

Das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität: Aktuelle Entwicklungen und neue Methoden

Guido Reifenberger und Cornelia Höner

mit Beiträgen von Johannes Fischer, Wolfgang Kaisers, Karl Köhrer, Christian Mielke, Roland Piekorz, Claus Seidel und Stefanie Weidtkamp-Peters

Das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) wurde 1991 als zentrale wissenschaftliche Einrichtung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit dem Ziel der Förderung einer über Fakultätsgrenzen hinaus gehenden interdisziplinären Grundlagenforschung gegründet und 1992 eröffnet. Der damalige Rektor Prof. Kaiser bezeichnete die Gründung des BMFZ als „Markstein beim Umbau unserer Universität der Zukunft“ (vgl. 1. Bericht des BMFZ, 1994). Im Jahrbuch der Heinrich-Heine-Universität 2004 wurden Organisation und Aufgaben des BMFZ bereits ausführlich vorgestellt (www.bmfz.de, Archiv). Inzwischen umfasst das BMFZ neben seinen zentralen Laboratorien mehr als 50 Arbeitsgruppen aus der Medizinischen und Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, die das gemeinsame Interesse an einer interdisziplinären, fakultätsübergreifenden Forschung an grundlegenden biologischen und medizinischen Fragestellungen vereint. Die hohe wissenschaftliche Qualität der Forschung, die in den Arbeitsgruppen des BMFZ durchgeführt wird, spiegelt sich nicht zuletzt in zahlreichen hochrangigen Veröffentlichungen in international führenden wissenschaftlichen Zeitschriften wider. Eine kleine Auswahl von aktuellen Top-Publikationen aus BMFZ-Arbeitsgruppen, die in den beiden letzten Jahren erschienen sind, findet sich am Ende dieses Beitrages. Alle Arbeitsgruppen des BMFZ werden für Ihre Forschungsarbeit durch kompetitiv eingeworbene, externe Drittmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Europäischen Union, des Bundesministeriums für Bildung und Forschung und anderer nicht-kommerzieller Förderinstitutionen unterstützt. BMFZ-Mitglieder sind zudem als Koordinatoren bzw. Sprecher sowie Teilprojektleiter in zahlreichen ortsansässigen wissenschaftlichen Verbundprojekten tätig, einschließlich der DFG-geförderten, lebenswissenschaftlich ausgerichteten Sonderforschungsbereiche (SFB 575, 590, 612 und 728), Forschergruppen (KFG 217, FOR 717 und 729) und Graduiertenkollegs (GK 1033, 1089 und 1487, internationales GK 1525 und integriertes GK im SFB 575). Auch die Zentrallaboratorien des BMFZ sind aufgrund ihrer wissenschaftlichen und methodischen Kompetenz in mehrere dieser Verbundprojekte, insbesondere in der Funktion als zentrale Methodenprojekte, integriert. Zu nennen sind hier Beteiligungen des Molekularbiologischen Zentrallabors (Prof. Karl Köhrer) an den Sonderforschungsbereichen 590, 612 und 728 sowie der klinischen Forschergruppe 217, und des Analytischen Zentrallabors (Dr. Sabine Metzger) am Sonderforschungsbereich 590 und am Graduiertenkolleg 1089. An den diesjährigen Anträgen der Heinrich-Heine-Universität auf Etablierung von Exzellenz-Clustern und Graduiertenschulen im Rahmen der zweiten Ausschreibungsrunde der Exzellenzinitiative des Bundes und der Länder sind ebenfalls sowohl die BMFZ-Zentrallaboratorien als auch zahlreiche BMFZ-Arbeitsgruppen aktiv beteiligt.

In dem nachfolgenden Beitrag möchten wir allerdings keinen Überblick über die von den BMFZ-Mitgliedern aktuell bearbeiteten Forschungsprojekte geben, sondern vielmehr über einige der in den letzten Jahren im BMFZ oder zumindest mit Unterstützung des BMFZ realisierten, strukturellen und methodischen Neuentwicklungen sowie über sonstige BMFZ-Aktivitäten zur Förderung der interdisziplinären Forschungsk Kooperation an unserer Universität informieren.

Übersicht über neu etablierte Methodenplattformen

Um einerseits die wissenschaftliche Interaktion zwischen den BMFZ-Mitgliedern zu fördern und andererseits das Methodenspektrum und damit die Serviceleistungen des BMFZ zu erweitern, wurden in den vergangenen Jahren wiederum regelmäßige interdisziplinäre wissenschaftliche Veranstaltungen, darunter die inzwischen fest etablierten internationalen BMFZ-Meetings sowie die jährliche BMFZ-Klausurtagung (s.u.), durchgeführt sowie die Zentrallaboratorien apparativ gezielt weiter ausgebaut und die Etablierung neuer Methodenplattformen durch das BMFZ unterstützt. So beteiligte sich das BMFZ an der Etablierung einer zentralen Einheit für Durchflusszytometrie und Zellsortierung („*Flow Cytometry Core Facility*“), durch die gemeinsam mit dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie (ITZ) und mit Unterstützung der Medizinischen Fakultät eine hochmoderne Anlage zur Zellanalyse und –sortierung am Standort realisiert werden konnte, die allen interessierten Arbeitsgruppen zur Nutzung offen steht. Die Anlage wird von Herrn Dr. Johannes Fischer geleitet (s.u.).

Im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II wurde die dort befindliche *Life-Cell-Imaging-Plattform* (konfokales Laserscanning-Mikroskop) in den Bestand des BMFZ überführt. Das BMFZ trägt die Kosten für Wartung und Reparatur der Plattform. Dafür kann die Anlage von den BMFZ-Mitgliedern und anderen interessierten Arbeitsgruppen nach Absprache genutzt werden. Ansprechpartner sind hier Herr Dr. Roland Piekorz und Herr Dr. Christian Mielke (s.u.).

Im Institut für Molekulare Physikalische Chemie ist das „*Center for Advanced Imaging*“ (CAI) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät im Aufbau. Eine der hier neu etablierten, hochauflösenden fluoreszenzmikroskopischen Techniken ist die sogenannte konfokale Multi-Parameter-Laserscanning-Mikroskopie. Das BMFZ unterstützte diesbezüglich die Anschaffung eines Moduls für die ultrasensitive Bildgebung (CCD-Camera) und eröffnet damit den BMFZ-Mitgliedern die Nutzung neuer Mikroskopie-Verfahren mit einer Auflösung von bis zu 30 nm (Prof. Claus Seidel, Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters, s.u.).

