

**6. BMFZ-Klausurtagung
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
15. - 16. September 2011**



1.	Programm	3
2.	Abstracts der Mitglieder	5
3.	Anfahrtsbeschreibung	26

6. BMFZ-KLAUSURTAGUNG
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
15. – 16. September 2011
Programm

Donnerstag, 15. September 2011

14.00 h	Begrüßung	Guido Reifenberger
14.15 h - 16.15 h	Sitzung 1	Moderation: Hans Werner Müller
	The inducible proteasome in neurons under normal and pathological conditions	Friederike Schröter, Orhan Aktas, Neurologie
	Novel treatment strategies for acute and chronic spinal cord injury	Veronica Estrada, Hans Werner Müller, Molekulare Neurobiologie
	Cerebellar organotypic slice cultures: A useful tool to analyse potential therapeutic effects of unrestricted somatic stem cells from umbilical cord blood	Meike Winter, Norbert Goebels, Neurologie
	Monooxygenase und Zelltod bei M. Huntington	Axel Methner, Neurologie
	Nos2 deficiency leads to an increased incidence of medulloblastoma in Ptch1 ^{+/-} mice	Petra Zipper, Guido Reifenberger, Neuropathologie
	An outlook on the mechanism of gamma secretase modulation	Thorsten Jumpertz, Sascha Weggen, Neuropathologie
	DISC1opathies as mental diseases and in animal models	Svenja Troßbach, Carsten Korth, Neuropathologie
	Entwicklung künstlicher Ersatzgewebe zur Rekonstruktion der Augenoberfläche - Neue Ansätze zum Bindehautersatz -	Stefan Schrader, G. Geerling, Augenklinik (Antragsteller)
16.15 h – 16.45 h	Kaffeepause	
16.45 h – 18.30 h	Sitzung 2	Moderation: Arndt Borkhardt
	Modulation der β 1-adrenergen Rezeptorstruktur und -funktion durch kardiopathogene Autoantikörper	Beatrice Bornholz, Friederich Boege, Klinische Chem. u. Laboratoriumsdiagnostik
	Novel insights in the regulation of Interleukin 6 classic and trans-signaling by ADAM proteases and soluble gp130	Jürgen Scheller, Biochemie u. Molekularbiologie II
	In-vivo Modelle der Leukämogenese in der Pädiatrie	Julia Hauer, Arndt Borkhardt, Kinder-Onkologie u. -Hämatologie
	Molekulargenetische Analyse einzelner frühdisseminierter Tumorzellen	Birte Möhlendick, Nikolas Stoecklein, Allgemein, Viszeral- u. Kinderchirurgie
	Neue Ansätze zur Isolierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) bei Mammakarzinom Patientinnen	Dieter Niederacher, W. Janni, Frauenklinik
	Structural basis of cyclic nucleotide-activated ion channel gating: Structural insights into conformational changes of a cyclic nucleotide-binding domain in solution	Sven Schünke, Dieter Willbold, Physikalische Biologie
	Nanodiscs – a model membrane for biophysical studies of membrane proteins	Bernd König, Dieter Willbold, Physikalische Biologie
19.00 h	Gemeinsames Abendessen, anschließend: Individuelle Diskussionsrunden im Biergarten	

6. BMFZ-KLAUSURTAGUNG
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
15. – 16. September 2011

Programm

Freitag, 16. September 2011

8.00 h – 9.00 h	Gemeinsames Frühstück	
9.15 h – 10.45 h	Sitzung 3	Moderation: Heiner Schaal
	In vitro Generierung von natürlichen Killerzellen aus humanen Stammzellen	Markus Uhrberg, ITZ
	Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer	Wolfgang Göring, Wolfgang Schulz, Urologie
	Cytomegaloviral Riposte: Exploitation of the Ubiquitin Proteasome System to Interfere with Interferon Signalling	Marco Trilling, Hartmut Hengel, Virologie
	The hnRNP F/H dependent G-run within HIV-1 intron 2 is necessary for <i>vif</i> -mRNA splicing	Heiner Schaal, Virologie
	Decreased expression and activity of red cell eNOS correlate with endothelial dysfunction in humans	Miriam Cortese-Krott, Malte Kelm, Kardiologisches Labor
	Novel skin genes - roles in homeostasis and disease	Peter A. Gerber, Bernhard Homey, Hautklinik
10.45 h – 11.15 h	Kaffeepause	
11.15 h – 12.45 h	Sitzung 4	Moderation: Guido Reifenberger
	Rolle des Transkriptionsfaktors BMAL1 in Hirnalterungsprozessen	Charlotte von Gall, Anatomie II (Antragstellerin)
	Study of biomolecular structure and interactions by superresolution microscopy and multiparameter fluorescence image spectroscopy	Claus Seidel, Physikalische Chemie II
	Update: Genomics & Transcriptomics Labor	Karl Köhrer, Genomics & Transcriptomics Laboratory, BMFZ
	Proteomanalyse im "Molecular Proteomics Laboratory"	Kai Stühler, Molecular Proteomics Laboratory, BMFZ
	Hilfe bei der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen durch selektive Anreicherung von Phosphopeptiden	Nadine Dyballa, Sabine Metzger, Molecular Proteomics Laboratory, BMFZ
	Next Generation Sequencing – High Performance Computing (NGS-HPC)	Rafael Dellen, Martin Lercher, Zentrale Bioinformatik
13.00 h - 14.00 h	Gemeinsames Mittagessen	
	Ende der Klausurtagung	

2. Abstracts

AG Orhan Aktas

The inducible proteasome in neurons under normal and pathological conditions

F. Schröter, J. Klose, T. Prozorovski, B. Wingerath, J. Ingwersen, U. Seifert, E. Krüger, H.-P. Hartung, P.-M. Kloetzel, O. Aktas,
Neurologische Klinik

Under inflammatory conditions (e.g. interferon (IFN)- γ signaling) three catalytic subunits (β 1, β 2 and β 5) of the 20S proteasome complex are replaced by inducible subunits (LMP2, LMP7 and MECL1) to form the immunoproteasome (i20S). So far, due to the preferred and mostly constitutively expression in cells of the lymphoid tissue, the immunoproteasome was mainly linked and modulates MHC class I-dependent antigen presentation. However, recent findings suggest that the immunoproteasome may also have non-immune functions: obviously, i20S formed in non-lymphoid cells upon IFN- γ challenge contributes to protein homeostasis as a part of ubiquitin-proteasome system (UPS). Indeed, animals lacking the central immunoproteasome subunit LMP7 show enhanced vulnerability of the brain in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis (MS), while the driving immune response was not altered. However, the precise inducibility and function of i20S in neural cells of the central nervous system (CNS) remains unclear.

Therefore we analysed i20S subunits in primary neuronal cultures and neuronal cell lines. We found a profound resistance of neuronal cells to upregulate LMP7 upon treatment with inflammatory cytokines. Considering the crucial role of LMP7 activity for recruitment of LMP2 and MECL1 into a mature immunoproteasome complex, further experiments were directed to understand the mechanisms involved in neuronal LMP7 gene silencing. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) we were able to detect an increased association of methyl-CpG binding domain protein 1 (MBD1) at STAT1/IRF1 regulatory elements at the neuronal LMP7 promoter. Moreover, in contrast to microglial cells with a typical macrophage-like phenotype, neurons showed an altered IRF1 binding after treatment with IFN- γ . Methylation-specific PCR (MSP) analysis of bisulfite-treated DNA confirmed the methylation status of the CpG elements at the IRF1 binding site in neurons. In line, treatment with the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine (5-Aza) reversed LMP7 silencing in immortalized hippocampal neurons. Interestingly, we found in primary neuronal cultures that suppression of electric activity with voltage-dependent sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX) sensitize neuronal cells to IFN- γ -induced de novo synthesis of LMP7.

