

LABORWELT

Nr. 2/2010 – 11. Jahrgang

Bioanalytik

Probenvorbereitung:
Integrierte Lab-on-the-Chip-
Analytik für die PCR

Paper des Monats: Direkte
Reprogrammierung von
Fibroblasten in Neuronen

Kostenbewusste Umwelt-
sensorik: Aptamere statt
Antikörper als Binder



Marktübersicht:
miRNA-Profilung

Join the
GS Junior Launch Event
at the **Analytica 2010***



454
SEQUENCING

GS Junior System

Next Generation Sequencing for Everyday and Everyone

Introducing the GS Junior Benchtop System



The Complete System includes: GS Junior Instrument, high-performance desktop computer, and the complete suite of GS data analysis software plus dedicated bioinformatic protocols.

Simplified Workflow and Bioinformatics

Perfectly sized for labs that require:

- **Direct, clonal sequencing of amplicons (PCR products)**
- **Targeted human resequencing**
- ***De novo* sequencing of microbial genomes**
- **Metagenomic characterization of complex environmental samples**
- **Pathogen detection**

...and many more applications, all for a price with extraordinary value!

Learn more at www.gsjunior.com

* Be the first to see and touch the **GS Junior** live at the **Analytica 2010** on March 23rd in Munich.

To receive your personal voucher for the **GS Junior Launch Event** simply call 0621-759-8554 and use the promo code "GSJ".

For life science research only.
Not for use in diagnostic procedures.

454, 454 LIFE SCIENCES and 454 SEQUENCING are trademarks of 454 Life Sciences Corporation, Branford, CT, USA, a Roche company. GS FLX TITANIUM and GS JUNIOR are trademarks of Roche.

© 2010 Roche Diagnostics. All rights reserved.

Roche Diagnostics GmbH
Roche Applied Science
Werk Penzberg
82372 Penzberg, Germany



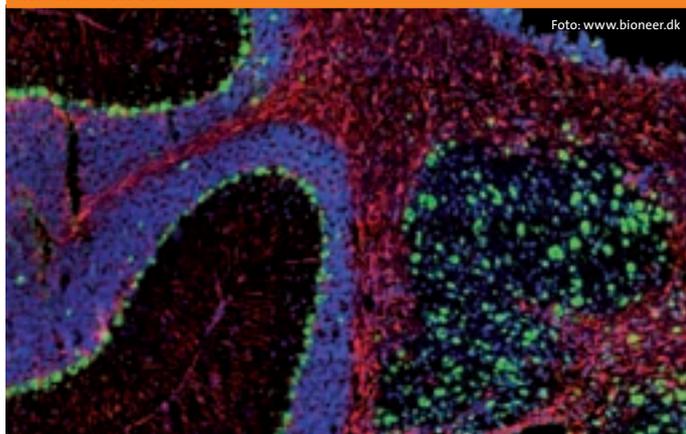
Bioanalytik im Umbruch

Nicht nur die Märkte für Life Sciences-Tools, -Geräte und -Verbrauchsmaterialien sind im Umbruch, wie die jüngste Übernahme des Bioprozessspezialisten Millipore durch die deutsche Merck KGaA deutlich zeigt. Auch die Bioanalytik richtet sich zunehmend auf neue Märkte aus. So winken etwa PCR-Test-Anbietern unter dem neuen Namen „Anbieter von molekularer Diagnostik“ zunehmend Geschäfte im Hype-Markt der „Individualisierten Medizin“, in den derzeit hohe Beträge fließen: rund 100 Millionen sollen es im Falle des Mitte Februar gekürten Münchener m4-Spitzenclusters sein. Auch junge oder frisch in den Forschungslabors entwickelte Technologien wie das Next Generation Sequencing (vgl. S. 10, 16, 21) oder Aptamer-Capture-Technologien (vgl. Seite 6) zielen verstärkt auf neue Industriemärkte.

Zwar scheint Roche Diagnostics mit seinem auf der Analytica in München erstmals in Europa präsentierten „Genome Sequencer Junior“ zunächst nur den Forschungsmarkt im Visier zu haben: Das System kostet nur noch ein Viertel der großen Sequencer, hat aber für die meisten Forschungsanwendungen genau den richtigen Leistungsumfang. Der größere Markt liegt aber laut Marketing-Chef Marcus Dröge längerfristig im Diagnostik-Segment. Auch Branchenprimus Qiagen hat den Trend der molekularen Diagnostik frühzeitig erkannt und baut das gewinnträchtige Segment derzeit systematisch aus. Kommende Themen auf der Hypeskala, die sich für findige Laborfirmen auszahlen dürften: Medikamententestung mit Stammzellen, Forschung an klinischen Proben/Biobanken etc. Bei soviel positiver Zukunftsstimmung verwundert es kaum, dass die Wirtschaftskrise kaum Kratzer bei den Großanbietern hinterlassen hat. Dies spiegelt sich – zum großen Glück der Messe München – auch in einem unverändert hohen Anmeldestand zur Analytica wider, dem Frühjahres-Highlight für den Laborsektor. Grund für uns, mit einer LABORWELT-Themenausgabe den aktuellen Stand der Bioanalytik-Entwicklung zu beleuchten. Wenn Sie in München sind, freuen wir uns über Ihren Besuch: Halle A3-Stand 104.

Thomas Gabrielczyk

In diesem Heft



Marktübersicht: miRNA-Quantifizierung

Chips, PCR oder Sequencing – über den Königsweg des besonders für Krebs- und Grundlagenforscher interessanten miRNA-Profilings sind sich selbst Anbieter entsprechender Forschungsdienstleistungen nicht einig. Dies legen jedenfalls die Angaben der Firmen nahe, die an der LABORWELT-Marktübersicht „miRNA-Quantifizierung“ teilgenommen haben (ab Seite 41. ff).

Inhalt

- Paperwelt** Highlight des Monats
4 Direkte Umwandlung von Hautfibroblasten in Nervenzellen
 Marius Wernig, Stanford University
- Blitzlicht** Umweltanalytik
6 Erkennung von Umweltschadstoffen durch DNA-Aptamere
 Beate Strehlitz et al., Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig
- Titel: Bioanalytik**
 Entnahme von humanen embryonalen Stammzellen aus flüssigem Stickstoff.
 Foto: Jeff Miller/University of Wisconsin-Madison
- Blitzlicht** Mikrobielle Genomforschung
10 Bioinformatische Tools zur ultraschnellen Genominterpretation
 Alexander Goesmann et al., CeBiTec, Universität Bielefeld
- Blitzlicht** Lab-on-a-Chip
13 POC-System zur Probenaufbereitung für den HPV-Nachweis
 Marion Ritzi-Lehnert et al., Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz
- Blitzlicht** Next Generation Sequencing
16 Analyse der Transkriptom- und Splicing-Dynamik während der Neurogenese
 Burkhard Ziebolz, Roche Applied Science, Penzberg
- Blitzlicht** Laborautomation
21 BRCA1/BRCA2: Automatisierte Suche nach Genmutationen
 Ruth-Maria Leiber et al., Tecan Schweiz AG, Männedorf
- Blitzlicht** Zytometrie
23 Multiple Marker: Plattform für explorative Zytometrie
 Christian Hennig, Medizinische Hochschule Hannover
- Blitzlicht** microRNA-Arrays
25 MicroRNA-Array-Analysen – Einfluss der Normalisierungsmethode
 Lin Gan und Bernd Denecke, Chip Facility – IZKF BIOMAT, RWTH Aachen
- Blitzlicht** Peptidvakzine
31 Tumorassoziierte Peptide für die Krebsbehandlung
 Toni Weinschenk et al., immatics biotechnologies GmbH, Tübingen
- Blitzlicht** Integrierte Bioanalytik
31 Labor im Taschentuch – Weiterentwicklung der Lab-on-Chip-Idee
 Frank Bier, Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik
- Report** Forschungsevaluation
34 h-Index – geeignet zur Bewertung einzelner Forschungsleistungen?
 Markus von Ins, Kompetenzzentrum Bibliometrie für die deutsche Wissenschaft, Bonn
- Wissenschaft** Biomarkerentwicklung
39 PURE – Volkskrankheiten im Fokus
 Klaus Gerwert et al., Ruhr-Universität Bochum
- 29 Kongresswelt**
- 44 Karrierewelt - Stellenmarkt**
- 51 Produktwelt**
- 53 Termine, Ausblick, Impressum**

Direkte Umwandlung von Haut- in Nervenzellen – waren iPS nur der Anfang?

Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Südhof und Marius Wernig (2010): Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors, Nature 463(7284):1035-41

Dass Fibroblasten mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) verwandelt werden können, war bereits 2006 gezeigt worden. Dass sich Hautzellen aber auch ohne den Umweg über die iPS sogar mit wesentlich höherer Effizienz (bis 19,5%) in sogenannte induzierte neurale Zellen (iN) programmieren lassen, hat jetzt die Gruppe von Marius Wernig erstmals gezeigt. In einem Pool von 19 für die Nervenentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktoren identifizierten sie durch lentivirale Expression der einzelnen Faktoren und verschiedener Kombinationen in embryonalen und postnatalen Mausfibroblasten die drei für die Bildung funktioneller Nervenzellen erforderlichen Proteine *Ascl1* (*Mash1*), *Brn2* und *Myt1l*. *Ascl1* induziert die Umwandlung der Mausfibroblasten in unreife neuritenähnliche iN-Zellen, die beiden anderen Faktoren helfen dabei, Neuronen mit komplexerer Morphologie und Physiologie zu erzeugen. Die iN-Zellen exprimieren spannungsabhängige Kanalproteine, zeigen die elektrophysiologischen Eigenschaften von reifen Nervenzellen, integrieren sich in bereits vorhandene Nerven-Netzwerke und bilden untereinander Synapsen aus. Gelingt die Umwandlung der Fibroblasten auch im Menschen, könnte dies die Möglichkeit eröffnen, Erbkrankheiten in humanen Zellmodellen zu untersuchen.

LABORWELT:

Wie kamen Sie auf die Idee zu Ihrer Studie?

Wernig:

Dass man eine Blutzelle mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren in eine andere verwandeln kann, war bereits vor unserer Publikation bekannt. Aber von einem Hautfibroblasten bis zu einem Neuron ist es ein ungleich weiterer Weg, weil die Zellen sehr verschieden sind. Es war also völlig unklar, ob das möglich ist. Von daher war es ein hochriskantes Projekt. Aber nachdem wir wussten, dass man Zellen komplett in pluripotente iPS-Zellen rückprogrammieren kann, stellten wir uns die Frage: Handelt es sich wirklich um eine Rückprogrammierung, oder findet durch die Expression geeigneter Transkriptionsfaktoren einfach eine Konversion von einem in den anderen Zelltyp statt? Mit anderen Worten: war es nur ein Zufall, dass diese Verwandlung zuverlässig in eine pluripotente Stammzelle gelang? Kann man aber tatsächlich auch jede beliebige Körperzelle durch Expression geeigneter Faktoren aus einer anderen Körperzelle erhalten? Das war eine offene, eigentlich auch naheliegende Frage im Feld. Aber eben gegen das Lehrbuchwissen, und deshalb haben wahrscheinlich viele gedacht: So etwas Abstruses, wie soll das jemals funktionieren? Von daher haben anscheinend auch nicht sehr viele Gruppen außer uns versucht, diese Hypothese zu überprüfen.

LABORWELT:

Was sind Ihre wichtigsten Ergebnisse, und welche Relevanz haben sie?

Wernig:

Wir haben gezeigt, dass man embryonale Mausfibroblasten direkt in funktionelle Nervenzellen umwandeln kann. Wir haben entdeckt, dass dies mit drei Faktoren gelingt, die eine Rolle bei der normalen Hirnentwicklung spielen – *Ascl1*, *Brn2* und *Myt1l*. Wir haben gezeigt, dass *Ascl1* allein bereits die Differenzierung der Hautzellen in Neuronen bewirken kann, die beiden anderen Faktoren aber wesentlich zur Effizienzsteigerung des Prozesses beitragen. Wir haben auf diese Weise nicht nur Zellen erhalten, die interessant ausschauen und ein paar Markergene exprimieren. Wir konnten zeigen, dass die Zellen die Funktion von Nervenzellen übernehmen. Insbesondere konnten wir zeigen, dass die gewonnenen Zellen in Co-Kultur mit anderen Nervenzellen fähig sind, synaptische Verbindungen herzustellen. Die Ähnlichkeit zeigte sich morphologisch, auf der molekularen Ebene und auch funktionell.

LABORWELT:

Welche Anwendungspotentiale ergeben sich daraus?

Wernig:

Interessante Anwendungsmöglichkeiten eröffnen sich dann, wenn uns diese Konversion auch mit menschlichen Zellen gelingt. Dies vorausgesetzt, sehe ich momentan zwei klinisch interessante Anwendungsfelder. Zum einen wäre es sehr attraktiv, die Krankheiten von Patienten mit erblichen neurodegenerativen oder psychiatrischen Erkrankungen in der Kul-



Eigentlich hat Marius Wernig zwei Karrieren, eine wissenschaftliche und eine musikalische. Denn der 35-Jährige spielt Violine, Viola und Klavier und komponiert auch. Seine Doktorarbeit machte Wernig nach Studium an der medizinischen Universität Wien (1992-1995) und der LMU und TU 1995-1999) München bei Prof. Rudi Balling, damals noch am GSF Forschungszentrum. Nach vier Assistenzjahren (1999-2003) bei den Bonner Stammzellforschern Prof. Otmar Wiestler und Prof. Oliver Brüstle wechselte Wernig als Post-Doc zu Prof. Dr. Rudi Jaenisch (2003-2008) ans Whitehead Institute for Biomedical Research in Cambridge (USA). Seit 2008 ist Wernig Assistenzprofessor am Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine der Stanford University School of Medicine. Seine Forschungsinteressen liegen auf der epigenetischen Reprogrammierung von Stammzellen und den Selbsterneuerungs-Mechanismen neuraler Vorläuferzellen.

turschale zu modellieren. Die Hoffnung ist hier, die Entwicklung der Krankheit an konvertierten Zellen nachvollziehen zu können, die die Pathologie beibehalten haben. Das wäre phantastisch. Denn Tiermodelle haben eine sehr begrenzte Aussagekraft, wenn es darum geht zu zeigen, was im menschlichen Gehirn vor sich geht. Die zweite Anwendungsoption ergibt sich direkt aus der ersten. Hat man Krankheitsmodelle auf Basis menschlicher Zellkulturen etabliert, dann lassen sich auch Krankheitsmarker für harte klinische Endpunkte finden, die die Basis für ein Drug Screening in diesen Modellen bilden.

LABORWELT:

Was sind Ihre nächsten Ziele?

Wernig:

Es gibt natürlich ganz viele offene Fragen. Aber die wichtigste ist natürlich, ob wir diese induzierten neuronalen Zellen auch aus menschlichen Hautzellen herstellen können. Daneben werden wir prüfen, ob die direkte Umwandlung in Nervenzellen auch mit anderen Zelltypen funktioniert.



VOM ZENTRALLABOR IN IHR LABOR.

Das NEUE easyCyte™ 8HT-System



- KOMPLETT – Die erste Komplettlösung in Form eines Tisch-Durchflusszytometers der Welt.
- OPTIMIERT – Multiparametrische Kits und Untersuchungen.
- INTUITIV – Software- und Analysepakete.
- LEISTUNGSSTARK – Innovative Guava®-Technologie.
- PREISGÜNSTIG – Passt auf Ihren Labortisch und in Ihr Budget.

Millipore bringt die Leistung der Durchflusszytometrie auf Ihren Labortisch.

Stellen Sie sich vor, die komplexesten Untersuchungen direkt von Ihrem Labortisch aus durchführen zu können. Kein Zentrallabor. Keine externe Fachkenntnis nötig. Millipores integrierte Instrumente, Testsätze, Software und unser Service bieten Ihnen eine Komplettlösung, die Ihnen das Leben leicht macht.

ADVANCING LIFE SCIENCE TOGETHER® Forschung. Entwicklung. Produktion.

Millipore und Advancing Life Science Together sind eingetragene Marken der Millipore Corporation.
Guava ist eine eingetragene Marke von Guava Technologies, Inc.
Das Millipore-Logo ist eine Marke der Millipore Corporation.
easyCyte ist eine Marke von Guava Technologies, Inc.
©2010 Millipore Corporation. Alle Rechte vorbehalten.



Stellen Sie auf Guava um unter
www.millipore.com/flowcytometryL

Erkennung von Umweltschadstoffen durch DNA-Aptamere

Regina Stoltenburg, Christine Reinemann, Beate Strehlitz, Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ, Leipzig

Biosensoren sind als einfache und kostengünstige Messsysteme zur vor Ort-Messung von Umweltschadstoffen sehr gefragt. Die Bindung des Analyten an die biologische Komponente im Biosensor, den Rezeptor, liefert ein Messsignal. Dieses wird über einen direkt mit dem Rezeptor verbundenen Transducer in ein quantitatives Signal gewandelt. An die Stabilität, Selektivität und Sensitivität des biologischen Rezeptors werden dabei – abhängig von der zu messenden Substanz und der Probenmatrix – hohe Anforderungen gestellt. Diese können von bisher in Biosensoren eingesetzten Enzym- oder Antikörper-Rezeptoren in vielen Fällen nicht erfüllt werden. Eine interessante Alternative bieten hier Aptamere, die bislang hauptsächlich in der medizinischen Diagnostik und Therapie eingesetzt werden: sie sind sehr stabil und können für verschiedenste Zielmoleküle *in vitro* entwickelt werden. Bereits während der Entwicklung ist eine gezielte Anpassung an die späteren Messbedingungen möglich.

Aptamere sind einzelsträngige DNA- (ssDNA) oder RNA-Oligonukleotide, die aufgrund ihrer spezifischen dreidimensionalen Struktur eine hochaffine Bindung mit ihrem Zielmolekül eingehen. Diese Bindungsreaktion kann, genau wie eine Antigen-Antikörper-Bindung, zur Erkennung des Analyten im Biosensor genutzt werden. Das zu einem bestimmten Zielmolekül passende Aptamer wird mit dem SELEX-Verfahren (Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment) aus einer

synthetisch erzeugten Bibliothek von rund 10^{15} Nukleinsäuren unterschiedlicher Sequenz selektiert. Dieser *in vitro*-Prozess bietet den Vorteil, auch auf schwierige Zielmoleküle wie Umweltschadstoffe oder toxische Substanzen angewandt werden zu können. Die Struktur der Zielmoleküle kann dabei von einfachen organischen Molekülen über Peptide und Proteine bis hin zu komplexen Strukturen wie Zellen oder ganzen Organismen reichen¹. Nach erfolgreicher Selektion und Sequenzanalyse

der einzelnen Aptamere können diese jederzeit mittels chemischer Synthese hergestellt werden. Sie können sehr einfach modifiziert werden, zum Beispiel mit funktionellen Gruppen zur Verbesserung der Stabilität oder Immobilisierbarkeit oder mit Reportermolekülen für den Nachweis.

FluMag-SELEX

Das SELEX-Verfahren zur Selektion von DNA-Aptameren ist ein iterativer Prozess, der aus mehreren Schritten besteht: der Bindungsreaktion zwischen Target und Oligonukleotid-Bibliothek in der ersten SELEX-Runde, Waschschritten zur Entfernung ungebundener Oligonukleotide, der Elution der an das Target gebundenen Oligonukleotide sowie deren anschließende Amplifikation mittels PCR. Aus dem PCR-Produkt wird schließlich die relevante ssDNA gewonnen und damit ein neuer, nunmehr selektierter und angereicherter Oligonukleotid-Pool generiert. Dieser ist der Ausgangspunkt für die nächste SELEX-Runde.

Die Grundlagen dieses Prozesses, den es mittlerweile in vielen verschiedenen Variationen gibt², wurden bereits 1990 beschrieben^{3,4}. Der in unserem Labor etablierte FluMag-SELEX-Prozess ist durch die Verwendung einer DNA-Fluoreszenzmarkierung (Flu) und von Magnetic Beads (Mag) zur Immobilisierung der Targetmoleküle gekennzeichnet⁵. Die Fluoreszenzmarkierung dient der Quantifizierung der DNA in den verschiedenen Prozessschritten, ohne auf radioaktive Marker zurückgreifen zu müssen. Durch die Targetimmobilisierung auf Magnetic Beads kann besonders die Abtrennung Target-gebundener und -ungebundener Oligonukleotide einfach und effizient durchgeführt werden. Die Abbildung 1 zeigt den grundlegenden Ablauf des SELEX-Verfahrens für DNA-Aptamere, welches prinzipiell in jedem Labor mit molekularbiologischer Ausstattung ausführbar ist. Eine Anreicherung Target-spezifischer Oligonukleotide erfolgt in aller Regel nach acht bis 16 Runden. Aus diesem Aptamer-Pool werden im nächsten Schritt mittels Klonierung einzelne Aptamere gewonnen, die dann weiter charakterisiert (Sequenzierung, Sequenzanalyse, Bestimmung der Affinitätskonstanten) werden können. Darüber hinaus ist es möglich, die Sequenzen zu optimieren (z.B. Verkürzung auf den bindenden Bereich) und zu modifizieren (z.B. Ankopplung von Markern oder funktionellen Gruppen).

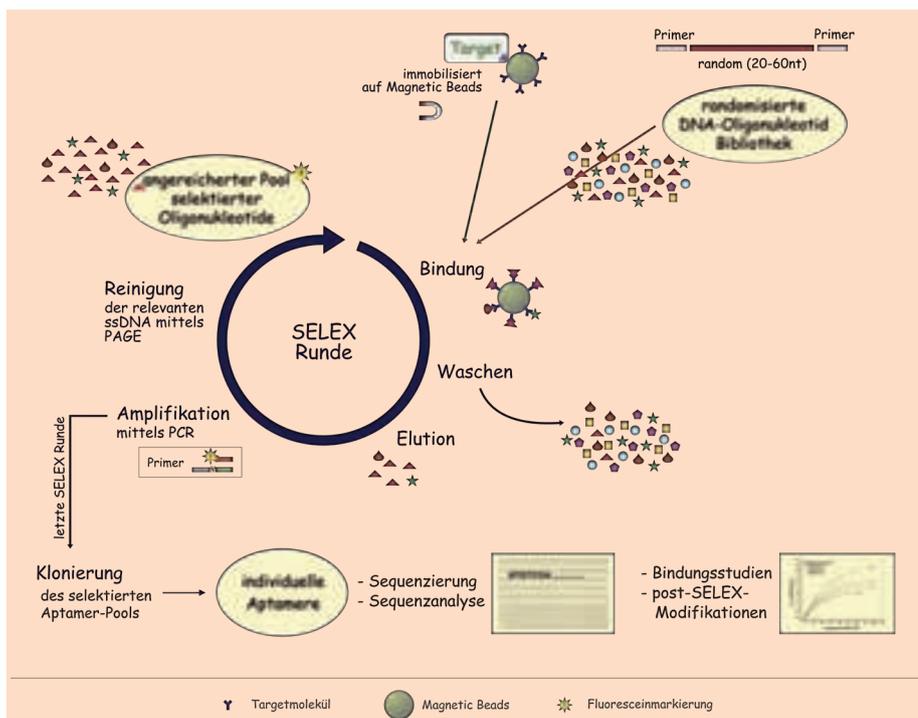


Abb. 1: Schematische Darstellung der grundlegenden Schritte des DNA-SELEX-Verfahrens

Aptamere zur Detektion von Umweltschadstoffen

Das FluMag-SELEX-Verfahren hat sich für unterschiedliche Targets bewährt und wird bereits von anderen Arbeitsgruppen

Competence in **Electrophoresis**

Versatile Systems for Scientific Laboratories



Power Packs
P25/P25T

- ❖ Universal for electrophoresis and blotting



Agarose Gel Electrophoresis
Compact Line

- ❖ Easy to use design



PAGE Electrophoresis
Minigel Family

- ❖ Leak-free systems for native and SDS gels



Semi-Dry Blotting Systems
Fastblots

- ❖ Rapid and high efficient transfer



Pulsed Field Gel Electrophoresis
Rotaphor System 6.0

- ❖ Separation of large DNA molecules up to 8 MB



Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TGGE Systems

- ❖ Rapid detection of mutations in DNA fragments



Innovation · Advancement · Development
Quality Products Made in Germany

www.biometra.com

+49 551 50686-0 · info@biometra.com

anti-Cocain-Aptamer (Original)	5'- GGGAGACAAGGATAAATCCTTCAATGAAGTGGGTCGACA -3'	39nt
modifiziertes anti-Cocain-Aptamer + komplementäres Quencher-Oligo	5'- FI-ATCTCGGGAGACAAGGATAAATCCTTCAATGAAGTGGTCTCCC -3' 5'- GTCTCCCAGAT-D -3'	44nt 12nt

Abb. 2: Sequenzen des anti-Kokain-Aptamers (original bzw. modifiziert) und des Quencher-Oligonukleotids. Fluorescein-Markierung (FI), DABCYL-Markierung (D); blau: zusätzlich an das Aptamer angefügte Nukleotide; grün: ausgetauschte Nukleotide; unterstrichen: zueinander komplementäre Enden des Aptamers

angewandt^{6,7}. So konnten wir etwa Aptamere für das sehr kleine organische Molekül Ethanolamin⁸, ein Peptid sowie für Proteine selektieren.

Ethanolamin und seine Derivate Di- und Tri-Ethanolamin werden in der chemischen Industrie sowie als Zusatzstoffe in Kosmetika verwendet. Wir konnten als Bindungsort im Molekül die Ethylamin-Gruppe identifizieren. Auch Moleküle mit frei zugänglicher Methylamin-Gruppe werden gebunden. Die Amino-Gruppe (in primären, sekundären und tertiären Aminen) ist dabei für die Aptamer-Bindung essentiell, während die Hydroxyl-Funktion nicht benötigt wird. Negativ geladene organische Moleküle werden von den Aptamern nicht gebunden, selbst wenn sie eine Ethyl- oder Methylamin-Gruppe enthalten. Auch quartäre Ammoniumverbindungen werden nicht gebunden. Demzufolge zeigt das Aptamer Gruppenspezifität⁹.

Weiterhin wurden mittels FluMag-SELEX Aptamere für einen Extrakt aus Sporen des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* selektiert. Die gewonnenen Aptamere binden an Proteine des Extraktes und sind in der Lage, einzelne Schimmelarten zu unterscheiden. Studien zufolge ist Schimmelbefall in Innenräumen eine der Ursachen für die Zunahme der generellen Allergiefähigkeit in Industriestaaten¹⁰. Daher ist die Entwicklung eines neuen, Aptamer-basierten Verfahrens zur Schimmelpilz- und Allergen-Detektion ein Ziel unserer Arbeit.

Zusätzliche, vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Vorhaben unserer Gruppe betreffen die Entwicklung von Aptamern sowie eines vor-Ort-Messgerätes zum Nachweis bakterieller Verunreinigungen des Trinkwassers. Diese stellen in vielen Regionen der Erde ein Problem dar.

Auch andere Schadstoffe, zum Beispiel Arzneimittelrückstände, können in das Trinkwasser gelangen, wenn sie in Kläranlagen nicht oder nicht vollständig abgebaut werden. Über ihr Gefährdungspotential, insbesondere im Zusammenwirken mehrerer Substanzen, ist noch wenig bekannt. Eine Methode zur einfachen und schnellen Messung der Substanzen bietet die

Möglichkeit, ihren Einfluss auf die menschliche Gesundheit besser abzuschätzen.

Aptamere als Rezeptoren in Biosensoren und Assays

Über die Messung von Arzneimittelreststoffen in großen Flüssen kann auf den Verbrauch dieser Substanzen in der Einzugsregion rückgeschlossen werden. Aufsehen erregten im Jahr 2005 entsprechende Studien an

Wasserproben aus dem Rhein¹¹ und dem Po¹² auf Kokain (Cocain) und sein Abbauprodukt Benzoylcegonin. Aus den gemessenen Werten ließ sich ablesen, dass der Kokainkonsum im Einzugsgebiet der Flüsse weit höher war als erwartet.

Kokain kann auch mit Hilfe von Aptamern detektiert werden. Ein entsprechender Assay wurde von uns konzipiert. Ein anti-Kokain-DNA-Aptamer¹³⁻¹⁵ wurde für den Assay so modifiziert, dass der Kokainnachweis nach dem FRET-Prinzip mit einem Fluorophor-Quencher-Paar und unter Bildung eines intermolekularen Beacons erfolgt. Die Sequenzmodifikationen des anti-Kokain-Aptamers erfolgten in Anlehnung an Liu et al.¹⁶, wobei zusätzlich eine Fluoresceinmarkierung am 5'-Ende angefügt wurde (vgl. Abb. 2). In dem konzipierten Assay funktioniert dieses Aptamer im Zusammenwirken mit einem zweiten, komplementären Oligonukleotid, das am 3'-Ende DABCYL als Quencher-molekül trägt.

Die Abbildung 3 verdeutlicht die Funktionsweise des Aptamer-basierten Kokain-Assays. Der Messansatz enthält zwei DNA-Moleküle, das Aptamer und das Quencher-Oligonukleotid. In Abwesenheit von Kokain liegt das Aptamer partiell ungefalteter vor und hybridisiert mit

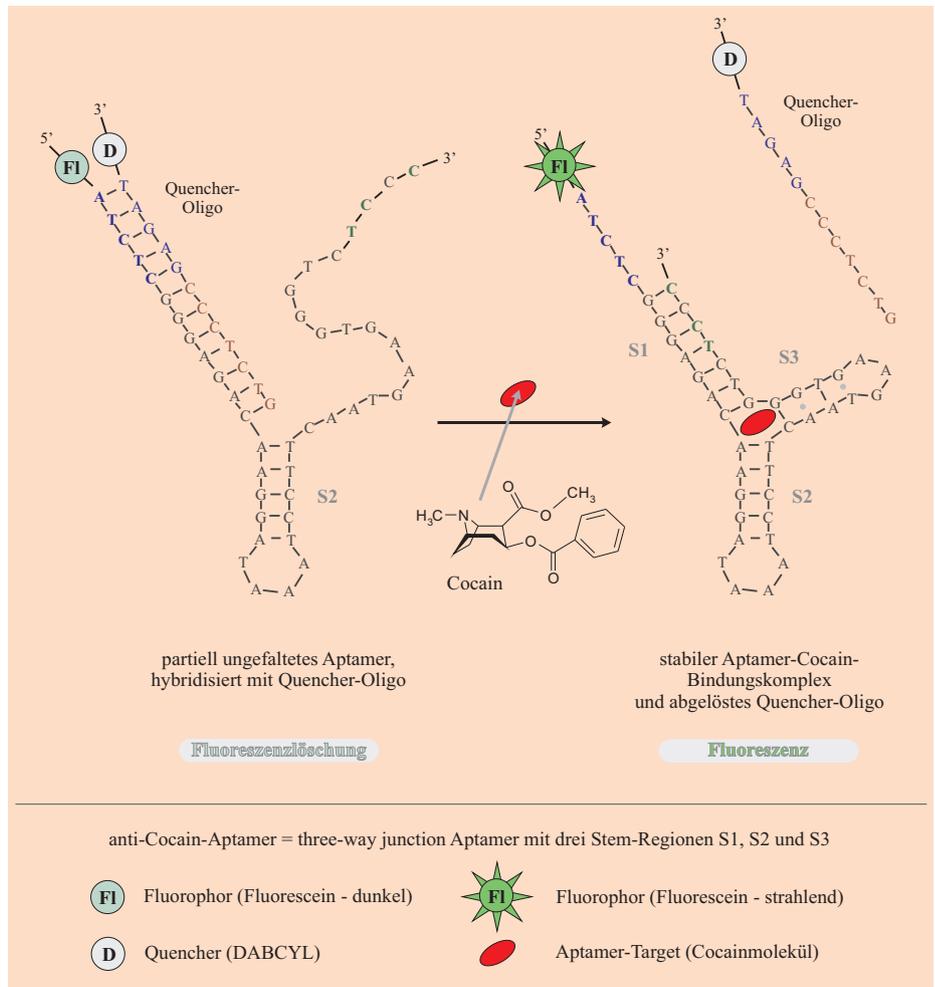


Abb. 3: Funktionsweise des FRET-basierten Messassays auf Basis des modifizierten anti-Kokain-Aptamers und des Quencher-Oligonukleotids (intermolekulares Beacon-Aptamer)

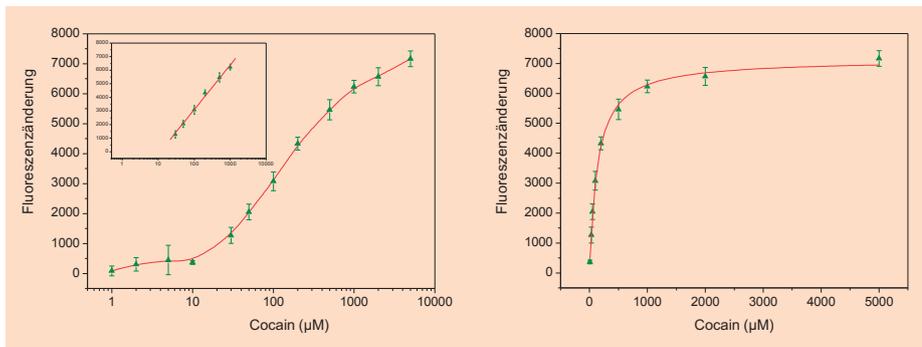


Abb. 4: Fluoreszenz-basierter Messassay mit anti-Kokain-Aptamer als Erkennungselement; Nachweisprinzip FRET (Fluorophor/Quencher, intermolekulares Beacon). Darstellung der Fluoreszenzänderung als Differenz zwischen den gemessenen Fluoreszenzwerten aus den Messansätzen mit Zugabe von Kokain und dem Messansatz ohne Kokain

dem Quencher-Oligonukleotid. Fluorophor und Quencher nähern sich einander so stark an, dass es zu einer Energieübertragung vom angeregten Fluorophor auf das Quencher-molekül kommt. Diese führt zur Fluoreszenzlöschung. Die Fluoreszenzintensität im Messansatz erreicht unter diesen Bedingungen ein Minimum. In Anwesenheit von Kokain faltet sich dagegen das Aptamer in die typische „three-way junction“-Struktur, und es kommt zur Ausbildung des stabilen Bindungskomplexes. Das Quencher-Oligonukleotid wird – abhängig von der Kokainkonzentration – aus der Bindung an das Aptamer verdrängt. Mit steigender Kokainkonzentration nimmt dadurch die Fluoreszenzintensität im Messansatz zu.

Dass dieser Konzeptassay funktioniert, konnte in mehreren Bindungsversuchen mit verschiedenen Kokainkonzentrationen für einen Konzentrationsbereich von 0 bis 5.000 µM Kokain gezeigt werden (Abb. 4).

Die Nachweisgrenze für Kokain betrug in diesem Assay 10 µM, der lineare Messbereich erstreckte sich bis 1.000 µM Kokain. Eine nicht-lineare Regressionsanalyse der Bindungsdaten diente der Ermittlung des K_D -Werts (134,4 µM \pm 7,2) als Maß für die Affinität des Aptamers zum Kokain.

Aptamere wurden als biologische Rezeptoren mit Biosensoren verschiedenster Funktionsprinzipien gekoppelt, zum Beispiel mit elektrochemischen, optischen oder massensensitiven Sensoren. Aufgrund der einfachen Modifizierbarkeit der Aptamersequenzen bieten sich viele Möglichkeiten für ihre Immobilisierung. Ihre, verglichen mit Antikörpern oder Enzymen, kleine Größe erlaubt eine hohe Beladungsdichte der Sensor-Oberflächen. Oft werden die Biosensor-Prinzipien zunächst mit bereits bekannten Aptameren, wie etwa dem anti-Thrombin-Aptamer¹⁷ getestet¹⁸. Für die Entwicklung von Aptamer-Biosensoren mit Marktrelevanz besteht ein Bedarf an spezifischen Aptameren, deren Entwicklung wir weiter vorantreiben werden.



