

**5. BMFZ-Klausurtagung
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
6. – 7. September 2010**



Inhalt

Seite

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

5. BMFZ-KLAUSURTAGUNG
Kardinal-Schulte-Haus
Bergisch-Gladbach
6. - 7. September 2010

Programm

Montag, 6. September 2010

| | | |
|-------------------|---|---|
| 14.00 h | Begrüßung | Guido Reifenberger |
| 14.00 h - 16.15 h | Sitzung 1 | Moderation: HW. Müller, G. Reifenberger |
| | Mechanisms of degeneration and disturbed neuroregeneration in chronic neuroinflammation: roles of the i-proteasome, Sirt1 and Wnt | Orhan Aktas, Neurologie |
| | Implantation von Stammzellen zur Verbesserung der Regeneration nach Rückenmarktrauma | Jessica Schira, Hans Werner Müller, Molekulare Neurobiologie |
| | Novel Approaches toward Treatment of Spinal Cord Injury | Barbara Grimpe, Hans Werner Müller, Molekulare Neurobiologie |
| | Untersuchung oszillatorischer Netzwerke <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> | Markus Butz, Alfons Schnitzler, Neurologie |
| | Die Rolle von GDAP1 bei der Charcot-Marie-Tooth Polyneuropathie | Axel Methner, Neurologie |
| | Essential co-operation of N-cadherin and Neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation | Kurt Gottmann, Neuro- und Sinnesphysiologie |
| | Molecular mechanisms underlying glioblastoma cell invasion | Sabit Delic, Markus Riemschneider, Guido Reifenberger, Neuropathologie |
| | γ -Sekretase Modulation zur Therapie und Prävention der Alzheimer Erkrankung | Sascha Weggen, Neuropathologie |
| | Eine hochsensitive Methode für den Nachweis von Alzheimer-Amyloid- β -Aggregaten in Körperflüssigkeiten | Aillean Funke, Dieter Willbold, Physikalische Biologie |
| 16.15 h – 16.45 h | Kaffeepause | |
| 16.45 h – 18.45 h | Sitzung 2 | Moderation: A. Borkhardt, R. Haas |
| | Accessory proteins for Ras | Reza Ahmadian, Biochemie und Molekularbiologie II |
| | Profiling of corresponding miRNA/mRNA changes reveals selective upregulation of mitochondrial Sirt4 in cells undergoing premature senescence | Roland Piekorz, Biochemie und Molekularbiologie II |
| | Dual activation of β_1 -adrenergic receptors by cardiopathogenic autoantibodies: Allosteric switching of receptor conformation and inhibition of receptor cycling | Beatrice Bornholz, Friederich Boege, Klinische Chem. u. Laboratoriumsdiagnostik |
| | Dynamische Interaktion von mitochondrialer Topoisomerase I mit transkriptional aktiver mtDNA | Stefan Sobek, Friederich Boege, Klein. Chem. u. Laboratoriumsdiag. |
| | Entstehungsmechanismen akuter Leukämien im Kindesalter | Arndt Borkhardt, Kinder-Onkologie u. -Hämatologie |
| | Suppression der normalen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen durch maligne Plasmazellen auf dem Wege einer Überaktivierung des TGF-Beta-Signalweges | Rainer Haas, Hämatologie, Onkologie |
| | BRCA and Beyond – update 2010: new risk associated genes in breast and ovarian cancer families | Dieter Niederacher, W. Janni, Frauenklinik |
| | Rekurrente Bruchpunkte in Osteosarkomzelllinien | Birte Möhlendick, Harald Rieder, Humangenetik und Anthropologie |
| 19.00 h | Gemeinsames Abendessen, anschließend: Individuelle Diskussionsrunden im Biergarten | |

Programm

Dienstag, 7. September 2010

| | | |
|--------------------------|---|--|
| 8.00 h – 8.55 h | Gemeinsames Frühstück | |
| 9.00 h – 11.00 h | Sitzung 3 | Moderation: B. Homey, W. Schulz |
| | Toll-like Rezeptor (TLR)-Expression und UV-induzierte Entzündungsreaktion - Eine Untersuchung an humanen Keratinozyten | Nicole Fitzner, Victoria Kolb-Bachofen, Immunbiologie |
| | Einfluss von epigenetischen Determinanten auf die Differenzierung hämatopoietischer Stammzellen | Nina Graffmann, Jens Brands, Markus Uhrberg, ITZ |
| | Downregulation of antiviral genes in prostate cancers affects the response to the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine | Stefan Bleckmann, Wolfgang Schulz, Urologie |
| | Selektive activation of retroelements in prostate cancer | Wolfgang Göring, Wolfgang Schulz Urologie |
| | The latency-associated HCMV gene product pUL138 enhances TNFR1 expression | Khanh Le, Hartmut Hengel, Virologie |
| | Isolation, characterization, and activity of an endothelial nitric oxide synthase in human red blood cells | Miriam Cortese-Krott, Malte Kelm, Kardiologisches Labor |
| | Zytokin- und Chemokin-vermittelte Zell-Zellkommunikation | Bernhard Homey, Hautklinik |
| | Neuroimmunologie: Von rekombinanten Antikörpern und Hirngewebe im Reagenzglas | Prof. Norbert Goebels, Neurologie (Antragsteller) |
| 11.00 h – 11.30 h | Kaffeepause | |
| 11.30 h – 13.15 h | Sitzung 4 | Moderation: H. Schaal, A. Weber |
| | Regulation and Function of the Aryl hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) <i>in vivo</i> | Heike Weighardt, Irmgard Förster, Umweltmedizinische Forschung |
| | Konsequenzen pathogener Spleißmutationen | Heiner Schaal, Virologie |
| | Alveolate Pellice Proteins: Characterisation and Pathogenic Significance | Sven Gould, William Martin, Oekologische Pflanzenphysiologie |
| | A sodium-dependent pyruvate transporter belonging to the sodium:bile acid transporter family at the chloroplast envelope | Andreas P.M. Weber, Biochemie der Pflanzen |
| | Bericht des Molekularbiologischen Zentrallabors | Karl Köhrer, Molekularbiologisches Zentrallabor |
| | Aufgaben und Leistungen des Analytischen Zentrallabors | Sabine Metzger, Analytisches Zentrallabor |
| | Bioinformatische Technik für die Analyse von Gensequenzdaten | Wolfgang Kaisers, Martin Lercher, Bioinformatik |
| 13.15 h - 14.30 h | Gemeinsames Mittagessen | |
| | Ende der Klausurtagung | |

2. Abstracts

AG Reza Ahmadian

1. Accessory proteins for Ras

Ion Cirstea, Lothar Gremer & Reza Ahmadian, Institute of Biochemistry & Molecular Biology II

Signal transduction of Ras and Ras-like proteins is regulated by three classes of canonical interacting partners. These include regulators that control activation, (guanine nucleotide exchange factors GEFs), inactivation (GTPase-activating proteins GAPs) of the GTPase cycle, and a wide spectrum of effectors (e.g. Raf kinase and PI3K) that initiate signaling cascades downstream of Ras and Ras-like proteins. Currently, it has become more evident that an increasing number of additional Ras-binding partners, including galectin-1, galectin-3, Notch1, nucleolin, nucleophosmin and p75^{Neurotrophin receptor} are critical in modulating and integrating Ras in various signaling networks at biological membranes. However, the roles of these accessory proteins as novel modulators of Ras signaling remain unclear. We consider that these control elements safeguard the strength, efficiency and specificity of Ras-dependent signal transduction, provide an attractive **new generation of highly selective drug targets** that attenuate rather than inhibit Ras signaling. Preliminary results on deciphering new functional control mechanisms of Ras signal transduction will be discussed.

2. Profiling of corresponding miRNA/mRNA changes reveals selective upregulation of mitochondrial Sirt4 in cells undergoing premature senescence

Kuck F¹, Lindecke A², Schmidt S¹, Schroeder P³, Krutmann J³, Köhrer K², Piekorz RP¹,
¹Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, ²Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ), and ³Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)³,

Centrosomal transforming acidic coiled-coil (TACC) domain-containing proteins are central players in structures and processes connected to the mitotic spindle apparatus and cell division. We could recently demonstrate that mitotic spindle stress elicited through depletion of TACC3 is a potent inducer of cellular senescence linking centrosome dysfunction to p21WAF mediated cell cycle exit and growth arrest [1]. Interestingly, a role of small non-coding RNAs (miRNAs), which regulate various gene expression networks, has been proposed in model systems of organismal aging. Here we analyzed molecular changes in mitotic spindle stress triggered senescence by performing a comparison of miRNA- and mRNA expression profiles between proliferating and senescent (i.e., TACC3-depleted) MCF7 cells. Among ~41000 gene array targets, 2389 mRNAs were differentially expressed upon TACC3 knockdown, annotated predominantly to cell cycle regulation, chromosome segregation, and cellular macromolecular complex subunit organization. In parallel, 38 miRNAs were differentially expressed between control and senescent MCF7 cells (fold change ≥ 1.5 , $p < 0.05$). A total of 603 regulated transcripts were predicted targets of these differentially expressed miRNAs with 9 miRNAs showing a strong differential expression correlation with their targets. Noticeably, TACC3 depletion led to downregulation of the miR-17-92 cluster, a novel biomarker of human cell aging which is

repressed by p53 in stress-induced senescence. Furthermore, miR-146b, an inhibitor of the senescence associated secretory phenotype, was found at higher levels in TACC3 depleted cells. Lastly, we observed a downregulation of miR-15b concomitant with selective upregulation of the mitochondrial Sirtuin isoform Sirt4 among this multifunctional protein family. Thus, combined miRNA/mRNA profiling substantiates the premature senescence phenotype triggered by mitotic spindle stress and identifies Sirt4 as a potential novel senescence marker. [http://www.iovs.org/cgi/content/full/50/8/3562 - B1](http://www.iovs.org/cgi/content/full/50/8/3562-B1)

[1] Schmidt, Schneider et al. (2010). The centrosomal protein TACC3 controls paclitaxel sensitivity by modulating a premature senescence program. *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2010.354.