Ein weiteres hochaktives Forschungsgebiet, das in seiner Weiterentwicklung in den vergangenen Jahren durch das BMFZ gezielt unterstützt wurde, ist die *Strukturbiologie*. So hat sich das BMFZ an der Anschaffung mehrerer Großgeräte zur Röntgenstrukturanalyse beteiligt, darunter u.a. ein Röntgengenerator, ein Kryoflex-System sowie ein Pipettierroboter, der es ermöglicht, in geringen Probenmengen in kurzen Zeiträumen mehrere tausend unterschiedliche Kristallisationsbedingungen systematisch zu testen.

Nach Schließung des Instituts für Onkologische Chemie der Medizinischen Fakultät hat das BMFZ die Betreuung der dort angesiedelten *zentralen Affymetrix-Chip-Plattform* übernommen

und zur Unterstützung des zentralen Microarray-Service eine zusätzliche Wissenschaftlerstelle im Molekularbiologischen Zentrallabor des BMFZ finanziert. Die Finanzierung dieser Stelle erfolgte zunächst durch Umwidmung von Sachmitteln des BMFZ und wurde dann von der Medizinischen Fakultät übernommen.

Bereits im Jahr 2008 hat sich das BMFZ des Weiteren an der Beschaffung des ersten Hochdurchsatzsequenziergerätes der nächsten Generation („*Next Generation Sequencing Facility*“) an der Heinrich-Heine-Universität beteiligt, welches in der Kinderklinik betrieben wird und für Kooperationsprojekte offen steht. Das BMFZ unterstützt diese zukunftssträchtige Methode, mit der nicht nur eine Sequenzierung einzelner Gene sondern des gesamten Genoms, d.h. aller Gene eines Organismus einschließlich des Menschen, möglich ist. Inzwischen wurde dieser Bereich durch Anschaffung weiterer Hochdurchsatzsequenzierer in der Kinderklinik (Prof. Arndt Borkhardt) und, mit Mitteln des Rektorats, im Molekularbiologischen Zentrallabor des BMFZ (Prof. Karl Köhrer) weiter ausgebaut, so dass nun alle derzeit gängigen Next Generation Sequenzierplattformen am Standort verfügbar sind.

Nicht nur für diese neuen Sequenziertechnologien, sondern auch für andere am BMFZ verfügbare Methoden, mit denen große Datenmengen generiert werden (z.B. Microarray-basierte Expressionsanalysen), bedarf es einer ausgewiesenen bioinformatischen Expertise, um diese hochkomplexen Datensätzen sinnvoll und fachgemäß auswerten zu können. Zur Stärkung des Bereiches *Bioinformatik und Biostatistik* hat das BMFZ in Kooperation mit dem Institut für Bioinformatik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät (Prof. Martin Lercher) daher eine zentrale Bioinformatik-Stelle neu eingerichtet. Die Stelle ist seit dem 1.7.2009 besetzt und steht den BMFZ-Mitgliedern zur Unterstützung und Beratung bei bioinformatischen Fragen und Auswertungen zur Verfügung (Dr. Wolfgang Kaisers, s.u.).

Die neuen Methodenplattformen im Detail

Zentrallabor für Durchflusszytometrie und Zellsortierung

Johannes Fischer, Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie (ITZ)

Das Zentrallabor für Durchflusszytometrie und Zellsortierung wurde im April 2009 am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika mit Unterstützung und Förderung durch das BMFZ etabliert (Abb. 1). Diese Core Facility steht allen Wissenschaftlern der Heinrich-Heine-Universität und des Universitätsklinikums Düsseldorf als Serviceeinheit offen. Dank modernster Ausstattung werden umfangreiche Serviceleistungen auf höchstem Niveau im Bereich durchflusszytometrischer Analysen und Zellsortierung sowie entsprechende Schulungen angeboten, die von mittlerweile mehr als 20 Arbeitsgruppen verschiedenster Institute wahrgenommen wurden. Gleichzeitig fungiert die Einheit als europäisches Referenzzentrum für Zellsortierung mit dem MoFlo XDP Zellsorter (Beckman Coulter).

Durchflusszytometrie als Meßmethode

Die Durchflusszytometrie ist eine Analysemethode zur quantitativen Erfassung von physikalischen, biochemisch-zellbiologischen und immunologisch-genetischen Parametern von Zellen mit deren Hilfe unterschiedliche Zelleigenschaften wie Viabilität, Phänotyp, Quantifizierung und Lokalisierung (FRET) von Antigenen, oder Zellzyklus gemessen werden können. 47% der Leistungen der Core Facility fallen in diesen Bereich.

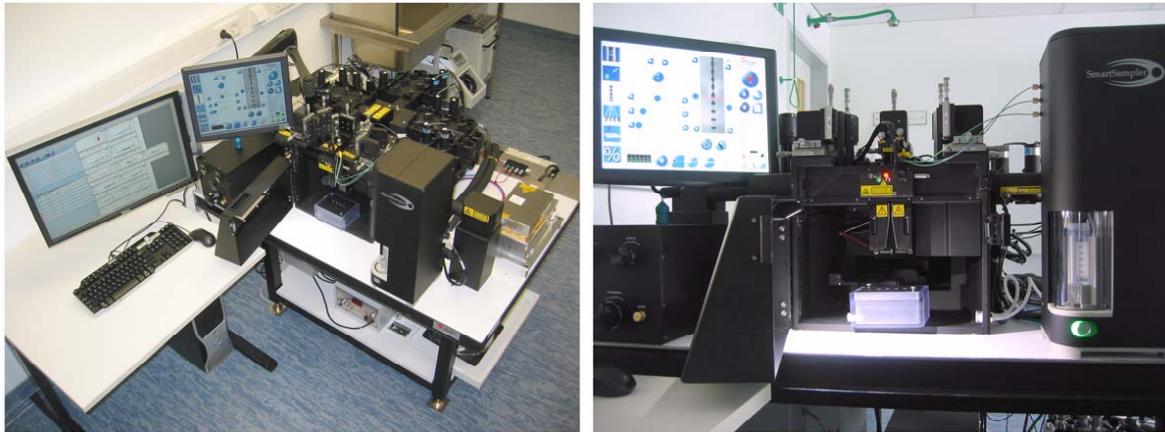


Abb. 1. Das Herzstück des Zentrallabors für Durchflusszytometrie und Zellsortierung, der MoFlo XDP Zellsorter der neuesten Generation.

