

**4. BMFZ-Klausurtagung
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
27. - 28. August 2009**



Inhalt

Seite

1.	Programm	3
2.	Abstracts der Mitglieder	5
3.	Anfahrtsbeschreibung	38

**4. BMFZ-KLAUSURTAGUNG
KARDINAL-SCHULTE-HAUS
BERGISCH-GLADBACH
27. – 28. AUGUST 2009**

Donnerstag, 27. August 2009

14.00 h	Begrüßung	Guido Reifenberger
14.15 h - 16.30 h	Sitzung 1	Moderation: Hartmut Hengel, Dieter Willbold
	Probing into the molecular function of human cytomegalovirus-encoded Fc γ -receptors	Henrike Reinhard, Hartmut Hengel, Virologie
	Towards the gating mechanism of a CNG channel: Solution structure of the <i>M. loti</i> K1 channel cyclic nucleotide binding domain free and in complex with cAMP	Dieter Willbold, Physikalische Biologie
	Function of Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in dendritic cells	Irmgard Förster, Umweltmedizinische Forschung
	Spleißen und pathogene Spleißmutationen: In vitro und in silico Ansätze	Heiner Schaal, Virologie
	Spatio-temporal regulation of the human licensing factor Cdc6 in replication and mitosis	Christian Mielke, Friederich Boege, Klinische Chem. u. Laboratoriumsdiagn.
	Endosymbiosis and eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry	William Martin, Ökologische Pflanzenphysiologie
	Neue Möglichkeiten der RNA-Expressionsanalyse im MZL	René Deenen, Karl Köhler, Molekularbiologisches Zentrallabor
	Peptide distribution on <i>Arabidopsis thaliana</i> by Imaging MALDI-MS	Sabine Metzger, Analytisches Zentrallabor
	Unterstützung bei der Auswertung von DNA-Microarray und NextGeneration Sequencing Daten durch den Zentralbereich Bioinformatik	Wolfgang Kaisers, Martin Lercher, Bioinformatik
16.30 h – 17.00 h	Kaffeepause	
17.00 h - 19.15 h	Sitzung 2	Moderation: Guido Reifenberger, Brigitte Royer-Pokora
	BRCA and Beyond: Risikoassoziierte Gene beim hereditären Mamma- und Ovarialkarzinom	Dieter Niederacher, W. Janni, Frauenklinik
	Molekularzytogenetische Analysen zur Charakterisierung komplexer Chromosomenveränderungen bei Osteosarkomzelllinien	Birte Möhlendick, Harald Rieder, Humangenetik und Anthropologie
	Wilms Tumoren mit <i>WT1</i> - und <i>CTNNB1</i> -Mutationen haben Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen und exprimieren Gene der frühen Nierenentwicklung	Brigitte Royer-Pokora, Humangenetik und Anthropologie
	Identification and clinical validation of novel molecular markers for patients with primary brain tumors	Guido Reifenberger, Neuropathologie
	30 Jahre RAS: Rückblick und Perspektiven	Reza Ahmadian, Biochemie und Molekularbiologie II
	Orexin-Rezeptoren haben eine funktionelle Bedeutung für hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen	Ingmar Bruns, Rainer Haas, Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
	Epigenetische hotspots in Stammzellen aus Nabelschnurblut und induzierten pluripotenten Stammzellen	Simeon Santourlidis, Peter Wernet, Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ)
	Age-dependent variation in <i>EED</i> expression in human hematopoietic stem cells	Nina Graffmann, Markus Uhrberg, ITZ
19.15 h	Gemeinsames Abendessen, anschließend: individuelle Diskussionsrunden im Biergarten	

Freitag, 28. August 2009

8.00 h – 8.55 h	Gemeinsames Frühstück	
9.00 h – 11.00 h	Sitzung 3	Moderation: Kurt Gottmann, Hans Werner Müller
	Mechanisms of inflammatory neurodegeneration and disturbed regeneration	Orhan Aktas, Neurologie
	Cortical gene expression profiling in spinal cord repair: insight into the complexity of the neural regeneration program	Hans-Werner Müller, Molekulare Neurobiologie
	Untersuchungen zu pathologischen Oszillationen der Basalganglien bei Patienten mit M. Parkinson und ihrer therapeutischen Modulierbarkeit	Lars Wojtecki, Alfons Schnitzler, Neurologie
	Mechanismen der Resistenz gegen oxidativen Stress	Axel Methner, Neurologie
	The cell adhesion molecule N-cadherin regulates structure and function of central synapses	Kurt Gottmann, Neuro- und Sinnesphysiologie
	Thyrotropin-releasing hormone (TRH) causes arousal through excitation of histaminergic neurons	Helmut L. Haas, Neurophysiologie- und Sinnesphysiologie
	Screening for neuroactive Bile salts reveals significant interaction with GABA_AR	Olga Sergeeva, Neuro- und Sinnesphysiologie
	Spontaneous and evoked Calcium signalling in hippocampal astrocytes and NG2-Cells	Corinna Walz, Christine Rose, Neurobiologie
11.00 h – 11.30 h	Kaffeepause	
11.30 h – 13.30	Sitzung 4	Moderation: Judith Haendeler, Arndt Borckhardt
	Effektormoleküle der Immunabwehr von Toxoplasmen: mGBPs	Klaus Pfeffer, Med. Mikrobiologie u. Krankenhaushygiene
	Molekulargenetik und Klinik von primären Immundefekterkrankungen	Arndt Borkhardt, Kinderonkologie
	Grainyhead like 3- a central regulator of endothelial cell migration	Margarete Lukosz, Judith Haendeler, Molekulare Altersforschung, Umweltmedizinische Forschung
	Novel, cysteine independent interactions of Thioredoxin-1 – Implications for vascular aging?	Tim-Christian Zschauer, Judith Haendeler, Molekulare Altersforschung, Umweltmedizinische Forschung
	Posttranscriptional modulation of cyclooxygenase-2 expression in HaCaT keratinocytes by UVB: p38^{MAPK} and HuR as pivotal players	Niklas S. Fernau, Lars-Oliver Klotz, Umweltmedizinische Forschung
	Detection of intracellular NO production in red blood cells by flow cytometry	Miriam M. Cortese-Krott, Malte Kelm Kardiologisches Labor
	Kardiale E-Typ-Prostaglandin-Rezeptoren: antiischämische und hypertrophe Effekte	Jutta Meyer-Kirchrath, Karsten Schrör, Pharmakologie
	Creating a virtual organelle to understand metabolite fluxes within different cell types	Andrea Bräutigam, Andreas P.M. Weber, Biochemie der Pflanzen
13.30 h - 14.30 h	Gemeinsames Mittagessen	
	Ende der Klausurtagung	

2. Abstracts

AG Orhan Aktas

Mechanisms of inflammatory neurodegeneration and disturbed regeneration

Molecular Neurology Research Group, Department of Neurology

Inflammatory processes in the brain occur not only in multiple sclerosis (MS) but also in a number of other damage paradigms, such as ischemic stroke or primary neurodegenerative diseases. However, it is often neglected that inflammation in the central nervous system (CNS) does not immediately or necessarily lead to the death of nerve cells. Current research indicates that mild (i.e. sublethal), but persistent inflammatory stimuli in the brain do not affect neuronal survival, especially in early phases of the disease, but cause neuronal dysfunction and subtle neuropathological changes to dendrites or synapses, which are reversible to begin with. The molecular mechanisms responsible for these – possibly even reversible – alterations are of great clinical and neurobiological interest, and are also a major concern of our research focus.

Moreover, both primary and secondary inflammatory neurodegenerative diseases are characterized by severely limited regeneration of nerve cells and a disproportionately high occurrence of astrocytes. This so-called reactive astrogliosis is thought to be responsible for inadequate neuronal regeneration in the CNS, though it is not yet known which molecular factors contribute to this phenomenon. For this research focus, we are investigating whether a disturbed differentiation of neural stem cells, which are ubiquitously encountered in the adult CNS, leads to the quantitative preponderance of astrocytes. Our current work has revealed that even subtle changes of the redox equilibrium, which would not in themselves be toxic, considerably inhibit the proliferation of neural stem cells, and lead to a disproportionately high number astrocytes compared with neurons. This altered differentiation pattern indicate that even mild metabolic changes do in fact have a reciprocal regulatory effect on the neuronal and astroglial development of neural stem cells. Further investigations have revealed that the histone deacetylase silent information regulator 1 (Sirt1) serves as a sensor for the redox potential in neural stem cells, and directly influences their differentiation via modulation of basic helix loop helix (bHLH) transcription factors.

Finally, in the pathogenesis of MS, it is the migration of activated immune cells through the blood-brain barrier which enables subsequent immunological damage processes, and thus the migration process represents an important starting point for targeted immunomodulatory therapeutic strategies. The key issue is the question of how the migration of activated immune cells can be influenced effectively, selectively, and without serious side-effects. A potential candidate is the bradykinin receptor 1 (B1): Our in vivo studies revealed that mice lacking B1 show a significantly increased disease severity compared with wild-type controls. Histopathological analysis showed a considerable increase in inflammatory infiltration, while immunological experiments suggested a qualitatively and quantitatively unchanged autoimmune response against the myelin sheath. We also observed that, by administering B1 agonists, it was possible to influence the severity of the disease in wild-type mice in a therapeutically beneficial way. Thus, it is the goal of this research focus to investigate the actual underlying molecular processes. The bradykinin system appears to be an endogenous control cycle limiting the excessive migration of activated encephalitogenic immune cells, and as such could represent a new approach in the therapy of inflammatory diseases of the brain.

AG Reza Ahmadian**30 Jahre RAS: Rückblick und Perspektiven**

L. Gremer, I. Cirstea, R. Dvorsky und R. Ahmadian,
Biochemie und Molekularbiologie II

RAS (Rat sarcoma) ist ein Proto-Onkogen, das für ein sogenanntes kleines GDP/GTP-bindendes Protein kodiert. Es wurde erstmals 1979 vom amerikanischen Biochemiker Edward M. Scolnick als ein 21 kDa großes nukleotidbindendes, zelltransformierendes Protein beschrieben. RAS ist eine zentrale Schaltstelle verschiedener Signaltransduktionswege und ist maßgeblich an der Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu zählen insbesondere die normale und entartete Zellproliferation, die Steuerung von Apoptose, Zellinvasivität, Neoangiogenese, neuronalen Prozessen des Lernens, der Gedächtnisbildung, und der synaptischen Plastizität. Als Guaninnukleotid-bindendes Protein nimmt es die Funktion eines molekularen Schalters ein, mit dem zelluläre Prozesse an- oder abgeschaltet werden können. RAS wechselt hierbei zwischen zwei unterschiedlichen Proteinkonformationen, dem inaktiven GDP- und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand. RAS kann nur im GTP-gebundenen Zustand mit Effektoren interagieren, die dann ihrerseits die Signalweiterleitung, z. B. durch den MAPK (mitogenaktivierten Proteinkinase)-Signalweg, vermitteln. Da sowohl die intrinsische GTPase-Aktivität als auch der intrinsische GDP/GTP-Austausch grundsätzlich sehr langsame Prozesse sind, wird die Halbwertszeit des aktiven und inaktiven Zustands von RAS über Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) gesteuert.

