

BMFZ

Heinrich Heine
HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DUSSELDORF

**2. BMFZ-Klausurtagung
Tagungshotel *Maria in der Aue*
Wermelskirchen
9. - 10. August 2007**



Inhalt

Seite

1.	Programm	3
2.	Abstracts der Mitglieder	5
3.	Anfahrtsbeschreibung	30

2. BMFZ-KLAUSURTAGUNG

Tagungshotel *Maria in der Aue*, Wermelskirchen
9. - 10. August 2007

PROGRAMM

Donnerstag, 9.8.2007

14.00 h	Begrüßung	Guido Reifenberger
14.15 h - 16.00 h	Sitzung 1	Moderation: Hartmut Hengel, Dieter Willbold
	Selective Inhibition of IgG-mediated Effector Functions through Herpesviral Fc γ Receptors	Hartmut Hengel, Virologie
	Comprehensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense	Klaus Pfeffer, Medizinische Mikrobiologie
	Entwicklung einer diagnostischen Methode zum Nachweis Partikel-assoziiierter Erkrankungen wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und der Alzheimerschen Demenz	Eva Birkmann, Detlev Riesner, Physikalische Biologie
	Strukturelle Aufklärung von Protein-Protein Wechselwirkungen mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR)	Marc Wittlich, Dieter Willbold, Physikalische Biologie
	Struktur und Molekulare Mechanismen der an der Ethylensignaltransduktion beteiligten Rezeptorproteine	Georg Groth, Biochemie der Pflanzen
	DNS-Topoisomerasen als intrinsische Kofaktoren der extrinsischen Alterung des nukleären und mitochondrialen Genoms	Friederich Boege, Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
	MS2-Tethering" System: Ein Werkzeug zur Analyse der Spleißregulation und Exonererkennung	Heiner Schaal, Virologie
16.00 h - 16.30 h	Kaffeepause	
16.30 h - 18.15 h	Sitzung 2	Moderation: Rainer Haas, Arndt Borkhardt
	Entwicklung funktioneller Assays für die Charakterisierung unklassifizierbarer Varianten (UVs) in den Genen BRCA1 und BRCA2	Dieter Niederacher, Frauenklinik
	Bedeutung der NF κ B-Aktivität für das Überleben von Karzinomzellen in Suspension	Wolfgang Schulz, Urologie
	Role of aberrant microRNA expression in the progression of astrocytic gliomas	Bastian Malzkorn, Guido Reifenberger, Neuropathologie
	Unravelling molecular mechanisms involved in myeloid leukemia pathogenesis	Ingmar Bruns, Rainer Haas, Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
	Identifizierung von Antigenen in der Immunpathogenese der schweren aplastischen Anämie im Kindesalter im Rahmen der euro-päischen multizentrischen Studie EWOG-SAA	Bernd Hubner, Arndt Borkhardt, Kinder-Onkologie, -Hämatologie, Klin. Immunologie
	RhoGTPasen und Tumorinvasion: Mechanismen und Netzwerke	Reza Ahmadian, Biochemie und Molekularbiologie II
	Hyperammonaemie, Taurin und synaptische Plastizität	Helmut Haas, Neuro- und Sinnesphysiologie
18.15 h - 19.30 h	Abendessen	
19.30 h - 20.30 h	Sitzung 3 (s. nächste Seite)	Moderation: Guido Reifenberger

19.30 h - 20.30 h	Sitzung 3	Moderation: Guido Reifenberger
	Bericht aus dem Molekularbiologischen Zentrallabor	Karl Köhrer (Molekularbiologisches Zentrallabor)
	Imaging Massenspektrometrie: Ein neues Tool in der Bioanalytik	Sabine Metzger (Analytisches Zentrallabor)
	Systems Biology of Intracellular Solute Transport in Plants	Andreas Weber, Biochemie der Pflanzen
ab ca. 20.30 h	Individuelle Diskussionsrunden im Biergarten	

Freitag, 10.8.2007

8.00 h – 9.00 h	Frühstück	
9.00 h – 11.00 h	Sitzung 4	Moderation: Christine Rose, Hans-Werner Müller
	Sodium signals induced by glutamatergic transmission in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells	Christine Rose, Neurobiologie
	NMDA receptors and episodic-like memory in the rodent	Dere Ekrem, Joseph P. Huston, Physiologische Psychologie
	Transplantation of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in a Model of Experimental Choroidal Neovascularization	Irina Semkova, Antonia Joussem, Augenheilkunde
	Role of N-cadherin in presynaptic function and organization	Kurt Gottmann, Neuro- und Sinnesphysiologie
	Arbeitsgruppe Molekulare Neurobiologie: Aktuelle Forschungsschwerpunkte	Hans-Werner Müller, Molekulare Neurobiologie
	Mechanisms of GPR39 cell protection	Axel Methner, Neurologie
	Freisetzung neuroaktiver Substanzen nach Hirntrauma	Frauke Otto, Mario Siebler, Neurologie
	Recombinant scFv antibodies display structure-dependent antiprion effects and are blood-brain barrier-permeable	Carsten Korth, Neuropathologie
11.00 h – 11.30 h	Kaffeepause	
11.30 h – 13.00 h	Sitzung 5	Moderation: Rüdiger Scharf, Helmut Sies
	Die Rolle der Ceramide bei der UV-vermittelten Signaltransduktion in der Haut	Susanne Grether-Beck, Jean Krutmann, Institut für Umweltmedizinische Forschung
	Functional role for newly identified proteins in the mitochondria – functional role in endothelial cell apoptosis and migration	Judith Haendeler, Institut für Umweltmedizinische Forschung
	FoxO-Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Selenhomöostase durch Insulin	Lars-Oliver Klotz, Institut für Umweltmedizinische Forschung
	Funktion Gi-abhängiger Signalwege im kardiovaskulären System	Bernd Nürnberg, Biochemie und Molekularbiologie II
	Plättchen-Rezeptorpolymorphismen, Adhäsion und arterielle Thrombogenese: Einfluss thrombozytärer Integrinvarianten auf die Plättchen-Gefäßwand-Interaktion unter dynamischen Flussbedingungen	Rüdiger Scharf, Hämostaseologie
	(-)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase	Helmut Sies, Biochemie und Molekularbiologie I
13.00 h - 14.00 h	Mittagessen	
14.15 h - 15.00 h	BMFZ-Vorstandssitzung	

2. Abstracts

AG Bender

Entwicklung funktioneller Assays für die Charakterisierung unklassifizierbarer Varianten (UVs) in den Genen *BRCA1* und *BRCA2*

B. Betz¹, P. Rio Galdo², H. Hanenberg³, HG Bender¹ und D. Niederacher¹

¹Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, ²Hematopoietic Gene Therapy Program CIEMAT/Botin Foundation Madrid, Spain; ³Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie

Keimbahnmutationen der Gene *BRCA1* und *BRCA2* liegen ursächlich der erblichen Variante des Mamma- und Ovarialkarzinoms zu Grunde. Die entsprechenden Proteine sind gemeinsam für Reparaturmechanismen im Zellzyklus, insbesondere auf der Doppelstrangebene verantwortlich. Etwa ein Drittel aller im Gentest gefundenen *BRCA* Mutationen sind Missense Mutationen mit unklarer klinischer Relevanz, sog. unklassifizierbare Varianten (UVs). Die Entwicklung funktioneller Assays zur Charakterisierung dieser UVs ist daher für die Risikoberechnung, die genetische Beratung und das Angebot therapeutischer Maßnahmen von großer Bedeutung.

Mittels vektorexprimierter shRNA konnte die Expression des endogenen *BRCA1* Proteins in nicht-immortalisierten humanen Fibroblasten vollständig unterdrückt werden. Diese *BRCA1*^{-/-} Zellen verlieren ihre Fähigkeit, nach Induktion von Doppelstrangbrüchen sog. Foci zu bilden und durch Mitomycin C wird ein Arrest der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus induziert.

Die *BRCA1*^{-/-} Fibroblasten wurden mit einem oncoviralen Vektor transfiziert, der entweder das Wildtyp *BRCA1* Gen oder eine mutante Form des *BRCA1* Gens exprimiert. Mutationen wurden durch in vitro Mutagenese in den Vektor eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der durch Mitomycin C induzierte Phänotyp der *BRCA1*^{-/-} Fibroblasten durch Transfektion des *BRCA1* Wildtypgens komplementiert werden kann, nicht jedoch durch Transfektion des *BRCA1* Gens mit eindeutig pathogenen Mutationen.

Diese funktionellen Assays sollen eine Abschätzung der klinischen Relevanz von *BRCA1/2* UVs ermöglichen.

AG Boege

DNS-Topoisomerasen als intrinsische Kofaktoren der extrinsischen Alterung des nukleären und mitochondrialen Genoms

Christian Mielke und Fritz Boege
Zentralinstitut für Klin. Chemie und Labordiagnostik

Destabilisierung der nukleären und mitochondrialen Genome durch oxidativen Stress und Umweltfaktoren ist ein wesentlicher Motor der extrinsischen Zellalterung. Exogene Primärveränderungen der DNS sind gut untersucht. Unklar ist jedoch, wie solche prinzipiell reversiblen Schäden einzelner DNS-Basen oder –Strangabschnitte dauerhaft in großräu-

mige Gewinne oder Verluste ganzer Chromosomen oder Chromosomenstücke überführt werden, die für gealterte Genome typisch sind. Endogene DNS-modifizierende Enzyme, insbesondere DNS-Topoisomerasen, könnten bei dieser irreversiblen Schadenskonversion eine wichtige Rolle spielen. Wir haben beobachtet, dass (i) photo-oxidative DNS-Läsionen im nukleären Genom hochmutagene Topoisomerase•DNS-Strangbrüche induzieren und (ii) experimentelle Überexpression von Topoisomerasen in Mitochondrien eine rasche Depletion der mitochondrialen DNS und mitochondrial kodierter Proteine verursacht. Wir vermuten, dass beides auf Interaktionen der Enzyme mit der mitochondrialen DNS und möglicherweise mit darin enthaltenen, beschädigten DNS-Basen beruht. Wir postulieren deshalb *Topoisomerasen als intrinsische Kofaktoren und Schrittmacher der extrinsischen Genomalterung in Zellkern und Mitochondrium*. Wir wollen jetzt im Detail untersuchen, welche Arten von DNS-Primärveränderungen durch Topoisomerasen verstärkt bzw. konvertiert werden, wie dies geschieht, welche Rolle die verschiedenen Isoformen und Typen der Enzyme spielen, welche anderen DNS-modifizierenden Proteine und Prozesse daran beteiligt sind, wie diese Mechanismen die extrinsische Alterung von Zellen und Organismen beeinflussen, und welche präventiven Strategien hier ansetzen können.

