

LABORWELT

Nr. 3/2012 – 13. Jahrgang

Biobanking

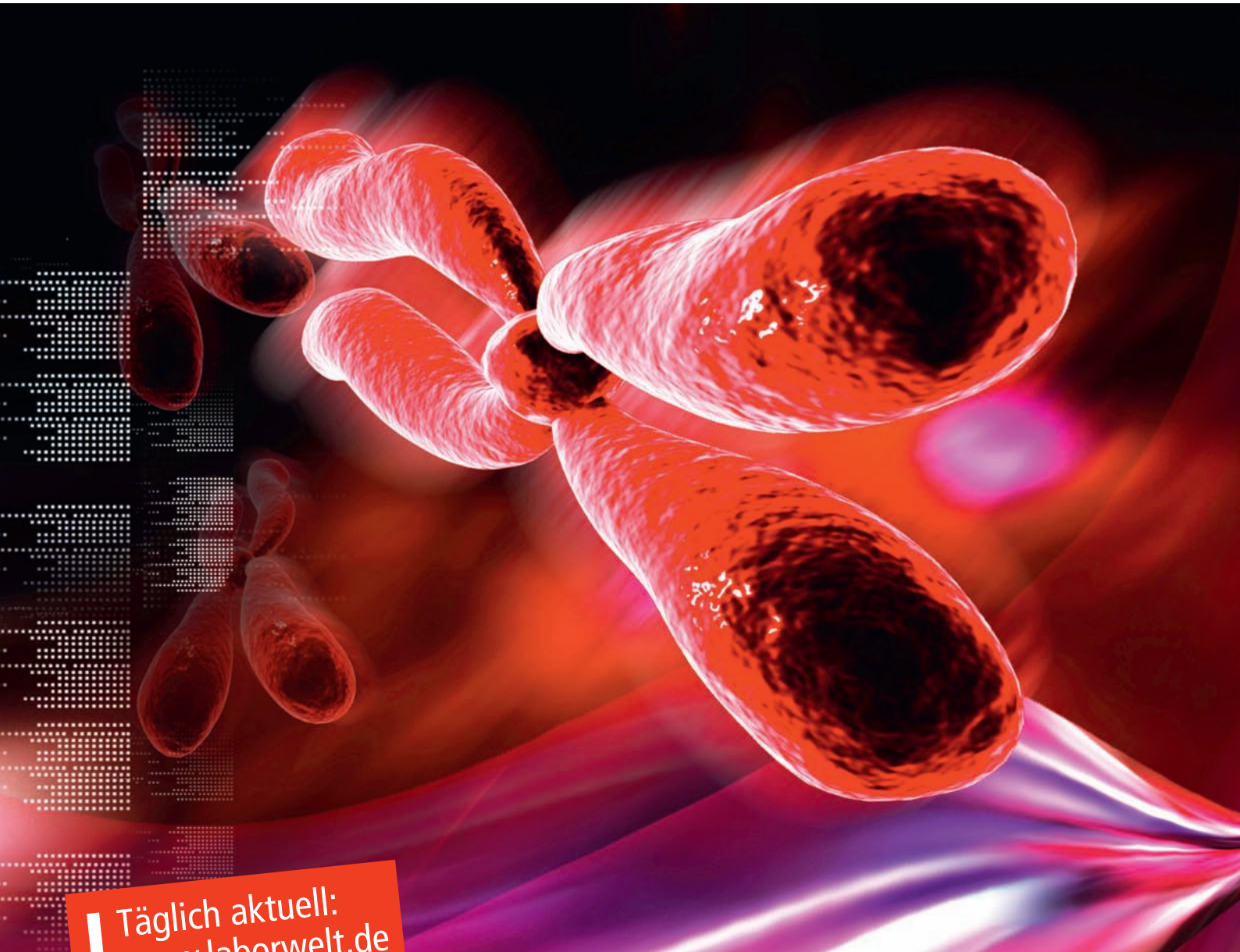
Automation und
Probenvorbereitung

Funktionsgenomik

Gezieltes Ausschalten von
Genen mit TALENs und ZFNs

Mikroskopie

In vivo-Imaging mit
molekularer Auflösung



Täglich aktuell:
www.laborwelt.de

BIOCOM



454
SEQUENCING

GS Junior System

GS Junior, my new best friend *...because now I can sequence on my bench-top*

We think you're going to like the GS Junior System. And not simply because it's exciting. It's much more than that.

- **The GS Junior System allows you to perform next-generation sequencing in your lab, on your bench, when you're ready.** And because it is based on proven 454 Sequencing Systems, it delivers results you can trust time and time again.
- **The GS Junior System also comes with a desktop PC equipped with user-friendly bioinformatic tools.** So you don't need to be an IT expert to assemble, map or analyze your genome, transcriptome or metagenome.
And what's not to love about that?

To learn more about the GS Junior System and how it can help you and your laboratory succeed, get in touch via our website: www.gsjunior.com

It could be the start of a beautiful friendship.

**GS Junior System –
The power of next-generation sequencing in your hands**

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

454, 454 SEQUENCING and GS JUNIOR
are trademarks of Roche.

Roche Diagnostics Deutschland GmbH
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim
www.roche.de



© 2012 Roche Diagnostics GmbH.
All rights reserved.

LABORWELT 3/2012

- 4 **Nachrichten aus der Wissenschaft**
DNA-Kopierer, Sichere Genfliegen, Künstliches Perlmutter, Umstrittener Gentest, Freies Forschungsportal, das Bananom und Qualle aus Herzzellen
- 38 **Labormarkt im Umbruch**
Danaher – unbekannter Riese im Markenzoo

Funktionsgenomik

I



TITEL:
Functional Genomics
Angesichts explodierender Datenmengen aus Sequenzierungsprojekten wird die Funktionsanalyse immer mehr zum Flaschenhals des molekularbiologischen Fortschrittes. Einen Ausweg versprechen RNAi, das Gene Editing und Aktivitätsscreens.

- 6 **Blitzlicht Targeted Knock-out**
Gene gezielt modifizieren mit Designer-Nukleasen
Denise Nguyen et al., TU München
- 9 **Expertenpanel Metabolomics**
Diagnose und Prognose mit Metabolomics-Tests
Therese Koal und Henricke Kamp
- 12 **Blitzlicht Genome Engineering**
Sequenzgenaues DNA-Targeting mit TAL-Tools
Frank Notka, Life Technologies/GeneArt AG, Regensburg
- 15 **Paperwelt RNA-Interferenz**
Einblick in das humane Sekretom
Rainer Pepperkok, EMBL, Heidelberg
- 16 **Blitzlicht Affinomics**
Antikörper zur Funktionsanalyse des Humanproteoms
Jörg Hoheisel, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
- 18 **Blitzlicht Metagenomics**
Biotechnologie aus dem Mittelmeer
Peter Golyshin et al., Bangor University, UK; Frank Oliver Glöckner, MPI für Marine Mikrobiologie, Bremen

Zellen & Biobanken

II



TITEL:
Zellen & Biobanken
Biomarker-Screening in Biobanken ist en vogue. Doch bevor Omics-Marker mit Zusatznutzen gefunden werden können, müssen die Probenvorbereitung, Lagerung und Analysetechniken standardisiert werden.

- Blitzlicht Stammzellkultur**
20 **Adhärenzte Zellkultur im „hängenden Tropfen“**
Julia Schulz et al., Fraunhofer-IBMT, St. Ingbert

- Paperwelt Datenauswertung**
22 **Biomarker und System-Epidemiologie**
Robin Haring, Universität Greifswald

- Blitzlicht Probenlagerung**
24 **Biobanken – Optimierung durch Automation**
Berthold Huppertz, Biobank Graz

- Expertenpanel Kryokonservierung**
27 **Kältetechnik für Biobanken**
Uwe Schön, Ben Spindler und Heiko Zimmermann

Mikroskopie

III



TITEL:
Mikroskopie
Neue Lichtmikroskopietechniken haben die Beugungsgrenze hinter sich gelassen und erreichen Auflösungen von unter 100 Nanometern. Wie dies die Forschung vorantreibt, lesen Sie in diesem Spezial.

- Blitzlicht dSTORM**
28 **Vielfarben-dSTORM mit Carbocyaninen**
Jan Schmoranz et al., Technische Universität Berlin
Blitzlicht Elektronenmikroskopie
- Blitzlicht Elektronentomographie**
30 **Minimal invasive Methoden in der Kryo-ET**
Jürgen Plitzko et al., MPI für Biochemie, Martinsried
- Blitzlicht SIM**
32 **Hochaufgelöste in vivo-3D-Zeitserien mittels SIM**
Reto Fiolka, Howard Hughes Medical Institute, Ashburn, USA
- Expertenpanel Optogenetik**
35 **Licht als genetischer Schalter**
Thomas G. Ortner, Rolf Borlinghaus
- Paperwelt STED-Mikroskopie**
36 **Scharfer Blick ins Gehirn von Mäusen**
Stefan Hell et al., Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
- 37 **Verbände**
- 39 **Neue Produkte**
- 41 **Termine**
- 42 **Ausblick/Impressum**

Intro



Die dunkle Seite der Genomik ...

Neben dem Organspendeskandal füllte ein weiteres biologisches Thema mit Sprengkraft einen guten Teil des medialen Sommerloches: die Kritik an dem pränatalen Gentest der Konstanzer Lifecodexx AG. Mit dem Bluttest können Ärzte viel früher und unkomplizierter als per Fruchtwasseranalyse feststellen, ob Trisomie 21 vorliegt oder nicht. Unabhängig davon, ob die Kritik des Bundesbehinderten-Beauftragten Hubert Hüppe zutrifft, der Test sei einzig auf eine Selektion Betroffener ausgerichtet, scheint eine erneute Negativwahrnehmung der Genforschung und -diagnostik vorprogrammiert. Wohl auch deshalb wird der Ruf nach angemessenen Regularien unter Biowissenschaftlern und Medizinern immer lauter. Mitte Juli forderten gleich zwei Wissenschaftsakademien (vgl. S. 42) die Europäische Kommission auf, bestimmte Testangebote zu untersagen. Zugleich sollen Qualitätsstandards für die direktvermarkteten Gentest-Angebote vorgeschrieben werden. Die erforderliche Debatte wirft einen Schatten auf Fortschritte bei der Genforschung, die nach langer Wartezeit endlich Nutzen verspricht.

Neue Methoden

Aktuelle Fortschritte bei funktionellen Techniken, wie dem Gene editing (vgl. Spezial „Funktionsgenomik“) ermöglichen es indes erstmals, realitätsnah und ohne Off-Target-Effekte die Funktionen von Genen zu studieren. Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, um die in Zellen & Biobanken – unserem zweiten Spezialthema – verborgenen Schätze zu heben: Diagnosemarker und Arzneimitteltargets. Abgerundet wird der Blick in die molekularen Tiefen von Krankheit und Gesundheit durch ein Spezialthema Mikroskopie. Ob die bislang wenig wahrgenommenen technologischen Fortschritte vermögen, die Negativperspektive zu ändern, muss die Berichterstattung zeigen. Wichtig ist es indes, diese zu kommunizieren.

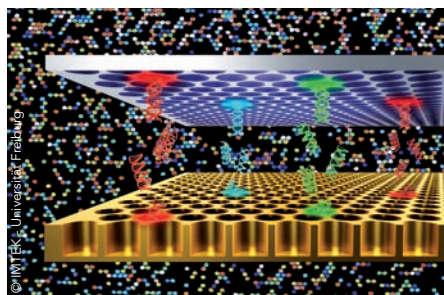
Thomas Gabrielczyk

Sequenzierung

DNA-Kopierer: So groß wie 1 Cent

➔ Mit einem von Freiburger Forschern entwickelten winzigen Chip können gleichzeitig hunderttausend einzelne DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

Das Herzstück der neuen Technik ist gerade einmal so groß wie eine 1 Cent-Münze. In einem Chip mit hunderttausend Vertiefungen – dem Picowell Array – werden die DNA-Sequenzen so verteilt, dass statistisch betrachtet jeweils genau eine Sequenz in genau einer Vertiefung landet. Danach wird der Chip mit einem einzigen gewöhnlichen Mikroskopie-Objektträger verschlossen. Die enthaltene DNA kann dann



mittels Festphasen-PCR vervielfältigt und anschließend mit Next Generation Sequencing entziffert werden. Der Clou: Die bei der PCR entstehenden DNA-Kopien binden an genau der Stelle an den Objektträger, die der Position der ursprünglichen Sequenz entspricht. Der Objektträger lässt sich dann, ähnlich wie ein DNA-Microarray, zur schnellen und kostengünstigen Analyse kompletter Genome einsetzen – ohne Spezialgeräte oder zusätzliche Übertragungsschritte.

Entwickelt wurde das nun im Fachmagazin *Lab on a Chip* (DOI: 10.1039/C2LC40534B) präsentierte Verfahren am Institut für Mikrosystemtechnik (IMTEK) der Universität Freiburg. Geht es nach den Forschern, könnte das System künftig DNA-Tests in der personalisierten Medizin vereinfachen. „Die Analyse einer Tumorzelle kann beispielsweise Aufschluss darüber geben, welche Signalwege in der Zelle fehlerhaft sind. Dieses Wissen ist in der personalisierten Medizin hilfreich, um Medikamente zielgerichtet auf eine Patientengruppe maßzuschneidern“, heißt es dazu aus Freiburg.

Genetik

Sichere Genfliegen

➔ Schweizer Forscher haben eine transgene Taufliiegen-Spezies erzeugt. Eine Gen-Barriere verhindert die Fortpflanzung von *Drosophila synthetica* mit der natürlichen Art.