Die Tatsache, dass in 20 bis 30 Prozent aller menschlicher Tumoren Punktmutationen im RAS-Gen gefunden werden, unterstreicht die bedeutende Funktion von RAS bei der Kontrolle des Zellwachstums. Diese Punktmutationen führen allesamt zum Verlust der GTPase-Aktivität von RAS, die durch GAPs nicht mehr hergestellt werden kann. Da der Wechsel von der GTP-gebundenen Form zur GDP-Form blockiert ist, kommt es zu einer Akkumulation von aktivem RAS und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle. Große Anstrengungen wurden unternommen, um den molekularen Mechanismus der Schalterfunktion von RAS-Proteinen zu verstehen.

Jüngste Studien haben gezeigt, dass eine Überfunktion des RAS-MAPK-Signalweges die Ursache einer Gruppe von angeborenen Erkrankungen, die sogenannten neuro-kardio-fazio-kutane (NCFC) Syndromen, führt. Diese Erkrankungen beinhalten das Noonan-, LEOPARD-, Costello-, Legius- und das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom, sowie die Neurofibromatose Typ 1.

Die medizinische Relevanz des RAS-MAPK-Signalwegs sowohl für verschiedene Tumorerkrankungen als auch die Entwicklungsstörung hat neben neuen Einsichten in diesen Signalweg auch eine Vielzahl von fundamentalen Fragen aufgeworfen, mit denen sich unsere Arbeitsgruppe befasst.

AG Fritz Boege**Spatio-temporal regulation of the human licensing factor Cdc6 in replication and mitosis**

Faiza M. Kalfalah¹, Morten O. Christensen¹, René M. Linka¹, Frank Essmann², Wilhelm G. Dirks³, Fritz Boege¹, Christian Mielke¹

¹ Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, and ² Molecular Medicine, Medical School, ³ DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig,

Before S phase, replication origins are primed by a licensing mechanism. Licensing is prevented from reoccurring during replication to ensure that each origin initiates only one round of DNA duplication. Regulation of the human licensing factor Cdc6, however, remained elusive due to seemingly contradictory findings about the involvement of stabilization, degradation and nuclear export of Cdc6. Using fluorescently tagged Cdc6 (Cdc6-YFP) expressed in living cycling cells, we demonstrate here that Cdc6-YFP is stable and chromatin-associated during mitosis and G1 phase. It undergoes rapid proteasomal degradation during S phase initiation followed by an active export to the cytosol during S and G2 phases. Biochemical fractionation abolishes this nuclear exclusion, causing aberrant chromatin association of Cdc6-YFP and, likely, endogenous Cdc6, too. In addition, we demonstrate association of Cdc6 with the mitotic spindle in late G2 and during mitosis. These results demonstrate that multiple Cdc6-regulatory mechanisms coexist in a tightly controlled cell cycle-specific manner, and they suggest a novel functional role of Cdc6 in organizing the mitotic spindle. We present a model that fits known regulatory events affecting Cdc6 into a cell cycle-dependent order.

AG Arndt Borkhardt**Molekulargenetik und Klinik von primären Immundefekterkrankungen**

Arndt Borkhardt,
Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie

Es sind gegenwärtig mehr als 150 kongenitale Erkrankungen des Immunsystems bekannt, die nach klinischen, laborchemischen, molekulargenetischen und funktionellen Gesichtspunkten charakterisiert werden können.

Man unterscheidet T- und B-Zell-Defekte, kombinierte Immundefekte, Defekte der natürlichen Killerzellen oder Granulozyten, Defekte des Komplementsystems, Syndrome mit Immundysregulation oder Immundefekte in Assoziation mit komplexen Krankheitsbildern.

Es finden sich entsprechende klinische Manifestationen wie z.B. Infektionen mit opportunistischen Erregern (Hinweis auf T-Zell-Defekte), Infektionen mit kapseltragenden Bakterien (B-Zell-Defekte), pyogene Infektionen mit Bakterien und Pilzen (Phagozytosedefekte) oder Autoimmunphänomene (Komplementdefekte). DNA-Instabilitätssyndrome, die mit einem Immundefekt einhergehen, resultieren für die betroffenen Kinder daneben oft in einem deutlich erhöhten Malignomrisiko.

In der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie sind in den letzten Jahren zahlreiche zellbiologische und molekulargenetische Verfahren etabliert worden, um primäre Immundefektsyndrome genauer zu charakterisieren.

Ein neuer T-Zelldefekt wurde kürzlich über Genkopplungsanalysen und Kandidatengensequenzierung bei zwei unserer Patienten identifiziert (Huck et al., JCI, 2009). Mutationen in der IL-2 induzierbaren T-Zell-Kinase (ITK) führen zu einer schweren Funktionsstörung der Signalübertragung nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors. Das klinische Bild bei unseren Patienten war durch eine schwere, unbehandelbare und damit letztendlich zum Tode führende EBV-assoziierte Lymphoproliferation geprägt.

In einem umfangreichen ITK-Mutationsscreening (Linka et al., Manuskript in Vorbereitung) wurden weitere Patienten mit ähnlichem klinischen Phänotyp und homozygoter ITK Mutation an anderen Behandlungszentren identifiziert.

In einem vom BMBF finanzierten Verbundprojekt (PID-NET) wird deswegen gemeinsam mit Kinderkliniken in Freiburg, Hannover, Dresden und Ulm der Stellenwert der neuen DNA-Sequenziertechnologien bei der raschen und sicheren molekulargenetischen Diagnostik primärer Immundefekte evaluiert. An unserer Klinik sollen alle derzeit bekannten ca. 150 Immundefekt-Gene nach Hybridisierung eines „sequence capture arrays“ parallel mit der Pyrosequenziertechnologie auf Mutationen hin untersucht werden.

AG Irmgard Förster**Function of Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in dendritic cells**

Theresa Köhler^a, Randall S. Johnson^b, Heike Weighardt^a and Irmgard Förster^a,

^aInstitut für umweltmedizinische Forschung (IUF) and ^b University of California, San Diego, USA

Tissue inflammation is a hallmark of microbial infections and is characterized by a local reduction in oxygen levels due to enhanced cellular infiltration and vascular obstruction. The transcription factor Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α mediates essential changes in gene expression, like the metabolic switch to the glycolytic pathway or induction of angiogenesis, to permit cellular adaptation to reduced oxygen supply. In addition, HIF-1 α has direct anti-microbial functions, leading to the production of defensins, proteases and nitric oxide (NO). Previously, we showed that HIF-1 α is essential for the inflammatory and anti-bactericidal function of macrophages. Since dendritic cells (DC) are the main antigen presenting cells in inflammation, we now also investigate the function of HIF-1 α in DC.

Therefore, we have generated two mutant mouse lines with efficient cell-type specific ablation of HIF-1 α in DC, using either CD11cCre or CCL17Cre mice. While CD11c is expressed on all DC, CCL17⁺ DC belong to the CD11b⁺CD8⁻ DC subset and are of importance for the induction of local immune responses in barrier organs. We first studied the influence of HIF-1 α and hypoxia on the differentiation of DC from bone marrow precursors *in vitro*. Analysis of DC differentiation under hypoxic conditions revealed reduced growth and increased maturation of DC, marked by enhanced expression of MHC class II. DC generated in hypoxia failed to further upregulate expression of MHC class II after stimulation with LPS. In line with that, DC differentiated in hypoxia showed a higher capability to induce proliferation of allogenic T cells in mixed lymphocyte reaction compared to DC differentiated in normoxia. Thus, hypoxic conditions may enhance maturation of DC in the absence of microbial stimuli. Additionally, cytokines were measured in DC culture supernatants revealing reduced secretion of IL-12p70 under hypoxic conditions. Furthermore, hypoxia-induced upregulation of CD73 and chemokine receptors CXCR4 and CCR7 were found to be HIF-1 α -dependent in DC.

To analyse the function of HIF-1 α in the migration of skin-derived DC *in vivo*, FITC was applied topically and migration of DC to the draining lymph nodes was measured. HIF-1 α -deficient DC did not differ from DC of wildtype mice in their migratory capability. In future, we intend to explore the role of HIF-1 α in DC in antimicrobial defense as well as in allergic reactions.

AG Kurt Gottmann**Role of N-cadherin in presynaptic function and organization**

Kurt Gottmann,
Neuro- und Sinnesphysiologie

Synaptic cell adhesion molecules are thought to be key players in transsynaptic signaling that control synapse formation and regulate synaptic function. Recently, their role in synapse elimination in development and disease has become a major focus of research. This is based on the hypothesis that developmental elimination mechanisms may be re-activated in the diseased brain.

We are focussing on N-cadherin, a member of the cadherin superfamily of adhesion molecules, which is strongly expressed in several brain regions. Classical cadherins, such as N-cadherin, interact homophilically via their cadherin domains across the synaptic cleft thus mediating transsynaptic signals.

Using ES cell derived neurons, we are studying the effects of the genetic knock-out of N-cadherin on synapse formation by imaging fluorescent synaptic proteins. We found that N-cadherin plays an important role in the control of presynaptic vesicle accumulation. Regarding the molecular mechanism, N-cadherin appears to recruit another adhesion system, the neuroligin/neurexin system, to nascent synaptic sites and postsynaptic neuroligin then induces the presynaptic clustering of vesicles.

N-cadherin also plays a major role in modulating the presynaptic vesicle cycle at mature, fully functional synapses. Electrophysiological patch-clamp studies demonstrated a role in the transsynaptic regulation of vesicle recruitment to the active zone, which is important in maintaining a releaseable vesicle pool during strong synaptic activity. In addition, N-cadherin might be involved in controlling endocytosis of synaptic vesicles as indicated by cellular imaging studies using FM dyes and quantum dots.

Our future aims for 2009/2010 include analysis of the role of N-cadherin in synapse elimination processes during development and disease. We have already started a study on the role of N-cadherin in the molecular mechanisms of synaptotoxicity induced by β -amyloid to learn more about the molecular pathogenesis of Alzheimers disease.

Publikationen 2007/08:

K. Gottmann (2008). Transsynaptic modulation of the synaptic vesicle cycle by cell adhesion molecules. *J. Neurosci. Res.*, 86: 223-232.

Cooperations: PD Dr. Carsten Korth: Synaptotoxicity of β -amyloid

AG Helmut Haas**Thyrotropin-releasing hormone (TRH) causes arousal through excitation of histaminergic neurons**

Helmut L. Haas, Regis Parmentier*, Sergej Kolbaev, Boris Klyuch, David Vandael, Oliver Selbach, Jian-Sheng Lin* and Olga A. Sergeeva,
Neurophysiology, *INSERM-U628, Physiologie intégrée du système d'éveil, 69373 Lyon, France

The firing of histaminergic tuberomamillary nucleus (TMN) neurons controls arousal and attention, being active during waking, silent during sleep. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) promotes arousal and combats sleepiness associated with narcolepsy. Single-cell RT-PCR (scRT-PCR) demonstrated variable expression of the two known TRH receptors in the majority of TMN neurons. TRH increased the firing rate of most TMN neurons. This excitation was abolished by the TRH receptor antagonist chlordiazepoxide. TRH depolarized TMN neurons directly without changing their input resistance. This effect reversed at the potential typical for nonselective cation channels. The potassium channel blockers barium and cesium did not influence the TRH-induced depolarization but TRH effects were antagonized by inhibitors of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, KB-R7943 and benzamil. The frequency of GABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents was either increased (TTX-insensitive) or decreased (TTX-sensitive sIPSCs) by TRH, indicating a heterogeneous modulation of GABAergic inputs by TRH. Facilitation but not depression of sIPSC frequency by TRH was missing in the presence of the kappa-opioid receptor antagonist *nor*-binaltorphimine. Montirelin, a TRH analogue, induced waking in wild type mice but not in histidine decarboxylase knockout mice lacking histamine. Inhibition of histamine synthesis by (S)- α -fluoromethylhistidine also blocked the arousal effect of montirelin in WT mice. Thus direct receptor-mediated excitation of rodent TMN neurons by TRH demands activation of nonselective cation channels as well as electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. Our findings indicate a key role of the brain histamine system in TRH-induced arousal.