AG Orhan Aktas

Mechanisms of degeneration and disturbed neuroregeneration in chronic neuroinflammation: roles of the i-proteasome, Sirt1 and Wnt

Orhan Aktas, Molecular Neurology Research Group, Department of Neurology

Current research indicates that mild (i.e. sublethal), but persistent inflammatory stimuli in the central nervous system (CNS), as found in multiple sclerosis (MS), may not affect neuronal survival but cause neuronal dysfunction and subtle neuropathological changes. We are currently investigating the molecular mechanisms responsible for these – possibly even reversible – alterations. Our recent work revealed a crucial role of mild oxidative conditions regulating both, degenerative and regenerative processes in the CNS. We observed that interferon (IFN)-induced immunoproteasomes (i-proteasomes), previously associated with improved processing of major histocompatibility complex (MHC) class I antigens, function to protect cell viability under conditions of IFN-induced oxidative stress (Seifert et al. 2010, *Cell* 142:613). Apparently, IFNs trigger the production of reactive oxygen species, which induce protein oxidation and the formation of nascent, oxidant-damaged proteins. We found that the ubiquitin proteasome system (UPS) is concomitantly upregulated in response to IFNs, functioning to target defective ribosomal products (DRiPs) for degradation by i-proteasomes. In a murine model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), i-proteasome-deficiency resulted in the formation of ubiquitylated protein aggregates. Obviously, efficient clearance of these aggregates by the enhanced proteolytic activity of the i-proteasome is important for the preservation of cell viability upon IFN-induced oxidative challenge. Interestingly, we observed marked differences regarding the inducibility of i-proteasomes in different cell types and are currently investigating the underlying molecular mechanisms. Such differences may explain the tissue-dependent susceptibility towards inflammatory damage processes. Previously we had been able to link an epigenetic mechanism to disturbed neurogenesis in the course of neuroinflammation. We had observed that the histone deacetylase *silent information regulator 1* (Sirt1) serves as a sensor for the redox potential in neural progenitor cells (NPCs), and directly influences their differentiation via modulation of basic helix loop helix (bHLH) transcription factors such as Mash1 (Prozorovski et al. 2008, *Nat Cell Biol* 10:385). We are currently investigating the distinct cellular expression patterns of Sirt1 in the CNS

in different developmental periods, including early and aged stages. Finally, regarding further molecular pathways regulating neurogenesis in the context of chronic neuro-inflammation, we recently observed alterations of Wnt signaling in the course of EAE. Taken together, our current work indicates that chronic inflammatory processes modulate the homeostasis of the CNS by multiple molecular mechanisms, ranging from protein turnover to epigenetic pathways.

AG Fritz Boege

1. Dual activation of β_1 -adrenergic receptors by cardiopathogenic autoantibodies: Allosteric switching of receptor conformation and inhibition of receptor cycling.

Beatrice Bornholz¹⁾, Stefanie Weidtkamp-Peters³⁾, Stephanie Schmitmeier¹⁾, Claus A. M. Seidel²⁾, Lars R. Herda⁵⁾, Stephan B. Felix⁵⁾, Horst Lemoine⁶⁾, Morten O. Christensen¹⁾, Christian Mielke¹⁾, Fritz Boege^{1,7)}

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

³⁾ Institute of Molecular Physical Chemistry, Heinrich-Heine-University, Universitätsstr.1, 40225 Düsseldorf, Germany

⁵⁾ Department of Internal Medicine B, University of Greifswald, Friedrich-Loeffler-Str. 23a, 17475 Greifswald, Germany.

⁶⁾ Institute of Laser Medicine, Heinrich-Heine-University, Medical School, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Background: Antibodies against extracellular epitopes of β_1 -adrenergic receptors are frequent in chronic heart failure of various etiologies. Immunization against these epitopes induces cAMP-stimulatory autoantibodies conferring myocardial dysfunction. Such autoantibodies are thought to trigger cardiopathogenesis via allosteric conformational receptor activation. We prove this hypothesis and evaluate further properties discriminating cardiopathogenic and apathogenic autoantibodies.

Methods and Results: Cardiopathogenic IgG were derived from unselective immune apheresis of patients with dilated cardiomyopathy (NYHA III-IV, EF < 30 %, stable medication, long-termed hemodynamic improvements). Apathogenic IgG were isolated from blood samples of matched healthy volunteers. Both collectives were assessed for IgG binding to native β_1 -adrenergic receptors by immunoprecipitation and colocalization with biofluorescent receptors expressed in HEK 293 cells. Receptor autoantibodies thus confirmed (i) had similar prevalences > 90% in patients and volunteers, (ii) stimulated cAMP with a potency not stringently correlated to titer or disease activity, (iii) triggered changes in receptor conformation similar to full, partial or inverse agonists, and (iv) sensitized cAMP responses to catecholamines by inhibiting agonist-triggered receptor cycling. The last potency was significantly higher in patient IgGs. It was correlated to therapy response and highly discriminative (> 80%) between cardiopathogenic and apathogenic autoantibodies.

Conclusions: β_1 -adrenergic receptor autoantibodies are allosteric modifiers of receptor conformations mimicking (partial) agonists or antagonists. They have a high prevalence not significantly related to heart disease. β_1 -adrenergic receptor autoantibodies also inhibiting agonist induced receptor cycling and prolonging cellular cAMP responses to

catecholamines are significantly linked to cardiac insufficiency and their inhibitory potency is correlated to therapy response.

2. Dynamische Interaktion von mitochondrialer Topoisomerase I mit transkriptional aktiver mtDNA

Stefan Sobek, Ilaria Dalla Rosa, Christian Mielke, Fritz Boege, und Morten O. Christensen, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Für die Homöostase des mitochondrialen Genoms (mtDNA) ist es notwendig, den bei Transkription und Translation auftretenden topologischen Stress zu reduzieren. Alle Vertebraten exprimieren eine mitochondrial adressierte typ IB Topoisomerase (Top1mt), die im nuklearen Genom kodiert ist. Um die biologische Funktion von Top1mt zu untersuchen, wurde das Wildtypprotein Top1mt sowie eine katalytisch inaktive Variante (Y559F) mit YFP fusioniert und stabil in humanen Zellen exprimiert. Die Expression dieser fluoreszierenden Proteine hatte keinen Einfluss auf die Kopienanzahl und Topologie der mtDNA. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte für beide Top1mt Varianten eine mitochondriale Verteilung mit distinkten Akkumulationen in Foci gezeigt werden. Diese Top1mt Foci kolo-kalisierten mit mitochondrialen Nucleoiden und konnten nur in Zellen mit mtDNA nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte Top1m eine starke Präferenz für Nucleoide, die aktiv transkribierte mtDNA enthalten, was auf eine Rolle von Top1mt im mitochondrialen Transkriptionsprozess hinweist. Photobleaching Experimente zeigten, dass Top1mt innerhalb eines mitochondrialen Kompartiments mobil ist, und deswegen zwischen einzelnen Nucleoiden mit aktiver Transkription frei ausgetauscht werden kann.

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass eine dynamische Verbindung Zwischen Top1mt und den mitochondrialen Nucleoiden besteht und deuten darauf, dass es selektiv zu einer Akkumulation von Top1mt an Nucleoiden mit transkriptional aktiver mtDNA kommt.

AG Arndt Borkhardt**Entstehungsmechanismen akuter Leukämien im Kindesalter**

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

Chromosomale Translokationen und genomische Abberationen bei kindlichen, akuten Leukämien sind für die Auswahl einer geeigneten Therapie, sowie für den Progress der Erkrankung entscheidend. Das Labor für Knochenmarkstransplantation befasst sich mit der umgehenden Charakterisierung kindlicher akuter myeloischer und lymphatischer Leukämien. Voraussetzung für die Entstehung einer Leukämie sind eine für die Entartung susceptible, hämatopetische Zellpopulation, bestimmte Umgebungsfaktoren im Knochenmark, sowie zytogenetische Abberationen. Diese unterschiedlichen Teilgebiete werden von unterschiedlichen Arbeitsgruppen adressiert.

Die Charakterisierung von hämatopoetischen Zellpopulationen erfolgt zum aktuellen Zeitpunkt in Mausmodellen welche defizient für Tumorsuppressorgene und lymphatische Zelldifferenzierungsgene sind. In diesem Modell konnte eine hämatopoetische Stammzellpopulation beschrieben werden, die eine B-lymphoblastische Leukämie induziert.

Die Bedeutung der hämatopetischen Nische für die Entstehung einer akuten Leukämie adressieren wir indem wir die Bedeutung von Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und deren Einfluss auf die Funktion hämatopoetischer Zellen untersuchen. Hier stehen v.a. die immunmodulatorische Bedeutung von gesunden MSCs auf Zellen des Immunsystems im Vordergrund als auch die Auswirkung genetisch veränderter MSCs auf die Entstehung oder Promotion einer akuten Leukämie. Die Arbeitsgruppe strebt parallel die Erteilung einer Herstellungserlaubnis für GMP konforme MSCs an, um diese Zellen auch in klinischen Protokollen einsetzen zu dürfen.

