

# ABSTRACTS

## VORTRÄGE

### **60 Jahre DNA – die ganze Welt in einem Molekül**

*Dirk Lassner*

IKDT Institut Kardiale Diagnostik and Therapie GmbH und Leibniz-Institut für Interdisziplinäre Studien, Berlin  
Berlin

Das 21. Jahrhundert wird das Jahrhundert der Lebenswissenschaften sein und ist geprägt durch die fundamentalen Erkenntnisse der Biotechnologie und der sie begleitenden Informationstechniken. Kein anderes Biomolekül hat die modernen Wissenschaften in den letzten Jahren so stark beeinflusst wie die Desoxyribonukleinsäure, die DNA. Ihre einzigartige stoffliche Komposition begründet die essentielle Bedeutung der DNA für die Lebenswissenschaften. Sie ist der universelle Träger aller Erbinformationen, sowohl der des Menschen als auch aller anderen Organismen wie Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Viren), in einer hochkompakten Form kodiert in einem 4-Bit-Code. Dort scheinen alle strukturellen Grundlagen des Lebens determiniert zu sein. Die Verdopplung der zellulären DNA durch natürliche Enzymsysteme oder die Informationsanhäufung während der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), stellt heutige elektronische Festspeicher in Bezug auf Datendichte, Geschwindigkeit und Sicherheit noch immer in den Schatten stellt. Die Architektur der Doppelhelix erlaubt die Nanoskalierbarkeit dieses Biomoleküls von 0.4 nm bis einige Millimeter. Diese Eigenschaft prädestiniert die DNA als Grundbaustein für die technische Nutzung nanomechanischer Systeme.

In den Biowissenschaften und in der Medizin liegt die Bedeutung der DNA in der Regelung zellulärer Prozesse durch die Ablesung der in ihr gespeicherten Information. In der Medizin betrifft dies insbesondere die moderne Diagnostik und Behandlung von Krankheiten durch maßgeschneiderte Therapien. Aber die Vielfalt dieses Biomoleküls interessiert nicht nur Wissenschaftler und Technologen. Auch Künstler, Kriminologen, verschiedene Institutionen und Privatpersonen sind von diesem Molekül begeistert. Sie nutzen dessen Eigenschaften auf vielfältige Weise. Beginnend mit Dali gibt es heute viele Künstler, welche die Genominformation in grafische oder musikalische Kunstwerke umsetzen. Privatpersonen entscheiden sich für medizinische Eingriffe wegen ihrer Gensequenz oder Versicherungen begründen daraufhin Fallentscheidungen. Kein anderes Biomolekül beeinflusst das Leben aller Menschen so durchdringend.

Die genomische Information in der Doppelhelix kodiert aber auch die evolutionäre Entwicklung des jeweiligen Organismus und liefert heutzutage die unverrückbaren Beweise für philosophische oder rassenpolitische Fragen, wie die Herkunft des Menschen aus Afrika. Das Genom speichert nicht nur zahlreiche Umwelteinflüsse, sondern möglicherweise auch das Alter der Organismen. Die Kraft der Gene wird für das unbändige Reproduktionsbestreben der Individuen verantwortlich gemacht. Somit ist die Geninformation ein entscheidender Schlüssel zur Klärung der wichtigsten Menschheitsfrage: Was ist Leben? Diese Fragestellung eröffnet eine Diskussion für die

moderne Astronomie: Ist die Suche nach Leben in fremden Galaxien in unserer heutigen Form sinnvoll? Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines ähnlich universellen Biomoleküls auf einem anderen Planeten oder gibt es DNA-unabhängiges Leben?

## **DNA-Nanotechnologie: Nanostrukturen und molekulare Maschinen aus DNA**

*Friedrich C. Simmel*

Technische Universität München

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die Biologie ist die DNA in den vergangenen Jahrzehnten chemisch und physikalisch so gut wie kaum ein anderes Makromolekül untersucht und charakterisiert worden – dazu zählen kinetische und thermodynamische, aber auch polymermechanische und elektrostatische Eigenschaften. Darüber hinaus wurden auch Verfahren entwickelt, künstliche DNA-Moleküle kostengünstig herzustellen und dazu noch auf vielfältige Weise chemisch zu modifizieren. Nutznießer dieser Entwicklung ist seit einigen Jahren auch ein Forschungszweig an der Schnittstelle zwischen den Lebenswissenschaften und der Nanotechnologie, der es sich zur Aufgabe gesetzt hat, künstliche molekulare Strukturen durch Selbstorganisation biomolekularer Komponenten herzustellen. So können heute die einzigartigen molekularen Erkennungseigenschaften der DNA – die berühmte „Basenpaarung“ – dazu genutzt werden, nahezu beliebige molekulare Objekte durch die sequenzspezifische Zusammenlagerung von DNA-Molekülen zu erzeugen. Diese Objekte können dann einerseits als molekulare Nanostrukturen mit vollkommen unbiologischer Funktion – gewissermaßen als „Material“ – verwendet werden, andererseits können durch DNA-Selbstorganisation aber auch biologische Funktionseinheiten zumindest im Ansatz nachempfunden werden. Durch die geschickte Nutzung der mechanischen Eigenschaften der DNA können neben statischen Nanostrukturen auch molekulare Schalter und Maschinen realisiert werden, und die informationscodierenden Eigenschaften der DNA eignen sich gar für die Realisierung einfacher molekularer Computer.