Schweizer Forscher haben mit Hilfe genetischer Methoden eine neue Taufliiegen-Art geschaffen. Die Ergebnisse veröffentlichten die Wissenschaftler von der Universität Bern am 25. Juli in der Fachzeitschrift *PLoS ONE* (7(7): e39054, doi:10.1371/journal.pone.0039054). Im Vergleich zur natürlich vorkommenden Spezies *D. melanogaster* hat die von den Zellbiologen um Eduardo Moreno geschaffene neue Fliegen-Version hellere Augen und anders geformte Flügel. Der Clou der Forschungsarbeit liegt darin, dass die Wissenschaftler eine künstliche genetische Barriere zwischen den Arten eingerichtet haben. Die Folge: *Drosophila synthetica* ist das erste transgene Tier, das sich nicht mit dem Wildtyp vermehren kann, selbst aber fruchtbar bleibt und sich mit anderen Taufliiegen ihrer Art fortpflanzen kann. Moreno ist überzeugt, dass die neue Taufliiegen-Art künftig als Modell für die Entwicklung anderer transgener Organismen dienen könnte: „Wenn alle gewünschten genetischen Veränderungen auch mit entsprechenden Artenbarrieren versehen würden, so dass sich der veränderte Organismus nicht mit der natürlichen Art vermischen kann, dann könnten wir Risiken eingrenzen und natürliche Arten vor unerwünschten Kreuzungen mit transgenen Organismen schützen.“

Biomimetik

Künstliches Perlmutter

➔ Britische Forscher haben künstliches Perlmutter erzeugt. Mit dem robusten Imitat könnten zukünftig Schiffsrümpfe beschichtet werden.

Britischen Forschern um Ullrich Steiner von der University of Cambridge ist es gelungen, Perlmutter im Labor nachzuahmen (*Nature Communications*, doi:10.1038/ncomms1970). Mit Hilfe eines neuen biomimetischen Verfahrens konnten die Wissenschaftler erstmals die abwechselnden Schichten aus Kalk und organischem Material nachbauen, so dass die schillernde Optik erhalten bleibt. Dafür erzeugten sie zunächst eine poröse organische Schicht, die in eine Lösung mit einer Kalziumverbindung getaucht wird. Tröpfchen der Lösung kristallisieren anschließend zu einer stabilen Kalziumkarbonatschicht aus. Etwa 30 solcher Beschichtungszyklen werden von einem Roboter durchgeführt. Durch die Abfolge und Dicke der Schichten wird einfallendes Licht ähnlich reflektiert und gebrochen wie beim Natur-Perlmutter.

In der Natur verwenden schalenbildende Mollusken Perlmutter vor allem als Schutz gegen Fressfeinde, da es ähnlich wie eine Ziegelsteinmauer aufgebaut ist. Das Perlmutter-Imitat eigne sich künftig deshalb dafür, robuste und günstige Beschichtungen für verschiedenste Gegenstände herzustellen, so die Forscher. Denkbar wäre, dass das Kunst-Perlmutter in Zukunft im Schiffsbau eingesetzt wird, um die Schiffsrümpfe stabil zu beschichten.

Technologie**Vorstoß für freies Forschungsportal**

➔ Nach der britischen Regierung plant jetzt auch die Europäische Kommission, Forschungsergebnisse frei zugänglich zu machen. Die Kosten sollen die Autoren tragen.

Wenn der Steuerzahler die Forschung finanziert, soll er sie auch nutzen können. Dieser Argumentation folgt die Europäische Kommission mit ihrer Mitte Juli veröffentlichten Empfehlung, wissenschaftliche Publikationen im Rahmen öffentlich geförderter Forschung als Open Access-Veröffentlichungen frei zugänglich zu machen. Nach dem Willen der Kommission sollen bis 2016 etwa 60% der Resultate EU-geförderter Forschung kostenlos nutzbar sein. Die EU schließt sich damit der britischen Open-Access-Initiative von Mitte Juni an. Nach dem Willen des Wissenschaftsministers David Willets sollen Forschungsergebnisse generell öffentlich zugänglich gemacht werden; die Bearbeitungskosten von 2.000£ pro Publikation sollen von 2014 an die Autoren selbst tragen.

Hintergrund der Open Access-Initiative ist die in wissenschaftlichen Verlagen inzwi-

schen weitverbreitete Praxis, hohe Preise für Fachzeitschriften zu verlangen, deren Inhalt aus öffentlich geförderter Forschung stammt und unentgeltlich von Wissenschaftlern geprüft und aufbereitet wurde. Nach einem Wissenschaftler-Boykott des holländischen Verlags Elsevier sprach der britische *GUARDIAN* vom „akademischen Frühling“.

„Die Steuerzahler sollten nicht zweimal für Forschungsergebnisse zahlen müssen, und sie müssen problemlos auf Rohdaten zugreifen können“, sagte Neelie Kroes, die zuständige EU-Kommissarin für die Digitale Agenda. Das EU-Modell sieht zwei Wege vor, die den Wissenschaftlern die Wahl zwischen konventioneller Publikation oder einer Veröffentlichung abseits etablierter Verlagsstrukturen lassen.

In Großbritannien setzt man hingegen auf den Aufbau eines neuen Forschungsportals mit Peer-Review-Verfahren und Diskussions- und Tools. Für dessen Aufbau hat sich Wissenschaftsminister Willets bereits unentgeltliche Hilfe gesichert: Als Regierungsberater fungiert Wikipedia-Gründer Jimmy Wales.

Gendiagnostik**Gentest kommt**

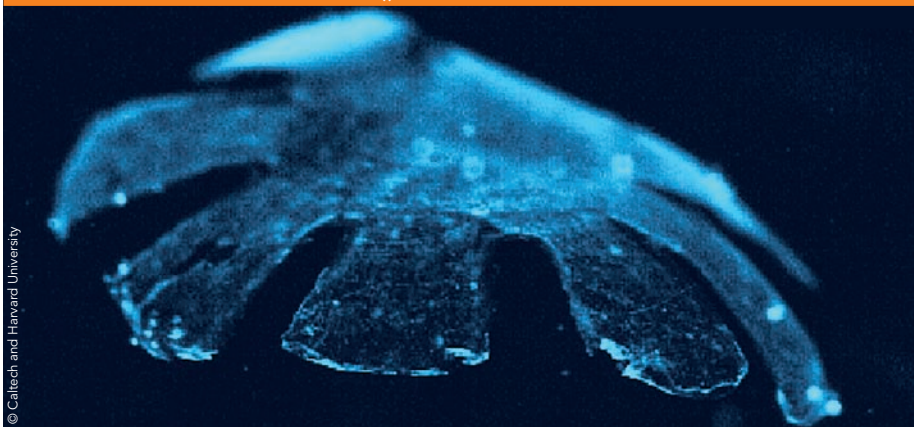
➔ Der vorgeburtliche Praena-Test auf Trisomie 21 soll trotz Kritik noch in diesem Jahr zu haben sein. Die Landesregierung Baden-Württembergs wird den Markteintritt nicht verhindern.

Selten hat ein Medizinprodukt solchen Wirbel verursacht wie der PraenaTest® auf Trisomie 21 der Konstanzer Lifecodexx AG. „Ich halte den Test für illegal“, sagte der Behinderten-Beauftragte der Bundesregierung Hubert Hüppe (CDU) Mitte Juli in Berlin. Seine Einschätzung beruht auf einem von ihm in Auftrag gegebenen Rechtsgutachten der Universität Bonn. Jedoch wird nach Meldungen von *SPIEGEL ONLINE* das zuständige Sozialministerium in Baden-Württemberg die Vermarktung des bereits genehmigten Tests trotz der Kritik nicht verhindern. Landessozialministerin Katrin Altpeter (SPD) bezieht sich dabei auf das Gendiagnostikgesetz, wonach vorgeburtliche genetische Untersuchungen durchgeführt werden dürfen, wenn sich damit Eigenschaften feststellen lassen, die die Gesundheit des Kindes vor oder nach der Geburt beeinträchtigen. Der Lifecodexx-Test basiert auf der Analyse zellfreier fötaler DNA im Blut der Mutter. Der entscheidende Unterschied zu etablierten Methoden nach Herstellerangaben: Bisher komme es bei etwa 1% der 30.000 Schwangeren, die sich jährlich einer Fruchtwasseruntersuchung unterziehen, zu einer Fehlgeburt. Der Praena-Test® sei hingegen gefahrlos.

Genomforschung**Das Bananom ist da**

➔ Französische Forscher haben das Genom der Wildbanane entziffert.

Französische Wissenschaftler um Angélique D'Hont teilten in Paris mit, das Erbgut der Variante DH Pahang der Wildsorte *Musa acuminata* umfasse mehr als 36.500 Gene (*NATURE*, doi:10.1038/nature11241). Im Vergleich zur Supermarktbanane kann die Wildsorte eine Reihe von Pilzen, Bakterien und Viren in Schach halten. Die Forscher vom Pariser Zentrum für internationale Zusammenarbeit in der Agrarforschung wollen nun herausfinden, welche Gene dafür verantwortlich sind. Dieses Wissen könnte der Supermarktbanane helfen. Die weltweit verbreitete Sorte Cavendish ist steril und wird deshalb vegetativ vermehrt, was ihre genetische Variabilität einschränkt und sie anfällig gegen Schädlinge wie die Erreger der Schwarzen Blattmasern und der Panamakrankheit macht. Die Resistenzgene der Wildbanane könnten aber die Rettung sein, meinen die Forscher.

Aus der LABORWELT.de-Galerie „Bild der Woche“**Qualle aus Rattenherz-Zellen**

Sie sieht aus und bewegt sich wie eine echte Qualle. Doch die blaue Meduse ist ein biologisches Imitat. Herzmuskelzellen aus Ratten bringen das Silikon-Gerüst zum Schwimmen. Ein US-Forscherteam hat erstmals eine bio-künstliche Qualle erschaffen. Der Silikonkörper der Kunst-Meduse zieht sich eigenständig rhythmisch zusammen. Möglich wird dies durch in das Silikon platzierte Herzmuskelzellen von Ratten (*Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2269). Die Forscher der Harvard University in Cambridge und des California Institute of Technology in Pasadena studierten zunächst an Ohrenquallen die Form und Verteilung der Muskelzellen. Anschließend schufen sie einen flachen, run-

den Silikonkörper mit acht Ausstülpungen. In die winzige Quallenform impften sie in genau vorher festgelegten Bahnen Zellen von Rattenherzen ein. Diese hatten sich bereits nach wenigen Tagen zu einem Muskelzell-Netzwerk verbunden. Für das Gelingen des Experimentes war dann nur noch etwas Starthilfe in Form eines Elektroschockes notwendig. Ähnlich wie nach dem Impuls eines Herzschrittmachers schlugen die Herzmuskelzellen kurz darauf selbständig im Takt, so dass sich die Qualle normal fortbewegen konnte. Anwendungspotential sehen die Wissenschaftler in der Herstellung künstlicher menschlicher Organe.

(alle Bilder der Woche auf Laborwelt.de)

I Funktionsgenomik



Während der Berg an Sequenzierungsdaten und bioinformatischen Vorhersagen von Genfunktionen wächst, hinkt die experimentelle Analyse der oft fehlerbehafteten Daten immer noch nach. Doch neue Methoden versprechen künftig eine automatisierte Funktionsanalyse und somit den Brückenschlag zwischen Genotyp (Genom, Methylom) und Ausprägung (Proteom, Metabolom). Erst dies ermöglicht das Lesen im Genom.

Jenseits der RNA-Interferenz

Mit Hilfe der unterdessen etablierten RNA-Interferenz (RNAi)-Technologie hat ein Team um Rainer Pepperkok vom EMBL in Heidelberg jedes der gut 20.000 Gene des Menschen ausgeschaltet und die Wirkung auf die Sekretion von Proteinen untersucht. Erstmals identifizierten die Forscher so einen Großteil der an der Sekretion beteiligten regulatorischen Proteine in humanen Zellen. Ähnliches leisten sogenannte Designer-Nukleasen, die sequenzspezifisch Doppelstrangbrüche induzieren und so das gezielte Ausschalten von Genen und die Untersuchung der funktionellen Konsequenzen im entsprechenden Tiermodell gestatten, wie Schnieke et al. berichten. Doch ist mit Hilfe der Zinkfinger-Nukleasen und TAL-Effektor-Nukleasen noch mehr möglich: Das Einschleusen synthetischer Gene an bestimmten Genloci eröffnet erstmals die gezielte Analyse der funktionellen Konsequenzen von Einzelbasenaustauschen. Mittels Aktivitäts-basiertem Screening versuchen zudem Forscher des MAMBA-Konsortiums um Peter Golyshin – der Miterfinder des Reactome Arrays – neue industriell interessante Metaboliten und Enzyme im Metagenom des Mittelmeeres aufzuspüren und mit Industriepartnern zu Produkten zu entwickeln. Experten stellen darüber hinaus das Potential von Metabolom-Analysen zur Diagnose von Krankheiten und Vorhersage von Arzneimitteltoxizitäten dar.

Gene gezielt modifizieren mit Designer-Nukleasen

Denise Nguyen, M.Sc., und Dr. Tatiana Flisikowska, Technische Universität München, Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere

Gene Targeting, also die gezielte Modifikation eines bestimmten Gens in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, war bislang die Standardmethode zur funktionellen Genomanalyse und um Tiermodelle für die Biomedizin bereitzustellen. Damit wurde die Maus zum meistverwendeten Säugetiermodell – und die Entwickler der Technologie 2007 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Obwohl das Potential dieser Technologie für viele Spezies offensichtlich ist, konnten funktionale ES-Zellen bislang nur für die Spezies Maus, Ratte und Affe etabliert werden. Gene Targeting beim Nutztier kann zwar mittels somatischem Kerntransfer erzielt werden, ist aber technisch aufwendig. Bei beiden Methoden muss die genetische Veränderung über homologe Rekombination *in vitro* kultivierter Zellen durchgeführt werden. Die verwendeten Zellen müssen die Fähigkeit besitzen, die Entwicklung eines neuen Lebewesens zu unterstützen oder zu tragen. Mit der Einführung des Gene Editing – so genannt, um es vom Gene Targeting zu differenzieren – wurde unlängst eine technologische Hürde übersprungen, sowohl hinsichtlich der Effizienz, mit der gezielte Veränderungen ins Genom eingebracht werden können, als auch hinsichtlich der Auswahl der Spezies. Die Methode beruht auf dem Einsatz neuartiger sequenzspezifischer Designer-Nukleasen: Zink-Finger-Nukleasen (ZFNs) oder TAL-Effektornukleasen (TALENs). Sie sind in Pflanzen, Reptilien, Fischen und Säugetieren aktiv. Durch die hohe Effektivität kann die Genmanipulation in Zellen, aber auch direkt in der befruchteten Eizelle durchgeführt werden, und das selbst für Säugetierarten, für die es weder funktionale ES-Zellen gibt noch der Kerntransfer eine Option darstellt.