AG Rainer Haas**Orexin-Rezeptoren haben eine funktionelle Bedeutung für hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen**

Ingmar Bruns, Ron-Patrick Cadeddu, Rainer Haas,
Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Orexin-Rezeptoren spielen eine Rolle in der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme und der Energiehomöostase. Es wurde lange angenommen, dass ihre Expression auf das zentrale Nervensystem beschränkt ist. In den vergangenen Jahren wurden die Rezeptoren aber in einer ganzen Reihe von Geweben nachgewiesen. Wir hatten in früheren Untersuchungen die Orexin-Rezeptoren 1 und 2 auch auf blutbildenden Stamm- und Vorläuferzellen entdeckt. Ziel dieser Studie war, die Funktion der Orexin-Rezeptoren 1 und 2 in CD34+ hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen und die Signalwege über die funktionellen Effekte vermittelt werden zu untersuchen. Die Signalübermittlung des Orexinsystems erfolgte in den bisher untersuchten Geweben vor allem über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und Beeinflussung der cAMP-Konzentration sowie Aktivierung von „Mitogenaktivierten Protein Kinasen“ (MAPK)-Signalwegen. In hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen führte die Rezeptorstimulation zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Interessanterweise hemmte die Vorbehandlung mit Orexinen dagegen den SDF-1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom. Die intrazelluläre cAMP-Menge wurde durch die Rezeptorstimulation reduziert.

Zur Prüfung der funktionellen Bedeutung des Orexinsystems für blutbildende Stamm- und Vorläuferzellen führten wir klonogene Wachstumstests und Langzeitkulturexperimente, Zellzyklus- und Zelltodanalysen, Zelladhäsions- und Wanderungs-Tests durch. Es zeigte sich, dass Stimulation der Orexin-Rezeptoren mit Orexin A und B zu einem vermehrten Wachstum früher, pluripotenter Kolonien und zu einer Verminderung differenzierter Kolonien führt. Langzeitkulturexperimente zeigen dazu, dass die Selbsterneuerungsrate früher Stammzellen durch die Stimulation der Orexin-Rezeptoren erhöht wird, d.h. es ist ein höherer Anteil von Stammzellen vorhanden, die Ursprung für alle blutbildenden Zellen sein können. Nach Orexin-Rezeptor-Stimulation befindet sich ein größerer Anteil der Stamm- und Progenitorzellen, wie auch der frühen undifferenzierten Stammzellen, in einer inaktiven Zellzyklusphase. Zudem reduzieren die Orexin-Gaben den Anteil apoptotischer Zellen an den gesamten Stamm- und Vorläuferzellen wie auch an den frühen Stammzellen. Die Behandlung mit Orexinen führt zu einer verringerten Zellwanderung der Stamm- und Progenitorzellen in Richtung des Lockstoffes SDF-1 β . Dieses Phänomen ist allerdings nur bei den aus Knochenmark isolierten Stamm- und Progenitorzellen zu beobachten, mit dem Zytokin G-CSF mobilisierte Zellen, die aus Apheresaten gewonnen wurden, lassen keinen Einfluss der Orexin-Rezeptor-Stimulation auf die Zellwanderung erkennen. In engem Zusammenhang mit der Zellwanderung steht die Fähigkeit zur Adhäsion, d.h. der Anhaftung an Oberflächen wie Collagen und Fibrinogen. Hier zeigte sich nach Orexin-Rezeptor-Stimulation eine signifikante Verminderung der Stamm- und Progenitorzelladhäsion an Collagen und Fibrinogen. In Anbetracht der funktionellen Effekte des Orexinsystems auf Stamm- und Progenitorzellen stellte sich die Frage nach dem Produktionsort der Orexine. Untersuchungen von Knochenmarkschnitten zeigten die Orexinvorstufe Prepro-Orexin in CD34+ Zellen. Dies wurde anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen und Western Blots verifiziert. Neben dieser autokrinen Produktion wiesen wir in Serumproben aus dem Knochenmark gesunder Spender Orexin nach. In der Zusammenschau zeigen die Ergebnisse eine Bedeutung des Orexinsystems für hämatopoietische Stamm- und Vorläuferzellen. Der funktionelle Phänotyp der Orexin-stimulierten Zellen deutet auf einen Mobilisationseffekt der Orexin-Rezeptorstimulation sowie eine erhöhte Repopulationskapazität, d.h. die Fähigkeit der frühen Stammzellen nach Transplantation die gesamte Blutbildung zu regenerieren, hin. Dies sollte in vivo in Mausmodellen verifiziert werden. Ggf. bestünde eine klinische Anwendbarkeit von Orexin-Agonisten für die Stammzellmobilisation und –transplantation.

AG Judith Haendeler**1. Grainyhead like 3- a central regulator of endothelial cell migration**

Margarete Lukosz, Joachim Altschmied, Jean Krutmann, Judith Haendeler,
Molecular Aging Research, Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)

Aging is one major independent risk factor of cardiovascular diseases (CAD). Concomitantly with aging, the migratory capacity of endothelial cells (EC) is decreased. The phenotype of grainyhead like 3 (GRHL3) knock out mice suggests defects in cell migration, but the perinatal lethality precludes the analysis of effects in adult organs. To analyze whether GRHL3 plays a role in EC migration we overexpressed it and observed an induction of migration to a similar degree as upon treatment with vascular endothelial growth factor (VEGF). To get insights in the underlying mechanisms, we analyzed a known VEGF-induced migration activator, endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Phosphorylation of eNOS on S1179 was increased upon overexpression of GRHL3. Interestingly, incubation with the NO donor papanoate dramatically increased GRHL3 mRNA levels (papanoate: 3.75-fold +/- 1.34 of control) indicating a positive feedback loop. To investigate, if GRHL3 is essential for EC migration we made use of a shRNA against GRHL3. Ablation of GRHL3 decreased basal and NO-induced EC migration (scr: 73+/- 16; shGRHL3: 26+/-12; scr+NO: 149+/-19; shGRHL3+NO: 36+/-10). Decreased migratory capacity of senescent EC is paralleled by an increase in Src kinase activity. To evaluate if Src kinases have an influence on GRHL3, we treated ECs with the Src kinase family inhibitor PP2. Indeed, expression of GRHL3 was dramatically increased by PP2 (PP2: 4.50-fold +/- 1.72 of control). In humans GRHL3 exists in three isoforms (GRHL3-1, -2 and -3). In contrast to GRHL3-1 and -2, overexpression of isoform 3, which lacks the transactivation domain, suppressed cell migration and eNOS phosphorylation, indicating that these effects require the activation of GRHL3 target genes. To gain further insights into the functions of this isoform in vivo, we overexpressed it in zebrafish embryos. Injection of GRHL3-3 RNA led to severe deformations during zebrafish development, suggesting that GRHL3-3 might act in a dominant negative manner. In conclusion, GRHL3 is an important and essential inducer of EC migration. Endogenous GRHL3 expression is positively regulated through NO and negatively by the Src kinase family. In addition, one isoform seems to be dominant-negative, which might have important implications in the regulation of GRHL3 target genes.

2. Novel, cysteine independent interactions of Thioredoxin-1 – Implications for vascular aging?

Tim-Christian Zschauer, Joachim Altschmied, Judith Haendeler, Molekulare Alternsforschung,
IUF

Aging processes are associated with increased intracellular formation of reactive oxygen species. One redox regulator is the oxidoreductase thioredoxin-1 (Trx). It is ubiquitously expressed and contains two active site cysteines 32 and 35. It has antioxidative and anti-apoptotic properties. Nuclear Trx modulates the function of several transcription factors. Interestingly, several functions of Trx are aggravated by its interaction with AP-endonuclease 1 (APEX1). APEX1 is a multifunctional 36kDa protein and has a central role in base excision repair. It has been shown that isolated APEX1 is a reductive activator of the transcription factor AP-1 (c-Fos/c-Jun heterodimer) and that an association between Trx and APEX1 is a prerequisite, suggesting formation of a ternary complex between Trx, APEX1 and AP-1 in vivo. Given the fact that Trx levels are dramatically reduced in senescent endothelial cells and APEX1 is suggested to play an important role in the development of age-dependent disorders, the aim of this study was to understand the yet unknown molecular basis for the ternary complex formation in endothelial cells. Using

fluorescence microscopy, we first demonstrated that endogenous Trx and APEX1 colocalized in endothelial cells. The association of Trx and APEX1 was confirmed in the cytosol and nucleus by performing coimmunoprecipitation experiments. To determine whether disulfide bridges are involved in the Trx/APEX1 association, we mutated APEX1 cysteines 65, 93 and 310 (APEX1(C65S/C93S/C310S), previously shown to interact with cysteines in other proteins, to serines. This mutant bound endogenous Trx with the same efficiency as APEX1 wildtype in endothelial cells. Moreover, a Trx mutant, in which the active site cysteines are mutated to serines (Trx(C32S/C35S)) was still able to bind to endogenous APEX1. These data demonstrate that the Trx/APEX-1 interaction is independent of disulfide bridge formation. Exact delineation of the Trx/APEX1 interaction surface will in the future allow the development of small peptides containing the interaction domains of Trx or APEX1 respectively, in order to enhance transcription factor activity and bypass the loss of antioxidative capacity during aging processes.

AG Hartmut Hengel**Probing into the molecular function of human cytomegalovirus-encoded Fc γ -receptors**

Henrike Reinhard¹, Eugenia Corrales-Aguilar¹, Elisabeth R. Sprague², Ofer Mandelboim³, Pamela J. Bjorkman² and Hartmut Hengel¹

¹Virology, ²Caltech, Pasadena, USA, ³Lautenberg Center, Jerusalem, Israel

Surface receptors recognizing the Fc domain of IgG (Fc γ Rs), i.e. CD16, CD32 and CD64 represent a family of host receptors connecting humoral and cellular immune responses. We have identified two human cytomegalovirus (HCMV)-encoded transmembrane glycoproteins with Fc-binding properties (vFc γ Rs), gp34 and gp68, on the surface of infected cells and on the HCMV particle. To elucidate their potential interference with distinct IgG-mediated effector functions, neutralization and complement-mediated virolysis assays were performed. Both receptors failed to protect HCMV virions from immune IgG. However, when taking advantage of a novel established Fc γ R activation assay, gp34 as well as gp68 were demonstrated to inhibit IgG-mediated effector functions of host Fc γ Rs with high efficacy.