## **Die RNA – vom kleinen Bruder der DNA zum Multitalent**

*Jens Kurreck*

Technische Universität Berlin

Lange Zeit wurde der RNA nur eine untergeordnete Rolle zugewiesen. Während die DNA als Träger der Erbinformation von großer Bedeutung war, schien die RNA nur Nebenrollen zu spielen: Sie überbrachte als messenger RNA die Information der DNA zum Ort der Proteinbiosynthese, war am Aufbau der Ribosoms beteiligt und lieferte Aminosäuren an. Mit der Entdeckung von RNA Molekülen mit katalytischer Aktivität (Ribozymen) wurde deutlich, dass die RNA doch sehr vielfältig ist. Sie kann Informationen speichern und Reaktionen beschleunigen. Die RNA Welt Hypothese gewann an Plausibilität. Die vergangenen 10 Jahre haben gezeigt, dass die RNA noch zahlreiche weitere Funktionen im zellulären Geschehen wie auch bei Krankheitsprozessen hat. MicroRNAs sind in alle bislang untersuchten Prozesse involviert und können Erkrankungen auslösen wie auch verhindern. Therapeutische Interventionen auf der Basis kleiner RNA Moleküle werden intensiv klinisch getestet, und microRNAs im Blut gelten als bedeutsame neue Biomarker. Hinzu kommen lange, nicht-kodierende RNAs, die ebenfalls lange Zeit übersehen wurden, von denen man heute aber weiß, dass sie ebenfalls entscheidende Steuerfunktionen in der Zelle haben. Der Vortrag gibt einen Überblick über die Bedeutung der zahlreichen

verschiedenen RNA-Klassen, von denen die meisten erst in den letzten Jahren gefunden wurden.

## **Zirkuläre RNAs**

*Nikolaus Rajewsky*

Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin

In den letzten Jahrzehnten haben zirkuläre RNAs mit vielleicht insgesamt 10 Veröffentlichungen im Verhältnis zu normalen linearen RNA Molekülen mit hunderttausenden von Veröffentlichungen ein Schattendasein geführt.

In den letzten zwei Jahren hat sich überraschend herausgestellt, dass tausende von zirkulären RNAs in menschlichen Zellen aktiv sind und komplexe Aktivierungsmuster zeigen. Weiter konnte gezeigt werden, dass zirkuläre RNAs andere RNAs regulieren können. Wir haben daher kürzlich vorgeschlagen, dass zirkuläre RNAs eine große Klasse von RNAs mit regulatorischem Potential darstellen (Memczak et al Nature 2013).

Der Stand der Forschung zu zirkulären RNAs wird vorgestellt und auch neue, potentiell sehr interessante Anwendungen in der Medizin angesprochen.

## **From the Genomic Project to –omics Medicine: a key component in personalising therapy**

*Hans Lehrach*

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat uns erstmals das Programm hinter allen biologischen Prozessen im Menschen geliefert. Wir sind aber alle verschieden. Wir sehen verschieden aus. Wir reagieren verschieden auf unsere Umwelt, und wir neigen zu verschiedenen Krankheiten. Es war daher wichtig, nicht nur ein Genom, sondern viele analysieren zu können, eine Aufgabe, die durch die enormen Fortschritte in der Sequenzieretechnologie lösbar wurde. Während die Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms in einer internationalen Zusammenarbeit mehr als 10 Jahre dauerte, und zwischen 1 und 3 Milliarden Dollar kostete, sind wir jetzt in der Lage, ein Genom pro Tag zu Kosten von ein paar tausend Dollar zu sequenzieren.

Diese enorme Reduktion der Kosten hat es uns erlaubt, eine rasch ansteigende Zahl von Individuen zu sequenzieren, anfangs einzelne (wie zum Beispiel Jim Watson), aber immer mehr auch große Kohorten. So wird im 1000Genom Projekt die Variation des Genoms innerhalb und zwischen menschlichen Populationen analysiert. TCGA, ICGC und andere Programme analysieren in großem Maßstab die Genom, Epigenom und Transkriptomvariation in verschiedenen Tumor/Patienten Vergleichen, und eine ansteigende Anzahl von Untersuchungen adressiert die Variation in Genomen anderer Patientengruppen. Diese Fortschritte eröffnen aber immer mehr noch viel weitreichendere Möglichkeiten, von der statistischen Analyse von Genomen zu der Routineanwendung der neuen Methoden in der Medizin, von der Statistik zu der detaillierten Charakterisierung des einzelnen Patienten, von einer (bestenfalls stratifizierten) Medizin, zu der Selektion der für den einzelnen Patienten optimalen Therapie auf der Basis von ‚virtual patient‘ Modellen, etabliert auf der Basis der enorm

detaillierten molekularen, Bild und Sensordaten, die in Zukunft von jedem Patienten (und nicht Patienten) zur Verfügung stehen werden, anfangs vor allem in der Onkologie, dem Vorreiter einer modellgetriebenen ‚Big Data‘ Medizin, zu vielen anderen Krankheiten, aber auch zur Vermeidung von Krankheiten durch individualisierte Prävention.