LABORWELT

Literatur

- [1] Klussmann, S., *The Aptamer Handbook. Functional Oligonucleotides and Their Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany 2006.
- [2] Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., *Biomol Eng* 24 (2007), 381-403.
- [3] Tuerk, C., Gold, L., *Science* 249 (1990), 505-510.
- [4] Ellington, A.D., Szostak, J.W., *Nature* 346 (1990), 818-822.
- [5] Stoltenburg, R., Reinemann, C., Strehlitz, B., *Anal Bioanal Chem* 383 (2005), 83-91.
- [6] Niazi, J.H., Lee, S.J., Gu, M.B., *Bioorg Med Chem* 16 (2008), 7245-7253.
- [7] Niazi, J.H., Lee, S.J., Kim, Y.S., Gu, M.B., *Bioorg Med Chem* 16 (2008), 1254-1261.
- [8] Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R., Strehlitz, B., *Biochem Biophys Res Co* 338 (2005), 1928-1934.
- [9] Reinemann, C., Stoltenburg, R., Strehlitz, B., *Anal Chem* 81 (2009), 3973-3978.
- [10] Müller, A., Lehmann, I., Seiffart, A., Diez, U., Wetzig, H., Borte, M., Herbarth, O., *Int J Hyg Environ Health* 204 (2002), 363-365.
- [11] <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,383687,00.html>
- [12] Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., Fanelli, R., *Environmental Health: A Global Access Science Source* 4:14 (2005).
- [13] Stojanovic, M.N., de Prada, P., Landry, D.W., *J Am Chem Soc* 122 (2000), 11547-11548.
- [14] Stojanovic, M.N., de Prada, P., Landry, D.W., *J Am Chem Soc* 123 (2001), 4928-4931.
- [15] Stojanovic, M.N., Landry, D.W., *J Am Chem Soc* 124 (2002), 9678-9679.
- [16] Liu, J.W., Lu, Y., *Angew Chem Int Ed* 45 (2006), 90-94.
- [17] Bock, L.C., Griffin, L.C., Latham, J.A., Vermaas, E.H., Toole, J.J., *Nature* 355 (1992) 564-566.
- [18] Strehlitz, B., Nikolaus, N., Stoltenburg, R., *Sensors* 8 (2008) 4296-4307.

Danksagung

Die Erarbeitung der Ergebnisse wurde durch Projektförderungen des SLUG, der AiF und des BMBF unterstützt.

Korrespondenzadresse

Dr. Beate Strehlitz
Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung
GmbH – UFZ
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Tel.: +49-(0)341-235-1764
Fax: +49-(0)341-235-451764
beate.strehlitz@ufz.de

Suchen Sie einen neuen Partner für DNA- und RNA-Synthesen?



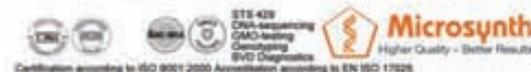
- Microsynth bietet Ihnen zuverlässig ein umfangreiches Angebot mit schnellen Lieferzeiten zu fairen Preisen!
- Als ein führendes ISO-zertifiziertes Schweizer Unternehmen für Oligonucleotid-Synthesen bietet Microsynth seit 1989 hohe Qualität.

Kontaktieren Sie uns auf der



oder per oligo.support@microsynth.ch und fordern Sie Ihr individuelles Angebot an für z.B.

- Dual-labelled Fluorescent Probes mit Design-Service,
- siRNAs inkl. Design-Service,
- lange Oligonucleotide bis 125 Basen inkl. PAGE-Aufreinigung,
- oder Oligonucleotide für HT-Projekte im Plattenformat.



Microsynth AG • Schützenstr. 15,
CH-9436 Balgach
Tel: +41 71 722 83 33 • www.microsynth.ch

Bioinformatische Tools zur ultraschnellen Genominterpretation

Jessica Schneider, Jochen Blom, Dr. Frank-Jörg Vorhölter und Dr. Alexander Goesmann, Computational Genomics Group, Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld; Proteom- und Metabolom-Forschung, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld

Moderne Sequenzierverfahren erlauben die Entschlüsselung bakterieller Genome in immer kürzerer Zeit. Heutzutage werden nicht nur einzelne Stämme einer Spezies sequenziert, sondern oft mehrere nah verwandte Vertreter. Die dabei entstehenden Genomdaten gestatten vergleichende Analysen, die Rückschlüsse auf die jeweilige Lebensweise oder phänotypische Merkmale erlauben. Zur Realisierung einer schnellen und weitestgehend automatisierten Auswertung sind eine umfangreiche Hardware-Ausstattung und bioinformatische Software-Tools unabdingbar, wie sie am Zentrum für Biotechnologie in Bielefeld etabliert sind. Eine Vielzahl bioinformatischer Methoden zur Genominterpretation steht zur Verfügung, die hier am Beispiel ausgewählter *Xanthomonas*-Spezies vorgestellt werden.

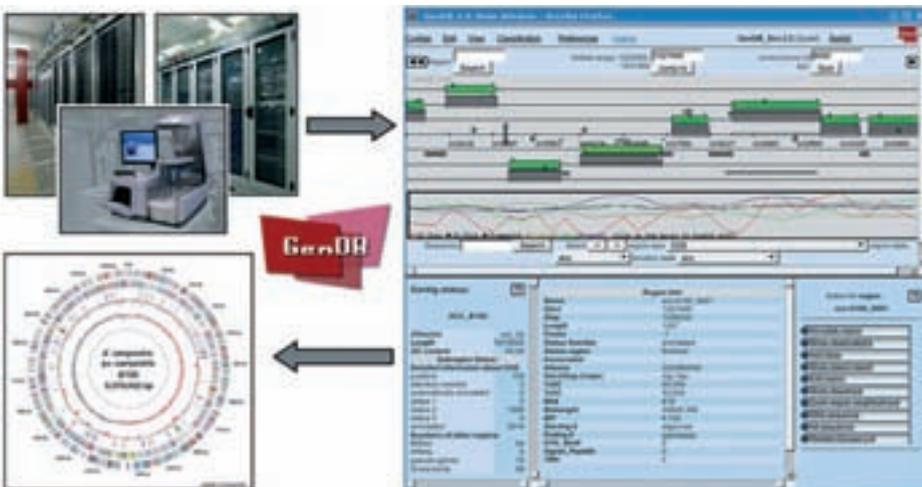


Abb 1: Nach der Sequenzierung werden die entstandenen Sequenzdaten assembliert. Konsensussequenzen der sequenzierten Basen werden in Form von Contigs erstellt, die nachfolgend in GenDB importiert und automatisch annotiert werden. Als Ergebnis werden kodierende Regionen und ihre Funktionen vorhergesagt. Eine übliche Visualisierung ist der zirkuläre Genom-Plot.

Die Entschlüsselung der genetischen Information verschiedener Bakterienstämme kann durch die Fortschritte der Hochdurchsatz-Sequenzierung innerhalb weniger Tage erreicht werden. Für die anschließende bioinformatische Bearbeitung der Sequenzdaten und die automatische Genom-Annotation ist die Verfügbarkeit von geeigneter Software und Hardware von großer Bedeutung. Seit nunmehr 10 Jahren sind am Bielefelder Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) auf allen Gebieten der „omics“-Technologien umfangreiche Softwareplattformen entwickelt worden. Dabei entstand zur automatisierten Analyse von prokaryotischen Genomen das Annotationssystem GenDB¹. Mit Hilfe die-

ses Systems können zum Beispiel bei einem *Xanthomonas*-Genom die Gene innerhalb weniger Stunden identifiziert werden, wobei ihnen – wenn möglich – eine Funktion zugeordnet wird. Wenn ein Gen für ein Enzym kodiert, wird automatisch eine EC-Nummer vorgeschlagen. Die dazu nötige Rechenleistung wird über ein Rechencluster mit etwa 1500 Rechenkernen zur Verfügung gestellt. Im Anschluss an die automatische Annotation kann ein Benutzer über die grafische Benutzeroberfläche von GenDB auf die Daten zugreifen. Ein Element dieser Benutzeroberfläche ist der Contigview (Abb. 1), der dem Benutzer ermöglicht, entlang der kompletten Genomsequenz zu navigieren. Dabei ist er

zu einem bestimmten Zeitpunkt auf den jeweils gewählten DNA-Abschnitt und die darauf liegenden Gene fokussiert. Trotz ihrer räumlichen Nähe im Genom katalysieren benachbarte Gene aber oft verschiedenste Reaktionen, die unterschiedlichen Stoffwechselwegen angehören. Um einen Überblick über die metabolischen Fähigkeiten eines Organismus zu erlangen, bietet sich daher eine automatisierte Stoffwechselrekonstruktion an, die auf der Gesamtheit aller kodierenden Regionen beruht.

Neue Sichtweisen durch in silico-Stoffwechselrekonstruktion

Um diese Stoffwechselrekonstruktion zu unterstützen ist das Programm CARMEN (<http://carmen.cebitec.uni-bielefeld.de>) entwickelt worden. Als Rekonstruktionsgrundlage können verschiedene Eingabeformate genutzt werden. Zum einen können dies SBML-Modelle (Systems Biology Markup Language) sein. Zum anderen kann auf die KGML-Dateien (KEGG Markup Language) zurückgegriffen werden, die Stoffwechselwege aus der KEGG-Datenbank² repräsentieren. Aus diesen Dateien werden Informationen zu Reaktionen, Substraten, Produkten und Enzymen gefiltert und abgespeichert, ebenso wie Positionsangaben zur grafischen Darstellung der einzelnen Moleküle. Nach dem Einlesen der externen Daten können in Kombination mit den EC-Nummern annotierter Gene Organismus-spezifische Abbildungen ausgewählter Stoffwechselwege erstellt werden. Abschließend werden diese Daten im standardisierten SBML-Format abgespeichert. Die Nutzung dieses XML-basierten Austauschformates ermöglicht die Visualisierung, Bearbeitung und Modellierung von Stoffwechselwegen unter Verwendung geeigneter SBML-Editoren beziehungsweise Simulationsprogramme. Durch die Automatisierung dieses Prozesses mit CARMEN wird die aufwändige manuelle Stoffwechselrekonstruktion, die je nach Umfang mehrere Tage in Anspruch nehmen kann, auf wenige Minuten reduziert.

Ein Pflanzenpathogen als Xanthan-Produzent

CARMEN kann auf alle mit GenDB analysierten Genome angewendet werden, da ein lokaler Zugriff auf die GenDB-Datenbank implementiert ist. Exemplarisch soll nachfolgend die Stoffwechselrekonstruktion von *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 vorgestellt werden. Gram-negative



Neu: arium® pro Reinstwassergeräte. Maßstab bei Bedienung und Kostenbilanz.

arium® pro, setzt die neuen Maßstäbe bei Bedienkonzept und Kostenbilanz.

Über die innovative Glasbedienoberfläche mit Touch-Funktion und Grafikunterstützung kann der Anwender alle Arbeitsabläufe sehr effizient steuern und ausführen.

Die sehr hohe Kapazität der Aufreinigungs-komponenten ermöglicht lange Wartungsintervalle und niedrige Betriebskosten.

- Alle Betriebsdaten auf einen Blick
- Manuelle, zeitgesteuerte oder volumengesteuerte Entnahme
- Aktivierbarer PIN Code für Grundeinstellungen
- Selbsttätige Verwaltung und Anzeige der Wartungsintervalle, optional individuell konfigurierbar
- Tisch-, Wand- und Einbausystem, Display variabel montierbar
- Schlanke, platzsparendes Design



product
design
award

2010 ■



analytica2010

23.-26. MÄRZ 2010 WISSE WÖRCHEN

Halle A3, Stand 151 | 250

www.sartorius-stedim.com/arium-pro
turning science into solutions

Sartorius Stedim Biotech
USA +1.800.368.7178
Europe +49.551.308.0

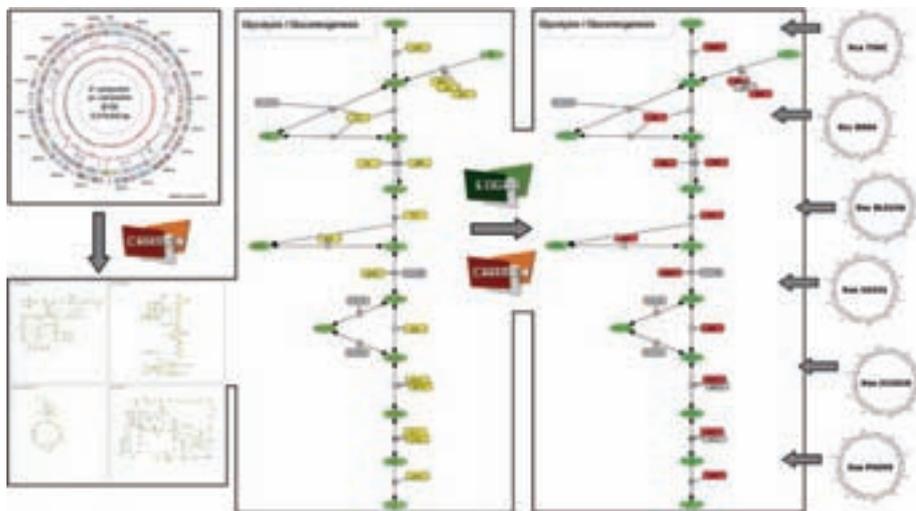


Abb 2: Ablauf einer Stoffwechselrekonstruktion mit CARMEN von *Xanthomonas campestriis pv. campestriis* B100 anhand der in GenDB annotierten Gene. Basierend auf einer manuell kuriierten Rekonstruktion der Glykolyse ist das Kerngenom weiterer sechs *Xanthomonas*-Stämme integriert und nachfolgend mit dem CellDesigner visualisiert worden. Die Kerngenom-Berechnung wurde mit EDGAR durchgeführt.

Bakterien des Genus *Xanthomonas* zählen zu den Pflanzenpathogenen und verursachen große Schäden bei wirtschaftlich bedeutsamen Nutzpflanzen³. Darüber hinaus sind diese Bakterien in der Lage, das Polysaccharid Xanthan zu synthetisieren. Es wird vielseitig in der Industrie angewendet und zählt daher zu den wichtigsten biotechnologisch synthetisierten Polysacchariden⁴. Zur gezielten Untersuchung der Xanthan-Biosynthese und aller damit verbundenen metabolischen Prozesse ist das Genom von *X. campestriis pv. campestriis* B100 sequenziert, assembliert und nachfolgend mit GenDB annotiert worden. Als Ausgangsbasis zur Analyse der Xanthan-relevanten Stoffwechselwege ist die Glykolyse ausgewählt und automatisch mit Hilfe der CARMEN-Software rekonstruiert worden (Abb. 2). Vorangegangene biochemische Analysen haben gezeigt, dass *X. campestriis pv. campestriis* importierte Glukose über den Entner-Doudoroff-Weg und den Pentosephosphat-Weg verstoffwechselt. Zeitgleich konnte keine Aktivität der Phosphoglukokinase gezeigt werden, einem Schlüsselenzym der Glykolyse. Bei der aktuellen Genomanalyse von *X. campestriis pv. campestriis* B100 konnte jedoch die Präsenz eines Phosphofruktokinase-Gens gezeigt werden⁵. Auch das rekonstruierte SBML-Modell zeigt einen vollständigen Stoffwechselweg, der alle Schlüsselenzyme der Glykolyse enthält (Abb. 2).

Der entstandene Stoffwechselweg ist im Anschluss mit dem SBML-Editor CellDesigner⁶ bearbeitet worden. So können aus einer Datenbank übernommene Fehler behoben und das Modell manuell verifiziert werden. Die so entstandenen Modelle eignen sich hervorragend als Referenz-SBML-Datei für CARMEN. Auf diese Weise können

die Annotationsdaten eines weiteren neu sequenzierten Organismus auf kuriierte Stoffwechselwege übertragen werden. Dies geschieht basierend auf den bidirektional besten BLAST-Treffern zweier Organismen. Dieses Vorgehen ist insbesondere bei nah verwandten Spezies von großem Nutzen, da ein schnelles Aufdecken metabolischer Besonderheiten gefördert wird. CARMEN ist jedoch nicht auf die Analyse zweier Bakterien beschränkt, es bietet auch die Datenintegration verschiedener Organismen in ein SBML-Modell an. Dies kann anhand zuvor



Abb 3: Kolonien von *Xanthomonas campestriis pv. campestriis* auf einem Agar-Medium. Erkennbar ist eine Mischung großer und kleiner Kolonien. Die großen Kolonien produzieren das Polysaccharid Xanthan und exportieren es in ihre Umgebung.

berechneter Gen-Sätze mit bestimmten Eigenschaften realisiert werden.

Komparative Genomik kombiniert mit Stoffwechselrekonstruktion

Um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies zu analysieren, wurde in Bielefeld die EDGAR-Software entwickelt⁷. Dabei wurden zunächst insgesamt 640 bereits veröffentlichte bakterielle Genomsequenzen in 79 Gattungsgruppen eingeteilt und für jeden Teildatensatz entsprechende Genomvergleiche vorberechnet. Über die benutzerfreundliche und frei zugängliche Weboberfläche kann der Benutzer komparative Analysen durchführen. Orthologe Gene können in ihrem genomischen Kontext visualisiert und Organismus-spezifische und gemeinsame Gene für eine Auswahl von Genomen bestimmt werden. Die Menge der Gene, die alle analysierten Genome gemeinsam haben, wird als Kerngenom bezeichnet. Die dazugehörigen Gene werden in der Weboberfläche in tabellarischer Form angezeigt und können exportiert werden. Die so entstandene Datei kann von CARMEN verwendet werden, um die komparativen Daten auf ein Referenzmodell zu übertragen. Dieses Modell muss jedoch einem Organismus angehören, dessen Gene Teil des berechneten Kerngenoms sind. Das Kerngenom von sieben *Xanthomonas*-Spezies ist auf diese Weise auf die zuvor rekonstruierte Glykolyse von *X. campestriis pv. campestriis* B100 übertragen worden (Abb. 2). Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Gene *gpm2* und *eno2*, die für Isoformen der Phosphoglycerat-Mutase und Phosphopyruvat-Hydratase kodieren, nicht Teil des Kerngenoms sind. Die Isoformen *Gpm1* und *Eno1* sind hingegen in allen sieben Genomen konserviert. Dies führt zu der Annahme, dass die Gene *gpm1* und *eno1* essentiell für die Katalyse der jeweiligen Glykolyse-Reaktion sind.

Literatur

- [1] Meyer, F., *Nucleic Acids Res* (2003), 31:2187-2195.
- [2] Ogata, H., *Nucleic Acids Res* (1999), 27:29-34.
- [3] Swings, J., London:Chapman and Hall, 1st edition (1993).
- [4] Seisun, D., Aqua Sur - 3rd international conference on aquaculture, Puerto Varas, Chile (2006).
- [5] Vorhölter, F. et al., *J. Biotechnol.* (2008), 134:33-45.
- [6] Funahashi, A. et al., *BIOSILICO* (2003), 1:159-162.
- [7] Blom, J. et al., *BMC Bioinformatics* (2009), 10:154.

Korrespondenzadresse

Dr. Alexander Goesmann
 Universität Bielefeld
 CeBiTec
 33594 Bielefeld
 Tel.: +49-(0)521-106-4821
 Fax: +49-(0)521-106-6419
 agoesman@CeBiTec.Uni-Bielefeld.DE

Point of care-System zur Probenaufbereitung für den HPV-Nachweis

Dr. Marion Ritzi-Lehnert, Rainer Gransee, Dr. Klaus Stefan Drese,
Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Mainz

Gebärmutterhalskrebs ist mit rund 500.000 Erkrankungen pro Jahr eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Auslöser des Zervixkarzinoms sind 15 Subtypen des humanen Papillom-Virus (HPV). Mit dem Nachweis oder Ausschluss einer HPV-Infektion inklusive der Bestimmung der gefährlichen Subtypen als essentiellen Bestandteil einer gründlichen Krebs-Vorsorge-Untersuchung kann Gebärmutterkrebs frühzeitig erkannt und in den 10% der infizierten Frauen, in denen das Virus dauerhaft persistiert, in einem frühen Stadium therapiert werden. Derzeit werden Abstrichproben in Zentrallaboren analysiert, was mehrere Wochen dauern kann. Um diesen Vorgang zu beschleunigen, wurde ein fluidisches Mikrosystem entwickelt, mit dessen Hilfe eine HPV-Infektion vollautomatisch und vor Ort nachgewiesen werden kann. Dieses Mikrosystem extrahiert die mRNA aus Abstrichproben und erlaubt den Nachweis vorhandener HPV-mRNA. Nach Eingabe der fixierten Probe wird die Aufbereitung für den nachfolgenden Nachweis vollautomatisiert vom Gerät durchgeführt.

Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO sind Krebserkrankungen global die zweithäufigste Todesursache, nur übertroffen von Herz-

Kreislaufkrankungen¹. Gebärmutterhalskrebs ist darunter eine der am meisten verbreiteten Krebsarten². Auslöser der Krankheit sind fast

immer humane Papillom-Viren (HPV)³, weshalb deren Nachweis nach Ansicht der Autoren essentieller Bestandteil einer gründlichen Krebs-Vorsorge-Untersuchung sein sollte. Derzeit werden zum HPV-Nachweis Abstrichproben in Zentrallaboren analysiert, was meist mehrere Wochen dauert. Neue Technologien eröffnen nun die Möglichkeit, die Analyse direkt beim Arzt durchzuführen zu lassen, um sofort mit einer Therapie beginnen zu können.

Neben der ärztlichen Diagnose anhand typischer Hautveränderungen und Gewebeuntersuchungen ist der Nachweis von mRNA eine verlässliche Diagnosemethode, die durch die Etablierung immer neuer Biomarker nicht nur für die frühzeitige Identifizierung von Krebserkrankungen an Bedeutung gewinnt. Die Verwendung von mRNA als Biomarker für den HPV-Nachweis reduziert die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, da im Gegensatz zum DNA-Nachweis nur aktive Viren nachgewiesen werden und dies mit hoher Sensitivität. So können Frauen mit persistierender HPV-Infektion durch den Nachweis der konstitutiven Expression der Tumorgene E6 und E7 bereits in einem frühen Stadium identifiziert und behandelt werden. Aus diesem Grund wurde ein automatisiertes Chip-basiertes System für die Extraktion von mRNA aus Gebärmutterhals-Abstrichen entwickelt, mit dessen Hilfe – vollautomatisch und vor Ort – die Expression von in das Tumorgenom



BioVaria 2010

Europe's Next Top Technologies

20 April 2010, Munich, Germany

// Nowhere else can the biopharmaceutical industry gain such a comprehensive overview of attractive licensing opportunities from publicly funded research: well-selected and professionally presented. // Manfred Horst, Director Scientific Liaison, MSD
Learn more and register at:

www.BioVaria.org



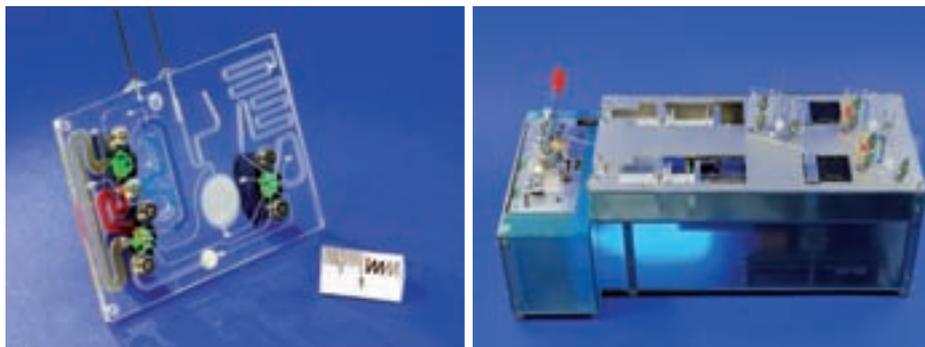


Abb. 1: Links: Probenaufbereitungschip. Rechts: Der Prototyp für die automatisierte Probenaufbereitung zur Extraktion der HPV-mRNA aus Abstrichproben enthält zwei Spritzenpumpen für den Flüssigkeitstransport, Motoren für die Ventilsteuerung, ein Heizelement und die Elektronik, die das Gerät mit Hilfe eines LabView-Programms steuert.

eingebauten HPV-Onkogenen nachgewiesen werden kann.

Das Gesamtsystem besteht aus zwei Modulen: Das erste Modul isoliert die Nukleinsäuren aus Zellabstrichen des Gebärmutterhalses. Das dahinter geschaltete zweite Modul sorgt für die spezifische Vervielfältigung und den Nachweis (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification; NASBA) diverser mRNA-Moleküle, die auf die Krebs-relevanten HPV-Subtypen hinweisen. Die biochemischen Prozesse finden in Einweg-Polymerchips statt. Hierfür wurde ein Standardlaborprotokoll zur DNA/RNA-Aufreinigung in die mikrofluidische Umgebung umgesetzt und entsprechend angepasst. Im Folgenden fokussieren wir uns auf das erste Modul, da die Proben auch direkt im „HPV Proofer“⁴ der Firma Norchip A/S eingesetzt werden können.

Das Verfahren

Abstrichproben werden in 2-5 ml einer methanolhaltigen Fixierungslösung (PreservCyt™) aufgenommen und mit Hilfe einer Spritze in den mikrofluidischen Aufbereitungschip (Abb. 1 A) eingebracht. Die in der Probe enthaltenen Zellen werden mit Hilfe eines Nylonfilters zurückgehalten, während die Flüssigkeit wegtransportiert

wird. Die Zellen werden durch das Einbringen einer chaotropen Hochsalzlösung in die Filterkammer lysiert und das Lysat anschließend zu einer weiteren Filterkammer geführt, die mehrere Lagen Silica-Membranen enthält. Mit Hilfe einer Festphasenextraktion (SPE) wird die RNA auf der Kieselsäure-Matrix festgehalten. Wie bei der konventionellen Booms-Methode⁵ werden mit Hilfe von zwei Waschschrritten unerwünschte Zellbestandteile und das Salz entfernt. Nach einem Trocknungsschritt mit Luft, die über die Filter geströmt wird, um das in den Waschpuffern enthaltene Ethanol zu entfernen, wird die RNA mit Wasser von den Filtern eluiert.

Um nutzerabhängige Einflüsse möglichst vollständig zu eliminieren, werden alle benötigten Flüssigkeiten im Chip gelagert. So werden eine hohe Reproduzierbarkeit erzielt, mögliche Fehlerquellen und auch die Gefahr der Kontamination der Probe sowie des Nutzers minimiert. Sämtliche Flüssigkeiten werden mit Hilfe von zwei Spritzenpumpen transportiert (Abb. 1B). Die erste Spritze enthält die Probe und wird vom Nutzer in das Gerät eingelegt. Da diese Spritze durch die Probe kontaminiert ist, wird sie nach der Analyse entsorgt. Die zweite Spritze ist im Gerät integriert und transportiert mittels Luftdruck alle Flüssigkeiten und die Trocknungsluft im Chip. Da der Transport der Flüssigkeiten durch

das System durch Druck getrieben ist und diese Spritze nicht mit den Flüssigkeiten in Berührung kommt, kann sie wiederverwendet werden. Auf dem Chip befinden sich drei integrierte Drehventile, die zum Einen für die Lagerung der Flüssigkeiten notwendig sind, zum Anderen aber auch dafür sorgen, dass die Flüssigkeiten zum richtigen Zeitpunkt zum richtigen Ort gelangen. Eine zusätzliche Lichtschranke zeigt an, wann die RNA-Lösung am Ausgang ankommt.

Um die Effizienz von Lyse- und Trocknungsschritt zu erhöhen und die benötigte Zeit zu minimieren, werden diese beiden Schritte durch Temperaturerhöhung unterstützt. Hierfür wurden entsprechende Heizelemente in das Gerät integriert. Da die Verwendung von Filtern mit partikelbehafteten Proben die Gefahr eines erhöhten Druckaufbaus birgt, wurde das System zusätzlich mit einem Drucksensor ausgestattet, der eine zu hohe Druckbeaufschlagung des Filters beim Probenauftrag verhindert.

Der entwickelte Prototyp zur Probenaufbereitung wurde erfolgreich mit verschiedenen HPV-infizierten humanen Zellen getestet (Tab. 1). Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von 5 bis 50.000 Zellen in 3 ml PreservCyt™ fixiert und die RNA über den Aufreinigungschip isoliert. Die RNA wurde dann mit Hilfe einer NASBA-Reaktion (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) unter Verwendung des PreTect HPV-Proofer-Kits (NorChip A/S) nachgewiesen (Abb. 2). Die Amplifizierung wurde mit unverdünntem Eluat durchgeführt. Die Kurven zeigen den charakteristischen steilen Anstieg im Fluoreszenzsignal mit abschließender Sättigung einer erfolgreichen NASBA-Reaktion. Die untere Grenze der dabei noch nachweisbaren Zellanzahl liegt bei nur fünf infizierten Zellen.

Um zu zeigen, dass das System nicht nur HPV-infizierte Zellkulturzellen aufarbeiten, sondern tatsächlich HPV-mRNA aus klinischen Abstrichproben nachweisen kann, wurden verschiedene, bereits HPV16-positiv getestete Proben mit dem System untersucht. Diese realen Proben sind deutlich schwieriger zu untersuchen als Zellkulturen, da sie aufgrund verschiedener Zusammensetzungen aus Zellen, Schleim und Blut unterschiedliche Viskositäten aufweisen. Um einen starken Druckanstieg zu verhindern, muss der Probeneintrag in den Chip daher diskontinuierlich erfolgen. Die Probe wurde dazu in kleinen Portionen eingebracht, zwischen denen die Spritzenpumpe rückwärts pumpt, um den Druck vom Filter zu nehmen. So konnten auch die realen Proben aufgearbeitet und die RNA aufgereinigt werden. Auch hier wurden die typischen Fluoreszenzsignale erhalten und alle Proben entsprechend der Standardmethode positiv analysiert⁸. Unter Verwendung der Software PreTect HPV Proofer konnten alle positiv gewerteten Proben einer Identifizierung mit HPV16 zugeordnet werden. Diese Experimente zeigen, dass mit Hilfe des entwickelten automatisierten Systems genügend HPV-mRNA aus klinischen Proben isoliert werden kann, um eine anschließende Analyse durchführen zu können.

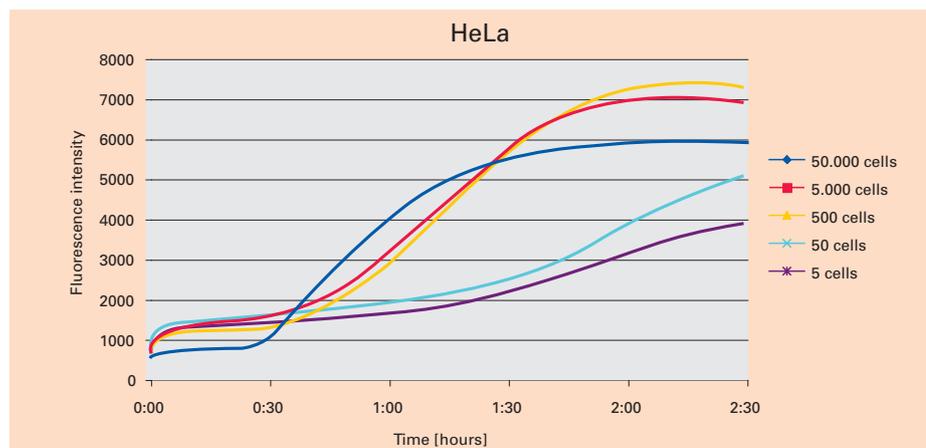


Abb. 2: Vervielfältigung der im Chip isolierten HPV-mRNA aus HeLa-Zellen mit Hilfe der NASBA-Reaktion

Tab 1: HPV-mRNA-Extraktionsversuche mit 5 bis 50.000 Zellen verschiedenen humanen Zell-Linien

Zelllinie/Zellen	CaSki - HPV16	MS751 - HPV45	HeLa - HPV18
50.000	positiv	positiv	positiv
5.000	positiv	positiv	positiv
500	positiv	positiv	positiv
50	positiv	positiv	positiv
5	positiv	negativ	positiv

Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde ein Lab-on-a-Chip-System entwickelt, das vollautomatisch RNA aus Abstrichproben vom Gebärmutterhals isoliert. Alle notwendigen Schritte von der Zellaufreinigung über die Zellyse bis zur Isolierung der RNA mit Hilfe einer Festphasenextraktion werden in einem Einweg-Polymerchip durchgeführt. Der gesamte Prozess wird dabei über ein Gerät kontrolliert, in das die Probespritze und der Chip eingelegt werden. Alle benötigten Reagenzien sind bereits im Chip enthalten. Die Funktionalität des Systems wurde mit HPV-infizierten Zelllinien und mit realen Abstrichproben gezeigt.

Das Probenaufbereitungsgerät soll mit einem zweiten Gerät kombiniert werden, das ebenfalls automatisiert die NASBA-Reaktion und den Nachweis verschiedener HPV-Subtypen auf einem Mikrochip durchführt^{6,7}. Dieses kombinierte System kann dann vor Ort für den Nachweis von Genexpressionsmustern eingesetzt werden, zum Beispiel direkt in der Arztpraxis, wodurch eine zeitnahe Diagnose gewährleistet ist. Aber nicht nur Abstrichproben können mit dem Gerät untersucht werden. Durch geringfügige Modifikationen lassen sich Nucleinsäuren auch aus anderen Proben aufarbeiten und eine entsprechende Analyse anschließen. So ist das System nicht auf die hier verwendete Kieselgel-Matrix oder den verwendeten RNA-Aufreinigungs-kit beschränkt, sondern kann mit den verschiedensten Materialien und Reagenzien auch für andere Applikationen verwendet werden, in denen komplexe biologische Proben aufgeschlossen werden müssen und ein schnelles Analyseergebnis gewünscht wird. Auch können andere Amplifikationsmethoden als die NASBA, wie etwa RT-PCR, an das Aufbereitungssystem angeschlossen werden. Anwendungen gibt es etwa in der Nahrungs- und Futtermittel-Analyse, der personalisierten Medizin und anderen Point-of-Care-Diagnostiken sowie der Forensik.

Literatur

- [1] World Health Organization, „Fact sheet No. 297: Cancer“, (2006)
- [2] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P., Int. J. Cancer, 94, 2, 153-156 (2001).
- [3] Walboomers, J. M. M., et al., J. Pathol., 189, 12-19, (1999).
- [4] Tor Moldena, Irene Kraus, Hanne Skomedal, Trine Nordström, Frank Karlse, J. Virolog. Methods 142. 204-212 (2007).
- [5] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. J Clin Microbiol. 1990 Mar; 28(3):495-503
- [6] Gulliksen, et al., Lab Chip, 2005, 5, 416-420
- [7] Furuberg, L., et al., Microsyst. Technol. (2008) 14:673-681.
- [8] Baier, T., et al., Lab Chip, 2009, 9, 3399-3405

Diese Arbeiten wurden teilweise im 6. Rahmenprogramm der EU gefördert: MICROACTIVE (IST-NMT-CT-2005-017319) Projektpartner: Coombe Womens' hospital (Ireland), SINTEF (Norway), IMTEK (Germany), BioFluidix (Germany), NorChip (Norwegen)

Korrespondenzadresse

Dr. Marion Ritzi-Lehnert
 Institut für Mikrotechnik Mainz – Abteilung Fluidik und Simulation
 Carl-Zeiss-Straße 18-20, 55129 Mainz
 Tel./Fax: +49-(0)6131-990-399 / -205
 ritzi@imm-mainz.de

Seit über 25 Jahren Ihr Spezialist für das Zell- und Gewebekulturlabor, die Mikrobiologie und die Molekularbiologie

Unsere Kompaktlösung für Ihre Zellkultur:

Seren/Plasmen (Human/Tier),
 Blutbestandteile und -produkte

Proteine, Antikörper

Substrate und Reagenzien



Bellco Biotechnologie:

- Anaerobe Kultursysteme
- Fermenter
- Fernbach- und Schüttelkolben
- Homogenisatoren
- Kodierte Deckgläschen
- Magnetrührer und Spinner Flasks
- Pipettenstopfgeräte
- Rollersysteme
- Rührwerke
- und vieles mehr.....