ZFNs und TALENs werden häufig auch als molekulare Scheren oder Designer-Nukleasen bezeichnet, da sie eine Zielsequenz im Genom erkennen und dort einen DNA-Doppelstrangbruch induzieren. Daraus folgt, dass sowohl ZFNs als auch TALENs Elemente zur Sequenzerkennung und Endonuklease-Aktivität besitzen müssen (vgl. Abb. 1A).

Aufbau von Designer-Nukleasen

Die seit mehreren Jahren bekannten ZFNs beruhen – wie der Name schon impliziert – auf dem Motiv der Zink-Finger, welche ubiquitär in Transkriptionsfaktoren gefunden werden. Ein einzelner Zink-Finger hat eine Größe von 20 bis 30 Aminosäuren und ist strukturell gekennzeichnet durch das Vorhandensein von zwei β -Faltblättern und der als Erkennungsheilix bezeichneten α -Helix. Der am häufigsten verwendete Typ von ZFNs besteht aus drei bis vier Zink-Fingern; jeder davon bindet drei aufeinanderfolgende Basen der Zielsequenz. Somit ergibt sich für eine einzelne ZFN eine Erkennungssequenz von 9 bis 12 Basenpaaren, für ein ZFN-Paar von 18 bis 24 Basenpaaren.

TALENs beruhen auf den Transkriptionsaktivator-ähnlichen (transcription activator-like effector, TAL) Effektoren, welche erstmals als Virulenzfaktoren in Pflanzenpathogenen wie *Xanthomonas spp.* gefunden wurden. Die DNA-Bindung von TAL-Effektoren wird

über eine Domäne mit 12 bis 27 Wiederholungseinheiten von je 33 bis 35 Aminosäuren vermittelt, wobei jede Einheit über zwei hochvariable Aminosäurereste (repeat-variable di-residue, RVD) an genau eine Base der Zielsequenz bindet. Mit einem Aufgebot von nur vier verschiedenen Wiederholungseinheiten ist es somit theoretisch möglich, für jede beliebige DNA-Sequenz einen passenden TAL-Effektor zu entwerfen, welcher je nach Anzahl der Wiederholungseinheiten eine Sequenzspezifität von 12 bis 27 Basenpaaren besitzt, für ein TALEN-Paar somit 24 bis 54 Basenpaare.

Diese hohe Spezifität der DNA-Bindedomänen sollte garantieren, dass nur die Zielsequenz beziehungsweise das Zielgen erkannt wird. Während die Erkennungssequenz eines normalen Restriktionsenzym sechs Basenpaare umfasst und somit im Durchschnitt alle 4.096 Basenpaare auftritt, sollte eine 18 Bp-Erkennungssequenz einer Designer-Nuklease nur einmal in 69 Milliarden Basenpaare vorhanden sein – zum Vergleich: das menschliche haploide Genom umfasst 3 Milliarden Basenpaare.

Sowohl in TALENs als auch in ZFNs ist die jeweilige DNA-Bindedomäne mit der katalytischen Domäne der Endonuklease FokI fusioniert, welche nach Dimerisierung einen Doppelstrangbruch in der Trennungssequenz zwischen den beiden Erkennungssequenzen induziert.

TALE- und ZF-Nukleasen werden immer paarweise eingesetzt, mit Erkennungssequenzen für beide DNA-Stränge und mit einem Abstandshalter von etwa 15 Basenpaaren zwischen den Erkennungssequenzen. Dieser Zwischenbereich wird dann von der FokI-Endonuklease gespalten.

Gene Editing *in vitro* und *in vivo*

Wie auch die bereits bekannten Meganukleasen nutzen TALENs und ZFNs aus, dass ein induzierter Doppelstrangbruch zur Aktivierung zellulärer Reparaturmechanismen führt. Zur Reparatur der eingeführten Läsionen stehen zwei gut konservierte Mechanismen zur Auswahl – die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) oder die Reparatur über eine homologe Vorlage (s. Abb. 1B).

Genommodifikationen mit Hilfe von Designer-Nukleasen können also zwei Formen annehmen: Ohne Zugabe eines exogenen DNA-Donors findet an der anvisierten Stelle nicht-homologe Endverknüpfung statt. Aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Reparatur kommt es dabei zu kleineren Insertionen und Deletionen. Werden die Erkennungssequenzen also in einem der vorderen Exons gewählt, kommt es häufig zu einem Knock-out des Gens. Diese Vorgehensweise bietet die Möglichkeit, Gene auszuschalten, ohne dabei im Genom Spuren in Form von Selektionskassetten zu hinterlassen.

Wird dagegen ein Vektor mit homologen Sequenzen gemeinsam mit den Designer-Nukleasen transfiziert, so können über homologe Rekombination definierte Mutationen oder Transgene am gewünschten Locus eingeführt werden, im Vergleich zum herkömmlichen Gene Targeting allerdings mit deutlich erhöhter Effizienz.

Für das Einbringen der Designer-Nukleasen in die Zelle stehen grundsätzlich alle bisher bekannten Transfektionsmöglichkeiten zur Verfügung. Besonders interessant ist jedoch die Transfektion als *in vitro* transkribierte mRNA, da eine transiente Expression für die Induktion des Doppelstrangbruches ausreichend erscheint und gleichzeitig eine zufällige Integration und die damit einhergehende potentielle Schädigung durch Off-Target-Aktivität vermindert werden kann.

Die bisherigen Experimente mit Designer-Nukleasen zeigen, dass Gene Editing sehr effizient ist und auch ohne Selektion Mutationsraten von 30% bis 50% auftreten^{1,2}. Selbst biallelische Knock-outs treten mit Frequenzen von 1% bis 20% auf^{3,4}.

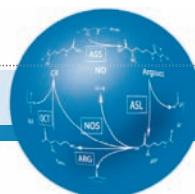
Das Potential der Designer-Nukleasen soll hier an zwei Beispielen der *in vitro*- und *in vivo*-Genmanipulation verdeutlicht werden. Humane ES-Zellen sind mit Hilfe des normalen Gene Targeting nur schwer zu modifizieren. Durch den Einsatz von Designer-Nukleasen kann sich dies jedoch ändern. So konnten mittels eines neuartigen Assemblierungsprotokolls in kürzester Zeit 96 TALENs für verschiedene Ziele in humanen ES-Zellen hergestellt werden, die in 87% der Fälle zu einem erfolgreichen Knock-out führten³.

Noch interessanter für die funktionelle Genanalyse und für die Entwicklung von Tiermodellen ist die Möglichkeit, dass mit Hilfe von ZNFs oder TALENs ein Knock-out und selbst homologe Rekombination direkt im Tier, in der befruchteten Eizelle, durchgeführt werden kann. Dies wurde für Mäuse gezeigt und in eigenen Experimenten für das Kaninchen – einer Spezies, für die weder funktionelle ES-Zellen vorhanden sind noch der somatische Kerntransfer etabliert ist (Abb. 2)⁴. Designer-Nukleasen eröffnen somit neue Möglichkeiten für die genetische Manipulation von fast allen Zelltypen und in einer Vielzahl von Spezies.

TALENs oder ZNFs?

Im insgesamt noch recht jungen Feld der Designer-Nukleasen stellen die ZFNs die besser charakterisierte Spezies dar. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten ihre Wirksamkeit in einer Vielzahl von Organismen und Zelltypen nachweisen; ebenso wurden mehrere Protokolle erstellt, mit deren Hilfe eigene ZFNs hergestellt werden können. Aber gerade

BIOCRATES
LIFE SCIENCES



Targeted Metabolite Identification and Quantification:

Absolute/DQ[®] p150 Kit & p180 Kit



- Identify and quantify more than 180 metabolites
- Discovery of metabolomic biomarkers
- Routine monitoring of metabolic pathways
- Reduced measurement time for U(H)PLC-MS
- Integrated MetIDQ[™] Software for calculation of metabolite concentrations

The Kits are designed to be used with your Waters[®] or AB SCIEX[™] mass spectrometer.

Contact:
 BIOCRAATES Life Sciences AG
 Innrain 66
 A-6020 Innsbruck, Austria
marketing@biocrates.com
www.biocrates.com

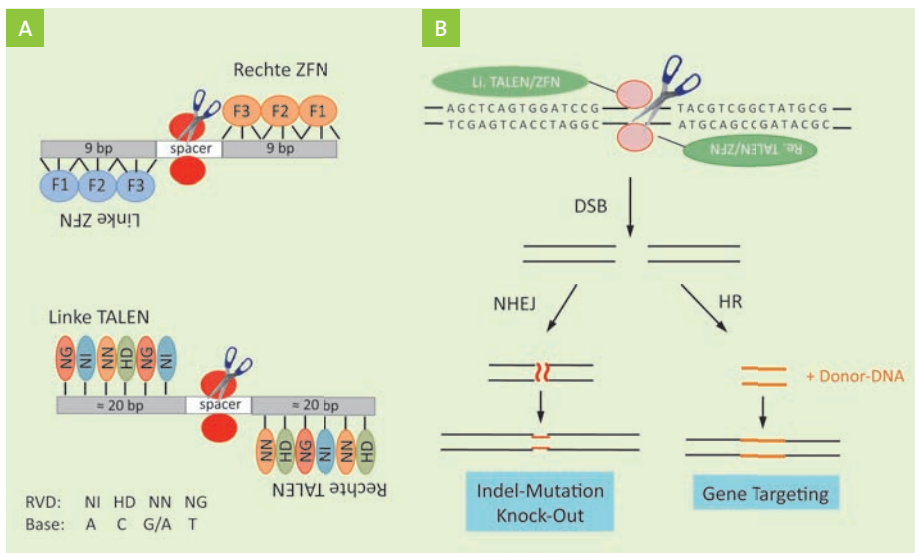


Abb. 1: Aufbau und Wirkungsweise von Designer-Nukleasen. A. ZFNs und TALENs unterscheiden sich nur durch die Beschaffenheit der DNA-Bindedomänen. B. Gene Editing mittels Designer-Nukleasen resultiert entweder in einem Knock-out oder in der Einführung einer exogenen DNA-Sequenz. DSB: Doppelstrangbruch, HR: Homologe Rekombination

die Assemblierung von funktionalen ZFNs stellt noch ein Hindernis bei der Verbreitung dieser Technologie dar – zwar müssen im Vergleich zu TALENs weniger Einzelmotive zusammengefügt werden, um ein funktionsfähiges Molekül zu erhalten; dafür gestaltet sich der Designvorgang für funktionale ZFNs als deutlich schwieriger. Dies liegt zum einen daran, dass Zink-Finger Basentriplets erkennen und bisher nicht für alle denkbaren Triplets wirksame Zink-Finger identifiziert wurden – nur etwa alle 500 Basenpaare findet sich im Genom eine geeignete Sequenz. Zum anderen kommt es zwischen den einzelnen Zink-Finger-Motiven einer ZFN zu Interaktionen, welche die Bindeeigenschaften erheblich verändern. Eine auf dem Papier ideale ZFN kann also in der Zelle unter Umständen nur sehr schlechte DNA-Affinität zeigen, was ein zeitaufwendiges Funktionsscreening der selbstentworfenen ZFNs unumgänglich macht. Hinzu kommt der Off-Target-Effekt – die Aktivität außerhalb der eigentlichen Zielregion –, der bei ZFNs bei Verwendung der Wildtyp-FokI-Domäne nicht unerheblich ist und zu erhöhter Zytotoxizität führt.

TALENs – obwohl erst seit kurzem bekannt – können dagegen über die verfügbaren Protokolle hergestellt werden, ohne dass Probleme hinsichtlich der Funktionalität auftreten. Das liegt daran, dass nach den bisherigen Erkenntnissen die einzelnen Wiederholungseinheiten einer TALEN in ihrer DNA-Bindung komplett voneinander unabhängig sind und es nicht zu Positionseffekten kommt. Ebenso können TALENs aufgrund des zugrundeliegenden „Eine-Base-eine-Aminosäure“-Codes für jede beliebige DNA-Sequenz konstruiert werden. Erstaunlich ist zudem, dass alle bisher publizierten TALENs trotz Wildtyp-FokI-Domäne keine Off-Target-Aktivität zeigen.

Beide Arten von Designer-Nukleasen sind gebrauchsfertig erhältlich: TALENs kosten zwischen 3.000 und 5.000 Euro, was auch zu einer Preisreduzierung bei ZFNs führen dürfte (bisher kosten diese zwischen 12.000 und 25.000 Euro für nicht-kommerzielle Anwendungen). Sowohl für ZFNs als auch für TALENs gibt es zudem Kits für 650\$ bzw. 350\$, mit denen die Nukleasen im heimischen Labor hergestellt werden können; aus den genannten Gründen funktioniert dies jedoch

für TALENs sehr viel besser und auch deutlich schneller als für ZFNs.

