Standardabweichung ± 1 normalisiert, farbig markiert (rot für erhöht, blau für erniedrigt) und so sortiert, dass auffällige Zusammenhänge – zum Beispiel zwischen CRP und A1M) als Farbmuster mit freiem Auge erkennbar wurden (sog. Clustering).

Der Reader kann unter www.trillium.de mit dem Menüpunkt Trillium Software direkt aus dem Internet geladen werden, der Explorer ist für den Einsatz in DGKL-Projekten beim Verfasser abrufbar (hoffmann@trillium.de). Datensätze können aber auch zur Auswertung an die Arbeitsgruppe Bioinformatik der DGKL eingesandt werden.

DANKSAGUNG

Der Autor dankt der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL für die Förderung des Forschungsprojekts. Ein weiterer Dank gilt Prof. P. Cramer und Dr. A. Tresch (Genzentrum der Universität München), Prof. W. Hofmann und Dr. von Meyer (Klinikum München) sowie Prof. M. Vogeser (Klinikum Großhadern der Universität München) für die Überlassung der hier gezeigten Datensätze.

PROJEKTBE SCHREIBUNG

Der Antrag bestand aus zwei Teilen:

1. Entwicklung einer Software in zwei Stufen (MS Officeprogramme, Internetprogramm)
2. Experimenteller Einsatz für die explorative Auswertung simulierter und echter Daten.

Der Schwerpunkt des Projekts liegt in der fachgerechten Aufbereitung von Laborwerten und anderen klinischen Daten. Dazu gehören die flexible Übernahme aus unterschiedlichen Quellformaten (aktuell .txt, .csv und .xls), die Integration von Referenzintervallen sowie die Transformation der Absolutwerte, das heißt die methodenunabhängige Normalisierung auf eine einheitliche Skala mit dem Referenzmittelwert 0 und der Standardabweichung 1. Da diese Schritte zeitaufwändig

und fehlerträchtig sind, wurde vor allem auf die Entwicklung einfach bedienbarer „Assistenten“ für eine intuitive Benutzerführung Wert gelegt (Abb. 1).

Die Programmierung erfolgte in MS Excel unter Visual Basic for Applications (VBA). Da das ebenfalls geplante Internetprogramm (s.o.) von den Gutachtern zurückgestellt wurde, liegt das Schwergewicht des vorliegenden Berichts auf der Bedienung des Excelprogramms und der Auswertung klinischer Daten. In Kooperation mit dem Softwarehersteller Neumann & Kindler (www.labcore.de) soll der Trillium Reader zu einem eigenständigen Produkt mit Schnittstellen für verschiedene Datenbanken weiterentwickelt werden (4). Interessierte Arbeitsgruppen der DGKL erhalten eine Community Version zu Testzwecken kostenlos.

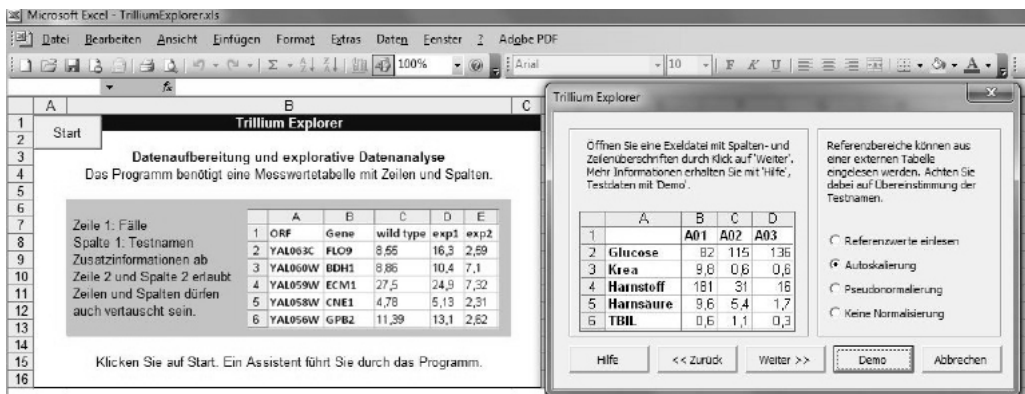


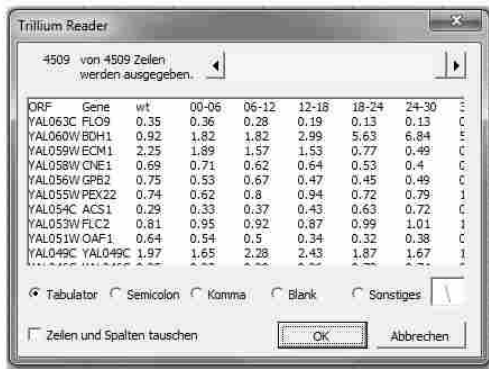
Abb. 1: Aufruf des Programms Trillium Explorer aus MS Excel heraus (oben). Nach Klick auf den Startknopf links oben öffnet sich ein Formular im Stil eines MS Windows-Assistenten zur Ablaufsteuerung. Es beinhaltet eine Hilfefunktion und die Simulation von Demo-Daten. Links ist eine typische Datentabelle aus der Molekularbiologie, rechts aus der Labormedizin zu sehen. Beide können in identischer Weise verarbeitet werden.

TRILLIUM READER

Mit MS Excel kann man Textdateien oft nur mit erheblichem Zusatzaufwand korrekt einlesen. Typische Probleme sind das Überschreiten der maximalen Spaltenzahl von 256, die Deutung von Zahlen mit Dezimalpunkt als Text oder die fehlerhafte Umwandlung von Zahlen- und Textangaben in Datumsformate. Abb. 2 zeigt dies am Beispiel

von Genexpressionsprofilen (5): Excel deutet „1.82“ als „Jan 82“ und den Zeitpunkt „06-12“ (Minuten) als „06. Dez.“, der Trillium Reader liest diese Werte korrekt ein.

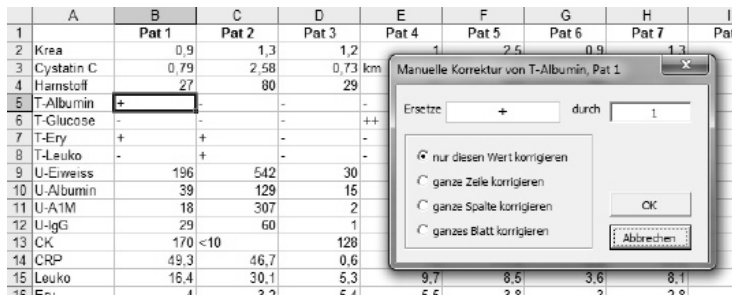
Das Programm erkennt auch semiquantitative Werte (z.B. <10 oder +++) und schlägt sinnvolle Ersatzwerte für die weitere numerische Verarbeitung vor (Abb. 3).



	A	B	C	D	E	F	G
1	ORF	Gene	wt	00-06	06-12	12-18	18-24
2	YAL063C	FLO9	0.35	0.36	0.28	0.19	0.13
3	YAL060W	BDH1	0.92	1.82	1.82	2.99	5.63
4	YAL059W	ECM1	2.25	1.89	1.57	1.53	0.77
5	YAL058W	CNE1	0.69	0.71	0.62	0.64	0.53
6	YAL056W	GPB2	0.75	0.53	0.67	0.47	0.45
7	YAL055W	PEX22	0.74	0.62	0.8	0.94	0.72

	A	B	C	D	E	F	G
1	ORF	Gene	wt	00-06	06 Dez	Dez 18	18-24
2	YAL063C	FLO9	0.35	0.36	0.28	0.19	0.13
3	YAL060W	BDH1	0.92	Jan 82	Jan 82	Feb 99	Mai
4	YAL059W	ECM1	Feb 25	Jan 89	Jan 57	Jan 53	0.77
5	YAL058W	CNE1	0.69	0.71	0.62	0.64	0.53
6	YAL056W	GPB2	0.75	0.53	0.67	0.47	0.45
7	YAL055W	PEX22	0.74	0.62	0.8	0.94	0.72

Abb. 2: Der Trillium Reader liest Textdateien mit TAB, Semicolon und anderen Trennzeichen (links) in MS Excel ein (rechts oben). Zahlen mit Dezimalkomma wie auch Dezimalpunkt werden korrekt erkannt. Typische Microsoft-Probleme, wie die unerwünschte Umwandlung von Texten in Datumsformate (rechts unten) werden vermieden.



	A	B	C	D
1		Pat 1	Pat 2	Pat 3
2	Krea	0.9	1.3	1.2
3	Cystatin C	0.79	2.58	0.73
4	Harnstoff	27	80	29
5	T-Albumin	+	1	0
6	T-Glucose	0	0	0
7	T-Ery	1	1	0
8	T-Leuko	0	1	0
9	U-Erweiss	196	542	30
10	U-Albumin	39	129	15
11	U-A1M	18	307	2
12	U-IgG	29	60	1
13	CK	170	5	128
14	CRP	49.3	46.7	0.6
15	Leuko	16.4	30.1	5.3

Abb. 3: Vorverarbeitung von semiquantitativen Urinteststreifenergebnissen. Für das Data Mining ist es sinnvoll, anstelle von + oder ++ (links) Zahlenwerte wie 1 oder 2 einzusetzen (rechts). Textangaben wie <10 können durch Zahlen (kleiner Pfeil rechts unten) ersetzt werden, um sie der Auswertung zugänglich zu machen.

TRILLIUM EXPLORER

Die so aufbereiteten Daten können direkt aus Excel heraus mit dem Trillium Explorer weiter verarbeitet werden. Wie der Name besagt, führt das Programm eine sogenannte explorative Analyse unstrukturierter Datensätze durch, um darin enthaltene nicht-triviale Strukturen und Zusammenhänge aufzudecken. Hierfür stellt die Bioinformatik zahlreiche Algorithmen aus der Statistik und Künstlichen Intelligenz zur Verfügung, die bereits an anderer Stelle vorgestellt wurden (2).

Nach intensiven Vorarbeiten der DGKL-Arbeitsgruppe Bioinformatik wurde als robustes und intuitiv interpretierbares Verfahren das hierarchische Clustering ausgewählt. Es erzeugt eine visuelle „Zusammenballung“ ähnlicher Werte (to cluster = zusammenballen). Färbt man die Felder entsprechend ihrer klinischen Wertigkeit an (z. B. erhöhte Werte rot und erniedrigte blau), so erhält man zusammenhängende farbige Flächen (hot spots), die den Blick des Untersuchers auf interessante Konstellationen von Laborwerten und Fällen lenken.

Der Arbeitsablauf im Explorer besteht folglich aus zwei Teilen, für die es jeweils einen eigenen Assistenten gibt: In Schritt 1 werden die Zellen auf Basis von Referenzwertetabellen angefärbt und in Schritt 2 auf Basis dieser „Farbwerte“ geclustert (Abb. 4a und b).

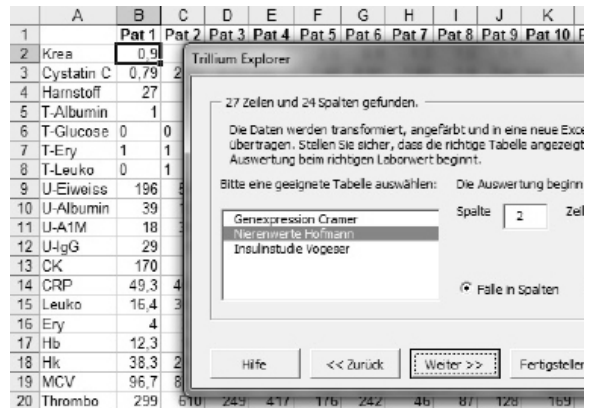


Abb. 4a: Auswahl und Einlesen einer Excel-Tabelle in den Trillium Explorer. Das erste auswertbare Zahlenfeld (hier Spalte 2, Zeile 2) wird selbständig erkannt. Nach dem Klick auf ‚Weiter‘ werden die Werte auf Basis einer laboreigenen Referenzwertetabelle normalisiert (2) und angefärbt.



Abb. 4b: Clustering der angefärbten Werte (aus drucktechnischen Gründen in Grauwerten dargestellt). Der Assistent erlaubt die Auswahl der Ähnlichkeitsmaße Distanz und Korrelation in Zeilen und Spalten. Im dargestellten Beispiel aus der Nierendiagnostik wird für die Tests ein Korrelationsmaß (Pearson) und für die Patienten ein Distanzmaß (Manhattan) ausgewählt (1, 2).

Anstelle der Normalisierung mit Referenzwertetabellen ist es auch möglich, Richtwerte aus den Daten selbst schätzen zu lassen. Je nach Anzahl und Verteilung der Werte verfolgt das Programm dabei selbsttätig drei verschiedene Strategien:

Stimmen Median und Mittelwert gut überein, so wird als klassisches Streuungsmaß für symmetrische Verteilungen die Standardabweichung berechnet.

Ist die Verteilung links- oder rechts-schief und die Wertezahl ausreichend, dann wird die zweifache Standardabweichung aus dem steileren Kurvenast geschätzt, indem man die Differenz aus Median und dem entsprechenden Quantil (1/6 oder 5/6) bildet.

Bei schiefen Verteilungen und geringer Wertezahl wird eine logarithmische Pseudonormalisierung (2, 3) angeboten. Hierfür benötigt man nur einen einzigen Referenzwert (z. B. Median) ohne Streuungsmaß.

Bei allen drei Verfahren entsteht letztlich durch Transformation ein Datensatz mit dem mittleren Referenzwert 0 und einer Schwankungsbreite von etwa -5 bis +5. Entsprechend viele Farben - von dunkelblau bis dunkelrot - werden den einzelnen Feldern zugeordnet. Der „Farbwert“ wird auf zwei Kommastellen genau beim Darüberfahren mit der Maus angezeigt.

Nach der Normalisierung erfolgt die eigentliche explorative Analyse. Das Ergebnis ist

eine neue Exceltabelle, auf der man zusammenhängende farbige Flächen (Cluster) erkennt. Um sowohl den Überblick über den gesamten Datensatz zu erhalten als auch Details beurteilen zu können, bietet das Programm zwei unterschiedliche Ansichten an: eine Detailansicht mit Zahlenwerten und eine Überblicksansicht mit schmalen Spalten, bei der nur die Farben ohne Zahlenwerte zu sehen sind. Das Beispiel in Abb. 5 zeigt beide Ansichten nebeneinander.

Man erkennt in der Übersicht (links) auf einen Blick Datenstrukturen und Zusammenhänge, die mit laborärztlichem Fachwissen

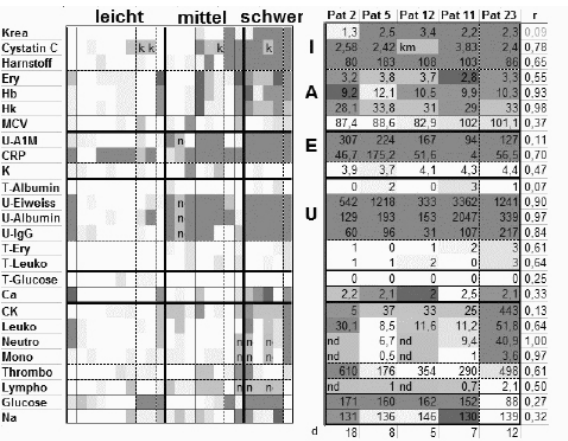


Abb. 5: Ergebnis einer explorativen Analyse aus der Nierendiagnostik (Serummarker, Urinteststreifen, Blutbild, Eiweißdifferenzierung im Urin). Im Gesamtüberblick (links) erkennt man drei Gruppen von Patienten (senkrecht) mit unterschiedlicher Schwere der Erkrankung und vier Gruppen von Markern (waagrecht) für die Insuffizienz (I), Anämie (A), Entzündung (E) und erhöhte Urineiweißausscheidung (U). Der farbliche Unterschied zwischen I (rot) und A (blau) kommt in der Schwarz-Weiß-Darstellung nur andeutungsweise heraus.

aus dem Bereich der Nierendiagnostik in Einklang stehen. So teilt das Programm die Patienten in drei unterschiedliche Schweregrade ein und findet bei schweren Fällen eine gehäufte Koinzidenz von Niereninsuffizienz und Anämien. Diese ist mit verminderter Erythropoetinbildung in der Niere erklärbar. Ferner erkennt man, dass die Urinproteine bereits in Gruppe 2 erhöht sind, die Serummarker erst in Gruppe 3. Diese höhere Empfindlichkeit wird die Früherkennung von Nephropathien genützt (6).

In der Detailansicht (rechts) werden zusätzlich die Korrelationskoeffizienten (senkrecht) und Distanzen (waagrecht) der jeweils benachbarten Spalten und Zeilen angegeben. Betrachtet man die Testnamen und zugehörigen Korrelationskoeffizienten genauer, so überrascht, dass das alpha-1-Mikroglobulin im Urin (U-A1M) vom Explorer aus der Gruppe der übrigen Urinproteine herausgelöst wurde. Das Programm ordnet diesen Marker dem CRP im Serum zu und ermittelt dafür eine hoch signifikante Korrelation ($p < 0,001$), die der von etablierten Nierenmarkern wie Kreatinin versus Cystatin C nicht nachsteht. Dieser Befund verlangt nach weitergehenden Untersuchungen zur Doppelrolle von A1M bei tubulären Nierenschäden (6) und Entzündungen (7). Es erscheint auf Grund des Data-Mining-Ergebnisses auch lohnend, generell nach Korrelationen zwischen Nieren- und Entzündungsmarkern im Blut und Urin zu fahnden, um entzündlich-toxische Schäden

am Tubulussystem besser erklären und früher erkennen zu können.