Der **CellMaker Regular™** ist ein Bioreaktor mit Einweg-Zellkulturbeutel für Bioprosesse und Fermentation.

- Schnell und einfach zu benutzen
- Kompakt mit kleiner Arbeitsfläche
- 1-8 und 10-50 Liter Zellkulturbeutel
- Temperaturbereich 15 °C - 45 °C
- Programmierbare Kontrolleinheit mit Touch Screen



Dunn Labortechnik GmbH

Thelenberg 6 • 53567 Asbach
 Tel.: 0 26 83 / 4 30 94 • Fax: 0 26 83 / 4 27 76
 e-mail: info@dunnlab.de • Internet: www.dunnlab.de



Die Vorzüge eines MiniVap™

Selbstverständlich würden Sie keinen Haartrockner verwenden, um chromatographische Proben in einer einzelnen Mikrotestplatte zu verdampfen. Sie haben wahrscheinlich aber auch keine Lust Schlange zu stehen, um einen großen Evaporator in Ihrer Abteilung für denselben Zweck zu benutzen. In diesem Fall brauchen Sie einen Porvair MiniVap. Das Gerät ist klein, schnell, flexibel und beeinträchtigt Ihre Proben nicht. Weitere Information finden Sie unter www.microplates.com/downloads.php



Telephone: 0 26 83 / 4 30 94
 Email: info@dunnlab.de
www.microplates.com



Analyse der Transkriptom- und Splicing-Dynamik während der Neurogenese

Burkhard Ziebolz, Roche Applied Science GmbH, Penzberg

Die Erfassung ganzer Transkriptome mit Hilfe des Next Generation Sequencing hat die Untersuchung der Genexpression revolutioniert. Mit einer erweiterten RNA-Seq-Methode haben Wissenschaftler um Michael Snyder (Stanford University) jetzt Veränderungen der Transkriptome von humanen embryonalen Stammzellen während ihrer Entwicklung zu Nervenzellen verfolgt und Erstaunliches gefunden. Während die Zahl der durch differentielles Spleißen entstandenen verschiedenen Transkripte („RNA-Isoformen“) in den Stammzellen am größten war, nahm sie mit zunehmender neuraler Differenzierung ab – ein Phänomen, das die Wissenschaftler als Isoform-Spezialisierung bezeichnen. Die quantitative Analyse der verschiedenen Spleißvarianten mit bislang nicht erreichter Sensitivität und Genauigkeit gelang Snyder et al. durch Einbeziehen des long-read-Sequencings. Die längeren Reads des Genome Sequencer FLX Systems (Roche Applied Science) ermöglichten die mit alleiniger Verwendung der Short-Read-Technologie nicht mögliche Ableitung der Anordnung nicht-aneinanderhängender und multipler Exons innerhalb eines Transkripts. Mit der Kombination von single-read-, paired-end-read- und long-read-RNA-Sequenzierung analysierten die Forscher die Transkriptome und Spleißdynamik in embryonalen Stammzellen sowie zu drei Zeitpunkten (N1-N3) der neuralen Entwicklung – zu Beginn der Differenzierung („early initiation“, N1), in Vorläuferzellen („neural progenitors“, N2) und in jungen Gliazellen („early glia cells“, N3). Dabei identifizierten sie bisher nicht annotierte Transkripte und RNA-Isoformen, die spezifisch für die einzelnen Entwicklungsstadien sind. Die Expressions-Unterschiede von Transkripten wichtiger Signalwege und Rezeptorproteine eröffnen neue Einblicke in die neurale Entwicklung von Zellen.

Die Festlegung der Entwicklungsrichtung und Entwicklung undifferenzierter Zellen zu Neuronen ist ein komplexer Prozess. Ihr Verständnis verspricht, zu einer verbesserten Arzneimitteltherapie neurodegenerativer Erkrankungen beizutragen. Gleichwohl fehlt bislang eine umfassende Analyse der Gene und RNA-Isoformen, die während der diversen Stadien der Entwicklung zu Nervenzellen exprimiert werden. Ein Grund dafür ist, dass der bisherige Erkenntnisgewinn über die Entwicklung einzelner Zelltypen dadurch erschwert war, dass die aus Tiermodellen gewonnenen Zelltypen nicht synchronisiert und daher heterogen hinsichtlich ihres Entwicklungsstadiums sowie nur in kleinen Mengen verfügbar waren. Ein Ausweg bietet die Untersuchung der Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen (hES-Zellen) zu Neuronen, die mit vergleichsweise hohen Zellzahlen durchgeführt werden kann.

RNA-Sequenzierung

Die Entwicklung der massiv parallelen Sequenzierung von RNA ermöglicht es, die transkribierten Regionen umfassend zu kartieren und RNA-Isoformen sehr genau und empfindlich quantitativ zu analysieren. Obgleich die auf kurzen Leseweiten basierende Technologie die Detektion transkribierter

Bereiche und aneinanderhängender Exons ermöglicht, gibt es doch wichtige Limitationen, insbesondere hinsichtlich der Ableitung nicht-zusammenhängender Exons und mehrerer Exons innerhalb desselben Transkripts. In der



Abb. 1: Das Genome Sequencer FLX System (Roche Applied Science; Penzberg)

hier beschriebenen Studie wurden deshalb die Stärken der Short-Read- (35 Bp paired-end reads, Illumina) sowie der Long-Read Technologie (450 Bp Roche 454 GS FLX Titanium Reads) kombiniert, um Transkript-Strukturen und die Komplexität des Transkriptoms in neuronalen Entwicklungsstadien mit bisher unbekannter Präzision zu analysieren.

Charakterisierung verschiedener Entwicklungsstadien

Zur Untersuchung der frühen Entwicklung humaner Neuronen aus humanen embryonalen Stammzellen (Zelllinie H1, Univ. Wisconsin, Madison) wurden zwei Strategien auf Basis von Standardprotokollen¹ verfolgt:

- die Differenzierung von hES-Zellen in Feederzell-freier, chemisch definierter adhärenter Zellkultur über ein Frühstadium N1, neurale Progenitoren (N2) zu Gliazellen (N3).
- die Isolierung neuraler Vorläuferzellen (N2) aus Embryokörperchen (embryoid bodies), die aus hES-Zellen differenziert worden waren.

Die abgeleiteten Zellpopulationen zeigten mit hoher Reproduzierbarkeit eine große Homogenität in den diversen Entwicklungsstadien: hES-Zellen exprimierten in beiden Ansätzen sämtliche charakteristischen Stammzellmarker und Transkriptionsfaktoren, wie Immunoassays und FACS-Analysen zeigten¹.

- Neuronen, am Beginn der Entwicklung (Stadium N1) zeigten keine Tra-1-160/81-Expression mehr, bildeten weniger SSEA4 sowie Oct4 und begannen mit der SSEA1-Expression.
- N2-Nervenprogenitoren mit der typischen bipolaren Morphologie hatten die Oct4- und SSEA4-Expression komplett eingestellt, bildeten aber noch die Stammzellmarker PAX6 und SOX1 sowie den Neuroepithel-Marker Nestin. Nach Entzug von Wachstumsfaktoren entwickelten sich die Zellen hauptsächlich zu Neuronen. Auch mit dem zweiten Differenzierungsprotokoll abgeleitete Neuronen exprimierten PAX6, SOX1 und Nestin und waren negativ für den Pluripotenzmarker Oct4.
- N3-Stadien zeigten eine charakteristische Morphologie und exprimierten das Gliazell-spezifische Protein GFAP.

Integration von langen Leseweiten in die RNA-Seq-Analyse

Um die Transkription in Zellen der beschriebenen Differenzierungsstadien zu charakterisieren, wurde eine Kombination von 35-bp single reads, 35-bp paired-end reads und 250–450-bp long reads genutzt. Dabei wurde die Hauptinformation aus den kurzen single reads gewonnen. Wichtige Details, wie die Exon-Konnektivität sowie die Charakterisie-



European Biotechnology

NETWORK

Join the European Biotechnology Network!

The European Biotechnology Network is dedicated to facilitating co-operation between professionals in biotechnology and the life sciences all over Europe. The network is run by the European Biotechnology Foundation, a non-profit organisation based in Brussels. Do you want to know more about the advantages of a (free) membership? Just have a look at our website: www.european-biotechnology.net

European Biotechnology Foundation | Square Ambiorix 13 | B-1000 Bruxelles, Belgique
Tel: +32 2 79 17 003 | Fax +32 2 79 17 004

info@european-biotechnology.org | www.european-biotechnology.net

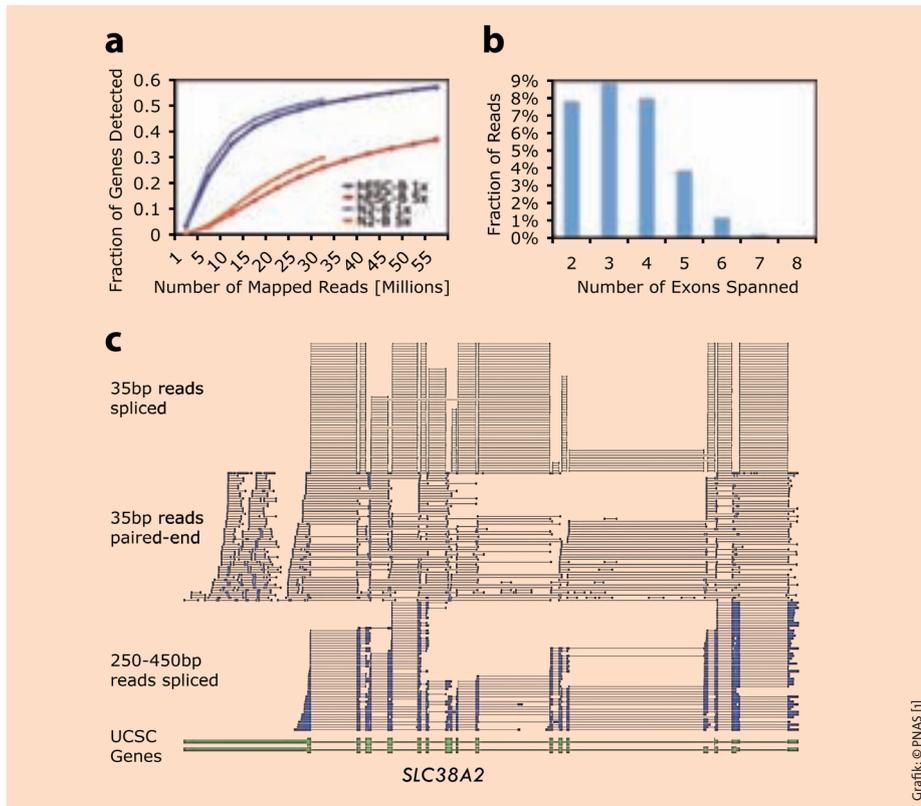


Abb. 2: Transkript-Charakterisierung mit Hilfe der erweiterten RNA-Seq. **A.** Zahl der entdeckten Exons in Abhängigkeit der Lesetiefe. **B.** Zahl der Exons, die mittels langer 450 Bp-Reads, erfasst wurden. **C.** Transkript-Komplexität, die durch Kombination der Sequenzier-Technologien erreicht wurde. Gezeigt sind die Splice-Reads für single end- und long Reads.

zung komplexer Splice-Isoformen wurden aber erst mit Hilfe der long-read-Sequenzierung möglich, die durch paired-end Reads komplementiert wurden. Durch die langen Leseweiten von 450-bp-Reads war es möglich, die Verbindung von bis zu acht Exons zu analysieren (siehe Abb. 2B). Die Kombination der Sequenzierungstechnologien ermöglichte sogar die Rekonstruktion von Genen, die aus bis zu 16 Exons bestanden.

Zudem lieferte die RNA-Seq-Analyse verglichen mit Tiling-Array-gestützten Transkriptionsanalysen wesentlich mehr unbekannt transkriptionsaktive Regionen („TARs“). Als spezifisch für das Entwicklungsstadium „hES“ wurden 624 bisher nicht annotierte TARs identifiziert. Für die Entwicklungsstadien N1, N2 und N3 zeigten sich 246, 300 und 353 einzigartige TARs, die möglicherweise stadienspezifische Funktionen ausüben.

Integration von langen Leseweiten in die RNA-Seq-Analyse

Zusätzlich zur zelltypspezifischen Genexpression identifizierten Snyder et al. zahlreiche durch alternatives Splicing entstandene Isoformen, die charakteristisch in spezifischen Entwicklungsstadien gebildet wurden. Um die bisher noch nie untersuchte Verände-

rung der Spleiß-Isoformen in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums zu analysieren, wurde die Zahl einzigartiger Spleißstellen für jedes Genmodell der einzelnen Differenzierungsstadien quantifiziert. Um die Diversität der Spleißstellen zu untersuchen, wählten Snyder et al. anschließend die in den vier Entwicklungsstadien 500 am stärksten transkribierten Gene aus, da für diese eine genügend große Zahl an Reads vorlag, um die Identifikation von Unterschieden im Splicing zu gestatten. Die Analyse offenbarte eine größere Isoform-Diversität in humanen embryonalen Stammzellen als in den neuronalen Entwicklungsstadien N1, N2 und N3. Der Median der Junctions betrug für hES-Zellen 3,1, während er für N1 bei 2,2, für N2 bei 1,9 und für N3 bei 2,1 lag. Diese Daten legen nahe, dass die Diversität an Isoformen während der Differenzierung abnimmt – ein Prozess, den die Autoren als Isoform-Spezialisierung bezeichnen.

Differentielle Expression distinkter Genklassen während der Neurogenese

Zusätzliche Gen-Ontologie-Analysen ergaben, dass Transkripte, die in die Entwicklung des Nervensystems, die Nervenzelldifferenzierung und Transkriptionsregulation involviert sind, in

N2-Stadien gegenüber hES-Stadien signifikant überrepräsentiert waren. Eine Gruppe mit den Genen gSOX1, SOX2, PAX6, MAP2, DCX, ZIC1, NOTCH2, HES1, und OLIG2 zeigte die höchsten Transkriptlevel im N2-Stadium. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Transkripte des „neuroactive ligand-receptor interaction-Pathways“ im N1- bzw. N2-Stadium überexprimiert, dagegen im N3-Stadium herunterreguliert waren. Ein ähnliches Bild zeigte sich für verschiedene Rezeptorgene, die die Fähigkeit zur Differenzierung in diverse Nervenzelltypen, wie etwa in glutaminerge, GABAerge, dopaminerge, cholinerge, adrenerge und serotoninerge Neurone, determinieren. Dies steht in Übereinstimmung mit der verstärkten Expression glialer Marker im N3-Stadium.

Fazit

Erst unlängst konnte gezeigt werden, dass rund 94% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden². Ein wichtiges Werkzeug, um individuelle Spleißstellen zu identifizieren und transkribierte Regionen zu rekonstruieren, steht durch die Kombination von Sequenzier-Techniken, die lange und kurze Reads liefern, jetzt zur Verfügung. Durch die Kombination der Technologien gelingt es, die Exon-Anordnung in einem Maße zu rekonstruieren, wie es vorher nicht möglich war. Dieser Ansatz kann in Zukunft genutzt werden, um das Raum-Zeit-Muster der Transkriptionsaktivität im Zuge von Entwicklungsvorgängen im Detail zu studieren. Künftige Verbesserungen der Sequenzier-Technologien, wie bereits von Roche/454 Life Sciences angekündigte längere Leseweiten, höherer Durchsatz sowie weiter sinkende Kosten, versprechen weiteren Fortschritt bei der Erfassung der Transkriptom-Dynamik und des alternativen Splittings.

Literatur

- [1] Wu JQ, Habegger L, Noisa P, Szekely A, Qiu C, Hutchison S, Raha D, Egholm M, Lin H, Weissman S, Cui W, Gerstein M, Snyder M., Dynamic transcriptomes during neural differentiation of human embryonic stem cells revealed by short, long, and paired-end sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. (2010), doi: 10.1073/pnas.0914114107
- [2] Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebukova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes, Nature 465: 470-476.

Korrespondenzadresse

Dr. Burkhard Ziebolz
Roche Applied Science
82377 Penzberg
burkhard.ziebolz@roche.com

BRCA1/BRCA2: Automatisierte Suche nach Genmutationen

Ruth-Maria Leiber¹, Louis Hornez² und Jean Philippe Peyrat², ¹Tecan Schweiz AG, Männedorf; ²Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret, Lille (Frankreich)

Um Mutationen in den Krebsgenen BRCA1 und BRCA2 nachzuweisen, gilt die systematische Resequenzierung der entsprechenden DNA-Abschnitte als Gold-Standard. Wissenschaftler des Centre Oscar Lambret haben ein Protokoll zur automatisierten Hochdurchsatz-Sequenzierung mit Liquid-Handling-Stationen (Tecan) etabliert, mit dessen Hilfe Genmutationen bei Patienten mit Mamma- und Ovarialkarzinomen schnell und zuverlässig identifiziert werden können.

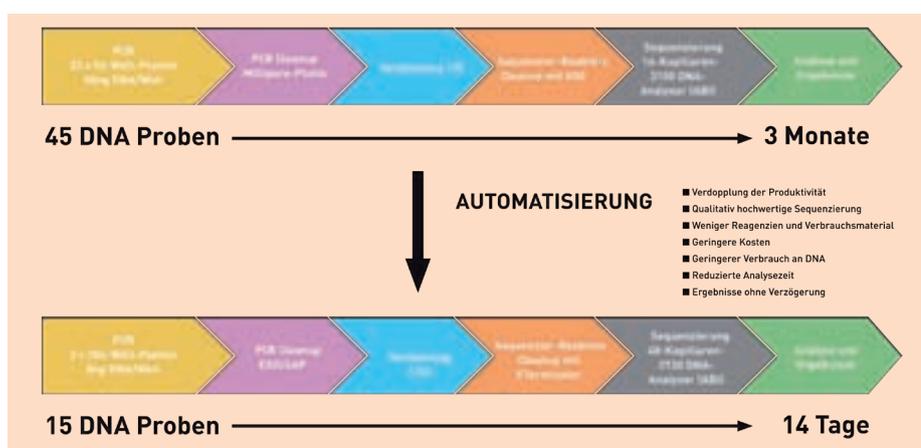


Abb. 1: Schematische Darstellung des Arbeitsprotokolls zur schnellen Resequenzierung von BRCA1/BRCA2: Beide Arbeitsabläufe (vor/nach Automation) bestehen aus sechs Schritten: PCR-Vorbereitung, PCR, PCR-Aufreinigung, Sequenzier-Reaktion, Sequenzierung und Auswertung. Die Automation kann die Analysezeit von 90 auf 14 Tage verkürzen.

Fünf bis zehn Prozent aller Brustkrebskrankungen gehen auf vererbte Mutationen bestimmter Gene zurück^{1,2}. Bereits 1994 wurde das BRCA1-Gen auf Chromosom 17 lokalisiert³. Seither wurden mehr als 1.200 verschiedene BRCA1-Genmutationen bei Patientinnen mit Mamma- und Ovarialkarzinomen entdeckt. Auch das BRCA2-Gen, das auf Chromosom 13 liegt, wird mit verschiedenen Krebskrankungen in Zusammenhang gebracht. Wie im Falle von BRCA1 handelt es sich bei BRCA2 um ein Tumorsuppressorgen, dessen Protein an der Aufrechterhaltung eines ordnungsgemäßen Zellzyklus beteiligt ist. 80% der Frauen, die Mutationen im Umfeld von BRCA1 oder BRCA2 tragen, entwickeln Mammakarzinome, immerhin 40% entwickeln Ovarialkarzinome.

Die Resequenzierung gilt heute als „Gold Standard“ des BRCA1/BRCA2-Nachweises. Sequenzierungsverfahren sind jedoch meist aufwändig und teuer. Um Zeit und Kosten zu

sparen, versuchen Forscher, immer schnellere Resequenzierungsprotokolle zu entwickeln und damit Genmutationen im Hochdurchsatz zu identifizieren.

Sequenz-basierte Mutationsanalyse

Das Laboratoire d'Oncologie Moléculaire Humaine, Centre Oscar Lambret in Lille hat einen Arbeitsablauf etabliert, mit dessen Hilfe sich die Analysezeit bei der DNA-Sequenzierung drastisch reduzieren lässt. Das Hochdurchsatzanalyse-Protokoll zur Resequenzierung („Fast Resequencing“) beruht auf der Automation der Arbeitsschritte mit Liquid Handling-Systemen der Firma Tecan. Der Arbeitsablauf besteht zwar – genau wie bei Standardprotokollen – aus sechs Schritten: PCR, PCR-Aufreinigung („Clean-Up“), Verdünnung, Sequenzier-Reaktion, Sequenzierung und Auswertung. Im direkten Vergleich

verkürzt es aber die Analysezeit von 90 auf 14 Tage (Abbildung 1).

Hochdurchsatz-Identifikation von Mutationen

Mit dem Hochdurchsatz-Protokoll zur Resequenzierung von BRCA1 und BRCA2 können bis zu 15 DNA-Proben simultan analysiert werden (Abb 2). Dazu werden die PCR-Reaktionen zunächst mit Hilfe des Freedom EVO[®] 100 mit 8-Kanal-Liquidhandling-Arm vorbereitet. Es folgt die PCR auf drei 384-Well-Platten. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgen automatisiert auf dem Tecan Freedom EVO-System mit MultiChannel-Arm[™] (96-Kanal-Pipetierkopf). Die amplifizierten PCR-Produkte werden gereinigt und verdünnt und daraus die Sequenzier-Ansätze vorbereitet. Zum bidirektionalen Sequenzieren wurden am Centre Oscar Lambret der BigDye[®]-Terminator v1.1 Cycle Sequencing-Kit und zum Abstoppen der Sequenzier-Reaktionen der BigDye X Terminator[®] Purification-Kit eingesetzt (Applied Biosystems). Danach folgt die Sequenzierung von sechs 384-Well-Platten auf dem 3730-DNA-Analyzer mit A48-Kapillaren. In der abschließenden Auswertung mit der Variant Reporter-Software können Mutationen identifiziert werden. Die zur Sequenzierung eingesetzte Hard- und Software stammte von Applied Biosystems.

Automation: schneller zur Sequenz

Die schnelle Resequencing-Methode hat gegenüber dem üblichen Verfahren diverse Vorteile: So sind nur 8 ng DNA-Ausgangsmaterial pro Mikrotiterplatten-Well für die Analyse notwendig – zum Vergleich: das Standardprotokoll benötigt 50 ng DNA. Die PCR wird mit 15 DNA-Proben in drei 384-Well-Platten durchgeführt. Bisher waren dafür 32 96-Well-Platten und 45 parallele DNA-Ansätze notwendig. Das neue Protokoll hilft also, einen beträchtlichen Teil des Verbrauchsmaterials einzusparen. Darüber hinaus ist die Analyse doppelt so produktiv, und die Ergebnisse liegen bereits nach 14 Tagen vor.

Abbildung 3 (vgl. Seite 22) dokumentiert die hohe Qualität der Sequenzanalysen durch automatisiertes Fast Resequencing am Beispiel eines zusammenfassenden Qualitätsberichtes, wie er üblicherweise von der Variant Reporter-Software ausgegeben wird. Hier betrug die Sequenzabdeckung bei 1.920 Sequenzier-Ansätzen aus 15 parallelen DNA-Proben insgesamt 381.255 Basen. Wie die Zusammenfassung zeigt, lag das Kriterium „Percentage of Assembled Traces“ in diesem Fall bei 100%. Das heißt, dass in diesem repräsentativen Sequenzierlauf alle Proben die Filterkriterien erfüllten. (An dieser Stelle können Proben, die bestimmte vom Anwender festgelegte Krite-



Abb. 2: Hochdurchsatzprotokoll zur Resequenzierung von BRCA1 und BRCA2 mit der Tecan Freedom EVO Liquid Handling-Station. Für die PCR-Probenvorbereitung wurde ein 8-Kanal-Liquid Handling-Kopf eingesetzt. Die PCR-Aufreinigung und die Vorbereitung der Sequenzierung erfolgten mit einem 96-Kanal-Pipettierkopf.

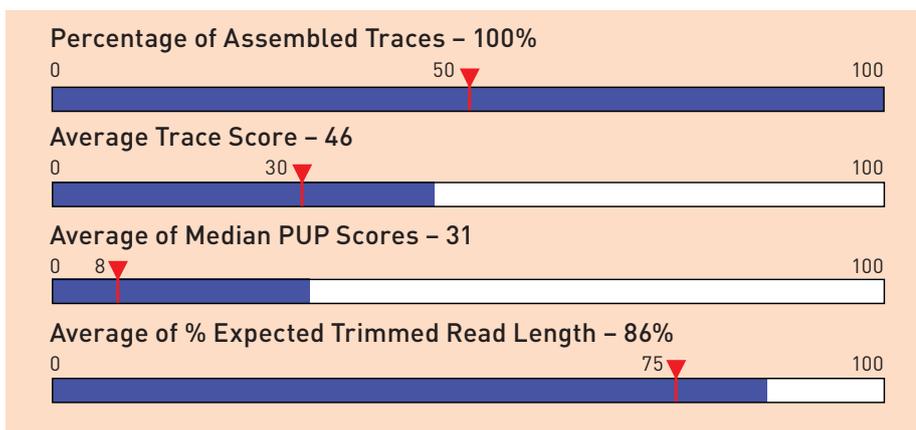


Abb. 3: Qualitätsbericht der Variant Reporter-Software: Die Zusammenfassung zeigt die hohe Qualität der durch „Fast Resequencing“ gewonnenen Sequenzdaten. Die Sequenzabdeckung der 1.920 Sequenzier-Ansätze aus 15 parallel verarbeiteten DNA-Proben lag bei 381.255 Basen. Die „Percentage of Assembled Traces“ betrug 100%. Der „Average Trace Score“ für alle Spuren, die die Analyse durchliefen, betrug 46. Dies entspricht einer durchschnittlichen Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,0025%. Die mittlere Signalstärke („Average of Median PUP Scores“) lag bei durchschnittlich 31%, die durchschnittliche erwartete Leselänge nach Trimming der Sequenzen bei 86%.

rien nicht erfüllen, von der statistischen Analyse ausgeschlossen werden.) Der „Average Trace Score“ für alle Spuren, die die Analyse durchliefen, betrug 46. Das entspricht einer durchschnittlichen Fehlerwahrscheinlichkeit von 0,0025%. Der „Average of Median PUP Scores (Peak under Peak Scores)“ ist ein Maß für die Signalstärke. Er wird als Verhältnis des Fluoreszenzsignals des höchsten Sekundärpeaks zum Fluoreszenzsignal der am häufigsten aufgerufenen Base berechnet. Hier lag der Average of Median PUP Score bei 31, was einem durchschnittlichen Signal-Rauschen von 3% (1/31) entspricht (für alle Basen aller Spuren, die die Analyse durchlaufen). Die Variant Reporter-Software entfernt vor der Analyse Daten von geringer Qualität, wie sie üblicherweise am Anfang und Ende jeder Sequenz gefunden werden. Hier betrug die durchschnittliche erwartete Leselänge nach Trimming der Sequenzen 86% („Average of % Expected Trimmed Read Length = 86%“).

Motor der Krebsforschung: die schnelle Resequenzierung

Das beschriebene Protokoll zur schnellen und kosteneffizienten Resequenzierung von BRCA1/BRCA2 wird bereits seit 2008 erfolgreich am Centre Oscar Lambret in Lille eingesetzt. Seit 20 Monaten setzen die Forscher zur Automatisierung der einzelnen Schritte Roboteranlagen ein, wodurch ein rasches und zuverlässiges Genotyping im Hochdurchsatzverfahren möglich wird. Innovative Methoden zum schnellen und sicheren genomweiten Nachweis von Genvariationen treiben die Krebsforschung heute voran. Die Fähigkeit, Krebserkrankungen auf DNA-Ebene besser zu verstehen, ist ein wichtiger erster Schritt auf der Suche nach neuen, verbesserten Therapieansätzen.

Literatur

- [1] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994;266:66-71.
- [2] Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, et al. A collaborative survey of mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA*1995;273:535-541.
- [3] Breast Cancer Information Core. http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/ (January 2003).

Korrespondenzadresse

Aline Weiss
 Tecan Schweiz AG
 aline.weiss@tecan.com
 www.tecan.com

Beliebig viele Marker pro Zelle: Plattform für explorative Zytometrie

Dr. Christian Hennig, Medizinische Hochschule Hannover,
Klinik für Pädiatrische Pneumologie, Allergologie und Neonatologie

In der Immun- und Krebs-Diagnostik sowie im Zuge der Erforschung immunologischer Mechanismen ist es oft erforderlich, viele phänotypische und funktionelle Marker einer Zelle zu erfassen und gebündelt zu interpretieren. Verfahren wie die Durchfluss- oder Slide-basierte Zytometrie stoßen hier an ihre Grenzen, insbesondere dann, wenn nur kleine Probenvolumina mit geringer Zellzahl zur Verfügung stehen. Das von uns entwickelte neue, robuste Verfahren der iterativen Chip-basierten Zytometrie (iCBC) ermöglicht eine Analyse beliebig vieler Marker an lebenden Zellen – selbst wenn nur wenige hundert Zellen in Volumina von nur 0,5 bis 10 µl vorliegen. Anders als bei der Durchfluss- oder Slide-basierten Zytometrie können die Zellen mit dem neuen iCBC-Verfahren beliebig oft auf neue Marker hin untersucht werden. Dieser explorative Ansatz beschleunigt die Wissensgenerierung und erlaubt in der medizinischen Diagnostik erstmals eine schrittweise Präzisierung der Diagnose anhand ein- und derselben Probe. Mit der Anmeldung mehrerer Patente sind die Voraussetzungen für eine kommerzielle Fortentwicklung der Plattform geschaffen worden. Im Rahmen der BioVaria 2010 (siehe Kasten) wird sie erstmals öffentlich einem Industriepublikum vorgestellt.

Die Durchflusszytometrie gilt heute als Goldstandard für die Charakterisierung von Zellen in Suspension. Mit üblichen Verfahren können

fünf bis acht Marker gleichzeitig erfasst werden, mit relativ hohem Aufwand auch bis zu 17¹. Dabei muss vor der Messung feststehen, welche

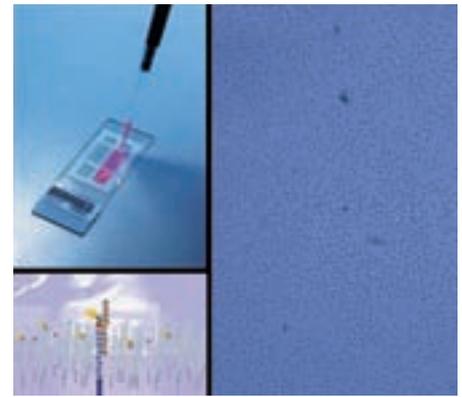


Abb 1: Zellen immobilisieren selbständig an Mikrofluidik-Chips mit DNA-beschichteter Oberfläche und stehen lebend für serielle Analysen zur Verfügung.

Marker bestimmt werden sollen, denn nach der Messung stehen die Zellen für weitere Analysen nicht mehr zur Verfügung. In der medizinischen Praxis stößt diese Methodik allerdings rasch an Grenzen. Eine eindeutige Diagnose oder individuelle Therapieentscheidung lässt sich oft nur dann sinnvoll treffen, wenn relevante Zellen umfassend charakterisiert werden können. Oft handelt es sich dabei um seltene Zellen, und oft stehen nur kleinste Probenvolumina zur Verfügung, die einer durchflusszytometrischen Analyse nicht zugänglich sind. Um diese Problematik zu lösen, wurde an der Pädiatrischen

NEXT GENERATION SEQUENCING SERVICES



febit bietet Zugang zu neusten Sequenzierungstechnologien

■ WHOLE GENOME SEQUENCING

Resequenzierung mit hoher Abdeckung und Tiefe für zuverlässige SNP und Mutationsanalysen

■ GEZIELTE RESEQUENZIERUNG

Anreicherung spezifischer Regionen des Genoms mit höchster Effizienz und Abdeckungsrate für großangelegte Studien, Barcoding für parallele Sequenzierung

■ WHOLE TRANSCRIPTOME SEQUENCING

Sequenzierung aller kodierenden und nicht-kodierenden RNAs, Splicing-Events, exprimierten SNPs, Mutationen, Translokationen, Fusions-transkripte, allelspezifische Expressionsmuster

■ SMALL RNA PROFILING

Profiling bekannter und Entdeckung neuer small RNA Moleküle mit Next Generation Sequencing

Ihre Vorteile mit Services von febit

- Sequenzierung mit höchster Genauigkeit (99,9%) bis zu 2-base encoding
- Kosteneffektive Hochdurchsatz-Sequenzierung
- Transkriptom-Analyse für ein breites Spektrum von Organismen mit Referenzsequenzen
- Entdeckung neuer small RNAs
- Umfassender Service von der Probe bis zum analytischen Bioinformatikreport

» GENOME EXPLORATION. SIMPLIFIED. AUTOMATED.

Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) im Laufe des vergangenen Jahres eine Plattform entwickelt und validiert, die die neue Technologie der iterativen Chip-basierten Zytometrie (iCBC) mit verschiedenen Informationstechnologien zur Datenerfassung und -bewertung kombiniert.

Die iCBC-Plattform im Überblick

Die zu analysierenden Zellen binden an eine zelladhäsive, DNA-beschichtete Oberfläche innerhalb eines Mikrofluidik-Chips. Dabei bleiben ihre Vitalität, Funktionalität und 3D-Struktur weitgehend erhalten. Durch die Immobilisierung ist jede Zelle eindeutig lokalisierbar und kann somit seriell auf beliebig viele extra- oder intrazelluläre Marker hin untersucht werden. Histologische Färbungen wie HE oder Giemsa sind ebenso möglich wie der Nachweis unterschiedlicher Proteine oder Gene mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern oder DNA-Sonden. Dabei können alle zu analysierenden Marker mit demselben Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden, was das Repertoire nutzbarer Antikörper und analysierbarer Marker gegenüber parallelen Analyseverfahren deutlich erweitert. Zwischen den einzelnen Messzyklen werden die Fluorophore durch längeres Bestrahlen ausgebleicht. Dieses Vorgehen hat sich in der Grundlagenforschung bewährt. Um das Verfahren mit Blick auf Anwendungen in der Routinediagnostik zu beschleunigen, wurden neuartige Antikörper-Fluorophor-Konjugate entwickelt. Die Fluorophore sind über einzelsträngige DNA-Linker an die Antikörper gekoppelt und können nach der Messung durch Zugabe einer komplementären Einzelstrang-DNA mit gebundenem Quencher in Sekundenschnelle spezifisch gelöscht werden. Die nachfolgende quantitative und qualitative Analyse der verschiedenen Marker erfolgt mittels Image-Zytometrie, was zudem die Markerlokalisierung innerhalb subzellulärer

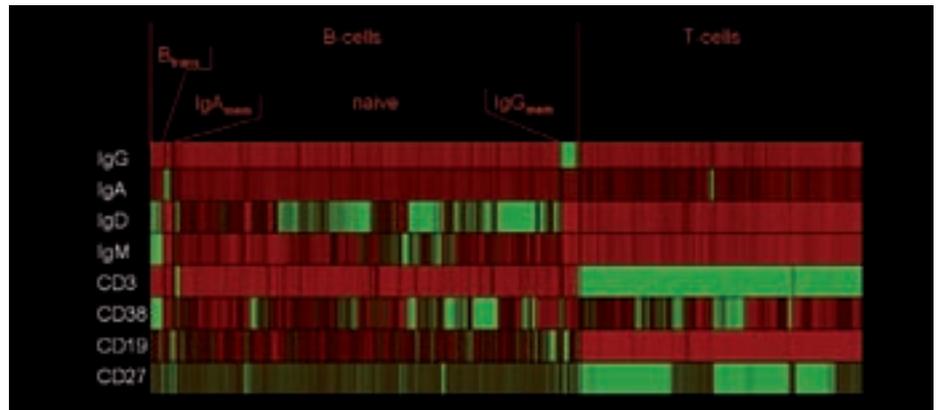


Abb 2: Ausschnitt aus einer Phänotypisierung von Lymphozyten nach der Messung von acht (zum Großteil B-Zell-spezifischen) Markern. Nach hierarchischer Clusterung zeigen sich automatisch die einzelnen B-Zell-Subpopulationen wie naive, Transitional- oder Gedächtniszellen.