AG Borkhardt

Identifizierung von Antigenen in der Immunpathogenese der schweren aplastischen Anämie im Kindesalter im Rahmen der europäischen multizentrischen Studie EWOG-SAA

Bernd Hubner, Arndt Borkhardt

Klinik für Kinderonkologie,- hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Bei der erworbenen schweren aplastische Anämie (aSAA) handelt es sich um eine seltene Erkrankung des Knochenmarks, die durch Panzytopenie und Knochenmarkshypozellularität unklarer Ätiologie gekennzeichnet ist. Klinische und experimentelle Daten deuten darauf hin, dass die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen durch potentiell autoreaktive T-Lymphocyten unterdrückt wird und so die Bildung aller Blutzellen zum Erliegen kommt.

Im Rahmen der molekularen Charakterisierung von CD34 Stamm- und Vorläuferzellen bei SAA konnten wir erstmals die patientenindividuelle Genexpressionsprofile von CD34-Knochenmarkszellen aus SAA mit Hilfe von Hochdichteexpressionanalysen (Affymetrix) bestimmen. Hierarchische Clusteranalysen ergaben, dass Patienten mit SAA ein eigenes, für die Erkrankung charakteristisches Expressionsprofil aufzeigen. In vorläufigen Analysen konnten wir 402 Gene charakterisieren, die im Vergleich zu gesunden CD34- Zellen differentiell exprimiert werden ($p < 0.05$). Gen- Ontologie Analysen (FatiGO) zeigen, dass biologische Prozesse in CD34- Zellen im Wesentlichen durch eine starke Herabregulation von Genen charakterisiert sind, die mit der Zellkommunikation/ Adhäsion, Wachstum und

Differenzierung und der Stressantwort in Verbindung stehen, während nur wenige Gene mit Funktionen im Zelltod/ Apoptose identifiziert wurden. Diese Befunde unterstützen unsere Hypothese, dass die Immunattacke auf Stamm- und Vorläuferzellen bei Vorstellung der Patienten bereits weitestgehend abgelaufen ist. Wir nehmen an, dass potentielle Autoantigene in ihrer Expressionsdichte herunterreguliert werden und sich „überlebende“ Stammzellen auf diese Weise einer Immunantwort entzogen haben. Erste Befunde deuten darauf hin, dass sich unter den herabregulierten Genen die Zielstrukturen befinden, die ursächlich für die Autoimmunität sind.

Um die Rolle von T- Lymphozyten in der Pathogenese zu untersuchen, wurde die Diversität des T- Zell-Rezeptor Repertoires (TCR- Repertoire) im Knochenmark von neu diagnostizierten SAA- Patienten untersucht und mit dem Repertoire im peripherem Blut verglichen. Die Analysen erfolgte mittels Vbeta- /Jbeta spezifischen Spektratyping- Analysen aus isolierten CD4+ und CD8+ Lymphozyten. Im Knochenmark von 4 bisher analysierten aSAA- Patienten zeigte sich eine extreme Einschränkung („Skewing“) des TCR- Repertoires sowohl bei CD4+ als auch bei CD8+ Lymphozyten im Vergleich zum korrespondierenden Repertoire im peripheren Blut. Dagegen konnte in der gesunden Kontrollgruppe ein solches oligoklonales „Skewing“ nicht gefunden werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine T- Zell vermittelte Autoimmunreaktion an der Pathogenese beteiligt ist und möglicherweise als Antwort auf einen Kontakt mit spezifischen Antigenen des Knochenmarks proliferieren.

AG Georg Groth

Struktur und Molekulare Mechanismen der an der Ethylensignaltransduktion beteiligten Rezeptorproteine

Georg Groth,

Institut für Biochemie der Pflanzen

Ethylen ist ein wichtiges Phytohormon, das zahlreiche pflanzliche Wachstums- und Entwicklungsprozesse, wie z.B. Zellstreckung, Blütenentwicklung, Blattfall, Frucht- und Samenreife kontrolliert. Darüber hinaus spielt Ethylen auch bei der Vermittlung verschiedenster biotischer und abiotischer Stresssignale, wie z.B. bei der Pathogenabwehr, bei Trockenheit, Hitze oder Kälte eine wichtige Rolle. Die an der Ethylensignaltransduktion beteiligten Komponenten konnten in molekulargenetischen Studien identifiziert werden. Genaue Kenntnisse über den molekularen Mechanismus der Signalwahrnehmung und -weitergabe liegen jedoch noch nicht vor.

Der Schwerpunkt unserer Arbeiten liegt in der proteinbiochemischen und strukturellen Charakterisierung der am Ethylensignalstoffwechsel beteiligten membranintegralen Rezeptorproteine. Mit ETR1 haben wir den Prototyp der Ethylenrezeptorfamilie in einem bakteriellen System exprimieren und mit Hilfe von Metallchelat- oder hydrophober Interaktionschromatographie reinigen können.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Rezeptorproteinen sind die Proteine der Ethylenrezeptorfamilie vermutlich in Abwesenheit ihres Substrates aktiv und werden erst durch die Bindung des Phytohormons inaktiviert. Um diesen postulierten, bislang aber noch nicht nachgewiesenen Effekt

der Substratbindung auf die Autokinase-Aktivität des ETR1-Rezeptors zu untersuchen, haben wir das gereinigte Protein in Gegenwart verschiedener Ethylenagonisten und –antagonisten in radioaktiven Phosphorylierungstests untersucht. Die Experimente demonstrieren, dass Ethylenanaloga, wie z.B. Cyanid, die Autokinase-Aktivität des Ethylenrezeptors nahezu vollständig hemmen, während Ethylenantagonisten, wie z.B. 1-Methylcyclopropen, die Kinaseaktivität nicht inhibieren.

Neben ETR1 konnten wir mit EIN2 ein weiteres Membranprotein, das in molekulargenetischen Studien als zentrale Komponente der Ethylensignalkette identifiziert werden konnte, klonieren und den Extramembranbereich dieses Proteins erfolgreich in *E. coli* exprimieren. Mit Hilfe von CD-Spektroskopie, Fluoreszenz-Spektroskopie und isothermaler Titrationskalorimetrie konnten erste Ergebnisse zum strukturellen Aufbau und zur möglichen Signalwahrnehmung/-weiterleitung durch EIN2 gewonnen werden.

AG Helmut Haas

Hyperammonaemie, Taurin und synaptische Plastizität

Helmut Haas, Aisa Chepkova, Oliver Selbach, Olga Sergeeva

Institut für Neurophysiologie

Hyperammonaemie ist die Ursache der neurologischen Störungen bei hepatischer Enzephalopathie. Langzeitpotenzierung (LTP) der synaptischen Übertragung, ein zelluläres Modell und Modul für Lernen und Gedächtnis im Hippokampus ist bei Hyperammonaemie gestört. Ein wesentlicher pathophysiologischer Faktor ist ein mildes Astrozytenödem, das Verschiebungen des Osmolyten Taurin nach sich zieht. Taurin ist ein Ligand an Glycin- und GABAA-Rezeptoren und erzeugt auch selbst eine dauerhafte Potenzierung hippocampaler und striataler synaptischer Übertragung, die zumindest teilweise auf den gleichen Mechanismen beruht wie die klassische LTP. Wir beschreiben jetzt eine protektive Rolle von Taurin für LTP unter Hyperammonaemie in Hirnschnitten der Maus. Vergleiche mit anderen Substanzen, die ebenso wie Taurin osmolytische, neuromodulatorische oder antioxidative Eigenschaften haben (Betain, Glycin, GABA, PicROTOXIN, Ascorbinsäure, Carnosin) ergaben, dass keine dieser Eigenschaften für die Neuroprotektion entscheidend ist. Der "Mitochondrien-Verstärker" L-carnitine verhinderte, ebenso wie Taurin, die Beschädigung der LTP. Daher machen wir eine Verbesserung der Mitochondrien-Funktion für die "Rettung" der LTP vor der Schädigung durch Hyperammonaemie verantwortlich. Dies lässt hoffen, dass Taurin-Medikation günstige Effekte bei kognitiven und motorischen Störungen bei der hepatischen Enzephalopathie entfaltet.

AG Rainer Haas

Unravelling molecular mechanisms involved in myeloid leukemia pathogenesis

Ingmar Bruns, Akos Czibere, Rainer Haas

Klinik für Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie

Acute myeloid leukemia (AML) and chronic myelogenous leukemia (CML) are malignant disorders of the hematopoietic stem cell (HSC). In regular hematopoiesis, hematopoietic stem cells differentiate into multipotent progenitor cells, which in turn differentiate into mature blood cells. In contrast, AML is a clonal disorder of the hematopoietic stem or early progenitor cell that presumably arises from a disturbed expression of transcription factors. Recent publications indicate a key role for transcription factors of the *ets* and *activating protein-1 (AP-1) family* regarding clonal expansion and the differentiation block of AML blast cells. In case of CML a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22 (t(9;22)(q34;q11)) is held responsible for the disease onset. The translocation results in formation of the BCR-ABL fusion oncogene encoding a protein with constitutive tyrosine kinase activation, which plays a central role in the pathogenesis of the disease. Inhibition of this tyrosine kinase activation by specific inhibitors can induce molecular remissions, but, quite often the disease expands again as soon as the medication is discontinued, suggesting the existence of a “protected” CML leukemic stem cell (LSC) which is not targeted by the various tyrosine kinase inhibitors.