Um die Bedeutung von genomischen Alterationen für die Entstehung von akuten Leukämien zu untersuchen befassen wir uns mit der lymphatischen TEL/AML1 positiven und der HLXB9/TEL positiven akuten myeloischen Leukämie. Für diese beiden Leukämieentitäten wurden Promotorbindungsstudien durchgeführt, um den Einfluss des Fusionsproteins auf die zelluläre Genexpression hin zu untersuchen. Diese Daten stehen zur Publikation an. In einem zweiten Schritt werden Zielgene dieser Fusionsproteine in primären hämatopoetischen Stammzellen validiert und deren Einfluss auf hämatopoetische Stammzellendifferenzierung untersucht.

Darüber hinaus werden detaillierte genomische Profile der humanen TEL/AML1 und HLXB9/TEL positiven Blasten erstellt. Dies erfolgt sowohl im Blastenpool als auch mit einer neuen Methode auf Einzelzellebene mittels 454-Sequenzierung und Illumina Mate-pair Sequenzierung.

Diese methodische Plattform erlaubt es uns im Rahmen international renommierter International Cancer Genome Consortium (ICGC)–Projekte micro-RNA- und genomische Profile in weiteren malignen Zellen zu charakterisieren.

AG Irmgard Förster

Regulation and Function of the Aryl hydrocarbon Receptor Repressor (AhRR) *in vivo*

Heike Weighardt*, Olga Brandstätter*, Stefanie Zwicker*, Meike Winter*, Thomas Haarmann-Stemmann#, Markus Korkowski*, Charlotte Esser*, Josef Abel# and Irmgard Förster*,
*Department of Molecular Immunology, #Department of Molecular Toxicology, Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung (IUF)

The Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) is a ligand activated transcription factor which mediates the toxic effects of polycyclic and halogenated aromatic hydrocarbons. Upon ligand binding, the AhR translocates into the nucleus to induce transcription of genes that regulate the xenobiotic metabolism. Recently, it was shown that the AhR has in addition an emerging role in the immune system. The AhR contributes to the differentiation of regulatory T cells and Th17 cells and also serves as an innate immune regulator. The AhR itself is regulated by feedback inhibition by the AhR Repressor (AhRR). It is presently unclear, however, whether the AhRR exerts an essential antagonistic function *in vivo*, either under physiological conditions or in response to exogenous AhR activation. In order to get insight in AhRR expression and function we generated AhRR-deficient mice which additionally allow to monitor expression of the AhRR by a fluorescence approach. Therefore, we replaced the coding region of the AhRR gene by an enhanced green fluorescence protein (EGFP)-cassette. Expression analysis in naive AhRR^{E/+} and AhRR^{E/E} mice revealed constitutive expression of the AhRR in immune cells mainly located in barrier organs. AhRR expression could be demonstrated in dendritic cells (DC) in skin, mucosa and lymph nodes, and T cells of the intestinal immune system. In addition, fibroblasts and keratinocytes in the skin express the AhRR and its expression could be enhanced by AhR activation. Interestingly, no expression of the AhRR could be detected in liver and heart. Expression of the AhRR could not only be upregulated by AhR activation, but was also enhanced after stimulation with Toll like Receptor (TLR) ligands in lymph node DC *in vivo* and *in vitro*, analysing expression of the AhRR in bone marrow derived DC. These data indicate an important crosstalk of the innate immune system with the AhR/AhRR pathway at environmental interfaces.

AG Norbert Goebels

Neuroimmunologie: Von rekombinanten Antikörpern und Hirngewebe im Reagenzglas

Norbert Goebels, Neurologische Klinik

Obwohl weder die krankheitsrelevanten Immunkomponenten, noch deren molekulare Zielstrukturen identifiziert sind, gibt es Hinweise dafür, dass klonal expandierte, autoreaktive Lymphozytenpopulationen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) und anderer immun-medierter neurologischer Erkrankungen spielen. Ein besonders augenfälliges Indiz hierfür ist das Vorhandensein sogenannter „oligoklonaler Immunglobuline“ (OKB) im Liquor von mehr als 95% aller MS-Patienten. Trotz intensiver Untersuchungen sind Antigenpezifität und pathogenetische Relevanz dieser OKB bislang nicht

entschlüsselt. Mit Hilfe rekombinanter Antikörpertechnologie konnten wir die Antigenspezifität klonal expandierter Liquorplasmazellen, den Produzenten der oligoklonalen Banden, in monoklonaler Form nachbilden und die Bindung an ZNS Strukturen demonstrieren. Konfokales Live-imaging dient dazu, die Interaktion verschiedener Immunkomponenten mit dem zentralen Nervensystem in organotypischen ZNS-Gewebekulturen zu charakterisieren.

AG Kurt Gottmann

Essential co-operation of N-cadherin and Neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation

Kurt Gottmann,
Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie

Cell adhesion molecules are key players in transsynaptic communication, precisely coordinating presynaptic differentiation with postsynaptic specialization. At glutamatergic synapses, their retrograde signaling has been proposed to control presynaptic vesicle clustering at active zones. However, how the different types of cell adhesion molecules act together during this decisive step of synapse maturation is largely unexplored. Using a knockout approach, we show that two synaptic adhesion systems, N-cadherin and Neuroligin-1, co-operate to control vesicle clustering at nascent synapses. Live cell imaging and FRAP experiments at individual synaptic boutons revealed a strong impairment of vesicle accumulation in the absence of N-cadherin, whereas the formation of active zones was unaffected. Strikingly, also the clustering of synaptic vesicles triggered by Neuroligin-1 overexpression required the presence of N-cadherin in cultured neurons. Mechanistically, we found that N-cadherin acts by postsynaptically accumulating Neuroligin-1 and activating its function via the scaffolding molecule S-SCAM, leading in turn to presynaptic vesicle clustering. A similar co-operation of N-cadherin and Neuroligin-1 was observed in immature CA3 pyramidal neurons in an organotypic hippocampal network. Moreover, at mature synapses N-cadherin was required for the increase in release probability and miniature EPSC frequency induced by expressed Neuroligin-1. This co-operation of two cell adhesion systems provides a novel mechanism for coupling bidirectional synapse maturation mediated by Neuroligin-1 to cell type recognition processes mediated by classical cadherins.

(Stan et al., PNAS 2010)

AG Rainer Haas**Suppression der normalen hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen durch maligne Plasmazellen auf dem Wege einer Überaktivierung des TGF-Beta-Signalweges**

Ingmar Bruns, Sebastian Büst und Rainer Haas,
Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie

Das Versagen der Hämatopoese mit Ausbildung einer Anämie ist ein sehr häufiges Erstsymptom bei Patienten mit multiplem Myelom. Die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen sind bisher kaum untersucht worden. Daher führten wir bei einer Gruppe von 51 Patienten mit Erstdiagnose eines multiplen Myeloms eine Reihe von zellbiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen durch. Das mittlere Alter der Patienten betrug 68 Jahre, wobei 22 Patienten Frauen und 30 Patienten Männer waren. Im Mittelpunkt unserer Untersuchungen stand die Genexpressionsanalyse von CD34-positiven hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen dieser Patienten. Außerdem wurde der Gehalt an unterschiedlichen Vorläuferpopulationen (HSC, CMP, MEP und GMP) mit Hilfe einer FACS-Analyse untersucht. Zunächst fanden wir, dass die Patienten im Vergleich zu normalen Kontrollpersonen eine 4-fach geringere Menge des für die Erythrozyten- und Thrombozytenbildung verantwortlichen Vorläufers MEP aufwiesen. Außerdem zeigte sich auch eine signifikant verringerte Zahl an erytroiden Kolonien in Form von BFU-E- und CFU-E. Bei der Genexpressionsanalyse zeigte sich dann, dass insbesondere die Überaktivierung des TGF-Beta-Signalweges in den CD34-positiven Zellen zu der verringerten Selbsterneuerungskapazität, Proliferation und Differenzierung der unterschiedlichen Stamm- und Progenitorzellen beitrug. Auf Proteinebene spiegelte sich dies insbesondere in einer gesteigerten Aktivität des hauptsächlichen Mediators der TGF-Rezeptor-1-Kinase nämlich dem phosphorylierten smad2-Protein wider. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auch bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, welches durch eine gestörte Ausreifung von Stammzellen gekennzeichnet ist, eine Überexpression des TGF-Beta-Signalweges eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielt.

AG Hartmut Hengel**The latency-associated HCMV gene product pUL138 enhances TNFR1 expression**

Vu Thuy Khanh Le, Mirko Trilling and Hartmut Hengel,
Institut für Virologie

Analysis of phenotypic differences between HCMV AD169 variants containing most of the ULb' region (AD169-ULb'pos) and AD169 variants with duplicated TRL region (AD169-ULb'neg) revealed distinct modulation of TNF receptor signalling, including discrepant densities of TNFR1 on the cell surface. Cells infected with the AD169-ULb'pos variant showed increased TNFR1 surface distribution compared to AD169-ULb'neg-infected cells. The cloning and testing of all open reading frames encoded by the AD169 ULb' region identified the UL138 gene product as mediator of this phenotype. Ectopically expressed pUL138 resulted in augmented TNFR1 surface expression leading to gain of sensitivity

towards TNF- α treatment. pUL138 up-regulated TNFR1 protein levels due to an extended protein half-life. The effect of pUL138 was target selective since related death receptors including Fas and TRAIL receptor 2 remained unchanged. As UL138 transcripts were previously detected in latently infected CD14⁺ monocytes and CD34⁺ progenitor cells from HCMV-seropositive donors (Goodrum et al. Blood 110(3): 937-945, 2007), the elucidation of pUL138 function will be instrumental in understanding the role of TNF- α in the control of HCMV latency and reactivation. Based on an AD169-ULb'pos BACmid a targeted DeltaUL138 deletion mutant was constructed. Analysis of this mutant virus revealed additional pUL138-independent HCMV-encoded modulation of TNFR1, underscoring strict regulation of TNFR1 signalling by HCMV in productive as well as latent infection. Altogether, the identification of the latency-promoting HCMV gene product pUL138 as enhancer of TNFR1 expression highlights the importance of TNF- α signalling for latency and/or reactivation in vivo.