Strukturen (Zellkern, Golgi-Apparat etc.) erlaubt. Zur Strukturierung und Visualisierung der anfallenden komplexen Datensets werden neu entwickelte Tools auf Basis der hierarchischen Clusteranalyse oder von semantischen Webtechnologien wie der Zyto-Ontologie eingesetzt. Da die Zellen nach Fixierung innerhalb des Chips über Monate hinweg für weiterführende Untersuchungen aufbewahrt werden können, stehen sie für weitere Analysen zur Verfügung, falls die Primärdaten-Auswertung neue Fragestellungen aufwirft. Dies ist zum Beispiel bei wertvollen Patientenproben vorteilhaft.

Qualität und Quantität im Vergleich

Im direkten Vergleich² mit der konventionellen Durchflusszytometrie zeigte die iCBC-Plattform bei der Analyse von Proben die gleiche Spezifität, war jedoch um den Faktor 10 sensitiver, weil sich schwache Signale besser vom Hintergrundsignal negativer Zellen differenzieren ließen. Eine Klassifizierung der Signale in die Kategorien

hohe, mittlere und niedrige Expression war bei beiden Methoden im gleichen Maße möglich. Hinsichtlich der benötigten Zellzahl und Probenvolumina erwies sich die iCBC-Plattform auch für minimale Proben als geeignet. Selbst bei wenigen hundert Zellen wurden reproduzierbare Ergebnisse erzielt, wobei – abhängig von der Zellzahl – Probenvolumina von 0,5 bzw. 10 µl eingesetzt wurden. Die Möglichkeit, bei Anwendung der iCBC-Technologie beliebig viele Marker zu kombinieren, erleichtert eine Validierung vorläufiger Daten. So lässt sich ein vermuteter Zelltyp oder funktioneller Zustand einer analysierten Zelle durch Einbeziehen weiterer Marker bestätigen oder widerlegen. Zudem ist bei der seriellen Analyse eine Verzerrung der Messwerte durch Spill-over- oder Kompensationseffekte ausgeschlossen. Auch gegenüber anderen in der Literatur beschriebenen Methoden der Slide-basierten Zytometrie bietet die iCBC deutliche Vorteile. Gängige Verfahren ermöglichen lediglich die parallele Analyse einer überschaubaren Anzahl vorher festzulegender Marker („FACS on a chip“). Zudem werden die Zellmorphologie und -funktion durch die Fixierungsmethode wesentlich beeinträchtigt³. Experimentell wurde zwar gezeigt, dass eine serielle Analyse mehrerer Marker möglich ist, allerdings war der Aufwand dafür vergleichsweise hoch, und es konnten nur sehr wenige Zellen pro Slide analysiert werden⁴. Dagegen verbindet die iCBC eine schonende Immobilisierung mit der Möglichkeit zur seriellen Analyse mehrerer hundert oder tausend Zellen pro Chip. Dabei können die immobilisierten Zellen sogar *in vitro* manipuliert und resultierende Veränderungen ihres Aktivitätszustandes online beobachtet werden.

Anwendungen in der Grundlagenforschung und der Klinik

Die iCBC-Plattform wird an der MHH sehr breit eingesetzt: in der immunologischen Grundlagenforschung ebenso wie in Onkologie, Stammzellforschung, Dermatologie, Rheumatologie,

Laborwelt Hintergrund

BioVaria: Marktplatz für Erfindungen der öffentlichen Forschung

Am 20. April findet in München die BioVaria 2010 statt. Die von der Ascenion und mehreren europäischen Technologietransfer-Einrichtungen organisierte Konferenz bietet Vertretern der biopharmazeutischen Industrie eine Übersicht über kommerziell aussichtsreiche Technologien aus der öffentlichen biomedizinischen Forschung Europas. Mehr als 50 patentgeschützte, lizenzierbare Projekte werden in Kurzpräsentationen und auf Postern vorgestellt, darunter: Wirkstoffe, Diagnostika, Targets, Tools und Plattformtechnologien in den Bereichen Krebs, Entzündungen, Autoimmun- und Herz-Kreislaufkrankungen. Neu im Programm: Aussichtsreiche Ausgründungen.



Allergologie und Entzündungsforschung. Mittlerweile können wir auf an mehr als 350 validierten Markern gewonnene Erfahrung zurückgreifen. Sowohl ein Einsatz in der Grundlagenforschung als auch auf dem Gebiet der Patienten- oder Diagnostik-orientierten Forschung sind bereits dokumentiert⁵. So konnte etwa bei Patienten der MHH durch eine umfassende Phänotypisierung von B-Zellen mittels iCBC ein seltener Immundefekt diagnostiziert werden, der mittels genetischer Diagnostik nicht detektiert worden war. Erst die präzise Diagnose ermöglichte eine Therapiefindung im Sinne der personalisierten Medizin⁶.

Ausblick

Diese Beispiele verdeutlichen das Potential der Plattform. Selbst minimale Probenmengen mit geringen Zellzahlen können einfach aufbereitet, immobilisiert und zuverlässig auf eine beliebige Zahl von Markern durchgemustert werden. Dieser explorative Ansatz ermöglicht erstmals die konsequente, langfristige Analyse derselben Zellen, wobei die Resultate vorangegangener Messzyklen in die Planung von Folgeanalysen einbezogen werden können. Anders als beim Hypothesengetriebenen Ansatz der Durchfluss- und Slide-basierten Zytometrie kann so wesentlich rascher ein Zuwachs an Wissen um komplexe zelluläre Mechanismen erzielt werden. Aber auch als komplementäre Ergänzung zu etablierten Verfahren bietet die iCBC neue Möglichkeiten, beispielsweise für ein schnelles initiales Markerscreening zur Identifikation geeigneter Markersets für nachfolgende Hochdurchsatz-Analysen. In der medizinischen Diagnostik ermöglicht sie erst die präzise Diagnose von Erkrankungen, die etwa durch spezifische Defekte einzelner Zelltypen charakterisiert sind. Damit hat die Plattform das Potential, in vielen Bereichen den Weg zur personalisierten Medizin zu ebnet. Als sinnvolles Einsatzgebiet erscheint auch die Wirkstoff-Suche und -Validierung. Um dieses Potential möglichst breit entwickeln zu können, wurden mehrere Patentanmeldungen zu verschiedenen Aspekten der iCBC-Plattform eingereicht. Ein Patent wurde binnen eines Jahres bereits erteilt. Erste Kontakte mit potentiellen Lizenznehmern oder Kooperationspartnern in der Industrie sind inzwischen initiiert, um verschiedene Kommerzialisierungsstrategien zu evaluieren. Denkbar sind sowohl Lizenzierungen oder Kooperationen als auch die Gründung eines eigenen Unternehmens mit dem Ziel, die Technologie zu einer Plattform für die Routinediagnostik fortzuentwickeln. Auf der BioVaria 2010 wird die Technologie einem größeren Industriepublikum am 20. April vorgestellt.

Literatur

- [1] Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nat. Rev Immunol* 2004; 4:648-655
- [2] Hennig C, Adams N, Hansen G. A versatile platform for comprehensive chip-based explorative cytometry. *Cytometry Part A*. 2009; 75(4):362-70
- [3] Laffers W, Mittag A, Lenz D, Tarnok A, Gerst AO. Iterative restaining as a pivotal tool for n-color immunophenotyping by slide-based cytometry. *Cytometry Part A* 2006; 69A:127-130
- [4] Schubert W, Bonnekoh B, Pommer AJ, Philipsen L, Bockelmann R, Malykh, Y, Gollnick H, Friedenber M, Bode M, Dress AW. Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat. Biotechnol* 2006; 24:1270-1278
- [5] Polte T, Hennig C, Hansen G. J *Allergy Clin Immunol*. Allergy prevention starts before conception: maternofetal transfer of tolerance protects against the development of asthma. 2008;122(5):1022-1030
- [6] Hennig C, Baumann U, Ilginus C, Horneff G, Foell J, Hansen G. Successful treatment of autoimmune and lymphoproliferative complications of patients with intrinsic B-cell immunodeficiencies with Rituximab. *Br J Haematol*. 2010;148(3):445-8

Korrespondenzadresse

Dr. Ralf Cordes
Karl-Wiechert-Allee 3
30625 Hannover
Tel.: +49-(0)511-5328-921
cordes@ascenion.de



www.jobboerse.bio-sell.de

exklusiv für den Life Science und Biotech Markt

- einfach und unkompliziert
- günstige Konditionen
- hohe Multiplikatorenzahl
- Beratungsservice

Sie finden hier Jobs für

- Wissenschaftler und Postdocs
- Doktoranten, Technische Assistenz
- Vertrieb und Marketing
- Spezialisten



Tel.: 09128/724 32 32
Fax: 09128/724 32 33
Mail: jobs@bio-sell.de
www.jobboerse.bio-sell.de
www.bio-sell.de

Books

Project Management for the Biotech Industry

The biotech industry is a challenging business. Long lead times, high development expenses and high project failure rates are facts of life. An ever-changing market environment contributes to the uncertainties. In this book Johanna Holldack presents an approach for using project management in the biotech industry and elucidates the methodology and organization.

Project Management for the Biotechnology Industry
€68.00, ISBN 3-928383-25-6

Tel. +49 (0)30/26 49 21-40, Fax +49 (0)30/26 49 21-11
eMail service@biocom.de
Web www.biocom.de



BIOCOM

MicroRNA-Array-Analysen – Einfluss der Normalisierungsmethode

Lin Gan und Bernd Denecke
Chip Facility - IZKF BIOMAT, RWTH Aachen

Mit Hilfe der Array-Technologie findet ein rasanter Erkenntnisgewinn über die Funktion von microRNAs statt. Um unter Verwendung von Arrays zuverlässige Veränderungen im microRNA-Expressionsmuster nachweisen zu können, bedarf es zuverlässiger Normalisierungsmethoden. Bis heute gibt es noch keinen Goldstandard für die besonderen, mit microRNAs verknüpften Bedingungen. Ziel dieses Artikels ist es, den Leser für den Einfluss der verwendeten Normalisierungsmethode auf die statistische Auswertung eines microRNA-Array-Experimentes zu sensibilisieren.

Der Phänotyp einer Zelle wird letztendlich durch die Genregulation kontrolliert. Somit stellt die Genregulation die Basis für die zelluläre Differenzierung, Morphogenese und Anpassungsfähigkeit einer Zelle und eines Organismus dar. Eine Modulation der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Neben epigenetischen Effekten (Cytosinmethylierung, Histonacetylierung) findet eine Regulation auf Ebene der Transkriptionsinitiation (Transkriptionsfaktoren), des heteronukleären Transkript-Prozessings (z.B. des RNA-Spleißens), des mRNA-Transportes vom Zellkern in das Zytoplasma (nukleozytoplasmatische Transportfaktoren wie z.B. Exportin-5), der Translation sowie der posttranslationalen Modifikation eines Proteins statt. Erst in jüngerer Zeit wurde zunehmend deutlich, dass vorher nicht erkannte Nicht-Protein-kodierende Gene eine wichtige Rolle bei der Genexpressionskontrolle spielen. Eine erst 1993 entdeckte Klasse funktioneller RNA-Produkte¹, die microRNAs (miRNAs), wurden in den letzten Jahren als wichtige Regulatoren auf posttranskriptioneller Ebene entschlüsselt.

Die Initiierung der Translation einer mRNA ist ein sehr komplexer Prozess, der immer noch nicht in allen Einzelheiten entschlüsselt ist². Die Translationskontrolle kann unspezifisch wirkend über ribosomale Faktoren geregelt werden. Andere Faktoren greifen auf mRNA-Ebene an und sind somit selektiv für bestimmte mRNAs. Zu diesen Faktoren gehören zum einen RNA-bindende Proteine, die selektiv auf die das relevante RNA-Sequenzmotiv tragenden mRNAs wirken. Zum anderen gehören die microRNAs in diese Kategorie. MicroRNAs sind einzelsträngige, typischerweise 21 bis 23 Nukleotide kurze RNA-Moleküle, die als negative Regulatoren der Genexpression in eukaryotischen Organismen agieren. Allerdings wurden in jüngerer Zeit auch viele kleine,

nicht-kodierende RNAs in prokaryotischen Organismen und in Viren identifiziert. MicroRNAs sind in der Regel komplementär zu einer Region im 3'-untranslatierten Bereich, wobei sie potentiell auch an Sequenzen des „offenen Leserahmens“ oder an 5'-untranslatierten Sequenzen binden können³. Nach Anlagerung der microRNAs an ihre Zielsequenz kann die Translation durch zwei Mechanismen unterdrückt werden:

- Die mRNA-Stabilität wird nach Bindung der microRNA über eine verstärkte Degradationsrate über den normalen deadenylierungsabhängigen Signalweg reguliert (ähnlich dem siRNA-Mechanismus).
- Die Hemmung der Translationsinitiation, die nicht mit einer mRNA-Degradation einhergehen muss. Dabei wird davon ausgegangen, dass die microRNAs als Adaptoren agieren, die spezifisch die katalytischen Komponenten des RISC (RNA-induced silencing complex) wie etwa Argonaute-1 und GW1824 rekrutieren.

Beide Mechanismen resultieren in einer verminderten Anzahl der durch die Zielsequenzen kodierten Proteine. Die relative Gewichtung dieser beiden Mechanismen scheint aus noch nicht geklärten Gründen zwischen verschiedenen microRNA-mRNA-Paaren zu variieren. Nichtsdestotrotz wird angenommen, dass microRNAs typischerweise eher über die Hemmung der Translationsinitiation als über den mRNA-Verdau wirken. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass die microRNA-vermittelte Reduktion der Proteinexpression meistens nicht mit einer Verminderung der entsprechenden mRNA-Menge einhergeht⁵. Unter anderem konnte den microRNAs eine essentielle Bedeutung für die Entwicklung, die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation, den Zelltod, die Chromosomenstruktur und bei der Virusresistenz zugeordnet werden. Die teilweise tiefgrei-

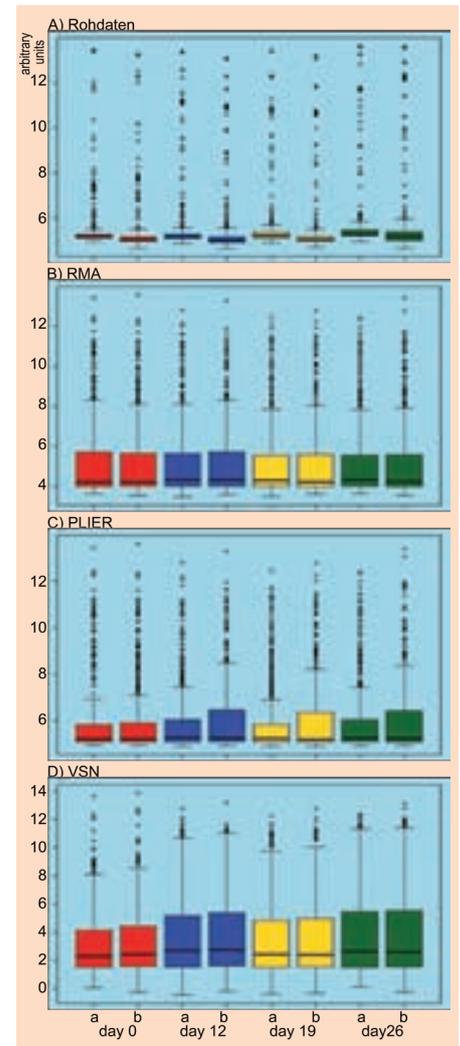


Abb. 1: Boxplot der Rohdaten (A) und Daten nach Kalibrierung mit der RMA- (B), PLIER- (C) und VSN-Methode (D).

fenden Effekte auf die Zellphysiologie sind sicherlich auch dadurch bedingt, dass einzelne microRNAs an mehrere verschiedene mRNAs binden können.

MicroRNA-Analyse mittels Microarray-Technologie

Wie schon bei mRNA-Expressionsanalysen ermöglicht die Microarray-Technologie eine simultane genomweite microRNA-Analyse. Diesem Umstand ist es zu verdanken, dass in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von organspezifischen microRNA-Expressionsmustern in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand, einer Behandlung, einer Krankheit etc. ermittelt wurden. Auch in der klinischen Forschung nimmt das microRNA-Profil einen immer größeren Stellenwert ein. Dieser wurde in den letzten Jahren noch dadurch erhöht, dass microRNAs in Krebsgeweben eine abweichende Expression zeigen. Dies legt nahe, dass microRNAs möglicherweise eine neue Klasse von Onkogenen oder Tumor-Suppressorgenen

darstellen. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass ungefähr 1% bis 5% der Gene im eukaryotischen Genom microRNAs ausmachen. Somit werden wahrscheinlich 10% bis 30% der Protein-kodierenden Gene durch microRNAs reguliert. Hinsichtlich der zunehmenden Bedeutung der microRNAs ist eine zuverlässige Aussage über quantitative Veränderungen der microRNA-Expression mit Hilfe von Arrays erstrebenswert.

Ziel dieses Artikels ist zu verdeutlichen, dass unterschiedliche Normalisierungsmethoden wesentliche Auswirkungen auf die anschließende statistische Analyse haben. Je nach Methode gibt es Vor- und Nachteile. Im Gegensatz zu mRNA-Expressionsanalysen steht eine abschließende Validierung der brauchbarsten Normalisierungsmethode für microRNA-Arrays noch aus.

Weshalb müssen microRNA-Array-Daten normalisiert werden?

Microarray-Daten beinhalten häufig eine extrem große Varianz der Messwerte. Prinzipiell kann diese Varianz in die biologische, interessierende Varianz und in die störende Varianz ohne biologischen Ursprung unterteilt werden. Nicht biologische Varianzquellen, die eher eine technische Ursache haben, sind unter anderem: die Probenpräparation (wie RNA-Extraktion, reverse Transkription, Amplifikationseffizienz, Markierung, verschiedene Bearbeiter), Array-spezifische Effekte (zwei Arrays sind nie absolut gleich. Bedingt durch die vielen technischen Arbeitsschritte, die nicht zu 100% identisch wiederholt werden können, liegt eine zufällige Variabilität zwischen den Arrays vor), die Hybridisierung (etwa Menge der Probe, Hybridisierungseffizienz, unspezifische Bindung der Probe an die Chipoberfläche, Verunreinigung durch Staub oder Kratzer) oder auch der Messprozess (z.B. Scanner-Messgenauigkeit, Hintergrundfluoreszenz). Um auf die Identifikation differentiell exprimierter Gene zu fokussieren, sollten diese nicht-biologischen Varianzen minimiert werden. Eine Korrektur dieser technischen Varianzen kann aus den Daten geschätzt werden. Dazu sind verschiedene Normalisierungsverfahren entwickelt worden, deren Anwendung vor der eigentlichen statistischen Datenanalyse essentiell ist. Dabei sollte Wert darauf gelegt werden, dass die technisch bedingten Varianzen möglichst entfernt werden, während die informativen biologischen Veränderungen noch erhalten bleiben. Zur Normalisierung gibt es viele – auch für Affymetrix-Microarray-Daten – nutzbare Algorithmen. Diese schließen MAS⁵, PLIER, RMA, DCHIP, GCRMA und VSN ein. Die Auswahl des Normalisierungsverfahrens hat einen erheblichen Einfluss auf die nachfolgende Analyse und die endgültige biologische oder klinische Auslegung der Daten.

RMA (robust multichip average⁶), PLIER (probe logarithmic intensity error estimation

- Affymetrix^{7,8}) und VSN (variance stabilization and normalization⁹) sind weitverbreitete Datenaufbereitungsmethoden, die in der Affymetrix-Microarray-Datenanalyse ihre Anwendung finden (siehe Glossar: verwendete Normalisierungsmethoden). Bisher sind sie allerdings nur für mRNA-Microarray-Analysen als Normalisierungsmethode evaluiert. In einem konkreten microRNA-Experiment haben wir ein Datenset mit diesen drei verschiedenen Methoden vor der statistischen Analyse aufbereitet, um einen Einblick auf die durch die Normalisierungsmethoden bedingten Effekte auf das Endresultat zu bekommen. Hierfür wurden die normalisierten Expressionswerte jedes einzelnen Probesets einer statistischen Auswertung unter Verwendung des Bioconductor Applikationspaketes LIMMA analysiert. Unterschiedlich exprimierte Zielsequenzen wurden mittels eines Bayes-angepassten t-Tests bestimmt.

Wie die Boxplot-Darstellung zeigt, wird mit allen drei Methoden auf den Median skaliert. Dabei zeigt sich eine unterschiedliche Verteilung (Abb. 1). Für die untersuchten Vergleiche (Tag 12 versus Tag 0, Tag 19 versus Tag 0, Tag 26 versus Tag 0) wird deutlich, dass der Zweierlogarithmus des Veränderungsfaktors ($\log_2 FC$) mit vorausgehender VSN-Methode größer ausfällt als mit den RMA- und PLIER-Methoden (Abb. 2A). Auch die Häufigkeiten verschieben sich, der VSN-Methode zufolge, etwas in den positiven Bereich. Mit anderen Worten: es werden im Vergleich zu den Normalisierungsmethoden RMA und PLIER mehr „hochregulierte“ Gene angezeigt. Nach der Normalisierung mit der VSN-Methode werden auch markantere Wahrscheinlichkeitswerte für eine Veränderung erreicht. Nach der statistischen Analyse wurden die jeweiligen signifikant unterschiedlich exprimierten microRNAs als Venn-Diagramm dargestellt (Abb. 2B). Dabei wird deutlich, dass die größte Überlappung der microRNAs nach der RMA- und der VSN-Methode zu beobachten ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein großer Teil der unterschiedlich exprimierten microRNAs nur nach der RMA- und der VSN-, nicht jedoch nach der PLIER-Normalisierung nachweisbar sind. Sogar einige Marker-microRNAs sind je nach Normalisierungsmethode nicht als verändert exprimiert nachweisbar (bei dem dargestellten Experiment handelt es sich um eine Herzzell-spezifische Differenzierung von embryonalen Stammzellen: microRNA-499, deren Expression während der Differenzierung von Herzzell-Vorläuferzellen gezeigt wurde¹⁰, konnte lediglich nach der VSN-, jedoch nicht nach der RMA- oder PLIER-Normalisierung als verändert nachgewiesen werden).

Schlussfolgerung

Anhand des dargestellten Beispiels konnten wir zeigen, dass Normalisierungsmethoden einen extremen Einfluss auf das Ergebnis der

World's First iPhone App for Bioreactor Control



DASGIP Parallel Bioreactor Systems for Unparalleled Results.

Europe
+49 2461 9800
info@dasgip.de

US West Coast
+1 510 799 6105
tombruggman@dianovainc.com

US East Coast
+1 800 531 9462
biotools@dasgip.com

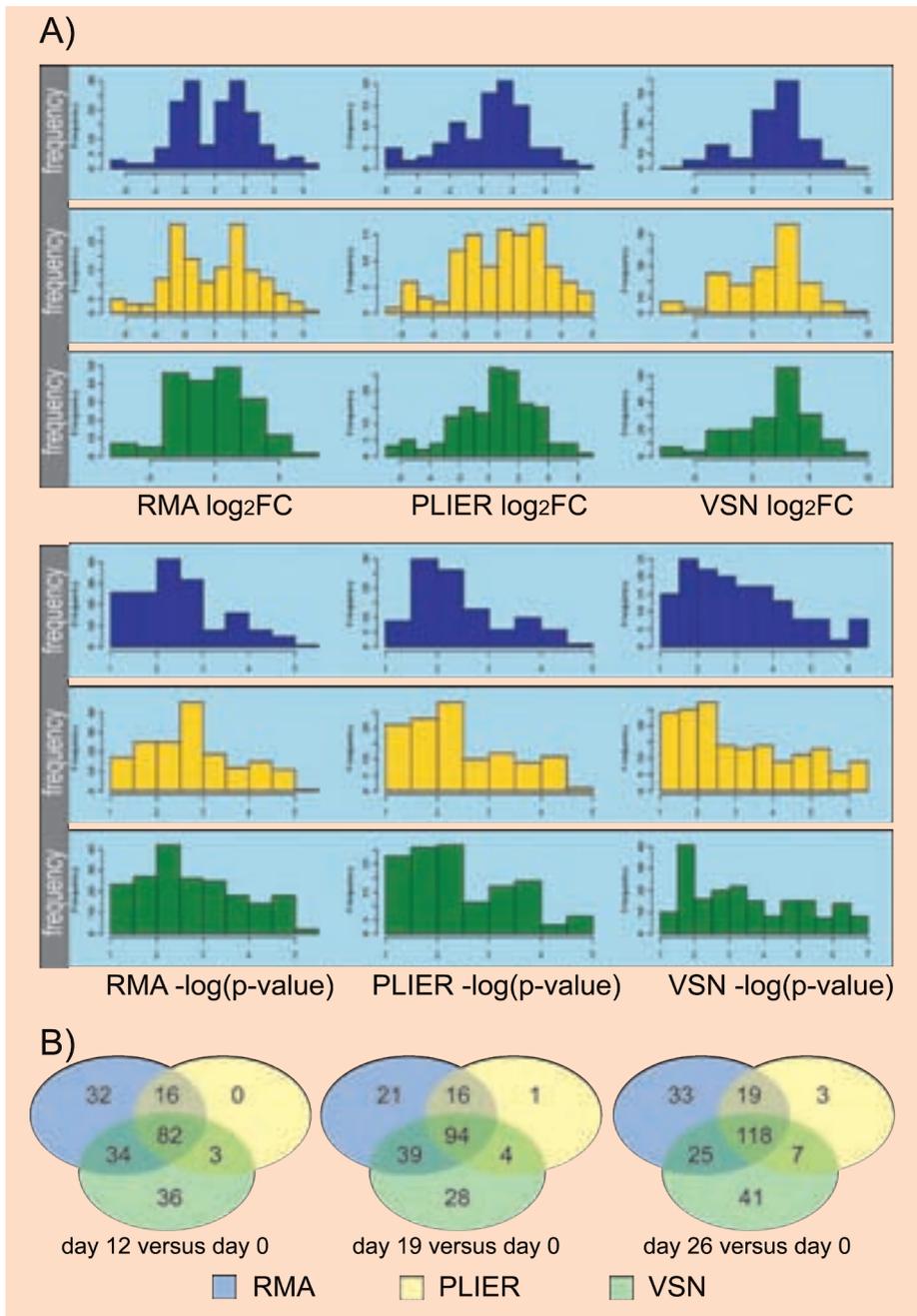


Abb. 2: A) (oben) Histogramm des Zweierlogarithmus der Veränderung in der Expression (\log_2FC) zwischen den Vergleichen Tag 12 versus Tag 0 (blau), Tag 19 versus Tag 0 (gelb) und Tag 26 versus Tag 0 (grün). (unten) Histogramm des negativen Zehnerlogarithmus des p-Wertes für veränderte Expression zwischen den Gruppen. B) Venn-Diagramm von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen im Vergleich zu Tag 0.

statistischen Endanalyse haben. Durch den Vergleich der RMA-, PLIER- und VSN-Normalisierung kristallisierte sich heraus, dass durch die Verwendung der VSN-Methode die stärksten Veränderungen mit den markantesten Wahrscheinlichkeitswerten erzielt wurden. Somit scheint VSN die bessere Normalisierungsmethode zu sein, obwohl unter Umständen mehr falsch-positive microRNAs erfasst werden könnten. Mehr echte Datensätze sind erforderlich, um eine klare Richtlinie für die Normalisierung von microRNA-Arraydaten vorzugeben. Dabei wären sicherlich auch MicroRNA-„spike in“-

Datensätze hilfreich, um Effekte verschiedener Normalisierungsverfahren auf die Auswertung besser abschätzen zu können.

Literatur

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75:843-854 (1993)
- [2] Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV: The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:113-127 (2010)
- [3] Ding L, Han M: GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol*. 17:411-416 (2007)

- [4] Cuellar TL, McManus MT: MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol*. 187:327-332 (2005)
- [5] Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM: Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 3:404-418 (2005)
- [6] Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP: Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 31:e15 (2003)
- [7] Affymetrix: Guide to probe logarithmic intensity error (PLIER) estimation. Technical report, Affymetrix Inc., www.affymetrix.com/support/technical/technotes/plier_technote.pdf
- [8] Therneau TM, Ballman KV: What Does PLIER Really Do? *Cancer Inform*. 6:423-431 (2008)
- [9] Huber W, von Heydebreck A, Sültmann H, Poustka A, Vingron M: Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics*. 18 Suppl 1:104-110 (2002)
- [10] Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, Metz CH, Liu J, Doevendans PA, Goumans MJ: MicroRNA-1 and -499 Regulate Differentiation and Proliferation in Human-Derived Cardiomyocyte Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jan 15. [Epub ahead of print] (2010)

Literatur

RMA (robust multi-array analysis⁶) setzt sich aus drei Schritten zusammen: a) Korrektur des Hintergrundrauschens über ein globales Modell der Intensitätsverteilung je Array, b) Quantilnormalisierung, durch die die Expressionsverteilungen der Arrays aneinander angeglichen werden und c) Zusammenfassen der Proben zu Probesets über Mediänglättung. Der RMA-Algorithmus stellt eine robuste Methode zur Normalisierung von Multi-chip-Analysen dar.

VSN (variance stabilization normalization⁹) basiert auf die Beobachtung, dass die Expressionsvariabilität von der Stärke der Intensität abhängt. Diese Abhängigkeit wird durch eine varianzstabilisierende Transformation ausgeglichen. Vor der Transformation werden die Intensitäten hinsichtlich des Hintergrundrauschens kalibriert. Ein Array-übergreifendes Modell sorgt für Vergleichbarkeit der Expressionsverteilungen. Das Zusammenfassen der Proben erfolgt wie bei RMA über Mediänglättung.

PLIER (probe logarithmic intensity error^{7,8}) verwendet eine sequenzspezifische Hintergrundkorrektur. Die probenspezifischen Affinitätsparameter werden unter Berücksichtigung aller zu vergleichenden Arrays kalkuliert. Ansonsten basiert auch PLIER auf einer Quantilnormalisierung. Die Zusammenfassung der Proben erfolgt über Mediänglättung. Das durch PLIER verwendete Fehlermodell geht davon aus, dass Fehler anstelle zur Hintergrund subtrahierten proportional zur beobachteten Intensität sind.

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. Bernd Denecke,
 Chip Facility - IZKF BIOMAT, RWTH Aachen
 Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen
 Tel./Fax: +49-(0)241-8089918/ -8082124
bernd.denecke@rwth-aachen.de
www.chip-facility.rwth-aachen.de

Arrays, Sequenzer und funktionelle Genomik im Focus

Daniela M. Köster und Robert Wild, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin

Zum insgesamt zwölften Mal trafen sich Technologieexperten aus Forschung und Unternehmen in Frankfurt am Main zum Status-Seminar „Chip Technologies, Sequencing and Functional Genomics“. Erstmals hatte der Veranstalter Dechema e.V den altbekannten Fokus auf Chip-Technologien erweitert und wegen ihrer wachsenden Bedeutung in der Wissenschaft moderne Sequenzierungstechnologien sowie die funktionelle Genomik mit in das Programm aufgenommen. Mehr als 200 Experten und 19 auf den Microarray-Markt ausgerichtete Aussteller sorgten Anfang Februar auf der Konferenz für einen regen Erfahrungsaustausch. Im Rahmen der Tagung wurden verschiedenste Entwicklungen in der Miniaturisierung und Automatisierung präsentiert. Neben 20 Vorträgen und 66 Postern konnten sich die Besucher der Konferenz während der Pausen über die neusten Produkte der Firmen auf diesem Feld informieren.

Microarrays lassen sich als universell einsetzbares Werkzeug zur parallelen Analyse von Biomolekülen (DNA, Proteine, kleine Moleküle etc.) einsetzen. Der große Bedarf an sensitiven und automatisierten Assays auf Microarray-Basis in allen Bereichen von essentieller Bedeutung, die mit geringen Mengen an Probenmaterial arbeiten. Auch im Bereich der funktionellen Studien haben sich Microarrays als unverzichtbares Forschungswerkzeug etabliert. Die in Frankfurt vorgestellten Projekte zeigten die große Nachfrage nach immer sensitiveren Analysen sowie einem ständigen Nachschub

an neuen Detektionsverfahren. Hierbei gewinnen besonders elektrische Ausleseverfahren an Bedeutung.

Trend zum elektrischen Auslesen

Elektrische Ausleseverfahren für Microarrays bieten eine Alternative zu den weitverbreiteten optischen Detektionssystemen. Sie umgehen alle mit Farbstoffnachweisen verbundenen Probleme, wie etwa das Erfordernis, spezielle Scanner anschaffen zu müssen, oder die Empfindlichkeit der Farbstoffe gegenüber Licht und Ozon.

Sandra Julich von der Friedrich-Schiller-Universität Jena präsentierte ein automatisiertes Verfahren zur Analyse des Pflanzenparasiten *Phytophthora*, der weltweit zu hohen Ertragsverlusten bei Kulturpflanzen beiträgt. Eine große Gefahr stellt der Erreger vor allem bei der Kartoffel dar. Um eine Ausbreitung zu verhindern, sind Analysen von Pflanzen, die importiert oder exportiert werden, essentiell. Der in Jena entwickelte Lab-on-a-Chip (Abb. 1) benötigt eine geringe Menge an Probenmaterial und ermöglicht eine einfache Bearbeitung. In diesem System erfolgen die Amplifikation der spezifischen Erreger-DNA mittels PCR und das Auslesen der Signale in einem Gerät. Für die Amplifikation wird ein Primer verwendet, der mit der Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist. Anschließend wird die Probe zwischen den Elektroden des Chips auf der Oberfläche hybridisiert. Der Nachweis des Analyten beruht auf einem Nanopartikel-basierten elektrischen Ausleseverfahren. Nach der Zugabe eines Substrates entsteht durch die HRP ein Silberniederschlag, wodurch die Verbindung zwischen den Elektroden geschlossen wird und ein Stromfluss gemessen werden kann.