Zellsortierung und deren Anwendungsbereiche

Die Zellsortierung ermöglicht die Auftrennung von Zellen oder Partikeln eines Gemisches anhand ihrer Oberflächenantigene oder intrazellulär integrierter Fluorochrome, was 48% der Leistungen der Core Facility ausmachte. Der vorhandene Sorter MoFlo XDP ist mit einer digitalen Elektronik ausgestattet und kann bis zu 18 Fluoreszenz- und 2 Streulicht-Parameter unterscheiden. Als Hoch-Geschwindigkeitssorter analysiert und sortiert er bis zu 70.000 Ereignisse pro Sekunde. Die Möglichkeiten der Zellablage sind vielfältig: simultan in bis zu vier unterschiedlichen Röhrchen, Einzelzellsortierung (Klonierung) auf z.B. 96- oder 384-well Platten, oder Zellablage für die Einzelzell-PCR auf Objektträgern (z.B. Ampligrids, Advalytix, BC).

Die häufigsten Anwendungsgebiete dieser Separationsmethoden liegen in der Trennung transfizierter, *in vitro* kultivierter Zellen anhand von fluoreszierenden Proteinen (z.B. GFP; YFP, dsRed), der Sortierung sehr seltener Zellsubpopulationen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Oberflächenantigene (z.B. Stammzellen, NK-Zellen Subpopulationen, Plasmazellen), der Isolierung von Zellen aus verschiedenen Gewebearten wie dem Knochenmark, unterschiedlichen Tumorgewebe oder der Milz der Maus.

Die für jede spezifische Anwendung individuell entwickelten und angepassten Protokolle erlauben je nach Ausgangspopulation eine bis zu 98-99% oder höhere Reinheit der Separation. Aufgrund der Ausstattung des Sorters mit einem leistungsstarken, durch das BMFZ finanzierten,

UV-Laser werden auch Analysen des Calcium Flux (Indo1/Indo2), Chromosomenanalysen (Chromomycin-A/Hoechst), Zellzyklusanalysen (DAPI, Hoechst) oder Stammzellsortierungen mit Charakterisierung der Zellen über ihre Hoechst Eflux-Eigenschaften durchgeführt.

Ausstattung (Zugang und Buchung)

Die Ausstattung des Labors umfasst neben dem High-Speed Sorter MoFlo XDP zwei Analysegeräte: FC500 (BC) und FACSCanto (BD), jeweils ausgestattet mit 2 - 3 Lasern unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Das Serviceangebot ist für jeden Wissenschaftler über das Internet zugänglich. Nach einer Registrierung erhält der Nutzer die Möglichkeit, seine Sort- oder Analysetermine zu buchen. Über unsere Webseite können die Erstinformationen hinsichtlich Ausstattung und Zugang zu der Einrichtung in Erfahrung gebracht werden (<http://www.cellsort.de>). Weitere Beratung erfolgt im persönlichen Kontakt.

Schulung

Zum Kennenlernen der Technik wird ein zweistündiger Basiskurs Durchflusszytometrie, der für alle Interessenten offen ist, angeboten. Als Inhalte werden die Grundlagen dieser Messmethode und die Schulung direkt an den Geräten bzw. vor Ort behandelt, was 5% der Nutzer in Anspruch nahmen.

Die BMFZ Imaging-Plattform Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Roland Piekorz, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, und Christian Mielke, Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik

Die dem BMFZ angegliederte Imaging-Plattform wurde im Herbst 2004 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II eingerichtet und wird seither interdisziplinär und fakultätsübergreifend im Rahmen der Forschung zu molekularbiologischen, zellbiologischen und mausgenetischen/biomedizinischen Fragestellungen intensiv genutzt. Im Mittelpunkt steht die konfokale Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie (cLSM), die eine dreidimensionale Darstellung fixierter oder lebender Zellen und Gewebeschnitte in hoher Auflösung ermöglicht. Mittels der cLSM können durch definierte Laser/Fluoreszenzwellenlängen virtuelle optische Schnitte durch eine Zelle erzeugt werden, die wiederum mit Hilfe einer geeigneten Software zu einer räumlichen Darstellung des untersuchten Objekts als dreidimensionales Volumenbild zusammengesetzt werden. Hierbei wird im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie störendes Hintergrundlicht aus unscharf abgebildeten Tiefenbereichen unterdrückt. Ein Applikationsbeispiel ist in der Abbildung dargestellt, in der typische Stadien der mitotischen Zellteilung an fixierten Präparaten (A) oder lebenden Zellen („Live Cell Imaging“; B) dargestellt sind (Abb. 2.).

Arbeitsgruppen der Heinrich-Heine-Universität steht für die konfokale Mikroskopie und Schnittbildtechnik ein Mikroskop vom Typ LSM 510 der Fa. Zeiss nach entsprechender Einweisung und online-Reservierung zur Verfügung. Dieses Mikroskop verfügt über eine sog. „META-Komponente“, die es erlaubt, optische Schnittbilder in zahlreiche aufgelöste Einzelbilder mit

einem spektralen Abstand von 10 nm zu zerlegen. Dies ermöglicht eine Auflösung und quantitative Trennung überlappender Emissionsspektren, wenn z. B. mehrere Fluorochrome oder fluoreszierende Proteine (GFP, YFP, CFP) gleichzeitig analysiert werden. Speziellere cLSM 510-basierte Applikationen ermöglichen des Weiteren die Darstellung der subzellulären Kolokalisation mehrerer Proteine sowie die Analyse der Interaktion zweier Proteine durch die FRET-Mikroskopie.

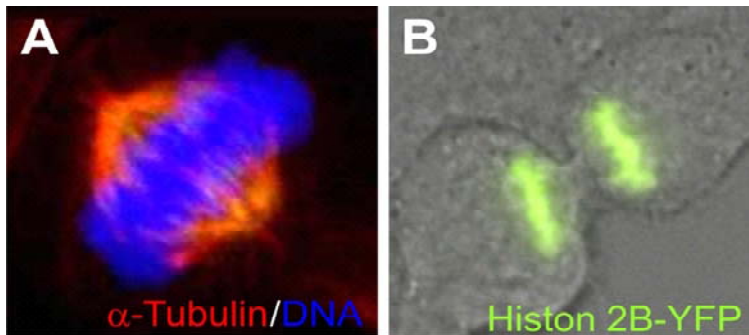


Abb. 2. cLSM-basierte Detektion mitotischer Zellen (A) während der Metaphase (Spindelapparat in rot, DNS blau) und (B) Telophase (Histon-markiertes Chromatin dargestellt in leuchtend grün, Zellumrisse in grau durch Aufnahme des Durchlichtes).

Die Imaging-Plattform wird verstärkt durch ein Epifluoreszenz-Mikroskop (Nikon TE2000), das neben der Dokumentation fluoreszenzmarkierter oder histologischer Präparate auch die Echtzeitaufnahme z.B. migrierender Zellen unter temperierten Bedingungen ermöglicht.