AG Bernhard Homey

Zytokin- und Chemokin-vermittelte Zell-Zellkommunikation

Bernhard Homey,
Hautklinik

Zytokine und Chemokine kontrollieren wichtige biologische Prozesse des Organismus. Sie erhalten die Homöostase, induzieren allergische und autoimmune Antworten und beeinflussen Tumorprogression und Metastasierung. Hier werden aktuelle Projekte zur Rolle von Zytokinen und Chemokinen in der Spermien-Eizell-Interaktion, Infektkontrolle, Juckreizentstehung und Tumorprogression vorgestellt.

AG Dieter Niederacher, Wolfgang Janni

BRCA and Beyond – update 2010: New risk-associated genes in breast and ovarian cancer families

Dieter Niederacher, Wolfgang Janni, Frauenklinik

Germline mutations in a number of genes involved in the recombinational repair of DNA double-strand breaks are associated with a predisposition to breast and ovarian cancer.

The high-penetrance breast cancer genes *BRCA1* and *BRCA2* and the four intermediate-penetrance breast cancer genes, *ATM*, *CHK2*, *BRIP1* and *PALB2*, play essential roles in the genomic stability of cells and have been functionally linked to the homologous recombination (HR) pathway of DNA repair.

Some biallelic mutations in *BRCA2*, *PALB2* and *BRIP1* are viable and cause a rare childhood chromosomal instability disorder, Fanconi anemia (FA), characterized by developmental abnormalities, bone marrow failure and predisposition to leukemia and other cancers.

As recently a homozygous missense mutation in the *RAD51C* gene (also involved in HR DNA repair pathway) was shown to cause a Fanconi anemia-like phenotype, we assessed whether monoallelic germline alterations in *RAD51C* confer susceptibility to breast and/or ovarian cancers by screening the *RAD51C* gene in such families tested negative for mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes.

In 1100 index cases from 1100 German families, we identified six monoallelic pathogenic mutations in *RAD51C* that confer an increased risk for breast and ovarian (BC/OC) cancer. We identified two frameshift-causing insertions, two splice site mutations and two missense alterations, which proved to be non-functional in two independent in vitro assays. These mutations were exclusively found within 480 pedigrees with the occurrence of both tumor entities (1.3%), but not in 620 pedigrees with breast cancer only or in 2912 healthy German controls. Initial clinical and histopathological data indicated that *RAD51C*-associated carcinomas might represent a tumor entity distinct from *BRCA1*- and *BRCA2*-associated malignancies.

The results provide the first evidence of highly penetrant mutations in a *RAD51* paralogue with human cancer and support the 'common disease – rare allele' hypothesis, pointing to the existence of multiple, yet undetected high-risk conferring genes for breast and ovarian cancer.

AG Malte Kelm

Isolation, characterization, and activity of an endothelial nitric oxide synthase in human red blood cells

Miriam M. Cortese-Krott¹, Patrick Horn¹, Thomas Krenz¹, Christoph Krisp², Sivatharsini Sivarajah¹, Katharina Lysaja¹, Franziska Strigl¹, Dirk Wolters², Klaus-Dietrich Kröncke³, Christian Heiß¹, Malte Kelm¹,

¹Cardiovascular Research Laboratory, Department of Cardiology, Düsseldorf University Hospital, Düsseldorf, Germany; ²Biomolecular mass spectroscopy/Proteincenter, Department of analytical chemistry, Ruhr-University Bochum, Germany; ³Institute of Biochemistry and Molecular Biology I, Medical Faculty of the Heinrich Heine University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany.

It has been shown that red blood cells (RBC) express a nitric oxide synthase (NOS), and release NO metabolites in a NOS-dependent fashion. The biochemical characteristics (isoform and activity) of this RBC-NOS are unknown. The aim of this study was to isolate and characterize the RBC-NOS for sequence, activity in vitro and ability to produce NO within RBC. We isolated a NOS protein under native conditions by immunoprecipitation with magnetic microbeads using antibodies anti human-NOS3. The success of immunoprecipitation was verified by western blot. Electron spray ionization/mass spectrometric analysis revealed that the immunoprecipitated protein is a endothelial nitric oxide synthase (NOS3 type 1). The isolated protein was active as measured by the conversion L-H³-Arginine into L-H³-Citrullin. The activity could be inhibited by adding the NOS inhibitors L-NAME or L-NIO, and was dependent on the presence of Ca⁺⁺/Calmodulin in the reaction buffer. We also found a NOS-dependent intracellular NO production within RBC as measured by staining the cells with the NO probe DAF-FM and laser scanning microscopy, fluorimetry and flow cytometry. By comparing the intracellular NO production among blood cells by flow cytometry, we found that monocytes produce the highest levels

of NO, followed by neutrophils, lymphocytes, RBC and platelets. Thus, because of their number RBC are the major NO producing compartment in blood. In summary, we here show that human RBC express a classical isoform of NOS3, which is active *in vitro* and produces NO within the cells. Our data point to a role of RBC in mediating NOS-derived effect within the circulation.

AG Karl Köhrer

Aufgaben und Leistungen des Molekularbiologischen Zentrallabors

Karl Köhrer,
Molekularbiologisches Zentrallabor (MZL) des BMFZ

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

- durch die Bereitstellung von speziellen Analysegeräten,
- durch die Durchführung von Auftragsanalysen,
- im Rahmen wissenschaftlicher Kooperationsprojekte.

Im Vortrag werden die zur freien Nutzung bereitstehenden Spezialgeräte (Pipettierroboter, spezielle Photometer, Fluorometer, Real-Time PCR Systeme) vorgestellt und die aktuell angebotenen Auftragsanalysen (DNA-Sequenzierung, DNA-Fragmentanalysen, Bio-Analyzer-Chip basierte DNA/RNA-Untersuchungen, Affymetrix Microarray Analysen) erläutert. Neue Möglichkeiten der Genexpressionsanalyse mit Hilfe von DNA-Microarrays, bzw. über Hochdurchsatz-Sequenzierungsansätze (RNA-Sequencing) werden am Beispiel von ausgewählten Kooperationsprojekten vorgestellt.

Kontaktdaten:

Karl Köhrer – Tel. 81 13165 – Email: koehrer@uni-duesseldorf.de

Sibylle Scheuring – Tel. 81 13069 – Email: scheurin@uni-duesseldorf.de

René Deenen – Tel. 81 14367 – Email: Rene.Deenen@uni-duesseldorf.de

AG Martin Lercher

Bioinformatische Technik für die Analyse von Gensequenzdaten

Wolfgang Kaisers¹, Martin Lercher²,

¹Zentralbereich Bioinformatik (BMFZ), ²Institut für Bioinformatik

Die Analyse von Gensequenzdaten umfasst eine Vielzahl verschiedener Teilprozesse. Das Spektrum reicht von technischen Aspekten, wie der Handhabung großer Datenmengen (im Gigabyte- bis Terabyte-Bereich) und Prozessorkapazitäten über Prozessierung von Next Generation Sequencing Daten bis hin zum Problem der Korrelation zwischen

Gensequenzen und komplexen biochemischen Prozessen wie Transkription, RNA-Splicing und Translation.

Die technische Realisierung und Anwendung von Analysealgorithmen muss auf Plattformen stattfinden, die den Spezifikationen von Hochleistungsrechnern genügen. Das bedeutet Einsatz von Datenbanksystemen und speziellen Softwareprodukten sowie eigene Anpassungen und Neuentwicklungen aufbauend auf bestehenden Softwarebibliotheken.

In der Regel bestehen die ersten Analyseschritte aus Präprozessieren, Assemblieren und Annotation. Dafür wird meist kommerzielle Software (z.B. mitgeliefert mit Sequenziergeräten) oder Freeware aus akademischen Quellen, also fertige Softwareprodukte eingesetzt.

Erst danach wenden sich die weiteren Bearbeitungsschritte der Beantwortung der eigentlichen biologischen Fragestellung zu. In der Anfangsphase der Sequenziertechnik wurden vor allem allgemeine Fragestellungen bearbeitet, wie die Identifikation von Genen und Transkriptionsstartstellen und von Exon- und Intronregionen. Dafür sind eine Vielzahl verschiedener probabilistischer Modelle eingesetzt und weiterentwickelt worden. Viele davon wurden bis zu fertigen Softwareprodukten weiterentwickelt. Aufgrund der Komplexität der Sequenzstrukturen existiert bis heute kein Algorithmus, der die oben genannten Identifikationen sicher leistet.

Mit zunehmender Verbreitung der Sequenziertechnik werden die bearbeiteten Fragestellungen spezialisierter, das heißt von der globalen Ebene auf die lokale Ebene verschoben. Als Beispiel sei die Funktion von Transkriptionsregulationen und Splicingvorgängen einzelner Gene genannt. In ihrer Grundstruktur sind allerdings alte und neue Fragen gleich. Deshalb wird man sinnvollerweise auch zunächst mit gleichen probabilistischen Modellen arbeiten. Man kann und muss also auf einem breiten Spektrum existierender Struktur aufbauen.

Etwas abstrakter formuliert bedeutet Gensequenzanalyse, dass man aus Abhängigkeiten in der linearen Kettenstruktur von DNA, RNA und Proteinen funktionelle Rückschlüsse ableiten will. Deshalb verwendet man Modelle, die Wahrscheinlichkeiten sequentiell beobachteter Ereignisse darstellen und oft aus anderen technischen Bereichen wie beispielsweise Kommunikationstechnik oder Spracherkennung übernommen wurden. Beispiele dafür sind Markov-Ketten (höherer Ordnung) und Hidden Markov Models. Aber auch Modelle mit anderem Hintergrund wie Neuronale Netzwerke und Diskriminanzanalyse werden erfolgreich eingesetzt. Diese Modelle werden typischerweise mit existierenden Daten trainiert bevor man Aussagen daraus ableiten kann.