Previously, we had observed elevated levels of ubiquitinated protein aggregates and oxidized-damaged proteins in the brain of LMP7-deficient animals challenged with EAE. However, immunohistochemical analysis in wild type littermates with EAE showed no relevant upregulation of LMP7 in neurons. Thus, in line with our in vitro data, LMP7 expression in neurons seems not to contribute to the observed in vivo phenotype. These findings suggest a more prominent role of glia-dependent LMP7 upregulation during chronic autoimmune neuroinflammation.

AG Fritz Boege**Modulation of β 1-adrenergic receptor function by autoantibodies**

Beatrice Bornholz PhD¹, Stefanie Weidtkamp-Peters PhD², Stephanie Schmitmeier PhD³, Claus A. M. Seidel PhD², Lars R. Herda MD⁴, Stephan B. Felix MD⁴, Horst Lemoine MD⁵, Morten O. Christensen PhD¹, Christian Mielke PhD¹, Fritz Boege MD¹.

¹ Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Diagnostics, Medical School

² Institute of Molecular Physical Chemistry,

³ Current address: InnoRa GmbH, Robert-Koch-Platz 4, 10115 Berlin

⁴ Department of Internal Medicine B, University of Greifswald, Friedrich-Loeffler-Str. 23a, 17475 Greifswald,

⁵ Institute of Laser Medicine, Heinrich-Heine-University, Medical School

Background, objective: Antibodies against β 1-adrenergic receptors (β 1AR) probably cause idiopathic dilated cardiomyopathy (DCM), as they are frequently associated with DCM and in immunized rodents confer myocardial dysfunction and cAMP-stimulation. To elucidate the pathogenic mechanism, we assess the impact of autoantibodies derived from immune absorption therapy of DCM patients on β 1AR conformation and function.

Methods, results: IgG derived from DCM patients or healthy donors (10 samples each) or commercial IgG preparations (2 samples) were studied, incorporating fluorescent FRET sensors of receptor conformation into human β 1AR bearing stably expressed in HEK293 cells. IgG binding to, and corresponding conformation changes of, the native receptor were observed in all samples. IgG impact on conformation was not stringently correlated to cAMP stimulation, suggesting alternative induction of active or inactive conformations. Some IgG also inhibited catecholamine-induced receptor internalization determined by total internal reflection fluorescence microscopy. cAMP-responses to isoproterenol were attenuated by IgG that inhibited internalization or triggered inactive receptor conformations and potentiated by IgG that triggered active receptor conformations without inhibiting internalization.

Conclusions: β 1AR autoantibodies are allosteric modulators of receptor conformation and potential inhibitors of receptor internalization. Combined, these mechanisms potentiate or attenuate endogenous cAMP regulation via the β 1AR. Healthy volunteers had low levels of receptor-specific IgG, which were allosteric attenuators of receptor activity with marginal impact on receptor internalization. DCM patients had significantly higher levels of receptor-specific IgG, which more effectively inhibited receptor internalization and induced more active receptor conformations. We propose these are the features relevant and predictive for DCM pathogenesis.

AG Arndt Borkhardt**In-vivo Modelle der Leukämogenese in der Pädiatrie**

Julia Hauer , Daniela Tiedau , Sarah Wildenhain , Deborah Ingenhag , Arndt Borkhardt,
Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie

Die akute Leukämie ist die häufigste Krebserkrankung im Kindesalter. Die Ätiologie ist sehr wahrscheinlich multifaktoriell und bisher noch immer nicht ausreichend untersucht. Das derzeit akzeptierte Modell der Leukämieentstehung geht von einem initiierenden Ereignis, wie z.B. der Expression eines Onkogenes oder der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgenes, in einer suszeptiblen hämatopoetischen Stammzellpopulation aus. Die Progression zur Leukämie wird dabei durch den sequentiellen Zugewinn genomischer Alterationen unterhalten.

In-vivo Modelle für die Untersuchung der einzelnen transformierenden Ereignisse bis hin zur Entstehung einer akuten Leukämie sind sehr selten. Mit dem ursprünglichen Ziel, ein präklinisches p19Arf^{-/-}Rag1^{-/-} Mausmodell für den Einsatz von Gentherapie für Rag1-Defizienz zu entwickeln, beobachteten wir in diesem Modell das spontane Auftreten von Vorläufer-B-ALLs und konnten diese detailliert charakterisieren. Dieses Modell dient einerseits dazu die Bedeutung der Dominanz hämatopoetischer Stammzellpopulationen im Knochenmark zu untersuchen und zum Anderen den Ursprung und die Auswirkung genomischer Alterationen für die Initiierung und Progression von Vorläufer B-ALLs zu charakterisieren.

Zusätzlich interessieren wir uns für eine Form der akuten myeloischen Leukämie im Kindesalter, die durch eine Translokation t(7;12) sowie eine hohe HLXB9 Expression gekennzeichnet ist. HLXB9 besitzt eine zentrale Bedeutung in der Differenzierung von pankreatischem und neuronalem Gewebe. Eine Bedeutung in der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen ist unbekannt. In bisherigen Experimenten konnten wir die Bedeutung von HLXB9 als Transkriptionsfaktor in hämatopoetischen Stammzellen zeigen und PTGER2 als direktes Zielgen in hämatopoetischen Stammzellen identifizieren. An diese Experimente anknüpfend ist es ein zukünftiges Ziel die Bedeutung von HLXB9 für die Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen zu zeigen. Die Interaktion HLXB9-exprimierender hämatopoetischer Stammzellen mit mesenchymalen Stammzellen der hämatopoetischen Nische werden wir in einem Nestin-GFP positiven Mausmodell untersuchen.

AG Charlotte von Gall**Rolle des Transkriptionsfaktors BMAL1 in Hirnalterungsprozessen**

Charlotte von Gall,
Institut für Anatomie II

Das zirkadiane System gewährleistet eine zeitlich optimierte Abstimmung von kognitiven Leistungen und Körperfunktionen. Bei Säugern besteht das zirkadiane System aus einem Lichteingang, einem endogenen zirkadianen Rhythmusgenerator im Nucleus suprachiasmaticus und untergeordneten zirkadianen Oszillatoren. Das molekulare Uhrwerk besteht aus autoregulatorischen transkriptionalen/translationalen Rückkopplungsschleifen mit positiven und negativen Regulatoren der Genexpression, die von Uhrengenen kodiert werden. Die wichtigsten transkriptionellen Aktivatoren sind CLOCK, NPAS2 und BMAL1, die wichtigsten transkriptionellen Inhibitoren sind mPER1-2 und mCRY1-2. Dieses molekulare Uhrwerk findet sich im SCN, aber auch in vielen untergeordneten Oszillatoren und treibt hier die rhythmische Genexpression an. BMAL1 ist eine essentielle Komponente des molekularen Uhrwerkes und BMAL1-defizienten Mäusen (BMAL1^{-/-}) fehlt jegliche zirkadiane Rhythmik. Interessanterweise zeigen BMAL1^{-/-} auch eine deutlich reduzierte Lebenserwartung und verschiedene Anzeichen für ein vorzeitiges Altern sowie deutliche Einschränkungen in Kurz- und Langzeitgedächtnis. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass Expression und Funktionalität des Ryanodinrezeptors im SCN von BMAL1^{-/-} Mäusen deutlich herabgesetzt sind. Somit nimmt das molekulare Uhrwerk direkten Einfluss auf neuronale Signaltransduktionskaskaden. Ziel dieses Projektes ist die Aufklärung der Ursachen für die kognitiven Defizite bei BMAL1-Defizienz. Eine genaue Analyse des Verhaltens, der adulten Neurogenese und der glutamatergen Signaltransduktion von Prosencephalon-spezifischen BMAL1^{-/-} Mäusen soll Aufschluss darüber geben, welche Rolle BMAL1 für die Entstehung, Funktionalität und Alterung hippocampaler Neuronen spielt.