## **Das „Genographic Project“ aus raumwissenschaftlicher Perspektive**

*Hartmut Asche*

Gesellschaft für Erdkunde, Berlin

Das „Genographic Project“ wurde 2005 von der US-amerikanischen National Geographic Society, IBM, der Waitts Family Foundation in Verbindung mit der University of Arizona ins Leben gerufen. Das interdisziplinäre Forschungsprojekt kombiniert moderne genetische, geowissenschaftliche und informationstechnische Methoden und Technologien, um die Ursprünge des Menschen und seine räumliche wie genetische Entwicklung zu erforschen. Hierfür wurden seit Projektbeginn DNA-Proben von bislang rund 610.000 Menschen, darunter Angehörige zahlreicher indigener Völker, gesammelt und ausgewertet. Die Daten bestätigen, dass die Ursprünge des Homo sapiens in Afrika zu verorten sind, wie bereits ca. 200.000 Jahre alte Fossilienfunde in Äthiopien belegen. Grundlegende Klimaveränderungen vor 70-60.000 Jahren (Eiszeit) reduzierten die menschliche Population im Kernraum auf geschätzte 10.000 Individuen. Sie initiierten zugleich auch Wanderungsbewegungen, die zur globalen Ausbreitung der menschlichen Spezies führten. Ein Migrationsstrang erreichte vor ca. 50.000 Jahren die eurasisische Landmasse auf einem südlichen Weg über das Bab al-Mandeb, die Küsten Vorder-, Süd- und Südostasiens bis nach Australien. Eine nördliche Migrationsroute führte über den Nahen Osten bis nach Zentralasien. Von diesen Sekundärzentren nahmen weitere Wanderungsbewegungen in die nördlichen Breiten Europas und Asiens ihren Ausgang. Vor ca. 20.000 Jahren eroberte Homo sapiens über die seinerzeit bestehende Landbrücke von Asien den Kontinent Amerika, dessen Südspitze vor ca. 15.000 Jahren erreicht wurde. Der Wechsel zu einer landwirtschaftlichen Produktionsweise in den eroberten Erdräumen löste eine Bevölkerungsexplosion aus, legte den Grundstein menschlicher Zivilisation, trieb die materiell-technologische Entwicklung an und begründete in besonders begünstigten Räumen die ersten Hochkulturen. Gleichzeitig veränderte diese Entwicklung die menschliche Genstruktur nachhaltig. DNA-Daten und Populationsgenetik, in Verbindung mit paläontologischen und geowissenschaftlichen Befunden, wie sie im „Genographic Project“ untersucht werden, ermöglichen faktenbasierte Korrekturen und Präzisierungen der bisherigen Annahmen. Sie verdeutlichen uns vor allem die gemeinsamen Wurzeln unserer Spezies. Damit leistet das „Genographic Project“ einen nicht zu unterschätzenden Beitrag, bestehenden rassistischen Vorurteilen zu begegnen.

## **Funktionen und Manipulationen der mitochondrialen DNA**

*Peter Seibel*

Biomedizinisch-Biotechnisches Zentrum der Universität Leipzig

Mitochondrien sind die Energiekraftwerke der eukaryotischen Zellen. Hier laufen die zentralen biochemischen Prozesse ab, die die oxidative Energieversorgung einer Zelle sicherstellen. Genetisch werden diese Reaktionen durch zwei unterschiedliche Genome kontrolliert: Während das exklusiv maternal vererbte mitochondriale Genom 13 Proteingene des oxidativen Phosphorylierungssystems beinhaltet, werden alle übrigen Gene vom weitaus komplexeren Kerngenom kodiert.

Dennoch konnte das mitochondriale Genom als eine Art "Hotspot" für DNA Veränderungen identifiziert werden, die multisystemische Erkrankungen beim Menschen auslösen können. Eine Möglichkeit der Reparatur der genetischen Defekte existiert nicht. Ein wesentlicher Grund für dieses Dilemma sind die fehlenden molekularen Werkzeuge, die eine Korrektur der mitochondrialen DNA zulassen würden.

In diesem Zusammenhang ist es uns gelungen, eine neue Technologieplattform zu entwickeln, die eine Manipulation der mitochondrialen DNA erlaubt: Zunächst lässt sich das endogene mitochondriale Genom durch einen enzymatischen Vektor gezielt zerstören und entfernen. Es entstehen sogenannte RhoZero Zellen, die dann über kein eigenes Mitochondriengenom verfügen. In einem zweiten Schritt werden die RhoZero Zellen mit exogenen DNA Molekülen beladen, so dass erneut Zellen entstehen, die mit der vollständigen und intakten genetischen Information ausgestattet sind. Unter Verwendung dieser molekularen Werkzeuge können nun Zellen mit einem veränderten genetischen Mitochondriengenom hergestellt werden. Vollkommen neuartige Therapieformen werden durch die entwickelte Technologieplattform ermöglicht.

## **Miniaturisierung der DNA-Nachweistechiken**

<sup>1,2</sup>*Frank F. Bier, <sup>1,2</sup>Soeren Schumacher*

<sup>1</sup> Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), Institutsteil Potsdam

<sup>2</sup> Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie

Die Möglichkeiten spezifischer Nachweise von Nukleinsäuren, wie sie in den vergangenen Jahren entwickelt wurden, haben Analytik und Diagnostik verändert. Durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) und die Kombination derselben mit der reversen Transkription wurden Analysen von geringsten Spuren und komplexen Mustern technisch erschlossen. Schließlich befindet sich die Sequenzierung auf einem Kurs technischer Verbesserungen, die sie bald zu einem zuverlässigen und auch erschwinglichen Instrument der Analytik werden lassen wird. Waren viele dieser Technologien bisher an ein gut ausgestattetes Labor allein schon aufgrund der Größe und Komplexität der dafür erforderlichen Maschinen gebunden, so bietet die Weiterentwicklung der Mikrofluidik und der Lab-on-Chip-Technik die Chance das Labor zu verlassen und dort Proben zu analysieren, wo immer es gebraucht wird, am sogenannten „point-of-need“. Wir stellen neue Entwicklungen auf diesem dynamischen Gebiet vor.