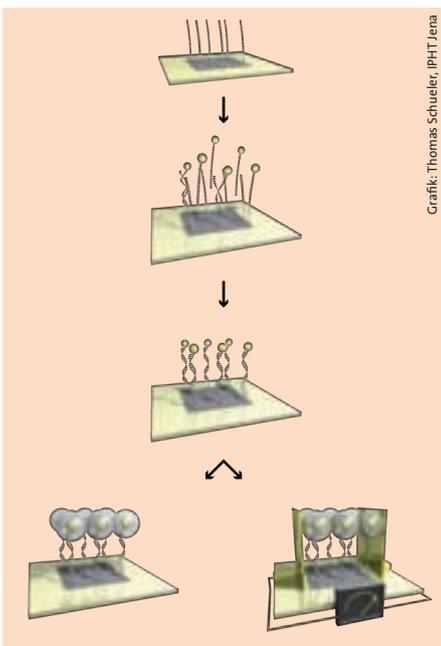


Abb. 1: Prinzip des Phytophthora-Chips. gelb: Horseradish-Peroxidase, grau Silberniederschlag

LABORWELT

New!

It's your choice!



Next Generation Sequencing



SPRIworks

Simplifies Next Generation Sequencing

Fully Automated

Fragment Library System

For the next Generation Sequencers

- Full Library Construction Process in a Cartridge
- Easy to Use and Operate Bench-top System
- No More Gels - Built in SPRI Size Selection Chemistry
- Run up to 10 Samples at a Time
- Maximizes Sequencing Work-flow



Beckman Coulter GmbH
47807 Krefeld Europark Fichtenhain B13
Tel. 02151/333 625
www.beckmancoulter.de

Wenige Pilzsporen reichen bereits aus, um den Parasiten nachzuweisen und auch zwischen verschiedenen Spezies zu unterscheiden. Mit dem vorgestellten Prototyp können bis zu 24 Proben parallel analysiert werden.

Ein im Rahmen der EU-Programme MASCOT und SmartHealth entwickeltes Mikro-Total-Analyse-System (μ TAS) wurde von Michael Bassler vom Institut für Mikrotechnik in Mainz vorgestellt. Der Lab-on-a-Chip-Ansatz (Abb. 2) verspricht eine schnelle, vereinfachte Handhabung und basiert ebenfalls auf einem elektrischen Ausleseverfahren. Dieses μ TAS integriert sämtliche Komponenten, um Blut von Patienten auf Krebsmarker zu testen. Vom Auftragen der Probe bis zum Ergebnis vergehen nur 12 Minuten. Nach dem ELISA-Prinzip werden verschiedene Antikörper gegen Krebsmarker mit Positiv- und Negativkontrollen auf den Arbeitselektroden des Chips immobilisiert. Das Blut von Patienten kann ohne weitere Behandlung direkt auf den Chip aufgetragen werden. Anschließend wird der Chip mit einem speziellen Gerät analysiert und ein elektrochemisches Signal ausgelesen. Der gesamte Testablauf ist vollständig automatisiert und verringert das Auftreten von Varianzen durch Handhabungsfehler. Die gewonnenen Daten lassen sich mit medizinischen Datenbanken vergleichen. Die meisten Tumormarker können durch die hohe Sensitivität von bis zu 5 ng/ml detektiert werden. Das im Oktober 2009 der Öffentlichkeit präsentierte μ TAS-System befindet sich bereits in der klinischen Testphase für den Nachweis von Brustkrebs.

DNA-Methylierungs-Assay

Die Analyse der DNA-Methylierung gewinnt immer mehr an Bedeutung, vor allem für die Diagnostik zur Früherkennung von Krebs. Sandeep Kumar Botla vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg stellte einen Assay vor, bei dem Unterschiede im Methylierungsstatus der Cytosin-Phosphat-Guanin-Inseln (CpG islands) als Tumormarker fungieren. Für die Analyse können Körperflüssigkeiten verwendet werden, was schmerzhaft Biopsien ersetzen könnte und die Untersuchung erleichtern würde. Die DNA-Veränderungen sind in einem frühen Krebsstadium zu finden und gelten als vielversprechender Marker für die Früherkennung. Die vorgestellte Methode basiert auf einem Oligonukleotid-Microarray zur Unterscheidung des Methylierungsstatus von DNA-Sequenzen. Im Zusammenhang mit Brustkrebs konnten durch die Untersuchung von 70 verschiedenen Patientenproben (gesunden und kranken) 22 Bereiche auf sieben verschiedenen Genen identifiziert werden. Damit war eine Differenzierung von Brustkrebs möglich.

Beim Thema Next Generation Sequencing (NGS) ging es unter anderem um die Anforderungen und Versprechen, die diese Technik

halten und erfüllen muss. Dr. Carola Wagner von der IMGM Laboratories GmbH präsentierte die verschiedenen Geräte mit ihren Vor- und Nachteilen. Als wesentliches Problem nannte sie die Handhabung der enormen Datenmengen, die mit dieser Methode bei der genomweiten Analyse gewonnen werden. Für den Nachweis einer einzelnen Mutation ist eine bis zu 50fache Sequenzabdeckung erforderlich.

Next Generation Sequencing

Das „International Cancer Genome Consortium (ICGC)“ will Sequenzanalysen von Tumorgenomen zur gezielten Behandlung von Krebspatienten nutzen. Prof. Dr. Peter Lichter vom Deutschen Krebsforschungszentrum



Abb. 2: Der elektrochemische Detektionschip des IMM ist als zweidimensionaler Elektrodenarray in elektrochemischen Detektionskammern ausgelegt.

(DKFZ) in Heidelberg stellte die Arbeit des Konsortiums vor, dem Arbeitsgruppen aus 22 Ländern angehören. Ziel ist es, eine Datenbank mit Markern der am häufigsten auftretenden Tumorerkrankungen zu erstellen. Krebs ist die Folge von Veränderungen im Genom. Gleichzeitig lassen sich die Tumore über spezifische genetische Marker klassifizieren und in Subpopulationen unterteilen. Mittels „ultra deep sequencing“ können somatische Mutationen und Punktmutationen gefunden werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollen Patienten individuell mit spezifischen Therapien behandelt werden. Deutschland wird innerhalb des Konsortiums das molekulare Profil von Hirntumoren bei Kindern analysieren. Diese zählen zu den Krebsarten mit der höchsten Mortalität bei Kindern. Am

häufigsten treten Medulloblastome und die langsam wachsenden pilozytischen Astrozytome auf. Es ist geplant, je 300 Tumorproben und Kontrollen von gesundem Gewebe zu analysieren. Eine große Herausforderung dabei stellt die Auswertung, Verwaltung und Lagerung der generierten Daten dar. Es wird mit Petabyte-Datenmengen gerechnet, also einer Million Gigabytes.

German Mouse Clinic

Zur funktionellen Genomanalyse wurde von Dr. Johannes Beckers vom Helmholtz-Zentrum München das bereits etablierte Projekt der „German Mouse Clinic“ präsentiert. Diese bietet ein breites Spektrum an phänotypischen und genotypischen Untersuchungen der Maus an. Unter anderem umfassen diese Untersuchungen zu Verhalten, Knochen und Knorpelentwicklung, Neurologie, Entwicklung von Organen, Schmerzverhalten, Immunologie und Pathologie. Dies umfasst etwa Tests wie mikros- und makroskopische Untersuchungen, Blutdruckmessungen und Schmerztests. Für die Analyse einer stabilen Mausmutante müssen 20 weibliche und männliche Mäuse zur Verfügung gestellt werden. Stellt sich im Laufe der Untersuchungen ein klinisch relevanter, charakteristischer Phänotyp dar, zieht dies Folgeuntersuchungen der Maus nach sich. Bis dato wurden mehr als 14.000 Mäuse untersucht. Durch die (inter)nationale Zusammenarbeit mehrerer Laboratorien konnten aus dieser enormen Zahl an Mäusen 182 Mausmutanten katalogisiert werden. Darüber hinaus befinden sich weitere 247 Mausmutanten in der erweiterten Testphase. Die Untersuchung von phänotypisch charakteristischen Mutationen in Mausmodellen hat eine enorme klinische Bedeutung.

Bei vielen Postern liegt das Detail im Auge des Betrachters. Denn hier wurden wertvolle Hinweise über Assay-Kompositionen und Handhabungsverfahren präsentiert. Die Optimierung existierender Assays, basierend auf mühevoller Detailarbeit zeigt, dass die zuverlässige Analyse von Einzelmolekülen auf Microarrays in greifbare Nähe rückt.

Abschließend lässt sich sagen, dass das 12. Statusseminar eine gelungene Veranstaltung war, um neue Ideen und Methoden vorzustellen und interdisziplinär zu diskutieren. Besonders jungen Wissenschaftlern bietet sich hier eine Plattform, ihre Arbeiten zu präsentieren und ihre Erfahrungen mit anderen zu teilen.

Korrespondenzadresse

Daniela M. Köster
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Abt. Vertebrate Genomics
Ihnestraße 63-73
14195 Berlin

Tumorassoziierte Peptide für die Krebsbehandlung

Dr. Toni Weinschenk, Dr. Harpreet Singh, Paul Higham,
immatics biotechnologies GmbH, Tübingen

Krebs ist nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Statistisch gesehen erkrankt daran etwa jeder dritte Europäer im Laufe seines Lebens. 90 Prozent der Menschen, die an Krebs sterben, erliegen jedoch nicht dem Primärtumor, sondern den Metastasen, die sich nach der Entfernung des Primärtumors im Körper bilden. Das Immunsystem versucht zwar, unkontrolliert wachsende Tumorzellen zu eliminieren. In der Regel bleibt der Tumor für das Immunsystem jedoch unsichtbar, weil die Tumorantigene im falschen Kontext vorliegen. Hier setzt die Technologie von immatics biotechnologies an, die Einsatz bei der Entwicklung von Tumorimpfstoffen findet, die die Immunabwehr des Körpers gegen Krebszellen aktivieren, das Wachstum von Tumorzellen kontrollieren sowie das Wiederauftreten des Tumors verhindern sollen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hans-Georg Rammensee an der Universität Tübingen hat das Unternehmen im Jahr 2002 die Technologieplattform XPRESIDENT™ konzipiert und weiterentwickelt. XPRESIDENT™ ermöglicht es, innerhalb weniger Monate relevante Tumor-Antigene zu identifizieren, die sich als Impfstoffe eignen, um das Immunsystem gegen Tumore und Metastasen zu mobilisieren.

Menschliche Körperzellen präsentieren auf ihrer Oberfläche mit Hilfe der HLA-Komplexe Peptid-Fragmente von abgebauten Proteinen aus dem Zellinneren. Diese Peptide spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr: Befinden sich beispielsweise Krankheitserreger in einer Zelle, werden deren Fragmente von den T-Zellen des Immunsystems als fremd erkannt, sobald sie auf der Oberfläche der befallenen Zelle präsentiert werden. Im Verlauf der daraufhin induzierten Immunantwort wird die infizierte Zelle eliminiert.

Auch Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Zellen durch ein verändertes Peptidmuster auf ihrer Oberfläche: Die Peptide können dabei in ihrer Häufigkeit ebenso variieren wie in ihrer Zusammensetzung. Im Prinzip könnten Krebszellen anhand dieser Tumor-assoziierten Antigene (TUMAPs) vom Immunsystem als defekt erkannt werden und eine entsprechende Immunreaktion auslösen. Jedoch müssen die Immunzellen zunächst aktiviert werden. Für dieses Priming sind ausreichende Antigen-Mengen und ein ko-stimulierendes Signal erforderlich.

Ziel des von immatics entwickelten Therapieansatzes ist es daher,

- die relevanten, für eine Tumorart charakteristischen Tumorantigene zu identifizieren;
- diese synthetisch nachzubauen, und
- nach Verabreichen eine starke und hochspezifische Antwort des Immunsystems gegen Tumorzellen hervorzurufen.

Um dies zu erreichen, kombiniert immatics mehrere TUMAPs zu einem Impfstoff. Nach Injektion in die Haut werden die TUMAPs von Antigen-präsentierenden Zellen gebunden. Diese wandern in die Lymphknoten und können dort vorhandene naive T-Zellen spezifisch gegen die geimpften TUMAPs aktivieren. So entstehen zytotoxische T-Zellen, die sich sehr

rasch vermehren und im Körper verteilen. Sobald sie Tumorzellen entdecken, die die geimpften TUMAPs auf ihrer Oberfläche präsentieren, eliminieren sie diese Zellen: Sie setzen zytolytische Substanzen frei und/oder lösen Reaktionen aus, die die Apoptose einleiten.

Gegenüber früheren Versuchen, das Immunsystem von Krebspatienten gegen Residualtumorzellen und Metastasen zu mobilisieren, bieten TUMAPs diverse Vorteile: Sie sind standardisiert und müssen nicht für jeden Patienten individuell zubereitet werden. Da sie sich vollständig synthetisch produzieren und chemisch sehr gut charakterisieren lassen, ist die Herstellung und pharmazeutische Entwicklung im Vergleich zu Proteinen und Antikörpern deutlich kostengünstiger. Dies erlaubt es, eine ganze Reihe von TUMAPs zu einem Produkt zu kombinieren. Darüber hinaus dienen sie auch als Diagnostikum. Mit ihrer Hilfe lässt sich messen, ob spezifische T-Zellen im geimpften Patienten aktiviert wurden. Dieses Immunomonitoring ist in frühen Phasen der klinischen Entwicklung sehr hilfreich. Zudem zählen Peptide zu den sichersten Substanzen, und im Bereich der Vakzinierung mit Peptiden kann auf jahrelange Erfahrungen zurückgegriffen werden.

Die Technologieplattform

Tumorassoziierte Peptide für einen solchen Impfstoff müssen sorgfältig ausgewählt werden. Sie sollten:

- für einen bestimmten Krebstyp charakteristisch sein,
- auf den Krebszellen von möglichst vielen Patienten vorkommen,
- nach Möglichkeit von Proteinen abstammen, die für das Überleben des Tumors wichtig sind

Hier entsteht Zukunft



HOTSPOT FÜR LIFE SCIENCE-UNTERNEHMENSGRÜNDER

- 15 Jahre intensive Erfahrung mit BioTech-Unternehmensgründern
- Büros und möblierte Labore mit einer hochwertigen technischen Gebäudeausstattung zu fairen Preisen
- Ein kreatives Umfeld mit Forschungseinrichtungen von Weltruhm in direkter Nachbarschaft (zwei Elite-Universitäten LMU, TU, Klinikum Großhadern, MPIs u.v.m.)
- Geografische Heimat für über 50 BioTech-Firmen
- Ein effizientes Netzwerk
- Enge Kontakte zu Investoren
- Attraktive, moderne Konferenzräume auch für Externe
- Schnelle, unkomplizierte Lösungen



Innovations- und Gründerzentrum
Biotechnologie IZB
Martinsried · Freising

Am Klopferspitz 19
82152 Planegg/Martinsried
Fon: +49 (0) 89 - 700 656 70
Fax: +49 (0) 89 - 700 656 77

www.izb-online.de

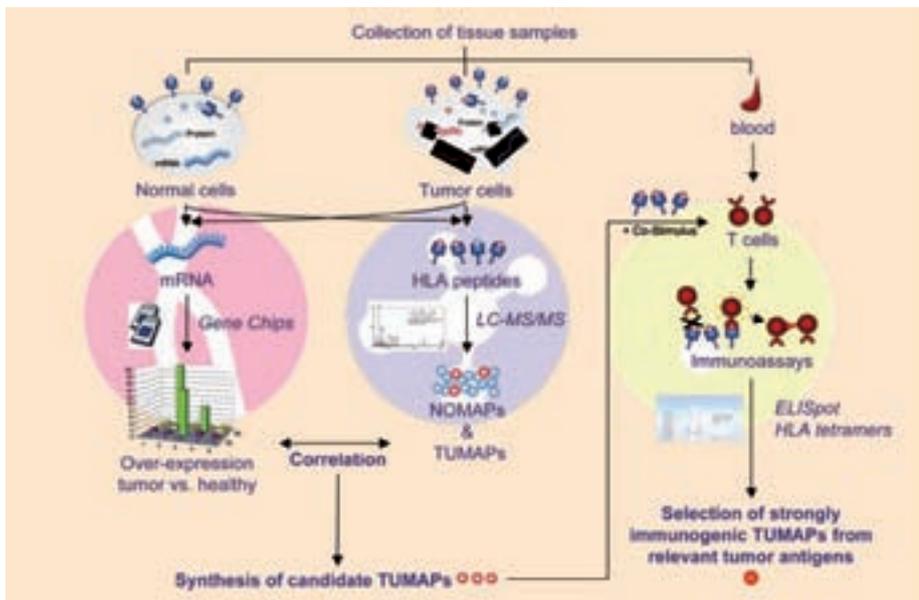


Abb. 1: Immatics XPRESIDENT™-Drug Discovery-Plattform

und in der Lage sein, eine starke Immunantwort auszulösen.

Immatics hat zur Identifizierung, Selektion und Validierung geeigneter TUMAPs die XPRESIDENT™-Technologieplattform entwickelt (abgeleitet von: eXpression profiling and analysis of peptide PREsentation by HLA molecules for IDentification of New tumor antigens in combination with T-cell screening). Diese kombinierten Techniken der Massenspektrometrie, Genomik, Biochemie sowie Immunologie und erlaubt die effiziente und rasche Entdeckung tumorspezifischer Antigenen, die alle genannten Anforderungen erfüllen.

XPRESIDENT™ arbeitet direkt mit primärem Tumormaterial von Krebspatienten. Zudem erlaubt die Technologie die Entdeckung von TUMAPs bis hinunter zu femtomolaren Mengen. Seit neuestem lassen sich die TUMAPs überdies quantifizieren. Damit ist eine wichtige Voraussetzung erfüllt, auch solche TUMAPs zu identifizieren, die verstärkt auf der Zelloberfläche präsentiert werden, ohne dass dies auf eine erhöhte Expression des zugrundeliegenden Gens zurückzuführen ist.

Identifizierung von TUMAPs

Die Entwicklung eines tumorspezifischen Impfstoffs beginnt mit dem biochemischen und massenspektroskopischen Vergleich von primärem Tumorgewebe und Normalgewebe. Dabei werden aus weniger als einem Gramm Material qualitative und quantitative Unterschiede ermittelt, die mehrere Hundert verschiedene Peptide umfassen können.

Bisherige Verfahren waren nicht empfindlich genug, um aus kleinen Proben aussagekräftige Daten zu gewinnen. Sie verwendeten deshalb entweder immortalisierte Zelllinien oder Computeralgorithmen, die TUMAPs anhand

von bekannten Mustern der Bindung an HLA-Molekülen voraussagen. Diese Ansätze spiegeln jedoch häufig nicht die reale Situation im Tumorgewebe von Patienten wider und müssen deshalb mit großem Aufwand auf ihre klinische Relevanz hin überprüft werden.

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden wird als nächstes die Herkunft der Peptide ermittelt. Nun gilt es, Peptide, die hauptsächlich in Tumorgewebe vorkommen, von jenen zu unterscheiden, die auch von gesundem Gewebe präsentiert werden. Immatics analysiert diese Unterschiede zunächst auf mRNA-Ebene. Dank großer gewebespezifischer Expressionsdatenbanken, die Immatics auf Basis von Gewebematerial freiwilliger Spender erstellt hat, können die von den Tumorzellen präsentierten Antigene sowohl mit der Expression und Präsentation desselben Antigens im umgebenden Gewebe des Patienten als auch mit einer Vielzahl anderer Körpergewebe verglichen werden. Seit kurzem ist Immatics in der Lage, die unterschiedliche Präsentation von TUMAPs auf Tumor- und gesundem Gewebe direkt zu erfassen. Zusätzliches Selektionskriterium ist die biologische Rolle des zugrundeliegenden Proteins.

Im Validierungsschritt wird mit immunologischen Techniken überprüft, ob die TUMAP-Kandidaten in der Lage sind, die für die Zerstörung von Tumorzellen wichtigen zytotoxischen T-Zellen unter klinisch relevanten Bedingungen zu aktivieren. Hierzu werden verschiedene *in vitro*- und *ex vivo*-Methoden eingesetzt, wie zum Beispiel *in vitro*-T-Zell-Assays. Anschließend werden die Menge der zytotoxischen T-Zellen, ihre Aktivität und ihre Funktionalität anschließend *ex vivo* in Blutproben der Patienten bestimmt.

Seit 2004 hat Immatics mehr als 100.000 neue TUMAPs identifiziert, davon Dutzende näher auf ihr therapeutisches Potential untersucht und zum Patent angemeldet. Von der ersten Untersuchung entsprechender Ge-

webeproben bis zum Beginn erster klinischer Prüfungen vergingen in der Regel weniger als 24 Monate. Nach der Validierung kombiniert Immatics 10 oder mehr verschiedene TUMAPs zu einer stabilen und einfach zu handhabenden Formulierung. Jedes einzelne Peptid wird ebenso wie die Mischung physikalisch, chemisch und mikrobiologisch charakterisiert. Zudem werden analytische und Produktionsverfahren für die externe Herstellung unter GMP-Bedingungen ausgearbeitet.

Der Weg zum Produkt

Immatics verwendet grundsätzlich mehrere TUMAPs in Kombination, um ein breites Spektrum zytotoxischer T-Zellen gegen den Tumor zu aktivieren. Damit werden Anpassungsprozesse des Tumors an den Immunangriff unterlaufen. Denn Tumorzellen mutieren schnell, und dabei verändert sich das Muster der exprimierten Proteine und der auf der Zelloberfläche präsentierten Peptide.

Zudem kombiniert Immatics in den Impfstoffen die beiden wichtigsten Typen von Peptiden, die vom MHC/HLA-System präsentiert werden: Sowohl Komplexe der Klasse I, als auch Komplexe der Klasse II. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Antigene beider Klassen eine wichtige Rolle bei der Tumorbekämpfung durch das Immunsystem spielen. Durch die Kombination beider Klassen von TUMAPs in einem Impfstoff kann Immatics die Reaktion des Immunsystems auf den Impfstoff maximieren.

Derzeit befinden sich zwei Impfstoffe in der klinischen Erprobung: IMA901, das derzeit in einer europäischen Phase-II-Studie an Patienten mit Nierenzellkrebs getestet wird, und IMA910, das zur Behandlung von Darmkrebs entwickelt wird und in einer ebenfalls multizentrischen europäischen Phase-I/II-Studie erprobt wird.

Die Impfstoffe wurden bisher sehr gut vertragen. In einer Phase-I-Studie von IMA901 zeigten mehr als 75% aller Geimpften eine Immunreaktion. Dabei gab es Korrelationen zwischen der durch IMA901 ausgelösten Immunantwort gegen mehrere TUMAPs und einer Stabilisierung bzw. einem Rückgang der Erkrankung ($p=0,02$).

Falls die Ergebnisse auch in größeren Studien zu einem deutlichen klinischen Erfolg führen, ist Immatics mit der XPRESIDENT™-Technologie in der Lage, auch für zahlreiche andere Krebsindikationen rasch spezifische Impfstoffe zu entwickeln und zu testen. Einige befinden sich derzeit bereits in der präklinischen Entwicklung.

Korrespondenzadresse

Dr. Toni Weinschenk
Immatics biotechnologies GmbH
Paul-Ehrlich-Str. 15, 72076 Tübingen
Tel./ Fax: +49 (7071) 5397-100/-900
media@immatics.com

Das Labor im Taschentuch – Weiterentwicklung der Lab-on-Chip-Idee

Frank F. Bier, Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik IBMT, Institutsteil Potsdam und Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam

Noch sind sie nicht auf dem Markt angekommen, die Labore, die nur Scheckkarten-klein in der Hosentasche Platz finden und ganze chemische Analysen durchführen sollen. Aber schon wird bereits an der nächsten Generation der Diagnostik geforscht – die molekular integrierte Analyse, die sich in einen Zwirnfaden einspinnen und in Textilien oder Hygienetüchern verarbeiten lassen soll: Ein „Taschentuchlabor“. Unter diesem Titel arbeiten 14 Partner in einem BMBF-geförderten Projekt, um biochemische Bindungsreaktionen ohne Umwege sichtbar und für die Diagnostik – vor allem von Infektionserregern – nutzbar zu machen.

Sowohl in der medizinischen *in vitro*-Diagnostik, als auch der pharmazeutischen, Umwelt- und Lebensmittel-Analytik werden biochemische Reagenzien eingesetzt, die auf der molekularen Erkennung des Analyten durch biologische Makromoleküle beruhen. Als Binder des Analyten fungieren dabei etwa Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren oder Rezeptoren und Hormone. Diese biomolekularen Erkennungselemente sind meist selektiver als chemische Reagenzien und benötigen – verglichen mit physikalischen Analysemethoden wie der Spektroskopie, Chromatographie oder Massenspektrometrie – nur einfache Apparaturen. Der Trend hin zu einfachen Systemen ist in der *in vitro*-Diagnostik besonders im Marktsegment der patientennahen Vor-Ort-Analysen (Point-of-Care) zu verfolgen. Dort wird zur Zeit der Versuch unternommen, Teststreifenformate für mehr Analyte und

komplexere Aufgaben zu entwickeln. Diesen Methoden sind aber technologische Grenzen gesetzt, die ihren Einsatz limitieren.

Binder, Schalter, Signalgeber

Ziel des Taschentuchlabor-Verbundes ist es daher, die höchstmögliche Integration aller bioanalytischen Prozessschritte auf molekularer Ebene anzustreben. Es soll eine neue Klasse von Sensor-Aktor-Molekülen oder Molekülkomplexen generiert werden, die eine technologische Plattform neben den digital-elektronischen und mikrosystemtechnischen Hauptentwicklungsrichtungen aktueller F&E-Strategien bildet. Die Aufgabe besteht darin, Funktionsmoleküle zu finden und erfinden, designen und entwickeln, die zugleich einen Analyten in einer komplexen Umgebung erkennen und binden sowie ein Signal erzeugen können. Diese Multifunktionsmoleküle werden als „Sensor-Aktor-Moleküle“ bezeichnet und sind die Basis sogenannter „autonomer Biosensoren“ – Messfühler, die ohne Gerät und Energieversorgung funktionsfähig, analytische Einheiten bilden. Fernziel ist das „Labor im Taschentuch“ zum Nutzen des Arztes oder Patienten.

Der Verbund geht dabei parallel in drei Einheiten vor: Die erste Einheit beschäftigt sich mit dem Auffinden charakteristischer Erkennungsstrukturen. Viren und Bakterien docken an spezifische Rezeptor- oder Oberflächenstrukturen der Wirtszellen an. Sie besitzen aber auch selbst spezifische Oberflächenantigene, die gezielt durch bestimmte Antikörperstrukturen (Paratope) gebunden werden können. Durch das Paratopmapping spezifischer Antikörper können Bindungsdomänen oder Peptide daraus isoliert werden und als künstliche Binder neu aufgebaut werden. Auch Glykanstrukturen können besonders gut Teil dieser künstlichen Binder werden und

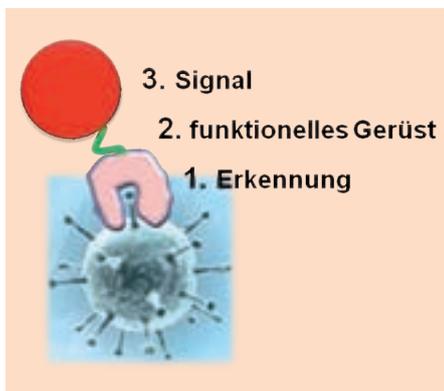


Abb 2: Sensor-Aktor-Moleküle sollen ein Bindungsereignis ohne Umwege in ein sichtbares Signal verwandeln. Drei Probleme sind zu lösen: 1. Spezifische Erkennung, 2. Stabilität und Verbindung durch ein funktionelles Rückgrat und 3. Erzeugung eines Signals, das nur im Bindungsfall ausgelöst wird und leicht erfasst werden kann.

LABORWELT

5 JAHRE Liquidator⁹⁶

Manuelle 96-Kanal Pipettierpower, die begeistert und das Pipettieren von Assays, ELISA, DNA/RNA-Isolationskits, PCR/Realtime-PCR, Proteinkristallisation, Screenings, Zellkulturarbeiten uvm. rasant beschleunigt und enorm vereinfacht.

Das muss gefeiert werden.

JUBILÄUMSPREIS

statt

~~€ 12.600,-*~~

nur

€ 9.999,-*

Angebot nur gültig bis 30.4.10



Unter www.liquidator96.de können Sie sich gleich selbst ein Bild machen von der überragenden Leistungsfähigkeit und verblüffenden Einfachheit dieses Gerätes.

* Preis zzgl. MwSt.

STEINBRENNER
LABORSYSTEME GMBH
SERVICE FOR SCIENCE



Steinbrenner Laborsysteme GmbH
In der Au 17, D-89257 Wiesenbach
Tel.: +49 (0)6223 861247 Fax: +49 (0)6223 861248
www.steinbrenner-laborsysteme.de
mail@steinbrenner-laborsysteme.de

zu deren Spezifität und zur Erhöhung der Bindungsstärke beitragen. Da sich nur wenige von hundert Bindungsstellen in lineare Peptide zerlegen lassen, müssen für diese Arbeiten umfangreiche Screening- und Syntheseprogramme durchgeführt werden. Dazu werden die Potentiale der Arraytechnologien ebenso genutzt werden wie die Erschließung von cDNA-Banken von Erregergenomen und Antikörpertechnologien.

In der zweiten Einheit arbeiten Chemiker an Rückgratstrukturen, an denen diese Bindungsdomänen aufgehängt werden. Die Polymere sollen so beschaffen sein, dass sie einerseits verschiedene Bestandteile der Bindungsstrukturen aufnehmen können und andererseits nach dem Vorbild des „induced fit“ sich dem Analyten in der Form anpassen. Die Bindungsreaktion zwingt das Polymer in eine neue Konformation, wie das Substrat das Enzym. Nun kommt die Aufgabe der dritten Einheit, nämlich diese Konformationsänderung in ein sichtbares oder anders leicht erfassbares Signal zu transformieren. Diese Aufgabe wird im Verbund von verschiedenen Seiten angegangen: Bistabile Moleküle, deren Zustandsänderung einen Farbumschlag auslöst, ist eine der verfolgten Varianten.

Ambitionierte Ziele

Das Projekt steht am Start, noch sind die drei Bereiche getrennt, und sowohl das Auffinden der besten artifiziellen Binder als auch der optimale Mechanismus zum Auslösen des Signals harren noch der Entdeckung – die ersten Schritte sind aber bereits getan. Die erste Gruppe potentieller Analyte werden Grippeviren sein, doch hat sich das Konsortium vorgenommen, weitere Erreger ins Visier zu nehmen, um die grundsätzliche Machbarkeit dieses neuen Ansatzes der Diagnostik zu demonstrieren.

Noch ist das Taschentuchlabor Zukunftsmusik, so wie vor zehn Jahren das Lab-on-Chip noch eine Vision war. Dieses erreicht heute die Produktionsreife: Die ivD-Plattform, die eine Allianz von Fraunhofer-Instituten entwickelt hat und in diesem Jahr auf der Analytica präsentiert, bietet eine Basis für die Entwicklung und Produktion von in vitro-Diagnostika für die Vor-Ort-Analyse. Kunden können so leicht ihre neuen Biomarker testen und sich darauf verlassen, dass sie diese auch als Lab-on-Chip produzieren und einsetzen können.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Frank F. Bier
 Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik
 IBMT – Institutsteil Potsdam
 Am Mühlberg 13
 14476 Potsdam-Golm, Germany
 Frank.Bier@ibmt.fraunhofer.de

h-Index – geeignet zur Bewertung individueller Forschungsleistungen?

Dr. Markus von Ins,
 Institut für Forschungsinformation und Qualitätssicherung iFQ, Bonn /
 Kompetenzzentrum Bibliometrie für die deutsche Wissenschaft

Im Rahmen der Beantragung von Forschungsgeldern und bei Berufungsverfahren geht es immer wieder darum, individuelle wissenschaftliche Leistungen zu bewerten. Diese Bewertung gestaltet sich für die Verantwortlichen oft schwierig. Daher gibt es einen Bedarf an Verfahren und Methoden, die diese Entscheidungen unterstützen können. Ein besonders verbreitetes Verfahren ist die Leistungsbewertung auf Basis von Publikationslisten. Eine Bewertung dieser Listen allein nach Umfang und Länge kann jedoch problematische Auswirkungen haben. So gingen in letzter Zeit immer wieder Fälle betrügerischen Fehlverhaltens durch Angabe noch nicht oder gar nicht publizierter Artikel durch die Presse. Es wächst daher der Wunsch, mehr die „Qualität statt Quantität“ zu bewerten. Auch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) wird, wie jüngst bekanntgegeben, künftig in ihren Vergabeverfahren stärker auf die Qualität der Publikationen setzen als auf die reine Masse.

Um die Qualität von Publikationen zu bewerten, gibt es verschiedene Wege. Das neue Verfahren der DFG zum Beispiel sieht eine Selbstselektion durch die Wissenschaftler vor. Diese dürfen maximal fünf Publikationen benennen, „eben jene fünf, die sie selbst für die wichtigsten ihrer gesamten

wissenschaftlichen Arbeit halten“, wie DFG-Präsident Kleiner Mitte Februar unterstrich (Pressemitteilung der DFG 7/2010). Immer öfter kommen auch quantitative Verfahren zum Einsatz, die das Oeuvre der Leistungen eines Wissenschaftlers oder einer Wissenschaftlerin zur Grundlage nehmen. Genutzt

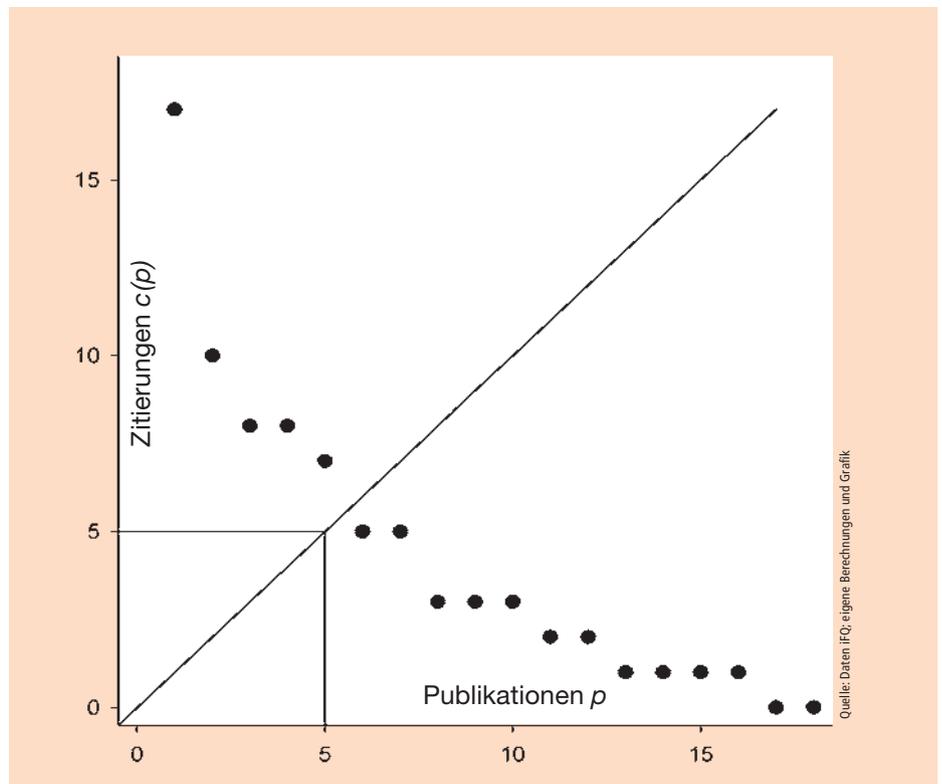


Abb. 1: Die Definition des h-Index zu einer Publikationsliste mit 18 Einträgen und einer fiktiven, aber typischen Verteilung der Zitierungen.

werden hierbei die Zitierungen der Publikationen als Ausdruck der Wahrnehmung einer Publikation durch die Scientific Community. Dabei wird davon ausgegangen, dass Publikationen, die öfter zitiert wurden, auch mehr Beachtung fanden beziehungsweise einen stärkeren Einfluss (Impact) auf die Forschung in einem Fachgebiet hatten. Die Diskussion darüber, ob diese Annahme grundsätzlich gültig ist, dauert an². Wird diese Annahme aber akzeptiert, so gibt es verschiedene Indikatoren, die zur Bewertung der wissenschaftlichen Leistung herangezogen werden können.