AG G. Geerling**Entwicklung künstlicher Ersatzgewebe zur Rekonstruktion der Augenoberfläche - Neue Ansätze zum Bindehautersatz -**

Stefan Schrader, G. Geerling
Augenklinik

Vernarbende Erkrankungen der Bindehaut wie das okuläre Pemphigoid, Stevens-Johnson Syndrom sowie okuläre Verbrennungen und Verätzungen können zu schweren, progredienten Vernarbungsreaktionen im Bereich der Augenoberfläche bis hin zum vollständigen Bindehautverlust führen. Im Endstadium dieser Erkrankungen resultieren starke Schmerzen im Bereich der Augenoberfläche, sowie ein schwerer Visusverlust bis hin zur Erblindung. Eine chirurgische Teil-Wiederherstellung der Bindehaut und der korrekten Lidstellung ist häufig nötig um die Beschwerden des Patienten und die Funktion der Augenoberfläche zu verbessern. Allerdings sind die chirurgischen Techniken oft durch einen Mangel an gesundem Bindehaut-Ersatzgewebe limitiert, insbesondere

wenn viel Gewebe für große Transplantate benötigt wird. Dies bedingt die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Bindehautersatzgewebe.

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung eines biomechanisch stabilen, epithelialisierten Bindehaut-Ersatzgewebes auf der Basis von Matrices wie plastisch komprimiertem Kollagen und Amnion Membran. Diese Substrate sollen als Trägermaterialien zur Expansion adulter humaner Bindehaut-Progenitorzellen dienen, mit dem Ziel des Einsatzes solcher Zell-Matrix-Konstrukte für die Rekonstruktion der Augenoberfläche.

AG Norbert Goebels

Cerebellar Organotypic Slice Cultures: A Useful Tool to Analyse Potential Therapeutic Effects of Unrestricted Somatic Stem Cells from Umbilical Cord Blood

Meike Winter, Norbert Goebels,
Neurology

To mimic de-myelination-processes in the brain, that are causative for progressive disabilities in multiple sclerosis (MS) patients, we have established a 3-dimensional slice culture of cerebellar tissue, which allows the spatial and timely dissection of the interaction of immune cells and neural tissue.

De-myelination can either be facilitated by myelin-specific antibodies, together with complement, resembling the humoral arm of immunological effector-mechanisms or by CD8 T cells, reactive against oligodendrocyte-structures. While myelin-specific antibodies induce severe de-myelination, axons remain intact and after withdrawal of antibodies, re-myelination occurs. In contrast autoreactive T cells lead to rapid de-myelination as well as axonal destruction as immunological collateral damage. In slice cultures of transgenic mice, which express a green fluorescent protein (GFP) in the myelin sheath of oligodendrocytes, de- as well as re-myelination can be visualized by confocal laser microscopic live imaging, employing both protocols.

Since MS cannot be cured up to now, there is an urgent need for innovative therapeutic approaches, which exceed broad immunosuppression. Stem cells might be potentially useful in repopulating damaged oligodendrocytes, either by differentiation-processes or indirectly by promoting differentiation of endogenous stem cells through secretion of neurotrophic factors. There are different sources of stem cells with certain advantages and disadvantages.

Umbilical cord blood, which contains the cells of the foetus, is considered a promising new source of immature stem cells. In comparison to mesenchymal stem cells from bone marrow, unrestricted somatic stem cells (USSC) from cord blood have retained their ability to differentiate into cells of all three germinal layers. They have been shown to differentiate into neural cells in vitro, including astrocytes and neurons. Additionally these cells hold immunosuppressive properties. In former studies, we were able to show, that USSC can be stimulated to potently inhibit T cell proliferation, as well as

dendritic cell maturation and NK cell killing-activity and therefore may also be beneficial in ameliorating inflammation in the brain. Additionally it seems suitable to use them in an allogeneic environment, since they create their own immunoprivileged niche even during ongoing inflammation and may therefore escape rejection.

In our project, we aim to explore the potential of USSC to integrate into neural tissue and influence de- and re-myelination processes as well as inflammation in our slice model.

To this end, we want to assess incorporation, survival, migration and differentiation by transplanting labelled, stimulated and un-stimulated USSC into our slices with subsequent tracing of these cells over time. Additionally we plan to assess the kinetics of de- and re-myelination in the presence of USSC. A special focus will be set on the effect of USSC on activation and proliferation of CD8 T cells in our model of cell-mediated de-myelination.

We believe that this *ex vivo* approach will help to elucidate the mechanisms by which stem cells act within the network of neural and immune cells in the central nervous system and therefore possibly contribute to the development of novel forms of treatment for autoimmune diseases like MS.

AG Hartmut Hengel

Cytomegaloviral Riposte: Exploitation of the Ubiquitin Proteasome System to Interfere with Interferon Signalling

Mirko Trilling, Vu Thuy Khanh Le, Manuela Fiedler, Albert Zimmermann, Elke Bleifuß and Hartmut Hengel,
Institut für Virologie

The mouse cytomegaloviral (MCMV) protein pM27 represents an indispensable factor for viral replication in interferon conditioned cells and for replication *in vivo*. pM27 acts by antagonizing *signal transducer and activator of transcription* (STAT)2-mediated interferon signalling without influencing STAT1 amounts, phosphorylation, translocation or DNA-binding.

We demonstrate that pM27 is essential and sufficient to curtail the half-life of mouse and human STAT2. Pharmacologic inhibition of the proteasome by MG-132 or lactacystin restored STAT2 amounts. Concomitantly, high molecular weight forms of STAT2 were observed, which were demonstrated to be poly-ubiquitin conjugated STAT2.

During co-immunoprecipitation studies, pM27 was found in complex with a cellular ~125 kDa protein, which was identified by mass-spectrometry to be the essential host ubiquitin ligase complex adaptor protein *DNA-damage DNA-binding protein* (DDB) 1.

Truncation mutants of pM27 showed a strict correlation between DDB1 interaction and their ability to degrade STAT2. Despite the fact that cellular DDB1 interaction partners usually contain (W)DxR motifs, we found that all four DxR motifs present in

pM27 were fully dispensable for DDB1 co-precipitation. pM27 contains a CxCxxC motif which is highly conserved among cytomegaloviruses with the notable exception of human and chimpanzee cytomegaloviruses. Side-directed mutagenesis of individual Cys-residues strongly diminished the DDB1 interaction.

SiRNA-mediated knock-down of DDB1 restored STAT2 in the presence of pM27 and strongly impaired viral replication in interferon conditioned cells, thus phenocopying the growth attenuation of *M27*-deficient virus.

Taken together, pM27 recruits DDB1 to exploit ubiquitin ligase complexes catalyzing the obstruction of the STAT2-dependent antiviral state of cells to permit viral replication.