## **Multiparametrische Diagnostik von Reparaturmechanismen der DNA in der individualisierten Medizin**

*Dirk Roggenbuck*  
Mediplan, Dahlewitz

Radio- und Chemotherapien sind heute effektive therapeutische Behandlungsmethoden für Patienten mit neoplastischen Erkrankungen. Allerdings treten bei diesen Behandlungsmethoden, die in den Richtlinien der entsprechenden medizinischen Fachgesellschaften niedergelegt sind, bei einem Teil der Patienten schwere bis schwerste Nebenwirkungen auf. Diese Nebenwirkungen sind häufig auf toxische Effekte im gesunden Gewebe zurückzuführen. Immer mehr Daten belegen, dass diese individuelle unterschiedliche Sensitivität gegenüber Bestrahlung oder chemotherapeutischen Wirkstoffen auf einer individuellen genetischen Prädisposition beruht. Das sind vor allem Mutationen und Genpolymorphismen, die eine Rolle bei der Zellantwort gegen Bestrahlung oder das Einwirken von Chemotherapeutika spielen. Eine individualisierte Medizin hat über die biomarkerbasierte Stratifizierung dieses Patientengutes die Aufgabe, Patienten mit einer erhöhten Sensitivität zu diagnostizieren und einer differenzierten Behandlung zuzuführen. Ein solcher Biomarker umfasst zum Beispiel die Bestimmung von Doppelstrangbrüchen (DSB) in der DNA. DSB sind die schwerste Form der DNA Schädigung, die durch ionisierende Strahlung oder bestimmte Chemotherapeutika wie Topoisomerase 2-hemmende Substanzen hervorgerufen werden können. Defekte in den Reparaturmechanismen dieser DSB, wie sie bei Erbkrankheiten wie zum Beispiel den Ataxia telangiectasia, Ligase 4 Defizienz und Nijmegen Breakage Syndromen zu finden sind, führen im Allgemeinen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung. Trotz intensiver Forschung sind noch nicht alle Mechanismen der DNA Reparatur bis auf die molekulare Ebene aufgeklärt. Die Bestimmung von DSB über die Detektion von induzierten gammaH2AX Foci ist heute die sensitivste Methode zur Ermittlung dieser DNA Schädigung und kann hervorragend zur Analyse von Defekten in den Reparaturmechanismen derselben angewendet werden. Erste automatische Verfahren zur Quantifizierung und multiparametrischen Evaluierung von gammaH2AX Foci sind kürzlich entwickelt worden. Solche Methoden auf der Basis der indirekten Immunfluoreszenz und automatischer Mustererkennungsalgorithmen bieten eine ideale Grundlage zur Einführung der Diagnostik von DNA Reparaturmechanismen in die Routinediagnostik von Patienten mit neoplastischen Erkrankungen im Rahmen einer individualisierten Medizin.

## **Neueste Entwicklungen auf dem Gebiet der RNA-Technologien**

*Volker A. Erdmann*  
Freie Universität Berlin

Mit der Entschlüsselung der DNA Struktur vor 60 Jahren fiel gleichzeitig der Startschuss für die sich sehr schnell entwickelnde Struktur- und Funktionsforschung von Ribonukleinsäuren (RNAs). Bereits der 1954 gegründete RNA Tie Club hatte sich den Leitspruch "To solve the riddle of the RNA structure and to understand how it built proteins" gewählt, da die Mitglieder auch die wichtige Rolle der RNA Moleküle bei der Genexpression vorhergesehen hatten.

Mit der Entschlüsselung des Genetischen Codes, und der Formulierung des Zentralen Dogmas der Molekularbiologie, schien es einleuchtend, dass die von der Natur den RNAs zugeordneten Funktionen sich auf die folgenden Punkte beschränken würden: 1. Überbringung der genetischen Information mittels mRNAs zu den Ribosomen (Eiweißfabriken der Zelle), 2. Überbringung der Aminosäuren mittels tRNAs zu den Ribosomen und 3. als strukturelle ribosomale RNA Komponente des Ribosoms.

Mit den bahnbrechenden Entdeckungen von Sidney Altman und Thomas R. Cech (Nobelpreise für Chemie 1989), dass RNA Moleküle auch enzymatische Eigenschaften besitzen können, entwickelte sich die RNA Forschung explosionsartig in ganz neue Richtungen, sodass heute z.B. die Schlüsselfunktionen von RNA Molekülen in der Regulation der Genexpression unbestritten sind. Ein Beispiel für diese RNA Regulatoren sind die sogenannten siRNAs und microRNAs, die mit Hilfe von Proteinfaktoren gezielt an mRNAs herangeführt werden, sodass diese dann die mRNAs zerschneiden und somit die die Synthese eines bestimmten Proteins unterbrechen können.

Wir beschäftigen uns seit Jahren mit der Struktur und Funktion von Ribonukleinsäuren und in jüngster Zeit auch wie diese RNA Moleküle für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt werden können. Im Zuge dieser Untersuchungen haben wir 1996 auch hochaffine Nukleinsäuren entdeckt, die wir mit Spiegelmere bezeichnet haben. Diese Spiegelmere sind im Prinzip Aptamere, also hoch affine Nukleinsäuren, die mit Hilfe der molekularen Evolution (SELEX Verfahren) in spiegelbildlicher Form hergestellt werden.

Die Vorteile der Spiegelmere, im Vergleich zu den Aptameren, die aus natürlichen Nukleinsäurebausteinen bestehen, liegen in ihrer Stabilität und der Tatsache, dass sie nicht in das Erbgut eines Patienten eingebaut werden können.

Die jüngsten Ergebnisse der Noxxon Pharma AG zeigen, dass Spiegelmere, auch in höheren Dosen, keine immunogenen und toxikologischen Nebenwirkungen hervorrufen. Zurzeit befinden sich drei Spiegelmere der Noxxon Pharma AG in der vielversprechenden zweiten klinischen Testphase.