Remarkably, the Fc γ recognition by gp34 and gp68 occurred independently of N-linked glycosylation of Fc γ , contrasting sharply from host Fc γ Rs. To get further insight into the interaction with Fc γ , truncations of gp68 and gp34 were constructed and probed for Fc γ binding. Amino acids 68 to 289 of gp68 including a putative Ig-like domain are strictly required for Fc γ binding whereas aa 24 to 140 of gp34 are sufficient. Gel filtration and biosensor studies revealed that gp68 binds unlike host Fc γ Rs but similar to the Herpes simplex virus 1 heterodimeric Fc γ R gE-gI at the CH₂-CH₃ interface of the Fc γ dimer at nanomolar concentrations. Unlike the gE-gI/Fc γ complex, the affinity of gp68/Fc γ is pH independent (5.6 to 8.1). Thus, the mechanistic details of Fc γ -binding by gp68 differ from host Fc γ Rs as well as gE-gI suggesting a unique molecular function. In conclusion, our data uncover herpesviral Fc γ Rs as potent rivals of host Fc γ Rs forming alternative Fc γ R structures which are instrumental to uncover the molecular interactions of immune IgG with host Fc γ Rs.

AG Malte Kelm**Detection of intracellular NO production in red blood cells by flow cytometry.**

P. Horn, T. Römer, S. Sivarajah, M. Grau, S. Zander, M. W. Merx, M. Kelm and Miriam M. Cortese-Krott.

Kardiologisches Labor

It has been recently shown that red blood cells (RBC) express a functional nitric oxidesynthase (NOS). The pathophysiological role of nitric oxide produced within the erythrocytes and its clinical relevance has not been fully elucidated so far. Main issues are the relative instability of NO, the presence of different enzymatic and non-enzymatic sources of NO within the vasculature and the low throughput characters of methods used to measure intracellular radical production (e.g. amperometric analysis). We established a new method for measuring the intracellular production of NO, which combine the sensitivity of the cell permeable fluorophore 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM diacetate) with the high throughput character of flow cytometry. The RBC isolated from blood of healthy donors was loaded with DAF-FM diacetate and the fluorescence was recorded within the RBC gate in a flow cytometer. RBC stained with DAF-FM resulted strongly fluorescent, as compared to unstained cells. By using fluorescence microscopy we found that the signal corresponding to DAF-FM was localised within the membrane of RBC. The addition of the NOS inhibitor L-NIO significantly decreased the DAF-FM signal, demonstrating that the signal derived from enzymatic NO production by NOS. Addition of nitrite or nitrate did not exert any effect, showing the specificity DAF-FM of for NO. To verify whether the DAF signal was also dependent on the bioavailability of the NOS substrate L-Arginin (L-Arg), we inhibited the L-Arg import into the RBC by adding high concentrations of L-Ornithin and L-Citrullin. We found that decreasing L-Arg bioavailability strongly decreased the DAF signal. To further demonstrate that the DAF-FM signal was dependent of NOS expression within erythrocytes we stained RBC obtained from chimera mice lacking eNOS expression in blood cells, obtained by transplanting the bone marrow of eNOS $-/-$ mice in wild type mice C57 BL/6. A strong decrease in DAF-FM fluorescence was observed as compared to control mice.

In summary these results show that intracellular NO production in RBC can be measured in high throughput by using flow cytometry and under the conditions used in our study depends on the expression and activity of a nitric oxide synthase expressed in RBC. The simultaneous determination of NO species in plasma and in RBC may contribute to define the pathophysiological role and clinical relevance of NOS-derived NO within the RBC.

AG Lars-Oliver Klotz**Posttranscriptional modulation of cyclooxygenase-2 expression in HaCaT keratinocytes by UVB: p38^{MAPK} and HuR as pivotal players**

Niklas S. Fernau, Dominik Fugmann, Susanne Grether-Beck, Jean Krutmann, Lars-Oliver Klotz, IUF

Cyclooxygenase-2 (COX-2) catalyzes the rate-limiting step in prostaglandin biosynthesis and thus plays a crucial role in inflammatory processes. Ultraviolet (UV) radiation is known to stimulate COX-2 expression in skin cells. There are several lines of evidence linking COX-2 and prostaglandin E₂ (PGE₂) to the development of UV-induced skin cancer, e.g. COX-2 and PGE₂ levels being elevated in skin cancer versus normal tissue. As demonstrated here by RT-PCR and Western blotting an induction of COX-2 expression in HaCaT human keratinocytes takes place only upon exposure of cells to UVB (280-320 nm) but not to UVA (320-400 nm) radiation. After exposure to UVB, PGE₂ levels were enhanced in HaCaT cell culture supernatants. Moreover, UVB irradiation caused a dramatic increase of COX-2 mRNA stability. UVB strongly activates the MAP kinase p38, and by inhibition of this kinase both the elevation of COX-2 mRNA and protein levels as well as the stabilization of COX-2 mRNA found upon exposure to UVB were prevented. Furthermore, COX-2 induction was moderated by protein kinase C inhibitors. UVB induction of COX-2 was drastically decreased by siRNA-based depletion of a stress-responsive mRNA-stabilizing protein regulated by p38^{MAPK} and PKC isoforms, namely of HuR. Increase of COX-2 expression by UVB coincided with an accumulation of HuR in the cytoplasm. UVB-induced COX-2 expression as well as generation of PGE₂ was suppressed in cells depleted of HuR. These data suggest stress kinases like p38^{MAPK} and PKC as well as the RNA-binding HuR as mediators of COX-2 expression and therefore represent very potential targets for interference with induction of COX-2 expression by UVB.

AG Karl Köhrer

Aufgaben und Leistungen des Molekularbiologischen Zentrallabors

Karl Köhrer,
Molekularbiologisches Zentrallabor (MZL) des BMFZ

Die Aufgabe und das Ziel der Zentrallaboratorien (ZL) sind es, die im BMFZ organisierten Arbeitsgruppen bei bioanalytischen Fragestellungen zu unterstützen. Zu diesem Zweck bearbeiten die Zentrallaboratorien eigene Forschungsprojekte und etablieren neue, moderne, bioanalytische Verfahren, um als kompetenter Ansprechpartner mit interessierten Arbeitsgruppen an der Universität zu kooperieren. Durch den Einsatz der im BMFZ verfügbaren Großgeräte und der in den ZL angesammelten methodischen Expertise wird die Bearbeitung bioanalytischer Fragestellungen mit modernen Technologien ermöglicht und effizient gestaltet.

Der Schwerpunkt der Arbeiten im Molekularbiologischen Zentrallabor (MZL) liegt in der Nukleinsäureanalytik. In diesem Bereich wurde eine Reihe von wichtigen Standard- und Spezialverfahren zur Isolierung, Aufreinigung, Quantifizierung und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren etabliert. Die dafür benötigten Geräte (Pipettierroboter, spezielle Photometer, Fluorometer) werden interessierten Arbeitsgruppen bei Bedarf zur Verfügung gestellt. DNA-Sequenzierungen, DNA-Fragmentanalysen und RNA-BioAnalyzer Untersuchungen können im MZL in Auftrag gegeben werden. Ein gleichbleibend hoher Qualitätsstandard der Analysen wird durch entsprechende Qualifizierungs- und Qualitätssicherungsmaßnahmen gewährleistet.

Neben der DNA-Sequenzierung konzentrieren sich unsere Arbeiten auf den Bereich der Genexpressionsanalyse. Seit acht Jahren betreiben wir hierzu ein DNA-Microarraylabor, in dem sämtliche Geräte zur Herstellung und Auswertung von DNA-Microarrays bereit stehen und in routinemäßigem Betrieb sind (Genetix QArray2 Mikro-Array-Spotter, Tecan HS400Pro Hybridisier- und Waschstation, Fuji FLA 8000 und GenePix 4000B Fluoreszenz-Reader, Microarray-spezifische Softwarepakete). Die für Genexpressionsanalysen vorgesehenen RNA-Proben werden mit einem Nanodrop® ND-1000 Spektralphotometer und einem Agilent BioAnalyzer 2100 quantitativ und qualitativ überprüft. Nur 500 pg an Gesamt-RNA werden hierfür in einem Mikroliter Probenvolumen benötigt. Neben den sehr kostengünstigen, selbst hergestellten Arrays bearbeiten wir auch kommerzielle DNA-Arrays (z.B. Agilent Microarrays und Affymetrix GeneChips). Mit diesen kommerziellen Plattformen sind wir auch in der Lage, miRNA-Profile zu generieren. Die statistische und bioinformatische Aufarbeitung der Arraydaten führen wir im Rahmen von Kooperationsprojekten zusammen mit den beteiligten Arbeitsgruppen durch.

Unter anderem zur Verifizierung von Microarray-Ergebnissen betreiben wir im MZL mehrere Real-Time PCR-Systeme (ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System, ABI Prism 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System), die auch interessierten Nutzern zur Verfügung stehen.

Inwiefern die DNA-Hochdurchsatz-Sequenzierung („Next Generation RNA-Sequencing“) eine sinnvolle Ergänzung zur herkömmlichen DNA-Microarray Technologie darstellt, haben wir in den vergangenen Monaten intensiv untersucht. Durch den Zugang zu der 454/FLX-Technologie an der Kinderklinik (Prof. Borkhardt) war es möglich, von unterschiedlichen Maisspezies exemplarisch Genexpressionsprofile zu erzeugen und bioinformatisch aufzuarbeiten. Die Erfahrungen, die wir dabei gemacht haben, bestätigen unsere Erwartungen und es ist klar, dass die „Next Generation RNA-Sequencing“-Methode eine wichtige Ergänzung zu der herkömmlichen DNA-Microarray Technologie darstellt. Zur quantitativen Erfassung der Transkriptdaten benötigt man allerdings eine sehr hohe Datendichte, die zur Zeit nur von zwei „Short-Read“ DNA-Sequenzierungsgeräten (Solexa/Illumina und SOLID/Applied Biosystems) generiert werden können.

Neben den bisher genannten nukleinsäureanalytischen Arbeiten führen wir auch eigene drittmittelgeförderte Forschungsprojekte durch (TP Z01 in der Klinischen Forschergruppe

217, TP Z1 im SFB 590; www.uni-duesseldorf.de/sfb575/ und TP Z1 im SFB 612; www.uni-duesseldorf.de/MedFak/sfb612/)

Mitarbeiter: Dr. Sibylle Scheuring, Dr. René Deenen, Sibylle Müller (BTA), Beate Weller (BTA), Jasmin Anaç (BTA).

AG Martin Lercher**Unterstützung bei der Auswertung von DNA-Microarray und NextGeneration Sequencing Daten durch den Zentralbereich Bioinformatik.**

Wolfgang Kaisers¹, Martin Lercher²,
¹Zentralbereich Bioinformatik (BMFZ), ²Bioinformatik

DNA-Microarray und NextGeneration Sequencing Verfahren werden aufgrund fallender Kosten und steigender Analysekapazität zunehmend zu Standardverfahren der Molekularbiologie. Mit der zunehmenden Informationsmenge aus Einzelanalysen und ubiquitär zugänglichen Datenbanken wächst auch die Komplexität der Auswerteverfahren.