Fazit

Insbesondere TALENs haben aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und der Robustheit des zugrundeliegenden Codes das Potential, Gene Targeting zu revolutionieren. Biallelische Knock-outs, die vorher meist nur durch Züchtung erreicht werden konnten, können mit Hilfe von Designer-Nukleasen in einem Schritt realisiert werden. Ebenso ist es möglich, durch gleichzeitige Anwendung verschiedener TALENs oder ZNFs zwei Targets gleichzeitig zu verändern. All dies ist zudem in Spezies möglich, in denen Gene Targeting mit den bisherigen Methoden nicht oder nur schwer durchführbar war, einschließlich Pflanzen und Reptilien. Designer-Nukleasen sind ein effizientes, zeitsparendes Werkzeug für die funktionelle Genanalyse und bieten Möglichkeiten für die Herstellung komplexer Krankheitsmodelle zur besseren Erforschung von Humanerkrankungen in physiologisch relevanten Tierspezies. Große Chancen bieten sich auch in der personalisierten Medizin: Die große Effektivität von TALENs, ihre geringe Off-Target-Aktivität und die Tatsache, dass nach der Genkorrektur keine fremden Sequenzen im Genom zurückbleiben, machen sie zu idealen Werkzeugen für die Gentherapie.

Literatur

1. Hockemeyer, D. et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology* 29 (2011), 731-734.
2. Li, T. et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic acids research* 39 (2011), 6315-25.
3. Hauschild, J. et al. Efficient generation of a biallelic knock-out in pigs using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12013-12018 (2011).
4. Santiago, Y. et al. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (2008), 5809-14.
5. Reyon, D. et al. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature biotechnology* 30 (2012), 460-5.
6. Flisikowska, T. et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases. *PLoS one* 6 (2011), e21045.

Korrespondenzadresse

Dr. Tatiana Flisikowska
 TU München
 Lehrstuhl für Biotechnologie der Nutztiere
 Liesel-Beckmann-Str. 1
 85354 Freising
 Tel.: +49-(0)8161-712030
 tatiana.adamowicz@wzw.tum.de

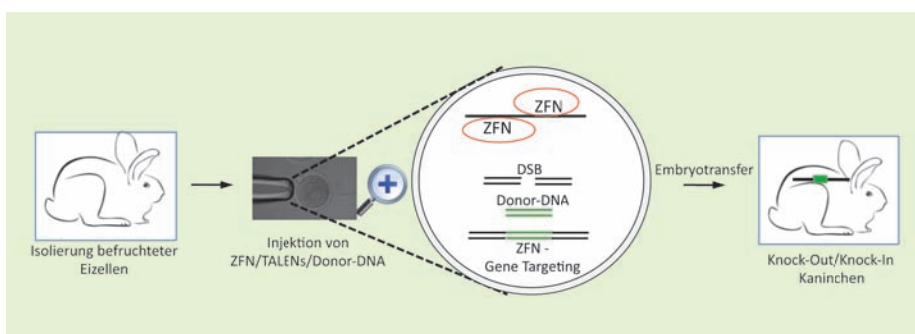


Abb. 2: Gene Editing mit Hilfe von ZFNs in Kaninchen-Oozyten

Diagnose und Prognose mit Metabolomics-Tests

Dr. Therese Koal, BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Österreich, Dr. Hennicke Kamp, BASF SE, Ludwigshafen

Analysen des von einem Zelltyp exprimierten Metabolitspektrums bieten im Gegensatz zu Gentests direkte Aussagen über biologische Funktionen. Massenspektrometrische Techniken ermöglichen dabei ein Multiplexing, das der Komplexität des Krankheitsgeschehens und der Toxizitätsmechanismen wesentlich besser gerecht wird als bisherige Einzelmetabolitbestimmungen. Die Analyse von Metabolitmustern, die relevant für die Diagnose von Krankheiten und die Prognose der Toxizität von Arzneimittelkandidaten sind, bietet über ihren direkten Nutzen hinaus auch die Möglichkeit, Erkenntnisse über Krankheits- und Toxizitätspathways zu gewinnen, indem die Ergebnisse von Metabolom-, Genom- und Transkriptomdaten miteinander in Beziehung gebracht werden.



Therese Koal
Diplomchemikerin
und Fachchemikerin
für Toxikologie,
Director Product &
Method Develop-
ment der BIOCRATES
Life Sciences

LABORWELT

Wo liegen Vorteile von Targeted Metabolomics gegenüber anderen massenspektrometrischen Bestimmungen zu diagnostischen Zwecken?

Koal

In der Biomarkerforschung und klinischen Diagnostik werden in jüngster Zeit ehrgeizige „Metabolomics“-Konzepte vorangetrieben, mit dem Ziel möglichst alle relevanten, niedermolekularen endogenen Stoffwechselprodukte (<1500 Dalton) aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe zu identifizieren und quantifizieren. Dazu haben sich vor allem massenspektrometrische (MS) Verfahren etabliert, die eine simultane Analyse der Zielmetaboliten aus einer biologischen Probe ermöglichen. Hier gibt es zwei sich technisch ergänzende Ansätze: Non-Targeted und Targeted Metabolomics.

Non-Targeted Metabolomics verfolgt *de-novo*-Metabolom-Analysen mit Fokus auf der Identifizierung der detektierten Signale; Nachteile bestehen in der beschränkten Anzahl etablierter Protokolle zur Prozessierung der Rohdaten, Instrumentabhängigkeiten und der Schwierigkeit, die chemische Identität potentieller Zielmetaboliten eindeutig aufzuklären, an der man letztendlich interessiert ist. Genau dafür ist der Targeted Metabolomics-Ansatz deutlich im Vorteil, denn es werden vorselektierte Metaboliten mittels hochselektiver Triple Quadrupol-MS/MS im „Selected Ion Monitoring“ (SIM)-Modus detektiert, identifiziert

und quantifiziert. Probenvorbereitung und Analyse werden eigens für die Zielmetaboliten entwickelt, aufeinander abgestimmt und standardisiert. Sie ermöglichen so eine simultane, hochpräzise, akkurate, robuste und quantitative Analyse, die eine langzeitstabile Intra- und Inter-Laborvergleichbarkeit gewährleistet.

Targeted Metabolomics hat sich gegenwärtig bereits in der klinischen Diagnostik im Neugeborenen-Screening als Standardtechnik etabliert und wird sich zeitnah auch für weitere Anwendungen (zum Beispiel Steroid-Hormone, 25 Hydroxy-Vitamin D2 und D3) durchsetzen und dabei Einzelanalyt-Analysenverfahren wie Immunoassays ablösen, die für metabolitspezifische Limitationen (Matrixeffekte, unzureichende Antikörper-Spezifität) bekannt sind. BIOCRATES hat eine MS-basierte standardisierte Targeted Metabolomics-Plattform entwickelt, die es ermöglicht mehr als 700 Metaboliten in verschiedensten biologischen Proben zu quantifizieren. Einige dieser Assays sind dabei als kommerzielle Kit-Produkte für mehr als 200 Metaboliten erhältlich (AbsoluteIDQ® p150 Kit, AbsoluteIDQ® p180 Kit, MetaDisIDQ® Kit, AbsoluteIDQ® Stero17 Kit und SteroIDQ® Kit).



Hennicke Kamp
Der Toxikologe
leitet seit 2010 die
Gruppe Services
Experimental Toxicology
and Ecology
bei der BASF SE in
Ludwigshafen.

LABORWELT

Wie können Metabolom-Analysen beim Toxikologie-Screening in der Arzneimittelentwicklung möglichst sinnvoll eingesetzt werden?

Hennicke Kamp

Metabolomics oder Metabolite Profiling beschreiben die Analyse von endogenen Stoffwechselprodukten wie Aminosäuren, Kohlenhydraten, Lipiden etc. aus biologischen Proben – also allen charakteristischen Stoffwechsel-Eigenschaften eines Organismus. In den vergangenen Jahren wurde die Technik zunehmend auch in toxikologischen Studien eingesetzt, um Änderungen in biochemischen Prozessen zu untersuchen (Lindon et al., 2004; van Ravenzwaay et al., 2007 und 2010). BASF und Metanomics haben basierend auf einer GC/MS- und LC/MS-MS-Plattform die Datenbank MetaMap® Tox aufgebaut, in der die Änderungen im Plasma-Metabolom von mehr als 500 verschiedenen Chemikalien hinterlegt sind, die die meisten toxikologischen Wirkmechanismen repräsentieren. Durch den Vergleich der Metabolomänderung einer unbekannt Substanz mit der MetaMap® Tox-Datenbank können nun



die Wirkmechanismen dieser Substanz erkannt und zuverlässig unterschieden werden.

Mit Hilfe der Metabolite-Profilierung-Methode sowie Datenbank MetaMap® Tox kann die Zahl der Tierversuche an Ratten erheblich reduziert werden, da die mit Hilfe des Metaboloms gewonnenen toxikologischen Informationen genutzt werden können, die weitere Sicherheitsprüfung von potentiellen Wirkstoffen in der Pharma- oder Pflanzenschutzmittelentwicklung zielgerichtet voranzutreiben („reduction through refinement“). Da die Metabolomanalyse schon in der frühen Wirkstoffentwicklung eingesetzt werden kann, lassen sich außerdem Substanzen mit negativen toxikologischen Eigenschaften rechtzeitig identifizieren, so dass weitergehende Tierversuche vermieden sowie Entwicklungsressourcen auf Substanzen konzentriert werden können, die ein vorteilhaftes Sicherheitsprofil zeigen. Metanomics Health bietet seit Juni 2012 zwei Produkte basierend auf MetaMap® Tox für Kunden in der Arzneimittelbranche an: den MetaMap® Tox Screener (25 Wirkmechanismen in 11 verschiedenen Organen), basierend auf 14 Tage-Studien an Ratten und den MetaMap® Tox Profiler (46 Wirkmechanismen in 17 verschiedenen Organen) auf Basis von 28 Tage-Studien.

Real-time PCR-Extraktionskontrollen

Bioline GmbH, Luckenwalde

Die Verwendung der real-time PCR hat aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Genauigkeit und Zuverlässigkeit in den letzten Jahren dramatisch zugenommen. Diese Eigenschaften sind stark abhängig von der Qualität des Ausgangsmaterials bzw. dem Vorhandensein von inhibitorischen Komponenten. Diese Faktoren beeinflussen in der Folge den Assay und können auch zu falsch negativen Ergebnissen führen.

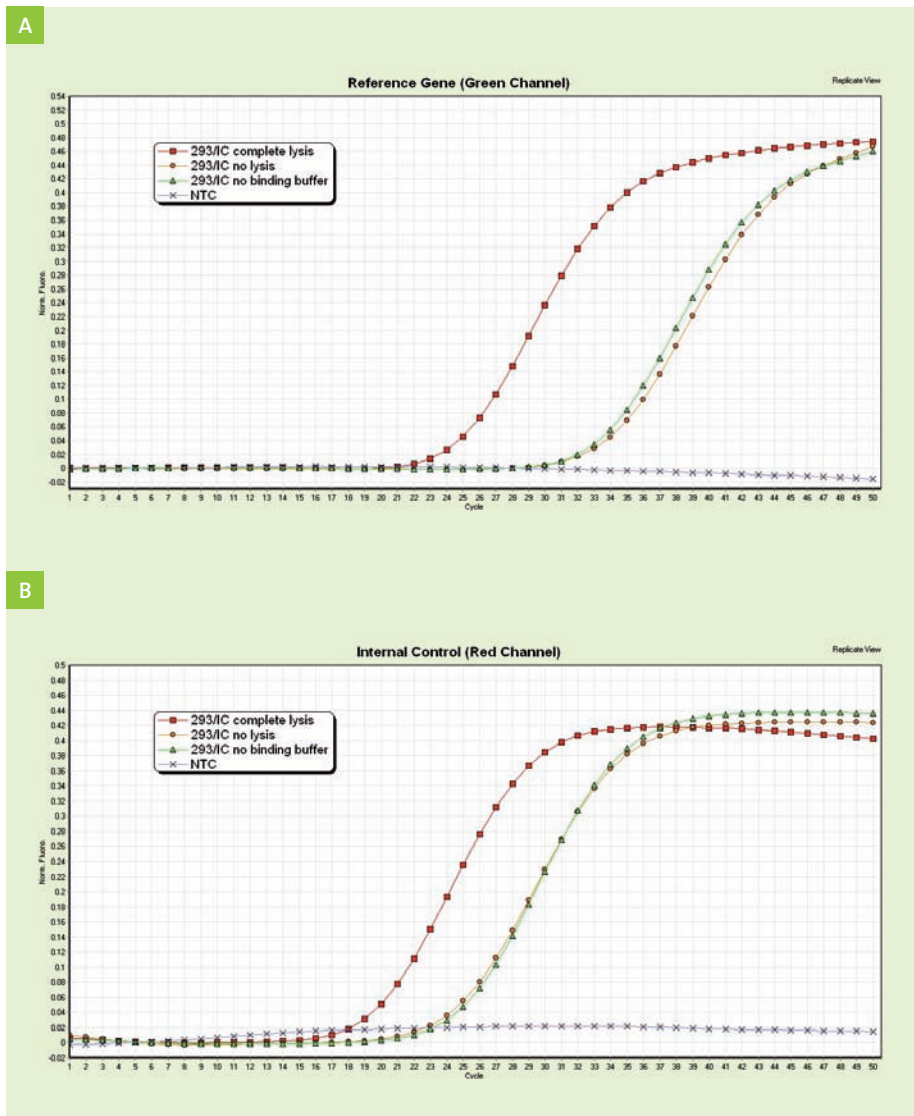
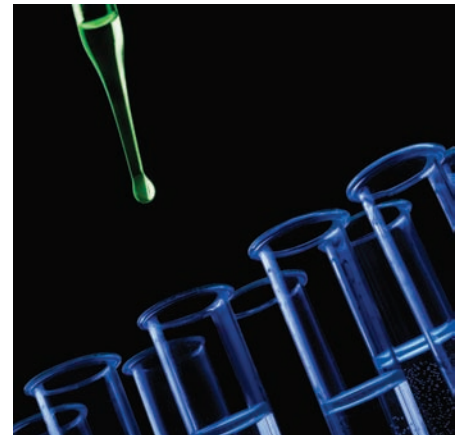


Abb. 1: Ineffiziente DNA-Extraktion. (A) Ein Fragment des Beta-2-Mikroglobulin ($\beta 2$ MG)-Gens wurde aus HEK293-Zellen (grüner Kanal) amplifiziert und (B) die Sequenz der internen Kontrolle aus der DEC (roter Kanal) amplifiziert. Dazu wurde das ISOLATE Genomic DNA Kit verwendet, wobei der Lysepuffer bzw. Bindepuffer durch PBS ersetzt wurde, um eine ineffiziente Extraktion zu simulieren. Die Reaktionsbedingungen waren 10 min. bei 95°C, gefolgt von 50 Zyklen bei 95°C für jeweils 10s, bei 60°C für 30s. Der vollständige Lyse-Schritt (rot) und das Inhibitionsmuster bei keiner Lyse (orange) und ohne Bindepuffer (grün) sind in beiden Fällen gleich, was veranschaulicht, dass die DEC zur Verfolgung der DNA-Extraktion eingesetzt werden kann.