Anfangs wurden zur Bewertung von Publikationslisten einerseits die Zitierungsraten der Publikation (durchschnittliche Zahl der Zitierungen pro Publikation) verwendet, oder die Zitierungsraten der Zeitschriften, in denen die Publikation veröffentlicht wurde (Journal Impact Factors, JIF). Beide Indikatoren erwiesen sich jedoch – besonders bei der Beurteilung individueller Forschungsleistungen – als problematisch. Die Berechnung durchschnittlicher Zitierungsraten ist nicht ausreichend robust, um insbesondere bei kleinen Publikationszahlen hinreichend aussagefähig und belastbar zu sein. Die Zitierungsraten der Zeitschriften wiederum sagen nichts über die Zitierung der einzelnen Publikationen aus, sie sind vielmehr ein Durchschnittswert, der sich in der Regel aus der sehr schiefen Verteilungen der Zitierungen aller in einer Zeitschrift veröffentlichten Publikationen ergibt. Wenigen sehr häufig oder hoch zitierten Artikeln in einer Zeitschrift stehen oft viele selten bis nie zitierte Publikationen gegenüber. Mit anderen Worten: Der Journal Impact Factor wird nicht von der Mehrheit der Publikationen bestimmt, sondern von einer ganz kleinen Minderheit. Somit sagt er nichts über die Qualität oder den Impact einzelner Forschungsleistungen aus.

Gesucht: Methoden zur Bewertung kleiner Publikationszahlen

Gesucht wurde daher nach Verfahren, welche sich besser für die Beurteilung geringer Publikationszahlen und individueller Leistungen eignen. Aktuell am weitesten verbreitet ist die Nutzung des Hirsch oder h-Index³. Dieser wurde 2005 von Jorge Hirsch eingeführt. Bei der Konstruktion des h-Index werden die Publikationen eines Autors absteigend entsprechend der Zahl der auf sie entfallenden Zitierungen geordnet (siehe Abb. 1). Der Wert des h-Index bestimmt sich durch die Zahl der h Publikationen, welche mindestens h Zitierungen auf sich zogen. In Abbildung 1 sind dies also fünf der insgesamt 18 Publikationen. Aus Abbildung 1 ist außerdem ersichtlich, dass der h-Index sich auch dann nicht verändern würde, wenn nur die fünf

Publikationen mit den höchsten Zitierungszahlen (links im Bild) überhaupt publiziert worden wären. Derselbe h-Index (oder Ertrag) kann daher theoretisch mit mehr oder weniger Publikationsaufwand erreicht werden. Ein weiterer Vorteil des h-Index ist seine Robustheit gegen Ausreißerwerte. Extreme Zitierungszahlen beeinflussen den Index kaum. Diese Extremwerte können in einigen Fachrichtungen, etwa den Lebenswissenschaften und der Medizin, vierstellig sein. Auch lässt sich der h-Index bereits für sehr geringe Publikationszahlen ermitteln. Der h-Index kann somit einige Probleme klassischer bibliometrischer Indikatoren lösen, jedoch lange nicht alle. Auch ergeben sich neue Probleme bei Interpretation und Bewertung.

Ungelöste Probleme

Ungelöst bleibt beispielsweise, dass aufgrund in den Forschungsrichtungen unterschiedlicher Zitiergewohnheiten Indikatorenwerte kaum über die Fachgrenzen hinweg vergleichbar sind. So kann ein h-Index von fünf in dem einem Forschungsgebiet sehr hoch sein, während er in einer anderen Forschungsrichtung einen sehr geringen Wert darstellt. Ungelöst bleibt auch die Schwierigkeit, dass sämtliche Zitierungsindikatoren „blind“ gegenüber den Inhalten der Publikationen sind. So weisen etwa zusammenfassende Übersichtsartikel und Reviews in der Regel deutlich höhere Zitierungsraten auf als Artikel, in denen originäre Forschungsergebnisse vorgestellt werden.

Inzwischen bieten verschiedene Datenbanken, wie etwa Scopus oder das Web of Science, die Voraussetzungen, um den h-Index zu ermitteln. Hier ist zu berücksichtigen, dass aufgrund bestehender Unterschiede zwischen den Datenbanken hinsichtlich der registrierten Publikationen die zugrundeliegenden Daten und in der Folge auch die Werte des h-Index variieren. Das bedeutet, es muss stets hinterfragt werden, auf Basis welcher Daten der Indikator ermittelt wurde. Indikatoren, die unter Verwendung unterschiedlicher Datenbanken ermittelt wurden, können nicht einfach verglichen werden. Vielmehr ist darauf zu achten, dass für Vergleiche dieselbe Datenbasis verwendet wird.

Auf einige weitere Schwierigkeiten, die sich aus der Anwendung des h-Index auf individuelle Forschungsleistungen ergeben, sei ebenfalls hingewiesen. Im Verlauf einer Forscherkarriere wächst die individuelle Publikationsliste gewöhnlich. Damit verbunden ist, dass die Publikationen auf dieser Liste vor jeweils unterschiedlich langer Zeit publiziert wurden, also unterschiedlich „alt“ sind. Auch werden Publikationen in aller Regel nicht unmittelbar nach Veröffentlichung zitiert. Vielmehr wächst auch die Zahl der Zitierungen über die Zeit.

Still using HAMA blockers???

LowCross-Buffer®

minimises

- > HAMA problems
- > matrix effects
- > cross-reactivities



Reliable results with economical solutions! Bulk available, please contact us for details!

Liquid Plate Sealer®

- > for long-term stability
- > economically priced
- > Made in Germany



Your coated ELISA plates are stable for years.

CANDOR
Bioscience GmbH

Improve your assays!
www.candor-bioscience.com

LowCross-Buffer® and Liquid Plate Sealer® are registered trademarks of CANDOR Bioscience GmbH.

Die höchste jährliche Zitierungszahl weisen Publikationen, je nach Forschungsrichtung, üblicherweise nach etwa zwei bis fünf Jahren auf. Damit weisen „ältere“ Publikationen in der Regel höhere Zitierungsraten auf als aktuellere Publikationen.

Diese beiden Tatsachen und die sich daraus ergebenden Probleme bei der Ermittlung und Bewertung von Indikatoren lassen sich im Falle größerer Forschungseinheiten und -systeme mittels der Definition fester Zeitfenster für Publikationen und Zitierungen, die bei der Indikatorberechnung verwendet werden, lösen. Bei der Bewertung individueller Forschungsleistungen entfällt diese Möglichkeit indessen. Auch Zitierungsverläufe sind im Falle der Bewertung individueller Forschungsleistungen schwieriger zu handhaben. Bei Bewertungsverfahren sollen idealerweise die aktuelle individuelle Forschungsleistung und die Erfahrung des Wissenschaftlers berücksichtigt werden. Beim h-Index, wie bei allen anderen bibliometrischen Indikatoren, werden aufgrund der zeitlichen Verzögerung zwischen Publikation und Zitierung aktuelle Forschungsleistungen jedoch wenig bis gar nicht und weiter zurückliegende Performanz stärker berücksichtigt.

Faktor Zeit: Lassen sich Entwicklungen beurteilen?

Die Anzahl an Zitierungen pro Publikation wächst im Laufe der Zeit mehr oder weniger stark an. Das bedeutet, dass ein- und dieselbe, unveränderte Publikationsliste zu einem früheren Zeitpunkt stets weniger Zitierungen auf sich vereint als einige Zeit später. Daraus ergibt sich die Problematik, dass auch die Bewertung allein aufgrund des h-Index-Wertes ein- und derselben individuellen Publikationsliste sich im Verlauf der Jahre ändern kann, da sich aus derselben Liste zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche h-Indices ergeben. Inwieweit dies ein Problem darstellt, soll hier an einem Beispiel demonstriert werden. Zu 89 Antragstellenden im Fachgebiet Biologie des Emmy Noether-Programms für Nachwuchsgruppenleiter/innen der DFG wurden deren gesamte Publikationslisten einschließlich des Antragsjahres ermittelt und sämtliche Zitierungen zu diesen Publikationen in der Datenbank Web of Science recherchiert. Die h-Indices wurden zu zwei Zeitpunkten bestimmt: im Antragsjahr und zwei Jahre nach Antragstellung. In Abbildung 2 wurden die jeweils zwei h-Indices als Streudiagramm aufgezeichnet. Jeder Punkt entspricht einem Antragstellenden und der dazugehörigen Publikationsliste. Wenn mehrere Antragstellende dieselben h-Index-Paare aufweisen, wurden diese zu kleinen Rauten getrennt, um auch eine Schätzung der Häufigkeit der Werte zu ermöglichen. Antragstellende mit

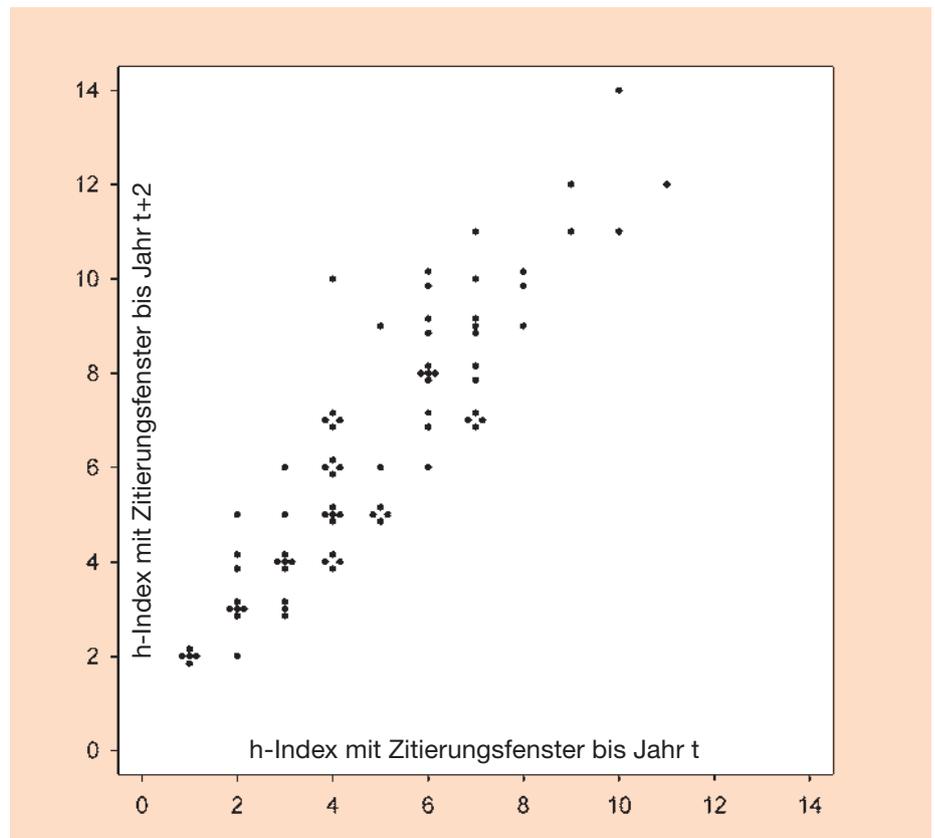


Abb. 2: Die Veränderung des h-Index aufgrund unterschiedlich langer Zitierungsfenster. Untersucht wurden 89 Publikationslisten.

gleichbleibenden h-Index-Werten finden sich auf der Diagonalen des Streudiagramms. Oberhalb der Diagonalen finden sich die Listen, deren h-Index zugenommen hat. Aus Abbildung 2 geht klar hervor, dass sich die h-Indices unterschiedlich entwickelten. Damit stellt sich die Frage, ob und in welchem Maß die unterschiedliche Entwicklung auch zu einer Veränderung der Position oder des Ranges in der Gruppe der Antragstellenden führt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Antragstellenden entsprechend ihrer Indexwerte in Gruppen geteilt: oberes Drittel, Mittelfeld und unteres Drittel. Anschließend wurde untersucht, ob es zu Verschiebungen bei der Zuordnung der Publikationslisten zwischen den drei Gruppen gekommen ist. Das heißt, es wurde untersucht, welche Listen zwei Jahre nach Antrag immer noch gleich bewertet worden wären beziehungsweise welche Veränderungen sich ergeben haben. Es zeigt sich, dass drei Viertel (71) der Publikationslisten zwei Jahre nach Antragstellung durch den h-Index gleich bewertet worden wären und ein Viertel der Listen (18) eine Veränderung der Bewertung erfahren hätte. Es zeigt sich aber auch, dass keine „grundlegenden“ Veränderungen der Bewertung – also Wechsel vom oberen ins untere Drittel oder umgekehrt – vorkommen. Dieses Beispiel zeigt ein bereits aus anderen Kontexten bekanntes Problem: Während

die Indikatoren in der Regel gut dazu geeignet sind, herausragende oder exzellente Forschende zu identifizieren und es auch einfach ist, ungenügende Leistungen zu bestimmen, bleibt die Schwierigkeit in der Bewertung im Bereich des „Mittelfeldes“ bestehen. Indikatorenwerte wie der h-Index können somit bei Bewertungsverfahren und Entscheidungsverfahren für die Bestimmung „eindeutiger“ Bewertungen hilfreich sein. Sie können aber – insbesondere im „Mittelfeld“ – keinesfalls ausschließlich für die Bewertung eingesetzt werden.

Literatur

- [1] Hirsch JE (2005): An index to quantify an individual's scientific research output PNAS 102 (46): 16569-16572
- [2] Adler R., Ewing J., Taylor P.: Citation Statistics, Statistical Science, 2009, Vol. 24, No. 1, 1–14 DOI: 10.1214/09-STS285

Korrespondenzadresse

Dr. Markus von Ins
iFQ - Institut für Forschungsinformation und Qualitätssicherung
Godesberger Allee 90; 53175 Bonn
Tel. :+49-(0)-228 -972 73 18
Fax +49-(0)-228-972 73 49
ins@forschungsinfo.de
www.forschungsinfo.de

PURE – Volkskrankheiten im Fokus

Kai Stühler, Bernd Gröttrup, Barbara Sitek, Christian Stephan, Eckhard Nordhoff, Thomas Brüning, Klaus Gerwert, Jens Wiltfang, Helmut E. Meyer, Ruhr-Universität Bochum

An der Ruhr-Universität Bochum entsteht mit mehr als 37 Millionen Euro Landesförderung das Europäische Proteinforschungsinstitut PURE (Protein Research Unit Ruhr within Europe). Rund 100 Forscher und praktische Mediziner werden in dem neuen Forschungszentrum daran arbeiten, Volkskrankheiten wie beispielsweise Krebs möglichst frühzeitig erkennen und behandeln zu können. Außerdem forscht das Institut nach schonenden Verfahren zur Früherkennung von Alterungskrankheiten wie Alzheimer und Parkinson.



Abb. 1: Nordrhein-Westfalens Innovationsminister Prof. Dr. Andreas Pinkwart (2.v.li.) Mitte Dezember 2009 bei der Gründung von PURE an der Ruhr-Universität Bochum (v.li.): Prof. Dr. Klaus Gerwert (Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum), Prof. Dr. Elmar Weiler (Rektor Ruhr-Universität Bochum), Prof. Dr. Helmut E. Meyer (Medizinisches Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum), Prof. Dr. Thomas Brüning (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV), Prof. Dr. Jens Wiltfang (LVR Klinikum Essen, Kliniken und Institut der Universität Duisburg-Essen)

Federführend beteiligt an PURE mit seinem Sprecher Prof. Dr. Klaus Gerwert sind Forscher von der Ruhr-Universität Bochum (RUB) und der Universität Duisburg-Essen: Prof. Dr. Thomas Brüning (Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IPA), Institut der RUB), Prof. Dr. Klaus Gerwert (Lehrstuhl Biophysik der RUB, Fellow der Max-Planck Gesellschaft), Prof. Dr. Helmut E. Meyer (Medizinisches Proteom-Center der RUB) und Prof. Dr. Jens Wiltfang (LVR-Klinikum Essen, Universität

Duisburg-Essen). Das onkologisch-klinische Studienzentrum (Prof. Dr. Wolff Schmiegel, Prof. Dr. Dirk Strumberg und Prof. Dr. Andrea Tannapfel) ist Bestandteil des regionalen Klinikverbundes in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitscampus und wird unter dem Dach von PURE eingerichtet. In enger Zusammenarbeit mit dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Bonn sollen darüber hinaus neuartige Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen identifiziert werden. PURE ist offen für wei-

tere Initiativen der molekularen Medizin und für Firmengründungen.

Proteinforschungszentrum für die Biomarkerentwicklung

Das Konzept von PURE basiert auf der Tatsache, dass sich praktisch alle Erkrankungen auf defekte Gene oder ihre Proteinprodukte zurückführen lassen. Proteine regeln sämtliche Lebensprozesse in der Natur und bestimmen unter anderem auch das Wachstum oder die Teilung der Zellen. Proteine sind wegen ihrer Regelfunktion von größtem Interesse für die Wissenschaft und für die medizinische und biotechnologische Anwendung. Durch rasante technische Fortschritte in der Proteomanalytik und der molekularen Biospektroskopie kann heute mit einer bisher unerreichten Empfindlichkeit analysiert werden, wie Proteine arbeiten, interagieren und welche Prozesse sie steuern. Jedoch klafft eine große Lücke zwischen der detaillierten Analyse und dem Verständnis der Proteininteraktionen in der Grundlagenforschung sowie der schnellen Umsetzung und dem Transfer dieses aktuell erworbenen, beziehungsweise vorhandenen Wissens in den medizinischen Alltag und die Praxis. Proteine, die als Biomarker eine Krankheit oder deren Progression spezifisch charakterisieren, sind sowohl für die medizinische Forschung als auch für den Diagnostikbereich hochinteressant und haben nach Einschätzung führender Wirtschaftsforscher großes marktwirtschaftliches Potential im Zukunftsmarkt der Biotechnologie.

Engpass Translation

Seit Jahrzehnten werden Proteinbiomarker in der klinischen Diagnostik angewendet. Allerdings sind ihre Anzahl und Indikationsbereiche noch äußerst begrenzt. Aufgrund ihrer geringen diagnostischen Sensitivität, Spezifität und Validität können Sie darüber hinaus nur in wenigen Fällen im Rahmen von Früherkennungsprogrammen in größeren Populationen eingesetzt werden. Seit Beginn der Proteom-Ära vor 11 Jahren konnten neben den bereits existierenden und teilweise immer noch umstrittenen Markern (z. B. PSA für die Früherkennung von Prostata-tumoren) keine weiteren Proteinbiomarker zur Marktreife und Zulassung gebracht werden. Eine Ausnahme sind hier die Demenzbiomarker im Nervenwasser (lumbaler Liquor) für die Früh- und Differenzialdiagnose der Alzheimerdemenz, die 2010 Eingang in die nationalen Leitlinien der neuropsychiatrischen Fachgesellschaften (DGN, DGPPN) zur Diagnostik und Therapie von Demenzerkrankungen gefunden haben. Der Hauptgrund für die mangelnde Umsetzung des vorhandenen Wissens in den klinischen Alltag liegt darin, dass bislang viel zu wenig auf integrierte Ansätze geachtet wurde, die das Verständnis der jeweiligen Erkrankung mit den

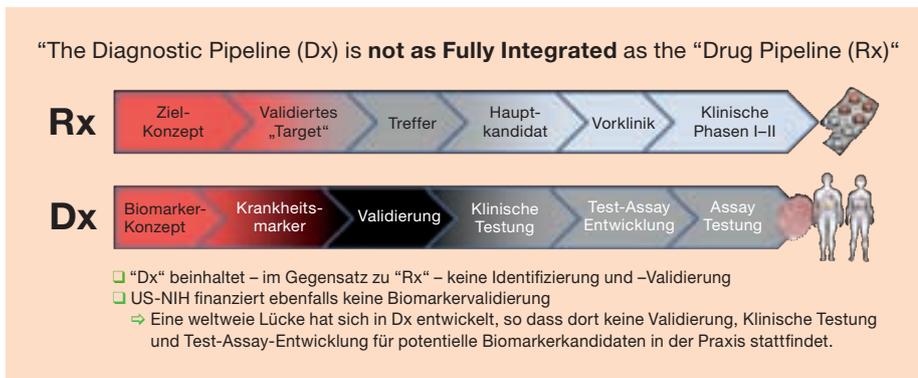


Abb. 2: Aktuelle Situation hinsichtlich der unterschiedlich weit fortgeschrittenen Ansätze zur Entwicklung und Validierung von Medikamenten („Drug Pipeline“, Rx) und Biomarkern („Diagnostics Pipeline“, Dx), aus dem Englischen übersetzt und angepasst von: Leigh Anderson, Plasma Proteome Institute, 2008.

technischen Möglichkeiten kombinieren. Hierbei ist sicher ein entscheidender Punkt, dass derzeit keine Verbindung zwischen identifizierten Biomarkerkandidaten und deren Stratifizierung und Validierung im klinischen Alltag stattfindet, wie sich dies bereits seit Jahrzehnten erfolgreich bei der Entwicklung und Zulassung und Prüfung von Medikamenten bewährt hat (Abb. 2). Ursächlich hierfür ist auf der einen Seite, dass die beiden Schritte Stratifizierung und Validierung zur Marktreife eines potentiellen Biomarkers einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Aufwand darstellen und sich der tatsächliche Nutzen eines Biomarkers für die Bevölkerung und das Gesundheitswesen erst nach dessen Überprüfung im Feld unter Realbedingungen („real world scenario“) erschließt. Dass die Biomarkerentwicklung daher nicht mit dessen Identifizierung im Labor, sondern erst nach Entwicklung geeigneter Testverfahren für die Praxis und deren Prüfung im Feld *per se* abgeschlossen ist, ist bislang noch nicht ins Bewusstsein der Mehrzahl der Forscher gedrungen. Auf der anderen Seite gibt es in Deutschland kaum Wagniskapitalgeber, die bereit wären, diesen Hochrisikoweg über Jahre mitzugehen. Darüber hinaus lässt es die Eigenkapitalausstattung kleiner Biotech-Firmen nicht zu, solche Projekte aus eigenen Mitteln in Angriff zu nehmen. Diese Hindernisse sollen durch das Zusammenführen internationaler Spitzenforschung sowohl im Grundlagenbereich als auch in der angewandten klinischen Forschung in PURE beseitigt werden.

Fokussierung auf Krebs und neurodegenerative Krankheiten

PURE fokussiert sich zunächst auf Erkrankungen, die sich mittel- und langfristig aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung sowohl in Deutschland als auch weltweit häufen werden: Krebs und neurodegenerative Erkrankungen. Beide Indikationsfelder zählen zu den Volkskrankheiten, die eine Quelle großen menschlichen Leids, aber auch von enormer so-

zioökonomischer Bedeutung sind. Dazu zählen sowohl die hohen Therapiekosten auf Seiten der Krebserkrankungen als auch die notwendigen Kosten im Rahmen der intensiven und dauerhaften Betreuung bis hin zur Pflege von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen. Die Bekämpfung dieser Krankheiten im Sinne einer erfolgreichen Primär- und Sekundärprävention ist damit von übergeordneter ethischer und sozialer, aber auch ökonomischer Bedeutung. PURE bietet dazu mit der vorgeschlagenen Einrichtung eines Europäischen Proteinforschungszentrums einen weltweit innovativen, spezifischen und integrativen Forschungsbeitrag zur Früherkennung dieser Erkrankungen mittels Biomarkeridentifizierung durch Plattformtechnologien und deren anschließende Validierung in großangelegten Feldstudien.

Bündelung von Expertise

Um dies zu erreichen, werden von Beginn an schrittweise vier etablierte Expertisen in PURE zusammengeführt. Prof. Helmut E. Meyer wird die proteomanalytischen Studien leiten. Er hat das Medizinische Proteom-Center (MPC) an der Ruhr-Universität Bochum aufgebaut. Dort werden bereits modernste proteomanalytische Studien durchgeführt. Prof. Meyer ist ein international anerkannter Proteomforscher, der unter anderem die weltweit ausgerichtete Proteomorganisation HUPO (Human Proteome Project) mitorganisiert. Innerhalb der proteomanalytischen Arbeiten ist Prof. Jens Wiltfang für die neuroproteomischen Arbeiten zur Identifizierung innovativer Proteinbiomarker für neurodegenerative Erkrankungen zuständig. Seine Arbeitsgruppe nimmt in der neuroproteomischen Identifizierung von Demenzbiomarkern eine international führende Stellung ein, und er ist innerhalb des HUPO für die Identifizierung hirnspezifischer Proteine in humanen Körperflüssigkeiten zuständig. Weiterhin sollen die in der Grundlagenforschung bereits sehr erfolgreich eingesetzten ultra-sensitiven fluoreszenz- und vibrationspektroskopischen Imaging-Metho-

den weiterentwickelt und durch PURE in die Anwendung überführt werden. Prof. Klaus Gerwert hat am Lehrstuhl für Biophysik der RUB insbesondere vibrationspektroskopische Methoden erfolgreich zur Untersuchung von Proteininteraktionen eingesetzt und international beachtete Ergebnisse erzielt. In bisherigen Ansätzen der Biomarkerforschung werden entweder massenspektrometrische oder spektroskopische Methoden zur Probenanalyse eingesetzt. Durch das Zusammenführen der beiden analytischen Techniken in PURE erwarten wir synergistische Effekte; insbesondere weil die Datenanalyse dann in einer gemeinsamen Bioinformatik- und Biostatistik-Abteilung in PURE durchgeführt wird. Die hierdurch erstmalig globale bioinformatische Analyse themenübergreifender Daten (genomisch, proteomisch, metabolomisch etc.) ist ein zusätzlicher Vorteil, der sich aus dem Zusammenschluss dieser Expertisen ergibt. Damit verbunden sind neue Einsichten durch die Kombination der Daten zu erwarten.

Eine weitere wesentliche Voraussetzung für den Erfolg von PURE wird aber auch eine standardisierte Probengewinnung sein. Die Qualität der Analysen hängt stark von der Probenqualität selbst ab. Prof. Thomas Brüning, Direktor des Instituts für Prävention und Arbeitsmedizin (IPA) in Bochum hat eine ausgewiesene Expertise in molekular-epidemiologischer Präventionsforschung. Er wird ein plattformübergreifendes, wissenschaftliches Studienzentrum aufbauen, über das Patientenproben qualitätsgesichert gewonnen, charakterisiert und für die nachfolgenden proteinanalytischen Studien vorbereitet werden. Zudem wird er dafür Sorge tragen, dass die wissenschaftlich-epidemiologischen Daten zu den Patienten individuell und nach allen gesetzlich vorgeschriebenen ethischen Standards gesammelt werden. Das IPA hat Zugang zu großen Hochrisikokollektiven aus unterschiedlichen Branchen mit Expositionen gegenüber kreberzeugenden Substanzen. Derartige Hochrisikokollektive eröffnen aufgrund des höheren Krebsrisikos im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung die Möglichkeit, Biomarker der Krankheitsentstehung gezielter und effektiver zu erforschen. Dies verschafft PURE ein weiteres globales Alleinstellungsmerkmal.

Zusammenfassend wird mit PURE erstmals ein umfassendes Konzept zur Biomarkeridentifizierung und -entwicklung realisiert und institutionalisiert, von dem erwartet wird, dass es die Entwicklungszeiten für neue Biomarker erheblich verkürzt.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Helmut E. Meyer
Medizinisches Proteom-Center
Ruhr-Universität Bochum
Universitätsstr. 150
44801 Bochum
helmut.e.meyer@rub.de

Marktübersicht: miRNA-Quantifizierung

Spätestens seit microRNAs mit Volkskrankheiten wie Krebs und dessen Metastasierung in Verbindung gebracht werden, ist die quantitative Erfassung der micro-RNA-Expression in der Zelle ein Thema für viele Wissenschaftler in Grundlagenforschung und Klinik. Bestimmen doch die Gleichgewichte der Genregulatoren über wichtige krebsrelevante Prozesse. Entsprechend gibt es einen Markt. Welche Technologien die Anbieter in Ihrem Produkt- und Service-Portfolio anbieten, haben wir in dieser Marktübersicht zusammengestellt*.

Firma/Kontakt	<p>Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis Hewlett-Packard-Str. 8 76337 Waldbronn</p> <p>Agilent miRNA microarray</p> <p>Microarray</p> <p>Agilent's microRNA microarray platform measures the relative expression of all known miRNAs. Using an innovative probe design Agilent has developed a sensitive method for distinguishing individual miRNAs from one another. Agilent offers one of the most reproducible systems on the market and requires only minimal sample input (only 100 ng of Total RNA). Samples are directly labeled eliminating the need for amplification or fractionation which can induce bias. Both catalog and custom content are available for all miRs listed in the miRBase database making Agilent one of the most flexible, sensitive, reproducible systems on the market.</p>	<p>BioCat GmbH Im Neuenheimer Feld 584 69120 Heidelberg Tel.: +49-(0)6221-7141516 Fax: +49-(0)6221-7141529 info@biocat.com www.biocat.com Dr. Elke Gamer</p> <p>Human, Mouse or Rat Genome Wide MicroRNA 384-well qRT-PCR Arrays</p> <p>Real-time qPCR</p> <p>Die in der total-RNA enthaltene microRNA wird mit QuantimiMi-Technologie getagget und in cDNA umgeschrieben: poly(A) wird ans 3'-Ende angehängt und dann die reverse Transkription über oligo(dT) Adapter-Primer initiiert. Die so generierte cDNA dient als Template für die anschließende real-time qPCR mit microRNA-spezifischem Forward Primer und universellem Reverse Primer. Die microRNA-spezifischen Primer werden in 384-well Platten „arrayed“ geliefert.</p>	<p>Biomol GmbH 22769 Hamburg Waidmannstr. 35 www.biomol.de Dr. Edgar Lipsius Tel.: +49-(0)40-853260-37</p> <p>RT2 miRNA PCR Array System</p> <p>SYBR Green-basierte qPCR Arrays</p> <p>miRNA-Expressionsanalyse mit drei optimal aufeinander abgestimmten Komponenten: PCR-Arrays mit lyophilisierten PCR-Primern im 96-Well oder 384-Well-Format - RT2 miRNA First Strand Kit für die reverse Transkription RT2-qPCR SYBR Green Master Mix</p>
Menge des benötigten Ausgangsmaterials	100 ng total RNA recommended	10 pg bis 10 ug total RNA	50 bis 400 ng miRNA pro Array
Qualitätskontrollen	Spike-in kit to monitor labeling and hybridization efficiency QC report – Array level quality control metrics generated for each hybridization.	Endogene Referenz-RNA-Kontrollen (hsa-U6, RNU43 & U1) für Normalisierung in jeder Platte enthalten	Überprüfung der Effizienz und Sensitivität, Spezifitätstests durch Schmelzkurvenanalytik
Spezies/customized	Three Catalog products: Human, Mouse, Rat Custom Offerings: All organisms listed in miRBase	Genome Wide MicroRNA 384-well qRT-PCR Arrays werden für die Spezies Mensch, Maus und Ratte angeboten. microRNA Expression Profiling wird auch im Kundenauftrag durchgeführt.	Mensch, Maus, Ratte individuelle Gen-Zusammenstellung möglich
Besonderheiten/Extras	Compatible with FFPE samples. 8 arrays per slide for higher throughput	microRNA Primer Design basierend auf microRNA-Einträgen in der Sanger miRBase Version 14 Alle microRNAs, auch miR*, repräsentiert Hohe Sensitivität - akkurate Quantifizierung auch bei nur 10 pg total RNA Ausgangsmaterial Dynamischer Bereich >6 logs Alle Reagenzien, die für die Konversion der microRNA aus 20 verschiedenen total RNA-Proben in quantifizierbare cDNA mittels QuantiMiMi-Technologie benötigt werden, im Kit enthalten Hohe Ausbeute – 1 cDNA-Synthesereaktion ausreichend für 5000 qPCRs Für Hochdurchsatzanalyse geeignet Freie Analysesoftware Cancer und Stem Cell microRNA qRT-PCR Arrays auch verfügbar	höchste Sensitivität und Spezifität durch optimiertes Primer-Design in verschiedenen Formaten für alle gängigen PCR-Cycler vorhanden Einzel-Assays für individuelle miRNAs ebenfalls erhältlich
Preis		Human Genome Wide MicroRNA 384-well qRT-PCR Array 1.498 Euro Mouse Genome Wide MicroRNA 384-well qRT-PCR Array 1.398 Euro Rat Genome Wide MicroRNA 384-well qRT-PCR Array 998 Euro	miRNA PCR Array Set: ab 563 Euro miRNA First Strand Kit: 225 Euro qPCR Master Mix: 249 Euro

<p>Firma/Kontakt</p> <p>Combimatrix Corp. Vertrieb Deutschland: Biozym Scientific GmbH 31840 Hess. Oldendorf www.biozym.com Dr. Monika Burbach Tel.: +49-(0)5152-9020 support@biozym.com</p>	<p>Febit biomed GmbH Im Neuenheimer Feld 519 69120 Heidelberg marcus.rothe@febit.de www.febit.com Dr. Marcus Rothe</p>	<p>IMGM Laboratories GmbH Lochhamer Str. 29 82152 Martinsried Tel.: +49-(0)89-895578-40 Fax: +49-(0)89-895578-41 www.imgm.com info@imgm.com Dr. Ralph Oehlmann</p>
<p>Produktname</p>	<p>Combimatrix Custom Arrays</p>	<p>Agilent miRNA Microarray</p>
<p>Art der eingesetzten Plattform</p>	<p>Microarray</p>	<p>Microarray (Agilent Technologies)</p>
<p>Beschreibung des Produktes</p>	<p>Species Specific MicroRNA Arrays: Format: 4 x 2K. Die Synthese der Sonden erfolgt in einem elektrochemischen Verfahren direkt auf dem Halbleiter-Chip. Das Auslesen der Arrays erfolgt wahlweise mit Standard Microarray-Scannern oder mit dem ElectraSense Reader von Combimatrix (elektrochemisches Ausleseverfahren).</p>	<p>Aktuell (V3) 8x15K Oligonucleotide Microarrays, basierend auf Sanger miRBase v12.0 (das nächste Update wird Sanger miRBase v14.0 abbilden) direktes Endlabeling über Cyanine-3-pCp</p>
<p>Menge des benötigten Ausgangsmaterials</p>	<p>0,5 bis 2 µg gelabelter Target-RNA pro Array</p>	<p>100ng Gesamt-RNA je Probe</p>
<p>Qualitätskontrollen</p>	<p>Jeder Array durchläuft Qualitätskontrolle</p>	<p>Agilent BioAnalyzer, miRNA Spike-In, Agilent Feature-Extraction Software Validierung per TaqMan® MicroRNA Assays and TaqMan® MicroRNA Arrays wird ebenfalls angeboten</p>
<p>Spezies/customized</p>	<p>z. B. Mensch, Maus, Ratte und customized</p>	<p>Mensch, Maus, Ratte, Custom über eArray</p>
<p>Besonderheiten/Extras</p>	<p>Die Arrays können viermal verwendet werden (Entfernung der Targets mit speziellen „Stripping-Kits“.</p>	<p>Vollservice oder einzelne Module (RNA Isolierung, Markierung und Hybridisierung, Datenextraktion, Bioinformatik) IMGM Laboratories ist Agilent Certified Service Provider (CSP) für Microarray-basierte genomische Analysen</p>