Das Center for Advanced Imaging (CAI)

Claus Seidel, Stefanie Weidtkamp-Peters, Institut für Molekulare Physikalische Chemie

Das im Aufbau befindliche *Center for Advanced Imaging* ist eine zentrale Einrichtung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät. Im Mittelpunkt der im CAI zum Einsatz kommenden bildgebenden Verfahren steht die Fluoreszenzmikroskopie. Die Fluoreszenzmikroskopie wird mittlerweile als etablierte Technik von den Lebenswissenschaften bis zur Physik und den Materialwissenschaften eingesetzt, um Strukturen vom Millimeter- bis in den Nanometerbereich abzubilden. Im CAI sollen nun die Expertise in Entwicklung und Anwendung sowie die entsprechende Ausstattung in diesem Bereich zusammengeführt werden. Arbeitsgruppen der Heinrich-Heine-Universität können am CAI z.B. so genannte konfokale Multi-Parameter-Laserscanning-Mikroskope nach entsprechender Einweisung nutzen, aber auch fortgeschrittene Mikroskopieverfahren und Nanoskopie in Zusammenarbeit mit den jeweiligen Experten für ihre Experimente einsetzen. Neben den Standardanwendungen stehen dazu am CAI zusätzlich aufgerüstete Mikroskope zur Verfügung, die es erlauben, z. B. die optische Auflösung, die bei einem herkömmlichen Laserscanning-Mikroskop im Bereich von etwa 300 nm liegt, bis zu einer Auflösung von

30 nm zu verbessern. Das BMFZ hat die Aufrüstung eines dieser Mikroskope durch die Ausstattung mit einer CCD-Kamera gefördert.

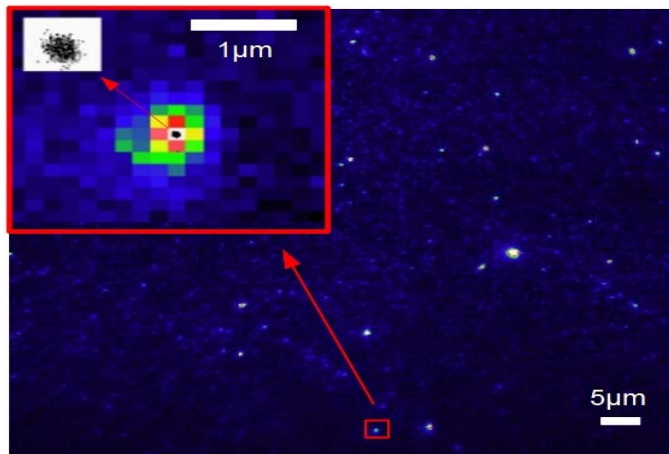


Abb. 3. Nachweis von Amyloid beta (A β) Aggregaten mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie.

An diesem Mikroskop kann nun Einzelmolekül-basierte Nanoskopie nach verschiedenen Verfahren eingesetzt werden, mit der man eine Auflösung von bis zu 30 nm erzielen kann. Bei diesen Verfahren der hochauflösenden Mikroskopie macht man sich das so genannte Blinken, also aufeinander folgende Hell- und Dunkelzustände, die einige Fluorophore zeigen, zu Nutzen. Bei entsprechendem Anregungslicht emittieren gleichzeitig nur einige wenige Fluorophore in einer Probe Licht, das dann mit einer CCD-Kamera detektiert wird. Bei der nächsten Aufnahme kommt das Licht von wenigen anderen Fluorophoren. Durch das Zusammensetzen einer solchen Bildserie aus vielen Einzelbildern entsteht ein räumlich besser aufgelöstes Bild, als in dem Fall, wenn alle Fluorophore gleichzeitig Licht emittieren. Diese Technik wird z. B. eingesetzt, um fluoreszenzmarkierte Aggregate von Amyloid-beta-Proteinen, die bei der Alzheimer-Erkrankung eine Rolle spielen, hoch aufgelöst abzubilden (Abb. 3).

Eine weitere Methode, mit der vor allem auch Proteininteraktionen in lebenden Zellen und Organismen untersucht werden können, stellt die FRET-Mikroskopie dar. Diese Methode kommt am CAI bereits vielfältig zum Einsatz. Beim Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird Energie von einem kurzwelligeren Fluorophor auf ein längerwelliges Fluorophor übertragen. Diese Energieübertragung kann nur über eine sehr geringe Distanz von nicht mehr als 10 nm stattfinden. Das kann der Fall sein, wenn zwei Proteine, die mit den entsprechenden Fluorophoren markiert sind, in einer Zelle einen Komplex bilden. Die Energieübertragung resultiert im Wesentlichen in einer verkürzten Fluoreszenzlebenszeit und einer geringeren Fluoreszenzintensität des kurzwelligen Fluorophors, welches die Energie abgibt. Diese Parameter werden gemessen, um Rückschlüsse auf eine mögliche Interaktion von Proteinen ziehen zu können (Abb. 4. u. 5.).

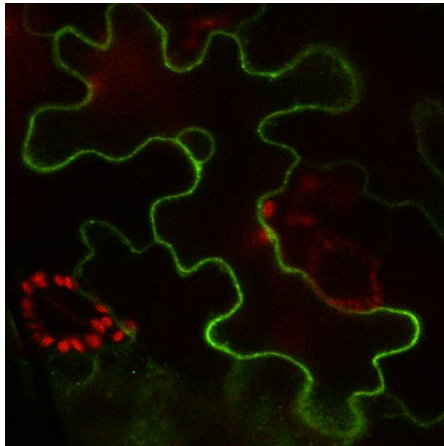


Abb. 4. Konfokalmikroskopische Aufnahme von Blattzellen aus Tabak. Grüne Fluoreszenz durch markierte Membranrezeptoren, rote Fluoreszenz durch Autofluoreszenz der Chloroplasten.

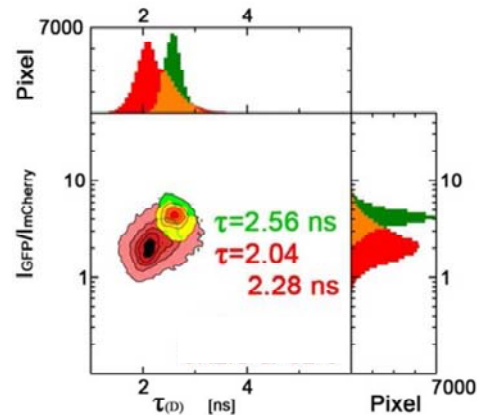


Abb. 5. 2D-Histogramm verschiedener Fluoreszenzparameter. Dargestellt sind die grüne Fluoreszenzlebenszeit τ und das Verhältnis der roten und grünen Fluoreszenzintensitäten, die für FRET relevanten Parameter.