DISKUSSION UND AUSBLICK

Mit der Programmierung der hier vorgestellten beiden Excel-Programme ist der wesentliche Teil des Projekts nach etwa einjähriger Laufzeit abgeschlossen. Der Trillium Reader kann aus dem Internet heruntergeladen werden (www.trillium.de) und befindet sich in der externen Weiterentwicklung, um Daten aus Labor- und Krankenhaus-Informationssystemen übernehmen zu können. Der Trillium Explorer wird in Details - etwa der Ermittlung vorläufiger Referenzwerte aus Studiendaten (9) - in Kooperation mit der AG Richtwerte der DGKL noch verbessert und ist deshalb vorerst nur per E-Mail anforderbar (hoffmann@trillium.de).

Die Auswertung zahlreicher Datensätze aus klinischen und experimentellen Studien hat den praktischen Nutzen der beiden Werkzeuge bereits bewiesen. Neben dem hier vorgestellten Beispiel aus der Nierendiagnostik fand sich ein überraschender Zusammenhang zwischen niedrigem LDL-C und stark erhöhtem Pro-Insulin (3). Weitere explorative Analysen zur Genexpression (5) und zum Serumpeptidom (10) sind Erfolg versprechend angelaufen.

Die von der DGKL geförderten Programme eröffnen ein weites Betätigungsfeld für Ergänzungen und Folgeprojekte. So zeigte sich, dass der ursprünglich konzipierte Einsatz für

die Analysen von sehr vielen Tests und vergleichsweise wenigen Fällen (siehe Abb. 2) in den bislang eingesandten Datensätzen eher die Ausnahme ist. Häufiger werden Tabellen mit vielen Patienten und vergleichsweise wenigen Tests eingesandt (Abb. 6). Das hierfür benötigte Vertauschen von Zeilen und Spalten mit entsprechender geänderter Normalisierung ist in Arbeit.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		Insulin	Pro-Insulin	RR_Sys	Bauchumfang	BMI	LDLC	HDLC	TG	HbA1c	Glucose
2	P029	3,56	3,08	125	99	30,0	116	71,9	68	5,00	113
3	P030	7,01	1,62	140	105	31,7	165	118,0	239	4,69	78
4	P031	13,72	4,32	130	115	37,5	120	62,6	298	5,09	98
5	P032	10,05	5,09	140	104	32,3	77	50,4	83	4,80	102
6	P033	4,18	0,96	150	98	35,0	73	56,1	49	5,40	94
7	P034	2,46	1,47	160	116	31,8	141	63,9	144	5,19	96
8	P036	11,82	0,61	130	109	30,8	111	90,9	137	5,69	111
9	P040	8,77	1,49	125	99	31,0	173	53,1	125	4,40	95

Abb. 6: Klinische Studie mit Laborwerten und klinischen Daten von rund 500 Patienten (3). Die übliche Darstellung (siehe Abb. 1-5) ist in MS Excel nicht realisierbar, da die Zahl der Spalten auf 256 begrenzt ist.

In der Zukunft ist damit zu rechnen, dass die Labordiagnostik immer häufiger Datensätze mit Hunderten oder Tausenden von Tests pro Fall auszuwerten hat, beispielsweise bei der Hochdurchsatzsequenzierung von Genomen oder der Massenspektrometrie von Proteomen und Metabolomen. Immer öfter erhalten wir auch dynamische Daten, die zusätzlich zu den Tests und Patienten die Zeit als dritte Dimension einführen. Hier erweist sich die Darstellung in Excel-Tabellenform als unbefriedigend; dynamische Bildfolgen im gif-Format wären besser geeignet. In der DGKL-Arbeitsgruppe Bioinformatik werden solche Ansätze intensiv verfolgt.

LITERATUR

1. Hoffmann G. IT-Werkzeuge zur Auswertung großer labordiagnostischer Datensätze. Antrag zur Förderung eines Forschungs- und Entwicklungsvorhabens an die Stiftung Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL vom 22. März 2010
2. Hoffmann G, Zapatka M, Findeisen P, Wörner S, Martus P, Neumaier M. Data-Mining in klinischen Datensätzen. J Lab Med 2010; 34; 227-33
3. Hoffmann G, Zapatka M, Findeisen P, Vogeser M. DGKL-Forschungsprojekte zum Data Mining in der Laboratoriumsmedizin. Klin Chem Mitteilungen 2010; 41: 160-4
4. Hoffmann G. Software-Entwicklungsprojekt zum Data Mining in der Medizin – Die Suche nach verborgenen Schätzen. Trillium-Report 2010; 8(4): 244 (www.trillium.de)
5. Miller C, Schwalb B, Maier K et al. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. Molecular Systems Biology 2011;7: 458
6. Hofmann W, Edel H, Guder W et al. Harnuntersuchungen zur differenzierten Diagnostik einer Proteinurie. Dtsch Ärztebl 2001; 98(12): A-756-63
7. Akerström B. Role of alpha1 microglobulin in immune response and inflammation. Folia cytochem histobiol 1992; 30: 183-6
8. MicroArray Quality Control (MAQC) project: www.nature.com/nbt/focus/maqc/
9. Arzideh F, Brandhorst G, Gurr E et al. An improved indirect approach for determining reference limits from intra-laboratory data bases exemplified by concentrations of electrolytes. J Lab Med 2009; 33:52-66
10. Findeisen P, Sismanidis D, Riedl M et al. Preanalytical impact of sample handling on proteome profiling experiments with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Clinical chemistry 2005;51:2409-11

VERFASSER:

PROF. DR. MED. GEORG HOFFMANN
Trillium GmbH, Hauptstraße 12b
82284 Grafrath
www.trillium.de

Forschungsbericht

Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie mittels UPLC-MS-TOF zur Labordiagnostischen Erfassung und Beurteilung von Vergiftungen

Gefördert durch die Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL

BIRGIT HENSCHEL; ALEXANDER VON MEYER; JÜRGEN HALLBACH

Department für Klinische Chemie, Abteilung Toxikologie, TDM und Chromatographie
Städtisches Klinikum München GmbH

EINLEITUNG

Akute Intoxikationen bei Erwachsenen werden in Deutschland am häufigsten durch Alkohol und Medikamente (z.B. Hypnotika, Sedativa, Psychopharmaka, Analgetika) aber auch durch Drogen verursacht. Bei Kindern, insbesondere bei Kleinkindern, stehen akzidentielle Vergiftungen im Vordergrund.

Die toxikologische Analytik ist ein wesentlicher Baustein für die Expositionsbeurteilung (Abb.1 nach H. DESEL, 2007). Erst die Expositionsbeurteilung liefert die Basis für spezifischere Therapieentscheidungen bei Vergiftungen.

Einfache toxikologische Untersuchungen sollten neben einer nicht vergiftungsspezifischen Basisdiagnostik in jedem „Notfalllabor“ möglich sein, während umfassendere toxikologische Untersuchungen i.a. spezialisierte Laboratorien erfordern (MARQUET, 1999, HALLBACH 2009, KÜLPMANN 2009, FELGENHAUER 2009). Dort sollten schwierigere und

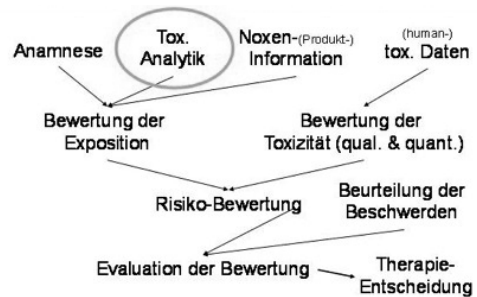


Abb.1 Expositionsbeurteilung bei Vergiftungen (nach H. Desel, GIZ Göttingen)

komplexere Untersuchungen bei klinischer Notwendigkeit zu jeder Uhrzeit möglich sein und im Regelfall nicht mehr als 3 Stunden Bearbeitungszeit erfordern.

Die Aufgabenstellungen für die Analytik im toxikologischen Schwerpunktlabor sind daher das qualitative General Unknown Screening, die gezielte Suchanalytik auf speziell nachgefragte Substanzen sowie gegebenenfalls die orientierende Quantifizierung zur Einschätzung der Schwere der Vergiftung und zur Verlaufsbeurteilung. Ein gerätetechnischer

Lösungsansatz, der es erlaubt alle drei Aufgaben anzugehen, könnte die hochauflösende Massenspektrometrie mittels UPLC-MS-TOF-Analytik darstellen. Diese Hypothese soll im Projekt geprüft werden und eine für die Routine geeignete Methode erarbeitet werden.

Die Befunde der toxikologischen Analytik sollten bei schwerwiegenden Fällen immer gemeinsam von Analytiker, Experten der Gif tinformationszentren und dem behandelnden Arzt besprochen und interpretiert werden. Viel Erfahrung bedarf insbesondere die richtige Einschätzung quantitativer Ergebnisse. Die zeitliche Relation zwischen individueller Toxikokinetik und therapeutischen / toxischen Bereichen ist schwierig zu beurteilen, da therapeutische / toxische Bereiche häufig verfahrensabhängig sind und nur grobe Anhaltspunkte für die Risikobeurteilung einer Intoxikation darstellen.

METHODIK

Prinzip. Die time-of-flight Massenspektrometrie (TOF) als chromatographisches Verfahren erlaubt die Analyte aufgrund ihrer exakten Molekülmasse genau nachzuweisen. Methadon und Fluoxetin besitzen beide die nominelle Masse von 309 Dalton und sind daher mit einer niedrig auflösenden Massenspektrometrie nicht voneinander zu unterscheiden. Die hochauflösende Massenspektrometrie erlaubt hingegen die Masse 309,1340 (Fluoxetin) von 309,2093 (Methadon) zu unterscheiden.

Im TOF-Massenspektrometer werden die Analytionen im Hochvakuum aufgrund ihrer Flugzeit unterschieden (*Abb. 2*). Je höher die Masse ist, umso länger ist die Flugzeit für eine definierte Flugstrecke. Kalibriert wird die Massenachse mithilfe von Substanzen, die reproduzierbare Massencluster bilden. Eine solche Massenachsenkalibration z. B. mit Natriumformiat zeigt *Abbildung 3*. Auch kleinste Änderungen der Umgebungsbedingungen können allerdings zu einer Verschiebung dieser Massenachse und damit zu einem zunehmenden Massenfehler führen. Um dies zu vermeiden, wird ständig parallel zur Probenanalytik eine Referenzsubstanz bekannter exakter Masse (z. B. Leucin-Enkephalin) mit untersucht und so die ursprüngliche Massenkalibrierung in einem geringen Rahmen angepasst.

Time-of-Flight MS Theory

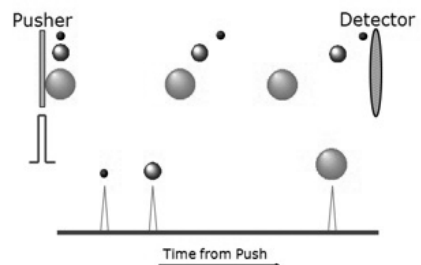


Abb. 2 Theorie der Time-of-Flight MS, LCT-P XE Manuel, Waters GmbH

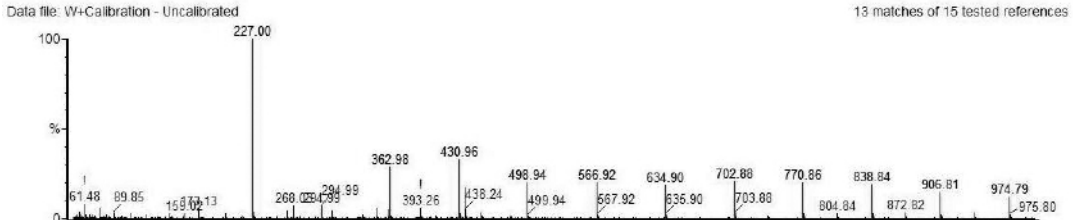


Abb. 3 a)

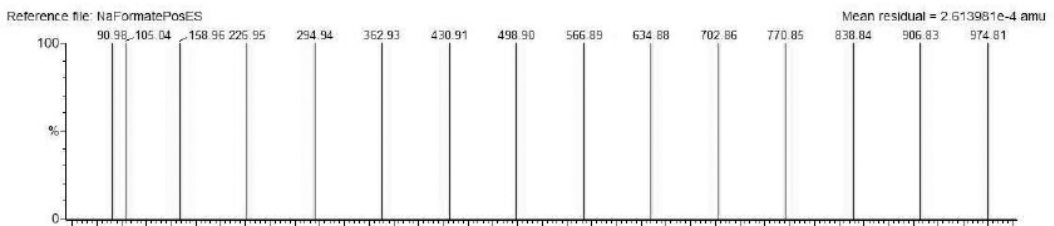


Abb. 3 b)

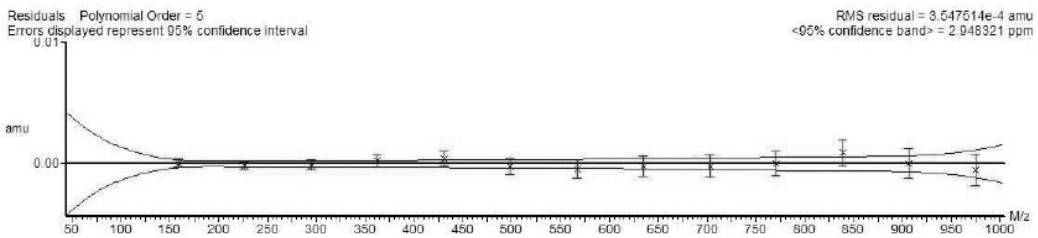


Abb. 3 c)

Abb. 3 Massenkalibration Waters LCT XE Premier, W + Modus:

- Messung des Natriumformiat-Clusters
- Theoretisches Natriumformiat-Cluster
- Massenabweichung

Gerät. Für die vorliegende Studie wurde eine Waters UPLC mit einem MS-TOF (LCT XE Premier) verwendet. Die Ionisierung erfolgt mittels der ESI Technik im positiven oder negativen Modus.

Qualitative Suchanalytik. Zur Probenvorbereitung werden, wie für die in unserem Labor etablierte GC-MS-Analytik, die Proben (1 ml Serum oder Urin) in Tox tubes (Varian)

extrahiert. Der in einem Stickstoffevaporator (Turbo Vap) zur Trockene eingedampfte Extrakt wird mit 100 µl Methanol aufgenommen und mit 200 µl Wasser verdünnt. Anschließend wird 1 µl der Probe auf einer Acquity UPLC Säule (100 mm Länge, 1.8 µm Partikel) chromatographisch getrennt (Methanol/Wasser-Gradient mit 1 bis 100 % Methanol unter gleichzeitiger Anwesenheit von 0.05 %

Ameisensäure). Mit einer Gesamtanalysendauer von 23 Minuten wird eine sehr gute Auftrennung der untersuchten Substanzen erreicht. Im TOF Detektor wird der Massenbereich 50-1000 Dalton (Da) mit einer Toleranzgrenze von 5 mDa für die exakte Masse erfasst. Aufgezeichnet werden nicht nur die Molekülmassen sondern durch eine insource-Fragmentierung mittels erhöhter Aperturespannung auch die dazugehörigen Fragmentenspektren.

Quantitative Analytik von Medikamenten. Als Probenvorbereitung wird eine einfache Proteinfällung mit Acetonitril durchgeführt (100 µl Serum, 100 µl interner Standard und 200 µl Acetonitril). Der Zentrifugationsüberstand wird mit 400 µl Laufmittel verdünnt und davon werden 2 µl auf die Säule gegeben. Die Analysenzeit wurde hierbei auf 7 Minuten verkürzt, da die Anforderung an die chromatographische Auflösung niedriger ist als beim Screening. Zur Detektion der untersuchten Substanzen und für die Peakintegration werden Massenspuren mit wiederum 5 mDa Toleranz aufgezeichnet.

AUSWERTUNG

Qualitative Suchanalytik. Ziel ist es, die in der Probe vorhandenen Fremdsubstanzen möglichst eindeutig zu identifizieren. Dafür werden von der jeweiligen Substanz das exakte Molekulargewicht, die Retentionszeit und die exakte Masse eines für die Substanz charakteristischen Fragmentions verwendet. Die von uns derzeit im Aufbau befindliche

Referenzbibliothek enthält daher genau diese Angaben und zusätzlich den Verbindungsnamen, die Summenformel und eine zweite Fragmentmasse, die allerdings derzeit von der Software noch nicht berücksichtigt werden kann. Die gesamte Referenzdatenbank liegt als einfach strukturierter Textfile vor. Während die Auswertesoftware konventioneller Massenspektrometer ein sog. Totalionenchromatogramm auf Peaks untersucht, werden beim TOF-Verfahren unzählige einzelne Massenspuren parallel aufgezeichnet und auf das Vorhandensein von Peaks geprüft. Hierdurch entsteht pro Analysenlauf eine sehr große Datenmenge. Findet die Chromatographie-Software in einer Massenspur einen Peak, dann schließt sich die Bibliothekssuche nach den obigen Kriterien an. Erster Filter ist die Retentionszeit mit einer typischen Toleranz von 0.3 min., dann wird die exakte Masse des unfragmentierten Moleküls und schließlich des zugehörigen Fragmentions geprüft. Die Bibliotheksvorschläge werden in zwei Kategorien unterteilt. Liegen nur sehr geringe Abweichungen (Massendifferenzen weniger als 3 mDa) vor, ergeben sich positive Hits. Abweichungen von 5-10 mDa führen zu sogenannten „tentative“ Hits. Ein Beispiel für eine solche Identifizierung zeigt *Abbildung 4*. Zur Absicherung der automatisierten Identifizierung wird anschließend noch das gefundene Massenspektrum mit dem Bibliotheksspektrum vom Analytiker verglichen.