<p>Firma/Kontakt</p>	<p>Microsynth AG Schützenstr. 15 CH-9436 Balgach Tel.: +41-(0)71-7228758 Fax.: +41-(0)71-7228758 Christof Wunderlin christof.wunderlin@microsynth.ch</p>	<p>Microsynth AG Schützenstr. 15 CH-9436 Balgach Tel.: +41-(0)71-7228333 Fax.: +41-(0)71-7228758 Dr. Johannes Haugstetter johannes.haugstetter@microsynth.ch</p>	<p>Miltenyi Biotec GmbH Friedrich-Ebert-Straße 68 51429 Bergisch Gladbach Tel.: +49-(0)2204-8306-0 Fax: +49-(0)2204-85197 mcs@miltenyibiotec.de www.miltenyibiotec.com</p>	<p>Invitrogen GmbH (Part of Life Technologies) Frankfurter Str. 129B 64293 Darmstadt euroinfo@invitrogen.com www.Invitrogen.com, Tel.: 0800-083-09-02 Fax: 0800-083-34-35</p>
<p>Produktname</p>	<p>454 sequencing service</p>	<p>PCR- und Real Time PCR-Service</p>	<p>miRxplore™ Microarray Kits and Services miRxplore™ Universal Reference</p>	<p>TaqMan® MicroRNA-Assays</p>
<p>Art der eingesetzten Plattform</p>	<p>Sequenzierung von RNA und DNA</p>	<p>Einsatzgebiete: Qualitative und/oder quantitative (Real Time) PCR-Analysen, z. B. zur Qualitätsicherung, Target-Validierung, Genexpressionsanalyse</p>	<p>Microarray</p>	<p>TaqMan® Assay-Chemie, RT-PCR</p>
<p>Beschreibung des Produktes</p>	<p>Projektentwicklung und -beratung Library-Präparationen aus RNA und DNA 454 Sequenzierung Datenanalyse wie z.B. Assembly oder Mapping der Daten. Technische Daten: 454 Sequenzierung mit dem Genome Sequencer FLX von Roche mit den GS Titanium-Reagenzien Zertifizierung nach ISO 9001:2000.</p>	<p>Projektentwicklung und -beratung DNA- und RNA-Präparationen (Real Time) PCR-Assay-Entwicklung Synthese von Primer-Probe-Sets Validierung von PCR-qPCR-Assays Probenanalyse und Auswertung im Hochdurchsatz. Technische Daten: Automatisierte Probenaufbereitung (Tecan, Qiagen), Analyse mit Geräten von ABI, Roche und Qiagen. Zertifizierung nach ISO 9001:2000 und Akkreditierung der analytischen Abteilungen nach ISO 17025 (STS 429).</p>	<p>miRxplore™ Microarrays für die parallele und exakte Bestimmung aller bekannten microRNAs für Mensch, Maus, Ratte und viraler microRNAs (miRBase 14.0) als Kit oder Microarray-Service verfügbar miRxplore™ Universal Reference ist ein Pool von über 950 synthetisch hergestellter microRNAs, die im äquimolaren Verhältnis konzentriert sind und die eine absolute Quantifizierung der microRNA-Kopienzahl in der Probe ermöglicht.</p>	<p>Taqman®-Assay, einfache 2-Schritt-Reaktion, einmal reverse Transkription mit einem spezifischen miRNA Primer (basiert auf dem Sanger miRBase-Register), gefolgt von einer qRT-PCR Reaktion mit einer Taqman®-Probe. Die Assays detektieren einfach und schnell reife microRNAs, nicht deren Precursor innerhalb von drei Stunden.</p>
<p>Menge des benötigten Ausgangsmaterials</p>				<p>1 bis 10 Nanogramm Total RNA</p>
<p>Qualitätskontrollen</p>			<p>72 Spike in Kontrollen: Negative mismatch-Kontrollen (13), Positivkontrollen (36), Hybridisierungskontrollen (5), Kalibrierungskontrollen (18)</p>	<p>Taqman® MicroRNA Endogenous Control Assays für die interne Kontrolle vorhanden</p>
<p>Spezies/customized</p>			<p>Mensch, Maus, Ratte, virale microRNAs, customized</p>	<p>Human, Maus, Drosophila, C. elegans, Arabidopsis sowie customized Assays (homepage)</p>
<p>Besonderheiten/Extras</p>	<p>Umfangreicher Service im Bereich DNA- & RNA-Synthese, DNA-Sequenzierung und Genotyping. Weitere Informationen unter www.microsynth.ch.</p>	<p>Umfangreicher Service im Bereich DNA- & RNA-Synthese, DNA-Sequenzierung und Genotyping. Weitere Informationen unter www.microsynth.ch.</p>	<p>Erste Microarray-basierte Plattform zur globalen, absoluten Quantifizierung von microRNAs (Bissel et al., RNA. 2009 Dec;15(12):2375-84. Epub</p>	<p>sehr spezifisch, sensitiv, skalierbar</p>
<p>Preis</p>				

Neustart: Von der Uni in die Selbständigkeit

Dr. biol. hum. Stephan Paxian, Science Gate, Menden, info@Science-Gate.net

Nach wissenschaftlichen Stationen in Ulm und Post-doc- beziehungsweise Gruppenleiter-Stationen in München, Braunschweig und Münster gab ein erneut anstehender Laborumzug von Münster nach Bonn den Anstoß, nach neuen Betätigungsfeldern jenseits der Universitätskarriere in der neurologisch-klinischen Forschung zu suchen. Die Idee, ein eigenes Mikroununternehmen zu eröffnen, ist nicht immer ein einfacher und vor allem kein geradliniger Weg. Und so brauchte es nach Gesprächen mit Freunden und Kollegen sowie Bewerbungen bei Biotech-Unternehmen einige Zeit, bis der Entschluss stand, ein eigenes Internetportal ins Leben zu rufen, das speziell auf die Bedürfnisse von Biowissenschaftlern und die klinische- und Grundlagenforschung zugeschnitten ist. Ein Portal für den gezielten und effizienten wissenschaftlichen Austausch in verschiedenen Disziplinen und das so wichtige Networking soll es sein, wenn es in diesem Sommer freigeschaltet wird.

Nicht immer ein geradliniger Weg

Eine eigene bescheidene Homepage mit Informationen zu Life-Sciences- und Research Tool-Anbietern, Meetings, Journals etc. war bereits aus Post-doc-Zeiten vorhanden. Die Seite hatte ich damals vor allem angelegt, um Zeit bei der Informationssuche aus vielen verstreuten Quellen zu sparen.

Über die Möglichkeit, eine geförderte Existenzgründung daraus zu machen, machte ich mir aber erst Gedanken, nachdem ich mich über die Möglichkeiten bei der Industrie- und Handelskammer informiert hatte. Die Aussichten für ein Portal, das Wissenschaftler mit gemeinsamen Forschungsinteressen zusammenbringt, erschienen gut: Gibt es doch auf Portalen, die damit werben, Millionen von Forschern zusammenzubringen, relativ durchgängig nur wenig Datenverkehr und Austausch. Offenbar gelingt es nicht ausreichend, die spezifischen Bedürfnisse einzelner Gruppen, zu bedienen, wie etwa in den Life Sciences.

Rückblickend auf meine Beschäftigungen an Universitäten, Kliniken und wissenschaftlichen Einrichtungen, dem Arbeiten in verschiedenen Fachgebieten, vorhandenen Zusatzqualifikationen und nach intensiver Diskussion mit Fachkollegen schien die Erfahrung groß genug, ein eigenes Projekt in diesem Feld zu wagen und mit Hilfe der

Industrie- und Handelskammer einen Finanzierungs- und Businessplan zu erarbeiten sowie mit den Fachkollegen – also den künftigen Nutzern des angedachten Webportals – Daten zum Markt und den Zielgruppenbedürfnissen zu erheben beziehungsweise abzustimmen.

Erste Schritte...

Ich besuchte also den für förderwillige Mikrounnehmer obligatorischen Kurs für Existenzgründer am Startercenter der IHK. Diese Startercenter sind speziell für Neugründungen eingerichtet und begleiten Gründungswillige mit zahlreichen Informationsangeboten in ihre Selbständigkeit.

Parallel dazu liefen Auftragsarbeiten, wie der Aufbau eines Content Management Systems (CMS) an, mit dem die großen Datenbanken und zahlreichen Verlinkungen des Web-Angebotes beherrschbar werden. Ein Steuerbüro prüfte den Business- und Finanzierungsplan, der für die ersten drei Jahre stehen und der alle planbaren Einnahmen und Ausgaben umfassen muss. Und nach zweimonatiger Suche war auch ein auf internationales Internetrecht spezialisiertes Rechtsanwaltsbüro gefunden, das die AGBs, Disclaimer etc. prüfte. Dazu kamen langwierig abgestimmte Arbeiten einer von mir engagierten Grafik-Designerin, die auf Webgestaltung spezialisiert war.

Plan und Realität

Wichtig in dieser Phase ist vor allem der Faktor Zeit. Denn alles dauert deutlich länger, als es bei der ersten Planung aussieht. Das doppelte der geplanten Zeit sollte man getrost als Puffer einplanen, bevor der Schritt in die Selbständigkeit tatsächlich getan ist. Und natürlich auch ein entsprechendes finanzielles Polster haben, wenn auch vieles improvisiert werden kann. Den Business- und Finanzierungsplan ließ ich zum Beispiel kurzerhand von meiner Lebensgefährtin – einer studierten Betriebswirtin – auf Herz und Nieren überprüfen und vor dem Gang zum Steuerbüro absegnen. Von diesem ist nämlich eine Art Unbedenklichkeitsbescheinigung bezüglich der Unternehmensgründung gefordert, will man den Zuschlag zu einer



Mein Biologie-Studium und Diplom absolvierte ich an der Universität Hohenheim und dessen Lebensmitteltechnologischem Institut. Während meiner Promotionszeit bis 2002 in der Gastroenterologie an der Universitätsklinik Ulm, verbrachte ich mehrere Monate als Gastwissenschaftler an der TU München und dem damaligen GSF Forschungszentrum, heute Helmholtz-Zentrum München. 2003 wechselte ich für drei Jahre als Projektleiter an die GBF das heutige Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung nach Braunschweig. Von 2006 bis 2008 arbeitete ich in der neurologischen Forschung des Universitätsklinikums Münster als Gruppenleiter und stellvertretender Tierstallleiter. Ende 2008 gründete ich das Unternehmen Science-Gate und machte mich selbständig.

geförderten Existenzgründung für maximal 9 + 6 Monate erhalten.

Alle Bescheinigungen für den Antrag auf Existenzgründung zusammenzutragen, dauerte von der Idee bis zur Genehmigung inklusive Abstimmung mit der IHK vier Monate. Der Antrag wurde genehmigt, das Gewerbe als Einzelunternehmen offiziell angemeldet, und die Arbeiten konnten endlich beginnen.

Immer einzuplanen ist, dass Dinge sich verzögern. Mein erster Programmierer bekam etwa Probleme mit der Gewerbeaufsicht und neue Programmierer mussten erst einmal gefunden werden. Schnell hatte sich das Projekt auch zu einer 7 Tage/10 Stunden-Beschäftigung ausgewachsen. Aktuell ist eine Medienagentur mit der Programmierung einer Mitgliedschaft und der Suchmaschinenoptimierung beschäftigt. Nach deren Fertigstellung – nach geplanten 6 Monaten und tatsächlichen 1,5 Jahren Vorlaufzeit und einer Investition eines fünfstelligen Betrages – wird sich dann zeigen, ob das Konzept aufgeht und sich der Schritt in die Selbständigkeit, der damit verbundene Idealismus, das Durchhaltevermögen und der Einsatz ehemaliger Arbeitskollegen und sehr vieler privater Mittel tatsächlich gelohnt haben.

Akademischer Stellenmarkt

Veröffentlichen Sie Ihre Stellenanzeigen zielgruppengerecht in unserem akademischen Stellenmarkt (auch online), der allen nicht-kommerziellen Instituten für ihre Stellenausschreibungen kostenlos zur Verfügung steht. Bitte senden Sie dazu Ihre Anzeige (1/4 Seite 90 mm breit x 122,5 mm hoch, Logo-jpg oder tiff, 300 dpi Auflösung) an a.macht@biocom.de. Annahmeschluss für die nächste LABORWELT-Ausgabe „Zellbiologie“ (Erscheinungstermin 28.04.2010) ist der 16. April 2010.

Karriere beginnt bei uns



W3 Universitätsprofessur Angewandte Mikrobiologie

Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften

Zum 01.10.2010 wird eine Persönlichkeit gesucht, die dieses Fach in Forschung und Lehre vertritt.

Umfassende Kenntnisse der Physiologie und Genetik von Mikroorganismen werden vorausgesetzt. Besonders erwünscht sind Erfahrungen im Bereich der funktionellen Genomik und Systembiologie mit dem Schwerpunkt der Stoffumwandlung und -produktion mit maßgeschneiderten Mikroben (Pro- oder Eukaryoten). Die Ausrichtung der Forschungsfelder sollte industriell wichtige Produkte umfassen und auf deren Produktion im technischen Maßstab abzielen. Die Beteiligung an laufenden Vorhaben der RWTH Aachen auf dem Gebiet des „Metabolic Engineering“ von Mikroorganismen, insbesondere im Exzellenzcluster „Tailor-made fuels from Biomass“, wird erwartet. Darüber hinaus sollen zukünftige interdisziplinäre Kooperationsmöglichkeiten mit Partnern aus den Natur- und Ingenieurwissenschaften der RWTH Aachen und des Forschungszentrums Jülich aufgezeigt werden. In der Lehre wird eine Beteiligung an der Ausbildung in Mikrobiologie und Genetik in den konsekutiven B.Sc./M.Sc.-Studiengängen Biologie und Biotechnologie/Molekulare Biotechnologie sowie im Lehramtsstudium erwartet. Die Bereitschaft zur Mitarbeit in der Hochschulselbstverwaltung wird vorausgesetzt.

Voraussetzungen sind ein abgeschlossenes Universitätsstudium, Promotion und zusätzliche wissenschaftliche Leistungen, die durch eine Habilitation, im Rahmen einer Juniorprofessur, einer wissenschaftlichen Tätigkeit an einer Hochschule, Forschungseinrichtung, in Wirtschaft, Verwaltung oder einem anderen gesellschaftlichen Bereich erbracht wurden. Des Weiteren werden hervorragende Publikationsleistungen, eine herausragende Drittmittelerwerbung sowie nachgewiesene sehr gute didaktische Fähigkeiten erwartet.

Den Bewerbungsunterlagen sollen Belege über Lehrerfolge beigelegt werden.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an den
Dekan der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
Prof. Dr. U. Simon
Templergraben 55
52062 Aachen

Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Gleichstellung von Mann und Frau mit dem „Total-E-Quality-Award“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen von Frauen sind ausdrücklich erwünscht. Bei gleicher Eignung, Befähigung und fachlicher Leistung werden Frauen in den Entgeltgruppen bzw. Laufbahnen, in denen eine Unterrepräsentanz von Frauen besteht, bevorzugt berücksichtigt, sofern nicht in der Person eines Mitbewerbers liegende Gründe überwiegen. Auf § 8 Abs. 6 Landesgleichstellungsgesetz NW wird verwiesen.

Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Ausbildung und Beschäftigung schwerbehinderter Menschen mit dem „Prädikat behindertenfreundlich“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen geeigneter schwerbehinderter Menschen sind ausdrücklich erwünscht. Dies gilt auch für Gleichgestellte im Sinne von § 2 SGB IX.

Paul-Ehrlich-Institut

Paul-Ehrlich-Straße 51-59, 63225 Langen
Telefon (06103) 77-1100

Das Paul-Ehrlich-Institut ist eine wissenschaftliche Einrichtung des Bundes, das als Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel zuständig ist und auf den damit verbundenen Gebieten der Lebenswissenschaften (z. B. Virologie, Bakteriologie, Allergologie, Immunologie, Medizinische Biotechnologie, Hämatologie) Forschung betreibt.

Zum nächstmöglichen Zeitpunkt ist im Fachgebiet 1/4 – Biostatistik – der „Abteilung EU-Kooperation / Mikrobiologie“ die Stelle einer/eines

Doktorandin/Doktoranden

Stellenbewertung: E 13/2 TVöD

Bewerbungskennziffer: 09 / 2010

zu besetzen.

Aufgabenprofil:

Der/die Doktorand(in) wird im Rahmen eines Verbundprojektes in Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet HIV, AIDS, die Evolution von HI-Viren in Patienten mit bio-informatischen und mathematischen Methoden untersuchen. Hierzu sind zunächst umfangreiche Analysen der vorliegenden longitudinalen Patientendaten notwendig, die insbesondere phylogenetische Analysen der HIV-Evolution umfassen. Die Datenanalyse soll durch ein mathematisches Modell und Computersimulationen ergänzt werden. Mithilfe des Modells sollen *in silico*-Fallstudien durchgeführt werden, die u.a. den Einfluss von Therapieschemata auf die Virus-Evolution untersuchen sollen.

Wir bieten ein offenes und interdisziplinäres Umfeld, in dem die Umsetzung eigener Ideen gefördert wird.

Anforderungsprofil:

- Abgeschlossenes Hochschulstudium (Diplom, Master oder vergleichbarer Abschluss) im Bereich Mathematik, (Bio-)Informatik, Physik oder einer verwandten Disziplin.
- Kenntnisse mindestens einer Programmiersprache
- Interesse an interdisziplinärer Arbeit und die Bereitschaft sich in biologisch-medizinische Fragestellungen einzuarbeiten.
- Fähigkeit zu selbständiger Arbeit und Teamfähigkeit, hohe Eigenmotivation
- Gute Englischkenntnisse

Das Beschäftigungsverhältnis ist vorerst auf 3 Jahre befristet; die wöchentliche Arbeitszeit beträgt 39 Stunden.

Die Eingruppierung erfolgt gemäß den tarifrechtlichen Bestimmungen des TVöD-Bund.

Auswärtigen Bewerbern ist das Amt bei der Wohnraumbeschaffung behilflich. Trennungsgeld und Umzugskosten werden nach den gesetzlichen Vorschriften gewährt.

Schwerbehinderte Bewerber/innen werden bei gleicher Eignung bevorzugt berücksichtigt.

Das Paul-Ehrlich-Institut fördert die Gleichstellung von Frauen und Männern und ist daher an Bewerbungen von Frauen interessiert.

Für inhaltliche Rückfragen wenden Sie sich bitte an

Dr. Christel Kamp

E-Mail: kamch@pei.de

Bitte richten Sie Ihre vollständigen Bewerbungsunterlagen unter Angabe der Bewerbungskennziffer bis zum 09. April 2010 an das Personalreferat des Paul-Ehrlich-Instituts.



Universität zu Köln



**The Cologne Graduate School in
Management, Economics, and Social Sciences (CGS)
offers
Scholarships for its Doctoral Program 2010**

The Cologne Graduate School in Management, Economics, and Social Sciences (CGS) of the WiSo-Faculty offers a three-year doctoral program to outstanding students holding a Master's degree (or German Diploma or equivalent) in Management, Economics and Social Sciences. The CGS specifically encourages international students with a master's degree in Economics, Finance, Management, Sociology, Psychology, Political Sciences, Energy Economics/Policy, Econometrics/Statistics and related fields to apply.

About the Program:

The course program will start in October 2010. During the first year, students will take part in courses on multidisciplinary methods and theories and subject-specific courses. During the second and third year, students mainly conduct research and work on their thesis. Students are encouraged to spend one term abroad.

Qualifications:

The CGS is looking for excellent students who are close to finishing their Master's degree (or German Diploma or equivalent) and who count among the top 10% of graduates in their faculty. Teaching language of the program is English.

Scholarships:

Students accepted to the program receive a scholarship of EUR 1.200 per month. The scholarship is awarded for a maximum period of three years and is tax-free. Scholarships start with the course program in October 2010.

Application Procedure:

Application is online only and is open from February 26 to April 30. Application forms and detailed information about all required documents you will find at www.cgs.uni-koeln.de. Please DO NOT send in paper applications.

Contact:

Cologne Graduate School of Management, Economics and Social Sciences (CGS)
Richard-Strauss-Str. 2 · 50931 Köln · Germany
email: office-cgs@wiso.uni-koeln.de



**Institut für
Bioprozess- und
Analysenmesstechnik e.V.**

Wir sind eine außeruniversitäre Forschungseinrichtung des Freistaates Thüringen. Die Stelle einer/s

**Wiss. Mitarbeiterin/s
(Biophysiker)**

ist vorbehaltlich der Förderung des Forschungsprojekts voraussichtlich zum 1.6.2010 zu besetzen.

Erwartet werden Kenntnisse auf dem Gebiet der Interaktion von Zellen mit elektrischen Feldern sowie Kenntnisse im Umgang mit elektrischer Messtechnik.

Wünschenswert sind ebenso Erfahrungen im Bereich der elektrischen Schaltungstechnik sowie Programmierung (C++, Matlab).

Sie verbinden Flexibilität und Eigeninitiative mit einer teamorientierten, wissenschaftlichen Arbeitsweise bei der Erarbeitung von anwendungsorientierten Problemlösungen im Rahmen eines Forschungsprojektes.

Die Möglichkeit zur Promotion ist gegeben. Die Stelle wird nach TV-L vergütet und ist auf zwei Jahre befristet.

Bitte richten Sie Ihre schriftliche Bewerbung bis zum 16.4.2010 an:

**Institut für Bioprozess- und
Analysenmesstechnik e.V.
Rosenhof
37308 Heilbad Heiligenstadt**



Ausschreibung einer Stelle

Wissenschaftliche/r Mitarbeiter/in

(BAT IIa2) im Institut für Vegetative Anatomie der Charité,
Universitätsmedizin Berlin

Im Institut für Vegetative Anatomie (Charité Universitätsmedizin Berlin, Vorklinik) wird bei Prof. Dr. S. Bachmann eine halbe Stelle Wissenschaftliche/r Mitarbeiter/in (Besoldungsgruppe BAT O-IIa/2) ab sofort und für zwei Jahre frei. Bewerber aus Medizin, Biologie, Biochemie, Biotechnologie, Physik und Tiermedizin sind gleichermaßen willkommen.

Thema: Untersuchungen zur Biologie des Kationen-Chlorid-Kotransporters der aufsteigenden Schleife der Säugerniere (NKCC2).

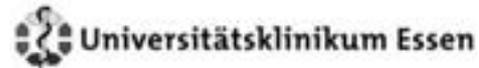
Aufgabengebiet: Zellkultur, Protein-Biochemie, Yeast-2-Hybrid, Histochemie und mikroskopische Anatomie inklusive konfokaler Mikroskopie, renale Pathologie und Physiologie.

Ziel der Arbeit soll die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen sein, welche die korrekte Funktion von NKCC2 ermöglichen. Im Fokus des Vorhabens steht dabei zunächst die Suche nach Proteinen, welche direkt mit NKCC2 interagieren. In einem zweiten Ansatz sollen außerdem Proteine identifiziert werden, deren Expression parallel zu der von NKCC2 reguliert wird. Der medizinische Hintergrund für dieses Projekte ergibt sich aus der Bedeutung von NKCC2 für die Regulation von Plasmaosmolarität und Volumenhaushalt.

Anforderungen: Der/die Kandidat/in sollte ein abgeschlossenes Diplom- oder Medizinstudium vorweisen können.

Bewerbungen mit den üblichen Unterlagen sind zu richten an:

Frau Schulte
Institut für Vegetative Anatomie
Charité CCM
Philippstr. 12
10115 Berlin



Am Institut für Molekularbiologie, Universitätsklinikum Essen, ist im Rahmen eines DFG-Forschungsprojektes die Stelle einer/eines

Doktorandin/Doktoranden

(VGr. TVL13/2 - befristet -)

ab sofort zu besetzen. Dauer der Beschäftigung: 3 Jahre. Verlängerungen sind im Rahmen der Bewilligung durch den Drittmittelgeber entsprechend den Höchstbeschäftigungsfristen des Hochschulrahmengesetzes (HRG) möglich.

Titel dieses Forschungsprojektes:

Die Interaktion von Connexin31 und AP2gamma in der Trophoblast Lineage-Differenzierung für die Erhaltung des Stammzellpotenzials der Trophoblastzellen während der Plazentadifferenzierung.

Ziel dieses Projektes ist es, die molekularen Mechanismen, die die Plazentaentwicklung determinieren, mithilfe von Maus-Trophoblaststammzellen zu identifizieren. Im Rahmen der Dissertation sollen hierzu Trophoblaststammzellen verschiedener Mausmutanten etabliert werden, in denen über Markermoleküle die Trophoblast Lineage-Differenzierung untersucht wird. Zudem sollen im Folgenden die daran beteiligten Signalwege analysiert und deren Funktionalität über lentivirale shRNA untersucht werden.

Voraussetzungen:

Abgeschlossenes naturwissenschaftliches Hochschulstudium und Erfahrungen in molekular- und zellbiologischen und möglichst tierexperimentellen Methoden. Eine hohe Motivation, wissenschaftliche Fragestellungen kreativ und eigenständig zu bearbeiten, werden erwartet.

Ein forschungsorientiertes Team, gute Ausstattung und Ressourcen werden geboten. Wir würden uns freuen, sie in unserem Team begrüßen zu dürfen.

Bewerbungen und Anfragen bitte an:

Prof. Dr. Elke Winterhager
Institut für Molekularbiologie
Universitätsklinikum Essen
Hufelandstr. 55
45122 Essen
Tel.: 0201/723-4387
Fax: 0201/723-5974
E-Mail: elke.winterhager@uk-essen.de



**Karriere beginnt
bei uns**

W2 Universitätsprofessur für Molekulare Zellbiologie der Pflanzen

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Zum 01.10.2010 wird eine Persönlichkeit gesucht, die dieses Fach in Forschung und Lehre vertritt. Die Professur soll im Bereich der molekularen Zellbiologie von Pflanzen angesiedelt sein. Ein Schwerpunkt der Aachener Biologie liegt bei der Sicherung und Transformation pflanzlicher Biomasse. Deshalb ist eine Expertise in einem dieser Teilgebiete besonders wünschenswert. Eine internationale Reputation im Bereich der molekularen Zellbiologie ist notwendig. Der/die Kandidat/in soll wesentlich zur Ausbildung in den Studiengängen der Biologie und Biotechnologie an der RWTH Aachen beitragen.

Voraussetzungen sind ein abgeschlossenes Universitätsstudium, Promotion und zusätzliche wissenschaftliche Leistungen, die durch eine Habilitation, im Rahmen einer Juniorprofessur, einer wissenschaftlichen Tätigkeit an einer Hochschule, Forschungseinrichtung, in Wirtschaft, Verwaltung oder einem

anderen gesellschaftlichen Bereich erbracht wurden. Des Weiteren werden eine hochkarätige Publikationsliste und didaktische Fähigkeiten erwartet.

Den Bewerbungsunterlagen sollen Belege über Lehrerfolge beigefügt werden.

Ihre schriftliche Bewerbung richten Sie bitte an den
Dekan der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
Prof. Dr. U. Simon
Templergraben 55
52062 Aachen

Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Gleichstellung von Mann und Frau mit dem „Total-E-Quality-Award“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen von Frauen sind ausdrücklich erwünscht. Bei gleicher Eignung, Befähigung und fachlicher Leistung werden Frauen in den Entgeltgruppen bzw. Laufbahnen, in denen eine Unterrepräsentanz von Frauen besteht, bevorzugt berücksichtigt, sofern nicht in der Person eines Mitbewerbers liegende Gründe überwiegen. Auf § 8 Abs. 6 Landesgleichstellungsgesetz NW wird verwiesen.

Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Ausbildung und Beschäftigung schwerbehinderter Menschen mit dem „Prädikat behindertenfreundlich“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen geeigneter schwerbehinderter Menschen sind ausdrücklich erwünscht. Dies gilt auch für Gleichgestellte im Sinne von § 2 SGB IX.



The Institute of Experimental Internal Medicine coordinates and participates in a variety of coordinated programs funded by the German Research Foundation (GRK1167, SPP1365, FOR521, SFB779, SFB854), the Federal Ministry of Education and Research (SysTec) and the European Union (Marie Curie Research Training Networks).

Further, the institute is a member of the interdisciplinary "Research Center Dynamic Systems in Biology/Medicine and Process Engineering" and the "Magdeburg Center for Biomolecular System Dynamics and Regulation" funded by the Federal State of Saxony-Anhalt within the "Excellence Program" and by the Federal Ministry of Education and Research within the "FORSYS" program "Research Units in Systems Biology".

The center provides an internationally competitive research environment including state-of-the-art technology platforms such as protein chemistry, mass spectrometry and high-end microscopy.

Currently, we are looking for:

Postdocs (E13, TV-L) Research Group Leaders (E14/15, TV-L)

for projects in the field of Systems Biology and the Signal Transduction of the NF- κ B system.

The positions will be funded for five years and continued based on success. Consumables and equipment will be provided. Applicants who have a commitment to scientific excellence as documented by a strong publication record are especially encouraged to apply.

Systems Biology

The biomedical research program in the Institute of Experimental Internal Medicine focuses on the biochemical analysis and mathematical modeling of signal transduction networks with a special emphasis on translational research. The model-based planning of experiments is linked to an iterative workflow enabling the identification and parameterization of adequate network models.

NF- κ B system

The research program of the institute encompasses scientific projects on the regulation of the NF- κ B system in the pathophysiology of inflammation and tumour biology (e.g. differentiation and cell cycle control). Here, the molecular and cell biological mechanisms of the intracellular signal transmission are of special interest. With special emphasis we characterize the biochemical functions of the multiprotein complex COP9 signalosome and its importance in the regulation of NF- κ B.

The Otto von Guericke University wishes to increase the proportion of female academic personnel. Women are therefore explicitly encouraged to apply. Handicapped persons with equivalent qualification will be given preference. Please send your application together with the usual documents (CV, list of publications, teaching experience, present and past extramural funding etc.) to the address below:

Prof. Dr. Michael Naumann
Institut für Experimentelle Innere Medizin
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg
Tel.: 0391-67-13227
Fax: 0391-67-13312
E-mail: Naumann@med.ovgu.de
Internet: <http://www.med.uni-magdeburg.de/fme/zim/ieim>



Karriere beginnt bei uns



5x Doktorand/in Lehrstuhl für Biotechnologie

Unser Profil: Die Kernkompetenz der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg ist das evolutive und rationale Design von Proteinen. In den drei Untergruppen (Molekularbiologie, Durchmusterungstechnologien und Modellierung) werden Biokatalysatoreigenschaften für die Stoffproduktion gezielt verbessert und Struktur-Funktionsbeziehungen in einem interdisziplinären Team (Biologen, Biochemiker, Chemiker, Biophysiker, Biotechnologen) studiert.

Ihr Profil: Im internationalen Graduiertenkolleg SeleCa (Selective Catalysis; Partner University Osaka) ist ab 1. April eine Promotionsstelle im Bereich Hybridkatalysatoren zu besetzen, um Metallkatalysatoren in einer Proteinumgebung zu verankern. Diese Stelle setzt die Bereitschaft für einen mehrmonatigen Aufenthalt in Osaka und fundierte chemische Grundlagen voraus.

– Im Graduiertenkolleg BioNoCo (biocatalysis in non-conventional media) sind ab 1. April in einem Verbundprojekt mit dem FZJ zwei Promotionsstellen zu besetzen, um erste Prinzipien für eine effiziente Gelenkte Evolution von Biokatalysatoren in unkonventionellen Lösungsmitteln aufzufinden. Vorausgesetzt werden fundierte molekularbiologische Kenntnisse.

– Für die Weiterentwicklung der SeSaM-Mutagenesetechnologie (neue und verbesserte Polymerasen) sind ab sofort in einem BMBF geförderten Verbundvorhaben mit der Firma SeSaM-Biotech zwei Promotionsstellen zu besetzen. Vorausgesetzt werden fundierte molekularbiologische Kenntnisse und ein chemisches Grundverständnis. Generelle Voraussetzungen sind gute englische Sprachkenntnisse, Sicherheit im Umgang mit den modernen Medien und die Bereitschaft zur wissenschaftlichen Betreuung von Studierenden in einem internationalen Umfeld. Ferner wird ein hohes Maß an Einsatzbereitschaft, Selbständigkeit und Teamgeist vorausgesetzt.

Der/die Technische Mitarbeiter/in sollte Erfahrungen im molekularbiologischen Bereich und in Proteinarbeiten besitzen und bereit sich in neue Arbeitsgebiete der Hochdurchsatzdurchmusterung einzuarbeiten.

Ihre Aufgaben: Entsprechend Meilensteinplanungen in Drittmittelprojekten

Unser Angebot: Die Einstellung erfolgt im Beschäftigtenverhältnis. Die persönlichen Voraussetzungen müssen erfüllt sein. Die Stelle ist zum nächstmöglichen Zeitpunkt zu besetzen und befristet bis zu 3 Jahren. Es handelt sich um eine Teilzeitstelle mit der Hälfte der regelmäßigen Wochenarbeitszeit. Eine Promotionsmöglichkeit besteht. Die Eingruppierung richtet sich nach dem TV-L. Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Gleichstellung von Mann und Frau mit dem „Total-Equality-Award“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen von Frauen sind ausdrücklich erwünscht. Bei gleicher Eignung, Befähigung und fachlicher Leistung werden Frauen in den Entgeltgruppen bzw. Laufbahnen, in denen eine Unterrepräsentanz von Frauen besteht, bevorzugt berücksichtigt, sofern nicht in der Person eines Mitbewerbers liegende Gründe überwiegen. Auf § 8 Abs. 6 Landesgleichstellungsgesetz NW (LGG) wird verwiesen. Die RWTH Aachen ist für ihre Bemühungen um die Ausbildung und Beschäftigung schwerbehinderter Menschen mit dem „Prädikat behindertenfreundlich“ ausgezeichnet worden. Bewerbungen geeigneter schwerbehinderter Menschen sind ausdrücklich erwünscht. Dies gilt auch für Gleichgestellte im Sinne von § 2 SGB IX.

Ihr/e Ansprechpartner/in:

Frau Dr. Monika Reiss

Tel.: +49 (0) 2418024177 · E-Mail: m.reiss@biotec.rwth-aachen.de oder

Herr Prof. Dr. Schwaneberg

Tel.: +49 (0) 2418024170 · E-Mail: u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de
www.schwaneberg.com

Ihre Bewerbung richten Sie an:

Dr. Monika Reiss · Lehrstuhl für Biotechnologie
RWTH Aachen, Worringer Weg 1, 52074 Aachen



Medical University of Graz

Call for Applications

(VGr. TVL13/2 - befristet -)

Application Deadline: March, 2010

The Medical University of Graz invites applicants for 29 PhD student positions in Molecular Medicine and Neurosciences with effect from 01.10.2010.

The programs provide cutting-edge education in basic principles of human diseases and therapeutics. The thesis projects will focus on various aspects of metabolic and vascular diseases, inflammation, cancer, stem cells, aging of the brain, and neurodegeneration. They will also integrate basic, applied and clinical sciences, as well as a wide spectrum of experimental techniques.

The programs offer multidisciplinary training in Molecular Medicine and Neurosciences in a productive and international environment. Successful applicants will integrate into research groups, carry out individual research projects and participate in lectures, courses, journal clubs, thesis seminars, congresses etc.

Accepted PhD-students will be employed for 3 years with a contract that includes social benefits. The positions are for students with a relevant Master's degree or equivalent in Medicine, Chemistry or Life Sciences.