In jüngster Zeit haben wir uns bemüht erstmalig spiegelbildliche Ribozyme, wie z.B. Hammerhead Ribozyme und DNAzyme, zu entwickeln. Hier konnten wir zeigen, dass diese spiegelbildlichen Enzyme, von uns als Spiegelzyme® bezeichnet, spiegelbildliche Substrate sequenzspezifisch sehr effizient spalten können. Die Anwendungspotentiale der Spiegelzyme könnten u.a. im Pharmakologischen Bereich als potentielle Antidote gegen Spiegelmere, oder andere in der Medizin eingesetzte spiegelbildliche Nukleinsäuren, gesehen werden.

Darüber hinaus zeigen unsere neuesten Forschungsergebnisse sehr überraschend, dass wir sogar mit unseren Spiegelzymen herkömmliche RNA Moleküle sequenzspezifisch zerschneiden können. Diese sequenzspezifischen Inaktivierungen konnten wir auch bereits mit einer Inaktivierung einer mRNA *in vivo* demonstrieren. Die sich durch diese Beobachtung eröffnenden Anwendungspotentiale könnten in der molekularen Medizin von grundsätzlicher neuer Bedeutung sein.

In dem Vortrag werden wir unsere Entwicklungen und neusten, und auch patentierten, Forschungsergebnisse über die Spiegelzyme zusammenfassen und die Potentiale dieser neuen Spiegelzym Technologien für die RNA Technologien in den Bereichen der molekularen Medizin und Biotechnologie diskutieren.

## **POSTER**

### **Microarray Copying – on the way to Next Generation Microarrays**

<sup>1,2</sup>Jürgen Burger, <sup>2</sup>Jochen Hoffmann, <sup>2,3</sup>Martin Trotter, <sup>1</sup>Normann Kilb, <sup>1,2</sup>Günter Roth

<sup>1</sup>Laboratory for Microarray Copying, ZBSA, Albert-Ludwigs-University Freiburg

<sup>2</sup>Laboratory for MEMS Applications, Department of Microsystems Engineering - IMTEK, Albert-Ludwigs-University Freiburg

<sup>3</sup>HSG-IMIT, Villingen-Schwenningen

Microarrays, especially DNA microarrays, are versatile tools for high throughput molecular interaction screening, testing of gene activity or SNP-typing. But as Next Generation Sequencing (NGS) becomes better and utmost important cheaper, SNP-typing and transcriptome analysis is now mainly made with NGS. Some believe that sequencing may replace microarrays. Nevertheless, sequencing of proteins is quite a challenge and molecular interactions, enzyme activity and binding-kinetic data are not obtainable at all with NGS. So in some niches microarrays may persist.

We intend now to bridge both worlds, microarrays and sequencing by microarray copying. Microarray copying means to take a sequencing chip as template and use widely available enzyme mixes to generate a microarray copy in terms of DNA, RNA or proteins.

Exemplary a DNA microarray was generated with more than 100,000 spots and DNA as long as 1,500 bp by amplifying the DNA from a sequencing chip, namely a picotiterplate of Roches GS FLX 454, with a simple PCR mix and a primer coated surface. The length of DNA exceeds any commercially available DNA microarray by far (demonstrated for 1.5 kb). But even protein microarray copies have been realized, by applying so called “cell-free in-situ expression mixes”, which takes DNA as template and generates the according encoded proteins. We show first results of such protein microarrays, copied in this case from a classic DNA microarray.

Having the daily used “photocopier” from the office in mind, we like to show first steps of the vision that in not too far future a “microarray copier” will be loaded with a Next Generation sequencing chip to generate DNA, RNA or protein microarray copies. As such copying of Next Generation Microarrays would be an upgrade of Next Generation Sequencing as it may be applied from each sequencing run.

### **Monoclonal mouse antibodies against Camel Immunoglobulins**

*Pamela Holzlöhner, Erik Schliebs, Natalia Maier, Friederike Pfister, Jonas Füner, Burkhard Micheel, Katja Hanack*

Universität Potsdam

Camelid antibodies are of special interest because some of them belong to immunoglobulin subclasses (IgG2 and IgG3) which are build up only by heavy chains. The advantages of these heavy chain antibodies are their small size which allows them to penetrate deep into tissues. It is furthermore assumed that their fingerlike VHH



binding domain can bind within the active center of enzymes. To use such antibodies for practical application we need specific identification tools. Therefore, we generated monoclonal antibodies that bind to camelid total IgG as well as only to the conventional camelid IgG1 and the heavy chain camelid IgG3. The monoclonal antibodies are suitable to detect camelid antibodies by enzyme immunoassay (ELISA) but not in western blots, indicating that the binding epitopes are discontinuous.

## **Effects of *trans*-fatty acids on the microRNA expression in human colon cancer cells**

*Solveigh Köpke, Thorsten Buhrke, Alfonso Lampen*  
Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin

*Trans* fatty acids (TFA) are unsaturated fatty acids with at least one double-bond in *trans* configuration. They are generated during industrial oil hardening and refinement processes at high temperatures or are formed by bacterial metabolism in ruminant animals. While there is a clear correlation between the consumption of TFA and an increased risk of coronary heart disease, a potential cancer risk is still controversially discussed. MiRNAs are small, non-coding RNAs that regulate the gene expression on a post-transcriptional level. By regulating target mRNAs they can act as oncogenes or tumorsuppressors and it is known that they are differentially expressed in a multitude of tumors. The aim of this project was to analyze potential fatty acid-induced changes of the miRNA expression profile in human colon cancer cells to investigate their potential role in colon carcinogenesis.