AG Bernhard Homey

Novel skin genes - roles in homeostasis and disease

Peter Arne Gerber, Bernhard Homey,
Department of Dermatology

Despite intense efforts of the scientific community, the function of the majority of human genes remains poorly characterized. To address this topic, in recent years Zlotnik and coworkers have developed a highly comprehensive database of human gene expression. This 'Body Index of Gene Expression (BIGE)' for the first time enables to screen the expression of uncharacterized genes expressed either selectively or specifically in over 100 different tissues of the human body. Using the BIGE, we have identified the top 300 genes that show the highest relative expression in the skin as compared to all other tissues. Surprisingly, our top skin genes did not only contain 82 percent identified skin markers but also 14 percent of characterized genes, which have not been known to be expressed in the skin, and 4 percent of uncharacterized transcripts. Subsequently, we have identified novel skin-associated genes of particular interest, including the first skin-specific G-protein-coupled-receptor and a potential new cytokine. To this end, we have analyzed the regulation and/or expression of our candidate genes in specific subsets of skin-cells *in vitro* and –diseases *in vivo*. These genes may serve as potential novel bio-markers and/or drug-targets.

AG Dieter Niederacher, Wolfgang Janni**Neue Ansätze zur Isolierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) bei Mammakarzinom Patientinnen**

Dieter Niederacher, Wolfgang Janni,
Frauenklinik

Die systemische Therapie von Brustkrebserkrankungen wird derzeit an den Eigenschaften des Primärtumors ausgerichtet, da bislang das primäre Tumorgewebe als geeigneter Surrogatmarker für systemisch gestreute Tumorzellen angesehen wird. Neue Daten zeigen jedoch, dass erhebliche molekulargenetische Unterschiede zwischen Primärtumoren und ihren gestreuten Tumorzellen und/oder ihren Metastasen bestehen. So erscheint es sinnvoll systemische Therapien direkt auf die gestreuten Tumorzellen als die eigentlichen Zielzellen auszurichten. Als Indikator-Organ dienen Knochenmark, Lymphknoten und Blut. Im Blut können sogenannte zirkulierende Tumorzellen (CTC) nachgewiesen werden. Auf Grund ihrer Seltenheit ist die Isolierung und Charakterisierung von CTCs technisch schwierig und die Biologie der gestreuten CTCs weitgehend unbekannt, allerdings legt der prognostische Wert des CTC Nachweis nahe, dass sich in dieser Population Vorläuferzellen der Metastasen befinden.

Einen möglichen, vielversprechenden Lösungsansatz für diese Problematik könnte hier die Leukapherese, d.h. die Anreicherung von „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMNCs) über Filtration von peripherem Blut bieten. Daten aus der Literatur, sowie eigene Vorarbeiten legen nahe, dass sich mit Hilfe dieses Verfahrens auch noch Monate nach der operativen Entfernung des Primärtumors Tumorzellen im Blut nachweisen und isolieren lassen.

Im Rahmen einer an der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf durchgeführten Hoch-Dosis-Chemotherapie beim Mammakarzinom wurden Apheresate der Patientinnen vor und nach Chemotherapie entnommen und für die autologe Replantation aufgearbeitet. Kontroll- und Duplikate dieser Apheresate wurden am ITZ des UKD (Dr. Johannes Fischer) kryo-konserviert, Aliquots dieser Proben konnten für die ersten Untersuchungen im Rahmen dieses Projekts verwendet werden. Insgesamt wurden die Apheresate von 20 MaCa –Patientinnen jeweils zum Zeitpunkt vor und max. 3 Wochen nach Chemotherapie untersucht. Nach Einzelzell-Genomamplifikation wurden mittels comparativer Genomhybridisierung (CGH) das genetische Material der CTCs auf genomische Stabilität bzw. Instabilität untersucht (Prof. Nikolas Stoecklein). Eine vergleichende Analyse einzelner CTCs vor bzw. nach Chemotherapie in verschiedenen Patientinnen zeigt, dass sich die CTCs hinsichtlich der genomischen Aberrationen in Zahl und Qualität untereinander unterscheiden, in Einzelfällen sind die Muster der chromosomalen Veränderungen von CTCs nach Chemotherapie relativ ähnlich. Insgesamt zeigt sich eine Zunahme der genetischen Aberrationen und damit einer erhöhten genomischen Instabilität bei den CTCs, die aus Apheresaten der Patientinnen nach Chemotherapie isoliert wurden. Erste vorläufige Auswertungen zeigen eine schlechtere Prognose der Patientinnen mit CTCs, für die eine erhöhte Zahl an chromosomalen Aberrationen nachgewiesen werden konnte.

Mit der Leukapherese kann sowohl die CTC Detektionsfrequenz, als auch die Anzahl detektierter CTCs pro Patient erheblich erhöht werden. Mit dem Veridex Cell-Search™ System (FDA zugelassenes Verfahren und derzeitiger „Goldstandard“ in der CTC Diagnostik) lassen sich Detektionsraten von 3-5 CTCs (aus 7.5ml Blut) erzielen, die in typischen Apheresepräparaten (ca. 150 ml) etwa um den Faktor 650 gesteigert werden können. Nach unserer Arbeitshypothese gelingt es durch die Apherese die CTC Anzahl so zu erhöhen, dass eine umfassende Charakterisierung der genetisch und phänotypisch heterogenen CTCs möglich sein sollte.

Um dieses Ziel zu erreichen, haben sich die Arbeitsgruppen um Prof. Stoecklein, Prof. Knoefel (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie), Dr. Niederacher, Prof. Janni (Frauenklinik) und Dr. Fischer (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika) im DCC-Net (Disseminated Cancer Cells Network) zusammengeschlossen, um ihre Forschungsaktivitäten im Bereich der frühen systemischen Krebserkrankung zu bündeln.

AG Malte Kelm

Decreased expression and activity of red cell eNOS correlate with endothelial dysfunction in humans.

Cortese-Krott MM, Sansone R., Sivarajah S., Rodriguez-Mateos AM, Kuhnle GGC, Krisp, C., Krenz T., Horn. P, Wolter D, Heiss C, Kelm M,
Cardiovascular Research Laboratory, Department of Cardiology

Red blood cells possess a nitric oxide synthase (NOS)-like activity characterized by the formation of bioactive nitric oxide (NO) species. We asked whether red cell NOS plays a functional role in human pathophysiology. Using immunoprecipitation and liquid-chromatography coupled mass spectrometry, we found that human red cells express an endothelial (e)NOS (NOS3 type 1), which metabolizes L-³H-Arginine into L-³H-Citrulline in a Ca²⁺/Calmodulin dependent-fashion and can be inhibited by NOS inhibitors. A NOS-dependent production of NO metabolites in red cells was confirmed by analyzing the intracellular nitrosation of DAF-FM by HPLC and mass spectrometry, as well as by analyzing the activation of soluble guanylate cyclase in a co-cultured RLT-6 reporter cell line. To test whether the activity of red cell eNOS is regulated similarly to endothelial cell eNOS in humans, we assessed eNOS expression and eNOS activity in RBCs isolated from patients with coronary artery disease (CAD), a condition characterized by endothelial dysfunction and decreased eNOS activity/function. We found that both expression and activity of red cell eNOS were decreased in patients with CAD as compared to age matched healthy individuals. In a regression analysis, we found that the activity of red cell eNOS significantly correlated with endothelial function, assessed by flow-mediated dilation of the brachial artery using ultrasound. This is the first human study analyzing a role for red cell eNOS in pathophysiology, suggesting that impairment in this signaling pathway is associated with human cardiovascular disease.

AG Karl Köhrer**Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) des BMFZ**

Karl Köhrer,
Genomics & Transcriptomics Labor (GTL), BMFZ

Der Schwerpunkt der Arbeiten im Genomics & Transcriptomics Labor (GTL) liegt in der Analyse von Nukleinsäuren. Alle wichtigen Standard- und viele Spezialverfahren zur Isolierung, Aufreinigung, Quantifizierung, Qualitätskontrolle und Sequenzanalyse von DNA und RNA sind im GTL etabliert. Die dafür benötigten Spezial- und Großgeräte werden zentral betrieben, und die Mitarbeiter im GTL unterstützen die im BMFZ organisierten Arbeitsgruppen:

- durch die Bereitstellung spezieller Analysegeräte
- durch die Durchführung von Auftragsanalysen
- im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationsprojekte.