DNA-Sequenzierung und Genexpression

Karl Köhler (Molekularbiologisches Zentrallabor)

Die Schwerpunkte der Arbeiten im Molekularbiologischen Zentrallabor (MZL) des BMFZ liegen in der Nukleinsäureanalytik und konzentrieren sich auf die Analyse (DNA-Sequenzierung) von DNA und RNA. In den letzten Jahren wurde dieser Bereich durch die Etablierung wichtiger Standard- und Spezialverfahren weiter ausgebaut und die dafür benötigten Groß- und Spezialgeräte angeschafft. Diese Analysegeräte und die im MZL angesammelte methodische Expertise erlauben eine effiziente Bearbeitung bioanalytischer Fragestellungen mit modernen Technologien, wovon alle interessierten Arbeitsgruppen der Universität profitieren.

Zentrale DNA Sequenzierungseinheit

Der Probendurchsatz im Bereich der DNA Sequenzierung wächst seit vielen Jahren kontinuierlich an. Insgesamt stehen vier DNA-Sequenzierautomaten (3 ABI 3130XL Genetic Analyzer und 1 ABI PRISM[®]310), zwei Pipettierroboter (Beckman Biomek[®]3000 und QIAGEN Bio-Robot[®]3000) und weitere Spezialgeräte zur qualitativen und quantitativen Erfassung der Proben zur Verfügung. Da zunehmend auch klinisch-relevante Proben untersucht werden, wurde im Jahr 2010 ein entsprechendes Qualitätsmanagementsystem aufgebaut und gemäß dem ISO 9001:2008 Standard zertifiziert.

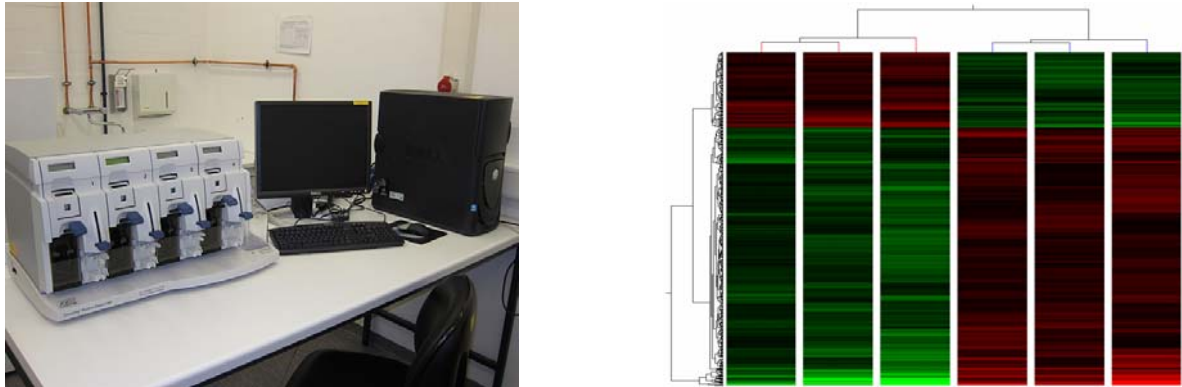


Abb. 5. A) Affymetrix Fluidics Station zur parallelen Prozessierung von Affymetrix Microarrays. B) Beispiel einer hierarchischen Clusteranalyse differenziell exprimierter Transkripte. Bioinformatische Analysen werden im MZL unabhängig von der verwendeten Microarray-Plattform mit verschiedenen Software-Lösungen durchgeführt.

DNA Microarrays und Hochdurchsatz DNA Sequenzierung zur Genexpressionsanalyse

Mit Hilfe der DNA Microarray-Technologie ist die globale Bestimmung der Genexpression, d.h. die Erfassung der Aktivität aller Gene eines Organismus möglich. Zur Herstellung und Bearbeitung von DNA-Microarrays sind teure Spezialgeräte (Microarray Spotter, Hybridisierautomaten und Fluoreszenzreader) notwendig. Mit Hilfe zusätzlicher Landesmittel wurde im Jahr 2001 die erste zentrale DNA Microarray Plattform im BMFZ etabliert und in den Folgejahren schrittweise erweitert und modernisiert. Heute können mit der BMFZ-eigenen Plattform Genom-weite DNA-Microarrays hergestellt und bearbeitet werden. Im Jahr 2008 hat das BMFZ die Betreuung der Affymetrix Core Facility der Medizinischen Fakultät übernommen (Abb. 5.), und seit 2009 steht eine zweite kommerzielle Array Plattform (Agilent DNA Microarray Plattform) zur Verfügung, so dass aktuell drei verschiedene Arrayformate im BMFZ bearbeitet werden können.

Die quantitative Erfassung der Genexpression erfolgt entweder über sog. „Real-Time PCR“ Analysen, sofern es sich über eine überschaubare Zahl von Genen handelt oder mit Hilfe von Hochdurchsatz DNA Sequenzierungsverfahren, falls alle Gene eines Organismus untersucht werden sollen. Durch die hochparallele Sequenzierung von cDNA Molekülen können mit dieser sog. „Next Generation Sequencing“ (NGS) Technologie globale Transkriptomanalysen durchgeführt werden, die gegenüber den herkömmlichen DNA Microarrays deutliche Vorteile haben: a) NGS Technologien erlauben quantitative und deutlich sensitivere Analysen, b) sie haben einen deutlich größeren linearen Messbereich, c) auch unbekannte Gen-Transkripte sowie Spleißvarianten können detektiert werden. Im Jahr 2008 hat sich das BMFZ an der Beschaffung des ersten kommerziell erhältlichen Hochdurchsatz DNA Sequenzierungsgerätes (Roche/454 Genome Sequencer) beteiligt. Mit Mitteln des Rektorates (FfE) wurde diese Technologie im Jahr 2010 weiter massiv ausgebaut, so dass nun ein HiSeq™ 2000 Gerät an der Kinderklinik und ein SOLiD™ System im Molekularbiologischen Zentrallabor für genomweite (Transkriptom-) Analysen bereit stehen (Abb. 6.).