English is the language used for teaching, communication and writing of the Thesis and thus, excellent English skills are required.

Applications must be submitted per email in full and using only the requested forms.

Further information and application forms are available at:
<http://www.medunigraz.at/phd/>



Cologne International Graduate School

From Embryo to old Age,
 Development, Health and Disease
 8 Fellowships

3-year Ph.D. programme starting fall 2010

The University of Cologne has a long-standing tradition and world-wide reputation for top-level molecular biological research. Beginning in Fall 2010 the Research School in Biology „From embryo to old age: the cell biology and genetics of health and disease“ will be offering a high-level Ph.D. programme for students with excellent qualifications. The participating research groups use **microbial, plant and animal model systems** to investigate cell biological and genetic mechanisms whose perturbation during the life cycle of an organism results in disease.

The three-year programme starts with a six-month rotation and course period, followed by a PhD project in one of the participating groups. Seminars and training courses complement the research work. Comprehensive support is provided throughout the programme. The programme language is English. Accepted students will receive a laptop computer and 500 EUR to get started in Cologne. No tuition fees are charged.

Eight competitive three-year fellowships (initially 1100 EUR, then 1400 EUR per month) are available.

We invite you to apply to the IGSDHD in Cologne, the exciting city in the heart of Europe.

To obtain further information please visit our website at:
<http://www.uni-koeln.de/bio-graduateschool/>

Deadline for application is 15 April, 2010

Contact:

Dr. Isabell Witt, IGSDHD,
 Zülpicher Strasse 47
 50674 Cologne, Germany
 Phone: +49 (0) 221 470 1683
 Fax: +49 (0) 221 470 1632
bio-gradschool@uni-koeln.de



The Graduate School for Biological Sciences

in Cologne
 has openings for

16 PhD studentships

Deadline for application is 30 April, 2010

The GSfBS will provide you with an excellent scientific environment and an outstanding curriculum for your doctorate. We do research in molecular genetics, functional genomics, cell biology, developmental biology, biotechnology and biochemistry in established model organisms.

Details of the training and research programme can be found on our website:

http://www.gs-biosciences.uni-koeln.de/gschools_overview.html
http://www.gs-biosciences.uni-koeln.de/gsfbs_special_courses.html

We invite you to apply for a position in our graduate school in Cologne, the exciting city in the heart of Europe.

Participating faculty in this call:

Marcel Bucher	Plant Physiology, Symbiosis
Jürgen Dohmen	Selective Proteolysis
Matthias Hammerschmidt	Bone Development in Zebrafish and Mouse

Ute Höcker
 Stefan Höning
 Thorsten Hoppe
 Martin Hülskamp
 Reinhard Krämer
 Carlen Niessen
 Angelika Noegel
 Nikoletta Papadopoulou
 Elena Rugarli
 Björn Schumacher
 Mirka Uhlírova

Light Signaling in Plants
 Protein Targeting in Mammalian Cells
 Development, Aging Biology
 Plant Development
 Biochemistry, Microbial Biotechnology
 Intercellular Adhesion and Carcinogenesis
 Role of the Nuclear Envelope
 miRNA in Innate Immunity
 Neurogenetics, Molecular Medicine
 DNA Damage and Aging
 Tissue Morphogenesis and Stress Signaling

Read about the projects at:

http://www.gs-biosciences.uni-koeln.de/application_postings.html

Read about the application procedure at:

http://www.gs-biosciences.uni-koeln.de/application_procedurs.html

Contact:

Dr. Isabell Witt
 Graduate School for Biological Sciences
 Zülpicher Strasse 47
 50674 Cologne
 Germany
 E-Mail: bio-gradschool@uni-koeln.de
 Tel.: +49 (0)221-470-1683

Kontakt zu Verbänden

Die Mitglieder der nachfolgenden Fachgesellschaften erhalten LABORWELT regelmäßig mit freundlicher Empfehlung ihrer Organisationen. Wer sich darüber hinaus für eine Mitarbeit oder einen Beitritt interessiert, erreicht die Fachgesellschaften unter den folgenden Kontaktdaten:

Ich interessiere mich für

- den Beitritt
 Unterstützung für Jungwissenschaftler
 Interessenvertretung
 eine Spende
 Fachgruppen im Bereich

Bitte kontaktieren Sie mich

Name

Firma

Tel.

Fax

Verband (siehe unten, bitte ankreuzen)

E-Mail

Dt. Ver. Gesell. f. Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. (DGKL)



Geschäftsstelle der DGKL
 Im Mühlenbach 52 b
 53127 Bonn
 Tel.: +49-(0)-228-92-68-9522
 Fax: +49-(0)-228-92-68-9527
 geschaeftsstelle@dgkl.de
www.dgkl.de

Gesellschaft für Genetik



c/o HZM – Deutsches
 Forschungszentrum für
 Gesundheit/Inst. of Develop-
 mental Genetics
 Tel.: +49-(0)-89-3187-2610
 Fax: +49-(0)-89-4620
www.gfgenetik.de

Netzwerk Nutrigenomik



Netzwerk Nutrigenomik
 Arthur-Scheunert-Allee 114
 14558 Nuthetal
 Tel.: +49-(0)-33200-88-301
 Fax: +49-(0)-33200-88-541
 mail@nutrigenomik.de
www.nutrigenomik.de

Deutsche Gesellschaft für Proteomforschung



c/o MPI für Biochemie
 Am Klopferspitz 18a
 82152 Martinsried
 Tel.: +49-(0)-89-1897-9007
 Fax: +49-(0)-89-1897-9009
 c.kleinhammer@dgpf.org
www.dgpf.org

Gesellschaft für Signaltransduktion



c/o Prof. Dr. Ralf Hass
 Med. Hochschule Hannover
 AG Biochemie u. Tumorbil.
 30625 Hannover
 Tel.: +49-(0)-511-532-6070
 Fax: +49-(0)-511-532-6071
www.sigtrans.de

RNA-Netzwerk



c/o Prof. Dr. Volker A. Erdmann
 Freie Universität Berlin
 Thielallee 63, 14195 Berlin
 Tel.: +49-(0)-30-8385 6002
 Fax: +49-(0)-30-8385 6413
 erdmann@chemie.fu-berlin.de
www.rna-network.com

BIO Deutschland

BIO DEUTSCHLAND

Tegeler Weg 33/
 berlinbiotechpark
 10589 Berlin
 Tel.: +49-(0)-30-3450593-30
 Fax: +49-(0)-30-3450593-59
 info@biodeutschland.org
www.biodeutschland.org

Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie



Geschäftsstelle der DGPT
 Achenbachstraße 43
 40237 Düsseldorf
 Tel.: +49-(0)-211-600-692-77
 Fax: +49-(0)-211-600-692-78
 mitglieder@dgpt-online.de
www.dgpt-online.de

FA Life Science Research im VDGH



c/o VDGH im VCI
 Mainzer Landstraße 55
 60329 Frankfurt am Main
 Tel.: +49-(0)-69-2556-1730
 Fax: +49-(0)-69-236650
 vdgh@vdgh.de
www.vdgh.de

Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)



c/o Institut für Hygiene und
 Med. Mikrobiologie
 Carl-Neuberg-Straße 1
 30625 Hannover
 Tel.: +49-(0)-511-532-4655
 Fax: +49-(0)-511-532-4355
www.dghm.org

Nationales Genomforschungsnetz



c/o DKFZ
 Im Neuenheimer Feld 580
 69120 Heidelberg
 Tel.: +49-(0)-6221-424-743
 Fax: +49-(0)-6221-423-454
 S.Argo@dkfz-heidelberg.de
www.ngfn.de

Österreichische Reinraumgesellschaft (ÖRRG)



ÖRRG
 Neudorf 41
 A-8262 Ilz
 Tel.: +43-(0)-3385-8117
 Fax: +43-(0)-3385-8117
 office@oerrg.at
www.oerrg.at

bts (Biotechnologische Studenteninitiative e.V.)



c/o BIOCUM
 Stralsunder Straße 58–59
 13355 Berlin
 Tel.: +49-(0)-2649-21-21
 Fax: +49-(0)-2649-21-11
www.bts-ev.de

Deutsche Gesellschaft für Neurogenetik



Institut für Humangenetik
 Calwer Straße 7
 72076 Tübingen
 Tel.: +49-(0)-7071-2977692
 Fax: +49-(0)-7071-295171
 peter.bauer@
 med.uni-tuebingen.de
www.hih-tuebingen.de/dgng/

Österreichische Ges. f. Laboratoriumsmedizin & Klinische Chemie

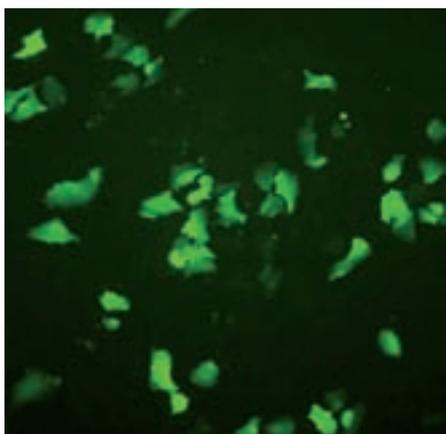


ÖGLMKC Geschäftsstelle
 Infomedica-KEG, Xenius Behal
 Tullnertalgasse 72
 A-1230 Wien
 Tel./Fax: +43-(0)-1889-6238
 office@oeglmkc.at
www.oeglmkc.at

Promocell

Optimierte Transfektion von Zell-Linien und Primärzellen

Das neue Transfektionreagenz PromoFectin der Promocell GmbH ermöglicht einen hocheffizienten und reproduzierbaren Transport von Nukleinsäuren in eine Vielzahl adhärenter und nicht-adhärenter Zelltypen – mit oder ohne Mediumwechsel. Es zeigt eine extrem geringe Zytotoxizität und ist für die Transfektion sehr empfindlicher und schwer zu transfizierender Zell-Linien und primärer Zellen bestens geeignet. Varianten von PromoFectin sind speziell auch für die optimale Transfektion von Endothelzellen (z. B. HUVEC) und Hepatozyten erhältlich. Weitere PromoFectin-Varianten für die Transfektion bestimmter Zell-Linien, neuronaler Zellen und Insektenzellen oder den Transport von siRNA, Oligonukleotiden und Proteinen in Zellen sind ebenfalls lieferbar. Die „Magnet-Assisted Transfection“-Technologie



(MATra) wurde speziell für eine sehr schnelle und hocheffiziente Transfektion entwickelt und zeigt – ebenfalls mit oder ohne Serum – exzellente Ergebnisse, auch mit vielen bekanntermaßen schwer zu transfizierenden Zelltypen (wie etwa Primärzellen) sowie eine extrem geringe Zytotoxizität. Das MATra-A-Reagenz, eine Suspension speziell beschichteter magnetischer Nanopartikel, bindet und komplexiert die interessierende Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNA, Oligonukleotide oder siRNA). Durch ein starkes magnetisches Feld werden die MATra-A/Nukleinsäure-Komplexe sehr schnell auf die zu transfizierenden Zielzellen gezogen und in hoher Dosis direkt auf den Zellmembranen abgelegt, was zu einer sehr effizienten Aufnahme der Komplexe in die Zellen führt. Auch Suspensionszellen lassen sich mittels eines einfachen Zwischenschrittes (MATra-S Immobilizer) optimal transfizieren. Das ebenfalls erhältliche MA Lipofection Reagent kann mit den meisten gebräuchlichen Transfektionsreagenzien kombiniert werden, um Transfektionsergebnisse mittels der MATra-Technologie noch weiter zu optimieren.

Promocell GmbH
Sickingenstraße 63/65
69126 Heidelberg
Tel.: +49-(0)6221-649-34-0
Fax: +49-(0)6221-649-34-40
www.promokine.de
info@promokine.de

Dunn Labortechnik

Neu: Innovativer Einweg-Bioreaktor

CellMaker Regular™, das Bioreaktorsystem mit Einweg-Zellkulturbeuteln der britischen Firma Cellexus Ltd., ist ab sofort exklusiv bei Dunn Labortechnik in Deutschland erhältlich.



Das System vereinfacht und beschleunigt Bioprozesse und Fermentation. Es ist in erster Linie für den Scale-up der Kultivierung von Mikroorganismen und Hefen gedacht. Der Einmal-Zellkulturbeutel kann eine große Anzahl an Schüttelkolben ersetzen und bietet eine Alternative zu Glasgefäßen oder Metallbioreaktoren.

Der CellMaker Regular™ besteht aus einer programmierbaren Steuereinheit, die mittels Touch Screen bedient wird, und einer Beutelstation. Diese Station stabilisiert nicht nur den besonders geformten Zellkulturbeutel, CellexusBag™, sie enthält auch das Temperiersystem und sorgt für die Durchmischung der Kulturen mittels patentierter Luftverwirbelungs-Technik. Das integrierte Heiz- und Kühlsystem ermöglicht die Zellkultivierung in einem Temperaturbereich von 15 °C bis 45 °C. Derzeit sind zwei Beutelgrößen, 1 bis 8 Liter und 10 bis 50 Liter, erhältlich.

Durch die Einweg-Zellkulturbeutel entfällt die bei Mehrfachbehältern aufwendige Reinigung. Der Beutel wird ohne weitere Vorbereitung eingesetzt und abschließend entsorgt: zeitsparend und kostengünstig. Auch die Entwicklungs- und Produktionszeiten verkürzen sich durch das schnell und einfach zu benutzende System.

Dunn Labortechnik GmbH
Thelenberg 6
53567 Asbach
Tel.: +49-(0)2683-43094
Fax: +49-(0)2683-42776
info@dunnlab.de
www.dunnlab.de

Ocean Optics

Erweiterter Spektralbereich durch XR-Gitter

Ocean Optics hat den Wellenlängenbereich mehrerer seiner faseroptischen Miniatur-Spektrometer erweitert. Die neue XR-Gitteroption mit einer Liniendichte von 500 Linien/mm überwindet die traditionellen Hürden bei der Bereitstellung einer breiten UV-NIR-Abdeckung in einem einzigen Miniatur-Spektrometer, das alle Wellenlängen von 200-1050 nm abdeckt.

Das XR-1-Gitter ist in den Spektrometern USB2000+, JAZ-EL2000 und USB4000 vorkonfiguriert erhältlich und kann darüber hinaus als Option in kundenspezifische Systeme eingebaut werden.

Spektrometer der XR-Serie liefern eine optische Auflösung von 2,0 nm (FWHM [Full Width Half Max]). Der von Ocean Optics entwickelte Filter zur Unterdrückung von Beugungen zweiter und dritter Ordnung wird direkt auf den Detektor aufgebracht. Der 25

µm-Spalt bei den vorkonfigurierten Spektrometern bietet eine gute optische Auflösung für die meisten Anwendungen. Spektrometer der XR-Serie sind praktische Ein-Instrument-Lösungen für Konfigurationen, bei denen UV-VIS- und VIS-NIR-Messungen benötigt werden, und eignen sich gut für die Durchführung von Messungen über den gesamten Wellenlängenbereich, wie etwa Sonnenstrahlung, atomare Emissionslinien und einige Plasmaanwendungen.

Jessica van Heck
Ocean Optics
Maybachstraße 11
73760 Ostfildern
Tel.: +49-(0)711-341696-0
Fax: +49-(0)711-341696-85
info@oceanoptics.eu
www.OceanOptics.eu

Porvair

Benutzerfreundliche Kartusche für optimierte Proteinfällungen

Eine neue 1 ml-Kartusche zur Proteinfällung (P/N 241100) von Porvair Sciences Ltd. vereint die Vorteile der firmeneigenen p3-Technologie mit der Kosteneffizienz und dem Komfort eines Abscheidungsverfahrens auf Kartuschenbasis. Die p3-Kartusche verfügt über eine neuartig behandelte Fritte mit Doppelmatrix und verhindert so das Nässen und Auslaufen von Proben, wie es vor der Anwendung von Vakuen mit vielen traditionellen Produkten für die Proteinfällung verbunden war. Die neuartig behandelte Frittenmatrix hält außerdem hohe Flussraten aufrecht, so dass Proben schnell vorbereitet werden können. Tests belegen, dass die p3-Kartuschen im Wesentlichen keine nachteiligen nichtspezifischen Bindeprobleme aufweisen.

Die neue p3-Kartusche wurde eigens für Labore entwickelt, die eine kleine Anzahl einzelner Proteinfällungsexperimente durchführen möchten, und stellen eine kosteneffiziente und praktische Alternative zu Protein-Präzipitationsmikrotestplatten dar.



Porvair Sciences Ltd.
Unit 6, Shepperton Business Park
Govett Avenue
Shepperton, Middlesex, TW17 8BA, UK
Tel.: +44-(0)1372-824290
int.sales@povair-sciences.com
www.povair-sciences.com

Millipore

Robuste Virus-Filtration für hohe Prozess-Sicherheit

Millipore hat Mitte Januar seine neue Viresolve Pro⁺-Produktreihe für die Virusfiltration vorgestellt. Mit der Einführung der Viresolve Pro⁺-Lösung erweitert der Marktführer sein Angebot an Virussicherheitsprodukten für die biopharmazeutische Industrie. Biologische



Arzneimittelprodukte, wie monoklonale Antikörper und therapeutische Proteine, werden mit Materialien biologischen Ursprungs und in Fertigungsprozessen hergestellt, die durch Viren kontaminiert werden können. Folglich müssen Biopharmakahersteller ausreichend effektive Virusabreicherungs-schritte in ihre Fertigungsprozesse integrieren, um sicherzustellen, dass ihre Produkte nicht durch Viren kontaminiert sind.

Millipores Virussicherheitsprodukte ermöglichen eine effektive und robuste Virus-

filtration – von der Prozessentwicklung bis hin zur biopharmazeutischen Großproduktion. Die Viresolve Pro⁺-Produktreihe erweitert Millipores Angebot mit einer robusten Lösung für die Parvovirusabreicherung, die auch bei höhertitrigen Produktströmen effektiv ist. Parvoviren gehören zu den kleinsten Viren und sind daher im Fertigungsprozess besonders schwer zu entfernen.

Die Viresolve Pro⁺-Lösung ist als Einwegmodul erhältlich und erhöht die Gesamtkapazität und -produktivität bei der Virusabreicherung in biopharmazeutischen Fertigungsprozessen. Sie ist sowohl für Prozesse zur Herstellung monoklonaler Antikörper als auch therapeutischer Proteine konzipiert. Sie beinhaltet einen proprietären binären Gasintegritätstest (BGT) zur Detektion übergroßer Poren oder von Defekten, die die Retentionsfähigkeit eines Filters beeinträchtigen und zu einer Kontamination des Endproduktes führen können, und stellt damit eine kritische Qualitätssicherungsmaßnahme zum Schutz des Verbrauchers dar.

Virginie Isner
Millipore S.A.S.
39, route industrielle de la Hardt - Bldg E
67120 Molsheim
Tel.: +33-(0)3-9046-9986
Virginie_isner@millipore.com
www.millipore.com

Beckman Coulter

Genbibliotheken automatisch erstellen

In einem Gemeinschaftsprojekt mit dem renommierten J. Craig Venter Institute (JCVI) validiert Beckman Coulter derzeit sein mit paramagnetischen Beads arbeitendes SPRIworks Fragment Library System I für den Genome Analyzer der Firma Illumina. Beckmans kompaktes System auf Basis der SPRI-Technologie (Solid Phase Reversible Immobilization) erstellt in nur fünf Stunden vollautomatisch und hochreproduzierbar bis zu zehn Genbibliotheken (DNA libraries).

Durch Eliminierung der Säulenreinigungsschritte und der Größenselektion mittels Gelelektrophorese wurden die Voraussetzungen für die Automatisierung des Arbeitsablaufs zur Erstellung von Genbibliotheken geschaffen.

Nach Auskunft der Beta-Tester vom JCVI erhöhte das System den Durchsatz von zuvor sechs auf aktuell 20 Genbibliotheken pro Arbeitstag und trägt so zur Kostensenkung bei. Ziel des Projektes ist es, das Next-Generation Sequencing zu automatisieren und dadurch den Durchsatz weiter zu steigern.



„Das SPRIworks System soll den Prozessablauf der nächsten Generation von DNA-Sequenzierern automatisieren und vereinfachen“, kommentierte Dr. Patrick J. Finn, Leiter der Abteilung Forschung und Entwicklung bei Beckman Coulter Genomics. „Es können größere Mengen von Proben sequenziert werden, und der Kunde kann die wachsende Kapazität der Sequenzierungssysteme der nächsten Generation voll ausschöpfen, um seine operative Leistungsfähigkeit zu steigern und die Sequenzierungsleistung zu maximieren.“

Beckman Coulter GmbH
Europapark Fichtenhain 13B
47807 Krefeld
Tel.: +49-(0)2151-333-625
ukoenig@beckman.com
ukoenig@beckman.com

März 2010 - April 2010

Veranstaltungskalender

21.-24.3.10

Meeting of the European Group for Blood Marrow Transplantation, Wien

Info: (Web: www.congrex.ch/ebmt2010)

23.-26.3.10

Analytica 2010, München

Info: Messe München GmbH

(E-Mail: info@analytica.de, Web: www.analytica.de)

07.-09. April 2010, Wien

qPCR 2010

Aktuelle Anwendungen der qPCR-Technologie, wie die single-cell qPCR, microRNA-Quantifizierung, digitale qPCR und viele mehr stehen im Zentrum des internationalen qPCR-Symposiums in Wien. Wie in den Vorjahren trifft sich hier die Branche, um über alle neuen Techniken, Applikationen und Datenanalysemethoden zu diskutieren – Info: www.qpcr2010-vienna.net

23.3.10

T5 JobMesse der Healthcare-Branche, Stuttgart

Info: Katrin Schenck, T5 Interface GmbH

(Tel.: +49-7031-285-19-0,

E-Mail: info@t5-interface.de,Web: www.t5-futures.de)

25.3.10

Netzwerktreffen Nachwachsende Rohstoffe, Straubing

Info: Dr. Raimund Brotsack, BioCampus Straubing

GmbH (Tel.: +49-9421-785-161,

E-Mail: raimund.brotsack@biocampus-straubing.de,Web: www.straubing-sand.de/biocampus)

26.-29. Mai 2010, Halle (Saale)

PSP 2010 Conference

Proteasen, Peptid-modifizierende Enzyme und ihre Anwendungen in der Arzneimittelentwicklung stehen im Fokus der internationalen Tagung „Proline Specific Cleavage and Oxoprolyl-Formation – Functions and Therapeutic Strategies“. Programm unter www.probiodrug.de/index.php?id=72

26.3.10

jobvector career day, München

Info: Dr. Martina Sribar, jobvector

(Tel.: +49-211-301384-20,

Fax: +49-211-301384-30,

E-Mail: martina.sribar@jobvector.com,Web: www.jobvector.com)

28.-31.3.10

62. Jahrestagung der DGHM/ Jahrestagung der VAAM, Hannover

Info: Conventus GmbH

(Web: www.vaam-dghm2010.de)

30.-31.3.10

The Synthetic Biology in Pharma Conference 2010, Cambridge (UK)

Info: Jaymin Amin, Avokado

(Tel.: +44-1403-220754,

E-Mail: info@synthetic-biology.info,Web: www.synthetic-biology.info)

07.-09.04.10

qPCR 2010 Symposium & Exhibition, Wien

Info: Martina Reiter, BioEPS GmbH

(E-Mail: martina.reiter@bioeps.com,Web: www.qpcr2010-vienna.net)

13.-15.4.10

Der QM-Beauftragte im Labor, Essen

Info: Haus der Technik, Essen

(E-Mail: hdt@hdt-essen.de,Web: www.hdt-essen.de)

20.4.10

BioVaria 2010, München

Info: Ascenion GmbH (Tel.: +49-89-318814-0,

E-Mail: info@scenion.de, Web: www.biovaria.org)

21.4.10

VIII Bionnale 2010, Berlin

Info: Thilo Spahl, BioTop Berlin-Brandenburg

(Tel.: +49-30-3186-2214,

E-Mail: spahl@biotop.de, Web: www.biotop.de)

21.-22.4.10

Biotechnologie-Tage 2010, Berlin

Info: (Web: www.biotechnologie-tage.de)

22.-24.04.10

European Course for Life Sciences Executives, ECLE, Bad Schauenburg (CH)

Info: Dr. Nicole Gilgen, ECLE Executive Office, c/o

ECPM (Tel.: +41 61 265 7650,

E-Mail: nicole.gilgen@unibas.ch,Web: www.ecpm.ch/ecle)

22.-23.4.10

13th Annual Conference of the European BioSafety Association, Ljubljana (SL)

Info: EBSA (E-Mail: conference@ebsaweb.eu,Web: www.ebsaweb.eu/EBSA_13)

23.4.10

5. Biotech-Tag der FH Bingen, Bingen

Info: Dr. Berit Hauschild, Transferstelle Bingen

(Web: www.tsb-energie.de)

07.-09. Juni 2010, Düsseldorf

Erneuerbare Ressourcen

Nachwachsende Rohstoffe und ihre industriellen Anwendungen sind das Thema der 6. Internationalen Conference on Renewable Resources & Biorefineries in den Düsseldorfer Rheinterassen. Registrierung: www.rrbconference.com/home.aspx?id83

Pflanzenforschung erhält Rückenwind

von Thomas Gabrielczyk, Redaktion LABORWELT

Überaus positive Signale sendet die Bundesregierung derzeit an Deutschlands von Gentechnikgegnern geschasste Pflanzenforscher. Dass die Pflanzengenomik im Rahmen der Genomforschungsinitiative GABI, des EU-Projektes Plant KBBE sowie dem ERA-Net Plant Genomics kontinuierlich gefördert wird, sicherte in Zeiten der GVO-Ablehnung zumindest die deutsche Spitzenstellung in diesem Bereich. Doch wem nutzen Arbeiten über Ertragsverbesserung und stresstolerante Pflanzen, wenn gleichzeitig ständig politisch Gegenwind gegen gentechnisch veränderte Pflanzen erzeugt wird? Doch jetzt ist offenbar auch der politische Wille da, ein positives Bewusstsein in der Öffentlichkeit zu schaffen. Denn neuerdings werden die Botschaften zu Biotech-Pflanzen mit neuen, nützlichen Anwendungen verknüpft. Moderne Pflanzen, die dem Klimawandel trotzen, die als Rohstoffalternative für eine sauberere Chemieproduktion dienen und zugleich zur wirtschaftlichen Wertschöpfung beitragen, sollen das Fundament der sogenannten wissensbasierten Bioökonomie bilden. Diese steht auch im Zentrum des neuen Forschungsrahmenplans des Bundesforschungsministeriums, der im nächsten Jahr das bisherige Rahmenprogramm Biotechnologie ablösen soll.

Auf einem BMBF-Fachforum im vergangenen Monat diskutierten knapp 200 Pflanzenforscher in Berlin, wie die moderne Pflanzenforschung helfen kann, bevorstehende globale Herausforderungen wie Klimawandel, Nahrungsmittel- und Ressourcenverknappung zu meistern. Einen Beitrag – so der Tenor – könne die Pflanzenforschung nur dann leisten, wenn alle zur Verfügung stehenden Technologien genutzt würden, also Smart breeding, Tilling und auch die Grüne Gentechnik. Dazu müsse die Pflanzenforschung insgesamt weiter gestärkt werden.

Ein interessantes Fazit, denn offenbar ist der Weg in die „Knowledge-based Bioeconomy“ ohne gentechnisch veränderte Pflanzen nicht möglich. Für die politisch bereits längst gefällte Entscheidung, künftig auf die moderne Pflanzenforschung zu setzen, braucht es jetzt Akzeptanz. Doch ob entsprechende Zusicherungen von Politikern, verbesserte Pflanzen könnten als Rohstoffalternative zum Erdöl und zur Bewältigung des Klimawandels beitragen, besonders vertrauensbildend sind, wird bezweifelt. „Bloß nicht zu starke Hoffnungen in der Bevölkerung wecken“, hieß es auf dem BMBF-Fachforum von

Industrievertretern. Das könne schnell in Totalablehnung umschlagen. Zugleich hieß es aber auch, dass für mehr Akzeptanz in der Öffentlichkeit geworben werden müsse. Nur wie?

„Ablehnung ist gar nicht so groß“

Die positiven Botschaften müssen von Gruppierungen transportiert werden, die hohes Vertrauen in der Bevölkerung genießen, sagt dazu eine aktuelle Studie des US-Landwirtschaftsministeriums (Gain Report IT1003) und räumt mit der vielbeschworenen Skepsis der Europäer gegenüber der Grünen Gentechnik auf. „Desinteresse wird als Ablehnung missinterpretiert“, so die Studie. Fast die Hälfte der jetzigen Gentechnik-Gegner würde sogar GVO kaufen, wenn glaubhaft positive Botschaften an Biotech-Pflanzen geknüpft würden. Ob die Studie Recht behält, muss sich noch erweisen. Für die Pflanzenforscher aber positiv: ihre Arbeit wird endlich wieder als politisch wichtig eingeschätzt.

Inserentenverzeichnis

Beckman Coulter GmbH	29
Biometra GmbH	7
Bio&Sell e.K.	25
Biovaria	13
BIOCOM AG	25
Candor Bioscience GmbH	35
DASGIP AG	27
Dunn Labortechnik GmbH	15
European Biotechnology Foundation ..	17
febit holding GmbH	23
Fördergesellschaft IZB mbH	31
Millipore Corporation	5
Microsynth AG	9
New England Biolabs GmbH.....	U4
Porvair Sciences Ltd.	15
Roche Diagnostics GmbH	U2
Sartorius Stedim Biotech AG	11
Steinbrenner Laborsysteme	33
UBMi B.V	U3

Vorschau Heft 3/2010



Thema Zellbiologie

Die Großen der Branche testen sie bereits: zellbasierte Assays mit humanen Zellen für die Arzneimittelforschung und die Chemikalienentwicklung auf Basis von embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen. Dies wird aber nur eines der aktuellen Themen sein, das renommierte Autoren in der kommenden LABORWELT-Ausgabe beleuchten. Zellbiologische Innovationen stehen im Fokus der Themenausgabe Zellbiologie. Zudem beleuchten Wissenschaftler des EMBL die Leistungsfähigkeit von Illumina-Sequenzern.

Marktübersicht: Zellkultur

Werbekunden bietet diese Ausgabe eine optimale Plattform für ihre Produkt- und Imageanzeigen. Reservieren Sie Ihren Werbeplatz in der LABORWELT-Themenausgabe bis spätestens zum 16. April 2010. Ergänzend zu dem Themenschwerpunkt Bioanalytik veröffentlichen wir eine Marktübersicht „Zellkultur“. Informationen zu Ihrer möglichen Teilnahme gibt Oliver Schnell (Tel.: +49-30-264921-45, E-Mail: o.schnell@biocom.de).

Impressum

LABORWELT (ISSN 1611-0854)
erscheint zweimonatlich im

BIOCOM Verlag GmbH
Stralsunder Straße 58–59
13355 Berlin, Germany
Tel./Fax: 030/264921-0 / 030/264921-11
laborwelt@biocom.de
www.biocom.de

Redaktion
Dipl.-Biol. Thomas Gabrielczyk
Tel.: 030/264921-50

Anzeigenleitung
Oliver Schnell
Tel. 030/264921-45,
o.schnell@biocom.de

Leserservice
Angelika Werner, Tel. 030/264921-40

Graphik-Design
Michaela Reblin

Druck:
Druckhaus Hamburg GmbH, 28325 Bremen

Für einen regelmäßigen Bezug von LABORWELT ist eine kostenlose Registrierung unter www.biocom.de oder per Fax erforderlich.

Namentlich gekennzeichnete Beiträge stehen in der inhaltlichen Verantwortung der Autoren. Alle Beiträge sind urheberrechtlich geschützt. Ohne schriftliche Genehmigung des BIOCOM Verlages darf kein Teil in irgendeiner Form reproduziert oder mit elektronischen Systemen verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

© BIOCOM Verlag GmbH, Berlin

 www.laborwelt.de

BIOCOM



The world's leading pharmaceutical networking event is ready for business

CPhI Worldwide, ICSE, P-MEC & BioPh
5-7 October 2010, Paris Nord Villepinte, France

CPhI Worldwide is *the* pharma event offering opportunities for manufacturers, suppliers and buyers to exchange ideas, form alliances and do business on a global scale. A new zone-based layout for 2010 will bring you even closer to your potential business leads.

ICSE continues to be the pharma industry's *leading* platform for companies providing a wide variety of outsourcing services such as clinical trials, contract research, contract packaging, logistic and analytical services.

P-MEC is where technology meets ambition. It is the premier convention for connecting sellers and buyers of pharma technology. From machinery to track-and-trace technology, P-MEC has it all!

BioPh is an exciting event bringing together companies and organisations dealing with new and innovative bio-solutions and treatment methods for pharma.

**Make sure you don't miss
this unique event. Visit the websites below,
email cphi@ubm.com or call
+31 204 099 544 to find out more.**



United Business Media

cphi.com | icsexpo.com | p-mec.com | bioph-online.com
wherepharmameets.com

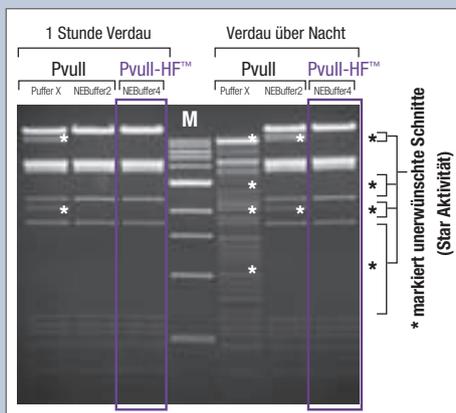


ENGINEERED FOR PERFORMANCE



HF™-Restriktionsenzyme von New England Biolabs

New England Biolabs bietet Ihnen die besten Restriktionsenzyme aller Zeiten! Durch den gezielten Austausch von Aminosäuren hat NEB eine einzigartige neue Generation an High Fidelity (HF™) Restriktionsenzymen konstruiert. HF™ Enzyme sind rekombinante, funktionsoptimierte Enzyme mit einer bisher ungekannten Performance - und das zum gleichen günstigen Preis wie das etablierte Wildtyp-Enzym! Nutzen Sie daher für Ihre DNA Verdauung HF™ Restriktionsenzyme von NEB!



PvuII zeigt intrinsische Star Aktivität (unerwünschte DNA-Schnitte) unter suboptimalen Pufferbedingungen oder bei längeren Inkubationszeiten. PvuII-HF hingegen ist optimiert für optimale Pufferkompatibilität (NEBuffer 4). Selbst bei einem Übernachts-Verdau ist keine Star Aktivität detektiertbar!

Ihr HF™-Vorteil:

- e** "engineered for performance"
- ★** dramatisch reduzierte Star Aktivität (bis zu 500-fach verbessert gegenüber dem Wildtyp-Enzym)
- NEB4** optimiert für höchste Puffer-Kompatibilität (NEBuffer 4, der optimale Puffer für über 160 NEB Restriktionsenzyme)
- 🕒** Time-Saver™ qualifiziert für 5 min Verdau
- !** Gleicher günstiger Preis wie das herkömmliche Wildtyp-Enzym

www.neb-online.de

CELEBRATING
35
YEARS

NEW ENGLAND
BioLabs® Inc.
enabling technologies in the life sciences

CLONING & MAPPING

DNA AMPLIFICATION
& PCR

RNA ANALYSIS

PROTEIN EXPRESSION &
ANALYSIS

GENE EXPRESSION
& CELLULAR ANALYSIS

New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main Deutschland

www.neb-online.de

Tel. 0800/246-5227 (kostenfrei in D) Tel. 00800/246-52277 (kostenfrei in A) Fax. +49/(0)69/305-23149 email: info@de.neb.com