Bei der Analyse von DNA-Microarray Daten werden standardmäßig numerische Verfahren zur Qualitätskontrolle, Korrektur von Hintergrundsignalen, Normalisierung und logarithmische Transformationen durchgeführt. Zur Erkennung differenzieller Expression der bis zu 50.000 gleichzeitig untersuchten Gene werden verschiedene Filterverfahren, meist basierend auf statistischen Tests, eingesetzt. Komplexe Annotationsdaten bringen die gefilterten Gene schließlich in einen funktionellen Zusammenhang.

NextGeneration Sequencing Analysen sind durch wesentlich größere Datenmengen und weniger standardisierten Auswerteverfahren gekennzeichnet.

Das BMFZ hat mit dem Zentralbereich Bioinformatik nun eine Instanz eingerichtet, die den Einsatz analytischer Techniken aus der Bioinformatik über den Bereich der Standardverfahren hinaus ermöglichen soll. Dies erfolgt in enger Zusammenarbeit mit den molekularbiologischen Zentrallabors des BMFZ und soll deren Analysemöglichkeiten unterstützen und erweitern.

Für Anfragen stehen wir jederzeit gerne zur Verfügung.

Dr. W. Kaisers	Tel. 11914	wolfgang.kaisers@uni-duesseldorf.de
Prof. M. Lercher	Tel. 12163	lercher@cs.uni-duesseldorf.de

AG William Martin**Endosymbiosis and eukaryotic anaerobes in light of Proterozoic ocean chemistry**

William Martin, Botanik III

Recent years have witnessed major upheavals in views about early eukaryotic evolution. One very significant finding was that mitochondria, including hydrogenosomes (anaerobic forms of mitochondria) and the newly discovered mitosomes, are just as ubiquitous and defining among eukaryotes as the nucleus itself. Mainstream formulations of endosymbiotic theory did not predict the ubiquity of mitochondria among anaerobic eukaryotes, while an alternative hypothesis that specifically addressed the evolutionary origin of energy metabolism among eukaryotic anaerobes did. Those developments in biology have been paralleled by a similar upheaval in the Earth sciences involving the new model of Proterozoic ocean chemistry, which indicates that the oceans were anoxic and sulfidic from about 1.8 to 0.58 billion years ago, due to the weathering of continental sulfides by atmospheric oxygen to sulfate, which fueled marine sulfate reducers (anaerobic, hydrogen sulfide-producing prokaryotes) on a global scale. These two developments in biology and geology are mutually compatible and underscore the evolutionary significance of oxygen-independent ATP-generating pathways in mitochondria as a watermark of the environments within which eukaryotes arose and diversified into their major lineages.

AG Axel Methner**Mechanismen der Resistenz gegen oxidativen Stress**

Axel Methner, Neurologie

Extrazelluläres Glutamat kann neben Exzitotoxizität auch über den langsameren Prozess der oxidativen Glutamatoxizität neurotoxisch wirken. Hier blockiert extrazelluläres Glutamat die Aufnahme der Aminosäure Zystin durch das Glutamat-Zystin-Antiporter System X_c^- . Zystin wird zur Synthese des wichtigen intrazellulären Antioxidans Glutathion benötigt. Daher erniedrigt die Hemmung der Zystinaufnahme die intrazelluläre Glutathion-Konzentration und führt zu Zelltod durch oxidativen Stress. Wir konnten zeigen, dass Resistenz gegen oxidative Glutamatoxizität mit einer Hochregulation der spezifischen X_c^- Einheit xCT einhergeht. xCT arbeitet hierbei mit den Glutamateinwärtstransportern EAAT zusammen, indem es die Cystinaufnahme und somit den Glutathiongehalt durch einen vermehrten Glutamat-Turnover erhöht (Lewerenz et al., 2006). Das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon schützt ebenfalls vor oxidativer Glutamatoxizität. Dieser Schutz beruht auf einer Erhöhung des Glutathiongehalts durch eine Induktion des antioxidativ wirksamen Transkriptionsfaktors Nrf2 und vermehrte Expression und Funktion von xCT (Lewerenz et al., 2009). Durch mRNA Subtraktion glutamatresistenter und –empfindlicher Zellen identifizierten wir weiterhin ein 3405 Aminosäuren langes Protein mit einer Superoxid-Dismutase-Domäne das wir TIGR (transcript increased in glutamate resistance) nannten. Überexpression von TIGR schützt vor oxidativer Glutamatoxizität und erhöht die SOD-Aktivität. TIGR ist, wie die Katalase, die das durch SOD generierte H_2O_2 zu H_2O katalysiert, in Peroxisomen lokalisiert. Die Mutagenese zweier konservierter und in der Kupfer/Zink-Bindung wichtigen Histidine führt zu einem Funktionsverlust (Toutzaris et al., 2009). GPR39 ist ein ebenfalls in glutamatresistenten Zellen hochregulierter Waisen-Rezeptor, dessen Überexpression vor einer Vielzahl von zelltodauslösenden Stimuli schützt. Wir konnten zeigen, dass GPR39 an $G_{\alpha 13}$ koppelt und RhoA und *Serum response element* vermittelte Signalwege induziert (Dittmer et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses Modellsystem aufgrund seiner Reproduzierbarkeit und Einfachheit in der Lage ist Proteine und Signalwege zu identifizieren, die eine Rolle in der Resistenz gegen oxidativen Stress spielen.

Zitate

Dittmer, S., Sahin, M., Pantlen, A., Saxena, A., Toutzaris, D., Pina, A.-L., Geerts, A., Golz, S., and Methner, A. (2008). The constitutively active orphan G-protein coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment-epithelial derived growth factor PEDF. *J Biol Chem* 283, 7074-7081.

Lewerenz, J., Albrecht, P., Tran Tien, M.-L., Maher, P., Karumbayaram, S., Kornblum, H., Wiedau-Pazos, M., Schubert, D., and Methner, A. (2009). Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *J Neurochem in press*.

Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006). Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system X protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem* 98, 916-925.

Toutzaris, D., Lewerenz, J., Jensen, L. T., Letz, J., and Methner, A. (2009). A novel giant peroxisomal superoxid dismutase motif-containing protein *Free Radic Biol Med submitted*.

AG Sabine Metzger**Peptide distribution on *Arabidopsis thaliana* by Imaging MALDI-MS**

W. Bouschen¹, V. Grüßung¹, Y. Stahl², R. Simon², S. Metzger¹

¹Biological-Medical Research Center, Analytical Central Laboratory, ² Genetics

Plant shoot and root meristems are dynamic structures where stem cell population and differentiation of their descendants are tightly regulated. In the *Arabidopsis thaliana* shoot this is accomplished by a negative feedback loop between *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *WUSCHEL* expression can induce stem cell identity, and secretion of *CLAVATA3* (*CLV3*) dodecapeptides from stem cells leads to *WUSCHEL* repression. Various homologues of *CLV3* known as CLE-peptides have been found in *Arabidopsis* in the last years. Due to the small size and intensive processing of the peptides, location and signaling pathway could not be cleared by labeling with fluorescent markers like GFP. The aim of this study is to identify and locate CLE peptides on *Arabidopsis* by ESI and imaging mass spectrometry.

Arabidopsis thaliana Columbia-0 wild type were cultivated onto 1.2% (w/v) plant agar. Plates were incubated in a growth chamber for 5 days and 7 days more under room conditions. Synthetic dodecapeptides CLE40 and CLV3 were added to the plates. Adding CLE40 or CLV3 peptide results in shorter root within the first 10 days in the wild type. The plant specific preparation protocol was optimized by using an air spray protocol with different matrices and different ratios of ethanol and water.

Imaging-MALDI-MS measurements were done on distinguished regions of *Arabidopsis thaliana* seedlings like shoot meristem, cotyledons or leaves, roots and root tips. Various preparation methods were developed to optimize the signal intensity of these regions.

With the MALDI Imaging we could show the distribution of analytes on plants, distinguished masses could be related to root, shoot and leaves.

AG Hans Werner Müller**Cortical gene expression profiling in spinal cord repair: insight into the complexity of the neural regeneration program**

F. Kruse, F. Bosse, C. Vogelaar, N. Brazda, P. Küry, M. Gasis and H.W. Müller,
Molecular Neurobiology Laboratory, Neurology

In this investigation specific alterations in cortical gene expression following a regeneration-promoting treatment of spinal cord injury have been systematically investigated. Typically, traumatic injury of the spinal cord results in formation of a collagenous fibrous scar acting as a growth barrier for regenerating axons in the lesion centre. Hence, we recently developed an anti-scarring treatment (AST) in which transient suppression of the fibrous scar by local application of iron chelator and cAMP leads to long distance axon regeneration and functional improvement in the rat (Klapka *et al.*, 2005). It is of great interest to investigate molecular reactions of cortical motor neurons following axotomy and even more relevant to reveal regeneration-associated regulation of gene expression resulting from the AST treatment. We investigated gene expression profiles in cortical motor neurons following thoracic corticospinal tract (CST) transection from day 1 up to 60 days post-operation (dpo). We used the high density oligonucleotide microarray technology (Affymetrix) applied to RNA preparations from dissected layer V/VI of the sensorimotor cortex.

Interestingly, we were able to detect more than 900 significantly regulated transcripts as early as 1 dpo. Over time the numbers of significantly regulated transcripts increased to a maximum of over 2 000 at 21 dpo. Many of the identified genes in the sensorimotor cortex have, thus far, not been described as regulated following CST transection. We also detected those genes which are known, from studies in the peripheral nervous system, to play a role in neuronal growth and repair. Furthermore, functional classification of significantly regulated genes suggested remarkable modifications of the injury-related cortical gene expression program by the regeneration-promoting AST, indicating a fundamental treatment-induced change towards a survival- and growth-promoting neuronal state.

Supported by DFG (SFB 590/TP C2) und Deutsche Stiftung Querschnittlähmung

AG Dieter Niederacher, W. Janni**BRCA and Beyond: Risikoassoziierte Gene beim hereditären Mamma- und Ovarialkarzinom**

D. Niederacher*, C. Nestle-Krämling*, T.O. Goecke#, B. Royer-Pokora#, W. Janni*
*Frauenklinik und #Institut für Humangenetik und Anthropologie

Die Entdeckung der BRCA1/BRCA2 Gene Mitte der '90er Jahre wurde als „hottest race in cancer genetics“ bezeichnet. Die weitere funktionelle Charakterisierung der BRCA-Gene als „care-taker“ innerhalb der DNA-Reparatur sowie die Umsetzung der Erkenntnisse in die genetische Diagnostik und Betreuung von Frauen aus Familien mit gehäuft auftretenden Brust- und Eierstockkrebs-Erkrankungen im Rahmen eines Versorgungsforschungsprojekts ist ein Beispiel für erfolgreiche translationale Forschung, die in der Suche nach weiteren mit Brust-/Eierstockkrebs (BC/OC) assoziierten prädisponierenden Genen ihre Fortsetzung findet.

Im Zentrum Düsseldorf als eines der zwölf Zentren im Deutschen Konsortium für familiären Brust- und Eierstockkrebs (GCHBOC) wurden bislang über 1.000 Familien beraten, bei über 600 Frauen aus diesen Familien wurde eine BRCA1/BRCA2 Mutationsanalyse durchgeführt. Dabei konnten 160 BRCA1- /BRCA2-Mutationsträgerinnen identifiziert werden. Im Rahmen der begleitenden Forschungsprojekte des GCHBOC wurden weitere prädisponierende Kandidatengene CHEK2, ATM, PALB2 bzgl. Mutationsfrequenzen und –profile in BRCA1/BRCA2 negativen Risikofamilien untersucht, sowie kürzlich ein neues prädisponierendes Gen in BC/OC Familien identifiziert.