Abb. 4 Ergebnis der Bibliothekssuche: ein Hit, hier Methadon, wird von der Software so angegeben, dass der Substanzname, die Summenformel, die extrahierte Masse, die Retentionszeit aus der Bibliothek, die Scan-Nummer im Probenlauf, die gefundene Retentionszeit, die Massenabweichung und das zugehörige Fragmentation dargestellt werden.

Wenn es Hinweise auf eine Substanz in einer Probe gibt, die noch nicht in der Referenzbibliothek enthalten ist, besteht die Möglichkeit aus den Rohdaten des Chromatogramms die Masse der fraglichen Substanz zu extrahieren. Hierzu muss lediglich die Summenformel der Substanz u. U. mithilfe des Internets ermittelt werden. Ein Hilfsprogramm der Software berechnet daraus die exakte Masse, nach der dann gesucht werden kann. Wird ein entsprechender Peak im Chromatogramm erhalten, so ist dies ein Indiz für das mögliche Vorhandensein der Substanz. Im nächsten Schritt prüft man, ob sich die gefragte Summenformel im Massenspektrum bestätigt („elemental composition“). Schließlich kann man das Massenspektrum dahingehend versuchen zu beurteilen, ob sich vorhandene Fragmentionen durch die Strukturformel der fraglichen

Substanz erklären ließen. Eine Verifizierung erhält man aber erst, wenn eine Vergleichsanalyse durchgeführt werden kann.

Quantitative Analytik. Erste Erfahrungen aus der Methodenvalidierung für verschiedene Arzneistoffe haben gezeigt, dass häufig mit einer 2-Punkt-Kalibration eine ausreichende Zuverlässigkeit der Analytik erreicht werden kann. Die Validierungen von Lidocain, Coffein und Antiepileptika erfolgte nach Validierungsrichtlinien der GTFCh (Peters et al. 2009). In der Auswertemethode werden die exakten Massen und Retentionszeiten der zu findenden Substanzen und ggf. Metaboliten mit definierten maximalen Abweichungen hinterlegt.

Eine typische Kalibration von Lidocain zeigt *Abbildung 5* (siehe Seite 82). In der Probentabelle wird die jeweilige Konzentration der unbekannten Proben automatisch berechnet. Da für die Peakerkennung und auch die Peakflächenbestimmung die exakte Masse verwendet wird, gibt es eine extrem glatte Basislinie im Chromatogramm und eine hochspezifische Erfassung des jeweiligen Analyten. Sollte in einer Probe der Verdacht für eine Kreuzkontamination vorliegen, so kann aus den Rohdaten jederzeit nachträglich auch auf das gleichzeitige Vorhandensein weiterer Massenspuren geprüft werden. So kann auch der Frage einer möglichen Ionensuppression im Einzelfall nachgegangen werden.

Abb. 5 Quantifizierung von Lidocain

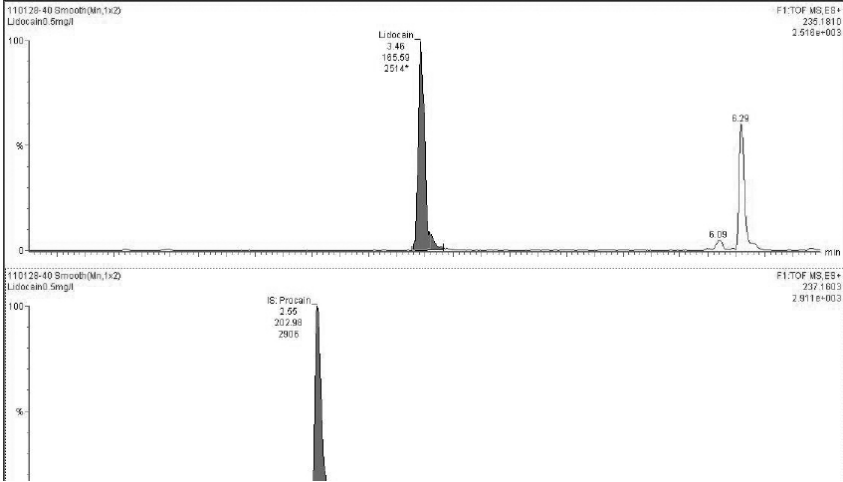


Abb. 5 a) Selektionierte Massenspuren für Lidocain und Procain (IS)

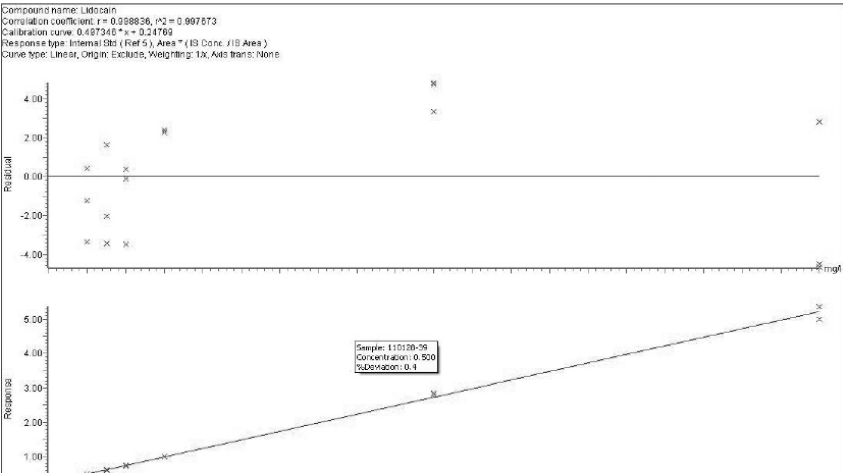


Abb. 5 b) 6-Punkt-Kalibration für Methodenvalidierung

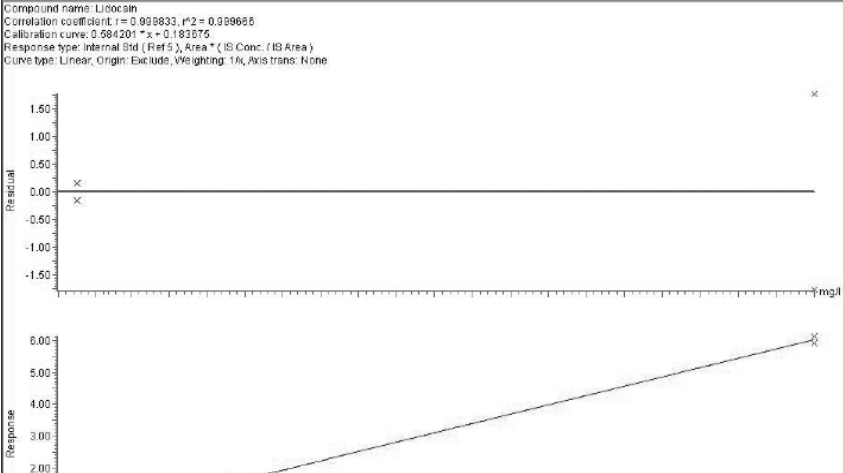


Abb. 5 c) 2-Punkt-Kalibration für Routineanalytik

DISKUSSION

Die LC-Massenspektrometrie (LC-MS) entwickelte sich neben der GC-Massenspektrometrie (GC-MS) in den letzten Jahren zu einer immer wichtigeren Methodik in der forensischen und klinischen Toxikologie. Während einfache single-stage-Massenspektrometer kaum mehr eingesetzt werden, wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Kombinationsgeräte entwickelt, die auf dem Prinzip der Tandem-MS (LC-MS/MS), der Ionenfalle (LC-MS/QTrap) und der TOF-Analytik (LC-MS/TOF) beruhen.

Die neuesten und auch teuersten Entwicklungen sind sog. Hybridsysteme wie das QTrap (Hybrid-Triple-Quadrupol-Linear-Ion-Trap-Massenspektrometer) (MÜLLER 2005) und das LC-QTOF-MS (BROECKER 2010). Wie bei der LC-MS/MS muss bei diesen high-end-Techniken ein hoher Aufwand bei der Methodenentwicklung betrieben werden, wodurch andererseits eine sehr gute Sensitivität und Spezifität erreicht wird.

Für den klinisch-toxikologischen Alltag (24h-Notfalllabor) wird dagegen eine einfachere und stärker standardisierte Arbeitsweise benötigt. Bislang waren hier GC-MS und das Remedi-System, das nicht mehr verfügbar ist, etabliert. Besonders letzteres hat sich durch eine sehr einfache Bedienbarkeit ausgezeichnet. Bei der Kombination von UPLC und TOF beruht die Identifizierung der Giftstoffe auf bis zu vier voneinander

unabhängigen Größen: exakte Masse, Isotopen-Ratios (I-fit), Retentionszeit und Fragmentanalyse. Die Brauchbarkeit der UPLC-MS/TOF als Ersatz für das Remedi-System wurde erstmals mit Untersuchungen an einem Testgemisch aus 29 Substanzen und Vergleichsuntersuchungen mit 30 authentischen Urinproben gezeigt (LEE 2009). Allerdings war die Referenzbibliothek bei dieser Untersuchung auf 170 häufig gebrauchte Arzneistoffe/Drogen und Metabolite limitiert. In unserer eigenen Bibliothek sind derzeit bereits 400 Substanzen erfasst. Wir konnten zeigen, dass die drei massenspektrometrischen Parameter hoch reproduzierbar und anders als bei der HPLC-MS/MS nicht oder zumindest kaum geräteabhängig sind. In der aktuellen Bibliothekssuche wird außer nach der Retentionszeit auch nicht mehr nach experimentellen Größen sondern nach theoretischen Größen (Molekularmasse der Muttersubstanz und eines charakteristischen Fragments) gesucht. Der ursprüngliche Enthusiasmus, dass ganz ohne die Untersuchung von Referenzsubstanzen, alleine mit einer theoretischen Bibliothek gearbeitet werden könnte (LAKS 2004, PELANDER 2008) ist aus heutiger Sicht nur zum Teil richtig, da die Prüfung der Zuverlässigkeit der Identifizierung die Erfassung von Referenzsubstanzen erfordert. Im Vergleich zur Arbeitsgruppe aus Hongkong (LEE 2009) arbeiten wir bei der primären Peakidentifizierung nicht mehr mit der nominalen Molekülmasse sondern

nutzen bereits an dieser Stelle die Stärke der TOF, also die Hochauflösung, indem nach der exakten Masse analog wie beim Vorgehen mit der QTOF (Broecker 2010) gesucht wird.

Bei Untersuchungen von Metaboliten stehen häufig keine Referenzsubstanzen zur Verfügung und hier konnte am Beispiel psychoaktiver Substanzen gezeigt werden, dass mit der UPLC-MS/TOF die Identifizierung von Metaboliten ausgehend von der jeweiligen Muttersubstanz auch ohne Verfügbarkeit entsprechender Vergleichssubstanzen in authentischen Untersuchungsproben möglich ist (Bakdash 2009). Von besonderem Wert ist hierbei die hohe chromatographische Auflösung und Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten mit der UPLC.

Da bei Vergiftungen zunehmend nicht nur eine Identifizierung der Substanzen im Urin und/oder Serum nachgefragt wird, sondern auch eine Quantifizierung, bietet die UPLC-MS/TOF auch hier eine interessante Einsatzperspektive.

DANKSAGUNG

Wir danken der Stiftung für Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik der DGKL für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums (Birgit Henschel) und die wohlwollende Unterstützung unseres Projekts.

RESULTIERENDE PUBLIKATIONEN

Hallbach J, Henschel B, von Meyer A. LC-MS-TOF in Clinical Toxicology. IATDMCT Montreal 2009, Roundtable R503.

Hallbach J, von Meyer A, Henschel B. High resolution HPLC coupled with time-of-flight-MS: Targeted and untargeted screening strategies in clinical toxicology. Mitt. DGKL 2010;41:231.

ZITIERTE LITERATUR

1. Bakdash A, Meyer-von A, Pragst F, Hallbach J. Detection of metabolites of selected psychoactive drugs in systematic toxicological analysis by LC-ESI-MS-TOF. GTFCh XVI. Symposium (2009);
2. Broecker S, Herre S, Wüst B, Zweigenbaum J, Pragst F. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition, Anal Bioanal Chem (2010).
3. Flanagan RJ. Developing an analytical toxicology service: principles and guidance. Toxicol Rev 23:251-63(2004).
4. Felgenhauer N, Hallbach J. Toxikologie, Vergiftungen, Drogenscreening. In: Praktische Labordiagnostik, H. Renz (Hrsg.) de Gruyter (2009).
5. Hallbach J, Degel F, Desel H, Felgenhauer N (2009). Analytical role in clinical toxicology: impact on the diagnosis and treatment of poisoned patients. J Lab Med 33(2):71-87 (2009).
6. Külpmann WR (editor). Clinical Toxicological Analysis. Wiley-Blackwell (2009).
7. Laks S, Pelander A, Vuori E, Ali-Tolppa E, Sippola E, Ojanpera I. A general screening method for doping agents in human urine by solid-phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Anal. Chem. 76:7375-7379 (2004).
8. Lee HK, Ho CS, Iu YP, Lai PS, Shek CC, Lo YC, Klinke HB, Wood M. Development of a broad toxicological screening technique for urine using ultra-performance liquid chromatography and time-of-flight mass spectrometry. Anal Chim Acta 649:80-90 (2009).

9. Marquet P, Lachatre G. Liquid chromatography – mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *Chromatogr B Biomed Sci Appl* 733:93-118 (1999).
10. Müller CA, Weinmann W, Dresen S, Schreiber A, Gergov M. Development of a mulit-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun Mass Spectrometr* 19:1332-8 (2005).
11. Elander A, Ristimaa J, Rasanen I, Vuori E, Ojanperä I. Screening for basic drugs in hair of drug addicts by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 30:717-24 (2008).
12. Peters et al – GTFCh Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen – Anforderungen an die Validierung von Analysenmethoden (2009).

ANSCHRIFT DER VERFASSEN

BIRGIT HENSCHL, München

ALEXANDER VON MEYER, München

Korrespondenz an:

DR. JÜRGEN HALLBACH

Department für Klinische Chemie

Klinikum München Schwabing

Laborgebäude Haus 28

Kölner Platz 1

80804 München

Tel (089) 3068 2539

Fax (089) 3068 3911

e-mail: juergen.hallbach@klinikum-muenchen.de

Dissertationen

Expression von Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN 2) in kultivierten hepatischen Sternzellen und Myofibroblasten der Rattenleber unter Einfluss von Zytokinen und Signalinhibitoren

Dissertation (Dr. med.) am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Aachen (ehem. Direktor: Univ-Prof. em. Dr. med. Prof. h.c. (RCH) AXEL M. GRESSNER)

ILHAN DEMIRCI, Aachen

Die Leberfibrose ist durch starke quantitative, qualitative und topohistologische Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) gekennzeichnet und stellt eine Form der Wundheilung auf sehr verschiedene Noxen (z. B. HBV, HCV, Alkohol) dar. Sie geht einer Leberzirrhose mit kompletten histologischen Umbau unter Bildung von Pseudolobulists voran. Die Aktivierung der perisinusoidal gelegenen hepatischen Sternzellen (HSC, früher als Ito-Zellen bezeichnet) und deren Transdifferenzierung zu ECM-produzierenden, kontraktile Myofibroblasten (MFB) stellt dabei einen Schlüsselmechanismus der Fibrogenese dar. Die wichtigsten profibrogenen Zytokine/Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1, PDGF-BB, IGF-I und ET-1 wurden in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren, auch von dieser Arbeitsgruppe, näher charakterisiert.

Connective tissue growth factor (CTGF/CCN 2) kann die Rezeptorbindung von TGF- β 1 erhöhen bzw. den durch dieses Zytokin vermittelten Effekt verstärken. Gleichzeitig besitzt das CTGF-Gen ET-1- und TGF- β -response-Elemente im Promotorbereich, was eine interessante Wechselwirkung bedingt. Der antifibrotische Effekt eines CTGF-silencings wurde zuvor in der Literatur beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CTGF-Expression in HSC und MFB unter Verwendung von TGF- β 1, PDGF-BB, ET-1 und verschiedenen allgemeinen und speziellen Inhibitoren der Transkription und wichtiger Signalkaskaden untersucht. CTGF soll laut Literatur während der Leberfibrose vermehrt in transdifferenzierenden HSC exprimiert werden und zudem Interaktionen mit TGF- β 1 und PDGF-BB aufweisen. Im in-vitro-Modell ließ sich keine Korrelation der CTGF-Expression mit dem Transdifferenzierungsprozess von HSC bzw. MFB erkennen. Weiterhin ließ

sich erkennen, dass in situ sowohl im normalen Lebergewebe als auch (sehr verstärkt) im CCl₄-Leberfibrosemodell Hepatozyten CTGF exprimieren.

Entgegen den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten konnte kein signifikanter Effekt einer TGF- β 1- und PDGF-BB-Stimulation auf die CTGF-Protein- oder mRNA-Expression festgestellt werden. Auch der Einsatz eines konstitutiv-aktiven Typ-1-TGF- β Rezeptors (T β RI) oder von Inhibitoren der TGF- β -Signalkaskade wies keine signifikanten Effekte auf. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu Ergebnissen vorangegangener Arbeiten könnte die damalige Verunreinigung unreiner HSC-Kulturen sein. In nachfolgenden Untersuchungen konnten Hepatozyten als quantitativ wichtige Quelle sowohl der konstitutiven als auch der TGF- β 1-abhängigen CTGF-Protein- und mRNA-Expression identifiziert werden.