Der Vortrag wird einen Überblick über das gesamte Leistungsspektrum des GTL liefern. Wir werden außerdem neue Geräte vorstellen und über aktuelle Arbeiten am Beispiel von ausgewählten Kooperationsprojekten berichten.

Kontaktdaten:

Laborleiter: Karl Köhrer – Tel. 81 13165 – Email koehrer@uni-duesseldorf.de
DNA-Bereich: Sibylle Scheuring – Tel. 81 13069 – Email scheurin@uni-duesseldorf.de
RNA-Bereich: René Deenen – Tel. 81 14367 – Email Rene.Deenen@uni-duesseldorf.de

AG Carsten Korth**DISC1opathies as mental diseases and in animal models**

Svenja Trossbach & Carsten Korth,
Institut für Neuropathologie

Schizophrenia and other chronic mental diseases (CMD) are clinically diagnosed entities with a likely heterogenous biological background. Candidate genes like Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1), identified through genetic linkage studies, have provided a handle to explore the neurobiology of CMD. We could demonstrate that the non-mutant DISC1 protein has an aggregation propensity of its own and could be identified as sarkosyl-insoluble in post mortem brains of a subset of patients with CMD, but not in normal controls or other brain diseases. Further experiments showed that DISC1 aggregates in cells and in animals are specifically recruiting other schizophrenia-related proteins and are cell-invasive, qualifying DISC1-related brain disorders or DISC1opathies as protein conformational disorders, similar to other chronic brain conditions. We have now generated the first transgenic rat model demonstrating DISC1 aggregates and thus enabling to model DISC1opathies experimentally *in vivo*.

AG Martin Lercher**Next Generation Sequencing – High Performance Computing (NGS-HPC)**

Rafael Dellen^{1,2}, Martin Lercher²,

¹Zentralbereich Bioinformatik (BMFZ), ²Institut für Bioinformatik

Der Vortrag liefert einen kurzen Überblick zum Dienstleistungsschwerpunkt Next Generation Sequencing- High Performance Computing des Zentralbereichs Bioinformatik des BMFZ.

Angesprochen werden die Systemspezifikationen der SGI Altix UV100, das momentan verfügbare Softwareangebot auf dem System, wie man einen Benutzerzugang erhält und Serviceinformationen für bestehende Benutzer-

AG Axel Methner**Monooxygenase und Zelltod bei M. Huntington**

Teresa Boldt, Armagan Özgür und Axel Methner
Neurologische Klinik

Bei Interesse an diesem Thema wenden Sie sich bitte an Prof. Methner.

AG Hans Werner Müller**Novel treatment strategies for acute and chronic spinal cord injury**

Veronica Estrada and Hans Werner Müller
Neurologische Klinik

Our lab is interested in establishing treatment possibilities which can be used to improve the outcome of spinal cord injury (SCI). SCI generally presents a devastating condition for the affected patient. The lesion scar which develops after SCI is associated with growth-inhibitory molecules and, therefore, presents a major obstacle for regrowing axons. We have previously shown that a delay in scar formation correlates with an increase in axonal regeneration and functional recovery (Klapka et al, Eur J Neurosci 2005, Schiwy et al., Eur J Neurosci 2009). Via manipulation of scar formation, of the lesion scar per se, or of involved molecular signaling pathways we want to enable regenerative axon growth responses and enhance the existing inherent axonal growth capability. Treatment strategies which prove successful in rat SCI can then be further optimized for clinical application.

In acute experimental SCI we are currently using an innovative mechanical micro-conector (mMS) device which is implanted into the transected rat spinal cord in order to reconnect severed tissue stumps. Adaptation of the spinal cord stumps is achieved

via initial fixation of the mMS at the site of injury and subsequent application of negative pressure. The mMS further contains an internal channel system which can be used to apply therapeutic substances directly into the lesion center.

In addition, we have developed a chronic transection SCI model in the rat which comprises the manipulation of the lesion area by resection of the mature lesion scar. Comparison of different matrix materials (Matrigel® [MG], alginate hydrogel [ALG], polyethylene glycol [PEG]) revealed PEG as an excellent matrix material to achieve beneficial tissue regeneration, regenerative axon growth into and beyond a spinal cord lesion leading to functional locomotor improvement.

In future experiments we want to combine each of the above-mentioned therapeutic approaches with other treatment strategies which have recently been developed in our lab and successfully applied to acute spinal cord injured animals (e.g., implantation of somatic stem cells from human umbilical cord blood [Schira et al., Brain 2011]) to further optimize the functional locomotor outcome.

AG Guido Reifenberger

Nos2 deficiency leads to an increased incidence of medulloblastoma in Ptch1^{+/-} mice

Petra Zipper, Guido Reifenberger,
Institut für Neuropathologie

Bei Interesse an diesem Thema wenden Sie sich bitte an Prof. Reifenberger.

AG Heiner Schaal

The hnRNP F/H dependent G-run within HIV-1 intron 2 is necessary for vif-mRNA splicing

Heiner Schaal,
Institut für Virologie

An equilibrium between alternatively spliced mRNAs encoding the human immunodeficiency virus type I (HIV-1) proteins is required for efficient virus replication. The relative abundance of these mRNA gene products is determined by the frequency of splicing at the alternative 5' and 3'-splice sites. The balanced usage of 3'ss SA1 and non-usage of 5'ss SD2 correlating with the retention of AUG containing intron 2 is required for *vif*-mRNA production. Several exonic splice regulatory elements are known to regulate the relative amount of *vif*-mRNA. However, there is hardly known about intronic elements.

Here we show that the 5'-extremity of HIV-1 intron 2 contains an intronic G-run (G₁₂), which acts to repress both 5'ss SD2 and a novel 5'ss SD2b. Mutational analyses of this G-run led to an increased amount of both mRNA and Protein levels of Vif result-

ing in reduced virus replication. Proteins hnRNP F/H and hnRNP A2/B1 bind to this inhibitory element, whereas silent mutations abolish an hnRNP affinity with a concomitant increase in splicing efficiency. This suggests the intronic G-run is directly involved in splicing inhibition and therefore maintenance of *vif*-mRNA.

Furthermore we have started to identify infection-induced alternative splicing events which affect cellular transcripts whose translational products influence HIV-1 splicing and/or viral replication by sequencing whole transcriptomes of uninfected and HIV-1-infected cells on a global scale. As a part of this project we confirmed the SD2b splice site usage in HIV-1-infected cells.

AG Jürgen Scheller

Novel insights in the regulation of Interleukin 6 classic and trans-signaling by ADAM proteases and soluble gp130

Jürgen Scheller

Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

Interleukin 6 (IL-6) trans-signaling plays a critical role in chronic inflammation and cancer. In IL-6 trans-signaling, IL-6 binds to the soluble IL-6 receptor (sIL-6R), whereas in classic signaling to the membrane-bound IL-6R, and both ways activate cells via the ubiquitously expressed signal-transducer gp130. Soluble gp130 (sgp130) specifically inhibits IL-6 trans-signaling and ADAM17 is the main sheddase of Interleukin-6 receptor (IL-6R) to induce IL-6 transsignaling.