Unter Beteiligung des GCHBOC innerhalb des internationalen CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2) wurden die in genomweiten SNP (single nucleotide polymorphism) Analysen identifizierten mit Brustkrebsrisiko assoziierten Gene *FGFR2* (rs2981582), *TNRC9* (rs3803662) und *MAP3K1* (rs889312) in über 10.000 BRCA1/2 Mutationsträgerinnen genotypisiert. SNPs rs2981582 (*FGFR2*) and rs889312 (*MAP3K1*) sind beide jeweils assoziiert mit erhöhtem Brustkrebsrisiko in *BRCA2* und nicht in *BRCA1* Mutationsträgerinnen, während SNP rs3803662 (*TNRC9*) mit erhöhtem Brustkrebsrisiko in *BRCA1* und in *BRCA2* Mutationsträgerinnen assoziiert ist. Die laufenden funktionellen Analysen der mit den SNPs assoziierten Gene werden zeigen inwieweit diese Gene mit der jeweiligen Funktion von BRCA1 und BRCA2 in Zusammenhang stehen und das BRCA1- bzw. BRCA2-bedingte Erkrankungsrisiko modifizieren.

AG Guido Reifenberger**Identification and clinical validation of novel molecular markers for patients with primary brain tumors**

Guido Reifenberger,
Neuropathology

The identification and clinical validation of novel molecular diagnostic, prognostic and predictive biomarkers for primary brain tumors constitutes a primary research objective of the molecular neurooncology group at the Department of Neuropathology. Over the past years, a number of national collaborative research networks devoted to this particular area of translational cancer research have been established, including the German Glioma Network funded by the German Cancer Aid, the Brain Tumor Net within the BMBF-funded National Genome Network (NGFN^{plus}) and two BMBF-funded networks concentrating on the clinical validation of molecular markers in malignant glioma and pediatric medulloblastoma patients, respectively. Using large-scale genomic and transcriptomic molecular profiling approaches as well as targeted analyses of promising candidate genes, specific gene signatures as well as new marker genes have been discovered that are of major clinical significance as independent predictors of response to therapy and/or prognosis. The presentation will summarize some of the recent exciting developments concerning the molecular stratification of malignant glioma and medulloblastoma patients into distinct risk groups, for which individualized, risk-adapted novel treatment regimens will be needed in the near future.

Selected recent references:

Felsberg J, Rapp M, Loeser S, Fimmers R, Stummer W, Goepfert, Steiger HJ, Friedensdorf B, Reifenberger G, Sabel MC. Clinical significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009 (in press).

Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach J, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, von Deimling A, Reifenberger G, Loeffler M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. A prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009 (in press).

Wick W, Stoffels M, Engel C, Hartmann C, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyermann R, Auf G, Rapp M, Savidou I, Meisner C, Kortmann R, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, v. Deimling A, Weller M. NOA-04 randomized phase III study of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009 (in press)

Glas M, Happold C, Rieger J, Wiewrodt D, Bähr O, Steinbach JP, Wick W, Kortmann RD, Reifenberger G, Weller M, Herrlinger U. Long-term survival of glioblastoma patients treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *J Clin Oncol* 2009 Mar 10;27(8):1257-61

Pfister S, Remke M, Benner A, Mendrzyk F, Toedt G, Felsberg J, Wittmann A, Devens F, Joos S, Kulozik A, Reifenberger G, Rutkowski S, Wiestler OD, Radlwimmer B, Scheurlen W, Lichter P, Korshunov A. Molecular risk stratification of pediatric medulloblastoma based on genomic aberrations. *J Clin Oncol* 2009 Apr 1;27(10):1627-36

Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P. BRAF gene duplication constitutes a novel mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest* 2008 May 1;118(5):1739-1749.

Riemenschneider MJ, Reifenberger G. Molecular diagnostics of gliomas. *Int J Mol Sci* 2009: 10: 184-212.

AG Harald Rieder**Molekularzytogenetische Analysen zur Charakterisierung komplexer Chromosomenveränderungen bei Osteosarkomzelllinien**

Birte Möhlendick¹, Johannes Fischer², Katharina Raba², Karl-Ludwig Schäfer³, Harald Rieder¹.

¹ Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

² Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

³ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste Tumor im Kindesalter. Nahezu alle OS sind high-grade OS mit schlechter Prognose und detektierbaren Metastasen bei Erstdiagnose. Die häufig beim OS vorkommenden komplexen Chromosomenrearrangements lassen sich mittels konventioneller Zytogenetik nicht aufklären. Um die Aberrationen und chromosomalen Rearrangements bei OS zu entschlüsseln, analysierten wir 14 OS-Zelllinien mittels Chromosomenbandenanalyse, spektraler Karyotypisierung (SKY) und array komparativer genomischer Hybridisierung (aCGH; 44k Oligonukleotidarray, Agilent). Die Frequenz der Zugewinne und Verluste von chromosomalem Material, sowie die Verteilung der Bruchpunkte wurden mittels eines zytogenetischen Datenanalysesystems (CyDAS, www.cydas.org) evaluiert. Alle 14 Zelllinien zeigten sehr komplexe Karyotypen. Die Auswertung der SKY-Analysen aller Zelllinien durch CyDAS zeigte Zugewinne in 2880 Chromosomenbanden und Verluste in 3275 Chromosomenbanden. Zugewinne wurden am häufigsten in den Regionen 11q23-q24 und 6p25-p23 gefunden. Regionen, die oft durch Verluste betroffen waren, waren 9q22-q34 und 22p13-p11. Insgesamt konnten 700 Brüche festgestellt werden. Die meisten Bruchpunkte bezogen sich auf die Banden 8q11, 20p11, 19q11, 17q21 und 1p11. Die vergleichende Analyse von SKY- und aCGH-Ergebnissen zeigte eine gute Übereinstimmung der gefundenen Aberrationen und ermöglichte eine genauere Beschreibung und Eingrenzung der Bruchpunkte. Mittels aCGH konnten auch kleinere Amplifikationen einzelner Gene oder kleinerer Regionen aufgespürt werden, die sich mit FISH verifizieren ließen. Ein detaillierter Vergleich der Ergebnisse soll nun zeigen, ob es sich bei unterschiedlichen Ergebnissen von SKY und aCGH um balancierte Translokationen handelt. Hierzu sollen nun durch Mikrodissektion oder Durchflusszytometrie einzelne Chromosomen separiert und anschließend mittels PCR amplifiziert werden, um diese mit Hilfe einer speziellen aCGH-Technik, dem array painting, genauer zu charakterisieren.

AG Christine Rose**Spontaneous and evoked Calcium signalling in hippocampal astrocytes and NG2-cells**

Corinna Walz, Christine Rose,
Neurobiologie

Glial cells actively participate in synaptic transmission and respond to neuronal activity by transient increases in their intracellular calcium concentration. These calcium transients can result in the release of neuroactive substances, so-called gliotransmitters, which in turn influence the neuronal network. While it is well established that neuronal synapses are plastic and alter their strength depending on previous activity, very little is known about activity-induced alterations of glial calcium signaling. In the present study we characterized spontaneous calcium signaling properties of hippocampal glial cells in juvenile mice, focussing on astrocytes as well as NG2-positive glial cells (NG2-cells). In addition, we applied different stimulation paradigms and compared changes in the amplitudes of glial calcium transients with those in field potential recordings. Employing high-resolution 2-photon imaging with the calcium-sensitive dye Fluo-5F, we found spontaneous calcium oscillations occurring in the absence of electrical stimulation in more than 90 % of classical astrocytes. Most of these calcium oscillations were restricted to cellular subdomains within small astrocytic processes and did not invade the soma. In contrast, spontaneous calcium oscillations were only rarely observed in NG2-cells. Short burst Schaffer collateral stimulation (3 pulses, 50 Hz) elicited calcium transients in astrocytes as well as NG2-cells. Calcium transients in NG2-cells were highly variable and, on average, exhibited a strong run-down with repetitive stimulations. Astrocytes consistently responded to repetitive stimulations and the amplitudes of astrocytic calcium transients correlated with the stimulation intensity. In contrast, after induction of synaptic potentiation by a theta-burst stimulation protocol, astrocytic calcium transients evoked by short burst stimulation were not significantly altered. Our data thus demonstrate pronounced differences in calcium signaling properties between astrocytes and NG2-cells, both concerning spontaneous activity as well as evoked activity. Our results also suggest that the amplitudes of astrocytic calcium transients reflect the number of activated fibers but not the degree of synaptic potentiation. (*This work was supported by the DFG (Ro2327/3-2)*)

AG Brigitte Royer-Pokora**Wilms Tumoren mit *WT1*- und *CTNNB1*-Mutationen haben Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen und exprimieren Gene der frühen Nierenentwicklung**

B. Royer-Pokora, M. Busch, C. Duhme, A. Brandt,
Humangenetik und Anthropologie, HHU und UKD, Düsseldorf

In Wilms Tumoren mit Mutationen im *WT1*-Gen kann man eine mesenchymale Differenzierung beobachten, meist in Muskel, aber auch Knorpel, Knochen und Fett. Dies weist darauf hin, dass der Ursprung des Tumors auf eine frühe multipotente Zelle zurückzuführen ist. Um weitere Einblicke in die Tumorentstehung zu erhalten ist ein Zellkulturmodellsystem notwendig.

Die von uns entwickelte Methode zur Kultivierung von Wilms Tumorzellen ermöglichte es erstmals Genexpressionsprofile und das Differenzierungspotential im Zellkultursystem zu analysieren. Es stellte sich heraus, dass die verschiedenen Wilms-Tumorzelllinien mesenchymalen Stammzellen sehr ähnlich sind und somit Eigenschaften von *Cancer Stem Cells* aufweisen könnten.

Wir haben diese Zelllinien mit verschiedenen Methoden biologisch charakterisiert. Drei der Zelllinien haben zusätzlich eine Mutation in *β-Catenin (CTNNB-1)* und zeigen einen aktivierten WNT Signalweg. Die Zelllinien haben ein limitiertes *in vitro* Differenzierungspotential für Adipogenese, Chondrogenese, Osteogenese und Muskeldifferenzierung.

In Genexpressionsanalysen konnte die nahe Verwandtschaft zu mesenchymalen Stammzellen bestätigt werden. Die tumorspezifische Gensignatur enthält viele Transkriptionsfaktoren und auffallend viele davon gehören der *HOX* Genfamilie an. Außerdem werden Gene exprimiert, die während der frühen Nierenentwicklung eine Rolle spielen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Subgruppe an Wilms Tumoren auf die Transformation einer frühen mesenchymalen Nieren Vorläuferzelle zurück zu führen ist.

AG Heiner Schaal**Spleißen und pathogene Spleißmutationen:
In vitro und *in silico* Ansätze**

Heiner Schaal,
Virologie

Sinnverändernde (missense) Mutationen können wie ein „Teekesselchen“ mehrdeutig sein. Zum einen können sie auf der Translationsebene dazu führen, dass eine sinnverändernde Aminosäure in das Protein eingebaut wird, zum anderen können sie noch bevor es überhaupt zur Translation kommt, den Sinn von Spleißstellen oder ihrer exonischen spleißregulierenden Sequenzen verändern, sodass die mRNA fehlerhaft prozessiert wird.