In vitro co-incubation of AML cells, primary and various cell lines, with non steroidal anti-inflammatory drugs with known anticancer properties leads to apoptosis and G2/M-Arrest of the AML cells. Analysis of the transcriptome (Affymetrix HU-133A 2.0) and proteome (2D-DIGE, MALDI-TOF-MS/MS) of these treated AML cells revealed regulation of several distinct pathways involved in cell proliferation and differentiation, e.g. ERK/MAPK, PPAR. We could also identify PCNA and GADD45 family of genes as

novel key transcription factors upstream and downstream of c-Jun and JunB, which regulate apoptosis, growth arrest and differentiation of AML cells. Further knockdown and in vivo studies will be conducted to strengthen our hypothesized signalling pathway.

To address the problem of identifying a CML stem cell, we used high-speed fluorescence-based cell sorting to extract distinct subsets from CD34+ CML and healthy bone marrow cells. We analysed the hematopoietic stem cell (HSC; Lin-, CD34+, CD38-), the common myeloid progenitor (CMP; Lin-, CD34+, CD38+, IL-3Ra+, CD45RA-), macrophage erythrocyte progenitor (MEP; Lin-, CD34+, CD38+, IL-3Ra-, CD45RA-) and the granulocyte macrophage progenitor (GMP; Lin-, CD34+, CD38+, IL-3Ra+, CD45RA+) compartment in a large scale transcriptional profiling study using Affymetrix HU-133A 2.0 gene arrays. For a comparative statistical analysis we performed smoothing spline normalization followed by an algorithm applying the perfect match-mismatch difference model to calculate expression values with dChip. When we compared the subsets, healthy vs. control, we considered a gene significantly differently expressed with a lower confidence bound of LCB >1.2. We were able to distinguish all subsets, except GMPs, when performing hierarchical cluster analysis using a correlation based centroid linkage algorithm with dChip. We could identify several genes associated with self-renewal, migration, adhesion and differentiation differentially regulated in CML HSCs compared to healthy HSCs, e.g. C/EBPbeta, CXCR4, CD164 and Prominin.

AG Hartmut Hengel

Selective Inhibition of IgG-mediated Effector Functions through Herpesviral Fc γ Receptors

Eugenia Corrales-Aguilar¹, Henrike Reinhard¹, Albert Zimmermann¹, David C. Johnson², Ofer Mandelboim³ and Hartmut Hengel¹

¹Institut für Virologie, ²Oregon Health and Science University, Portland, USA., ³The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel

Receptors for the Fc-domain of IgGs (Fc γ Rs) are expressed on the surface of immune cells. By linking cell-mediated and humoral immune responses Fc γ Rs play a key role in host defenses against pathogens. The Fc γ Rs CD16, CD32 and CD64 differ strongly in their function, cellular expression profile and the ability to bind IgG subclasses.

We identified two human Cytomegalovirus (HCMV) glycoproteins, gp68 and gp34, to be encoded by *UL119-118* and *IRL11/TRL11*, respectively, and to exhibit Fc binding properties on the surface of HCMV-infected cells, thus constituting viral Fc γ R (vFc γ Rs) (1). Likewise, herpes simplex virus (HSV) forms a heterodimeric vFc γ R, the gE/gI complex (2).

To elucidate the potential interference of the vFc Rs with distinct IgG-mediated effector functions, virus neutralization and complement-mediated virolysis assays were performed. gE deletion slightly enhanced HSV neutralization by IgG and improved complement dependent virolysis. In clear contrast, gp68 and gp34 failed to protect HCMV virions from neutralization and complement mediated virolysis. Rather, HCMV vFc R enhanced the neutralizing efficiency of HCMV-specific IgG. To prove a possible inhibition of host Fc γ Rs through vFc Rs, a novel BW5147 hybridoma-based Fc R activation assay was established measuring virus-specific CD16, CD32 and CD64-mediated IgG responses. Commercially available intravenous IgG pools were used as a source of antiviral IgG. Based on a panel of targeted HCMV and HSV gene deletion mutants (loss of function approach) and vaccinia recombinants expressing HCMV gp68, HCMV gp34 and HSV gE (gain of function approach) we found that HCMV gp68 inhibition affects activation and downstream signaling of CD16 > CD32 > CD64, while gp34 attenuates CD64 > CD16 > CD32. In clear contrast, HSV gE impairs mainly CD 16 activation and weakly CD32, but has no effect on CD64. Taken together, our data uncover herpesviral Fc Rs as hierarchical and redundant antagonists precluding host Fc Rs from triggering immune responses.

Ref. 1: Atalay, R et al., J. Virol. 76: 8595-8606 (2002)

Ref. 2: Dubin et al. J. Virol. 64: 2725-31 (1990)

AG Joseph Huston**NMDA receptors and episodic-like memory in the rodent.**

Dere Ekrem, Joseph Huston

Institute of Physiological Psychology, E-mail: dere@uni-duesseldorf.de

Rats and mice are attracted by novel objects. Exploration of a novel object leaves a complex memory trace akin to human episodic memory. In rodents, episodic-like memory (ELM) can be inferred from behavior which indicates the remembrance of the content (“what” kind of object was presented), place (“where” was this object placed) and temporal context (“when” was the object presented) after an unique episode. Most importantly, rodents behave as there is an interaction between temporal- and spatial information in their ELM, suggesting that they have established an integrated memory for unique experiences comprising “what”, “where” and “when” information. N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA-R) have been implicated in some forms of hippocampal synaptic plasticity and learning and memory. The NMDA-R is well suited to associate multiple features of an event to represent an episode or event. We have asked whether NMDA-R modulation by d-cycloserine (DCS), a glycine-site agonist and cognitive enhancer, has promnestic effects on ELM under sub-optimal learning conditions, induced by either stress or pro/retroactive memory interference. Mild acute stress induced by an i.p. saline injection prior to the learning trials disturbed ELM in rats. DCS (15-mg/kg, i.p.) ameliorated this stress-induced deficit, but was not able to fully restore ELM. Using an experimental protocol designed to detect promnestic drug effects in mice, we found that DCS, can induce ELM under conditions where animals regularly fail to establish an ELM. Mice treated with DCS (20-mg/kg, i.p.) both remembered the temporal order in which two different objects have been encountered, their spatial position, and showed the predicted type of interaction between temporal and spatial information typical for ELM. In conclusion, it appears that the NMDA-R is critically involved in ELM formation in rodents. Supported by the BMFZ, DFG-grants DE 1149/1-1 and DE 1149/1-2 to ED.

AG Antonia Jousen**Transplantation of Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in a Model of Experimental Choroidal Neovascularization**

Irina Semkova, Norbert Kociok, Antonia M. Jousen

Department of Experimental Ophthalmology, Eye Hospital.

Choroidal neovascularization (CNV) is responsible for the severe visual loss in age-related macular degeneration. Inflammatory mechanisms and immune activation have been implicated in the pathogenesis of CNV. Infiltrating macrophages seem to play a critical role in the pathogenesis of CNV by secreting different angiogenic and inflammatory growth factors and cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α). In our study we attempted to

investigate whether TNF- α signalling through receptor p75 may influence the recruitment and incorporation of bone marrow-derived hematopoietic stem cells to the CNV lesions. We used knock-out mice that lack TNF receptor p75 (TNFRp75 $^{-/-}$) to investigate the development of CNV lesions after transplantation of whole bone marrow and purified endothelial progenitor cells (EPCs) in comparison to wild type mice.

Lethally irradiated adult TNFRp75 $^{-/-}$ transgene as well as wild type mice were used as recipients for bone marrow transplantation. Whole bone marrow cells were obtained from gfp $^{+}$ -transgenic mice and injected into the tail vein of recipient mice. CNV was induced by 4-5 separate laser burns of each eye.

One month after transplantation, FACS analysis showed 70% Gfp $^{+}$ -circulating cells in recipient mice. Some gfp $^{+}$ -cells with branching processes (F4/80-positive) were observed to infiltrate the overlying neurosensory retina. The most of gfp $^{+}$ -cells were localized within and around the edge of CNV lesions, but no gfp $^{+}$ -cells were observed on the non-damaged choriocapillaris. Many gfp $^{+}$ -cells in the both groups were integrated into the neovascular tissue. The number of the scars, as well as their size and the fluorescence intensity, was reduced on flatmounts obtained from TNFRp75 $^{-/-}$ recipient mice.

Laser injury caused an enhanced bone marrow-cell recruitment to the CNV lesions in wild type in comparison to the TNFRp75 $^{-/-}$ knock-out mice. In wild type mice many of the transplanted cells were incorporated to the neovascular tissue and contributed to the development of CNV lesions. CNV formation and incorporation of transplanted cells was reduced in transgenic mice that lack TNFRp75 in comparison to the wild type mice. This suggests the importance of TNFRp75 $^{-/-}$ signalling in the development of CNV.

AG Oliver Klotz

Modulation of selenium homeostasis by insulin via FoxO transcription factors

Lars-Oliver Klotz

Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF), LarsOliver.Klotz@uni-duesseldorf.de

Selenoprotein P (SeP) is a pivotal selenium transporter in plasma, supplying extrahepatic tissues with selenium, thus allowing for the production of Se-dependent antioxidant enzymes such as glutathione peroxidases.