Hypomorphic ADAM17^{ex/ex} mice showed defects in mucosal regeneration due to inefficient EGFR-shedding. However, serum levels of soluble murine IL-6R were not reduced in ADAM17^{ex/ex} mice and murine ADAM17 was not the major sheddase of murine IL-6R. Shedding of murine IL-6R by murine ADAM17 was rescued in chimeric murine IL-6R proteins containing any extracellular domain but not the transmembrane and intracellular domain of human IL-6R. Apoptosis is a physiological stimulus of ADAM17-mediated shedding of human IL-6R. Even though apoptosis induced IL-6R shedding in mice, the responsible protease was identified as ADAM10. ADAM10 was also identified as protease responsible for Ionomycin-induced shedding of murine and human IL-6R. However, in ADAM10 deficient murine embryonic fibroblasts compensatory shedding of human IL-6R was mediated by ADAM17 but loss of ADAM10-mediated shedding of murine IL-6R was compensated by a yet unidentified protease. Moreover, we identified physiological purinergic P2X7 receptor stimulation as a novel inducer of murine and human IL-6R shedding solely mediated by ADAM10. The unexpected species specificity of ADAM10 and ADAM17 and the identification of ADAM10 as novel inducible sheddase of IL-6R in mice and men might have consequences for the interpretation of phenotypes from ADAM17 and ADAM10 deficient mice.

Pathophysiological conditions are often characterized by a molar excess of serum sIL-6R over IL-6 and our calculations indicated that within a wide range of IL-6 and

sIL-6R concentrations, free IL-6 and IL-6/sIL-6R complexes exist in parallel allowing both classic and trans-signaling. However, sgp130 was able to completely trap all free IL-6 molecules in IL-6/sIL-6R/sgp130 complexes when sIL-6R exceeds IL-6, thereby also indirectly inhibiting classic signaling as shown for IL-6R expressing Ba/F3 and primary T-cells. Since within a large range of molar ratios of IL-6 and sIL-6R, a significant fraction of IL-6 molecules did not form complexes with sIL-6R, lower concentrations of sgp130 than of the anti-IL-6R antibody tocilizumab or the anti-trans-signaling monoclonal antibody 25F10 were sufficient to block trans-signaling on cells lacking IL-6R. Our results point to a novel function of sgp130 in the blockade of classic signaling and indicate that *in vivo* only low therapeutic concentrations of sgp130 will guarantee blockade of IL-6 trans-signaling without affecting IL-6 classic signaling.

AG Wolfgang Schulz

Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer

Wolfgang Goering, Teodora Ribarska, Wolfgang A. Schulz
Department of Urology

Retroelements constitute a large part of the human genome. These sequences are mostly silenced in normal cells, but genome-wide DNA hypomethylation in cancers might lead to their reexpression. Whether this reexpression really occurs in human cancers is largely unknown. We therefore investigated expression and DNA methylation of various retroelements in human prostate cancer tissues and cell lines by quantitative RT-PCR and pyrosequencing, respectively.

The most striking finding was strong and generalized increased expression of the *HERV-K_22q11.23* provirus in cancers, including *de novo*-expression of a spliced accessory Np9 transcript in some tumors. In parallel, DNA methylation in the LTR decreased. Conversely, *HERVK17* expression was significantly diminished in cancer tissues, but this decrease was unrelated to LTR methylation. Expression of both proviruses was restricted to androgen-responsive prostate cancer cell lines and LTRs sequences containing steroid hormone responsive elements bound the androgen receptor and conferred androgen responsiveness to reporter constructs. Differential regulation of the two viruses appeared related to expression of the ERG oncogene. Global expression of *LINE-1* 5'-UTR and 3'-UTR sequences in prostate cancers rather decreased, despite significant hypomethylation of the internal *LINE-1* promoter. In contrast, analyses of individual *LINE-1* sequences revealed increased expression in prostate tumors without correlation to DNA methylation of their promoters.

Our findings demonstrate a surprising specificity of changes in expression and DNA methylation of retroelements in prostate cancer. In particular, global *LINE-1* hypomethylation does not lead to generalized overexpression, although individual *LINE-1* elements exhibit overexpression. Specific HERV-K proviruses display conspicuous changes in their expression that appear to be related to the aberrant androgen response in prostate cancer.

AG Claus Seidel**Study of biomolecular structure and interactions by superresolution microscopy and multiparameter fluorescence image spectroscopy**

Claus A. M. Seidel, Stefanie Weidtkamp-Peters, Suren Felekyan, Ralf Kühnemuth, Stephanie Grabowski, Qijun Ma, Stanislav Kalinin, Stefan Marawska, Igor Svetec
Institut für Molekulare Physikalische Chemie

Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy (MFIS) [1-3] is used to monitor simultaneously a large variety of fluorescence parameters in confocal fluorescence microscopy. As the photons are registered one by one using time correlation single photon counting (TCSPC), MFIS allows for fully parallel recording of FCS / FCCS (fluorescence correlation and crosscorrelation spectroscopy), fluorescence lifetime, fluorescence anisotropy and pixel / image information over time periods of hours with picoseconds accuracy. The analysis of the pixel fluorescence information in more dimensional histograms maximizes the selectivity of fluorescence microscopic methods. Moreover it facilitates a statistical relevant data analysis of the pixel information which makes an efficient detection of heterogeneities possible. In collaboration with Verena Keitel and Dieter Häussinger the reliability of MFIS has been demonstrated for molecular interaction studies of the bile acid receptor TGR5. The multidimensional analysis of correlated changes of several parameters measured by FRET, FLIM, FCS and fluorescence anisotropy increases the robustness of the analysis significantly. The economic use of photon information allows one to keep the expression levels of FP-fusion proteins as low as possible (down to the single-molecule level), to avoid artefacts due to phototoxic or photoconversion effects of FPs or overexpression of the target molecule. The principles of MFIS data acquisition and FRET analysis are demonstrated.

Moreover we demonstrate the recent superresolution images of DNA with a localization accuracy below 10 nm and high spatial sampling.

Kudryavtsev, V., Felekyan, S., Woźniak, A. K., König, M., Sandhagen, C., Kühnemuth, R., Seidel C. A.M., Oesterhelt, F.; *Multiparameter fluorescence imaging to monitor dynamic systems*, Anal. Bioanal. Chem. **387**, 71-82 (2007).

Weidtkamp-Peters, S., Felekyan, S., Bleckmann, A., Simon, R., Becker, W., Kühnemuth, R., Seidel, C. A. M.; *Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy to study molecular interactions*. Photochem. Photobiol. Sci., **8**, 470-480 (2009).

Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C. A. M., Simon, R., *Stem cell signalling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane*. Plant Physiol. **152**, 166-76 (2010).

AG Nikolas Stoecklein**Molekulargenetische Analyse einzelner fröhdisseminierter Tumorzellen**

Birte Möhrendick, Nokolas Stoecklein,
Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

Die häufigste Todesursache von Krebspatienten ist nicht auf den Primärtumor, also die lokale Erkrankung, sondern vielmehr auf das Vorliegen von Metastasen, also einer systemischen Erkrankung zurückzuführen. Daher sind die potentiellen Vorläuferzellen, die disseminierten Tumorzellen auch aus therapeutischer Sicht interessant. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine relativ große Anzahl von disseminierten Tumorzellen von Ösophaguskarzinompatienten mittels konventioneller komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) analysiert. Hierbei zeigte sich das Vorliegen einer Amplifikation auf dem langen Arm von Chromosom 17 als eine der häufigsten Veränderungen. Bei 50% dieser Zellen konnte das Onkogen HER-2/ERBB2 als amplifiziert nachgewiesen werden und als mögliches therapeutisches Target identifiziert werden. Um nun die amplifizierte Region weiter eingrenzen zu können und zusätzliche Zielgene aufdecken zu können, müssen hochauflösendere Analysen auf Einzelzellebene durchgeführt werden. Hierzu haben wir nun ein Protokoll zur Analyse von Einzelzellen mittels komparativer genomischer Oligonukleotid-DNA-Microarray-Technik (aCGH) etabliert. Mit Hilfe der hochauflösenden Technik können Veränderungen bis auf Genebene eingegrenzt werden und hierdurch die genetischen Charakteristika der Einzelzellen bestimmt werden. Die Aufdeckung der genetischen Heterogenität und Eigenschaften könnte dann bei der Entwicklung neuer spezifischer Therapeutika helfen. Die Methode wurde mit Einzelzellen einer Ösophaguskarzinomzelllinie, einer Leukämiezelllinie, Einzelzellen von Patienten mit Ösophaguskarzinom und Patienten mit Kopfhalskarzinom eingehend getestet und ein Standardprotokoll entwickelt. Im Rahmen des Vortrages werden die Möglichkeiten und Limitierungen der aCGH-Analysen von Einzelzellen vorgestellt.