We investigated 16 different C:18-Isomers with double bonds in *trans*- and/or *cis*-configuration. Caco-2 cells (human colorectal adenocarcinoma cells) were incubated for 24 h with different fatty acids. The RNA was isolated and transcribed to cDNA. Subsequently we analysed the expression of 84 cancer-associated miRNAs by qRT-PCR using the Human Cancer PathwayFinder miScript qRT-PCR Array (Qiagen). The Fold Change of miRNA expression of fatty acid-treated Caco2 cells in comparison to the miRNA expression levels of untreated cells was determined and analysed. Hsa-miR-184, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-9-5p and hsa-miR-10a-5p were significantly upregulated by several fatty acids whereas hsa-miR-32-5p and hsa-miR-15a-5p were significantly downregulated after fatty acid exposure.

In particular hsa-miR-32-5p (miR-32) is an interesting subject for further investigations. We provide first evidence that fatty acid-induced downregulation of miR-32 correlates with an upregulation of mRNA expression of *bim*, a proapoptotic member of the Bcl-2 pathway. Thus, our data support the hypothesis that fatty acids have an impact on the induction of apoptosis via downregulation of miR-32. The fatty acid-induced effects, however, were not dependent on the presence of *trans* double bonds in the tested compounds as the homologous compounds with double bonds in *cis* configuration showed comparable effects.

## **Vom Knochen zum Phänotyp – Wie die Analyse fossiler DNS die Historie der Fellfarben von Pferden aufdecken hilft**

*Arne Ludwig*

Leibniz-Institute for Zoo- and Wildlife Research, Berlin

Obwohl Untersuchungen fossiler DNS sich seit einiger Zeit großer Beliebtheit erfreuen, sind sie noch immer mit Limitierungen behaftet. Zum Beispiel können nach wie vor nur Fragmente mit einer maximalen Länge von ca. 200 Basenpaaren routinemäßig amplifiziert werden. Verbesserungen in der PCR sowie die Einführung der Next-Generation-Sequenzierung in den letzten Jahren erhöhen zwar die gewonnenen Datenmengen drastisch, aber gleichzeitig sind diese Techniken für fossile Proben sehr teuer, zeitaufwendig und damit riskant. In dieser Studie werden SNPs (Single-Nucleotide-Polymorphism) mittels Pyrosequenzierung detektiert, welche für Fellfarbvarianten kodieren bzw. mit bestimmten Fellfarben assoziiert sind. Untersucht wurden in unserer Studie fossile Knochen und Zähne eurasischer Pferde von Sibirien bis zur Iberischen Halbinsel, welche zwischen 25,000 und 1,000 Jahre alt sind. Wir konnten erstmalig zeigen, dass es vor der Domestikation Braune, Rappen und Tigerschecken gab. Überraschenderweise sind das die gleichen Phänotypen, welche in paläolithischen Höhlen gemalt wurden. Mit der Domestikation, welche in der nordkaukasischen Steppe vor ca. 3,500 Jahren vor Christus stattfand, stieg die Variabilität der Fellfarben rapide an. Menschlicher Schutz und künstliche Selektion waren für die Zunahme der Fellfarben verantwortlich und ermöglichen das Auftreten von natürlicherweise selektiv benachteiligten Varianten (pleiotrope Effekte). Diese Studie ist die erste umfassende paläogenetische Untersuchung eines quantitativen Merkmals und eröffnet damit weitreichende Möglichkeiten zur Untersuchung von Anpassung und Evolution einzelner Arten inklusive des Menschen.

## **Use of antibody gene library for the isolation of specific single chain antibodies by ampicillin-antigen conjugates**

*Katrin Messerschmidt, Meina Neumann-Schaal, Katja Hanack*

Universität Potsdam

Isolation of recombinant antibodies from antibody libraries is commonly performed by different molecular display formats including phage display and ribosome display or different cell surface display formats. We describe a new method which allows the selection of *Escherichia coli* cells producing the required single chain antibody by cultivation in presence of ampicillin conjugated to the antigen of interest. The method utilizes the neutralization of the conjugate by the produced single chain antibody which is secreted to the periplasm. Therefore, a new expression system based on the pET26b vector was designed and a library was constructed. The method was successfully established first for the selection of *E. coli* BL21 Star (DE3) cells expressing a model single chain antibody (antifluorescein) by a simple selection assay on LB-agar plates. Using this selection assay, we could identify a new single-chain

antibody binding biotin by growing E. coli BL21 Star (DE3) containing the library in presence of a biotin-ampicillin conjugate. In contrast to methods as molecular or cell surface display our selection system applies the soluble single chain antibody molecule and thereby avoids undesired effects e.g. by the phage particle or the yeast fusion protein. By selecting directly in an expression strain, production and characterization of the selected single chain antibody is possible without any further cloning or transformation steps.

## **Entwicklung einer Raman-spektroskopischen Bildgebung für die instrumentelle Analytik**

*<sup>1,2</sup>Carina Reble, <sup>1</sup>Ingo Gersonde, <sup>1</sup>Cathrin Dressler, <sup>1</sup>Johannes Schleusener, <sup>1</sup>Jürgen Helfmann, <sup>1,2</sup>Hans Joachim Eichler*

<sup>1</sup> Laser- und Medizin- Technologie Berlin (LMTB), Berlin

<sup>2</sup> Technische Universität Berlin

In der instrumentellen Analytik sind schwingungsspektroskopische Verfahren, wie Infrarot- und Raman-Spektroskopie, Routine. Vor allem die Methoden der Raman-Spektroskopie sind ideal auch für Fragestellungen in der Medizin und den Lebenswissenschaften. Sie ermöglichen eine kontaktfreie und schonende Messung selbst in wässrigen Systemen und liefern Informationen über molekulare Prozesse in Zellen. Raman-Messungen erfolgen in Sekunden und stellen einen adäquaten Ersatz für zeitaufwändige Laboranalysen dar. Raman-Messungen sind darüber hinaus äußerst präzise in der Differenzierung und Quantifizierung von Molekülen wie in den Life Sciences notwendig. Es stehen zudem oberflächenverstärkte Mechanismen (SERS= surface enhanced Raman scattering) zur Verfügung, die in der Lage sind, im Nachweis ultrasensitiv zu sein.