Die CTGF-Expression konnte in HSC in einem erheblichen Maße durch ET-1 stimuliert werden. Die basale CTGF-Expression zeigte sich stark abhängig von Sp-1- und Ets-1-Transkriptionsfaktoren. Eine hinlängliche Erklärung für diese Beobachtungen bietet die Tatsache, dass in vorangegangenen Arbeiten Bindungsstellen für diese Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich des CTGF-Gens identifiziert werden konnten. In Hepatozyten hingegen scheint die TGF- β -abhängige CTGF-Expression über die PI-3-Kinase- und

p38-MAPK-Signalkaskaden vermittelt zu werden, da deren spezifische Inhibitoren die basale CTGF-Expression in Hepatozyten senken konnten. Durch den Einsatz von Ets-1-siRNA und dem damit verbundenen silencing des Ets-1-Transkriptionsfaktors ließ sich eine signifikante down-Regulation der CTGF-Proteinexpression erzielen; sowohl für das 38 kDa große, als auch für das 20 kDa große Peptid. Smad 3, Ras/MEK/ERK- sowie JNK/MAPK-Signalkaskaden spielen, wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben, für die TGF- β -abhängige CTGF-Expression in humanen Fibroblasten und tubulären Epithelzellen eine wichtige Rolle. Die Suppression der basalen CTGF-Expression durch MEK- und ERK-Inhibitoren auch unter ET-1-Stimulation deuten auf eine ähnliche Rolle der Ras/MEK/ERK-Signalkaskade in HSC bezüglich der CTGF-Expression hin.

Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass CTGF sowohl für das Verständnis der Pathogenese der Leberfibrose als auch für zukünftige diagnostische und/oder antifibrotische Maßnahmen und Strategien eine wichtige Rolle spielt.

Gewebstransglutaminase und Autoantikörper gegen Gewebstransglutaminase in humanen Liquor-Serum-Probenpaaren

(Leiter: PROF. DR. J. THIERY, Betreuer: PROF. DR. T. MOTHES)

ANNE TAUBERT, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei Messverfahren zur Bestimmung der Konzentration an humaner Gewebstransglutaminase (GTG) im Liquor cerebrospinalis. Mit einem der Verfahren konnten darüber hinaus auch die GTG-Konzentrationen im Serum gemessen werden. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der GTG-Konzentration vom Funktionszustand der Blut-Liquor-Schranke (BLS), wobei mit zunehmender Funktionsstörung der BLS ein signifikanter Anstieg der GTG-Konzentration im Liquor cerebrospinalis zu erkennen war. Bei einem Patienten ließ sich darüber hinaus eine intrathekale GTG-Synthese vermuten. In Ergänzung dazu wurden mit einem bereits etablierten Verfahren die Autoantikörper gegen GTG im

Liquor cerebrospinalis gemessen sowie der Zusammenhang zwischen Antigen und Antikörper untersucht. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Antigen- und *Antikörperkonzentration* im Liquor cerebrospinalis. Zusätzlich gelang bei einem Teil der Patienten der Nachweis einer intrathekalen Antikörpersynthese. Eine Aussage bezüglich der Korrelation zu verschiedenen Diagnosen war aufgrund der Heterogenität des Patientengutes zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

HPLC-Analytik des Vitamin C – Methodenoptimierung und Referenzwerterstellung

Aus dem Zentrallabor Campus Lübeck des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Leiter: PROF. DR. MED. M. SEYFARTH) und (Dekan: PROF. DR. MED. W. SOLBACH) der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck

CORNELIA MARLENE FOCKE, Lübeck

ZUSAMMENFASSUNG

L-Ascorbinsäure spielt eine facettenreiche Rolle im menschlichen Organismus; ihr Nutzen in Prävention und Therapie vieler Erkrankungen ist derzeit noch wenig verstanden und aktuell Gegenstand der Forschung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die von Liao et al beschriebene RP-HPLC-Methode mit UV-Detektion zur Messung von Ascorbinsäurespiegeln im Plasma optimiert und an die Gegebenheiten des Zentrallabors angepasst. Verwendet wurde eine Synergi 4u Hydro-RP C18 150 x 4,6 mm Säule und eine mobile Phase aus 20 mM Ammoniumdihydrogenphosphat und 0,015 % meta-Phosphorsäure bei einem pH von 2,55, mit 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure als internem Standard. Serum oder Heparinplasma wurde mit einem Gemisch aus 10 % meta-Phosphorsäure und 1 % Perchlorsäure deproteiniert und stabilisiert. Die insgesamt sieben-minütige HPLC-Messung erfolgte per UV-Detektion bei 245 nm, bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Retentionszeit der Ascorbinsäure

betrug dabei 2,9 min, die des internen Standards 3,4 min. Die optimierte Methode zeigte eine Nachweisgrenze von 0,5 µmol/l. Die Unrichtigkeit der Messung lag konzentrationsabhängig zwischen 0,03 % und 0,08 %. Der Variationskoeffizient der Impräzision in Serie betrug konzentrationsabhängig 0,05–0,7 %, in der Tag-zu-Tag-Impräzision 4,2 % für Serumproben, 8,2 % für Plasmaproben. Die Messung der Ascorbinsäurekonzentrationen war linear von 2 bis 700 µmol/l. Die vorliegende Methode könnte prinzipiell auch für Liquor- und Urinuntersuchungen modifiziert werden. Mit 10 % meta-Phosphorsäure und 1 % Perchlorsäure versetzte und bei -20 °C eingefrorene Seren oder Heparinplasmen konnten 35 Tage ohne Konzentrationsverluste gelagert werden.

Zur Referenzwerterstellung wurden Serumproben von 150 Blutspendern zwischen 18 und 67 Jahren (m: 95, w: 55) analysiert. Der ermittelte Vitamin-C-Referenzbereich betrug 25–120 µmol/l; Frauen hatten dabei signifikant höhere Vitamin-C-Spiegel (24–136

μmol/l) als Männer (23–116 μmol/l). In pharmakokinetischen Untersuchungen zeigten sich deutlich höhere Ascorbinsäure-Plasmakonzentrationen nach intravenöser Applikation von 500 mg Vitamin C als nach oraler Gabe derselben Dosis.

VERFASSTER:

DR. MED. CORNELIA FOCKE
Institut für Pathologie
Dietrich Bonhoeffer Klinikum
Allendestr. 30, 17036 Neubrandenburg
Email: FockeC@dbknbn.de

Mechanisms of monocyte activation and differentiation

Dissertation (Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover (Direktor: PROF. DR. MED. KORBINIAN BRAND) und dem Institut für Biotechnologie der Technischen Universität München (Direktor: PROF. DR. JOHANNES BUCHNER)

JUDITH D. KANDEMIR, Pfaffenhofen

Monocytes are an integral part of the immune system, linking immunity's innate and adaptive branches. As professional antigen-presenting cells they are capable of activating cells of the lymphocytic lineages, which represent the adaptive compartment of the immune system. Upon activation (e.g., by pathogenic components, or by cytokines such as tumor necrosis factor [TNF; TNF-α]) monocytes produce a variety of cytokines and chemokines, including interleukin-8 (IL-8), which recruit and activate immune cells. Monocytes also differentiate towards tissue macrophages, and albeit it is known that transcription factors of the C/EBP and ETS families play an important role during the differentiation process, their exact role remains

unknown. The aim of this work was to analyze the TNF tolerance phenomenon in primary human monocytes and to characterize the role of C/EBPβ during monocytic differentiation.

The phenomenon of TNF tolerance is characterized by a significant suppression of the otherwise readily inducible expression of important cellular factors like IL-8 after prolonged stimulation with low doses of TNF. Since in previous publications TNF tolerance was assessed mainly in cell lines, one aim of this study was to investigate this condition in primary human monocytes isolated from whole blood drawn from healthy blood donors and to identify novel differentially regulated genes by gene expression analysis. To ensure

high purity of isolated monocytes, flow cytometric analyses confirmed the presence of at least 95% CD45+ CD14+ double positive cells (i.e., monocytes) after isolation and ruled out a possible contamination with lymphocyte subpopulations. Further experiments aimed at gaining a better understanding of the cell material examined confirmed that, upon stimulation with TNF, the primary human monocytes could be readily induced to secrete IL-8 in a time- and dose-dependent manner, as measured by ELISA. However, in these cells a TNF tolerant phenotype, which has been described for the premonocytic cell line THP-1, could not be stably induced at the level of IL-8 protein expression. This heterogeneity of monocytes exposed to the conditions of TNF tolerance was also observed by gene expression analysis and confirmed at the mRNA level by real-time quantitative (RT-q) PCR. By further assessing the data from the microarray analysis it could be confirmed, however, that a large number of genes involved in signal transduction, transcription, the regulation of apoptosis and of immunological processes, as well as mediating other important cellular functions, were stably induced by TNF stimulation in human monocytes. The instability of TNF tolerance in these primary cells possibly indicates that the genotype plays an important role in their ability to undergo TNF-induced deactivation.

The upregulation of C/EBP β during monocytic differentiation has been known for

a long time, yet its implications remained unclear. Premonocytic THP-1 cells stimulated with PMA, which have widely been used as a model to study monocytic differentiation, were chosen as a model for this work. Morphological analysis by light microscopy confirmed that PMA induced dramatic changes in this cell line, which consists of basally round, non-adherent cells and became flattened, amoeboid, and polygonal by this treatment. Western blot analysis detecting nuclear C/EBP β corroborated previous reports that this transcription factor is dramatically induced during monocytic differentiation. When assessing the differential upregulation of its three isoforms LAP* ("liver activating protein"), LAP, and LIP ("liver inhibitory protein") in detail it became evident that the LAP/LIP ratio changes notably during PMA-induced monocytic differentiation of premonocytic THP-1 cells, skewing the ratio towards the transcriptionally active isoforms of C/EBP β . Concurrently, nuclear expression of the large C/EBP α isoform p42 remained constant while the inhibitory small isoform p30 was slightly induced, suggesting an attenuation of C/EBP α functionality while that of C/EBP β was augmented. Both C/EBP α and C/EBP β were only weakly expressed in the cytoplasm of differentiating THP-1. The use of a proliferation assay confirmed that THP-1 treated with PMA became significantly growth inhibited. Remarkably, the observed inhibition of proliferation coincided temporally with the induction of the LAP/LIP ratio,

suggesting a causal link between these two events. Overexpression of C/EBP β LAP* in the human epithelial cell line HeLa directly showed the growth inhibitory effect of this transcription factor in additional proliferation assays. As a second model, C/EBP β wt and ko macrophage-like cell lines were subsequently used to further understand the influence of C/EBP β on differentiation. By morphological analysis, a striking difference regarding the morphologies of these two cell lines was detected. While C/EBP β wt macrophage-like cells appeared like normal macrophages, C/EBP β ko cells remained strictly round despite being adherent. Remarkably, the proliferation rates of C/EBP β wt cells, as detected by both direct cell counting and proliferation assays, were significantly reduced compared to C/EBP β ko cells. Additionally, cell cycle analyses confirmed that after serum withdrawal, which is a prototypic tool to synchronize a cell population, the latter started cycling more readily than C/EBP β wt cells. Calculation of the cycling indices $[(S+G2M)/G0G1]$ of both cell lines at different time points revealed that after synchronization, the C/EBP β ko cell line indeed started progressing through the cell cycle earlier than the C/EBP β wt cells. In order to gain insight into the mechanisms by which C/EBP β influences cell cycle progression, expression of retinoblastoma protein (Rb), which is a strong repressor of cell cycle progression, and its phosphorylation were analyzed by western blotting in PMA-treated THP-1. The results showed that cellular Rb levels

and, to a greater extent, phosphorylation of Rb were reduced by treatment with PMA. Remarkably, the level of Rb, regardless of PMA stimulation, was significantly lower in THP-1 transfected with C/EBP β -specific siRNA, indicating that the presence of C/EBP β during monocytic differentiation attenuates the PMA-induced reduction of Rb and serves to stabilize the level of hypophosphorylated Rb within the cell. An attempt to confirm the proliferation data from the C/EBP β ko macrophage-like cells using THP-1 transfected with C/EBP β siRNA provided contradictory results as cells treated this way proliferated at lower rates than control cells. Interestingly, a direct comparison of the dominating isoform expression patterns in native THP-1 and C/EBP β wt macrophage-like cells revealed that the former express mainly LIP, while in the latter, LAP predominates over the other isoforms. Taking this observation into account, these experiments provided further evidence for differential roles of LAP*/LAP and LIP during cell cycle progression. In a next step, a possible link between the observed differences regarding proliferation rates and morphologies of the C/EBP β wt and ko cell lines was examined by subjecting the cells to serum withdrawal. Surprisingly, serum-starved C/EBP β ko cells acquired a macrophage morphology, indicating that in these cell lines, the discrepancy in their proliferation rates indeed determines their distinct cellular appearances. C/EBP α , despite being slightly upregulated in C/EBP β ko macrophage-like cells, thus appeared not to be able

to compensate for the loss of C/EBP β . Since the ETS family transcription factor PU.1 was found to be strongly induced by PMA treatment in the THP-1 cell line, its expression level was subsequently assessed in C/EBP β ko cells. Interestingly, PU.1 remained expressed in C/EBP β ko cells, albeit at lower levels than in C/EBP β wt cells, thereby probably determining their macrophage fate. Overexpression experiments in THP-1 cells confirmed that C/EBP β directly induces PU.1 expression, explaining the lower levels of this protein in C/EBP β ko cells. Finally the question was addressed whether PMA remained capable of inducing morphological changes in C/EBP β ko macrophage-like cells or in THP-1 transfected with C/EBP β siRNA. In both cases, morphological analysis revealed that PMA treatment shifted the appearance of these cells notably towards a macrophage-like phenotype despite the absence, or attenuation, respectively, of C/EBP β . Furthermore it could be shown by use of siRNA that, other than C/EBP β , PU.1 is absolutely required for PMA-induced morphological changes in THP-1. Thus, the experiments presented herein indicate that two major roles of C/EBP β during monocytic differentiation are (i) the inhibition of cell cycle progression to which Rb may contribute and (ii) the enhancement of PU.1 activity by directly augmenting its expression. These results thus help to further understand of the role of C/EBP β during monocytic differentiation while confirming the crucial role of PU.1 during this process.

Overall, the results presented in this study extend current knowledge about monocytes. While their activation by cytokines like TNF was readily observable, attenuation of cytokine-induced signaling, as exemplified by the TNF tolerance phenomenon in this study, appeared to be dependent on various other factors that are possibly determined by the genetic background of the cells. If such factors proved to be important, the development of TNF tolerance could be linked to critical illnesses such as immunosuppression during late stages of sepsis. Additionally, the experiments presented herein further elucidate the role of C/EBP β during monocytic differentiation, which appeared to be mainly restricted to an inhibition of proliferation and the induction of PU.1 expression. Combined, the results presented in this work extend our molecular knowledge of the regulation of crucial monocytic functions, which may be important for a better understanding of inflammatory and malignant processes.

RESULTIERENDE PUBLIKATIONEN:

- Cappello, C., Zwergal, A., Kancierski, S., Haas, S.C., Kandemir, J.D., Huber, R., Page, S., and Brand, K. (2009) C/EBP β enhances NF- κ B-associated signalling by reducing the level of I κ B- α . *Cell. Signal.* 21(12): 1918-1924
- Haas, S.C., Huber, R., Gutsch, R., Kandemir, J.D., Cappello, C., Krauter, J., Duyster, J., Ganser, A., and Brand, K. (2010) ITD- and FL-induced FLT3 signal transduction leads to increased C/EBP β -LIP expression and LIP/LAP ratio by different signaling modules. *Br. J. Haematol.* 148(5): 777-790
- Gutsch, R.*, Kandemir, J.D.*, Pietsch, D., Cappello, C., Meyer, J., Simanowski, K., Huber, R., and Brand, K. (2011) CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits

bits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J. Biol. Chem.* 286(26): 22716-22729

- Günther, J., Kandemir, J.D., Cappello, C., Page, S., Huber, R., Müller, B., Pietsch, D., and Brand, K. TNF tolerance in primary monocytes. Manuscript in preparation

RESULTIERENDE ABSTRACTS:

- 1a. Brand, K., Kandemir, J., Cappello, C., Haas, S., Mages, J., Lang, R., and Neumeier, D. (2007) Gene expression profiles of TNF tolerant monocytes using microarray analysis (Presentation). Joint Annual Congress of The Austrian Society for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry (ÖGLMKC) and The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Vienna. Abstract Book
- 1b. Brand, K., Kandemir, J., Cappello, C., Haas, S., Mages, J., Lang, R., and Neumeier, D. (2007) Gene expression profiles of TNF tolerant monocytes using microarray analysis (Presentation). Joint Annual Congress of The Austrian Society for Laboratory Medicine and Clinical Chemistry (ÖGLMKC) and The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Vienna. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45(8): A93
- 2a. Haas, S., Cappello, C., Zwergal, A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S., and Brand, K. (2008) Steuerung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität durch C/EBP β – I κ B- α als Effektormolekül (Presentation). Hj.-Staudinger-Symposium of the DGKL, Bad Staffelstein. Abstract Book
- 2b. Haas, S., Cappello, C., Zwergal, A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S., and Brand, K. (2008) Steuerung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität durch C/EBP β – I κ B- α als Effektormolekül (Presentation). Hj.-Staudinger-Symposium of the DGKL, Bad Staffelstein. *Klin. Chem. Mitt.* 39(1+2): 30-31
- 3a. Cappello, C., Zwergal, A., Haas, S., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S., and Brand, K. (2008) C/EBP β sustains constitutive NF- κ B activity – evidence for involvement of I κ B- α (Presentation). 5th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Mannheim. Abstract Book
- 3b. Cappello, C., Zwergal, A., Haas, S., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S., and Brand, K. (2008) C/EBP β sustains constitutive NF- κ B activity – evidence for involvement of I κ B- α (Presen-

tation). 5th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Mannheim. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46(9): A155