Es ist gängige Praxis in der real-time PCR, eine bekannte Menge an Kontroll-DNA („spike-in“-Kontrolle) nach der DNA/RNA-Extraktion hinzuzugeben. Die Zugabe von Kontroll-DNA nach der Extraktion ermöglicht eine Verfolgung der Inhibition innerhalb des Assays, hat aber keinerlei Bedeutung als Extraktionskontrolle oder als Nachweis der Effizienz der reversen Transkription. Ideal ist es, wenn Probe und interne Kontrolle vor der real-time PCR der gleichen Behandlung unterzogen werden. Bioline verfügt über eine DNA-Extraktionskontrolle (DNA Extraction Control, DEC) und eine RNA-Extraktionskontrolle (RNA Extraction Control, REC), welche die Probe im Vergleich zu „spike-in“-Kontrollen genauer simulieren. Das genetische Material der Probe sowie der DEC bzw. REC wird gleichzeitig anhand der üblichen Extraktionsmethoden extrahiert, wobei die Extraktionskontrolle eine ebenso hohe Sensitivität gegenüber einer Inhibition oder fehlgeschlagenen Extraktion aufweist wie die Probe.

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Vorteil unserer Extraktionskontrollen gegenüber einer „spike-in“-Kontroll-DNA. Das Verfahren ermöglicht eine genauere Verfolgung der Effizienz des Extraktionsprozesses bzw. den Nachweis einer möglichen Inhibition innerhalb des real-time PCR-Assays.

DNA-Extraktionskontrolle

Die DNA-Extraktionskontrolle (DEC) besteht aus Zellen einer bekannten Konzentration, welche die DNA-Sequenz der internen Kontrolle enthalten (mit keiner bekannten Homologie zu anderen Organismen). Diese Zellen werden vor der DNA-Extraktion zusammen mit dem Lysepuffer zu der Zielprobe gegeben. Im Anschluss an die Extraktion wird der Primermix (Primer und Sonde) vor der Amplifikation zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Das Signal der internen Kontrolle verursacht dabei nur minimale Interferenzen bei der Detektion der Proben-DNA und bestätigt den erfolgreichen Verlauf des Extraktionsschrittes (Abb. 1)

Die Extraktionskontrollen (REC/DEC) dienen nicht nur als Indikator für die Effektivität des Extraktionsprozesses, sondern können ebenfalls genutzt werden, um Verunreinigungen durch PCR Inhibitoren zu veranschaulichen. Diesen Effekt erhält man dadurch, dass die Extraktionskontrollen ähnlich auf inhibitorische Faktoren reagieren, wie das Zielgen. Der Nachweis lässt sich sowohl anhand der Ct-Werte als auch der Signalstärke erbringen (Abb. 2).

RNA-Extraktionskontrolle

Die RNA-Extraktionskontrolle (REC) funktioniert nach dem gleichen Prinzip, wie die DNA-Extraktionskontrollen. Nach der Extraktion wird der Primermix (Primer und Sonde) vor der reversen Transkription und der Amplifikation zu dem Reaktionsgemisch hinzugegeben. Wie auch bei den DNA-Extraktionskontrollen lässt sich auch hier eine Aussage über eine fehlerhafte Extraktion, bzw. das Auftreten von Inhibitoren für die PCR treffen.

Abweichungen der internen Kontrolle zwischen Ansätzen

Die DNA- und RNA-Extraktionskontrollen (DEC und REC) liefern eine exogene interne Kontrolle zur universellen Verwendung bei verschiedenen real-time PCR-Assays und bieten eine gebrauchsfertige Anordnung mit neuen Targets ohne die Notwendigkeit einer Optimierung. Zur Gewährleistung einer korrekten Interpretation der negativen Ergebnisse, ist der Ct-Wert der Kontrollen konstant.

Schlussfolgerung

Die DNA- und RNA-Extraktionskontrollen (DEC und REC) dienen nicht nur dem Nachweis von Inhibitoren der PCR, sondern können ebenfalls als Indikatoren für die Effektivität des Extraktionsprozesses verwendet werden. Bei Nachweis von Inhibitoren in der real-time PCR weisen die Kontrollen ein ähnliches Inhibitionsprofil wie das eines Kontrollgens auf, sowohl hinsichtlich des Ct-Wertes als auch der Signalstärke. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Kontrollen auch als Indikatoren für den Probenverlust während des Extraktionsschrittes dienen können. Im Gegensatz zu den REC bzw. DEC hat die Zugabe reiner DNA während der Lyse keine Funktion als Indikator der „Zellyse“. Der Ct-Wert bei „vollständiger Lyse“ gegenüber demjenigen „ohne Lyse“ ändert sich in diesem Fall nicht wesentlich.

Die einzigartige Sequenz, die bei den DNA- und RNA-Extraktionskontrollen (DEC und REC) verwendet wird, minimiert die Interferenzen bei der Target-Detektion in einer Multiplex-

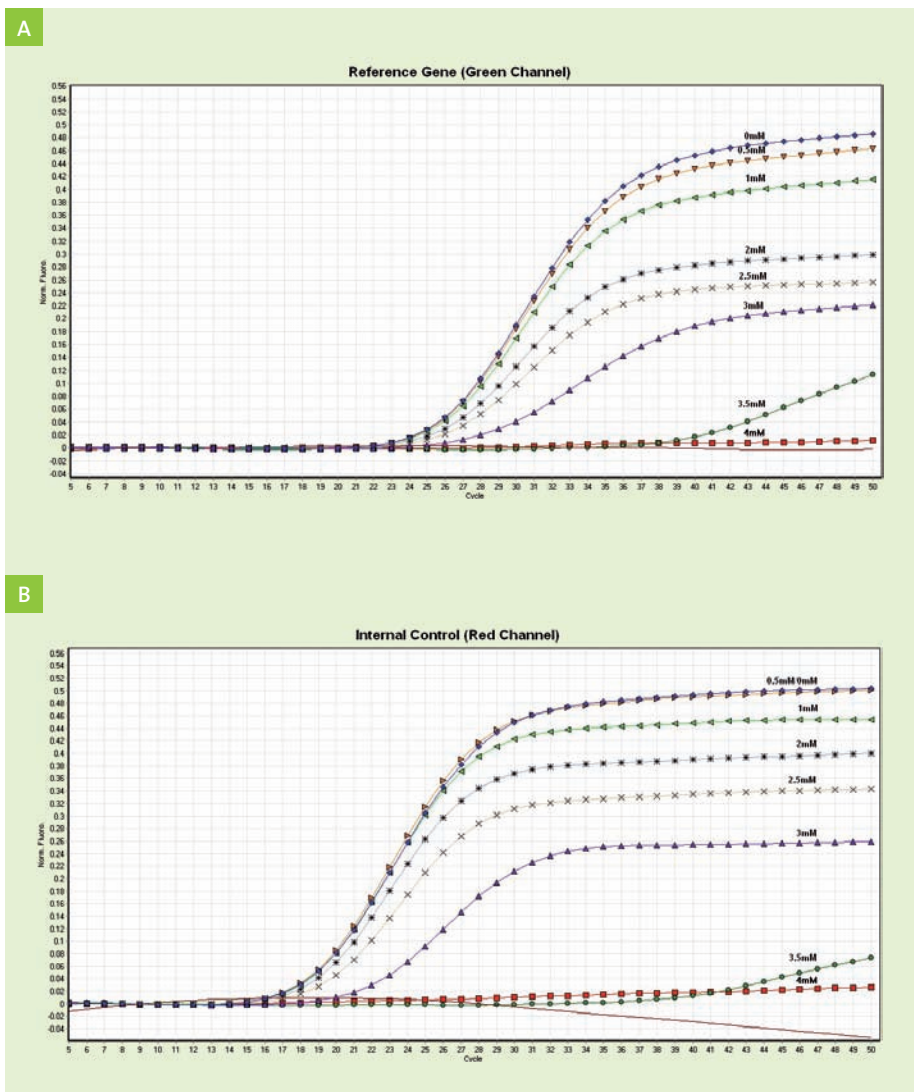


Abb. 2: PCR-Inhibition (A) Ein Fragment des Beta-2-Mikroglobulin ($\beta 2$ MG)-Gens wurde aus menschlicher genomischer DNA (grüner Kanal) und (B) die Sequenz der internen Kontrolle aus der DEC (roter Kanal) amplifiziert. Steigende EDTA-Konzentrationen wurden in die Reaktion eingetragen (0mM, 1mM, 2mM, 2,5mM, 3mM, 3,5mM und 4mM, respektive), um die zunehmenden Konzentrationen eines Inhibitors zu simulieren. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die DEC das gleiche Inhibitionsmuster wie die Ziel-Probe aufweist, was zeigt, dass die PCR-Inhibition anhand der DEC identifiziert werden kann.

Reaktion. Eine Optimierung und Validierung der Multiplex-Assays ist jedoch grundsätzlich zu empfehlen.

Die DNA- und RNA-Extraktionskontrollen (DEC und REC) eignen sich für eine Verwendung mit kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskits (Silizium-Membran und CHELEX-Filtermatrizen) und wurden für eine breite Palette von real-time PCR-Plattformen einschließlich der ABI-7500 (ABI), LightCycler 480[®] (Roche), RotorGene-Q[™] (Qiagen) und MX3005P[®] (Stratagene) getestet.

Die Kompatibilität der Kontrollen mit den unterschiedlichen klinischen Proben ist laut den Pathologielabors, die sich mit der Validierung der DEC und REC befassen, ein weiterer kritischer Aspekt dieser internen Kontrolle. Die Inkorporation der Kontrollen

ist sehr einfach und kann anhand einer geringen Anzahl von Versuchen bewerkstelligt werden. Abschließend ist festzuhalten, dass angesichts der Vielseitigkeit der DNA- und RNA-Extraktionskontrollen die DEC und REC als universelle Plattform für die qualitative Kontrolle bei den unterschiedlichsten Anwendungen von real-time PCR-Assays eingesetzt werden können.

Kontakt

Bioline GmbH
Im Biotechnologiepark TGZ II
14943 Luckenwalde
hberthel@bioline.com
www.bioline.com

Sequenzgenaues DNA-Targeting mit TAL-Tools

Dr. Frank Notka, Life Technologies Corp. / GeneArt AG, Regensburg

Transcription Activator-Like (TAL) Effektorproteine repräsentieren eine Klasse von Transkriptionsaktivatoren, die von verschiedenen *Xanthomonas*-Arten produziert und in ihre Wirtspflanzen injiziert werden. Dort wirken sie auf transkriptioneller Ebene auf die Expression bestimmter Wirtsgene, um ein für die Vermehrung der Bakterien förderliches zelluläres Milieu zu schaffen. Aus der Sicht des Genome Engineering interessieren dabei besonders die spezifischen Binde-sequenzen, welche die TAL-Proteine nutzen, um die Wirtsgene zu manipulieren. Die Spezifität der Binde-sequenzen ist in der Anordnung von Repeat-Domänen innerhalb des zentralen Bereichs von TAL-Effektoren verschlüsselt. Jede Repeat-Domäne kann ein bestimmtes Nukleotid binden, so dass die Reihenfolge der einzelnen Repeat-Domänen die zu bindende DNA-Sequenz definiert. Der Bindebereich vermittelt – zusammen mit einer Aktivator-Funktion und einem NLS (Nuclear Localization Signal) – den Kernimport und die Aktivierung bestimmter Promotoren. Mit der Entschlüsselung des Bindecodes und der Möglichkeit, unterschiedliche funktionelle Domänen zu fusionieren, wurde jetzt eine ganz neue Klasse von Werkzeugen für die Manipulation genetischer Information und Funktion hervorgebracht.

Die Menge verfügbarer genetischer Information ist bereits heute überwältigend groß und wächst aufgrund der rasanten Technologieentwicklungen im Bereich des Next Generation Sequencing unvermindert weiter. Die Auswertung der Sequenzdaten und die Überführung dieser Resultate in konkrete Anwendungen innerhalb der Biotechnologie oder Medizin erfolgt hingegen mit einer sehr viel geringeren Geschwindigkeit und Effizienz. Bisher waren die

Möglichkeiten einer gezielten Manipulation genetischer Information aufwendig und die Umsetzung von Erkenntnissen aus Genomanalysen entsprechend limitiert. Bakterielle TAL-Proteine, die wie Transkriptionsfaktoren wirken, haben das Potential, eine ganz neue Dynamik in die gezielte Veränderung von Genomen verschiedener Organismen zu bringen.

TAL-Proteine lassen sich als molekulare Werkzeuge verwenden, um Genome zu ma-

nipulieren. So können beispielsweise Gene irreversibel ausgeschaltet, repariert oder Fremdgene eingeschleust werden. Aber auch die reversible Regulation der Genexpression ist möglich, indem Aktivatoren oder Repressoren mit Promotor-bindenden TALs fusioniert werden. Die Palette möglicher Anwendungen ist durch die einfache Handhabung, beziehungsweise den unkomplizierten Austausch der funktionellen Fusionsanteile relativ problemlos erweiterbar und neue Anwendungsfelder, beispielsweise im Bereich epigenetischer Modifikationen, sind absehbar.