Die Raman-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung biologischer Proben unterschiedlicher Größen von ganzen Organen über Gewebeschnitte, Zellen, Viren bis hin zur DNA/RNA. Mikroorganismen (z. B. pathogene Keime) können anhand einer charakteristischen Raman-Signatur nachgewiesen werden. Auch im Bereich der Materialanalytik, der Prozesskontrolle und der Qualitätssicherung stellt die Raman-Spektroskopie ein vielfältig einsetzbares Instrument dar. Es können mithin Informationen zur Zusammensetzung und Struktur erhalten werden. Attraktiv ist die Technik für die bio-chemische Analyse, hier ist eine dynamische Charakterisierung und Bildgebung ohne Verwendung von Markern wie Fluorophoren im Sinne des „label-free“ einsetzbar. Die weitere Entwicklung von flexiblen fasergestützten Raman-Sonden und Raman-Imaging-Systemen für die sichere und schnelle Analytik soll in enger Zusammenarbeit mit dem Projektkooperationspartner Prof. Roth am Astrophysikalischen Institut Potsdam erfolgen. Im Vordergrund des Interesses am Projekt Raman-Imaging-Analytik (RIA) steht die praxisnahe Umsetzung der Multiplex-Spektrometer-Technologie.

## The Modi Operandi of the VideoScan Platform for the Detection and Analysis of Nucleic Acids

<sup>1</sup>Stefan Rödiger, <sup>2</sup>Werner Lehmann, <sup>1</sup>Ulrike Frömmel, <sup>2</sup>Werner Lehmann, <sup>1</sup>Alexander Böhm, <sup>1</sup>Jörg Nitschke, <sup>3</sup>Michal Burdukiewicz, <sup>1</sup>Christian Schröder, <sup>4</sup>Rémi Dangla, <sup>4</sup>Magali Droniou, <sup>1</sup>Peter Schierack

<sup>1</sup> BTU Cottbus-Senftenberg, Germany

<sup>2</sup> Attomol GmbH, Bronkow, Germany

<sup>3</sup> Wrocław University, Poland

<sup>4</sup> Stilla Technologies, Orsay, France

In medical routine diagnostics is a high necessity to deliver patient-related information (e.g., infections, personalized medicine) both at a high multiplex level and very accurate. Many assay platforms for nucleic acids have been developed which meet specific tasks. The performance of multiplex PCRs in conventional real-time PCR technologies is limited by available probe colors and/or the ability to perform melting temperature analysis. We expanded the power of nucleic acid analysis by building a multi-purpose tool for multiparameter analytics based on image analysis. Here we show that our platform, designated VideoScan, provides the basis for various use case scenarios. VideoScan is a highly versatile real-time image analysis platform and optimal for the quantification of thousands of microscopic objects within a single sample. VideoScan offers different levels for analysis and quantification of nucleic acids. This includes the ability to perform highly multiplex end-point and real-time quantification methods under precise temperature controlled conditions. We also developed heterogeneous multiplex microbead assays as a high-throughput technology (8 – 11 targets / cavity in 96-well plates). This technology was recently used for the comparison of *Escherichia coli* from human and domestic and wild animals in our in-house developed Multiplex-PCR Microbead Assay (MPMA). Moreover we show the design and applications of three microbead nucleic acid-based probe systems for homogenous assays that use Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Our methods include a new hydrolysis probe microbead real-time PCR assay (MHA), the LoopTag microbead real-time PCR probe system and a dual hybridization-probe assay. We implemented dual-hybridization probes for the quantification of nucleic acids and used this approach for melting curve analysis and the detection of Single Nucleotide Polymorphisms. The LoopTag probe system (Attomol GmbH) microbead real-time PCR probe system was adapted as part of an upcoming homogenous microbead probe system for increased sample throughput and in-deep target discrimination by melting curve analysis. The rising star of diagnostic applications is the digital PCR (dPCR). Recently we contributed the open source “dpcR” R package for the analysis of digital PCR experiments to the scientific community. Within this context there is an ongoing effort to use the VideoScan platform as a potential readout platform for the novel droplet digital PCR solution recently developed by Stilla Technologies (France). In conclusion the VideoScan technology is a useful platform for various assays and can be used to build novel customized multiplex on a single platform.

## **Individualisierte Medizin bei Kardiomyopathien mittels miRNA-Profilung**

<sup>1</sup>Christine Siegismund, <sup>1</sup>Maria Rohde, <sup>2</sup>Felicitas Escher, <sup>1</sup>Ulrich M. Gross, <sup>2</sup>Heinz-Peter Schultheiss, <sup>2</sup>Uwe Kühl, <sup>1</sup>Dirk Lassner

<sup>1</sup> Institut Kardiale Diagnostik und Therapie GmbH Berlin

<sup>2</sup> Med. Klinik II, Charité Universitätsmedizin Benjamin Franklin Berlin

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den westlichen Ländern bei weitem die häufigste Todesursache. Neben einer chronisch entzündlichen Reaktion in etwa 60 % aller Myokardbiopsien werden verschiedene kardiotope Viren wie beispielsweise Erythro- oder Coxsackievirus nachgewiesen. Diese viralen Infektionen des Herzmuskels gelten als eine Hauptursache für die Entwicklung einer Dilativen Kardiomyopathie (DCM). Einige Patienten sind in der Lage, eine virale Infektion des Herzmuskels durch ihr Immunsystem erfolgreich zu bekämpfen und beseitigen das Virus vollständig. Andere Patienten hingegen leiden aufgrund der chronischen, viralen Persistenz unter schweren Myokardschädigungen. Erste Untersuchungen zeigen, dass die Anwesenheit von einzelnen Genexpressionsmustern die individuell notwendige und effektive Behandlung des Patienten beeinflussen könnte. Abgesehen von kodierenden mRNAs im Herzmuskelgewebe, wurden miRNAs kürzlich als wichtige Regulatoren der Genexpression identifiziert und besitzen somit eine enorme Bedeutung in der Pathogenese von Kardiomyopathien.