A transcriptional regulation of SeP production by the forkhead box transcription factor FoxO1a was demonstrated in reporter gene assays using the human SeP promoter as well as point and deletion mutants thereof, by RT-PCR and at the level of selenite-induced release of SeP from human hepatoma cells.

Insulin, stimulating the phosphorylation and inactivation of FoxO1a via phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and the Ser/Thr-kinase Akt, suppressed SeP release from hepatoma cells. This suppressive effect of insulin on SeP expression was attenuated by inhibitors of PI3K.

Hence, we propose that selenium homeostasis is modulated by insulin signaling via hepatic SeP expression being regulated by FoxO1a.

Insulin-like signaling is stimulated by stressful stimuli, including ROS, UV radiation and heavy metal ions. Exposure of human and rat hepatoma cells to Cu(II) or Zn(II) resulted in a PI3K/Akt-dependent phosphorylation, inactivation and nuclear exclusion of transcription factors of the FoxO family as well as an impairment of FoxO target gene expression.

In summary, the SeP gene is a novel target of the PI3K/Akt/FoxO cascade. Due to the prominent role of SeP in selenium transport, regulation of SeP expression by FoxO1a establishes a novel link between insulin signaling and selenium homeostasis. Moreover, exposure of cells to stressful stimuli imitates insulin signaling, suggesting a link between cell stress and selenium homeostasis.

Support: Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 575/B4, SFB 728/B3)

AG Karl Köhrer

Aufgaben und Leistungen des Molekularbiologischen Zentrallabors

Karl Köhrer

Molekularbiologisches Zentrallabor 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 sollen die Zentrallaboratorien sowohl eigene Forschungsprojekte bearbeiten als auch neue, moderne, bioanalytische Verfahren etablieren, 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 soll die Bearbeitung bioanalytischer Fragestellungen mit modernen Technologien ermöglicht und effizient gestaltet werden.

Der Schwerpunkt der Arbeiten im Molekularbiologischen Zentrallabor (MZL) liegt in der Nukleinsäureanalytik. In den letzten Jahren wurde dieser Bereich durch die Etablierung weiterer, wichtiger Standard- und Spezialverfahren der Bioanalytik ausgebaut. So ist es heute möglich, mit Hilfe eines roboterunterstützten Systems (QIAGEN BioRobot[®] 3000) Nukleinsäuren im Mikrotiterplattenmaßstab (96 Proben) zu isolieren und aufzureinigen. Die anschließende Quantifizierung bzw. Qualitätskontrolle erfolgt über ein Mikrotiterplattenphotometer (Molecular Devices SpectraMax 190). Einzelne DNA-Sequenzierungsansätze werden per Hand durchgeführt, im Falle von Paralleluntersuchungen und Projekten mit höherem Durchsatz hingegen im Mikrotiterplattenmaßstab von einem Roboter (Beckman Biomek[®] 3000) pipettiert. Die Analyse der DNA-Sequenzreaktionen erfolgt auf einem ABI 3130XL Genetic Analyzer (16 Kapillarsequenziergerät). DNA-Fragmentlängenanalysen, wie z.B. MLPA-Analysen (Multiplex ligation-dependent probe ampli-

cation) laufen auf einem zweiten ABI 3130XL Genetic Analyzer, bestückt mit 16 kürzeren Kapillaren.

Der zweite Schwerpunkt unserer Arbeiten konzentriert sich auf den Bereich der Genexpressionsanalyse. Seit Juni 2001 betreiben wir ein DNA-Microarraylabor, in dem sämtliche Geräte zur Herstellung und Auswertung von Microarrays bereitstehen und in routinemäßigem Betrieb sind (GMS 417 und Genetix QArray2 Mikro-Array-Spotter, ASP Hybridisier- und Waschstation, Fuji FLA 8000 und GenePix 4000B Fluoreszenz-Reader, Microarray-spezifische Softwarepakete). Mit dem Nanodrop® ND-1000 Spektralphotometer und dem Agilent BioAnalyzer 2100 haben wir zwei weitere, wichtige Geräte für hochsensitive RNA-Analysen integriert. Mit diesen beiden Geräten sind wir in der Lage, wenige Nanogramm an Nukleinsäure in einem Mikroliter Probenvolumen quantitativ und qualitativ zu erfassen. Seit Inbetriebnahme des Microarray-Labors haben wir zusammen mit Arbeitsgruppen im BMFZ mehrere subgenomische (Maus, Ratte) und genomweite, PCR-Fragment (*Chlamydia pneumoniae*) und/oder Oligonukleotid-basierte Microarrays (Maus) hergestellt und erfolgreich genutzt. Unter anderem zur Verifizierung von Microarray Ergebnissen betreiben wir im MZL ein Real-Time PCR-System (ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System), das auch interessierten Nutzern zur Verfügung steht.

Neben den bisher genannten, nukleinsäureanalytischen Arbeiten führen wir auch eigene, Drittmittel-geförderte Forschungsprojekte durch. In einem BMBF-Projekt zur Generierung humaner Gateway® Entry Klone nutzen wir die im BMFZ vorhandene Technologieplattform zur systematischen Funktionsanalyse (NGFN-2; www.dkfz.de/smp-cell/cell.org/). In einem anderen, von der DFG geförderten Projekt (TP A6 im SFB 575; www.uni-duesseldorf.de/sfb575/) untersuchen wir gezielt die molekulare Funktion der humanen VPS4 Proteine und deren Interaktionspartner. Zusammen mit der Fa. Celonics (Jülich) etablieren wir im Rahmen eines vom BMWi/AiF geförderten ProInno II-Projektes effiziente Verfahren zur Charakterisierung stabiler, eukaryontischer Expressionsklone.

Mitarbeiter:

Dr. Andreas Beyer (z.Z. Vertreter von Frau Dr. Scheuring), Sibylle Müller (BTA), Beate Weller (BTA).

AG Jean Krutmann

Die Rolle der Ceramide bei der UV-vermittelten Signaltransduktion in der Haut

Grether-Beck, Jean Krutmann
Zellbiologie, IUF

Ein Schwerpunkt der Arbeiten liegt bei der Analyse der photobiologischen und molekularen Grundlagen der Induktion von Genexpression durch ultraviolette Strahlung im langwelligen UVA-Bereich (320-400 nm). Diese Strahlung führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere Singulett-Sauerstoff, die in den Membranmikrodomänen (Rafts) der Zellmembran zur Bildung von Ceramiden führt. Letztere können dann über die Aktivierung von nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen aus der Src-Familie zur Aktivierung des cholesterolbindenden Raft-Markerproteins Caveolin-1 an Tyrosin 14 führen. Hemmung der Ceramidbildung durch Singulett-Sauerstoffquencher oder membranstabilisierende Osmolyte, aber auch Hemmung der SRC-Kinase-Familie oder retroviral getriebener Knockout des Caveolin-1 führen zur Hemmung der UVA-induzierten Genexpression am Modell des Entzündungsmarkers ICAM-1. Die UVA-Antwort hängt aber nicht nur vom Gehalt an Ceramiden ab, sondern wird auch durch den Gehalt an Cholesterol bestimmt. So führt eine Verminderung von Cholesterol durch Lipidsenker aber auch durch Extraktion aus der Membran zur Verstärkung der Genexpression, während eine Cholesterolvorbehandlung die UVA-induzierte Aufregulation vollständig hemmt. Eingehende Untersuchungen dieser Signalkaskade haben gezeigt, dass die UVA-Antwort von dem Verhältnis von Cholesterol und Sphingomyelin in den Membranmikrodomänen abhängt. Physikochemische Untersuchungen an isolierten synthetischen Membrandomänen haben gezeigt, dass Ceramide eine höhere Affinität für das Sphingomyelin haben als das Cholesterol und somit letzteres aus seiner engen Assoziation mit dem Phospholipid verdrängen. Unsere Untersuchungen an Rafts aus Ceramid-behandelten Keratinozyten bestätigen dies *in vivo*.

Die Wechselwirkung von langwelliger UVA (320-400 nm) und kurzwelliger UVB (280-320 nm) stehen in einem weiteren Projekt zur UV-vermittelten Regulation der MAP-Kinasen und der Matrixmetalloproteinase-1 im Vordergrund. So kann Interessanterweise eine Kombinationsbestrahlung mit UVA + UVB die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 hemmen, wobei auch die Ceramide eine wichtige Rolle spielen.

Zudem untersuchen wir, inwieweit Signalceramide neben ihrer genregulierenden Funktion in basalen Keratinozyten auch an der Bildung der Hautbarriere *in vitro* wie *in vivo* beteiligt sein können.

Functional role for newly identified proteins in the mitochondria – functional role in endothelial cell apoptosis and migration

Judith Haendeler
IUF

Surrounded by their own membrane, mitochondria are thought to have once been free-living bacteria that were swallowed up by other single cell organisms some 2 billion years ago. Today, every cell in our body contains mitochondria, tiny organelles that produce the cells' energy, but have also been suggested as signalling organelles. Recently, 399 proteins were identified in mouse mitochondria, 150 of them were never associated with mitochondria before. Several studies suggested that protein translocation is a major mechanism for modulating the functional capacity of cells. Mitochondrial energy metabolism was associated with apoptosis, mitochondrial reactive oxygen species formation and migratory capacity of cells. Therefore, the aim of this study was to identify whether molecular links exists between mitochondria energy metabolism and cellular function. First, we identified telomerase reverse transcriptase (TERT) in the mitochondria. TERT is imported into the mitochondria via the translocase of outer membrane 20 (Tom20) and the translocase of inner membrane 23 (Tim 23). TERT binds to mitochondrial DNA at the coding region for ND1 and ND2. Binding of TERT to mitochondrial DNA protects against UV light induced damage. The binding and protection of mitochondrial DNA by TERT is independent of its reverse transcriptase activity. Serum-induced respiratory chain activity is only increased in cells overexpressing TERT wildtype, but not the reverse transcriptase dead mutant TERT(D868A). TERT wildtype, but not TERT(D868A), reduced ethidium bromide-induced mitochondrial reactive oxygen species. Strikingly, mitochondrially targeted TERT and not nuclear targeted TERT revealed the most prominent protective effect on H₂O₂-induced apoptosis. Secondly, we identified that VEGF- and caffeine induced migration critically depends on mitochondrial function and on the mitochondrial translocation of p27/kip1 (p27) protein, originally discovered as cell cycle inhibitory protein. Reducing p27 by siRNA abrogated VEGF- and caffeine-induced migration. Targeted expression of p27 to the mitochondria stimulated mitochondrial ATP biosynthesis and increased the mitochondrial membrane potential. Strikingly, only mitochondrial but not nuclear p27 rescued the impaired migratory capacity after siRNA-mediated suppression of endogenous p27 protein expression.