- 4a. Huber, R., Haas, S.C., Gutsch, R., Kandemir, J.D., Cappello, C., Krauter, J., Duyster, J., Ganzer, A., and Brand, K. (2009) ITD- und FL-induzierte FLT3-Rezeptor-abhängige Signalwege vermitteln eine Erhöhung der C/EBP β -LIP-Expression und der LIP/LAP-Ratio über differentielle Signalmodule (Poster). 6th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Leipzig. Abstract Book
- 4b. Huber, R., Haas, S.C., Gutsch, R., Kandemir, J.D., Cappello, C., Krauter, J., Duyster, J., Ganzer, A., and Brand, K. (2009) ITD- und FL-induzierte FLT3-Rezeptor-abhängige Signalwege vermitteln eine Erhöhung der C/EBP β -LIP-Expression und der LIP/LAP-Ratio über differentielle Signalmodule (Poster). 6th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Leipzig. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(9): A57-58
- 5a. Gutsch, R.*, Kandemir, J.D.*, Simanowski, K., Pietsch, D., Cappello, C., Meyer, J., Huber, R., and Brand, K. (2010) C/EBP β inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the Rb/E2F pathway with differential effects on morphology. 7th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Leipzig. Abstract Book
- 5b. Gutsch, R.*, Kandemir, J.D.*, Simanowski, K., Pietsch, D., Cappello, C., Meyer, J., Huber, R., and Brand, K. (2010) C/EBP β inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the Rb/E2F pathway with differential effects on morphology. 7th Annual Conference of The German United Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL), Leipzig. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49(9): A98

* equal contribution

VERFASSEN:

DR. RER. NAT. JUDITH D. KANDEMIR

Daiichi Sankyo Europe GmbH

Analytical Department

Luitpoldstr. 1, 85276 Pfaffenhofen

Tel.: 08441-759 484

Fax.: 08441-759 201

Judith.Kandemir@daiichi-sankyo.eu

Methodenentwicklung zur Analyse von bioaktiven Lipiden mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie

(Dr. rer. nat.) aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Direktor: PROF. DR. MED. GERD SCHMITZ)

MAX SCHERER, Regensburg

HINTERGRUND

Die äußerst wichtige Rolle von Lipiden in verschiedenen Zellen, Geweben und Körperflüssigkeiten wurde durch eine Reihe von Studien gezeigt. Viele Krankheiten stehen in engem Zusammenhang mit Störungen im Lipid-Stoffwechsel. Beispiele für solche Krankheiten sind unter anderem Krebs, Typ 2 Diabetes und Arteriosklerose. Neueste Ergebnisse im Bereich der „Lipidomics“, wurde durch die Entwicklung neuartiger massenspektrometrischer Tools für die Identifizierung und Quantifizierung molekularer Lipid-Spezies in verschiedenen biologischen Materialien, vorangetrieben. Bereits existierende Methoden für die Analyse von gering konzentrierten Sphingolipiden (SL), Glycerophospholipide (GP) und Gallensäuren weisen deutliche Limitationen hinsichtlich aufwendiger Probenvorbereitungen, langen chromatographischen Trennungen, hohen Probenvolumina oder unzureichenden Validierungs-Daten auf. Aus diesem Grund sind diese Methoden nicht geeignet für Biomarker-Screening in großen klinischen Studien.

METHODEN UND ERGEBNISSE / DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit beschreibt schnelle, sensitive und robuste analytische Methoden für die Quantifizierung von SL, GL und Gallensäuren mittels Flüssigchromatographie Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS). Die chromatographische Trennung sollte hinsichtlich der Co-Elution von Analyten und internen Standards optimiert werden. Diese ist Voraussetzung um potentielle Matrix-Effekte und unterschiedliche Ionisationseffizienzen auszugleichen. Für den Einsatz in großen klinischen Studien, sollte die Datenauswertung automatisiert werden, um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Neben Blutplasma sollten auch andere biologische Materialien, wie kultivierte Zellen und Gewebe eingesetzt werden.

Zunächst wurde eine Methode für die simultane Analyse von Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylglycerol (PG), Bis(monoacyl)glycerolphosphat (BMP) und Cardiolipin (CL) entwickelt. Quantifizierung dieser Lipide erfolgte durch hydrophile

Interaktionschromatographie (HILIC) gekoppelt mit ESI-MS/MS im positiven Ionisations-Modus. HILIC zeichnete sich durch optimale Peak-Qualitäten und Basislinien-Trennung der isobaren Komponenten PG und BMP aus. Zusätzlich wurde durch den Einsatz von HILIC eine Co-Elution der Lipid-Spezies und der zugehörigen internen Standards erreicht. Da sich viele Lipid-Spezies nur in ihrer Kettenlänge und/oder ihrem Sättigungsgrad unterscheiden, führt Co-Elution zu einem Isotopen-Überlapp der korrigiert werden muss. Aus diesem Grund wurden theoretisch berechnete Isotopen-Profile in selbst-programmierte Excel-Makros implementiert. Der komplexe Isotopen-Überlapp wurde im Folgenden, zum ersten Mal, in einem MS/MS-Experiment erfolgreich korrigiert.

Als weiterer Schwerpunkt dieser Doktorarbeit sollten neue analytische Methoden für den Nachweis und für die Quantifizierung von verschiedenen Sphingolipiden entwickelt werden. Durch die Anwendung von HILIC wurden die verschiedenen SL-Klassen erfolgreich getrennt, und gleichzeitige Co-Elution von Analyten und Internen Standards konnte erreicht werden. Charakterisierung mittels MS wurde für S1P und LPA im negativen Ionisationsmodus, für SPH und Metabolite sowie für HexCer und LacCer, im positiven Ionisationsmodus durchgeführt. Da beide Methoden die identische butanolische Extraktion, und die gleichen chromatographischen Komponenten verwenden, konnte das

komplette SL Profil aus demselben Extrakt bestimmt werden. Ein Inkubations-Experiment von Fibroblasten mit Myriocin, einem Inhibitor des ersten Schrittes der SL-Biosynthese, und einem Sphingosinkinase-Inhibitor zeigte Veränderungen des SL Profils. Um weitere wichtige Erkenntnisse des SL-Stoffwechsels in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen zu gewinnen ist es daher wichtig, kombinierte Methoden, die eine Vielzahl von Metaboliten erfassen, anzuwenden. In einem zusätzlichen Experiment wurden SL in Plasma und in FPLC-getrennten Lipoprotein-Fractionen quantifiziert. SLs zeigten eine spezifische Verteilung über die verschiedenen Lipoprotein-Klassen.

Gallensäuren wurden aus humanem Plasma/Serum mittels ESI-MS/MS in negativem Ionisations-Modus quantifiziert. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einer Umkehrphase C18-Säule. Innerhalb von 6.5 min wurden 18 verschiedenen Gallensäuren mittels Gradienten-Elution unter basischen Bedingungen getrennt. Als Probenvorbereitung wurde eine Proteinfällung mit Hilfe von Acetonitril angewendet. Da diese Methode im Rahmen der Routinediagnostik und in großen klinischen Studien eingesetzt wird, wurde eine Validierung auf Grundlage der FDA-Richtlinien durchgeführt.

**RESULTIERENDE PUBLIKATION
DER DISSERTATION**

- Scherer M, Schmitz G, Liebisch G. High-throughput analysis of sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid in plasma samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 2009;55:1218-22.
- Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G. Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2009;877:3920-5.
- Scherer M, Leuthaeuser-Jaschinski K, Ecker J, Schmitz G, Liebisch G. A rapid and quantitative LC-MS/MS method to profile sphingolipids. J Lipid Res 2010, 51:2001-11.
- Ecker J, Liebisch G, Scherer M, Schmitz G. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers on macrophage glycerophospholipid metabolism. J Lipid Res 2010 Sep; 51 (9):2686-94.
- Scherer M, Böttcher A, Schmitz G, Liebisch G. Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. Biochim Biophys Acta 2010 (in revision).
- Scherer M, Schmitz G, Liebisch G. Simultaneous quantification of cardiolipin, bis(monoacylglycerol)phosphate and their precursors by hydrophilic interaction LC-MS/MS including correction of isotopic overlap. Anal. Chem. 2010 (accepted).

ANSCHRIFT DES VERFASSERS

MAX SCHERER

Institut für Klinische Chemie und
Laboratoriumsmedizin
Universitätsklinikums Regensburg
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93047 Regensburg

Habilitation

Der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen: Bedeutung für Proliferation und Invasion

Habilitation (PD Dr. med. habil.) aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München

(Leiterin: PROF. DR. MARIANNE JOCHUM), 2010

PETER NETH, München

ZIELSETZUNG

Adulte Stammzellen kommen in zahlreichen Geweben und Organen des menschlichen Körpers vor und vermitteln dort die gewebespezifische Organregeneration. Im Knochenmark findet man neben den hämatopoetischen Stammzellen auch mesenchymale Stammzellen (MSC, mesenchymal stem cells), die innerhalb des mesodermalen Keimblattes in verschiedene Gewebe wie z. B. Knochen, Knorpel, Sehne, Fett und Muskel differenzieren können. Dieses Differenzierungsvermögen sowie die ethisch unbedenkliche Gewinnung aus dem Knochenmark machen MSC zu einem großen Hoffnungsträger im Rahmen von Patienten-spezifischen Zell- und Gewebeersatztherapien. Allerdings sind die der Selbsterneuerung bzw. Differenzierung zugrunde liegenden molekularen Steuerungsmechanismen in MSC bislang nur fragmentarisch bekannt.

Vor diesem Hintergrund war es von besonderem Interesse, geeignete genetische Modifikationsstrategien zu entwickeln, um mit deren Hilfe wichtige

Signaltransduktionskaskaden (wie z. B. den Wnt/ β -Catenin-Signalweg) besser zu verstehen, die zum einen zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters und zum anderen für die Regulation von Invasions- und Differenzierungsvorgängen – und damit zur Stammzell-vermittelten Geweberegeneration – notwendig sind. Darüber hinaus sollte eine komparative Analyse des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in humanen (hMSC) und murinen (mMSC) mesenchymalen Stammzellen die Grundlage für eine spätere Entwicklung eines validen Tiermodells zur Eruiierung klinisch relevanter Therapieoptionen dienen.

Wesentliche Schwerpunkte des Habilitationsprojektes waren daher:

- Etablierung eines nicht-viralen Plasmid-basierten Transfektionssystems zur gezielten Überexpression von Transgenen in MSC.
- Entwicklung eines nicht-viralen Transfektionssystems für siRNAs (short interfering RNAs) in MSC zum gezielten Knockdown von Genprodukten (v.a.

Komponenten des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges).

- Etablierung des TCF/LEF-Reportersystems in mMSC für die quantitative Erfassung von nukleärem β -Catenin als zentraler Mediator des Wnt/ β -Catenin-Signalweges.
- Evaluierung des Proliferations- und Invasionsvermögens von hMSC und mMSC nach Aktivierung bzw. Inhibition des Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweges.
- Analyse von Wnt/ β -Catenin-regulierten Proteolysefaktoren (MMPs und TIMPs) in hMSC und mMSC als essentielle Parameter für die Vermittlung der Invasionseigenschaften.

WESENTLICHE ERGEBNISSE

Zu Beginn des Habilitationsprojektes waren standardisierte Protokolle hinsichtlich einer nicht-viralen genetischen Modifikation von mesenchymalen Stammzellen nicht verfügbar. Die Evaluierung von verschiedenen liposomalen Transfektionsreagenzien ergab, dass Lipofectamine 2000 mit der höchsten Transfektionsrate (50 %) in hMSC und mMSC einhergeht. Gemäß unserem Protokoll generierte stabil genetisch modifizierte MSC behielten neben ihrer Proliferationskapazität auch ihr Differenzierungsvermögen innerhalb des mesodermalen Keimblattes bei. Diese deutet darauf hin, dass MSC auch nach dem von uns etablierten Transfektions- und Selektionsverfahren ihren Stammzellcharakter

über mehrere Monate aufrechterhalten, was eine wichtige Basis für zukünftige in vitro- und auch in vivo-Versuche darstellt. Parallel hierzu wurde ebenfalls mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine 2000 die Transfektion von siRNAs in hMSC und mMSC etabliert und optimiert, wodurch eine funktionell lang andauernde RNA-Interferenz erreicht werden konnte.

Basierend auf diesen genetischen Modifikationsstrategien konnte in mMSC das TCF/LEF-Reporter-System etabliert werden, das die Quantifizierung einer β -Catenin-abhängigen Reportergen-Expression erlaubt. Als Reportergen wurde Gaussia-Luciferase verwendet. Derartig modifizierte TCF/LEF-Reporter-MSC können zukünftig in einem in vivo-Mausmodell von großem Vorteil sein, da Wnt-aktive MSC mittels eines in vivo-Imaging-Systems visualisiert werden können, um ihre Funktion bei Geweberegenerationsprozessen aufzuklären.

Mit dem Ziel, den Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg hinsichtlich der Steuerung von grundlegenden Stammzeleigenschaften näher zu evaluieren, wurde nun der kanonische Wnt-Signalweg auf verschiedenen Ebenen manipuliert. Dies erfolgte wiederum sowohl in hMSC als auch in mMSC. Der komparative Ansatz wurde gewählt, um etwaige Spezies-basierende Unterschiede in der Regulation von einzelnen Wnt/ β -Catenin-Signalwegskomponenten zu identifizieren, was eine essentielle Grundvoraussetzung dafür darstellt, um für den

Menschen relevante präklinische Tiermodelle zur Entwicklung von geeigneten Therapieoptionen einsetzen zu können.

Neben zahlreichen Gemeinsamkeiten insbesondere hinsichtlich des Proliferationsverhaltens und der Wnt-Zielgenexpression des Zellzyklusproteins Cyclin D1 zeigten sich auch klare Unterschiede zwischen hMSC und mMSC. Dies betraf vor allem die Steuerung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP)-medierten Invasionsprozessen. Während die Invasionsfähigkeit in hMSC eine positive Korrelation mit dem Aktivierungsstatus des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zeigte, offenbarte sich in mMSC hingegen eine negative Abhängigkeit zwischen dem Wnt/ β -Catenin-Status und dem Invasionsvermögen. Diese nachhaltigen Unterschiede in den zellulären Phänotypen spiegelten sich vor allem in einer Spezies-divergenten Regulation der MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase) wider. So ging nur in hMSC die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges mit einer vermehrten MT1-MMP-Expression einher, während in mMSC die Produktion von MT1-MMP einer negativen Regulation durch den kanonischen Wnt-Weg unterlag. In ähnlicher Weise zeigten ebenfalls nur in mMSC die Proteinasen MMP-2 und MMP-9 unter Stimulation mit Wnt3a eine deutlich verringerte Expression.

Zusammenfassend spiegeln die erhobenen Daten erstmalig nachhaltige Unterschiede zwischen basalen Wnt/ β -Catenin-regulierten Prozessen in hMSC und mMSC wider. Somit

ist ein komparativer Ansatz für ein Spezies-relevantes drug design hinsichtlich bestimmter Wnt/ β -Catenin-Signalwegskomponenten unerlässlich, um letztendlich für den Menschen aussichtsreiche Therapien hinsichtlich einer gezielten Stammzellmobilisierung im Rahmen von Regenerationsprozessen entwickeln zu können.

PUBLIKATIONEN ZUM THEMA

- Hoelters J, Ciccarella M, Drechsel M, Geissler C, Gülkan H, Böcker W, Schieker M, Jochum M, Neth P. Non-viral genetic modification mediates effective transgene expression and functional RNA interference in human mesenchymal stem cells. *J Gene Med.* 2005 Jun;7(6):718-728.
- Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C. Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 Aug;24(8):1892-1903.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood* 2007 May; 109(9):4055-4063.
- Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M. The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion. *Stem Cell Rev.* 2007 Jan; 3(1):18-29.
- Karow M, Popp T, Egea V, Ries C, Jochum M, Neth P. Wnt signaling in mouse mesenchymal stem cells: impact on proliferation, invasion, and MMP expression. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug, 13(8B):2506-2520.

ANSCHRIFT DES VERFASSERS

PD DR. RER. NAT. PETER NETH, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Nussbaumstr. 20, 80336 München, E-Mail: Peter.Neth@med.uni-muenchen.de

Laborleitertreffen

Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern 2011

Das 19. Laborleitertreffen Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern fand am 24./25. Juni 2011 in Potsdam unter der wissenschaftlichen Leitung und Organisation von HERRN PROF. DR. BÜHLING (Cottbus), HERRN DR. FRITZ (Schwedt) sowie HERRN DR. K.-G. HEINZE (Berlin) statt. Die Veranstaltung wurde von der LÄK Brandenburg mit 7 Fortbildungspunkten honoriert.

Der erste Tag des Treffens wurde von HERRN PROF. BÜHLING moderiert.