Trotz erheblicher Fortschritte auf dem Gebiet der Algorithmen zur Beschreibung von Spleißstellen und ihrer spleißregulatorischen Sequenzen ist bis heute, wie am Beispiel einiger humaner Spleißstellen- und Missensemutationen gezeigt, eine verlässliche Vorhersage der Auswirkung von Nukleotidveränderungen in Bezug auf korrektes Spleißen unbefriedigend. Hinzu kommt, dass die U1 snRNA, die über komplementäre Basen an ihrem 5' Ende die 5'ss Sequenz erkennt, in einigen Fällen erst durch das Verschieben des komplementären Registers um ein Nukleotid die Position der Exon/Intron-Grenze definiert.

Experimentelle Mutationsanalysen sind daher für eine Verbesserung der Algorithmen und dem Verständnis der Spleißstellenerkennung nach wie vor unabdingbar. Unabhängig von einer zuverlässigen Vorhersagbarkeit können wir mit Hilfe integrierenden Lentiviren, die eine Spleißstellenmutations-adaptierte U1 snRNA exprimieren, einen DNA Schaden-induzierten G2 Zellzyklus Arrest in primären Fibroblasten von *FANCC*^{-/-} Patienten korrigieren.

AG Alfons Schnitzler

Untersuchungen zu pathologischen Oszillationen der Basalganglien bei Patienten mit M. Parkinson und ihrer therapeutischen Modulierbarkeit

Lars Wojtecki, Alfons Schnitzler,
Neurologie

Pathologische oszillatorische Aktivität in kortikalen Arealen sowie in den Basalganglien spielen beim M. Parkinson (PD) eine wesentliche Rolle, was insbesondere für den Parkinson-Ruhetremor bereits in Vorarbeiten der hiesigen Arbeitsgruppe gezeigt wurde.¹

Obwohl der Wirkmechanismus der Tiefen Hirnstimulation (DBS) des Nucleus subthalamicus (STN) zur Behandlung des PD nicht im Detail geklärt ist, geht man davon aus, dass eine Beeinflussung der pathologischen Oszillatoren dabei eine wesentliche Rolle spielt.

Ein Fokus unserer Arbeitsgruppe war daher einerseits die genauere Differenzierung der oszillatorischen Aktivität und die Untersuchung differentieller Aspekte der Therapie.

Zunächst konnte mittels Magnetoenzephalographie gezeigt werden, dass L-Dopa selektiv in einzelne Kopplungen innerhalb des subkortiko-kortikalen Tremor-Netzwerks eingreift.² Mittels invasiven intraoperativen Ableitungen konnte ferner gezeigt werden, dass der STN mit einer aufgabenspezifischen Frequenz hieran beteiligt ist und dass dieser in funktionelle motorische Subnetzwerke unterteilbar ist.^{3, 4} Therapeutisch zeigte sich, dass DBS des STN im Vergleich zu L-Dopa differentielle Einflüsse auf die Beweglichkeit hat.⁵ Verschiedene Frequenzeinstellungen des Stimulators indes haben differentielle Einflüsse auf Motorik und kognitive Funktionen, wie sich am Beispiel der Wortflüssigkeit und der Zeitwahrnehmung zeigen ließ.⁶⁻⁸ Nahe liegt, dass die gefundene Beeinflussung von kognitiven und auch emotionalen Funktionen⁹ auf Affektion funktionell von den motorischen Netzwerken des STN unabhängiger Subnetze beruht. In diesem Zusammenhang deuten aktuelle noch nicht veröffentlichte Daten darauf hin, dass der Grad der Beeinflussung der Wortflüssigkeit mit der Lateralität der Elektrodenlage innerhalb des STN korrelieren.

Literatur:

1. Timmermann L, Gross J, Dirks M, Volkmann J, Freund HJ, Schnitzler A. The cerebral oscillatory network of parkinsonian resting tremor. *Brain* 2003;126(Pt 1):199-212.
2. Pollok B, Makhoulfi H, Butz M, et al. Levodopa affects functional brain networks in Parkinsonian resting tremor. *Mov Disord* 2009;24(1):91-98.
3. Reck C, Florin E, Wojtecki L, et al. Differential distribution of coherence between beta-band subthalamic oscillations and forearm muscles in Parkinson's disease during isometric contraction. *Clin Neurophysiol* 2009.
4. Reck C, Florin E, Wojtecki L, et al. Characterisation of tremor-associated local field potentials in the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2009;29(3):599-612.
5. Timmermann L, Braun M, Groiss S, et al. Differential effects of levodopa and subthalamic nucleus deep brain stimulation on bradykinesia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23(2):218-227.
6. Timmermann L, Wojtecki L, Gross J, et al. Ten-Hertz stimulation of subthalamic nucleus deteriorates motor symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2004;19(11):1328-1333.
7. Wojtecki L, Timmermann L, Jorgens S, et al. Frequency-dependent reciprocal modulation of verbal fluency and motor functions in subthalamic deep brain stimulation. *Arch Neurol* 2006;63(9):1273-1276.
8. Wojtecki L, Elben S, Timmermann, et al. Pacing time: Modulation of time estimation and reproduction by STN deep brain stimulation in Parkinson's Disease. *Journal of Cognitive Neuroscience* 2007(Supp 2007 (Annual Meeting of the Cognitive Neuroscience Society 2007, New York)).
9. Wojtecki L, Nickel J, Timmermann L, et al. Pathological crying induced by deep brain stimulation. *Mov Disord* 2007;22(9):1314-1316.

AG Karsten Schrör**Kardiale E-Typ-Prostaglandin-Rezeptoren: antiischämische und hypertrophe Effekte**

Jutta Meyer-Kirchrath, Karsten Schrör,
Pharmakologie

In the heart, the generation of PGE₂ is significantly increased in acute myocardial ischemia and reperfusion. This is regarded as an intrinsic mechanism of protection against injury. Anti-ischemic action of prostaglandins have been shown in various in vitro and animal models of ischemia- and reperfusion-associated myocardial injury. <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/112/3/400> - [R5-167288#R5-167288](http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/112/3/400) <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/112/3/400> - [R6-167288#R6-167288](http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/112/3/400) However, besides their anti-ischemic action, prostaglandins have recently gained particular interest as promoters of cell growth and mediators of hypertrophy. Still, little is known about the molecular mechanisms underlying PGE₂-mediated regulation of cardiac structure and function.

PGE₂ exerts its effects via G-protein coupled receptors, designated EP₁₋₄. All four EP receptor subtypes are expressed in the heart and differ with respect to their signaling pathways. EP₁ couples to G_q and increases intracellular Ca⁺⁺, while EP₂ and EP₄ couple to G_s and stimulate adenylate cyclase with a subsequent increase in intracellular cAMP. The EP₃ receptor couples mainly to G_i and some isoforms additionally to G_q.

We used the cardiomyocyte-specific α -myosin heavy chain (α -MHC) promoter to overexpress the EP₃ receptor in mice. Isolated hearts from tg and wt mice were characterized with respect to G-protein coupling and the response to global ischemia and reperfusion. EP₃ overexpression caused an impressive delay of the onset of ischemic contracture. Moreover, LVEDP was significantly lower in tg than in wt hearts. Interestingly, one tg EP₃ receptor overexpressing line exhibited enlarged hearts with a significantly increased heart body-weight ratio compared with wt littermates at an age of 5–7 weeks. The surface of isolated cardiomyocytes was significantly increased in tg vs. wt cardiomyocytes. Tg hearts revealed enhanced mRNA expression of hypertrophy-associated markers like atrial natriuretic factor (ANF), transforming growth factor β (TGF- β) or β -MHC as well as elevated levels of the matrix genes collagen type I and III. Moreover, the activity of the phosphatase calcineurin was approximately doubled in the extracts from tg hearts as compared with wt. Likewise, the nuclear NFAT activity was significantly increased in tg hearts as compared with wt.

Moreover, hypertrophied hearts of EP₃ overexpressing mice revealed a significant (5-fold) increase in prostaglandin EP₄ receptor expression. Therefore, we hypothesized that EP₄ receptors may also be relevant for antiischemic and /or hypertrophic PGE₂ action. Lentiviral overexpression of EP₄ receptors in cardiomyoblasts of the rat (H9c2) indeed revealed cytoprotective effects of this receptor subtype under hypoxic conditions.

Our data suggest the involvement of E-type prostaglandin receptors in both PGE₂ mediated cardioprotection as well as cardiac hypertrophy.

AG Olga Sergeeva**Screening for neuroactive Bile salts reveals significant interaction with GABA_AR**

Olga Sergeeva, Wiebke Fleischer and Stephan Schubring,
Neurophysiology

Since ancient times a role for proper brain function is attributed to the liver. Hepatic encephalopathy represents neurological abnormalities as a result of liver failure. Bile salts (BSs) are produced by the liver and released in the intestine in response to food intake serving digestion and absorption of lipids and vitamins. Recently it was suggested that BS serve the general integration between food consumption and energy expenditure. Our present study addressed the question whether these products of the liver are neuroactive. GABA_A, AMPA and NMDA receptor-mediated responses were investigated with whole-cell patch-clamp recordings from acutely isolated mouse hypothalamic neurons. Among 9 tested primary and secondary BSs dehydrocholate and ursodeoxycholate (UDCA) were GABA_AR preferring antagonists (IC_{50} s 2mM and 0.09mM, respectively) while deoxycholate showed preference towards the NMDA receptor (IC_{50} 0.07mM). AMPA receptor-mediated responses (kainate, 150 μ M) were not affected by cholates and dehydrocholate up to concentrations of 3 and 8 mM respectively, while deoxycholate (0.6mM) slightly but significantly reduced them. At lower concentrations BSs synchronized network activity in a gabazine (GABA_AR antagonist) -sensitive way by shortening the decay kinetics of IPSCs, while at higher concentrations BS inhibited activity due to a block of NMDA receptors. Different combinations of GABA_AR α 1, β 3 and γ 2L subunits expressed in HEK293 cells showed different sensitivity to the BSs with the β 3 homo-multimeric receptor being the most sensitive target (UDCA IC_{50} 0.01 mM) whereas α 1 β 3 γ 2 and α 1 β 3 receptors showed similar sensitivity as native hypothalamic receptors (UDCA IC_{50} 0.1mM). We show for the first time that BSs modulate gabaergic transmission at physiologically relevant concentrations which may allow them to coordinate metabolic status of the body with behavioral arousal by affecting excitability in hypothalamic sleep pathways not only at pathological (cholestatic liver disease) but also at physiological conditions.