Der zentrale, aus Repeat-Domänen bestehende Bereich der TAL-Effektoren ist für die Bindung an die Zielsequenz verantwortlich. Natürlicherweise besteht dieser Bereich aus 12 bis 27 dieser Domänen. Jede Repeat-Domäne eines TAL-Proteins besteht aus durchschnittlich 34 Aminosäuren. Die spezifische Erkennung eines Nukleotids erfolgt über ein polymorphes Aminosäurepaar an Position 12 und 13 der sonst äußerst konservierten Repeat-Domäne, das als RVD (Repeat Variable Diresidue) bezeichnet wird. Die Entschlüsselung des natürlichen Codes, der jeder Repeat-Domäne ein Nukleotid in einer DNA-Sequenz zuweist, führte zur Entwicklung von Designer-TAL-Effektorproteinen. Diese bestehen aus mehreren Funktionseinheiten. So können unterschiedliche Funktionen, die in der Regel durch die Verknüpfung mit enzymatisch aktiven Domänen vermittelt werden, gezielt in zugängliche Regionen chromosomaler DNA dirigiert werden.

Die Entschlüsselung des TAL-Codes und die Entwicklung des Konzepts einer TAL-Technologieplattform (Abb. 1) erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universität Halle¹. Life Technologies entwickelte den Produktionsprozess für die Herstellung der Effektoren aus vorgefertigten Bausteinen. Seit März 2012 können kundenspezifische GeneArt® Precision TAL-Effektoren mit einer Lieferzeit von rund zwei Wochen bezogen werden.

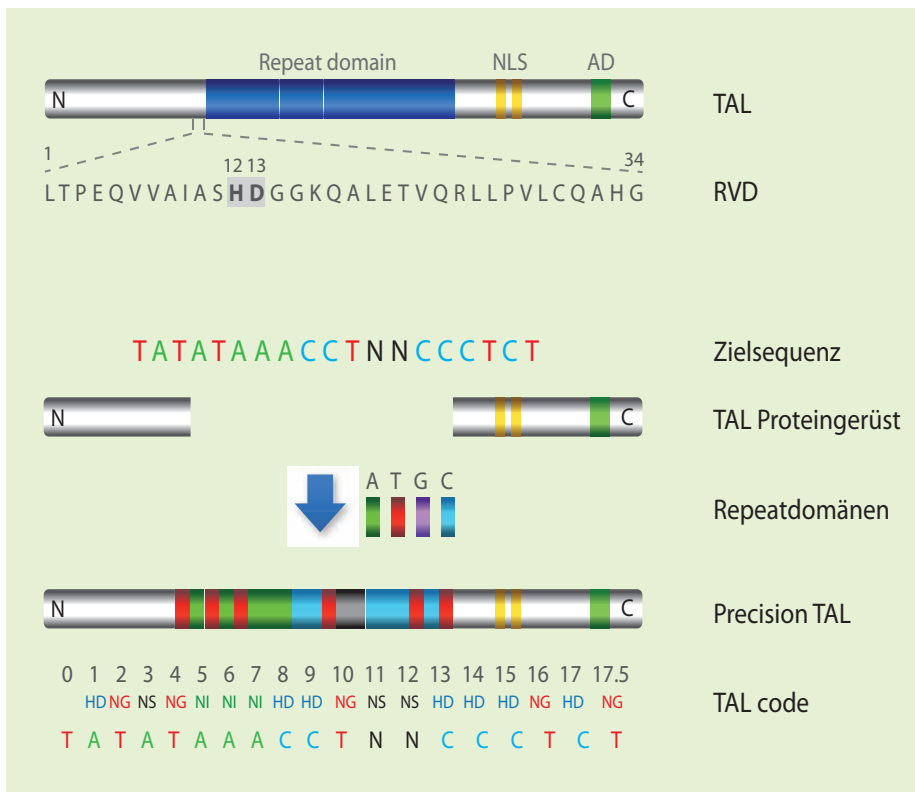


Abb. 1: Lernen von der Natur: TAL-Code dechiffrieren – spezifisches Bindemolekül designen

Präzises Genome Engineering

Gezielte Veränderungen von Genomen betreffen bisher in der Regel einfache Gene-Knock-outs, Gene Repairs, Genome-Rearrangements oder das gerichtete Einfügen von Fremd-DNA. In Abhängigkeit der jeweiligen Zielorganismen, wie Bakterien, Hefen, Algen, Pflanzen oder Säugetierzellen gibt es eine Reihe von Methoden, die sich in Aufwand und Effizienz erheblich unterscheiden. Während sich einfache Organismen, wie Bakterien, Hefen und manche Algen relativ gut manipulieren lassen, indem zelleigene Mechanismen wie die homologe Rekombination effizient genutzt werden, sind gezielte genomische Modifikationen gerade bei Pflanzen- und Säugetierzellen enorm aufwendig. Bisher standen mit Zinkfinger-nukleasen (ZFNs) und Homing-Endonukleasen zwei Technologien zur Verfügung, die eine

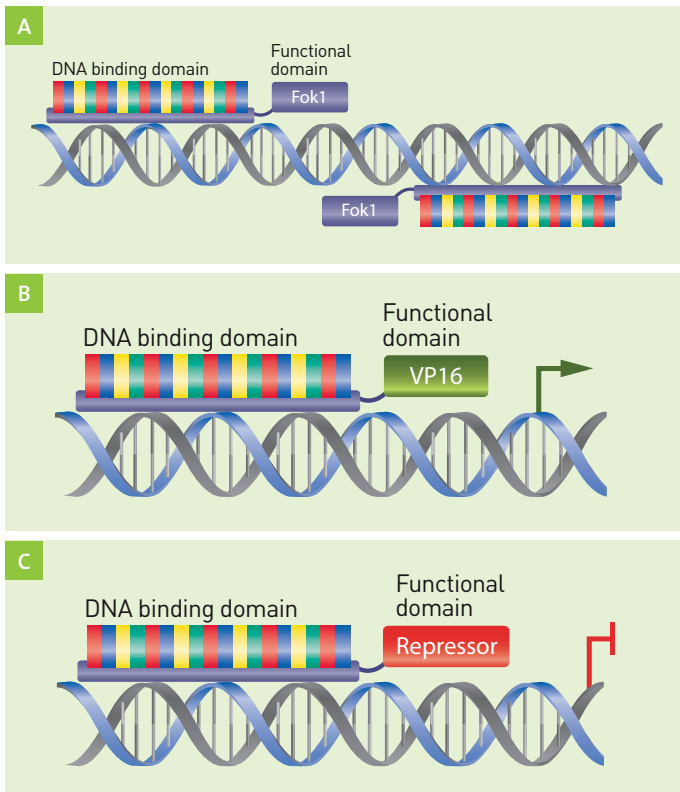


Abb. 2: Anwendungskonzepte: A. Genome engineering, B. Aktivierung und C. Hemmung der Expression

DNA-bindende Einheit mit einer DNA-schneidenden Einheit zur gezielten Spaltung eines genomischen Locus verknüpfen. Das sequenzgenaue Targeting und das Einführen eines gezielten DNA-Doppelstrangbruchs ist die Voraussetzung, um mit Hilfe zelleigener Reparaturmechanismen die Zielsequenz zu verändern. Durch Non-homologous end-joining (NHEJ) kann die Spaltstelle wieder verknüpft werden, wobei es in der Regel zu ungenauen Verbindungen in Form von Nukleotid-Deletionen kommt. Diese Ungenauigkeit wird zum irreversiblen Ausschalten eines Gens verwendet, da sie zu einem Frameshift (Leserastermutation) und damit zu einem inaktiven Gen bzw. Protein führt. Weist ein Ziel-DNA-Fragment zu beiden Seiten der Spaltstelle homologe Sequenzbereiche auf, kann es über homologe Rekombination (HR) in das Genom integriert werden. Die TALENs (TAL-Endonuklease) sind in ihrem Funktionsmechanismus und ihrer Wirksamkeit vergleichbar mit ZFNs. Allerdings ist das Design und die Auswahl der Zielsequenzen bei der Verwendung von ZFNs weniger flexibel. Es hat sich gezeigt, dass die Wirksamkeit von ZFNs kontext- und positionsabhängig ist und sich die beiden ZFN-Moleküle in ihren Bindungs- und Funktionseigenschaften gegenseitig beeinflussen können. Aus den abgeleiteten Designregeln ergibt sich rechnerisch eine Targetfrequenz von etwa 500 Nukleotiden und damit keine nukleotidgenaue Festlegung der Zielsequenz, sondern nur die Einschränkung auf einen Bereich. TALEs haben dagegen kaum Sequenzrestriktionen. Ein weiterer Nachteil von ZFNs: Die Effizienz lässt sich nicht gut prognostizieren, und unter Umständen müssen mehrere ZFN-Paare funktionell getestet werden, was sich auf die Herstellungskosten auswirkt. Auch für TALENs kann eine Vorselektion aus mehreren Paaren die Effizienz erhöhen. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Erfolgsrate von etwa 5% bis 50% genomischer Mutationen ausreicht, um rekombinante Zelllinien kostengünstig herzustellen. Generell ist die Bindungsspezifität der ZFNs nicht hoch genug, um Off-Target-Effekte auszuschließen. Unerwünschte Nebeneffekte, inklusive toxischer Reaktionen, bleiben daher nicht aus. Im Vergleich weisen TAL-Effektoren nachweislich seltener unerwünschte Nebeneffekte durch Off-Target-Bindungen auf.

Die gezielte Erhöhung oder Reduktion der Expression eines Gens auf chromosomaler Ebene ist in der Regel nur durch Verwendung



Die Vorzüge eines MiniVap™

Selbstverständlich würden Sie keinen Haartrockner verwenden, um chromatographische Proben in einer einzelnen Mikrotiterplatte 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

porvair
sciences

Life Sciences in Österreich

Mit Firmen, Adressen & Ansprechpartnern

Das neue Standardwerk der Life Sciences-Branche in Österreich enthält neben einer aktuellen Branchenstatistik rund 700 Datensätze aller mit Biotechnologie und Medizintechnik befassen Firmen und Organisationen - inklusive Kurzprofilen mit Unternehmensausrichtung und -größe, Arbeitsgebieten und Ansprechpartnern.



Life Sciences
in Österreich 2012
€ 29,80
ISBN 978-3-928383-39-4
Tel. +49 (0)30/26 49 21-40
Fax +49 (0)30/26 49 21-11
service@biocom.de
www.biocom.de

BIOCOM

natürlicher Aktivator- oder Repressor-Mechanismen, etwa auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren und miRNAs, möglich. Ein Gene-Knockdown kann auf transientem Weg durch posttranskriptionelle Silencing-Mechanismen unter Verwendung entsprechender Moleküle, wie beispielsweise siRNA oder Antisense-RNA vermittelt werden. Die Regulation der Promotoraktivität durch DNA-bindende Aktivatoren ist bisher auf einige wenige definierte Systeme zur Expressionskontrolle beschränkt. In diesen Systemen kommen natürliche Regulationsprozesse zur Anwendung, wie etwa das Lac-Operon oder Tet-Repressormoleküle. Die Anwendung solcher induzierbaren Systeme beschränkt sich in der Regel auf die Expression heterologer Proteine für biotechnologische Zwecke. Eine echte Regulation der endogenen Genexpression ist aufwendig. Posttranskriptionelle Methoden, welche die mRNA zum Ziel haben, können zwar die Expression des Zielgens herunterregulieren, aber eine Erhöhung der Expression lässt sich auf diesem Weg nicht erreichen. TAL-Effektoren können durch die frei wählbare Zielsequenz beliebige Regionen im Chromosom anvisieren und in Verbindung mit einer Aktivator- oder Repressoreinheit spezifisch die Genexpression steuern. Die Bindung einer TAL-Bindedomäne an Promotorsequenzen führt bereits zu einer Repression der Promotoraktivität.

Neue Anwendungsfelder

Ein großer Vorteil der TAL-Effektoren ist ihre enorme Flexibilität bezüglich der Wahl der Zielsequenz und der Anwendungsvielfalt. TAL-Effektoren können beliebige funktionelle Einheiten spezifisch zu einer genau definierten DNA-Zielsequenz dirigieren. Die DNA-Zielsequenzen unterliegen minimalen Restriktionen, so muss die Zielsequenz im Moment noch mit einem Thymidin beginnen. Die Länge der Zielsequenz ist ebenfalls sehr variabel, ein Bereich von 10 bis 25 Nukleotiden hat sich aber als praktikabel herauskristallisiert. Die Entschlüsselung des Bindungscode bietet weitere Variationsmöglichkeiten und Spielräume, um die Spezifität und Bindungseffizienz zu modulieren. Die kompakte räumliche Struktur der TAL-DNA-Bindedomäne, mit den zentralen variablen Repeat-Einheiten und dem flankierenden konservierten Proteingerüst, erlaubt die Fusion mit anderen Proteindomänen (oder Nicht-Protein-Anteilen), ohne die Bindeeigenschaften zu beeinflussen. Dies erlaubt das Bestücken der DNA-Bindeeinheit mit einer beliebigen Funktion. Die Fusionsanteile kodieren in der Regel eine enzymatische Funktion, können aber auch andere Eigenschaften wie etwa signalgebende (Fluoreszenz, FRET) oder strukturell verbindende Funktionen (Dimerisierung analog zum Yeast Two-Hybrid System, oder zum Cross-Linking) vermitteln. Entsprechend

dieser Möglichkeiten ist die Bandbreite potentieller Anwendungsgebiete groß. Momentan werden TAL-Effektoren überwiegend mit Nuklease-, Aktivator- und Repressorfunktion eingesetzt (Abb. 2). Die Nukleasefunktionen bieten bereits verschiedene Einsatzmöglichkeiten im Bereich des Genome Editing und -Engineering, und Aktivator- und Repressorfunktionen wurden ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Anwendungen in der Epigenetik zur Modulation der Chromosomenstruktur sind bereits in der Erprobung. Die enorme Vielfalt der möglichen Anwendungen wird sehr schnell zu neuen Einsatzbereichen führen, die zum Teil jetzt noch nicht absehbar sind. Zu dieser Entwicklung werden die schnelle Verfügbarkeit und die geringen Kosten wesentlich beitragen.