Bei der Anpassung bekannter Modelle an spezifische Fragestellungen kann in der Regel nicht auf fertige Softwareprodukte zurückgegriffen werden. Dafür ist die Entwicklung neuer Lösungen erforderlich. Um dies zu bewerkstelligen müssen biologische, Wahrscheinlichkeitstheoretische und technische Aspekte in den Lösungsansatz integriert werden.

Eddy S.R. What is a hidden Markov model, *Nature Biotechnology* (2004), 22: 1315-1316

Forney G. The Viterbi Algorithm, *Proceedings of the IEEE* (1973) 61(3): 268-278

Rajapakse J.C., Ho L.S. Markov Encoding for Detecting Signals in Genomic Sequences, *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* (2005) 2(2): 131-142

Zhang L., Luo L. Splice site prediction with quadratic discriminant analysis using diversity measure, *Nucleic Acids Research* (2003) 31(21): 6214-6220

AG Victoria Kolb-Bachofen

1. Toll-like Rezeptor (TLR)-Expression und UV-induzierte Entzündungsreaktion - Eine Untersuchung an humanen Keratinozyten

Nicole Fitzner, Victoria Kolb-Bachofen,
Forschungsgruppe Immunbiologie, Institut für Molekulare Medizin

Die zehn Toll-like Rezeptoren (TLRs), die bislang im humanen System identifiziert wurden, sind Rezeptoren der natürlichen Immunität und erkennen Pathogene aufgrund ihrer evolutionär konservierten Strukturen. Bereits kurze Zeit nach dieser Entdeckung wurden auch erste endogene Stressproteine als TLR-Liganden ermittelt. Diese können u.a. während toxischer Schäden oder Entzündungsprozessen von den Zellen gebildet bzw. freigesetzt werden und werden danger-Signale genannt. UV-Strahlung stellt hierbei einen sterilen entzündlichen Stimulus dar („Sonnenbrand“) und kann zur Modifikation körpereigener Hautstrukturen sowie zur Bildung und Freisetzung endogener Stressproteine führen. In weiterer Folge steht die UV-induzierte Immunsuppression, deren initiale molekulare Prozesse allerdings noch weitgehend unbekannt sind. Beide Ausgangspunkte verknüpfend untersuchen wir die Genexpression von TLRs auf humanen primären Keratinozyten und deren Modifikation nach UVA- bzw. UVB-Bestrahlung, um hierdurch einen Einstieg in die Untersuchung der UV-induzierten Entzündung und Immunsuppression zu erhalten.

Dafür haben wir zunächst primäre Keratinozyten-Kulturen mit verschiedenen UVA- (bis 60 J/cm^2) und UVB-Dosen (bis 60 mJ/cm^2) bestrahlt und mittels semiquantitativer real-time PCR die TLR-Genexpression untersucht. Ein allgemeiner Screen auf alle zehn Rezeptoren ergab, dass die Expression einiger, aber nicht aller TLRs durch UV-Strahlung moduliert wird: TLRs 7, 8, 9 und 10 werden sowohl unter hoher UVA- (60 J/cm^2) als auch unter UVB-Strahlung (60 mJ/cm^2) hochreguliert, TLRs 1 und 2 unter UVA-Strahlung sowie TLRs 2 und 6 unter UVB-Strahlung herunterreguliert. Unser besonderer Fokus liegt nun auf der Charakterisierung des TLR10, da die Expression dieses Rezeptors eine ausgesprochene UVA-Dosis-Abhängigkeit zeigt. Interessanterweise konnten wir bei diesem Rezeptor außerdem zeigen, dass ein explizierter Bezug zwischen der UV-Toxizität und der Stärke der TLR10-Expression im Sinne einer negativen Korrelation, ermittelt an primären Keratinozyten von sieben Einzeldonoren, besteht. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass der TLR10 im Rahmen der UV-induzierten Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielt.

Im Folgenden soll daher die Bedeutung des TLR10 weiter aufgeklärt werden. Dazu wird der Rezeptor mittels RNAi-Technik herunterreguliert und die Auswirkung einer „fehlenden“ TLR10-Expression auf das Entzündungsgeschehen charakterisiert. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen die initialen molekularen Mechanismen der UV-induzierten Immunmodulationen aufzuklären und ggf. den entsprechenden Signalweg oder Signalmoleküle zu identifizieren, denn bislang konnte für den TLR10 noch kein Ligand identifiziert werden und die Rolle dieses Rezeptors im Rahmen der natürlichen Immunabwehr ist damit noch völlig unbekannt.

2. Influence of visible light and physical plasma on human skin cells

Jörg Liebmann, Viktoria Kolb-Bachofen
Institute of Molecular Medicine, Research Group Immunobiology

Sun-light influences the physiology of the human skin in beneficial as well as harmful ways as has been extensively shown for UV-light. However, little is known about the effects of

other wavelengths of solar irradiation. Within the scope of a BMBF funded project we analysed the influence of distinct wavelengths in the visible spectrum of light (blue to infrared) on human skin cells. Irradiation with short wavelength blue light up to 426nm exerts toxic effects. Furthermore, we find that light at 450nm wavelength is non-toxic up to intensities of 500J/cm², but reduces proliferation dose dependently up to 50% caused by differentiation induction. Though, this differentiation induction can also be observed in cells treated with very low fluencies of 419 and 426nm the dose-range between growth arrest and toxicity is very narrow, in contrast to irradiation with 450nm wavelength. Experiments with a model protein demonstrate that the blue light irradiation photolytically generates NO, which is known to initiate differentiation in skin cells, from nitrosated proteins making these molecules photoacceptors for blue light up to 453nm.

In a second part within the same BMBF project we analysed the influence of an electrical plasma, consisting of ionised gas species and therefore describing the fourth state of matter, on human skin cells. Operated under atmospheric pressure with compressed air, these plasmas generate reactive nitrogen species like nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) and reactive oxygen species like ozone (O₃), hydroxyl radicals (OH[•]), superoxide (O₂⁻) and singlet oxygen (¹O₂) mainly. Additionally, they emit UV-radiation and a significant flux of charges all potentially influencing biological functions when directly applied on tissue or cells. We found an accumulation of nitric oxide oxidation products and could influence proliferation of the cells used in our study, though high treatment times showed signs of toxicity. Despite the fact nearly nothing is known about adverse effects, these plasma sources are already used in medical applications. Therefore, we plan to continue the evaluation of the positive as well as negative influence of these plasmas on skin cells within a DFG funded project.

AG William Martin

Alveolate Pellice Proteins: Characterisation and Pathogenic Significance

Sven B. Gould, William Martin, Institut für Botanik III

Wie die Mehrheit einzelliger Eukaryoten weisen auch die humanpathogenen Apicomplexa *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum* ein komplexeres Zyto- und Membranskelett auf als Metazoen. Dennoch konnten Intermediärfilamente, eine der drei proteinösen Säulen des eukaryotischen Zytoskeletts, in sequenzierten Protozoengenomen bisher nicht einwandfrei nachgewiesen werden. Zur Klärung des Paradoxon und Identifikation neuer struktureller Komponenten wurde in umfangreichen Vorarbeiten das Zyto- und Membranskelett des Ciliaten *Tetrahymena thermophila*, einem Verwandten der Apicomplexa, isoliert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Bioinformatische Analysen führten anschließend zur Identifikation eines charakteristischen und konservierten Merkmals: Mehr als ein viertel der Zyto- und Membranskelett zugeordneten Proteine weisen polare und sich wiederholende Motive auf (polar repeat proteins = PRPs). *In vivo* Lokalisationen belegen, dass manche PRPs mit Mikrotubuli assoziieren, Filamente formen und teils invasionsrelevante Strukturen (den Conoid) in apicomplexen Parasiten aufbauen (siehe Bild). Sie formen ganze Klassen von neuen Zytoskelettproteinen, welche sich durch Sequenzmerk-

male, nicht durch Sequenzhomologien, auszeichnen und daher schwer durch typische Sequenzanalysen zu identifizieren sind. Sie repräsentieren bisher unerkannte, aber bedeutende und teils hoch-exprimierte strukturelle Proteine in den Alveolata, wenn nicht allen Eukaryoten.

Wir erwarten zum Abschluss der laufenden Arbeiten ein besseres Verständnis der Funktion der repetitiven Elemente und deren Interaktion mit anderen Komponenten des Zytoskeletts. Vor allem werden wir grundlegend neue Familien von bisher unbekanntem eukaryotischen Zytoskelett Proteinen kennen, welche ein weites Feld für zukünftige Forschung öffnet.

AG Axel Methner

Die Rolle von GDAP1 bei der Charcot-Marie-Tooth Polyneuropathie

Axel Methner, Neurologische Klinik

Die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT) umfasst eine Gruppe erblicher sensomotorischer Polyneuropathien, die in ihrem Verlauf zumeist zu einer deutlichen körperlichen Behinderung führen. Die CMT4A ist die häufigste rezessive CMT und wird durch Mutationen im Gen für das Protein GDAP1 verursacht. GDAP1 ist ein mitochondrial lokalisiertes Transmembranprotein, das eine Rolle bei der Fusion von Mitochondrien spielt. Wir fanden GDAP1 hochreguliert, die gegen oxidative Glutamattoxizität resistent sind. In diesem Paradigma schädigt Glutamat Zellen nicht durch Exzitotoxizität, sondern durch Blockade des Glutamat-Zystin-Antiporter System X_c^- , das der Zystinaufnahme dient. Zystin wird zur Synthese des wichtigen intrazellulären Antioxidans Glutathion benötigt. Daher erniedrigt die Hemmung der Zystinaufnahme die intrazelluläre Glutathion-Konzentration und führt zu Zelltod durch oxidativen Stress. Der zum Zelltod führende Weg nach dem Absinken des Glutathionspiegels umfasst die Translokation von tBid an die Mitochondrien, die Aktivierung der 12/15-Lipoxygenase, die Anhäufung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies, sowie die Aktivierung eines durch zyklisches GMP aktivierten Kalziumkanals am Ende der Kaskade.