FRAU PD DR. S. WESTPHAL aus dem Institut für Klinische Chemie der Universitätsklinik Magdeburg behandelte die Frage: „Lipiddiagnostik: alles beim Alten?“. Obwohl die Diagnostik und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen in den letzten Jahrzehnten eindrucksvolle Fortschritte erzielen konnten, musste die anfängliche Euphorie an vielen Stellen gebremst werden. Möglicherweise (zu) einfache Vorstellungen wie „Erhöhung der HDL-Cholesterin-Konzentration verbessert die Prognose“ wurden durch ungeklärte physiologische Aspekte des HDL-Stoffwechsels sowie die unerwarteten Nebenwirkungen der Medikamente (CETP-Hemmer) ausgebremst. Ebenso wird weltweit nach den genetischen Ursachen der Atherosklerose gefahndet; leider sind aber auch hier die Ergebnisse nicht einheitlich und oftmals kommen die

verschiedenen Polymorphismen in ihrer Assoziation zum Auftreten einer koronaren Herzkrankheit nicht über die Aussagekraft eines erhöhten Gesamt-Cholesterins hinaus. Selbst gängige Betrachtungsweisen bspw. des LDL-Werts müssen relativiert werden, da diese Fraktion durchaus nicht homogen erscheint und kleine, dichte LDL-Partikel eine deutlich höhere Atherogenität als große LDL-Partikel aufweisen; ein Wert von 130 mg/dl kann also klinisch unterschiedliche Relevanz besitzen. Leider sind Routineverfahren zur Subfraktionierung des LDL aktuell nicht verfügbar. Homocystein wurde eher als Risikoindikator nicht als Risikofaktor diskutiert, CRP muss ebenfalls vorsichtig beurteilt werden da bspw. bei adipösen Patienten allein der Umstand der IL6-Sekretion durch Fettzellen über hepatische Induktion zu Erhöhungen des CRP führen kann. Was neue Parameter wie die Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2 und weitere Erkenntnisse zum Vitamin D-Stoffwechsel im Zusammenhang mit der Atheroskleroseentwicklung bringen werden, ist aktueller Forschungsgegenstand. In einer kritischer Betrachtung klärten neun relativ einfache Faktoren über 90% des vaskulären Gesamtrisikos, wobei als Laborparameter nur der Quotient ApoB zu ApoA1 enthalten war; die anderen umfassten neben der Hypertonie und dem Diabetes mellitus mehr

„Lifestyle“-Faktoren wie Rauchen, psychosoziale Faktoren, Verzehr von Obst/Gemüse, Alkohol, Sport. Nichtsdestotrotz besitzt der LDL-Wert ein hohes Evidenzniveau im Hinblick auf seine Atherogenität (höher als HDL oder gar die Triglyceride). Der künftige Fokus der Forschung muss neben der frühzeitigen Erkennung sowie Behandlung von Risikopatienten zumindest ebenso auf der Vermeidung unnötiger Therapien bei nicht gefährdeten Patienten liegen.

HERR PROF. DR. B. BRANDT, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Institut für Klinische Chemie, referierte über „Einzelzellanalyse – prädiktives Diagnostikum in der Onkologie der Zukunft?“. Schon Ende des 19. Jahrhunderts existierte die Vorstellung, dass Tumorzellen hämatogen disseminieren und auch bei operativer Therapie des Primärtumors die Metastasenbildung die Haupttodesursache solider Tumoren darstellt. Problematisch ist die geringe Zahl zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut selbst bei größeren, schon makroskopisch fassbaren Tumoren (Größenordnung 1 auf 107 bis 108 Leukozyten des peripheren Bluts; allerdings abhängig von Tumorart und -größe/-ausbreitung/-lokalisation. Beim Prostata-Ca finden sich relativ viele Zellen im Blut, beim Ovarial-Ca in der Regel nur wenige). Erschwert wird ihre Detektion auch durch den Umstand, dass Tumorzellen häufig makroskopisch oder genetisch nur in geringsten Teilen als „unnormal“ im Vergleich mit

der gesunden Mutterzelle imponieren. Zur Erfassung maligner Einzelzellen im peripheren Blut wurden Anreicherungs- und molekulare Charakterisierungsmethoden auf Basis von Dichtegradienten oder magnetischen Nanobeads konjugiert mit Antikörpern gegen bspw. epithelspezifische Strukturproteine (z. B. Zytokeratine, EpCAM) entwickelt. Zusammen mit mRNA-Expressions-Analytik, dem Nachweis chromosomaler Abberationen und DNA-Mutationen der Einzelzelle kann ein spezifisches Therapiemonitoring geleistet werden. Durch den Detektion onkogener Rezeptoren ist auch eine spezifische Therapie gegen Onkoproteine (HER2 und EGFR) besser führbar. Da in heterogenen Tumoren oft nur einzelne Subpopulationen Marker für eine potentielle Therapieresistenz tragen, kommt ihrer sensitiven Erkennung große Bedeutung zu, um spezifische Therapietargets zu identifizieren. Beispiele sind die BRCA1-Mutationen des Prostatakarzinoms und Amplifikationen des chromosomalen Abschnitts 3q26 beim Ovarial- und 7q12 beim Mammakarzinom. Gerade die BRCA1-Mutation beim Prostata-Ca birgt die Potenz, die Tumore, welche rasch bösartig metastasieren und einer Therapie bedürfen, von den relativ gutartigen Karzinomformen abzugrenzen, welche evtl. nur beobachtet werden müssen. Bei unbestrittener klinischer Wertigkeit für die Onkologie steht dem breiten Einsatz der Einzelzellanalyse im peripheren Blut leider noch der hohe Preis entgegen.

Nach einer kurzen Kaffepause schilderte Prof. Dr. R. Lichtinghagen, MBA, Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, im Zusammenhang mit seinem Thema „Pharmakogenetik: Ein Weg zur individualisierten Therapie“ einleitend den Weg vom Milliardenprogramm des Human Genome Projects über verschiedene Techniken mit Kapillar- oder Pyro-Sequenzierung sowie next generation Verfahren, die letztlich der Vision von „einem Genom für 1000 Dollar“ schon recht nahe kommen. Dieses ist mit den deutschen Abrechnungssystemen, wo schon bei single nucleotide Polymorphismen (SNPs) für eine simple Erfassung von 10 SNPs schnell 600,- € abgerechnet werden, nicht leistbar. Auch das Gendiagnostikgesetz erschwert hier die weitere Verbreitung. In der klinischen Praxis hat sich die Pharmakogenetik nur in einzelnen Gebieten wie der TPMT-Phäno-/Genotypisierung bei den Azathioprin/Mercaptopurin-therapien durchgesetzt. Andere Polymorphismen wie die VKORC1 plus Cyp2C9 bei der Coumarintherapie oder Cyp2C19 zur Detektion potentieller non-responder bei Clopidogrel Einsatz sind mehr als diskutabel und eher durch preiswertere, funktionelle Methoden (INR-Bestimmung oder die Thrombozytenfunktion) ersetzbar. Neben der Tatsache, dass nicht nur genetische Polymorphismen in relevanten Kandidatengen Einfluss auf die Therapiewirksamkeit haben, bleiben „traditionelle“ Faktoren weiterhin gültig: Leber-,

Nierenfunktion, Gewicht, Geschlecht, Alter, Nahrung, Genussmittel – und vor allem die Compliance der Patienten – sind von entscheidender Wichtigkeit. Methoden und Expertensysteme zur Erzielung einer sicheren Prädiktion der individuellen Arzneimittelwirkung auf Basis breiter genetischer Information sind zur Zeit nicht vorhanden.

HERR PROF. DR. B. L. HERRMANN, Endokrinologie-Diabetologie-Innere Medizin, Technologie Zentrum Ruhr, Bochum, behandelte den täglich auftretenden Themenkreis der Hormonanalytik bei Schilddrüsenerkrankungen. Schon mit den ersten Bildern wurde klar, dass auch hier die reine klinische Beobachtung incl. der Anamnese diagnostisch wegweisend sein kann: Neben den typischen Zeichen beim Morbus Basedow mit oft hyperthyreoter Stoffwechsellaage, zeigte er auch seltenere Formen mit teils riesigen Strumen, die bei Kombination Innenohrschwerhörigkeit mit Hypothyreose/genetisch fixierter Jodverwertungsstörung dem sog. Pendred- Syndrom entsprechen können. Die sehr deutlichen Häufigkeitsunterschiede bei Jodmangelstrumen zwischen Nord- und Süddeutschland existieren nicht mehr und ohnehin kann Deutschland nicht mehr als generelles Jodmangelgebiet gesehen werden. Bzgl. der Auto-Antikörper Diagnostik steht der Wert von TSH-Rezeptor-Ak bei M. Basedow sowie den TPO-Ak bei Hashimoto-Thyreoiditis (hier wichtiger als die Thyreoglobulin-Ak) außer Frage. Neben der

sehr schmerzhaften de Quervain Thyreoiditis nach viralen Infekten ohne spezifische Auto-Ak (häufig erst hyper- dann hypothyreot) sowie der seltenen „eisenharten Struma Riedel“ wurden genetisch fixierte endokrinologische Erkrankungen wie auch das Schmidt-Syndrom als polyendokrines Autoimmunsyndrom und die multiplen endokrinen Neoplasien (MENs) angesprochen. Neben der hormonellen Diagnostik haben natürlich die bildgebenden Verfahren großen Anteil im Rahmen der Schilddrüsenbeurteilung; auf der anderen Seite ist beim M. Basedow eine Szintigrafie nicht erforderlich, da hier der TSH-Rezeptor-Ak-Nachweis ausreicht. Die nähere Klärung der bei in bis zu 25% der deutschen Bevölkerung auftretenden Schilddrüsenknoten ist natürlich zur Abgrenzung maligne/benigne überaus wichtig und neben der Punktion können auch Tumormarker (z. B. das Calcitonin) sinnhaft sein. Besonders sollte in der Schwangerschaft darauf geachtet werden, dass abfallende TSH-Werte nicht zwangsläufig Hyperthyreosen indizieren, da das stark zunehmende β hCG durch seine Strukturhomologie zu TSH die peripheren Schilddrüsenhormonlage sicherstellen kann und die TSH-Reduktion induziert. Andererseits muss in der Schwangerschaft eine Hypothyreose vermieden werden und er nannte das Beispiel von Frauen mit Hashimoto-Thyreoiditis (ca. 10 – 15% haben keine TPO-Ak), die ggfls. mit Thyroxin supplementiert werden müssen. Während

die Behandlung der endokrinen Orbitopathie beim Morbus Basedow mit Selen sowie das Weglassen des Rauchen positive Auswirkungen haben, ist die Therapie mit Schilddrüsenhormonpräparaten beim sog. lowT3/lowT4-Syndrom bei der damit oft verbundenen schweren Grunderkrankung nicht erfolgversprechend.

Wie in den Vorjahren eröffnete Herr Dr. HEINZE mit einer kurzen Einführung den zweiten Tag der Veranstaltung, welcher einen breiten Themenkreis von Qualitätssicherungsmaßnahmen im Labor über Transfusionsmedizin, Hämostaseologie bis hin zur neurologischen Diagnostik umfasste.

FRAU PETRA MICHEELS, Landesamt für soziale Dienste Schleswig-Holstein, Abteilung Gesundheitsschutz – Medizinprodukteüberwachung, Kiel, wurde von Herrn Dr. HEINZE mit den etwas provozierenden Worten „Hämostaseologie sei biologisch, die Qualitätssicherung im Labor zumindest bürokratisch komplex; Vorteil der Qualitätssicherung: Es ginge vermutlich einfacher, - die Hämostaseologie eher weniger“, zu Ihrem Vortrag „Neue Rili-BÄK, Erfahrungen des ersten Jahres“ gebeten. Seit gut einem Jahr sind die Anforderungen der Rili-BÄK 2008 im Labor umzusetzen; vor allem im Teil A sowie in den die POCT-Bereiche betreffenden Abschnitten stellten sich die größten Probleme dar. Aus eigener Erfahrung berichtete die Referentin von 72 Überwachungen (April 2010 bis April 2011;

22 Laboratorien, 50 POCT-Bereiche). Der Teil B konnte in allen Fällen geprüft werden, Teil A nur zu 40%, da entweder die verpflichtende Umsetzung unbekannt war, die Unterlagen nicht einsehbar waren oder die Verantwortung ungeklärt bzw. in anderen Händen lag. Ein vollständiges Qualitätsmanagementsystem nach RiliBÄK 2008 hielten nur 4 Zentrallaboratorien vor; im POCT-Bereich war das gar nur einmal der Fall. Interessanterweise ist die Überwachungsintensität durch die Vollzugsbehörden/berechtigten Institutionen in den einzelnen Bundesländern deutlich unterschiedlich. Während bspw. in Berlin und Brandenburg sowie Schleswig-Holstein durchaus ein zweijähriges Überwachungsintervall für die meisten Laboratorien gehalten werden kann, sind in manchen anderen Bundesländern derartige Visitationen nahezu unbekannt. Trotz unterschiedlichen Engagements der Länderbehörden sollte allgemein darauf hin gewirkt werden, zu verdeutlichen, dass ein funktionierendes Qualitätsmanagementsystem hilfreich und arbeitserleichternd sein kann.

HERR PROF. DR. M. SPANNAGL, Klinikum Innenstadt, Medizinische Klinik, Hämostaseologie/Angiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, leitete sein Referat über „Thrombozytenfunktionsdiagnostik in der täglichen Routine“ mit zwei kleinen Filmen über das in vivo Verhalten von Thrombozyten im Flusskammermodell und ihrer Interaktion mit dem von Willebrand Faktor als

„Kleber“ zwischen Kollagen und Thrombozyten über den vWF-Rezeptor Glykoprotein Ib/V/IX, welcher mit dem Fibrinogen-Rezeptor Glykoprotein IIb/IIIa einen der zwei wichtigsten Rezeptoren darstellt, ein. Häufig wurde, selbstverständlich neben dem klinischen Erscheinungsbild, lediglich die Zahl der Thrombozyten zur Beschreibung der Plättchenfunktion herangezogen. Erst in den letzten Jahren etablierten sich hierfür Labormethoden, die im Gegensatz zur klassischen Born-Aggregometrie zum Teil als POCT-Methoden geeignet sind (u.a. Verify Now, Multiplate, PFA100). Aufgrund unterschiedlicher Meßprinzipien (optisch, elektrischer Widerstand, partikelverstärkte Trübung) und verschiedener Aktivierungswege (ADP-Rezeptor, Cyclooxygenaseweg, Thrombinrezeptor) bzw. Aktivierungsbedingungen (hoher vs niedriger Scherstress) sowie unterschiedliche Einfluss- und Störgrößen sind diese Methoden nur schwer miteinander vergleichbar und einen „one size fits all“-Test wird es nicht geben. Vielmehr werden sich künftig Kombinationen von Methoden als geeignet zur Beschreibung der Thrombozytenfunktion herauskristallisieren. Aktuell scheint die Impedanzaggregometrie wegen der spezifischen und sensitiven Messung der medikamentösen Thrombozytenhemmung beim Management akuter arterieller Interventionen an Bedeutung zu gewinnen. Neue antithrombozytäre Medikamente wie Prasugrel, Cangrelor u. a. zeichnen sich oft durch stärkere,

schnellere Wirksamkeit und weniger non-responder aber auch durch das höhere Risiko von Blutungen aus. Hier wird es künftig von Interesse sein, den sog. „sweet spot“ analog zum optimalen therapeutischen Fenster bei der INR-Adaptierung zu definieren.

Nach der kurzen Kaffepause knüpfte HERR PROF. DR. M. HEIM, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie mit Blutbank, Universitätsklinikum Magdeburg A. o. R., Magdeburg, Laboratoriumsmedizin, an das Gebiet der Hämostaselogie mit einem transfusionsmedizinischen Beitrag „Humanplasma (tiefgefroren, lyophilisiert) – sinnlos, „notfalltauglich“, Alternativen?“ an. In seiner bekannt kritischen, hinterfragenden Art ordnetet er ca. die Hälfte aller gegebenen Humanplasmen in Deutschland als nicht indiziert ein,- dies sei allein aus der Tatsache ableitbar, dass bei diesen Patienten nur zwei GFP-Präparate gegeben wurden, die in ihrer überaus fraglichen klinischen Wirksamkeit kaum die Schwankungsbreite der zur Kontrolle eingesetzten Labormethoden verließen. Der Umstand, dass es sich bei verschiedenen gefrorenen Plasmapräparationen um unterschiedliche Präparate mit verschiedenem Volumina, Wirkstoffgehalt, Infektionsrisiko und Nebenwirkungsprofil handelt („Plasma ist nicht gleich Plasma“), ist dem Kliniker oft unbekannt. Nur wenige deutliche Indikationen sind für den Einsatz von GFP-Gaben neben den Massivtransfusionen (>10 EK in 24 h), Plasmatausch bei TTP, Faktor V- und

Faktor XI-Mangel bekannt. Wenn aber GFP indiziert ist, dann müssen größere Mengen (> 800 ml) verabreicht werden; 2 – 3 GFP pro Transfusionsepisode sind ohne klinischen Effekt. Zusätzlich kann die Gabe von Fibrinogen nötig sein, vor allem wenn bereits vor GFP-Gabe eine Mangel bestand, PPSB gegeben wurde oder Präparate mit niedrigem Fibrinogengehalt verwendet wurden (z. B. Methylenblau-inaktiviertes GFP). Im Allgemeinen sind ca. 3 – 6 g Fibrinogen bei Erwachsenen zur Erzielung wirksamer Spiegel erforderlich. PPSB-Präparate haben ihren klassischen Bereich bei Überdosierungen einer Therapie mit Vitamin K Antagonisten; hier sollte die zusätzlich Substitution mit Vitamin K bedacht werden. Der Quick-Wert bei von 30 – 50 % sollte bei leichten und ein Wert von 60 – 80% sollte bei schweren Blutungen erreicht werden. Auch hier muss an Anwendungsbeschränkungen (Vorsicht bei HIT2, da in Deutschland nur ein Heparin-freies PPSB-Präparat existiert), normale Antihrombinspiegel bei PPSB Gabe und DIC gedacht werden. Grundsätzlich erlangen die Querschnittsleitlinien Hämotherapie für den Kliniker höchste Bedeutung nicht nur bei gutachterlichen Fragestellungen,- auch wird deren Beachtung (und gründliche Dokumentation!) der dort genannten Indikationen die Grundlage für die zunehmend anfallenden Vergütungsdiskussionen mit den Krankenkassen sein.