Literatur

[1] Jens Boch, Heidi Scholze, Sebastian Schornack, Angelika Landgraf, Simone Hahn, Sabine Kay, Thomas Lahaye, Anja Nickstadt, Ulla Bonas. "Science. 2009 Dec 11;326(5959):1509-12

GeneArt® Precision TALs sind nur für Forschungszwecke und nicht für diagnostische oder therapeutische Zwecke in Bezug auf Menschen oder Tiere bestimmt.

Korrespondenzadresse

Frank Notka
frank.notka@lifetech.com

Jetzt noch schneller informiert mit **www.transkript.de**

Neu und tagesaktuell
| Nachrichten
| Börse
| Presseschau
| Mediathek
| und vieles mehr

Einblick in das humane Sekretom

Simpson JC, Joggerst B, Laketa V, Verissimo F, Cetin C, Erle H, Bexiga MG, Singan VR, Hériché JK, Neumann B, Mateos A, Blake J, Bechtel S, Benes V, Wiemann S, Ellenberg J, Pepperkok R (2012): Genome-wide RNAi screening identifies human proteins with a regulatory function in the early secretory pathway. *Nat. Cell Biol.* 2012 Jun 3;14(7):764-74. doi: 10.1038/ncb2510.

Erstmals ist es gelungen, einen Großteil der Proteine zu identifizieren, die in humanen Zellen an der Sekretion beteiligt sind, also dem Ausschleusen von Stoffen aus der Zelle. Um das humane Sekretom zu erfassen, schalteten die Forscher um Rainer Pepperkok vom EMBL in Heidelberg und Kollegen vom University College Dublin in HeLa-Zellen jedes der rund 22.000 menschlichen Protein-codierenden Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) aus und beobachteten mit Hochdurchsatzmikroskopie wie stark der Knock-down die Sekretion eines fluoreszenzmarkierten Proteins beeinträchtigte. Ergebnis der Analysen von mehr als 8 Millionen Zellen und 700.000 Mikroskopiebildern: mindestens 545 Proteine sind an der Sekretion beteiligt. Davon scheinen 143 wichtig für frühe Prozesse, die im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat stattfinden, 59 sind Bestandteil der bereits bekannten Sekretionsmaschinerie. Die Arbeiten ebnen den Weg zu einem Verständnis der Regulation von Sekretionsprozessen und bergen damit das Potential, pathologische Störungen der Sekretion kausal zu verstehen.

LABORWELT:

Was war die Motivation für Ihre Arbeiten und die Wahl Ihres experimentellen Systems?

Pepperkok:

Wir haben zum ersten Mal weltweit das Sekretom einer menschlichen Zelle erfasst. Wir haben dazu HeLa-Zellen gewählt, weil sie technisch einfach zu untersuchen sind. HeLa-Zellen bewegen sich auf den von uns dazu eingesetzten siRNA-Arrays nicht sehr stark; das ist ein Grund, weshalb wir mit ihnen arbeiten. Zweitens, wir haben 2010 vergleichbare Studien mit HeLa-Zellen veröffentlicht, wo wir einen genomweiten siRNA-Screen der Mitose gemacht haben. Die Daten der damaligen und aktuellen Arbeit lassen sich sehr gut miteinander vergleichen. Um grundlegende Mechanismen des sekretorischen Weges zu analysieren, halten wir HeLa-Zellen zudem für hinreichend informativ. Das ist natürlich anders, wenn es um einen krankheits- oder gewebespezifischen Kontext geht. Da muss man entsprechend andere Zellen wählen.

LABORWELT:

Wie sind Sie methodisch vorgegangen, um das Sekretom zu analysieren?

Pepperkok:

Unser Ziel ist es, die an der Regulation der sekretorischen Pathways beteiligten Moleküle als Gesamtsystem zu verstehen. Wir mussten dazu verschiedene Methoden etablieren. Vor fast 10 Jahren haben wir mit Stefan Wiemann begonnen, Proteine mit GFP zu taggen, zu lokalisieren und zu sehen, ob sie in der Sekretion eine Rolle spielen könnten. Wir haben diese exprimiert, um dann funktionell den Einfluss der Überexpression zu sehen. Bereits damals haben wir Hochdurchsatz-

Mikroskope entwickelt, die es uns erlauben, im Hochdurchsatz funktionelle zellbasierte Assays anzuschauen und zu quantifizieren. Diesen Ansatz haben wir im Laufe der Jahre weiter verfeinert. Wir mussten in diesem großen Durchsatz Zellen mit siRNAs transfizieren. Dazu haben wir eine Methode zur reversen Transfektion von Array-gebundenen Zellen entwickelt. Nach Erstellen einer siRNA-Bibliothek in Kooperation mit Ambion, deren siRNAs jeweils tatsächlich nur die Expression eines Transkripts hemmen, und Entwicklung verschiedener Methoden der automatischen Bildanalyse waren wir soweit, das humane Sekretom erstmals zu analysieren.

LABORWELT:

Was sind Ihre wichtigsten Ergebnisse?

Pepperkok:

Es ist ein immenser technischer Fortschritt, dass wir die Stärke morphologischer Veränderungen der Zelle im Hochdurchsatz erfassen können. Wissenschaftlich gesehen, gab es gleichermaßen erfreuliche wie auch enttäuschende Ergebnisse. Wir haben gelernt, dass Schlüsselproteine zum Teil nicht mit dieser Methode identifiziert werden können. Ein Grund ist, dass sie redundant exprimiert werden, das heißt, ähnliche Proteine übernehmen die Funktion des stillgelegten Proteins. Das scheint für Schlüsselproteine im sekretorischen Weg ein generelles Prinzip zu sein. Was wir aber gesehen haben und sehen wollten, sind Proteine die die Sekretion regulieren, zum Beispiel signalübertragende Proteine, wie den EGF-Rezeptor; wir haben 170 Transkriptionsfaktoren identifiziert, deren Rolle beim Membrantransport noch gar nicht erforscht ist. Unterdessen haben wir Muster gefunden, die darauf hinweisen, dass



Rainer Pepperkok

Nach Diplom in Angewandter Physik (1987) und Promotion in Zellbiologie (1992) forschte Dr. Rainer Pepperkok von 1987-1993 in der Gruppe von Prof. Dr. Wilhelm Ansorge am EMBL in Heidelberg. Bis 1996 arbeitete er in der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Kreis (Universität Genf). Dann wechselte er als Head of Light Microscopy an den Imperial Cancer Research Fund nach London. Seit August 1998 ist Pepperkok Teamleiter an der Cell Biology/Cell Biophysics-Einheit sowie Leiter der Advanced Light Microscopy Facility am EMBL in Heidelberg.

eine Housekeeping-Aktivität der Sekretion von verschiedenen Gruppen von Transkriptionsfaktoren reguliert wird.

LABORWELT:

Wie lassen sich die funktionell redundanten Schlüsselproteine weiter analysieren?

Pepperkok:

Wir können die funktionelle Redundanz ausnutzen, indem wir das Schlüsselprotein und das funktionell dazu komplementäre Protein gleichzeitig ausschalten. Wenn wir das tun, sehen wir einen ganz drastischen Effekt auf die Sekretion. Das ermöglicht die Analyse ganzer Proteinnetzwerke. Im Falle der Sekretion konnten wir so aufklären, wie Cytoskelettelemente mit dem vesikulärem Coat-Protein interagieren.

LABORWELT:

Wo liegt das Anwendungspotential Ihrer Ergebnisse?

Pepperkok:

Mit derselben Technologie lassen sich auch krankheitsrelevante Protein-Protein-Wechselwirkungen untersuchen. Wir haben mit Kollegen bereits begonnen, die Wechselwirkungen beim Proteintrafficking der Zystischen Fibrose zu erfassen.

Antikörper zur Funktions-Analyse des Proteoms

Dr. Jörg D. Hoheisel, Abteilung Funktionelle Genomanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Die Personalisierte Medizin steckt noch in den Kinderschuhen. Zurzeit zielt sie mehr auf eine Patientenstratifizierung, um aus einem begrenzten Portfolio an vorhandenen Therapie-Optionen die am besten passende auszuwählen, anstatt eine speziell auf die Person abgestimmte Therapie zu ermöglichen. Für letzteres ist die Translation von Information auf der Ebene von DNA/RNA nur bedingt geeignet, da therapeutische Ansätze im allgemeinen Proteine beeinflussen, die für die meisten zellulären Aktivitäten verantwortlich sind. Folglich muss einer globalen Analyse des persönlichen Erbguts einer Person eine globale Analyse aller Proteine folgen. Sowohl für diese diagnostische Analyse als auch zusätzlich als mögliche therapeutische Reagenzien sind eine Vielzahl optimierter Antikörper oder anderer, äquivalenter Bindemoleküle notwendig. Als eines der ersten Projekte dieser Art zielt die europäische Affinomics-Initiative darauf ab, neben einer größeren Zahl an Bindern die Grundlage für die Herstellung und Charakterisierung solcher Affinitätsreagenzien im großen Rahmen zu schaffen und die Kommunikation der gewonnenen Information zu standardisieren.

In den vergangenen zehn Jahren hat sich das Gebiet der molekularen Medizin enorm weiterentwickelt. Dies liegt im Besonderen an der Möglichkeit, die menschliche Erbsubstanz – das Genom – vollständig zu entziffern. Die Technologie hat sich so weit entwickelt, dass eine Untersuchung des gesamten Genoms jedes einzelnen Patienten für eine Reihe von Krankheiten, insbesondere genetisch bedingte

Erkrankungen wie etwa Krebs, in wenigen Jahren zur Routine gehören wird. Trotz dieses unglaublichen Fortschritts im Erfassen krankheitsrelevanter Veränderungen der DNA und RNA ist die Möglichkeit einer Translation dieser Information in klinische Therapieansätze begrenzt. Ein Grund dafür ist, dass Therapeutika im allgemeinen Proteine beeinflussen; zurzeit zielen etwa 97% aller zugelassenen Wirkstoffe auf Proteine.

Bereits die überraschend geringe Zahl an Genen deutet an, dass viele zelluläre Aktivitäten nicht auf der Ebene der Nukleinsäuren reguliert werden, obwohl die noch junge Erkenntnis, dass es viele nicht-kodierende RNA-Moleküle mit wichtigen regulativen Funktionen geben kann, das Gewicht wieder in Richtung der Nukleinsäuren verschoben hat. In jedem Fall sind Proteine an quasi allen zellulären Prozessen beteiligt und werden in ihrer Struktur und damit häufig in ihrer Aktivität verändert. Das Ausmaß und die Wichtigkeit von Proteinmodifikationen werden durch die Tatsache dokumentiert, dass 5% bis 10% aller menschlichen Gene für Proteine kodieren, die andere Proteine modifizieren.

Im Gegensatz zum Erkenntnisstand über Nukleinsäuren ist global betrachtet das Verständnis der Proteinebene zurzeit noch relativ unvollständig und ungenau. Aufgrund der offensichtlich zentralen Rolle von Proteinen und den Möglichkeiten, die sich dank neuer Methoden ergeben, hat sich die Intensität von Analysen des vollständigen Proteingehalts – des Proteoms – einer Zelle oder eines Gewebes in den letzten Jahren wesentlich erhöht. Das Proteom ist wesentlich komplexer hinsichtlich der Strukturen und biophysikalischen Eigenschaften der Moleküle als das Genom, das sich grundsätzlich aus Molekülen gleicher Struktur und sehr ähnlicher Biochemie zusammensetzt. Allein die Zahl der Bausteine, 20 Aminosäuren für Proteine anstelle von jeweils vier Nukleotiden bei RNA und DNA, dokumentiert diesen Unterschied. Außerdem unterliegt das Proteom kontinuierlich dynamischen Veränderungen. Deshalb sind die Herausforderungen bei einer globalen und gleichzeitig quantitativen Analyse des Proteoms wesentlich größer und vielschichtiger als bei Genomanalysen.