Wir konnten zeigen, dass Überexpression von GDAP1 vor Glutamattoxizität schützt, während GDAP1-Knockdown die Resistenz gegen oxidativen Stress vermindert. GDAP1 schützt ebenso vor Überexpression von tBid und 12/15-Lipoxygenase. Dieser Zellschutz geht mit einem vermehrten Glutathiongehalt und einem erhöhten mitochondrialen Membranpotential einher. CMT4A verursachende Mutationen zeigen dies nicht, so dass wir davon ausgehen, dass diese Veränderungen der Krankheit zugrunde liegen.

AG Sabine Metzger

Aufgaben und Leistungen des Analytischen Zentrallabors

Sabine Metzger,
Analytisches Zentrallabor (AZL) des BMFZ

Die Aufgabe des Analytischen Zentrallabors (AZL) des BMFZ ist es, die Arbeitsgruppen des BMFZ bei ihren proteinanalytischen Fragestellungen zu unterstützen.

Die Herausforderung der Proteinanalytik in den letzten Jahren ist die Steigerung der Sensitivität ihrer Methoden. Proteinanalytik fußt auf vier technologischen Plattformen, 1.) die Isolierung geringster Proteinmengen 2.) die Trennung komplexer Proteinmischungen 3.) die massenspektrometrische Identifizierung und Charakterisierung und 4.) die Datenbank-gestützte Computerauswertung. Die erfolgreiche Identifizierung eines gering exprimierten Proteins bzw. die Identifizierung von Proteinmodifikationen basiert auf der Optimierung in all diesen Bereichen.

Da jedes Protein ein spezifisches, von seiner Aminosäurezusammensetzung abhängiges, Verhalten zeigt kann nicht mit Standardverfahren auf die Individualität der Probe reagiert werden. Die Beratung bei der Planung proteinanalytischer Projekte und die Begleitung dieser Projekte mit der methodischen Expertise des AZL bilden einen Schwerpunkt. Dazu kommt die Etablierung neuer Methoden und die Optimierung und Weiterentwicklung bestehender Methoden. Diese wird unterstützt durch die Durchführung eigener Forschungsvorhaben und Kooperationsprojekte.

Für die Auftrennung komplexer Proteingemische ist im AZL die 2D-Gelelektrophorese als Standardverfahren etabliert, sowohl für verschiedene pH-Bereiche als auch für cytosolische bzw. Membranassoziierte Proteine. Die entsprechenden Geräte (Multiphor II und IPGphor III) werden bei Bedarf interessierten Arbeitsgruppen auch zur Verfügung gestellt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeiten des AZL liegt im Bereich der massenspektrometrischen Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen. Die methodische und instrumentelle Ausrüstung des AZL legen hier den Fokus auf die Einzelanalytik. Die Identifizierung von Proteinen aus 1D- bzw. 2D-Gelen oder aus Lösungen ist für Konzentrationen im mittleren femtomol-Bereich routinemäßig etabliert. Dazu gehört auch die *de novo* Identifizierung unbekannter, d.h. nicht in einer Datenbank vorhandener Proteine. Neu wurde eine weitere enzymatische Verdauungsmethode etabliert und optimiert. Sie findet Anwendung wenn durch den Standardverdau mit Trypsin aufgrund zu weniger bzw. zu vieler Schnittstellen eine Identifizierung des Proteins nicht möglich ist.

Daneben kommt der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinmodifikationen eine immer größere Bedeutung zu. Für die Identifizierung von Phosphorylierung wurde die Anreicherung von Phosphopeptiden mittels TiO_2 erfolgreich etabliert. So konnte in zwei Kooperationsprojekten für das jeweilige Proteinen eine neue Phosphorylierungsstelle identifiziert werden.

Zur Unterstützung der massenspektrometrischen Identifizierung von Phosphoproteinen wurde die phosphospezifische Gelfärbung mit *ProQ Diamond* etabliert. Diese Methode bietet die Möglichkeit direkt im Gel Phosphoproteine zu identifizieren. Damit ist auch ein quantitativer Vergleich des Phosphorylierungsstatus von Proteinen möglich. In Kooperation mit der Klinik für Anästhesiologie wurde so der Einfluss einer Fernpräkonditionierung auf den Phosphorylierungsgrad mitochondrialer Proteinen im Herzen untersucht.

Das AZL führt auch eigene Kooperationsprojekte und drittmittelgeförderte Forschungsprojekte durch (TP Z1 im SFB 590; Foko 06/2010).

Mitarbeiter: Dr. Nadine Dyballa, Marion Gehrke (BTA), Axel Märthesheimer, Paul Romanski, Jana Kietzerow, Florian Funk.

AG Hans Werner Müller

1. Transplantation of stem cells from human cord blood to improve regeneration after spinal cord trauma

J. Schira¹, M. Gasis¹, V. Estrada¹, M. Hendricks¹, C. Schmitz¹, T. Trapp², K. Stühler³, G. Kögler², P. Wernet² and HW Müller¹

¹Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Neurology and ²Institute for Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University Medical Center, Düsseldorf, and ³Medical Proteome-Center, University of Bochum

SCI results in permanent loss of axons, scar formation and, consequently, functional disability. One approach to promote axonal regeneration is to transplant cells with the capacity to protect the endogenous tissue and/or to stimulate axon regeneration. Grafting of native unrestricted somatic stem cells (USSC) from human umbilical cord blood immediately after SCI at both 2mm rostral and caudal to the lesion site yielded massive migration of these stem cells into the lesion centre. *In vitro* under agarose chemotaxis assays revealed that the attraction of USSC to the injured spinal cord tissue is mediated through hepatocyte growth factor. After transplantation into the injured spinal cord, USSC survived for at least three weeks without differentiation into the neural lineage. Histological analysis showed significantly enhanced axon ingrowth into the lesion site five weeks after grafting as assessed by anterograde tracing. In addition, USSC conditioned medium efficiently increased neurite outgrowth of rat embryonic dorsal root ganglion explants and primary cortical neurons comparable with the capacity of astrocyte conditioned medium. Importantly, long-term behavioral studies (16 weeks) including the locomotor tests open field, horizontal ladder test and the CatWalk analysis of transplanted immunosuppressed rats provide preliminary evidence for partial motor improvement after USSC grafting. Whole-genome gene expression analysis (Illumina platform) of native USSC point to an expression of neuroprotective and axon growth stimulating factors which will be further analysed. Additionally, the secretome (released proteins) will be analysed by 2-D DIGE technology and mass spectrometry.

Taken together, we provide evidences that USSC improve axonal outgrowth *in vitro* and axonal regeneration *in vivo* as well as the functional locomotor behaviour in a SCI model.

Funding: DFG Research Unit FOR717/A2

2. Novel Approaches toward Treatment of Spinal Cord Injury

Barbara Grimpe,

Molecular Neurobiology Laboratory, Department of Neurology, University Medical Center of the Heinrich Heine University Düsseldorf and the Center of Neuronal Regeneration, Düsseldorf

Spinal cord injury (SCI) is devastating to those afflicted, leading to a cumbersome life of the victims. This happens in spite of over a century of research targeting the reasons for regeneration failure. The discovery of a large number of promising genes and proteins in the last centuries provides the necessary foundation for potential treatment of SCI. However, suitable medication or other interventions are still unavailable to prevent a life in a wheelchair after SCI.

With the beginning of the 21st century opportunities arose to tackle such unsolved health problems. The possibility to design the third generation of knock-down drugs, such as DNA enzymes/deoxyribozymes, which are highly specific in targeting and digesting mRNAs and hence preventing the expression of proteins, paves the way to finally accelerate recovery after a SCI. Furthermore, with the implementation of large scale experiments such as microarray and proteomics and the collection of information in huge databases a new era

in neurobiology has begun, in which so far unsolved and complex diseases and their progression can be investigated on a large scale. Latest developments in Systems Biology, which includes Data/Text Mining, Natural Language Processing, Machine Learning and Pattern Recognition providing the foundation to such comprehension.

My laboratory is using these two new developments in science to cope with the complex processes occurring after trauma to the central nervous system (CNS). By building the first global protein-interaction map in the CNS regeneration domain, we will be able to identify key players in the dynamic processes of events. These key players can be manipulated via newly design deoxyribozymes/DNA enzymes. Based on these hypothesis-driven approaches we will be able to build upon the accumulated information in the literature to design new experiments towards treatment of CNS injuries.