In conclusion, these findings clearly indicate that the mitochondrion has a central role in cellular functions of cells beyond energy metabolism and determines the migratory capacity of endothelial cells which is a hallmark in the process of atherosclerosis. Thus, identifying novel proteins in the mitochondrion and elucidating how a mitochondrion remodels in response to changes in energy demands and in disease states will importantly contribute to our understanding of atherosclerosis and may provides new avenues for drug development.

AG Axel Methner

Mechanisms of GPR39 cell protection

Axel Methner
Neurologische Klinik

GPR39 is a constitutively active G-protein-coupled receptor capable of increasing serum-response-element (SRE) mediated transcription¹, which was recently controversially suggested to bind obestatin. GPR39 is upregulated in a hippocampal cell line resistant against diverse stimulators of cell death² and its overexpression protects against oxidative, endoplasmic reticulum (ER) and mitochondrial stress. GPR39 induces expression of RGS16 (inhibitor of G-protein signalling 16), which suggests coupling to G α 13³ and induction of SRE-mediated transcription by the small GTPase RhoA. Indeed, co-expression of GPR39 with RGS16 or dominant-negative RhoA abolished cell protection, whereas overexpression of SRF protected. Further downstream the signalling cascade, GPR39 overexpression leads to a concerted upregulation of the high mobility group transcription factor TNRC9 (trinucleotide repeat containing 9), first identified as a polyglutamine-containing protein, and Cited1, a transcriptional coregulator. We further present evidence for physical interaction between these two proteins at the conserved HMG-domain of TNRC9 and their synergistic mediation of GPR39's cytoprotection. Moreover, TNRC9 could be a crosslink between SRE and CRE signalling, as our data suggests a transcriptional complex of Cited1/TNRC9 and Creb. Finally TNRC9 and Cited induce the transcription of the neurotrophic factor PEDF.

AG Sabine Metzger

Imaging Massenspektrometrie: Ein neues Tool in der Bioanalytik

Sabine Metzger, Werner Bouschen
Analytisches Zentrallabor des BMFZ

Die massenspektrometrischen Methodenentwicklung und Etablierung neuer Methoden ist ein vornehmliches Ziel des Analytischen Zentrallabors. Methodenentwicklung in der Bioanalytik ist immer ein interdisziplinäres Arbeiten. Getrieben wird die Methodenentwicklung durch Fragestellungen aus der Biologie oder Medizin, die in Kombination mit der Physik und der Chemie zu ganz neuen Messmethodiken führen können.

Während der letzten 15 Jahre hat sich die MALDI-MS zu einer Routinemethode für die Analyse von Peptiden, Proteinen, DNA, Oligosacchariden und Polymeren entwickelt. Die direkte Untersuchungen von biologischen Proben wie Gewebe, Gewebeschnitten oder einzelne Zellen rückte in letzter Zeit immer mehr in den Fokus der *life science*.

Die ideale Messung solch eines heterogenen, biologischen Systems würde die zeitliche und räumliche Verteilung seiner chemischen Zusammensetzung beinhalten. Dies wird in

der neuen Technik der MALDI-Imaging Massenspektrometrie vereint. Hier wird die Information aus der räumlichen Verteilung, wie sie ein Mikroskop liefert, kombiniert mit den physikalisch-chemischen Informationen des Massenspektrometers.

Die Spotgröße des Lasers ist ein wichtiger Parameter für eine erfolgreiche Imaging-analyse. Sie bestimmt die laterale Auflösung, die Probenpräparation und die Empfindlichkeit des Massenspektrometers sowie eine gute Datenanalyse. Beide MALDI-Massenspektrometer des Analytische Zentrallabors (AZL) können und sollen auf diese Technik aufgerüstet werden, mit Unterschieden je nach Gerät in der lateralen Auflösung bzw. im Molekulargewichtsbereich.

Speziell das ALADIM-Instrument bietet die Möglichkeit biologische Proben mit unterschiedlicher Dicke und Größe zu analysieren. Mit seinem Laserfokus von 25 μm besitzt es einen im Vergleich zu kommerziellen Geräten einen fünfmal kleineren Fokus. Damit liegt die Auflösung des Gerätes im Bereich von biologische Strukturen wie z.B. einzelnen Zellen.

Um solch eine Auflösung zu erreichen, ist es notwendig, die Migration der Substanzmoleküle innerhalb der biologischen Probe so weit wie möglich zu minimieren. Unterschiedliche Gewebe wie Hirn, Muskel oder Wurzelgewebe aus Pflanzen erfordern deshalb aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung eine spezifische auf die jeweilige Probe adaptierte Matrixapplikation.

Mit der Etablierung der MALDI-Imaging Analyse stellt das AZL den Mitgliedern des BMFZ eine weitere hochaktuellen Technik im Bereich der Massenspektrometrie zur Verfügung.

AG Hans Werner Müller

Forschungsgruppe Molekulare Neurobiologie: Aktuelle Forschungsschwerpunkte

Hans Werner Müller

Molekulare Neurobiologie, Neurologische Klinik

Die Arbeitsgruppe befasst sich auf molekularer, zellulärer und Systemebene mit Fragen der Neuroregeneration im zentralen und peripheren Nervensystem. Sie entwickelt u.a. Therapiekonzepte zur Verbesserung des regenerativen Axonwachstums, der Neuroprotektion und funktionellen Erholung nach traumatischen Läsionen im Zentralnervensystem (Querschnittlähmung).

In einem zweiten Projekt werden an einem transgenen Mausmodell die Prozesse der molekularen Pathogenese bei der hereditären demyelinisierenden peripheren Charcot-Marie-Tooth Neuropathie (CMT1A) studiert. Dabei werden solche Gene identifiziert und funktionell charakterisiert, die schon frühzeitig während der späten embryonalen bzw. neonatalen Entwicklung in der Schwannzelle fehlreguliert werden und die Differenzierung bzw. Reifung dieser Zelle stören.

In einem weiteren Projekt wird das Potential von adulten pluripotenten Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut (USSC) zur neuronalen Differenzierung und ggf. Zellersatztherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen ausgelotet.

Nachfolgend sind die aktuellen Projekte der Arbeitsgruppe und ihre Kooperationen im BMFZ zusammengefasst:

Kooperation

Regeneration nach Hirn- und Rückenmarktrauma: Methner	T. Grune, F. Schliess, B. Görg, A.
Molekularbiologie axonaler Regeneration:	BMFZ: Mol.biol. Zentrallabor
Neurobiologische Funktionen von SDF-1 und GIP:	C. Rose
Pathomechanismus demyelinisierender Neuropathien (CMT1A):	H.-P. Hartung
Neurale Differenzierung multipotenter	K. Gottmann, C. Rose, A.
Stammzellen aus Nabelschnurblut: Wernet	DeSouza-Silva, G. Kögler, P.

AG Bernd Nürnberg

RhoGTPasen und Tumorinvasion: Mechanismen und Netzwerke

Reza Ahmadian

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

Die Mitglieder der Ras- und Rho-Familien gehören zu den kleinen monomeren GTPasen, die als molekulare Schalter normalerweise einen Zyklus zwischen dem inaktiven, GDP- und dem aktiven GTP-gebundenen Zustand durchlaufen. Sie unterliegen einer stringenten Kontrolle, in der die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) als Aktivatoren den GDP/GTP-Austausch katalysieren und die GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) als Inaktivatoren die GTP-Hydrolysereaktion beschleunigen. Effektormoleküle binden an die aktivierte GTPase und leiten dabei das empfangene Signal weiter. Auf diese Weise sind die Ras- und Rho-GTPasen als Schlüsselmediatoren der Signaltransduktion an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Im Gegensatz zum Ras-Protoonkogen, das bei 30% aller menschlichen Tumoren mutiert ist, sind interessanterweise keine Mutationen in den Genen der Rho-GTPasen beschrieben worden. In den Genen ihrer Regulatoren (GEFs/GAPs) sind solche Mutationen allerdings bekannt. Ein fehlregulierter "ON-OFF" Zyklus ist die Folge, was eine permanente Aktivierung oder eine verzögerte Inaktivierung dieser Proteine nach sich zieht. Hyperaktivierung von Rho-GTPasen ist die potenzielle Ursache für eine lang anhaltende Verstärkung der Signalübertragung (z.B. Rho/ROCK-Signalwege) und folglich für die pathophysiologischen Ras- und Rho-Funktionen in der Tumorprogression, -invasion und -metastasierung. Umfassenden Untersuchungen an

GAP-stimulierten Reaktionsmechanismus führten bereits zur Identifizierung erster Ras-spezifischer GTP-Hydrolyse beschleunigenden Substanzen, die in der Lage sind, das konstitutiv-aktive Ras-Onkogen selektiv zu inaktivieren. Dieses bewährte Konzept der „Mechanismus-basierten Target- und Wirkstoff-Identifizierung“ wenden wir auch für die Tumor-assoziierten Rho-Regulatoren an, erstens um neue regulatorische sowie strukturelle Elemente der Rho-abhängigen Signaltransduktion als mögliche Angriffspunkte von Therapeutika aufzuschlüsseln, und zweitens, um neue Anti-Krebs-Wirkstoffe im Rahmen einer translationalen Forschung zu entwickeln.