AG Kai Stühler**1. Proteomanalyse im „Molecular Proteomics Laboratory“**

Kai Stühler,
Molecular Proteomics Laboratory (MPL), BMFZ

Das „Molecular Proteomics Laboratory“ (MPL) unter der Leitung von Prof. Dr. Kai Stühler, nutzt die modernen Techniken der Proteomforschung (Proteomics) um komplexe biologische Systeme zu erforschen. Entscheidende Fortschritte in Technologie- und Methodenentwicklung der letzten Jahre erlauben es, immer detailliertere Einblicke in das Zusammenspiel molekularer Prozesse komplexer biologischer Systeme zu erhalten. Bei der Aufklärung dieser Prozesse übernimmt die Proteomics mit ihren Untersuchungsobjekten, den Proteinen, eine entscheidende Schlüsselrolle. Zusammen mit anderen Technologien der quantitativen Biowissenschaften, wie bei-

spielweise Genomics, Transkriptomik, Metabolomik und natürlich der Bioinformatik, ermöglicht sie es ein umfassendes Bild funktioneller Zusammenhänge des Lebens wiederzugeben.

Um ein tieferes Verständnis der Funktionszusammenhänge in der Biologie zu erhalten, ist es zunehmend notwendig, nicht nur niedrig-komplexe biologische Modellsysteme zu untersuchen, sondern auch klinisch zugängliches Probenmaterial zu analysieren. In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kai Stühler ist eine hoch-sensitive Methode zur proteomanalytischen Untersuchung von 1.000 Zellen etabliert worden (Sitek et al., 2005), welche es nun erlaubt funktionelle Fragestellungen durch die direkte Analyse von humanen Patientenmaterial gezielt anzugehen. So ermöglicht diese zell- bzw. gewebebasierte Proteomanalyse, neben der Beschreibung biologischer Funktionszusammenhänge, sowohl die Identifizierung von Markerproteinen für die Immunohistochemie (Grzendowski et al., 2010, Poschmann et al., 2009) als auch von Serum-Biomarkern für die *in vitro* Diagnostik (Mölleken et al., 2009).

Neben der Identifizierung und Validierung von Biomarkern arbeitet das MPL mit seinen klinischen und naturwissenschaftlichen Kooperationspartnern unter anderem auch an Fragestellungen im Bereich der Tumorbilogie von Hirntumoren, Lymphomen und Neuroblastomen, der neuronalen Differenzierung als auch der Biologie von Stammzellen (Unrestricted Somatic Stem Cells, USSC) und der stromalen Alterung. Im Rahmen der Methodenentwicklung fokussiert sich das MPL besonders auf die quantitative Proteomanalyse (labelfreie Proteomics, SILAC, 2D-DIGE, SRM-Analytik etc.), die molekulare Charakterisierung von Proteinen (PTM-Analytik etc.) aber auch Anwendungen im Bereich des MS-Imaging und der Peptidsynthese,

Referenzen

Sitek B, Lüttges J, Marcus K, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Hahn SA, Stühler K. Application of fluorescence difference gel electrophoresis saturation labelling for the analysis of microdissected precursor lesions of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics* 2005; 5: 2665-2679

Mölleken C, Sitek B, Henkel C, Poschmann G, Sipos B, Wiese S, Warscheid B, Hawranke E, Roggenbrodt S, Broelsch C, Reiser M, Friedman SL, Holmskov U, Schlosser A, Klöppel G, Schmiegel W, Meyer HE, Stühler K. Detection of Novel Biomarkers of Liver Cirrhosis by Proteomic Analysis. *Hepatology* 2009; 49: 1257-1266.

Poschmann G, Sipos B, Sitek B, Ulrich A, Wiese S, Stephan C, Warscheid B, Klöppel G, Vander Borgh A, Ramaekers FC, Meyer HE, Stühler K. HSP47 and keratins are potential biomarkers for squamous cell carcinoma of the lung revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*, 2009 Jan 27.

2. Hilfe bei der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen durch selektive Anreicherung von Phosphopeptiden

Nadine Dyballa, Sabine Metzger

Arbeitsgruppe Proteinanalytik, Molecular Proteomics Laboratory (MPL), BMFZ

Die Identifikation und Charakterisierung von Proteinen ist ein Schwerpunkt in der Arbeitsgruppe Proteinanalytik. Neben der reinen Identifizierung von Proteinen nimmt das Interesse an dem Nachweis von posttranslationalen Modifikationen (PTM) immer mehr zu. Die Phosphorylierung als universeller Regulationsmechanismus ist eine der beliebtesten Fragestellungen im Bereich der PTM's. Spezifische Färbungen und Antikörper geben häufig konkrete Hinweise auf ihr Vorhandensein. Nachteilig ist jedoch, dass die Phosphorylierung nicht positionsgenau detektiert wird. Mit Hilfe der Massenspektrometrie ist dagegen die eindeutige Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle im Protein möglich.

Das Wechselspiel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung im zellulären Geschehen ist ein sehr dynamischer Prozess. Modifizierte Proteine sind darüber hinaus häufig nur zu einem geringen Prozentsatz modifiziert. Zur massenspektrometrischen Analyse ist daher die Sequenzierung des spezifischen Peptides notwendig, welches die Modifikation trägt. Die Analyse wird jedoch dadurch erschwert, dass die Phosphopeptide in Anwesenheit von nicht-phosphorylierten Peptiden im Massenspektrometer aufgrund ihrer schlechteren Ionisierbarkeit stark supprimiert werden. Die Lokalisierung der exakten Phosphorylierungsstelle ist dann die sprichwörtliche Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen. Abhilfe schafft eine selektive Anreicherung der Phosphopeptide vor der MS-Analyse. Hierdurch wird die Nachweisempfindlichkeit deutlich verbessert und der Erfolg auf eine massenspektrometrische Charakterisierung erhöht.

Durch Einsatz von Affinitäts-chromatographischen Methoden können Phosphopeptide direkt nach dem proteolytischen Verdau für die Massenspektrometrie effizient aufkonzentriert werden. Es hat sich gezeigt, dass Titandioxid (TiO_2) gegenüber immobilisierter dreiwertiger Metallionen (IMAC) eine höhere Selektivität und Sensitivität für Phosphopeptide aufweist. Hierbei wird ein nicht-kovalenter Komplex zwischen TiO_2 und den Phosphatgruppen im Peptidgemisch gebildet. Nach dem Fortwaschen nicht-phosphorylierter Peptide werden die phosphorylierten Peptide dann selektiv eluiert.