AG Guido Reifenberger

Molecular mechanisms underlying glioblastoma cell invasion

Sabit Delic, Markus J. Riemenschneider, Guido Reifenberger,
Institut für Neuropathologie

Astrocytic glioma cells have the ability to deeply invade surrounding brain tissue, thus making local therapeutic approaches ineffective. To identify novel genes that are regulated in glioma cell invasion, we microdissected infiltrating tumor cells from 11 human glioblastoma tissues and compared them to corresponding cells from the solid tumor core. In addition, we included three glioblastoma cell lines into our analysis from which we separated invasive and non-invasive tumor cell subpopulations using a modified Boyden chamber assay (8µm pores, MatrigelTM-coated). cRNA hybridization on oligonucleotide microarrays (Affymetrix U133 Plus 2.0) revealed 81 up- and 20 downregulated genes when comparing invasive and non-invasive glioblastoma cells (paired t-test, p-value <0.01; fold change >2.0). To further narrow down the list of promising candidates, we selected genes that were either associated with Gene ontology (GO) terms related to cell motility or cell-matrix interactions or that correlated with patient survival in an independent clinically well-documented set of glioma patients. This left us with 31 up- and 11 downregulated candidate genes of which we could effectively downregulate 21 genes by means of RNA interference for further functional validation. Extending our approach to a multidimensional level, we compared the protein expression between invasive and non-invasive glioblastoma cells by 2D-DIGE/nano LC-ESI MS/MS and assessed the miRNA profiles of both cell populations using low-density TaqMan arrays (Applied Biosystems Human MicroRNA Array v1.0; 365 miRNAs). Hereby, we identified 18 non-redundant proteins (p-value <0.05; average ratio >1.5) as well as 74 differentially expressed miRNAs (p<0.05, fold change >1.5).

AG Harald Rieder

Rekurrente Bruchpunkte in Osteosarkomzelllinien

Birte Möhlendick¹, Bee Ling Ng², Nigel Carter², Johannes Fischer³, Katharina Raba³, Karl-Ludwig Schäfer⁴, Harald Rieder¹

¹ Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

² Team 70, Human genetics, Wellcome Trust Sanger Center Cambridge UK

³ Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Universitätsklinikum Düsseldorf

⁴ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Das Osteosarkom (OS) ist der häufigste primäre Knochentumor im Kindesalter. Die konventionellen OS sind nicht mit spezifischen rekurrenten Translokationen assoziiert, aber um 70% der Tumoren zeigen eine Vielzahl von chromosomalen Veränderungen. Mit Hilfe von komparativer genomischer Hybridisierung auf DNA-Microarrays (aCGH, 44k Oligonukleotidarray, Agilent) wurden 19 OS-Zelllinien auf wiederkehrende Bruchereignisse analysiert. Die Analysen zeigten eine Anzahl von 1620 (38%) rekurrenten Bruchpunkten bei einer Gesamtzahl von 4266 Bruchereignissen. Eine Häufung von Brüchen im Centromer oder in Centromernähe (Chromosomenbanden q11-q12 oder p11-p12) konnte bei 22% der Bruchereignisse beobachtet werden. Das Chromosom 8 war mit einer Anzahl von 340 Brüchen am häufigsten betroffen und das Chromosom 22 mit einer Anzahl von 74 Bruchereignissen am geringsten. Die langen Chromosomenarme waren häufiger von Brüchen betroffen, als die kurzen Chromosomenarme, lediglich bei den Chromosomen 6, 9 und 16 überwogen die Bruchereignisse auf den kurzen Chromosomenarmen. Der Chromosomenarm 8q war am häufigsten in Bruchereignisse involviert und der Chromosomenarm 10p zeigte die geringste Bruchrate. Über Datenbankrecherchen konnten 57 Gene ausgewählt werden, die rekurrent von Bruchereignissen betroffen waren. Die Gene konnten anhand ihrer Funktion verschiedenen Kategorien zugeordnet werden. Der Hauptanteil der Gene spielt eine Rolle bei Tumorgenese und Progression (25%). Ebenfalls konnten Bruchpunkte in Genen identifiziert werden, die als Tumorsuppressor fungieren (16%) oder bei Zellwachstum und Proliferation, Knochenentwicklung oder Aufbau des Centrosomen- bzw. Spindelapparates eine Rolle spielen (6%). Die weitere Charakterisierung der Bruchpunktregionen soll nun mittels Arraypainting auf hochauflösenden Custom-Arrays erfolgen. Hierzu sollen einzelne Chromosomen mittels Durchflusszytometrie oder Mikrodissektion separiert und analysiert werden.

AG Heiner Schaal

Konsequenzen pathogener Spleißmutationen

Heiner Schaal,
Institut für Virologie

Eine Mutation innerhalb einer Spleißstelle kann aufgrund der Aktivierung kryptischer Spleißstellen zu einer fehlerhaften Erkennung der Exon-Grenze oder auch zum völligen Verlust der Exon-Erkennung führen. Bis heute lässt sich der Spleiß-Phänotyp nicht vorhersagen. Die alleinige Betrachtung der mutationsbedingten Änderung der intrinsischen Stärke der Spleißstelle ist in jedem Falle unzureichend. Allenfalls lässt sich diese für eine Vorhersage aberranten Spleißens als solches nutzen. Eine Änderung der funktionellen

Spleißstellen-Stärke, zusammengesetzt aus der Stärke spleißregulatorischer Sequenzen einerseits und spleißregulatorischer Proteine andererseits, ist offensichtlich immer noch unzureichend, stellt allerdings bereits eine deutliche Verbesserung für die Beurteilung des Spleiß-Phänotyps dar. Ziel ist es eine durch eine Spleißstellen-Mutation hervorgerufene Veränderung des Spleiß-Phänotyps korrigieren zu können.

AG Alfons Schnitzler

Untersuchung oszillatorischer Netzwerke *in vivo* und *in vitro*

Markus Butz, Bettina Pollok, Lars Wojtecki, Martin Südmeyer, Marcel Dihné, Alfons Schnitzler, Institut für Klinische Neurowissenschaften und Medizinische Psychologie

Die Magnetencephalographie (MEG) erlaubt die *in vivo* Charakterisierung oszillatorischer Netzwerke im menschlichen Gehirn. So kann gezeigt werden, welche kortikalen Areale an bestimmten Aufgaben beteiligt sind und wie diese Areale miteinander interagieren. Zudem kann untersucht werden, inwieweit oszillatorische Netzwerke in Patientengruppen pathologisch verändert sind und welchen Einfluss Neuromodulation und pharmakologische Intervention auf diese Netzwerke haben.

In den letzten Jahren wurden in unserer Arbeitsgruppe oszillatorische Netzwerke bei diversen Bewegungsstörungen untersucht (Morbus Parkinson, Gilles-de-la-Tourette Syndrom, Essentieller Tremor). Ein gutes Beispiel stellen die Untersuchungen zum Morbus Parkinson dar. Hier konnte ein oszillatorisches Netzwerk charakterisiert werden, das dem Parkinson-Ruhetremor zugrunde liegt und durch eine veränderte Interaktion zwischen motorischen Arealen und dem Thalamus gekennzeichnet ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-Dopa, dem wichtigsten Medikament in der Parkinsontherapie, dieses Netzwerk moduliert.

Durch die Anschaffung eines neuen MEG Gerätes im Jahr 2009, wurde es möglich, auch Parkinson-Patienten im Rahmen der Tiefenhirnstimulation (THS) zu untersuchen. So konnten jüngst simultane Ableitungen von Elektroden im *Nucleus subthalamicus* (STN), der primären Zielregion bei der THS, und kortikaler Aktivität mithilfe der MEG gemacht werden. Hierdurch wird eine unmittelbare Analyse der kortiko-thalamischen Interaktion möglich. Somit kann untersucht werden, mit welchen kortikalen Arealen die pathologisch veränderte Aktivität im STN in Verbindung steht. Geplante Untersuchungen wollen zudem herausfinden, wie die THS dieses Zusammenspiel moduliert und dabei zu einer dramatischen Verbesserung der Symptome führt.

Ein neuer Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe widmet sich ebenso funktionalen neuronalen Netzwerken, allerdings nicht *in vivo*, sondern *in vitro*. Hierzu werden murine ES Zell-abgeleitete neurale Prekursoren auf Mikroelektrodenchips gezüchtet und deren funktionelle Netzwerkaktivität in Form synchron oszillierender Muster computergestützt analysiert. Dabei zeigte sich, dass diese ehemals unreifen ES Zellen nach adäquater Differenzierung **in vitro** elektrophysiologisch hoch funktionale neuronale Netzwerke bilden können, deren Funktion pharmakologisch moduliert werden kann.

Insgesamt bietet die Untersuchung oszillatorischer Netzwerke *in vivo* und *in vitro* die faszinierende Möglichkeit, die Pathophysiologie diverser neurologischer Krankheiten näher zu ergründen, sowie die Wirkung bestehender Therapieoptionen besser zu verstehen.

AG Wolfgang Schulz

1. Downregulation of antiviral genes in prostate cancers affects the response to the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine

Stefan Bleckmann, Wolfgang A. Schulz,
Department of Urology, Heinrich Heine University Düsseldorf, Germany

Mutations and polymorphisms in genes encoding antiviral proteins, notably RNASEL, are associated with an increased risk of prostate cancer. In many prostate cancers interferon response genes, like the prototypic MX1, are downregulated. We sought to elucidate whether changes in DNA methylation underlie this downregulation.

Treatment with the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (aza-dC) induced MX1 and several other interferon responsive genes in PC3, but not in LNCaP cells, after 3 days. According to bisulfite sequencing, however, the major MX1 promoter was unmethylated in both cell lines. Induction of MX1 in LNCaP cells was neither restored by increasing the inhibitor concentration nor the length of treatment. In contrast to PC3, LNCaP cells express the androgen receptor and contain mutant RNase L. However, depleting LNCaP medium of steroids did not restore MX1 inducibility by aza-dC. Neither was MX1 inducibility in PC3 diminished by siRNA-mediated downregulation of RNase L. Intriguingly, compared to PC3, LNCaP cells also displayed a strongly diminished induction in response to exogenous interferon beta (8- vs. 90-fold), due to a 50-fold decreased expression of JAK1, a protein kinase crucial for interferon signaling. Accordingly, interferon beta expression in PC3 cells became upregulated after two days of aza-dC treatment, with the increase in MX1. This suggests that aza-dC treatment elicits interferon production, JAK1 activation and induction of interferon responsive genes like MX1 in PC3 cells. This sequence appears inactive in LNCaP cells due to lack of JAK1. Downregulation of JAK1 expression was not restricted to this cell line, but was also observed in a significant fraction of prostate cancer tissues.