Funktion G_i-abhängiger Signalwege im kardiovaskulären System

Bernd Nürnberg, Roland Piekorz

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

Die Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G_i-Proteine G_{i2} und G_{i3} sind wichtige Komponenten der Signalkaskade kardiovaskulär wirksamer Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. den cholinergen oder adrenergen Rezeptoren. Zellbiologische Studien lassen einen hohen Grad an Spezifität und Selektivität von G_i-Proteinen in ihrer Interaktion mit Rezeptoren und Effektoren vermuten. Im Tier führt ihre unselektive Inaktivierung durch PTX zu Fehlregulationen, während die konstitutive Deletion singulärer G α_i -kodierender Gene relativ milde Phänotypen zur Folge hat. Dies lässt auf redundante Rollen von G_i-Isoformen schließen. Unterstützt wird diese Annahme durch unsere Beobachtung, dass die gleichzeitige konstitutive Deletion der Gene für G α_{i2} und G α_{i3} eine frühe embryonale Letalität verursacht, während Mäuse mit einem Gnai2^{-/-}/Gnai3^{+/-}-Genotyp spät-embryonal/perinatal versterben. Um die Funktion und Isoform-Spezifität von G_i-Proteinen im Kardiovaskularsystem umfassend zu analysieren, verfolgen wir die folgenden Ziele: (1) Basale und pharmakologische Phänotypisierung kardiovaskulärer Parameter in G α_i -defizienten Mauslinien mit Hilfe telemetrischer Verfahren; (2) Untersuchung der embryonalen oder perinatalen Letalität von Mäusen mit unterschiedlichen Gnai2/Gnai3-Genotypen auf mögliche kardiovaskuläre Entwicklungs- und/oder Funktionsstörungen; (3) Analyse der kardiovaskulären Rolle von G_i-Proteinen in solchen Mausstämmen, in denen das Gnai3-Gen selektiv in Kardiomyozyten bzw. in Endothelzellen oder glatten Muskelzellen auf einem bereits vorhandenen Gnai2-defizienten genetischen Hintergrund postnatal deletiert wird; und (4) Charakterisierung neuartiger Schutzfunktionen von G_i-Proteinen im Herz-Kreislaufsystem. Hier konnten wir in zurückliegenden Untersuchungen zeigen, dass G α_{i2} -defiziente Mäuse eine unerwartete und stark erhöhte Anfälligkeit für zerebrale Ischämien nach einseitiger Carotisligatur aufweisen. Interessanterweise tritt die beobachtete Schlaganfall-symptomatik auch in carotisligierten Wildtyptieren auf, in denen G_i-Proteine pharmakologisch durch vorherige Pertussistoxingabe vom Rezeptor entkoppelt und somit funktionell inaktiviert worden sind. Ob dieser Phänotyp grundlegend durch einen veränderten vaskulären Tonus aufgrund einer gestörten Signaltransduktion vasoaktiver, G_i-protein-gekoppelter Rezeptoren bedingt ist, wird in aktuellen Untersuchungen geprüft. Das Projekt soll insgesamt zum Verständnis der Funktion von G_i-Proteinen im Kardiovaskularsystem beitragen.

Comprehensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense

Klaus Pfeffer

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Interferon γ (IFN- γ) orchestrates a potent anti-microbial host response. However, the underlying molecular basis for this immunological defense system is largely unknown. In a systematic approach to identify IFN- γ regulated host effector molecules, a notable number of transcripts with consensus GTP binding motives were obtained. Further extensive transcriptome and genome analyses identified five novel family members of murine guanylate binding proteins (mGBPs) now designated mGBP6, 7, 8, 9, and 10. Moreover, in this study all ten mGBP members (mGBP1-10) were comprehensively characterized. mGBPs are selectively upregulated *in vitro* by a set of proinflammatory cytokines and toll-like receptor agonists as well as *in vivo* after *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infection. After IFN- γ stimulation mGBP1, 2, 3, 6, 7, and 9 are associated with intracellular toxoplasma parasites and, interestingly, virulent toxoplasmas interfere with mGBP recruitment. Taken together, mGBPs comprise an important set of host defense molecules.

AG Guido Reifenberger

Role of aberrant microRNA expression in the progression of astrocytic gliomas

Bastian Malzkorn, Marietta Wolter and Guido Reifenberger

Department of Neuropathology

MicroRNAs (miRNAs) are small, single-stranded, non-coding RNA molecules that play a major role in the negative regulation of gene expression by translational inhibition or destabilization of mRNAs. MiRNA genes are transcribed as primary miRNA transcripts and processed to ~ 22 nucleotide mature miRNAs. A specific miRNA can down-regulate multiple target genes simultaneously and therefore, miRNAs serve as global regulators of gene expression. MiRNAs have key roles in development and are likely to be important mediators of neuronal plasticity. In our study, we started to investigate the role of microRNAs in the progression of astrocytic tumours. By real-time-stemloop-RT-PCR we analysed the expression of 158 miRNAs in 4 patients with primary low-grade gliomas WHO grade II that recurred as secondary glioblastomas. We identified 18 miRNAs exhibiting a progression-associated up-regulation (eg *hsa-miR-17-5p*) and one miRNA (*hsa-miR-184*) with a progression-associated down-regulation in at least 3 of 4 tumor pairs. The progression-associated expression differences were validated in four additional pairs of low grade primary and high grade recurrent tumours as well as in an independent series of 48

gliomas. The transfection of synthetic *hsa-miR-184* precursor-molecules or of *anti-hsa-miR-17-5p* antagomirs into glioma cells led to a 30-60 % reduction in cell viability of transfected cells compared to cells transfected with negative controls. In addition, *hsa-miR-184* significantly decreased proliferation and increased apoptosis in A172 cells. Experiments aiming at the identification of target genes regulated by *hsa-miR-184* and *hsa-miR-17-5p* are ongoing.

AG Detlev Riesner

Entwicklung einer diagnostischen Methode zum Nachweis Partikel-assoziiertes Erkränkungen wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und der Alzheimerschen Demenz

Eva Birkmann, Aileen Funke, Dieter Willbold & Detlev Riesner
Institut für physikalische Biologie

Bei Partikel-assoziierten Erkränkungen treten Proteinpartikel im Krankheitsverlauf als Symptom, bei Prionkrankheiten sogar als Erreger auf. Die Zusammensetzung und die Proteine, welche die Partikel bilden, sind bei den verschiedenen Krankheiten unterschiedlich.

In diesem Projekt wurde ein neuartiger diagnostischer Ansatz zum Nachweis von Krankheits-assoziierten Proteinpartikeln als hochempfindlicher Prion-Nachweis entwickelt und wird im weiteren Verlauf des Projektes optimiert und auf die Anwendbarkeit zur Diagnose weitere partikelassoziierter Krankheiten im Speziellen der Alzheimerschen Demenz getestet werden.

Dieser hochspezifische diagnostische Ansatz basiert auf einem Einzelpartikelnachweis, so dass die Methode das Potential hat, sogar einen einzigen Proteinpartikel nachweisen zu können. Dies eröffnet völlig neue Wege zu einer sehr sensitiven Frühdiagnostik, da in frühen Krankheitsstadien die Konzentration der krankheitsassozierten Partikel sehr gering ist. Alle bisher angewendeten diagnostischen Ansätze basieren auf der Summierung von Gesamtsignalen der zu untersuchenden Probe. Daher ist in solchen Ansätzen der Nachweis von einem einzigen Partikel höchst unwahrscheinlich.

Im Verlaufe des Forschungsprojektes wurde zunächst die Methodik namens „surface-FIDA“ zum Nachweis von einzelnen Partikeln, welche auf einer Oberfläche immobilisiert werden, entwickelt. Die immobilisierten Partikel werden durch verschiedenen fluoreszenzmarkierte Antikörper, welche in hoher Anzahl an die Partikel binden, markiert. Anschließend können Fluoreszenzintensitätsverteilungen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) untersucht werden und die Partikel anhand korrelierender Fluoreszenzpeaks identifiziert werden.

Die Anwendbarkeit dieses neuen diagnostischen Ansatzes konnte am Nachweis von Prionpartikeln, dem Erreger von Prion-Krankheiten für BSE und Scrapie bereits bestätigt werden. Die Übertragung des diagnostischen Systems auf die Alzheimersche Demenz lieferte auch bereits sehr viel versprechende Ergebnisse.

AG Christine Rose

Sodium Signals induced by glutamatergic transmission in Cerebellar Purkinje Neurons and Bergmann Glial Cells

Christine R. Rose

Institute for Neurobiology

In the central nervous system, the extracellular concentration of glutamate is regulated by specific transporters, termed EAAT 1-5 (excitatory amino acid transporters 1-5). EAAT`s are electrogenic and mainly use the electrochemical gradient of sodium to move glutamate into the cells. Glial cells predominantly express EAAT1 (GLAST) and EAAT2 (GLT-1), and play a central role in glutamate clearance by limiting glutamate diffusion. Using combined electrophysiological and quantitative imaging techniques in mouse cerebellar slices, we now demonstrate that both exogenous application of glutamate as well as short burst synaptic activity induce sodium transients in the mM range in the processes of Bergmann glial cells and Purkinje neurons. Whereas Purkinje cells' sodium transients are mainly caused by activation of AMPA receptors, glial sodium transients, in contrast, are mainly caused by the influx of sodium during inward transport of glutamate. Sodium signals in Purkinje cell dendrites have much faster kinetics as compared to glial sodium signals, which persist for tens of seconds. Based on our findings, we present a model which indicates that sodium transients in Bergmann glial cells, in concert with a membrane depolarisation and changes in the concentrations of other transported ions, result in a long-lasting reduction of the driving force for glial glutamate uptake at active synapses in the cerebellum. Thus, they might provide a negative feedback mechanism by promoting the diffusion of glutamate and the activation of extrasynaptic glutamate receptors following repetitive activity.