FRAU DR. N. JAKOB, Sanatorium Kilchberg, Kilchberg, Schweiz, referierte über „Schlaganfall und Schädel-Hirn-Trauma – was kann das Labor leisten?“. Allein schon die enorme Inzidenz und oft schlechte Prognose beider Erkrankungen (bspw. 250.000 Schädel-Hirn-Traumen pro Jahr in Deutschland) rechtfertigt die intensive Beschäftigung mit dem Thema. Der ideale Biomarker für den Schlaganfall sollte u. a. zwischen ischämisch vs. hämorrhagisch differenzieren können, in der Frühphase nachweisbar sein, eine ausreichend lange Halbwertszeit besitzen, möglichst spezifisch für neuronales Gewebe sein, quantitativ und schnell messbar sowie für die Risikoabschätzung, ggfls. sogar für die Therapieentscheidung von Bedeutung sein. Auf den ersten Blick scheint die Neuronenspezifische Enolase (NSE) dem am nächsten zu kommen; leider ist sie präanalytisch problematisch, nicht gewebspezifisch, korreliert schlecht mit dem funktionellen outcome und auch zur Schwere des Schlaganfalls. Protein S100 ist ebenfalls nicht gewebspezifisch (z. B. auch in Tumormarker des malignen Melanoms), kein Frühmarker aber ggfls. als Prognosemarker des hämorrhagischen Infarkts einsetzbar. Weitere Markersubstanzen wie die Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2 (zur Risikoabschätzung des Schlaganfalls), den Matrix-Metalloproteinasen (hier MMP-9), dem glial-fibrillary acid protein (GFAP; möglicher Marker für Differentialdiagnose Blutung vs. Ischämie; peak aber erst nach 2

– 4 Tagen) oder PARK-7 (ursprünglich ein Onkogen; ist nach 30 min bis 3 Stunden nach zerebraler Ischämie im Blut nachweisbar) werden in ihrer Aussagekraft weiter intensiv untersucht. Momentan sind traditionelle Marker wie Alter, Hämatomgröße, Hämatomort, Ventrikeleinbruch oder die Ausbreitung eines sekundäres Ödems immer noch die für den Kliniker entscheidenden Kriterien. Trotzdem werden die neuen Biomarker vor allem in Zweifelsfällen schon zur Prognose, teils sogar zur Therapieentscheidung, herangezogen. Die vom Moderator in seiner Vorstellung der Referentin gestellte Frage nach einem dem Troponin beim akuten Koronarsyndrom analogen Marker im Bereich des Schlaganfalls oder Schädel-Hirn-Traumas musste leider abschlägig beantwortet werden. Allerdings darf hieraus auch kein diagnostischer Nihilismus abgeleitet werden; die Ergebnisse klinischer Studien bzgl. der oben genannten (und anderer) Marker wird neue Erkenntnisse bringen.

In einem kurzen Schlusswort wies Herr DR. HEINZE darauf hin, dass derartige Veranstaltungen im heutigen medizinischen Umfeld nicht als Selbstverständlichkeit gelten dürfen und vor allem durch das Interesse der Gäste, dem Engagement der Referenten sowie der Unterstützung der Sponsoren (BD Pre-analytical Systems- und hier wieder allen voran Frau E. Rothermel, die für alle Wünsche schon lange im Vorfeld der Veranstaltung offen war - Roche Diagnostics sowie Sysmex

Deutschland GmbH) ermöglicht werden. Im Namen der wissenschaftlichen Leiter dankte er nochmals allen Beteiligten für ihr Interesse, bat alle Anwesenden (ca. 70 Personen) um die Bewertung der Veranstaltung, der Organisation incl. der Unterbringung, sowie um Themenvorschläge und weitere Anregungen, damit das Laborleitertreffen Brandenburg, Berlin, Mecklenburg-Vorpommern auch im nächsten Jahr wieder eine gut besuchte, interessante Veranstaltung werden wird.

VERFASSER:

DR. K.-G. HEINZE, Berlin

LabMed Berlin GmbH

Caspar-Theyß-Str. 27-31

14193 Berlin



DR. K. HEINZE, Berlin

PROF. BÜHLING, Cottbus

Kongressankündigung der DGKL-Sektion Immundiagnostik

10th Dresden Symposium on Autoantibodies
„From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases“

Dresden, 22.-25. September 2011

Vom 22. bis 25. September 2011 findet in Dresden das 10th Dresden Symposium on Autoantibodies statt. Erstmals wird dieses traditionelle Meeting gemeinsam von dem Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden, der Sektion Immundiagnostik der DGKL, der Gesellschaft zur Förderung der Immundiagnostik e.V. sowie dem hospital Laborverbund Brandenburg Berlin GmbH gestaltet.

Das Rahmenthema (**“From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases”**) der diesjährigen Jubiläumsveranstaltung spannt den Bogen von der Prädiktion der Krankheitsentwicklung bis hin zu neueren Erkenntnissen hinsichtlich Prophylaxe und kausaler Therapie von Autoimmunerkrankungen. Als Modellbeispiele hierfür werden die Forschungsergebnisse der rheumatoiden Arthritis (RA) sowie des Typ 1 Diabetes (T1D) präsentiert und diskutiert. Zusätzlich werden auch seltenere Autoimmunopathien wie autoimmune thrombotische Mikroangiopathien, Myositiden und Kardiomyopathien sowie die Mechanismen der autoimmun bedingten Transplantatabstoßung vorgestellt. Neben diesen krankheitsbezogenen Topics liegt der Schwerpunkt der Veranstaltung auf

methodischen Aspekten der Bestimmung von Autoantikörpern sowie diagnostischen Strategien für Autoimmunerkrankungen.

Forschungen zur Vorhersage einer Krankheitsentwicklung mittels Autoantikörper werden mit der Zielsetzung vorangetrieben, klinische Manifestationen von Autoimmunerkrankungen zu verhindern oder aber im frühen Stadium kausal zu therapieren! Bei der Mehrzahl der Erkrankungen mit einer autoimmunen Pathogenese ist das über Monate bis mehrere Jahre verlaufende präklinische Stadium mit der Produktion von krankheitsspezifischen Autoantikörpern assoziiert, was Möglichkeiten eröffnet, den zur Erkrankungsmanifestation führenden Autoimmunprozess zu stoppen. Hierfür sind jedoch große prospektive Studien zur Evaluierung der prädiktiven Bedeutung von Autoantikörpern (gegebenenfalls in Kombination mit anderen Biomarkern) in Bezug auf entsprechende Krankheitsentwicklungen erforderlich, wie im Falle des Typ 1 Diabetes gezeigt werden konnte. Beim autoimmunen Diabetes ist mittels Autoantikörper-Profilanalytik bereits eine relativ präzise Risikostratifizierung als Voraussetzung für Prophylaxe- und Interventionsstudien möglich. Eine ähnliche

Entwicklung scheint sich bei der RA anzubahnen, sodass beide Erkrankungen als Modelle zur Krankheitsprävention und Entwicklung neuer Therapiestrategien angesehen werden können. Die Grundvoraussetzung für derartige Präventions- und Therapiestudien ist eine sichere prädiktive bzw. Frühdiagnostik. Die Suche nach neuen klinisch relevanten Autoantikörpern sowie die Verbesserung, Optimierung und Standardisierung der Autoantikörperanalytik als auch der Evaluierungsstudien können in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielen. Das Dresdener Jubiläumsmeeting soll hierfür Akzente setzen und Impulse liefern.

TOPICS:

- From Prediction to Prevention of Autoimmune Diseases
- Pathogenesis and Prevention of Autoimmune Diseases
- Perspectives in the Treatment of Autoantibody Mediated Diseases
- Autoimmune Thrombotic Microangiopathies
- Autoimmune graft rejection
- Autoimmune Heart Diseases
- Novel Autoantibodies and Novel Autoimmune Entities
- Autoantibody Determinations – History and Perspectives

- A Renaissance of the HEP-2 cell Assay?
- Methodical Aspects of Autoantibody Testing

GELADENE REFERENTEN:

NANCY AGMON-LEVIN (Ramat Gan, Israel),
 LUIS E.C. ANDRADE (Sao Paulo, Brasil),
 ZOE E. BETTERIDGE (Bath, UK),
 MIRI BLANK (Tel-Hashomer, Israel),
 DIMITRIOS P. BOGDANOS (London, UK),
 ALIDA L.P. CAFORIO (Padua, Italy),
 EDWARD K.L. CHAN (Gainesville, USA),
 MARIE-AGNÉS DRAGON-DUREY (Paris, France),
 MARVIN FRITZLER (Calgary, Canada),
 MARTIN HERRMANN (Erlangen, Germany),
 FALK HIEPE (Berlin, Germany),
 RENE LOUIS HUMBEL (Esch-sur-Alzette, Luxembourg),
 KARIN LUNDBERG (Stockholm, Sweden),
 MICHAEL MAHLER (San Diego, USA),
 PIER LUIGI MERONI (Milan, Italy),
 THALACHALLOUR MOHANAKUMAR (St. Louis, USA),
 GAVIN J. PETTIGREW (Cambridge, UK),
 INGOLF SCHIMKE (Berlin, Germany),
 YEHUDA SHOENFELD (Tel Hashomer, Israel),
 SERGEY SUCHKOV (Moscow, Russia),
 MATTHIAS G. VON HERRATH (La Jolla, USA),
 ALAN WIIK (Copenhagen, Denmark),
 PETER ZIPFEL (Jena, Germany)

CHAIRMAN:

KARSTEN CONRAD (Dresden, Germany)

CO-CHAIRMEN:

EDWARD K.L. CHAN (Gainesville, USA)

MARVIN FRITZLER (Calgary, Canada)

RENE-LOUIS HUMBEL
(Esch-sur-Alzette, Luxembourg)

PIER LUIGI MERONI (Milan, Italy)

YEHUDA SHOENFELD
(Tel-Hashomer, Israel)

**INTERNATIONAL
ADVISORY BOARD:**

LUIS E.C. ANDRADE (Sao Paulo, Brazil)

DIMITRIOS P. BOGDANOS (London, UK)

ELENA CSERNOK
(Bad Bramstedt, Germany)

FALK HIEPE (Berlin, Germany)

ARNO KROMMINGA (Hamburg, Germany)

MICHAEL MAHLER (San Diego, USA)

GÜNTER STEINER (Vienna, Austria)

ALAN WIIK (Copenhagen, Denmark)

PETER ZIPFEL (Jena, Germany)

**NATIONAL ORGANIZING
COMMITTEE :**

RICO HIEMANN

THORSTEN KRIEGER

ROBERT LANGE

ULRICH SACK

WERNER SCHÖSSLER

ORGANISATIONSBÜRO:

SILKE ZWJATKOW

GFID e.V.

Veilchenweg 28

01326 Dresden

Tel: 0351 26 32 279

Fax: 0351 26 32 280

e-mail: kontakt@gfid-ev.de

CONGRESS VENUE:

Hörsaalzentrum der Technischen

Universität Dresden

Bergstrasse 64

01069 Dresden

PROGRAMM UND ANMELDEFORMULARE:

www.gfid-ev.de

VERFASSEN:

PD Dr. med. KARSTEN CONRAD

Institut für Immunologie

Medizinische Fakultät „Carl Gustav Carus“

der Technischen Universität Dresden

Fetscherstrasse 74

01307 Dresden

Tel.: 0351 458 6540

Fax: 0351 458 6308

e-mail: k_conrad@mail.zih.tu-dresden.de

VERANSTALTUNGEN

Veranstaltungskalender

DATUM, ORT	VERANSTALTUNG
30.09.2011 Berlin	Zweiter Workshop der Sektion Endokrinologische Laboratoriumsdiagnostik der DGKL
02.10. - 06.10.2011 Stuttgart	12th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology (www.iatdmct2011.de)
12.10. - 14.10.2011 Bonn	21st Annual Conference of the German Society for Cytometry (DGfZ)
30.03. - 27.03.2011 Bonn	Titel 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ)
13.10. - 16.10.2011 München	Joint Meeting European Society for Microcirculation (ESM) and German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB)
19.10. - 23.10.2011 Nevada, USA	2011 ASCP Annual Meeting is proud to host the XXVI World Congress of the World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM)
19.10. - 22.10.2011 Las Vegas	2011 ASCP Annual Meeting/WASPaLM XXVI World Congress
19.10. - 21.10.2011 Milan	CHEM-MED 2011: The International Chemical Event
20.10. - 21.10.2011 Bad Staffelstein	Minisymposium der Arbeitsgruppe Klinische Toxikologie der DGKL: UPDATE Klinische Toxikologie 2011 - Klinik und Labor
25.10. - 28.10.2011 München	Medical Biodefense Conference
02.11. - 04.11.2011 Zürich	Annual Assembly of the Swiss Society of Clinical Chemistry & Tri-National Congress of Laboratory Medicine
03.11. - 05.11.2011 Mainz-Finthen	DELAB/DGKL-Fortbildungsreihe
04.11. - 05.11.2011 Höfgen	15. Kinderimmunologisches Arbeitstreffen
21.11. - 26.11.2011 Bremen	Repetitorium Klinische Chemie
23.11. - 24.11.2011 Mainz-Finthen	DELAB/Fachseminar Spezial Qualitätsmanagement: Arbeitsschutz im medizinischen Labor
26.11. - 27.11.2011 Bremen	Leukozytendifferenzierkurs
30.11.2011 Milano	5th International Scientific CIRME Meeting

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

Laudatio

Preis für Biochemische Analytik an Prof. Dr. Svante Pääbo

Berlin 17. Mai 2011

Meine sehr verehrten Damen, meine Herren,

„Cave of the forgotten dreams“ heißt der jüngste Dokumentarfilm von Werner Herzog über die prähistorischen Wandbilder unserer frühesten Vorfahren. Der in 3D Technik aufgenommene Film wurde vor zwei Wochen erstmals in den USA gezeigt. Nach Presseberichten hatte der Film die höchsten Besucherzahlen an einem Wochenende. Dieser große Erfolg zeigt das aktuell hohe öffentliche Interesse an der unbeantworteten Frage, woher wir kommen, von wem wir abstammen. Der außergewöhnliche Film gibt Einblick in die Chauvet Höhle in Südfrankreich. Die erst 1994 entdeckte Höhle birgt die ältesten heute bekannten bildnerischen Zeugnisse prähistorischer Menschen. Diese beeindruckenden Malereien werden auf mehr als 30 000 Jahre zurück datiert. Was wissen wir über diese prähistorischen Künstler und Menschen? Wie ist ihre Sprache, Kunst, Gesellschaft entstanden. Gibt es spezifische Gene für die menschliche Evolution, für die Unterschiede zwischen Menschen und Großaffen? Warum haben Hominiden wie der Neanderthaler nicht überlebt? Und welchen Einfluss haben Selektionsgene der Evolution auf die Empfindlichkeit für heutige Zivilisationserkrankungen?

152 Jahre nach der berühmten Schrift „On the origin of species“ von Charles Darwin“ gibt uns SVANTE PÄÄBOS wissenschaftliches Werk heute grundsätzliche Antworten zur genetischen Basis der menschlichen Evolution. Wir ehren heute seine erfolgreichen Anstrengungen neue biochemische Methoden zur Analyse auch kleinster DNA Fragmente zu entwickeln. Es ist sein großes Werk und sein Verdienst das unendliche Puzzle aus seltenen DNA Fragmenten wieder zu einem Bild des Genoms unserer Vorfahren und nächsten Verwandten rekonstruiert zu haben.

Lassen Sie mich kurz einige persönliche Anmerkungen zu dem Lebenslauf des Mediziners und Biologen Svante Pääbo geben.

SVANTE PÄÄBO wurde 1955 in Stockholm geboren. Sein Vater ist der Biochemiker SUNE BERGSTRÖM, der 1982 den Nobelpreis für Medizin für seine Arbeiten zum Arachidonsäurestoffwechsel erhielt. Zu dieser Zeit hatte SVANTE PÄÄBO gerade an der Universität Uppsala sein Medizinstudium abgeschlossen und auch seine Studien an der Faculty of Humanities beendet. Hier hatte er sich auf weitere Schwerpunkte in Wissenschaftsgeschichte, Ägyptologie und Russisch konzentriert. Seine nachfolgende PhD-Arbeit war dann

der beeindruckende Start eines einzigartigen Wettlaufs um neue Entdeckungen der Menschheitsgeschichte. Svante Pääbo war der erste Wissenschaftler überhaupt der erfolgreich die DNA aus seiner 2400 Jahre alten Mumie isolieren konnte. Diese spannende Arbeit konnte der junge PhD Student 1985 in dem Journal Nature publizieren. Dies war gleichzeitig ein wissenschaftlicher Durchbruch für das neue Feld der Paläogenetik. Nach seiner Postdoc-Zeit in London, Zürich und Berkeley erhielt PÄÄBO 1995 einen Ruf nach München und wurde dort mit 35 Jahren Lehrstuhlinhaber für Allgemeine Biologie. Und er hatte jetzt einen Masterplan für die nächsten wissenschaftlichen Herausforderungen:

1. Isolierung der DNA des Neanderthalers aus 38000 Jahre alten Fossilien, sowie die Wiederherstellung und Analytik des kompletten Neanderthalergenoms, um die Abläufe der humanen Evolution besser verstehen zu können.
2. Aufklärung der nur zu 1.2 % differierenden DNA-Sequenzunterschiede zwischen Menschen und dem Schimpanse, um im ersten Schritt funktionelle Genvarianten für die Entwicklung der menschlichen Sprache zu identifizieren.