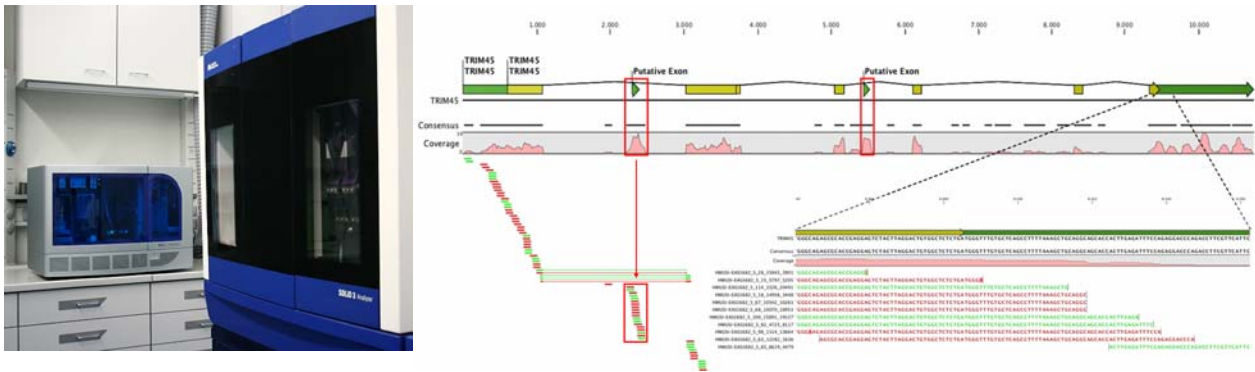


Abb. 6. A) Das SOLiD Hochdurchsatz DNA-Sequenziergerät im MZL. B) Auszug aus einem aktuellen NGS-Transkriptomprofil, das im MZL erstellt wurde. Annotierte Transkripte sowie alternative Splice-Produkte werden durch sensitive Detektion auf Exon-Level nachgewiesen. Zusammen mit der Identifikation von möglichen neuen Exonsequenzen ermöglicht die Hochdurchsatz-Sequenzierung somit die Erstellung und Charakterisierung von detaillierten Transkriptomprofilen.

Bioinformatische Methoden für die Analyse von Hochdurchsatz-Sequenzdaten

Wolfgang Kaisers (Zentralbereich Bioinformatik)

In Hochdurchsatz-Sequenziergeräten wird DNA aus biologischen Proben in viele kleine Fragmente geteilt und die Nukleotidsequenz der DNA-Fragmente ausgelesen. Als Ergebnis der Sequenzierung erhält man (Gigabyte-große) Textdateien, die kurze Sequenzabschnitte (sog. Reads) und zugehörige Qualitätsmerkmale enthalten. Durch Einsatz bioinformatischer Technik soll mit dieser Information die dem jeweiligen Experiment zugrunde liegende Fragestellung beantwortet werden. Der erste Verarbeitungsschritt ist dabei die sog. Präprozessierung. Hier werden Primer- und Adaptersequenzen entfernt und evtl. niedrig valide Nukleotid-Reads maskiert. Auch kontaminierende Sequenzen, die beispielsweise vom Untersucher oder der umgebenden Mikrofauna herrühren können, sollten identifiziert und entfernt werden. Für viele Fragestellungen müssen die einzelnen Reads dann zusammengestellt, d.h. assembliert werden. Dabei werden überlappende Nukleotidsequenzen in größeren Einheiten, sog. Contigs, zusammengefasst. Bei zahlreichen Sequenzierungsprojekten (z.B. *Haemophilus influenzae*, Mensch) wurden hierfür verschiedene Programme eingesetzt. Im Wesentlichen kommen dabei die Verfahren

- Paarweiser Alignment Algorithmus (Celera, TIGR)
- DeBruijn Graph Algorithmus (Velvet)

zum Einsatz. Contigs müssen z.B. durch Information aus mate Pair Reads konsistent angeordnet und orientiert werden (scaffolding), so dass (evtl. lückenhafte) Modelle von Chromosomen entstehen. Dieser Vorgang kann durch DNA Repeat-Abschnitte erschwert werden. Bei sog. EST („Expressed Sequence Tags“) Sequenzen erhält man mRNA Abbilder, die keine Introns enthalten. Bei Sequenzierung unbekannter Genome kann man über EST-Sequenzierung und durch Identifikation orthologer Sequenzen Gene lokalisieren. Mit genügend dichter Überdeckung kann

so das abgeschlossene Bild eines kompletten Genoms erstellt werden. Bei Resequenzierungs-Projekten, wenn also bereits ein sequenziertes Genom existiert, kann ein Alignment direkt auf dem bekannten Genom ausgeführt werden.

Nach Alignment ist Annotation das nächste Analyseziel. Dabei wird den experimentell ermittelten Gensequenzen durch Vergleich mit meist öffentlich zugänglichen Genomdaten eine biologische Bedeutung zugeordnet, typischerweise in Form eindeutiger Kennziffern („Identifizier“), beispielsweise der EntrezID (NCBI), Ensembl TranscriptID's oder ProteinID's. In weiteren Schritten kann zusätzliche Information wie Zugehörigkeit zu einer Gen-Ontologie oder zu einem bestimmten Signalweg verfügbar gemacht werden. Aufgrund der vielen bekannten und annotierten Gene und Genprodukte entstehen auch hier sehr umfangreiche Informationsmengen. Soll eine darüber hinausgehende Profilierung bestimmter Regionen stattfinden, wird man auf Algorithmen für multiples Alignment wie beispielsweise

- Hidden Markov Models (HMM)
- Gibbs Sampling
- Expectation Maximization

zurückgreifen. Hier kommen in verschiedenen Programmiersprachen (BioPerl, BioJava, Biopython, Seqan) bereitgestellte Bibliotheken zum Einsatz, wobei unterschiedlich aufwändige Spezialisierungen für die vorliegende Problemstellung erforderlich sind. Auf diese Weise können die experimentell gewonnenen Daten einem Modellrahmen angepasst werden, aus dem sich dann die Beantwortung der jeweiligen Fragestellung ergibt.

Interdisziplinäre Veranstaltungen des BMFZ

Internationale BMFZ-Meetings

Die jährlich stattfindenden internationalen BMFZ-Meetings bereichern nicht nur den wissenschaftlichen Austausch an der Heinrich Heine Universität sondern tragen auch dazu bei, aktuelle Forschungsergebnisse, die an der hiesigen Universität generiert werden, im internationalen Diskurs zu präsentieren. Jedes BMFZ-Meeting steht unter einem Oberthema, zu welchem jeweils neben Mitgliedern des BMFZ renommierte nationale und internationale Wissenschaftler/innen eingeladen werden. Die thematischen Schwerpunkte der letzten Jahre waren (vgl. <http://www.BMFZ.de>, Archiv):

2005 - Infection and Immunity

2006 - Development, Differentiation and Disease

2007 - Stem Cell Biology

2008 - Evolving Pathogens - Current Infectious Diseases - Molecular Principles in Pathogenesis and Immunity

2009 - Systems Biology

2010 - Future Challenges in Biological and Medical Research - Evolution, Aging and Disease

Die BMFZ-Meetings stießen in den vergangenen Jahren immer auf sehr reges Interesse und waren mit teilweise bis zu 300 Teilnehmern immer sehr gut besucht. Seit 2005 sind sie als zertifizierte Fortbildungsveranstaltung für Mediziner anerkannt. Besondere Höhepunkte auf den Tagungen 2005 und 2010 waren die Vorträge zweier Nobelpreisträger. Im Jahr 2005 berichtete der Nobelpreisträger für Medizin von 1996, Prof. Rolf Zinkernagel aus Zürich, über seine Forschungsergebnisse zum Thema „On antiviral immunity and vaccines“ und im Jahr 2010 hielt der Nobelpreisträger für Medizin von 2008, Prof. Harald zur Hausen aus Heidelberg (**Abb. 6.**), einen Vortrag zum Thema „Prevention of common human cancers“.