AG Markus Uhrberg**Age-dependent variation in *EED* expression in human hematopoietic stem cells**

Nina Graffmann¹, Simeon Santourlidis¹, Inga D. Michele², Alexandra Reckert², Gesine Kögler¹, Johannes C. Fischer¹, Stefanie Ritz-Timme², and Markus Uhrberg¹

¹Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics,

²Legal Medicine Aging is a gradual process that might depend on progressive deregulation of epigenetic mechanisms. In this study, we performed a screen for age-related expression changes of genes that are involved in chromatin remodelling and histone modification. As a model system for aging of long-living stem cells, neonatal human CD34⁺ hematopoietic stem cells (HSC) were compared to those from peripheral blood and bone marrow of healthy adult donors. Employing TaqMan-based microfluidic card technology, we identified a significant increase in transcription levels of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) member *EED* during aging. As part of the PRC2 complex, EED catalyses trimethylation of amino acid K27 of histone H3 (H3K27trime), which is a repressive histone mark in differentiated cells of higher eukaryotes. Indeed, we show via preparative FPLC for histone H3 and subsequent ELISA for H3K27trime that global H3K27trime levels are significantly lower in HSC from neonatal blood than from adults. These data are confirmed by H3K27trime-specific chromatin immunoprecipitation analyses, showing significantly increased levels of H3K27trime on promoters of PRC2 targets, e.g. estrogen receptor 1, in adults. Furthermore, we detected a novel *EED* transcript variant that occurred specifically and prominently in neonatal but not adult HSC. As this variant is predicted to translate into a new EED protein variant, it might also directly influence the activity of PRC2. We are currently employing ChIP-Chip analyses to describe the changes in PRC2-related histone modifications between neonatal and adult cells on a genome-wide level. Our data indicate a model, in which age-related changes in variants and expression levels of *EED* lead to significant changes in the levels of H3K27trime during human development and aging. Whether these changes are related to the loss of stem cell function in elderly people will be a matter of further studies.

AG Andreas Weber**Creating a virtual organelle to understand metabolite fluxes within different cell types**

Andrea Braeutigam, Andreas Weber,
Biochemie der Pflanzen

Transport proteins which connect the metabolic network between different compartments of a eucaryotic cell are essential to understand quantity and direction of metabolite fluxes. In plant cells, most anabolic pathways such as production of proteinogenic amino acids, fatty acids and membrane lipids, several vitamins and precursors of secondary metabolites are synthesized within a double membrane bound organelle, the plastid. Unfortunately knowledge about the transport proteins which connect these important pathways to the remainder of the cell is still limited. However, it is vital for both understanding the metabolic network as well as for engineering purposes to identify and characterize the transport proteins and with them the metabolite flux between different cellular compartments.

The first step towards creating a virtual organelle was to map the genes representing the pathways within the organelle with MapMan software (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan/>). In a second step the known transport proteins of the organelle were added to the map and finally proteins predicted to be localized in the membrane were added. We have used both our own 'omics' data as well as publicly available resources to visualize the changes in gene expression and protein presence in different tissue types.

The virtual organelle map has allowed us to develop new testable hypotheses about transport protein candidates and to redefine the function of known transport proteins in different tissue contexts.

Thimm O., Blasing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Kruger P., Selbig J., Muller L.A., Rhee S.Y., Stitt M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* **37**, 914-939

Bräutigam A., Hoffmann-Benning S., Weber A.P.M. (2008). Comparative Proteomics of Chloroplast Envelopes from C3 and C4 Plants Reveals Specific Adaptations of the Plastid Envelope to C4 Photosynthesis and Candidate Proteins Required for Maintaining C4 Metabolite Fluxes. *Plant Physiol.* **148**, 568-579

Bräutigam A., Shrestha R.P., Whitten D., Wilkerson C.G., Carr K.M., Froehlich J.E., Weber A.P.M. (2008). Comparison of the use of a species-specific database generated by pyrosequencing with databases from related species for proteome analysis of pea chloroplast envelopes. *Journal of Biotechnology* **136**, 44-53

Bräutigam A., and Weber A.P.M. (2009). Proteomic Analysis of the Proplastid Envelope Membrane Provides Novel Insights into Small Molecule and Protein Transport across Proplastid Membranes. *Molecular Plant* (in press)

AG Peter Wernet**Epigenetische *hotspots* in Stammzellen aus Nabelschnurblut und induzierten pluripotenten Stammzellen"**

Simeon Santourlidis, Peter Wernet, Markus Uhrberg,
Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

1) DFG Forschergruppe (FOR 717)**Epigenetische Kontrolle der funktionellen Erhaltung und der Differenzierungskapazität der USSC**

In der Nabelschnur sind Stammzellen vorhanden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein beträchtliches Differenzierungspotential aufweisen. So können aus ihnen Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. Daher sind sie eine vielversprechende Ressource für zukünftige Applikationen in der regenerativen Medizin.

Es ist weitgehend unbekannt welche Rolle das Epigenom für die Stammzellerhaltung spielt. Zelluläre Differenzierung ist jedenfalls mit einer globalen Umstrukturierung des Epigenoms, einer Umprogrammierung assoziiert. Wir untersuchen zum einen die DNA Methylierung und die Chromatinstruktur stammzellerhaltender Gene. Zum andern werden Veränderungen des Epigenoms untersucht die mit der Differenzierung assoziiert sind. Zielsetzung ist es verstehen zu lernen welchen Beitrag epigenetischen Vorgänge hinsichtlich der Stammzellerhaltung und der Differenzierung leisten.

2) BMBF Epigenetik Plattform - Technologieplattform zur Analyse der epigenetischen Veränderungen im Rahmen der Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS)

Im Zuge der Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) findet eine epigenetische Reprogrammierung des Genoms der somatischen Ursprungszelle (z.B. Fibroblast) statt. Dieser Prozess ist bis jetzt nur unvollständig aufgeklärt. Daher werden die epigenetischen Veränderungen die den iPS Reprogrammierungsprozess begleiten detailliert untersucht. In Zusammenarbeit mit mehreren Kooperationspartnern werden hierbei iPS-Zellen aus murinen und humanen Ausgangszellen untersucht. Durch neue genomweite Analysemethoden können sowohl DNA-Methylierungsmuster als auch Histonmodifikationen in den verschiedenen iPS-Modellen mit hoher Auflösung charakterisiert werden. Diese Analysen stellen eine wichtige Grundlage für ein besseres Verständnis der epigenetischen Reprogrammierung dar.

AG Dieter Willbold**Towards the gating mechanism of a CNG channel:
Solution structure of the *M.loti* K1 channel cyclic nucleotide binding domain free
and in complex with cAMP**

Sven Schünke^{1,2}, Matthias Stoldt^{1,2}, U. Benjamin Kaupp³ and Dieter Willbold^{1,2}

¹Structural Biology and Biophysics, ISB-3, Research Center Jülich

²Physical Biology, Heinrich-Heine-University

³Research Center caesar, Bonn

Cyclic nucleotide-sensitive ion channels, known as HCN and CNG channels, play crucial roles in neuronal excitability and signal transduction of sensory cells. Tetrameric HCN and CNG channels are modulated by direct binding of cyclic nucleotides (cAMP or cGMP) to their intracellular CNBDs. http://www.nature.com/nrn/journal/v2/n9/full/nrn0901_643a.html - B14 However, the mechanism by which the binding of cyclic nucleotides to the CNBD leads to the opening of the channel is not well understood. We report the solution structure of the isolated cyclic nucleotide binding domain (CNBD) of a cyclic nucleotide-activated K⁺ channel from *Mesorhizobium loti*. The protein consists of a wide antiparallel β -roll topped by a helical bundle comprising five α -helices and a short 3_{10} -helix. In contrast to the dimeric arrangement ("dimer-of-dimers") in the X-ray structure (Clayton et al., 2004), the solution structure of the cAMP bound form clearly shows a monomeric fold (Schünke et al., 2009). We will also present the solution structure of the unliganded CNBD. The monomeric structure of the CNBD supports the hypothesis that the CNBDs transmit the binding signal to the channel pore independently of each other.

References:

Clayton GM, Silverman WR, Heginbotham L, Morais-Cabral JH (2004) Structural basis of ligand activation in a cyclic nucleotide regulated potassium channel. **Cell** 119, 615-627 (2004)

Schünke S, Stoldt M, Novak K, Kaupp UB, Willbold D (2009) Solution structure of the *M.loti* K1 channel cyclic nucleotide binding domain in complex with cAMP. **EMBO Rep.** 10, 729

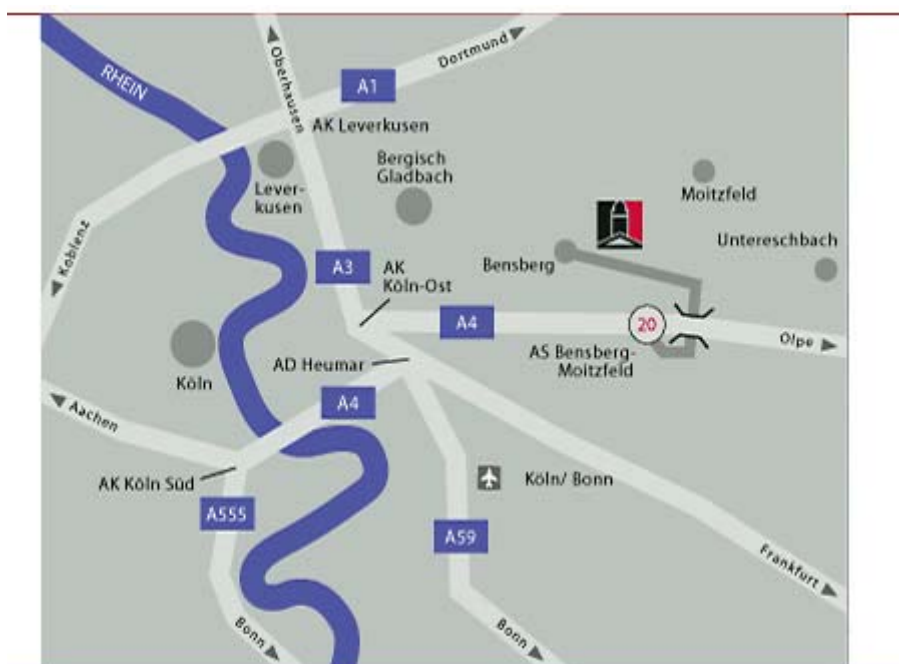
3. Anfahrtsbeschreibung

Kardinal Schulte Haus, Overather Straße 51, 51429 Bergisch Gladbach

Fon: 02204-4080

Fax: 02204-408697

E-Mail: reserv@k-s-h.de



Mit öffentlichen Verkehrsmitteln:

Von Köln Hbf mit dem Schnellbus SB40 bis zur Haltestelle Bahnhof Bensberg, dann Fußweg ca. 15 Minuten oder Buslinie 227, 420 oder 455. Mit der Straßenbahn 1 bis Bensberg Endstation oder mit der S-Bahn bis Bergisch Gladbach. Von Bensberg bzw. Bergisch Gladbach mit dem Bus Richtung Overath/Moitzfeld. Haltestelle: Thomas-Morus-Akademie.

Mit dem PKW: Über A4: Bis Anschlussstelle Nr. 20 Bensberg-Moitzfeld. An der Kreuzung links auf die L 136 Richtung Bensberg. Nach ca. 700 m rechts durch den Torbau hinaus zum Kardinal Schulte Haus.

Fahrpläne im Internet:

"Fahrplan Schnellbus SB40"

http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_SB40.pdf

"Fahrplan Buslinie 227"

http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_227.pdf

"Fahrplan Buslinie 420"

http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_420.pdf

"Fahrplan Buslinie 455"

http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_455.pdf

"Fahrplan Straßenbahnlinie 1"

http://www.kvb-koeln.de/german/fahrplan/download/mfp_001.pdf