Wir haben erfolgreich in verschiedenen Kooperationsprojekten TiO_2 im Batchverfahren zur Phosphopeptid-Anreicherung eingesetzt. Unter Verwendung dieser Technik konnten wir dadurch neue, unbekannte Phosphorylierungsstellen in Proteinen massenspektrometrisch nachweisen und identifizieren.

AG Markus Uhrberg**In vitro Generierung von Natürlichen Killerzellen aus humanen Stammzellen**

Markus Uhrberg,
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

Natürliche Killer (NK) Zellen haben eine Schlüsselfunktion bei der frühen Kontrolle von Virusinfektionen und der Eliminierung maligner Zellen im Rahmen der Tumorabwehr. Beim Menschen spielen hierbei inhibitorische Rezeptoren der KIR- (Killer cell Ig-like receptor) Genfamilie eine wichtige Rolle. Diese Rezeptoren werden in unterschiedlichen Kombinationen auf NK-Zellen exprimiert und bilden so ein sogenanntes klonotypisches Repertoire aus. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit den Mechanismen der Entstehung und Regulation des NK-Zellrepertoires. Wir haben zu diesem Zweck Zellkultursysteme entwickelt mit denen man die NK-Zellentwicklung aus Stammzellen *in vitro* untersuchen kann. Neben der Generierung von NK-Zellen aus hämatopoietischen Stammzellen haben wir ein neues System etabliert, bei dem induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) eingesetzt werden. Die möglichen Implikationen dieser neuen Entwicklung für den klinischen Einsatz von NK-Zellen werden diskutiert.

AG Sascha Weggen**An outlook on the mechanism of gamma secretase modulation**

Thorsten Jumpertz, Sascha Weggen,
Institut für Neuropathologie

The intramembrane-cleaving protease γ -secretase catalyses the last step in the generation of toxic amyloid- β ($A\beta$) peptides and is a principal therapeutic target in Alzheimer's disease. Both preclinical and clinical studies have demonstrated that inhibition of γ -secretase is associated with prohibitive side effects due to suppression of NOTCH processing and signaling. Potentially safer are β -secretase modulators (GSMs), which are small molecules that selectively lower generation of the highly amyloidogenic $A\beta_{42}$ peptides but spare NOTCH processing. GSMs with nanomolar potency and favorable pharmacological properties have been described, but the molecular mechanism of GSMs remains uncertain and both the substrate amyloid precursor protein (APP) and subunits of the γ -secretase complex have been proposed as the molecular target of GSMs. We have generated a potent photo-probe based on a piperidine GSM that lowers $A\beta_{42}$ generation with an IC_{50} of 290 nM in cellular assays. By combining *in vivo* photo-crosslinking with affinity purification, we demonstrated that this probe binds the N-terminal fragment of presenilin (PSEN), the catalytic subunit of the γ -secretase complex, in living cells. Labeling was not observed for APP or any of the other γ -secretase subunits. Binding was readily competed by a parent compound, but not by two compounds in the class of non-acidic GSMs suggesting a different mode of action. These findings indicate that potent acidic GSMs target presenilin to modulate the enzymatic activity of the γ -secretase complex.

AG Dieter Willbold

1. Structural basis of cyclic nucleotide-activated ion channel gating: Structural insights into conformational changes of a cyclic nucleotide-binding domain in solution

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

¹ Institut für Physikalische Biologie

² Institute of Complex Systems, Structural Biochemistry (ICS-6), Research Center Jülich

³ Center of Advanced European Studies and Research, Molecular Sensory Systems, Bonn

Cyclic nucleotide-gated (CNG) channels, and hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated (HCN) channels play an important role in signal amplification pathways. To elucidate the structural basis of the underlying gating mechanism, high resolution structures of the cyclic nucleotide-binding domain (CNBD) in the apo and holo state are required. Until recently, however, only crystal structures of CNBDs from HCN2 and the prokaryotic CNG channel MloK1 have been known. In the case of HCN2, the apo and holo state did not reveal substantial differences (Zagotta *et al.*, 2004, Taraska *et al.*, 2009). For MloK1, structural information for the apo state has only been gained from a non-functional mutant CNBD (Clayton *et al.*, 2004). In the present study, we determined the solution structures of the apo and holo wild-type CNBD of MloK1 (Schünke *et al.*, 2009, 2011). The solution structures of both states, allow to reconstruct, unbiased by mutations or crystal contacts, the sequence of dynamical events that propagate through the binding fold on cAMP binding. A comparison of these structures reveals large conformational rearrangements upon ligand binding. Ultimately, this leads to a sliding movement of the N-terminal helix which is directly connected to the transmembrane part of the channel. These structures provide important insights into conformational events that accompany channel gating within the ligand-binding site.

References:

Zagotta W.N., *et al.*, Nature, 425, 200-205 (2003)

Taraska J.W., *et al.*, Nat. Methods, 6, 532-537 (2009)

Clayton G.M., *et al.*, Cell, 119, 615-627 (2004)

Schünke S., *et al.*, EMBO Rep., 10, 729-735 (2009)

Schünke S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 108, 6121-6126

2. Nanodiscs – a model membrane for biophysical studies of membrane proteins

Bernd König, Julian Glück, Peixiang Ma, Marc Wittlich, Dieter Willbold

Institut für Physikalische Biologie

In vitro studies of membrane proteins frequently require reconstitution of the target protein into a model membrane that is compatible with the planned experiment. Many biophysical techniques have been developed and optimized for the study of soluble proteins. Application to membrane proteins often presents a considerable challenge.

Incorporation of membrane proteins into nanodiscs provides a versatile lipid bilayer environment to the protein and enables characterization of the membrane protein by

various techniques including solution NMR spectroscopy (1,2) as well as interaction studies by surface plasmon resonance (SPR) (3).

Nanodiscs consist of a small lipid bilayer patch of typically ~150 phospholipid molecules (4). The hydrophobic rim of the bilayer is protected from direct water contact by two copies of an amphipathic and highly α -helical membrane scaffold protein (MSP). A number of apolipoprotein-based MSP variants are in use. Nanodiscs are easily formed by a directed self assembly process starting from a stoichiometric mixture of detergent solubilized lipid and MSP. Gradual removal of detergent results in detergent-free nanodiscs. Addition of detergent solubilized membrane protein to the assembly mixture allows reconstitution of the membrane protein into the nanodisc (5).

We inserted a recombinantly produced and ^{15}N , ^{13}C -labeled fragment of human CD4 into nanodiscs and demonstrated feasibility of solution NMR studies on membrane proteins in nanodiscs (1). Second, the C-terminally lipidated protein GABARAP was anchored in a nanodisc via two palmitoyl chains. High quality solution NMR spectra of nanodisc associated GABARAP allows structure characterization as well as studies of molecular interactions (2). Finally, SPR was successfully used to study binding of a decahistidine tagged integral membrane protein in a nanodisc to a PentaHis monoclonal antibody (3).

(1) J. Glück et al. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**:12060-61

(2) P. Ma et al. (2010) *ChemBioChem* **11**:1967-70

(3) J. Glück et al. (2011) *Anal. Biochem.* **408**:46-52

(4) T.H. Bayburt et al. (2002) *NanoLetters* **2**:853-56

(5) T.H. Bayburt & S.G. Sligar (2010) *FEBS Letters* **548**:1721-27

3. Anfahrtsbeschreibung

Kardinal Schulte Haus, Overather Straße 51, 51429 Bergisch Gladbach

Fon: 02204-4080

Fax: 02204-408697

<http://www.k-s-h.de>

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

BMFZ

Prof. Guido Reifenberger, Reifenberger@med.uni-duesseldorf.de, 0211 – 81 8660

Dr. Cornelia Höner, Cornelia.Hoener@hhu.de, 0211 – 81 3373