Abb. 6. Der Nobelpreisträger für Medizin des Jahres 2008, Herr Professor Dr. Harald zur Hausen, im Gespräch mit Wissenschaftlerinnen anlässlich des 10. Internationalen BMFZ-Meetings in Düsseldorf am 17. Juni 2010.

BMFZ-Klausurtagungen

Das elementare Gründungsziel des BMFZ ist die Förderung der interdisziplinären, fakultätsübergreifenden Forschung und die dazu notwendige wissenschaftliche Kooperation zwischen den BMFZ-Arbeitsgruppen. Zu diesem Zweck hat der Vorstand des BMFZ im Jahr 2006 die Ausrichtung von jährlichen Klausurtagungen („BMFZ-Retreat“) beschlossen. Dabei steht der Austausch von Forschungsergebnissen sowie die Präsentation von Kooperationsangeboten im Vordergrund. Weiterhin werden das Methoden-Spektrum sowie die technischen Voraussetzungen der jeweiligen Arbeitsgruppen vorgestellt. Zu den Tagungen werden alle Forschungsgruppenleiter des BMFZ sowie jeweils ein bis zwei wissenschaftliche Mitarbeiter/Innen eingeladen. Die Mitglieder stellen sich jeweils mit Kurzvorträgen vor, die anschließend diskutiert werden. Die 1. Klausurtagung des BMFZ fand am 11./12. August 2006 im Kardinal-Schulte-Haus in Bergisch-Gladbach statt. Die seitdem jährlich veranstalteten Treffen sind außerordentlich erfolgreich verlaufen und fanden großen Anklang bei den Teilnehmern. Daraus entwickelten sich vielfältige Kontakte und Kooperationen. Die Tagungs-Programme sind jeweils unter „<http://www.BMFZ.de>, Archiv“ zu finden.

Seminare und Kolloquien

Das BMFZ unterstützte und initiierte jährlich ca. 20 Seminare und Kolloquien, die im Kontext der Forschungsschwerpunkte des BMFZ stehen. Diese sind offen für alle interessierten Wissenschaftler/innen und werden jeweils über die BMFZ-Homepage (www.bmfz.de) und per E-mail an alle BMFZ-Mitglieder angekündigt.

Interdisziplinäre Lehre

Die Zentrallaboratorien bieten für Studierende der Medizinischen und der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät kontinuierlich interdisziplinäre Lehroptionen in Form von Praktika und Vorlesungen für aktuelle analytische Verfahren an. Dazu gehörten u.a. ein A-Modul zum Thema „DNA-Microarrays für die Genexpression“ und Vorlesungen zum Thema „Proteinanalytik“ sowie „From gene to *in silico* structure“ und „Lasermmedizin für Physiker“.

Nachwuchsförderung

Bereits seit dem Jahr 2002 vergibt das BMFZ jährlich den *Ulrich-Hadding-Forschungspreis* zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses an der Heinrich-Heine-Universität. Der Preis wird im Rahmen des internationalen BMFZ-Meetings an exzellente, junge, nicht habilitierte Wissenschaftler/innen aus den Arbeitsgruppen der BMFZ-Mitglieder vergeben. Die bisherigen Preisträger/Innen sind unter „<http://www.BMFZ.de>, Archiv“ zu finden.

Ausblick

Die methodische und technische Entwicklung in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung geht rasant voran. Um auch in Zukunft die wissenschaftliche Leistungsfähigkeit des BMFZ zu gewährleisten und den Mitgliedern ein zeitgemäßes und wettbewerbsfähiges Spektrum an Methoden zur Verfügung stellen zu können, bedarf es einer kontinuierlichen Weiterentwicklung der bestehenden und neuer methodischer Plattformen. Hinsichtlich der aktuellen Entwicklungen auf dem Gebiet der globalen Genom-weiten Sequenziermethoden der nächsten Generation wurde an der Heinrich-Heine-Universität in den vergangenen zwei Jahren eine zeitgemäße Ausstattung geschaffen. Um aber die Forschung in diesem zukunftsreichen Bereich kompetitiv weiter voran zu treiben, bedarf es zusätzlich des Ausbaus der ortsansässigen bioinformatischen und systembiologischen Expertise, um mit den generierten hochkomplexen und extrem umfangreichen Datensätzen sinnvoll arbeiten zu können.

Einen weiteren zukunftsreichen Entwicklungsbereich stellt die Proteomforschung dar, die mit Hilfe moderner massenspektrometrischer Verfahren eine Vielzahl neuer Optionen der Proteinanalytik bietet, die von Proteom-weiten Expressionsuntersuchungen bis hin zu gezielten Analysen von posttranslationalen Modifikationen einzelner Proteine oder Peptide reichen. Zur Stär-

kung der methodischen Expertise und wissenschaftlichen Kompetenz in diesem Gebiet hat das BMFZ gemeinsam mit der Medizinischen Fakultät die Einrichtung einer W2-Professur für Proteomforschung auf den Weg gebracht, die dem Aufbau einer leistungsfähigen Arbeitsgruppe in der Proteomforschung dienen soll und zugleich das methodische Spektrum im Zentrallabor für Proteinanalytik des BMFZ in sinnvoller Weise komplementieren soll. Die Ruferteilung für diese Professur erfolgte dieses Jahr und die entsprechenden Berufungsverhandlungen laufen zur Zeit. Ganz wesentlich wird auch hier die apparative Neuausstattung mit hochmodernen Massenspektrometern sein, die dankenswerter Weise vom Rektorat der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen des „Fit-for-Exzellenz“-Programms unterstützt wird.