AG Heiner Schaal

Das "MS2-Tethering" System: Ein Werkzeug zur Analyse der Spleißregulation und Exonerkennung

Heiner Schaal

Institut für Virologie

Die Ausbildung von Spleißosomen an den Spleißstellen wird durch spleißregulatorische Proteine unterstützt, die an *cis*-agierenden Elementen im Exon oder Intron binden. Sie wirken dabei als Anschalt- oder Abschaltelinrichtung, wodurch die Erkennung der Spleißstellen entweder gefördert oder unterdrückt werden kann. Im Mittelpunkt der hier vorgestellten Ergebnisse steht ein experimentelles System mit dessen Hilfe sich ein beliebiges RNA-bindendes Protein gezielt an eine bestimmte Position auf dem Transkript rekrutieren lässt und der Effekt dieser Bindung auf die prä-mRNA Spleißregulation untersucht werden kann. Hierzu wurde für transiente Transfektionsexperimente in Säugerzelllinien ein HIV-1 basiertes 4-Exon Minigenkonstrukt generiert, das die HIV-1 nicht-kodierenden Leader Exons 2 und 3 enthält. Die exonischen Spleißenhancer und Silencer innerhalb der Exons wurden durch die RNA-Bindeplätze für die Bakteriophagen Hüllproteine

PP7 und MS2 ausgetauscht. Der Austausch ermöglichte die selektive Erkennung der Exons durch Koexpression von PP7- und MS2 Fusionsproteinen mit entsprechenden spleißregulatorischen Proteindomänen und somit eine Untersuchung ihrer kombinatorischen Wirkung auf das Spleißmuster. Zusätzlich wurde mittels Mutationsanalyse des Bakteriophagen MS2-Hüllproteins nach Mutationen gescreent, die bei gleicher Proteindomäne, eine effizientere Spleißstellennutzung erlauben.

AG Rüdiger E. Scharf

Plättchen-Rezeptorpolymorphismen, Adhäsion und arterielle Thrombogenese: Einfluss thrombozytärer Integrinvarianten auf die Plättchen-Gefäßwand-Interaktion unter dynamischen Flussbedingungen

Rüdiger E. Scharf, Volker R. Stoldt, Marianna Gyenes, Marcus Stockschläder, Rainer B. Zotz

Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin

Genetisch determinierte Varianten der thrombozytären Integrine α IIb β 3 und α 2 β 1 können die Oberflächenexpression oder Ligandenbindungsfunktion dieser Rezeptoren in einer Weise modulieren, dass eine gesteigerte Thrombogenität mit erhöhter Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen resultiert. In klinisch-molekularepidemiologischen Studien haben wir gezeigt, dass die HPA-1b-Variante (β 3 T1565C) des Fibrinogenrezeptors α IIb β 3 und die α 2 807TT-Variante des Kollagenrezeptors α 2 β 1 mit prothrombotischen Zuständen assoziiert sind und Risikodeterminanten für akute Koronarsyndrome darstellen. So haben wir kürzlich belegt, dass Träger der Genotypen HPA-1b bzw. α 2 807TT unter KHK-Patienten im Median 5.2 bzw. 6.3 Jahre jünger bei Manifestation ihres Myokardinfarkts sind als Individuen mit den „wildtype“ Genotypen HPA-1a bzw. α 2 807CT oder α 2 807CC. Zur phänotypischen Charakterisierung der thrombozytären Rezeptorvarianten führen wir Experimente im antikoagulierten Vollblut unter flussdynamischen Bedingungen an einem Modellsystem durch, das arterielle Strömungsbedingungen simuliert und Untersuchungen zur scherkraftinduzierten Plättchenadhäsion und Thrombusbildung an reaktiven Oberflächen erlaubt. Hierzu wird eine mit thrombogenen Matrices beschichtete Strömungskammer eingebracht. Plättchenadhäsion und Thrombusbildung werden in Relation zu den kritischen Rezeptorpolymorphismen unter „real time“-Bedingungen mit Epifluoreszenz-Videomikroskopie aufgezeichnet. Mit dieser Technik haben wir demonstriert, dass HPA-1b/1b-Plättchen bei Scherraten von 500 und 1.500 sec⁻¹ eine um 40% höhere Adhäsionsrate an immobilisiertes Fibrinogen als HPA-1a-positive Plättchen aufweisen (p< 0.04) und dass die Adhäsionsaktivität der α 2 807TT-Variante des α 2 β 1-Rezeptors an Kollagen im Mittel um 60% höher ist als beim hetero- oder homozygoten α 2 807C-Genotyp (p<0.05). Zur Quantifizierung der Thrombusbildung in vitro setzen wir ein 4D-Imaging-Verfahren ein, das eine exakte volumetrische Bestimmung von Thromben im Flusskammer-System erlaubt. Hierzu dient ein „Voxel“-basiertes Analyseverfahren, mit dem 4-dimensionale Daten, also Zeitfolgen von Volumina, ausgewertet werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens haben wir zeigen können, dass die Volumina der Einzelthromben bei HPA-1b-Plättchen signifikant

größer sind als bei HPA-1a-Plättchen ($p < 0.01$). Das prothrombotische Funktionsverhalten von HPA-1b haben wir auch nach rekombinanter Überexpression der α IIb β 3-Varianten in CHO-Zellen belegen können. Unter flussdynamischen Bedingungen ist die Adhäsionsrate von HPA-1b-CHO-Zellen an Fibrinogen doppelt so hoch wie die der HPA-1a-Isoform. Dieser Befund lässt sich auch durch „Displacement“-Experimente bestätigen: Transfizierte CHO-Zellen werden bei niedriger Scherrate ($50\text{-}150\text{ sec}^{-1}$) zunächst zur Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen gebracht und dann höheren Scherraten exponiert. Hierbei zeigt sich, dass HPA-1b-CHO-Zellen eine signifikant höhere Adhäsionsstabilität gegenüber wandnahen Scherraten bis 500 sec^{-1} aufweisen als HPA-1a-Zellen ($p < 0.001$). Zur weiteren Charakterisierung der Genotyp-Phänotyp-Beziehung befassen wir uns gegenwärtig damit, die biochemische Natur des Funktionsverhaltens der prothrombotischen Rezeptorvarianten tiefergehend zu analysieren. Hierzu untersuchen wir α IIb β 3-abhängige Tyrosinkinasen (Src, Syk, Csk), die konstitutiv mit dem Integrin assoziiert sind. Unser Interesse gilt außerdem Signalmodulen, die an Talin gekoppelt sind. Dieses aktinbindende Protein nimmt als strukturelles und funktionelles Bindeglied zwischen Integrinen und Zytoskelett eine Schlüsselrolle für die Signal- und Mechanotransduktion ein. Zur weiteren Untersuchung verfolgen wir zwei Strategien: (1) Konstruktion und stabile Expression photoaktivierbarer Fluoreszenzproteine, fusioniert mit der α - und β -Untereinheit beider HPA-1-Varianten, in CHO-Zellen und (2) Generierung eines Talin-Knockdown-Modells. Aus nachfolgenden Experimenten zur Lateralmobilität des Integrins in der Zellmembran mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer und dem Vergleich des Talin-Knockdown-Modells mit Kontroll-Transfektanten erwarten wir grundlegende Aufschlüsse zur Mechanotransduktion und ihrer Modulation in Relation zu den Integrin-Rezeptorvarianten.

AG Wolfgang Schulz

Bedeutung der NF κ B-Aktivität für das Überleben von Karzinomzellen in Suspension

W.A. Schulz¹, A. Meyer^{1,2}, S. Pohlmann², A. Sato¹, H.H. Seifert¹, C. Steinhoff³, K. Schulze-Osthoff²

¹Urologische Klinik, ²Institut für Molekulare Medizin, ³MPI für Molekulare Genetik, Berlin

Ein wesentliches Problem bei der Behandlung von Harnblasenkarzinomen (Urothelkarzinomen) stellen häufige Lokalrezidive dar, die sich u.a. durch Aussaat von Zellen über den Urin bilden. Dazu müssen die Tumorzellen über die Fähigkeit verfügen, in Suspension zu überleben und sich an das Gewebe wieder anzuheften. Wir sind der Hypothese nachgegangen, dass dafür die Aktivierung antiapoptotischer Signalwege notwendig ist. Für die Experimente wurden zwei Harnblasenkarzinomzelllinien verwendet, die eine partielle oder konstitutive Aktivierung des PI3K-Signalwegs aufwiesen. Sie wurden von der Kulturschale abgeschabt, 90 min in Bakterienkulturen inkubiert und dann wieder ausgesät. Ein erheblicher Anteil beider Tumorzelllinien wuchs nach dieser Prozedur wieder an, nicht dagegen normale Urothelzellen. Inhibition des PI3K-Signalwegs mittels Ly294002 oder Rapamycin während der 90 min Inkubationszeit verhinderte das Anwachsen nicht. Dagegen waren

zwei Inhibitoren der NF κ B-aktivierenden Kinase IKK äußerst wirksam bei Konzentrationen, die selbst bei kontinuierlicher Gabe keinen Einfluss auf die Vermehrung der Tumorzelllinien ausübten. Sie induzierten allerdings nicht wie erwartet Apoptose, sondern verhinderten die Adhäsion der Tumorzellen an Gewebekulturschalen. Überraschend verringerte die retrovirale Transduktion eines nicht-phosphorylierbaren I κ B die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen nicht, und der Einfluss von IKK-Inhibitoren blieb erhalten. Ein Vergleich der Genexpression zwischen adhären wachsenden Zellen und nach Inkubation in Suspension mittels Affymetrix-Microarrays ergab Unterschiede in mehreren Genen eines Integrin-vermittelten Signalwegs, der bekanntermaßen mit NF κ B-Signalwegen interagiert. Insgesamt sprechen unsere Ergebnisse also für eine wichtige Funktion der NF κ B-Aktivität beim Überleben und besonders der Adhäsion von Urothelkarzinomzellen. Allerdings ist an der Regulation von NF κ B in diesem Zusammenhang offenbar nicht der kanonische Signalweg mit Phosphorylierung und Inaktivierung von I κ B beteiligt. Die weitere genaue Analyse der beteiligten Mechanismen könnte letztendlich zur verbesserten Therapie von Urothelkarzinomen beitragen.