Aufgrund spezifischer miRNA-Profile kann zwischen latenter und aktiver Erythrovirusinfektion unterschieden werden. Unter Nutzung eines Vorhersage-Algorithmus kann anhand der deregulierten miRNAs auch schon bei der Erstbiopsie festgestellt werden, ob der Patient kardiotope Viren (Coxsackievirus, Adenovirus) spontan eliminiert oder einer IFN-beta-Therapie bedarf.

*Dieses Projekt wurde durch Mittel eines Sonderforschungsbereich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB TR19) und des KMU-innovativ-Programms des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert*

## **Assoziation von mitochondrialen DNA Mutationen mit Kardiomyopathien**

<sup>1</sup>Jenny Stehr, <sup>1</sup>Christine Siegismund, <sup>1</sup>Maria Rohde, <sup>2</sup>Jessica Zenker, <sup>2</sup>Birgitt Löffler, <sup>2</sup>Peter Seibel, <sup>3</sup>Uwe Kühl, <sup>3</sup>Heinz-Peter Schultheiss, <sup>1</sup>Dirk Lassner

<sup>1</sup> Institut Kardiale Diagnostik und Therapie GmbH Berlin

<sup>2</sup> Biotechnological-Biomedical Center (BBZ) der Universität Leipzig

<sup>3</sup> Med. Klinik II, Charité Universitätsmedizin Benjamin Franklin Berlin

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit Abstand die häufigste Todesursache in den westlichen Ländern, dabei sind Entzündungen und virale Infektionen die wichtigsten Gründe für die Entwicklung von nicht-ischämischen Kardiomyopathien. Bisher ist nicht bekannt, inwieweit diese Bedingungen zu einem Rückgang der mitochondrialen Funktion mit einhergehender konsekutiver Störung des Energiestoffwechsels und Funktion des Herzmuskels beitragen.

Mitochondrien sind die wichtigsten Energielieferanten der Zellen, da sie das Energie-Äquivalent ATP erzeugen, indem sie Elektronen durch eine Reihe von Enzym-Komplexen schleusen. Als toxisches Nebenprodukt werden Sauerstoffradikale gebildet, die ein hohes Potenzial haben, die mitochondriale DNA (mtDNA) zu schädigen und Mutationen zu verursachen. Bis jetzt sind über 150 Mutationen der mtDNA und Hunderte von mtDNA-Umlagerungen als neuartige molekulare Marker sowie als Ursache vieler Krankheiten bekannt.

Neben der direkten Sequenzierung der relevanten mtDNA Regionen, haben wir multiparametrische diagnostische Testverfahren auf Basis von Multiplex-ELISA, Multiplex-Fragmentlängenanalyse oder Realtime-PCR entwickelt, um auf kardiopathogene Mutationen und Deletionen der mtDNA zu screenen.

Die drei verschiedenen Ansätze wurden evaluiert und auf definierte Wildtyp und mutierte mtDNA Standards optimiert. Dadurch sind wir in der Lage, die mtDNA Mutations- und Deletionsdiagnostik auch auf viral-induzierte oder entzündlichen Kardiomyopathien von Herzpatienten anzuwenden.

*Dieses Projekt wurde durch das Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie gefördert.*

## **Modulares selbstorganisierendes Immobilisierungssystem zum Biosurface-Engineering enossaler Implantatmaterialien**

<sup>1</sup>Cornelia Wolf-Brandstetter, <sup>1</sup>Judith Reichert, <sup>2</sup>Jan Michael, <sup>2</sup>Bernd Schwenzer, <sup>1</sup>Dieter Scharnweber

<sup>1</sup> Institut für Werkstoffwissenschaft, Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, Technische Universität Dresden

<sup>2</sup> Professur für Allgemeine Biochemie, Technische Universität Dresden,

Das an der TU Dresden entwickelte Immobilisierungssystem soll einen wesentlichen Beitrag zur Verbesserung der Einheilung titanbasierter Implantate leisten und nutzt dafür die Selbsterkennung von Nukleinsäuresequenzen zur Immobilisierung und gesteuerten Freisetzung bioaktiver Moleküle. Der Vorteil dieses Systems liegt in seiner Modularität und der hohen Flexibilität.

Dazu werden Ankerstrangsequenzen in einer anodisch gebildeten Oxidschicht regionsspezifisch fixiert. Die derart modifizierten Oberflächen können nach der Sterilisation zeitnah zum operativen Eingriff variabel biologisch funktionalisiert werden, indem mit Wirkstoffen konjugierte komplementäre Stränge an die immobilisierten Ankerstränge hybridisiert werden. Eine patientenspezifische Anpassung kann durch Art und Menge der Wirkstoffe sowie eine gezielte Freisetzung durch variierende Längen und gezielten Einbau von Fehlpaarungen im entstehenden Doppelstrangbereich erfolgen. Erste zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen haben das große Potential des modularen Immobilisierungssystems nachgewiesen.

*Die Arbeiten wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Programms „Bioaktive Implantate“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung gefördert*