1997 verlässt SVANTE PÄÄBO München um nach Leipzig zu wechseln. Er wird in Leipzig Direktor des neu erbauten MPI für

Evolutionäre Anthropologie (EVA). Gleichzeitig ist er Honorarprofessor an der Universität Leipzig und Gastprofessor in Uppsala. Mit einem jungen Team und neuer Spitzentechnologie nimmt er jetzt das Kopf an Kopf Rennen um das Neanderthalgenom an.

Und meine Damen und Herren, dieser „Dr Jones“ der Genetik findet dann auch den verlorenen Schatz der Menschheit.

2007 zählt das TIME Magazin SVANTE PÄÄBO zu den 100 bedeutendsten Wissenschaftlern, die die Welt verändern. In seiner Laudatio würdigt der Erstbeschreiber des humanen Genoms CRAIG VENTER seinen Leipziger Kollegen wie folgt:

“Even after 148 years, many people still argue about whether Charles Darwin's theory on human evolution is correct. Svante Pääbo has done more than argue, conducting some of the most exacting work ever attempted on the DNA of human and nonhuman primates, including his spectacular 2006 announcement that he had decoded fragments of DNA from remains of Neanderthals. In so doing, he is replacing speculation with scientific fact. “

Und SVANTE PÄÄBO legt sehr bald die harten Fakten vor. Im Februar 2009 kündigt er die erste Ausarbeitung des Neanderthalgenoms. Es ist im damals gelungen aus den Fossilien bereits 3 Milliarden Basenpaare des Neanderthalers zu sequenzieren. Diese grundlegende Arbeit entstand in enger Kooperation

mit JONATHAN ROTHBERG und dessen analytischem Durchbruch mit der „454“ DNA-Hochdurchsatzsequenzierung (New Generation Sequencing). Im Mai 2010 konnte dann Pääbo schließlich das komplette Neanderthalgenom in Science publizieren. Im Gegensatz zu bisherigen Spekulationen zeigen seine Daten mit hoher Evidenz, dass es zwischen dem Homo sapiens und dem Neanderthaler zu einem Austausch gekommen ist. Es bleibt noch offen, ob wir dies nun als gute oder schlechte Botschaft zu bewerten haben.

Am Tag vor Weihnachten 2010 überraschte SVANTE PÄÄBO dann wieder mit einer Publikation in Nature die Welt mit einem neuen Verwandten des Menschen. Er stellte die komplette DNA Sequenz aus einem kleinen Knochenstück vor, das im sibirischen Denisova in einer Höhle gefunden worden war. Das aufregende Ergebnis war nun, dass diese DNA von einer bisher nicht bekannten Gruppe von Hominiden stammt, die zur selben Zeit lebte, wie der Homo sapiens und der Neanderthaler. Eine „Mission impossible“ war erfolgreich.

Doch wodurch unterscheiden sich nun heutige Menschen von den Großweltaffen? Im August 2002 konnten SVANTE PÄÄBO und sein PhD Student WOLFGANG ENARD in Science zeigen, dass der Transkriptionsfaktor FOXP2 im Menschen und im Affen unterschiedlich ist. FOXP2 wird als „Sprachgen“ vermutet, da es bei Patienten mit einer bestimmten

Sprachstörung mutiert ist. SVANTE PÄÄBOs Gruppe vermutete nun, dass der Unterschied zwischen Mensch und Affe in diesem Gen auf dem Austausch von zwei Aminosäuren beruht, die die Sprachfähigkeit beeinflussen könnten. Sie stellten nun transgene Mäuse mit dem humanen FOXP2 Gen her. Überraschenderweise zeigten diese Mäuse eine andere Vokalisation, ein vorsichtigeres Verhalten und eine niedrigere Dopamin Freisetzung im Gehirn. Diese 2009 in Cell publizierte Arbeit hat international große Aufmerksamkeit verursacht und das Interesse der Medizin an der Evolutionsbiologie verstärkt. Sie gibt erstmals funktionelle Hinweise, dass ein Selektionsgen der Evolution wie FOXP2 für die Entwicklung der menschlichen Sprache von größter Bedeutung war. Dieser Befund hat heute für die medizinische Forschung von Sprachstörungen größte Bedeutung.

Der nachhaltige Einfluss des wissenschaftlichen Werks von SVANTE PÄÄBO auf verschiedene Disziplinen ist einzigartig.

- Sein Werk ist eine Herausforderung für die Entwicklung weiterer neuer Methoden zur Analytik auch kleinster DNA Fragmente aus fossilen Materialien.
- Sein Werk ist eine Herausforderung für die vollständige genetische Aufklärung des Ursprungs des Menschen, der Hominiden und der Großaffen.
- Sein Werk ist eine Herausforderung für eine integrierte Analyse der Genome,

Transkriptome, Metabolome und Proteome des Menschen und der Primaten, um funktionelle Gene zu identifizieren, deren Selektion für die Menschheitsgeschichte von Bedeutung sind

- Sein Werk ist eine Herausforderung für das neue Wissenschaftsfeld der evolutionären Medizin, um die Anwendung der Evolutionstheorie in die medizinische Lehre und Forschung einzubringen. Es ist eine spannende Herausforderung jetzt zu erforschen, wie die Selektionsgene der menschlichen Evolution die Krankheitsempfindlichkeit für moderne Zivilisationserkrankungen beeinflussen.

SVANTE PÄÄBOs fundamentale Erkenntnisse zur menschlichen Evolution eröffnen somit eine neue wissenschaftliche Herangehensweise komplementär zu dem bisher eher mechanistischen Verständnis der Krankheitslehre, das heute die medizinische Wissenschaft prägt.

SVANTE PÄÄBO wurde bereits mit hohen Wissenschaftspreisen ausgezeichnet. Hierzu zählen der Gottfried Wilhelm Leibniz Preis der Deutsche Forschungsgemeinschaft, der renommierte Kistler Prize and the Theodor Böhler Medal der Biochemie. Er ist Mitglied einer Vielzahl von Fachgesellschaften, unter anderem der Leopoldina und Royal Swedish Academy of Sciences.

Wir freuen uns, dass wir SVANTE PÄÄBO für sein bioanalytisch und genetisch so hochrangiges Gesamtwerk heute gemeinsam mit JONATHAN ROTHBERG durch den "Preis für Biochemische Analytik" der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie auszeichnen können. Wir ehren einen außergewöhnlich erfolgreichen und risikofreudigen Wissenschaftler, einen modernen Zeitreisenden der Evolutionsgenetik, der uns den Ursprung der Menschheit, vielleicht auch der Künstler aus der „Cave of forgotten dreams“ durch seine Wissenschaft nahebringt.

Berlin, 16. April 2011

PROF. DR. MED. JOACHIM THIERY

Vizepräsident der DGKL



Preisträger PROF. DR. SVANTE PÄÄBO

Laudatio

Biochemical Analysis Prize to Dr. Jonathan Rothberg

17 May 2011 in Berlin

Ladies and Gentleman,

it is my great pleasure to welcome you here to the award ceremony of the Biochemical Analysis Prize. Let me briefly say a few words about the prize before I come to our winners of this year.

The German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine has established the Biochemical Analysis Prize in 1970 for outstanding achievements in the area of biochemical and molecular analysis. Since then 28 scientists have received the prize, 5 of them later received the Nobel Prize, but all of them are still respected for their personal contributions to science. We are particularly thankful to Sarstedt AG who has enabled us to continue the great tradition of this prize by a generous and unrestricted grant.

We have devoted this year's prize to the analysis of the genome and picked two scientists who contributed significantly to this field, both in their own way. These are Dr. JONATHAN ROTHBERG and Dr. SVANTE PÄÄBO.

Ever since CHARLES DARWIN and GREGOR MENDEL discovered the basic principles of evolution and genetics, mankind has been attracted by the idea to resolve the secrets of the human genome. In the late 70ies

– not even 30 years after the discovery of the structure of DNA by Watson and Crick – two methods to sequence DNA were developed by MAXAM and GILBERT and by SANGER and COULSON, who were awarded the Biochemical Analysis Prize in 1980. When I was a post-doc in the early 80s, I had ample opportunity to apply both methods myself. At that time they relied on radioactive labels and cloned DNA and were quite cumbersome. But they permitted us a glimpse at individual human genes. At that time the human genome was far beyond reach. It was a glimpse through a very tiny, little keyhole. No more than 150-200 bases could be sequenced in one run, which needed days of preparation of the DNA. Nevertheless, we were absolutely excited with this progress.

Well, since thousands of scientists all over the world drilled keyholes the information about the human genome grew exponentially. It became clear that – especially with the advent of PCR – the Maxam-Gilbert method was not as powerful as the Sanger method, which was refined and automated and applied for the human genome project. But the effort to sequence one complete mammalian genome was enormous and took many years. In fact, whole consortia worked on

certain species, with certain labs contributing sequence from individual chromosomes.

It is obvious that this approach is not suited for the sequence analysis of a personal genome. And this is where the scientific development of Dr. Jonathan Rothberg comes onto stage. He has devised a methodology to sequence DNA in a highly parallel and miniaturized manner, which could never be realistically achieved by scaling up conventional sequencing. While this method may not be the final step in DNA sequencing it can be considered a quantum leap in DNA analysis, and it showed new dimensions in which sequence analysis can penetrate. Pointless to say that this technology opens up completely new perspectives for biomedical research but also for medicine, because it permits for the first time to analyse large proportions of, or complete individual genomes. While we have seen many amazing applications in research of this new generation sequencing, we are just about to get an idea what we can do with this technology in clinical diagnostics. The award jury was sure that this type of DNA sequencing revolutionized our approach to the genome and therefore will deeply influence research and patient care in the years to come.

DR. ROTHBERG, I have tried to put your fundamental contribution to the analysis of nucleic acid sequences in perspective to the scientific and medical needs. You pioneered the

development of the next generation of nucleic acid sequencing.

PROF. KARL LACKNER

Präsident der DGKL



prize winner DR. JONATHAN ROTHBERG



GESCHÄFTSSTELLE DER DGKL
FRIESDORFERSTR. 153
53175 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
----	------	-------	--------------

SLK-Kliniken

sozial | leistungsstark | kommunal

Mit unseren Kliniken in Heilbronn, Bad Friedrichshall, Möckmühl und Brackenheim reicht unsere medizinische Bandbreite von der soliden Grundversorgung bis hin zur Spitzenmedizin. Mit über 1500 Betten und rund 3500 Mitarbeitern ist die SLK-Kliniken Heilbronn GmbH einer der größten und leistungsfähigsten kommunalen Klinikverbünde in Deutschland.



Wir suchen für das Institut für Laboratoriumsmedizin am Standort Heilbronn zum 01.01.2012 eine/n

Leitende/r Oberärztin/Oberarzt Fachärztin/Facharzt für Laboratoriumsmedizin

Das Institut mit angeschlossener Blutbank, die unter eigener Oberärztlicher Leitung steht, versorgt die Krankenhäuser der SLK-Kliniken als Zentrallabor mit ca. 2,5 Millionen Laborleistungen pro Jahr aus der klinischen Chemie, Hämatologie, Hämostasiologie, Toxikologie, Endokrinologie, Mikrobiologie, Immunologie, Infektionsserologie und Immunhämatologie und führt das Blutdepot für alle Kliniken. In der Mikrobiologie einschließlich Tuberkulose (L3-Labor) wird die Lungefachklinik Löwenstein mit versorgt. Die angeschlossenen SLK-Kliniken haben Bereichsnotfalllaboratorien, deren fachliche Leitung dem Zentrallabor obliegt.

Unsere Erwartungen:

- Sie verfügen über langjährige Erfahrung im Bereich der Laboratoriumsmedizin
- Sie beteiligen sich aktiv an der weiteren Entwicklung und organisatorischen Neugestaltung des Instituts
- Sie beteiligen sich an Rufbereitschaftsdiensten des Labors
- Sie vertreten den Institutsdirektor im Fachgebiet Laboratoriumsmedizin

Wir bieten:

- Fachlich und vielseitiges Aufgabengebiet
- Eigenverantwortliche Tätigkeit mit gestalterischem Spielraum
- Leistungsgerechte Vergütung nach TV-Ärzte/VKA
- Poolbeteiligung
- Wohnmöglichkeiten und Kooperation mit Kinderbetreuungseinrichtungen

Für telefonische Auskünfte steht Ihnen der Institutsdirektor, **PD Dr. Dr. Andreas Pickert** unter Tel. 07131 49-2150 zur Verfügung.

Sind Sie interessiert an einer Tätigkeit in einem zukunftsorientierten Unternehmen? Dann richten Sie Ihre aussagefähigen Bewerbungsunterlagen bitte an:

SLK-Kliniken Heilbronn GmbH
Geschäftsbereich Personal
Herrn Martin Franke
Am Gesundbrunnen 20-26
74078 Heilbronn

www.slk-kliniken.de



Die Klinikum Bayreuth GmbH ist Träger eines Krankenhauses der Maximalversorgung und akademischen Lehrkrankenhauses mit 24 Abteilungen mit 1.048 Betten in zwei Betriebsstätten in der Festspiel- und Universitätsstadt Bayreuth. Die Stadt liegt landschaftlich reizvoll zwischen Fränkischer Schweiz und Fichtelgebirge und bietet neben einem abwechslungsreichen kulturellen Leben auch zahlreiche Möglichkeiten zur Freizeitgestaltung.

Haben wir Ihr Interesse geweckt? Dann freuen wir uns auf Ihre vollständige Bewerbung an:

Klinikum
Bayreuth GmbH
Personalabteilung
Preuschwitzer
Straße 101
95445 Bayreuth
personalabteilung@
klinikum-bayreuth.de

Im Rahmen der Erweiterung des ärztlichen Teams suchen wir für das Institut für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie (ILM) zum nächstmöglichen Zeitpunkt eine/einen

Leitende/-n Oberärztin/Oberarzt

in Vollzeit.

Das Institut für Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie (ILM) erbringt derzeit jährlich mehr als zwei Millionen Untersuchungen bei steigenden Fallzahlen. Als Zentrallaboratorium versorgt es die Kliniken der Klinikum Bayreuth GmbH mit einem breiten Methodenspektrum in der labormedizinischen Basisdiagnostik sowie in mehreren Spezialbereichen wie z. B.

- spezielle Hämatologie (inklusive Durchflußzytometrie)
- spezielle Hämostaseologie
- Autoimmundiagnostik
- spezielle Liquordiagnostik
- Transfusionsmedizin mit Blutdepot
- mikrobiologische Diagnostik (u. a. mit massenspektrometrischer Erreger-Identifizierung mittels MALDI-TOF)
- molekulare Diagnostik (u. a. PCR-basierter Erregernachweis, komplexe human-genetische Analysen wie z. B. Sentinel-Lymphknotendiagnostik bei Brustkrebspatientinnen mittels LAMP)

Eine wichtige Rolle spielt das ILM in der konsiliarärztlichen, infektiologisch-mikrobiologischen Beratung. Es führt diesbezüglich regelmäßige Visiten in besonders relevanten Abteilungen durch und ist in die Entwicklung von Leitlinien für das hausinterne *antibiotic stewardship*-Programm integriert.

Wir streben an, Leistungen ambulant im Rahmen eines medizinischen Versorgungszentrums zu erbringen.

Wir suchen eine/-n Fachärztin/-arzt als ständige/-n Vertreterin/Vertreter des Chefarztes mit einer abgeschlossenen Weiterbildung im Gebiet Laboratoriumsmedizin und/oder Mikrobiologie, Virologie und Infektionsepidemiologie. Erfahrungen und Kenntnisse im Gebiet Transfusionsmedizin sind von Vorteil. Angesprochen sind ebenso Ärztinnen und Ärzte, die in Kürze ihre Facharztweiterbildung in den vorstehenden Gebieten abschließen wollen und im Anschluss die oben genannte neue berufliche Herausforderung und Perspektive suchen. Wichtig ist uns das Interesse an einer fächerübergreifenden, integrativen Laboratoriumsdiagnostik sowie an einer Vor-Ort-Betreuung der Einsender. Die Bereitschaft, ein Institut mit mehreren Spezialbereichen in der Ausweitung und Vertiefung des Methodenspektrums zu unterstützen, setzen wir voraus.

Wir bieten

Ihnen eine interessante sowie abwechslungsreiche Tätigkeit mit einer verantwortungsvollen Aufgabenstellung. Ihre Arbeitsbedingungen richten sich nach den Bestimmungen des Tarifvertrages für die Ärztinnen und Ärzte an kommunalen Krankenhäusern (TV-Ärzte/VKA). Außerdem unterstützen wir Sie organisatorisch und finanziell bei externen Fortbildungen. Ebenso helfen wir Ihnen bei der Wohnungssuche und bieten Ihnen als Überbrückung eine kostengünstige Unterkunft in unserem Personalwohnheim an.

Für fachbezogene Auskünfte steht Ihnen Herr Chefarzt Dr. med. Sven Schimanski, unter Tel.: 0921/400-3130 oder per E-Mail: sven.schimanski@klinikum-bayreuth.de gerne zur Verfügung.

Nähere Informationen über uns erhalten Sie unter www.klinikum-bayreuth.de und über den Standort Bayreuth unter www.bayreuth.de


Klinikum Bayreuth · Klinik Hohe Warte
KLINIKUM BAYREUTH GMBH