Ein dritter Bereich, dessen Weiterentwicklung das BMFZ in den nächsten Jahren gern unterstützen würde, betrifft den Ausbau der tierexperimentellen Bildgebung an der Heinrich-Heine-Universität. Komplementär zu der bestehenden Ausstattung und Expertise in der zellulären und hochauflösenden Mikroskopie (s.o.) wäre hier die Etablierung einer zentralen Plattform wünschenswert, in der z.B. mittels hochauflösender Magnetresonanztomographie, Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Fluoreszenz- bzw. Biolumineszenz-basierter optischer Methoden, eine „State-of-the-Art“ tierexperimentelle (*in vivo*) Bildgebung am Standort realisiert werden könnte. Dies würde nicht nur die Analyse und Charakterisierung neuer transgener Tiermodelle erleichtern, die in zahlreichen Arbeitsgruppen des BMFZ verwendet werden, sondern u.a. auch die präklinische Evaluation neuer, experimenteller Therapieverfahren deutlich erleichtern und verbessern.

Ausgewählte hochrangige Publikationen aus den BMFZ-Arbeitsgruppen (2009-10)

1. SEMMLING V, LUKACS-KORNEK V, THAISS C, QUAST T, HOCHHEISER K, PANZER U, ROSSJOHN J, PERLMUTTER P, CAO J, GODFREY D, SAVAGE P, KNOLLE P, KOLANUS W, FÖRSTER I, KURTS C (2010). Alternative cross-priming through CCL17/CCR4-mediated CTL attraction towards NKT cell-licensed dendritic cells". **Nat Immunol** 11, 313-20.
2. STUTTE S, QUAST T, GERBITZKI N, SAVINKO T, NOVAK N, REIFENBERGER J, HOMEY B, KOLANUS W, ALENIUS H, FÖRSTER I (2010). Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 107, 8736-41.
3. LANE N, MARTIN W (2010) The energetics of genome complexity. **Nature** 467, 929-934.
4. STAN A, PIELARSKI KN, BRIGADKI T, WITTENMAYER N, FEDORCHENKO, GOHLA A, LESSMANN V, DRESBACH HT, GOTTMANN K (2010). Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the transsynaptic control of vesicle accumulation. **Proc Natl Acad Sci USA** 107, 1116-11121.
5. MÜLLER-SCHIFFMANN A, MÄRZ-BERBERICH J, ANDRIJEVNA A, RÖNICKE R, BARTNIK D, BRENER O, KUTZSCHE J, HORN AHC, HELLMERT M, POLKOWSKA J, GOTTMANN K, REYMANN K, FUNKE SA, NAGEL-STEGER L, MORISCOT C, SCHOEHN G, STICHT H, WILLBOLD D, SCHRADER T, KORTH C (2010) Combining independent drug classes into superior, synergistically acting hybrid molecules. **Angew Chem Int Ed. Engl** 49, 8743-8746.
6. GÖRG B, QVARTSKHAVA N, BIDMON HJ, PALOMERO-GALLAGHER N, KIRCHEIS G, ZILLES K, HÄUSSINGER D (2010) Oxidative stress markers in the brain of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. **Hepatology** 52, 256-265.
7. SCHÖNBERG K, SRIBAR M, ENCMANN J, FISCHER JC, UHRBERG M (2010). Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition, **Blood**, Oct 8. [Epub ahead of print]

8. RASSAF T, HEISS C, MANGOLD S, LEYENDECKER T, KEHMEIER ES, KELM M, LAUER T (2010) Vascular formation of nitrite after exercise is abolished in patients with cardiovascular and coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol** 55, 1502-1503.
9. SCHULZE-TOPPHOFF U, PRAT A, PROZOROVSKI T, SIFFRIN V, PATERKA M, HERZ J, BENDIX I, IFERGAN I, SCHADOCK I, MORI MA, VAN HORSSSEN J, SCHRÖTER F, SMORODCHENKO A, HAN MH, BADER M, STEINMAN L, AKTAS O, ZIPP F (2009). Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system. **Nat Med** 15, 788-93.
10. FISCHER J, KOCH L, EMMERLING C, VIERKOTTEN J, PETERS T, BRÜNING J, RÜTHER U (2009) Inactivation of the Fto gene protects from obesity. **Nature** 458, 894-898.
11. DAGAN T, MARTIN W (2009) Seeing red and green in diatom genomes. **Science** 324: 1651-1652.
12. FILOSA A, PAIXÃO S, HONSEK SD, CARMONA M, BECKER L, FEDDERSEN B, GAITANOS L, RUDHARD Y, SCHOEPFER R, KLOPSTOCK T, KULLANDER K, ROSE CR, PASQUALE EB, KLEIN R (2009) Neuron-glia communication via EphA4/ephrinA3 modulates glial glutamate transporter levels and synaptic plasticity. **Nat Neurosci** 12, 1285-1292.
13. HUCK K, FEYEN O, NIEHUES T, RÜSCHENDORF F, HÜBNER N, LAWS HJ, TELIEPS T, KNAPP S, WACKER HH, MEINDL A, JUMAA H, BORKHARDT A (2009) Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. **J Clin Invest** 119, 1350-8.
14. KIRCHEIS G, KNOCH A, HILGER N, MANHART F, SCHNITZLER A, SCHULZE H, HÄUSSINGER D (2009) Hepatic encephalopathy and fitness to drive. **Gastroenterology** 137, 1706-1715.
15. SAWITZA I, KORDES C, REISTER S, HÄUSSINGER D (2009) The niche of hepatic stellate cells within rat liver. **Hepatology** 50, 1617-1624.
16. ALE-AGHA N, GALBAN S, SOBIEROY C, ABDELMOHSEN K, GOROSPE M, SIES H, KLOTZ LO (2009) HuR regulates gap junctional intercellular communication by controlling beta-catenin levels and adherens junction integrity, **Hepatology** 50, 1567-1576.
17. MEYER C, HEISS C, DREXHAGE C, KEHMEIER E, BALZER J, MÜHLFELD A, MERX MWM, LAUER T, KÜHL H, FLOEGE J, KELM M, RASSAF (2009) Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function **J Am Coll Cardiol** 55, 454-459
18. KREMER D, HEINEN A, JADASZ J, GÖTTLE P, ZIMMERMANN K, ZICKLER P, JANDER S, HARTUNG HP, KÜRY P (2009) p57kip2 is dynamically regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis and interferes with oligodendroglial maturation. **Proc Natl Acad Sci USA** 106, 9087-92.
19. STOECKEL MC, SEITZ RJ, BUETEFISCH C (2009) Congenitally altered motor experience alters somatotopic organization of human primary motor cortex. **Proc Natl Acad Sci USA** 106, 2395-2400
20. GANSEN A, VALERI A, HAUGER F, FELEKYAN S, KALININ S, TÓTH K, LANGOWSKI J, SEIDEL CAM (2009) Nucleosome disassembly intermediates characterized by single-molecule FRET. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 106, 15308-15313.