AG Mario Siebler

Funktionelle Schädigungsmechanismen nach Schädel-Hirn-Trauma

F. Otto, J. Opatz, M. Siebler, H.P. Hartung
Neurologische Klinik

Fragestellung: Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist die häufigste Ursache für Mortalität und Langzeitbehinderungen bei jungen Erwachsenen. Neben direkten strukturellen Schäden werden darüber hinausgehende funktionelle neuronale Störungen diskutiert, welche durch neuroaktive Substanzen vermittelt werden. Diese könnten zu Sekundärschäden beitragen bzw. die Rehabilitation verzögern. Wir entwickelten ein zellbasiertes elektrophysiologisches Modell (Neurochip) und untersuchten damit den Liquor von SHT-Patienten im Vergleich zu Normalprobanden und zu Serum.

Methoden: Kryokonservierte Cortex-Neurone embryonaler Ratten wurden auf Multielektroden-Arrays (MEA) ausgesät. Wir leiteten die spontanen extrazellulären Potentiale mit 60 planaren Mikroelektroden simultan ab. Der Liquor von SHT-Patienten wurde aus der Ventrikeldrainage steril entnommen und nach Zentrifugation bis zur Messung eingefroren. Als Vergleichskollektiv diente lumbaler Liquor von Normalpatienten (N-CSF) und von Patienten mit entzündlicher ZNS-Erkrankung (Multiple Sklerose <MS-CSF> und Meningitis <M-CSF>). Zur Messung des Effektes einer gestörten Blut-Hirnschranke wurden die Neurochips dem Serum von Normalpersonen exponiert.

Ergebnisse: Innerhalb von 3 Wochen entwickelte sich ein dichtes neuronales Netzwerk mit stabiler oszillatorischer synchronisierter Spontanaktivität. Applikation von N-CSF und M-CSF führte zu einer Verdoppelung der Spikeaktivität organisiert in Bursts. Unter SHT-CSF wurde die Netzwerkaktivität stark inhibiert mit Desynchronisation, was durch Zugabe des

NMDA-Antagonisten APV (20 μM) kompensiert werden konnte MS-CSF führte zu einer signifikant geringeren Aktivierung im Vergleich zu N-CSF. Serumapplikation führte bereits nach 2 Minuten Exposition zu einer Inhibition von mehr als 50%. Glutamat und NMDA führten beide konzentrationsabhängig zu einer biphasischen Netzwerkänderung mit Inhibition bei höherer Konzentration (IC_{50} Glutamat 12 μM , IC_{50} NMDA 1,8 μM).

Schlussfolgerungen: Im Liquor von Patienten mit SHT finden sich funktionell aktive Substanzen, die zu einer starken Inhibition von neuronaler Netzwerkaktivität führen. Dies könnte durch einen glutamatvermittelten Mechanismus verursacht werden. Auch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke mit Übertritt von Serum ist für die funktionelle Schädigung zu diskutieren. Der Neurochip ist damit prinzipiell zur innovativen funktionellen Diagnostik des Liquors geeignet. Eine chromatographische / massenspektrometrische Untersuchung der Liquores von SHT-Patienten zur Bestimmung z.B. der Glutamatkonzentration wird noch durchgeführt werden.

Wir danken der Hannelore-Kohl-Stiftung ZNS.

AG Helmut Sies

(–)-Epicatechin elevates nitric oxide in endothelial cells via inhibition of NADPH oxidase

Yvonne Steffen, Tankred Schewe, Helmut Sies
 Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

Dietary (–)-epicatechin is known to improve bioactivity of $\cdot\text{NO}$ in arterial endothelium of humans, but the mode of action is unclear. We used the fluorophore 4,5-diaminofluorescein diacetate to visualize the $\cdot\text{NO}$ level in living human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Untreated cells showed only a weak signal, whereas pretreatment with (–)-epicatechin (10 μM) or apocynin (100 μM) elevated the $\cdot\text{NO}$ level. The effects were more pronounced when the cells were treated with angiotensin II with or without preloading of the cells with $\cdot\text{NO}$ via PAPA-NONOate. While (–)-epicatechin scavenged $\text{O}_2\cdot-$, its O-methylated metabolites prevented $\text{O}_2\cdot-$ generation through inhibition of endothelial NADPH oxidase activity more strongly than apocynin. From the effect of 3,5-dinitrocatechol, an inhibitor of catechol-O-methyltransferase (COMT), on HUVEC is concluded that (–)-epicatechin serves as prodrug for conversion to apocynin-like NADPH oxidase inhibitors. These data indicate an $\cdot\text{NO}$ -preserving effect of (–)-epicatechin via suppression of $\text{O}_2\cdot-$ -mediated loss of $\cdot\text{NO}$.

AG Andreas Weber

Systems biology of intracellular metabolite transport in plant cells

Andreas P.M. Weber
Institut für Biochemie der Pflanzen

Eukaryotic cells are most fascinating because of their high degree of compartmentation. This is particularly true for plant cells, due to the presence of chloroplasts, photosynthetic organelles of endosymbiotic origin that can be traced back to a single cyanobacterial ancestor. The high degree of cellular compartmentation and thus the corresponding massive flux of metabolic precursors, intermediates, and end products between compartments requires many different solute transporters that catalyze the transport of polar small molecules across biological membranes. Despite their importance for the functioning of plant cells, only a relatively small number of the metabolite transporters encoded by plant genomes has been identified at the molecular level. One of the major goals of our laboratory is to unravel the molecular identity of intracellular metabolite transporters in plant cells, which is an essential prerequisite to gain systems level understanding of the metabolic networks of these cells.

To this end, we make use of the recent advances in sequencing technology, such as massively-parallel pyrosequencing (MPPS) of DNA molecules, comparative proteomics, statistical analysis of DNA microarray data, and comprehensive profiling of small molecules (metabolomics) in combination with traditional biochemistry and physiological techniques. In my presentation, I will present several examples to demonstrate the use of multiple 'Omics-level technologies to identify novel metabolite transporters in plants cells

Related references:

Weber APM, Weber KL, Carr K, Wilkerson C, Ohlrogge JB (2007) Sampling the Arabidopsis Transcriptome with Massively-Parallel Pyrosequencing. *Plant Physiol* 144: 32-42.

Swindell WR, Huebner M, Weber APM (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* 8:125

Weber APM, Fischer K (2007) Making the connections--the crucial role of metabolite transporters at the interface between chloroplast and cytosol. *FEBS Lett* 581:2215-22

Weber APM, Schwacke R, Flügge UI (2005) Solute transporters of the plastid envelope membrane. *Annu Rev Plant Biol* 56:133-64.

AG Dieter Willbold

Strukturelle Aufklärung von Protein-Protein Wechselwirkungen mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Marc Wittlich, Bernd König, Dieter Willbold
Institut für Physikalische Biologie

Die biomolekulare NMR erlaubt die Entschlüsselung von Protein-Protein Wechselwirkungen und -strukturen auf atomarer Ebene. Technische Verbesserungen und neuentwickelte, computerbasierte Methoden brachten in den letzten Jahren eine deutliche Erweiterung des mit NMR bearbeitbaren wissenschaftlichen Fragenspektrums. Hierbei spielen vor allen Dingen größere verfügbare Feldstärken (bis zu 22.3 Tesla) und kryogenisch gekühlte Probenköpfe eine dominierende Rolle. Optimierungen in Pulssequenzen und Auswerterroutinen bringen eine deutliche Zeitersparnis auf dem Weg zur Strukturaufklärung.

Für unsere Arbeitsgruppe stellt die NMR die dominante, wenn auch nicht monopolistische Methode dar. Zusätzlich werden Methoden wie UV-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie, sowie FCS, FRET, BRET, SPR und (in Kooperation) Röntgenkristallographie eingesetzt. Neben molekularbiologischen Methoden werden Proteine (sowohl im Komplex als auch im ungebundenen Zustand) mittels chromatographischen Techniken (RPC, GPC, A4F) analysiert. Der Einsatz von Zellkultur-Techniken ist ebenfalls wichtig.

Die NMR-Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Willbold gliedert sich in die beiden großen Themenbereiche: Proteine, die eine Rolle bei der Funktion und Dysfunktion des Nervensystems spielen und virale Proteine (aus HIV und SARS-CoV) und ihre Wechselwirkung mit zellulären Wirtsproteinen.

Das Verständnis der Interaktion von regulatorischen HIV-Proteinen mit ihren zellulären Bindungspartnern ist von entscheidender Bedeutung für die Inhibierung der Prozesse auf molekularer Ebene. Neben anderen Mechanismen kommt es nach Infektion der Wirtszelle zur Herunterregulierung des Korezeptors CD4 auf der T-Helferzelle durch das HIV-1-Protein Nef. Neu synthetisiertes CD4 wird im endoplasmatischen Retikulum durch das HIV-1-Protein VpU zur Degradation im Proteasom markiert. Unsere Arbeit fokussiert auf die dreidimensionale Struktur des Komplexes aus CD4 und VpU. Hierzu wurden zunächst die Strukturen der Einzelkomponenten aufgeklärt und analysiert. In einem nächsten Schritt wird der Komplex mittels verschiedenster Methoden charakterisiert.