Our data suggest that downregulation of interferon responsive genes in prostate cancers is not caused by hypermethylation of their promoters, but is rather secondary to changes in interferon signaling pathways, such as JAK1 deficiency. Our findings have implications for the potential use of DNA methylation inhibitors in prostate cancer therapy, by predicting that aza-dC will induce interferon responses in some prostate cancers, but not in others. These differences are expected to affect the therapeutic efficacy of aza-dC and other inhibitors of DNA methylation in this cancer type.

2. Selektive activation of retroelements in prostate cancer;

Wolfgang Göring,
Department of Urology

More than 40% of the human genome is composed of retroelements, mainly of LINE, SINE (Alu) and HERV (human endogenous retrovirus) sequences. Under normal conditions, these retroelements are transcriptionally repressed. Repression is associated with CpG methylation of their internal promoters or LTRs, respectively. During tumour development retroelements can become demethylated, leading potentially to their transcriptional reactivation. In our study, we investigated DNA methylation and expression of LINE-1, selected 'young' Alus and different HERVs in cancerous and benign prostate tissue samples and in several prostatic cell lines. We found LINE-1 and AluY RNAs in all cells, with cancer cell lines displaying slightly elevated transcript levels compared to normal prostate epithelial cells. In contrast, expression of various HERV-K proviral sequences proved to be strongly cell line-specific. In cancerous and benign prostate tissues, AluY and LINE expression were unaltered (AluY) or slightly diminished (LINE-1), whereas RNA levels of one particular HERV-K, referred to as HERV-K22q, were dramatically elevated in most prostate cancers compared to benign tissues. In contrast, expression of a different HERV-K provirus, HERVK17, was found to be significantly downregulated in prostate cancer tissues. Mean methylation of the HERV-K22q LTR CpG-islet was highly significantly decreased in prostate cancer tissues, inversely correlating with HERV-K22q expression. Certain HERV-K proviruses express an *env* splice variant encoding an accessory protein, Np9, which is a putative tumour suppressor and transcriptional repressor of the *c-MYC* proto-oncogene. Indeed, an according transcript appeared to emerge especially in tumour tissues with high HERV-K22q expression. Our findings suggest that global DNA hypomethylation in prostate cancer may preferentially be associated with selective activation of specific endogenous proviruses that may influence tumor development.

AG Markus Uhrberg

Identification of epigenetic determinants that regulate differentiation of hematopoietic stem cells to natural killer cells

Jens Brands, Nina Graffmann, Kathrin Schönberg, Simeon Santourlidis, Markus Uhrberg, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika

Our laboratory is interested in the molecular regulation of stem cell differentiation with a focus on hematopoietic pathways. Besides classical regulation pathways of differentiation by transcription factors, epigenetic modification emerges as an important modulator of cell fate decisions. We have previously shown that during differentiation of hematopoietic stem cells to natural killer cells, a lymphocyte population that expresses special receptors for recognition of MHC class I molecules called *killer cell inhibitory receptors* (KIR), histone modifications and DNA methylation are crucially involved in expression of KIR. In general, the *KIR* locus has an active epigenetic signature in NK cells and a repressive one in hematopoietic stem cells (HSC). The signals that are necessary for KIR expression, which

is a late event of NK cell differentiation, are given at a very early time point preceding the development of definitive NK cell precursors. Notably, the expression of KIR can be induced on the hematopoietic progenitor stage by chemical inhibition of histone methylation and on the NK cell stage by treatment of NK cells with inhibitors of DNA methylation. We are currently analyzing the role of DNA methyltransferases and putative DNA demethylases in an *in vitro* NK cell differentiation system employing an embryonal hepatic stroma cell line as hematopoietic niche support. In addition, we are monitoring the genome-wide epigenetic changes during NK cell differentiation by chromatin immunoprecipitation with DNA methylation- and histone modification-specific antibodies on arrays (NimbleGen, Roche) covering promoter regions of all known human genes.

AG Andreas Weber

A sodium-dependent pyruvate transporter belonging to the sodium:bile acid transporter family at the chloroplast envelope

Andreas P.M. Weber,
Institut für Biochemie der Pflanzen

Bei Interesse an diesem Thema wenden Sie sich bitte direkt an Prof. Weber.

AG Sascha Weggen

γ -Sekretase Modulation zur Therapie und Prävention der Alzheimer Erkrankung

Prof. Dr. Sascha Weggen,
Institut für Neuropathologie

Alzheimer's disease (AD) is the most common age-related neurodegenerative disorder currently affecting 20-30 million individuals worldwide. Conclusive evidence supports the amyloid hypothesis of AD, which states that aberrant production and deposition of A β plays a causal role in the pathogenesis. A β is a proteolytic fragment of the amyloid precursor protein (APP). The enzyme γ -secretase, which catalyses the final step in the proteolytic processing of APP, generates A β peptides of variable length ranging with peptides ending after 40 and 42 amino acids being the most prevalent species. Several lines of evidence indicate that increased production or reduced clearance of the longer A β 42 isoform could be the common etiologic mechanism of AD, and that A β 42 might be the ideal therapeutic target. Consequently, academic and pharmaceutical laboratories have focused on developing strategies to diminish A β formation for treatment or prevention of AD. The most substantial advances have been made with respect to inhibitors of γ -secretase, and highly potent compounds that block A β production with IC₅₀ values in the picomolar range are available today. However, animal studies and clinical trials with γ -secretase inhibitors have uncovered prohibitive mechanism-based toxicity, which can be largely explained by the essential role of γ -secretase in proteolytic processing of the NOTCH receptor. We have described that certain non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are selective inhibitors of A β 42 production, which has established a new class of AD therapeutics called γ -secretase modulators (GSMs). Importantly, GSMs effectively suppress A β 42 production while sparing NOTCH and other γ -secretase substrates. More recently, GSMs with nanomolar potency and good brain exposure have been described. These compounds can be divided in two major classes: acidic GSMs that retain some structural similarities to NSAIDs and non-acidic GSMs based on bridged aromatics. Important questions remain concerning these second-generation GSMs including their exact molecular mechanism of action, potential off-target effects, and their efficacy in preclinical mouse models of AD. It now seems certain that GSMs act by direct modulation of γ -secretase activity. Similar to γ -secretase inhibitors, GSMs were shown to be active in cell-free γ -secretase assays. However, the identity of the allosteric binding site for these compounds within the γ -secretase complex is controversial. New developments concerning the chemical biology and the molecular mechanism of GSMs will be discussed.

AG Dieter Willbold**Eine hochsensitive Methode für den Nachweis von Alzheimer-Amyloid- β -Aggregaten in Körperflüssigkeiten**

Susanne Aileen Funke¹, Lei Wang¹, Pia Zißmann², Eva Birkmann^{1,2}, Phillip Görtz³, Christian Lange-Asschenfeldt³, Dieter Willbold^{1,2},

¹ ISB-3, Jülich, Forschungszentrum Jülich

² Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

³ Institut für Psychiatrie und Psychotherapie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die Alzheimersche Demenz kann heutzutage erst bei der Autopsie nach dem Tod des Patienten mit absoluter Sicherheit diagnostiziert werden. Ein Biomarker, der den Krankheitsfortschritt anzeigt, ist sowohl für die Frühdiagnose der Krankheit, als auch für die Entwicklung von Therapeutika von grundlegender Bedeutung.

Nach der Amyloid-Kaskaden-Hypothese ist der Krankheitsprozess eng mit der Aggregation des Amyloid- β -Peptids (A β) verknüpft. Im Hirngewebe von AD-Patienten können u.a. unlösliche A β -Aggregate nachgewiesen werden, wobei heutzutage lösliche A β -Oligomere als die am meisten toxische Spezies gelten. Diese treten auch früher im Krankheitsprozess auf als die sogenannten „Plaques“. Möglicherweise können deshalb diese Oligomere als Biomarker für die Frühdiagnose und das „Therapie-Monitoring“ der AD dienen.

Wir haben einen neuartigen ultrasensitiven Test entwickelt, mit dem A β -Aggregate in Körperflüssigkeiten quantifiziert und deren Zusammensetzung untersucht werden können. Der hoch-spezifische Test beruht auf Laser-Scanning Mikroskopie und wird in Zukunft genutzt werden, um Zusammenhänge zwischen Zahl und Komposition von A β -Aggregaten in Körperflüssigkeiten und dem Krankheitsfortschritt herzustellen.

Funke SA et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364: 902-907 (2007)

Funke SA et al., *Rejuvenation Res.* 11(2): 315-318 (2008)

Funke SA et al., *Rejuvenation Res.* 13(2-3): 206-209 (2010)

3. Anfahrtsbeschreibung

Kardinal Schulte Haus, Overather Straße 51, 51429 Bergisch Gladbach

Fon: 02204-4080

Fax: 02204-408697

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



Mit öffentlichen Verkehrsmitteln:

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

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

Fahrpläne im Internet:

"Fahrplan Schnellbus SB40" http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_SB40.pdf

"Fahrplan Buslinie 227" http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_227.pdf

"Fahrplan Buslinie 420" http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_420.pdf

"Fahrplan Buslinie 455" http://www.vrs-info.de/minis/b_Linie_455.pdf

"Fahrplan Straßenbahnlinie 1" http://www.kvb-koeln.de/german/fahrplan/download/mfp_001.pdf