Für eine grundlegende Untersuchung des Proteoms ist die Verfügbarkeit von Antikörpern – oder anderen, entsprechenden Bindemolekülen – für jedes einzelne Protein unabdingbar. Es gibt momentan etwa 130.000 Antikörper von kommerziellen Anbietern, wobei für viele Proteine ein redundantes Angebot besteht, während es für andere keinerlei Antikörper gibt. Trotz dieses scheinbar großen Angebots, sind wir immer noch weit von einem vollständigen Satz an zuverlässigen und gut charakterisierten Bindern hoher Spezifität und Affinität entfernt. Selbst unter der Annahme, dass pro Gen nur ein Genprodukt, sprich Protein, entsteht, fehlen viele Antikörper. Dazu kommt die Vielzahl an unterschiedlichen Proteinmodifikationen, die erkannt werden müssen. Dies reicht von Splice-Varianten bis zu posttranslationalen Modifikationen, wie etwa Phosphorylierungen oder Ubiquitinierungen. Eine genaue Analyse von Unterschieden in der Protein-Glykosylierung ist augenblicklich noch jenseits der bestehenden Möglichkeiten. Zusätzlich sind für viele Anwendungen unterschiedliche Affinitätsmoleküle notwendig; ein Nachweis eines Proteins innerhalb einer Zelle

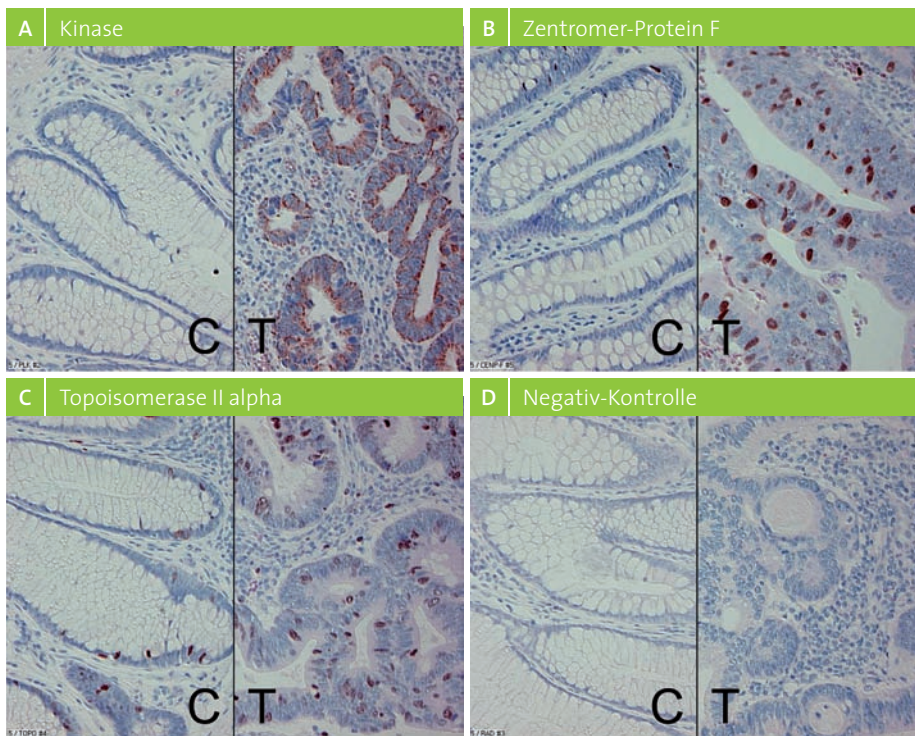


Abb. 1: Beispiel für einen Nachweis der zellulären Lokalisation von Proteinen über Antikörperbindung. Gewebeschnitte von gesundem (C) und Tumorgewebe (T) wurden mit Antikörpern inkubiert. Die braune Färbung zeigt die Position der Antikörper und damit der Zielproteine.

erfordert andere Moleküle als eine Immunfällung oder der Nachweis von Proteinen in Gewebeschnitten.

Weltweit wurden vor kurzem erste koordinierte Programme aufgelegt, um Affinitätsreagenzien in unterschiedlichen Formaten als globale Ressource bereitzustellen. Beispiele dafür sind ProteomeBinders (www.proteomebinders.org), Affinomics (www.affinomics.org), die Clinical Proteomic Technologies Initiative (proteomics.cancer.gov) oder die Antibody Factory (www.antibody-factory.de). Der Human Proteome Atlas (www.proteinatlas.org) ist im Augenblick am weitesten fortgeschritten und dürfte in einem guten Jahr für jedes der etwa 22.000 menschlichen Gene einen polyklonalen Antikörper gegen das vorhergesagte Genprodukt bereitgestellt und mittels der Antikörper die Lokalisation des Proteins in verschiedenen Geweben bestimmt haben. Vom Ansatz her sind alle genannten Initiativen noch relativ kleinformatig – trotz einer recht großen Zahl an Bindern, die jeweils hergestellt und charakterisiert werden. Dies liegt neben finanziellen Beschränkungen auch daran, dass als Teil der Projekte die besten Affinitätsmoleküle für die verschiedenen Anwendungen definiert werden. Gleichzeitig werden experimentelle Parameter untersucht, um die Grenzen der einzelnen Analyseformen auszureizen. Zusätzlich werden die Grundlagen geschaffen, um die Datenspeicherung und die Kommunikation der Ergebnisse zu standardisieren.

Das von der Europäischen Kommission geförderte Affinomics-Konsortium, das auf der ProteomeBinders-Initiative aufbaut, kombiniert ein ganze Reihe von Gruppen mit der Expertise, um all die oben genannten Aspekte abzudecken. Neben Produzenten der Zielproteine und von Epitopen mit unterschiedlichen Modifikationen nehmen eine ganze Reihe von Gruppen teil, die Affinitätsreagenzien produzieren. Einige der oben genannten Aktivitäten, wie der Human Proteome Atlas und die Antibody Factory, nehmen ebenfalls teil. Das Portfolio von Bindern reicht von IgG-Antikörpern aus Kaninchen und Mäusen, über Antikörpern aus Kamelen, die eine andere Struktur besitzen, rekombinanten „single chain fragment“ (scF) Bindern bis zu Darpins, niedermolekularen Bindemolekülen, deren Spezifität gezielt konstruiert werden kann. Dazu kommen Aptamere – Oligonukleotide, die spezifisch an ein Epitop binden. Außer der Charakterisierung der gewonnenen Bindemoleküle wird in dem

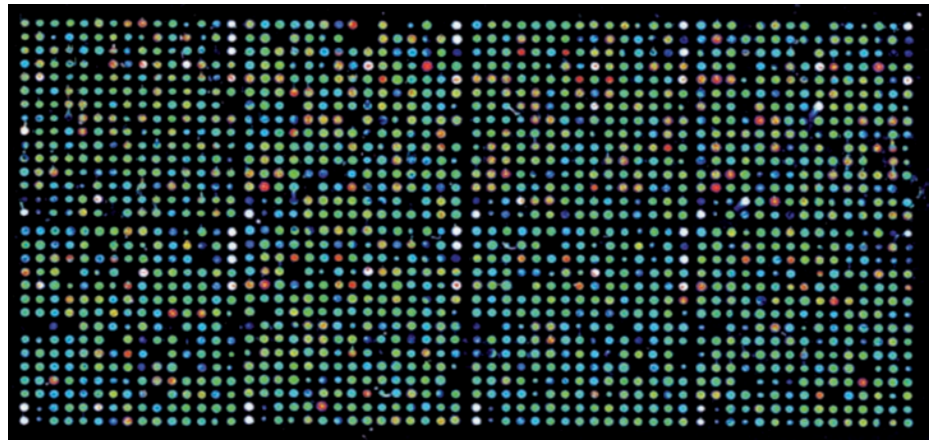


Abb. 2: Umkehrung des Formats zu Abb.1: Inkubation eines Proteinextrakts aus Gewebe auf einem Antikörper-Microarray. In der Falschfarben-Darstellung sind überexprimierte Proteine rot, geringer exprimierte Proteine blau dargestellt.

Konsortium ihre Eignung für eine Reihe von Anwendungen untersucht. Ein Schwerpunkt dabei sind Microarray-basierte Studien. Diese haben mittlerweile eine Qualität erreicht, die jene übertrifft, die für eine klinische Zulassung von DNA-Microarrays Voraussetzung ist. Gleichzeitig ist eine Sensitivität bis zum Nachweis von Interaktionen einzelner Moleküle selbst ohne Signalamplifikation möglich. Daneben bilden Aspekte der Datenspeicherung und Datenkommunikation einen weiteren Schwerpunkt.

Ausblick

Während ein erster Satz von 22.000 Antikörpern gegen das grundlegende menschliche Proteom in wenigen Monaten existieren wird, wird es einige Jahre dauern, um ein breites Portfolio an Bindern zu produzieren, die gegen die geschätzten ein bis zwei Millionen Protein-Isoformen sowie für alle relevanten Anwendungen in unbegrenzten Mengen verfügbar sein werden. Aufbauend auf den Erfahrungen von Aktivitäten wie Affinomics wird dieses Ziel jedoch recht schnell erreichbar sein. Bereits auf dem Weg zu diesem Ziel werden wichtige Ergebnisse gewonnen werden, die eine unmittelbare Anwendbarkeit ermöglichen. So kann beispielsweise der Zugang zu menschlichen Genomsequenzen für aberzehntausende von Individuen die Grundlage für eine gezielte affinitätsbasierte Untersuchung von Proteinen bilden. Krankheitsrelevante Protein-Isoformen, die auf Basenaustauschen, Sequenz-Deletionen

oder Splice-Varianten basieren, können mit passenden Affinitätsreagenzien gezielt auf ihre Struktur und Funktionalität analysiert und mit den „gesunden“ Isoformen verglichen werden. Dies kann die Grundlage für neue, gezielte und vor allem Individuum-spezifische Therapien bilden.

Literatur

- [1] Taussig et al. (2007). ProteomeBinders: planning a European resource of affinity reagents for analysis of the human proteome. *Nature Meth.* 4, 13-17.
- [2] Alhamdani, M.S.S., Schröder, C. & Hoheisel, J.D. (2009). Oncoproteomic profiling with antibody microarrays. *Genome Medicine* 1, 68
- [3] Gloriam et al. (2010). A community standard for the representation of protein affinity reagents. *Mol. Cell. Prot.* 9, 1-10.
- [4] Mustafa, S.A., Hoheisel, J.D. & Alhamdani, M.S.S. (2011). Secretome profiling with antibody microarrays. *Mol. Biosyst.* 7, 1795-1801.
- [5] Alhamdani et al. (2012). Immunoassay-based proteome profiling of 24 pancreatic cancer cell lines. *J. Proteomics* 75, 3747-3759.

Korrespondenzadresse

Jörg D. Hoheisel
Funktionelle Genomanalyse
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 580
69120 Heidelberg
Tel.: +49-(0)6221-42-4680
Fax: +49-(0)6221-42-4682
j.hoheisel@dkfz.de
www.dkfz.de/funct_genome/



Biobanking Services für Ihre Proben

- Lagerung kryokonservierter Zellsammlungen
- Lagerung von Humanzellen (Herstellungserlaubnis nach AMG)
- Lagerung von infektiösen Proben bis BSL 3 (BioStV, IfSG, GenTG)
- Back-up bestehender Biobanken
- Globale Kryologistik

BioKryo GmbH, Industriestr. 5, 66280 Sulzbach/Saar · Tel.: +49-(0)6897-952 86 96 · Fax: +49-(0)6897-952 86 98 · www.biokryo.com · E-Mail: kontakt@biokryo.com



Biotechnologie aus dem Mittelmeer

Peter N Golyshin¹, Christian Leggewie², Karl-Erich Jaeger³ Hanno Teeling⁴ and Frank Oliver Glöckner^{4,5}, ¹School of Biological Sciences, Bangor University, UK, ²evocatal GmbH, Düsseldorf, ³Heinrich-Heine Universität Düsseldorf ⁴Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, ⁵Jacobs University Bremen

Im Rahmen des EU-finanzierten MAMBA-Projektes fahndet ein internationales Konsortium nach neuen Enzymen für die Biokatalyse sowie mikrobiellen Aktivitäten, um bisher unbekannte Antioxidanzien und Krebswirkstoffe zu produzieren. MAMBA steht für „Marine Metagenomics for New Biotechnological Applications“. Das Projekt baut auf national und durch die EU-Rahmenprogramme finanzierten Arbeiten auf, die sich bereits mit der Erkundung katalytischer Aktivitäten mariner Mikroorganismen und Biozönosen sowie den Mechanismen des Überlebens dieser Organismen unter extremen Umweltbedingungen befassen. Das Konsortium aus Biochemikern, Genetikern, Mikrobiologen, Pharmazeuten und Prozessingenieuren bearbeitet die noch unterschätzte Erschließung der mikrobiellen Diversität durch Metagenomics. Diese verspricht gesellschaftlich hohen Nutzen und kann einen entscheidenden Beitrag zur Weiterentwicklung der Weißen Biotechnologie sowie der pharmazeutischen Industrie leisten.

Die Mehrheit der aktuellen biotechnologischen Anwendungen sind mikrobiellen Ursprungs. Es ist allgemein anerkannt, dass die mikrobielle Welt den bei weitem größten Teil der Biodiversität der Biosphäre repräsentiert. Mikroorganismen sind deshalb auch die Hauptressource enzymatischer Diversität und für neue biotechnologische Applikationen. Marine mikrobielle Lebensgemeinschaften machen mehr als 80% des Lebens auf der Erde aus und spielen eine unverzichtbare Rolle im Primärenergie- und Kohlenstoffkreislauf. Demzufolge wird die marine biochemische und chemische Diversität als Hauptquelle für die Suche nach neuen Enzymen und Naturstoffen betrachtet. Der Einsatz traditioneller Strategien zum Auffinden von Enzymen ist allerdings dadurch limitiert, dass sich die meisten Mikroorganismen nicht kultivieren lassen. Die erwartete

enzymatische Diversität in unkultivierbaren Mikroorganismen hat zur Entwicklung neuer Genomics-basierter Methoden geführt, den sogenannten Metagenomics. Es gibt in den Metagenomics zwei verschiedene Konzepte, entsprechend ihrer primären Zielsetzung:

- | das großangelegte Sequenzieren der Bulk-DNA oder von DNA-Bibliotheken zielt darauf ab, den größtmöglichen Teil genetischer Ressourcen in der Probe oder Bibliothek in einem meist Homologie-basierten Data mining zu identifizieren.
 - | die Konstruktion von Expressionsbibliotheken mit kleinen DNA-Fragmenten – speziell solcher in Phage λ -Vektoren – zielt dagegen auf ein direktes Aktivitätsscreening ab.
- Ein klarer Nachteil des ersten Ansatzes ist es, dass er sich vollständig auf die existierende

– potentiell fehlerbehaftete – Genom-Annotation verlässt. Dies begrenzt die Vorhersage von Genfunktionen auf bereits bekannte Protein- bzw. Enzymfamilien – die Entdeckung von Proteinen mit neuartigen Funktionen ist damit nicht möglich. Die gewaltigen Metagenom-Sequenzierdaten werden derzeit zum Großteil nicht zur anschließenden Entdeckung neuer Aktivitäten oder funktionellen Charakterisierung der vorhergesagten Gene des Metagenoms genutzt. Um dies zu leisten, etablieren sich derzeit weltweit Gruppen von Strukturgenomikern, deren erklärtes Ziel es ist, die Struktur zumindest eines repräsentativen Proteins der etwa 10.000 bis 15.000 Proteinfamilien aufzuklären. Gleichwohl geben die meisten Proteinstrukturen keinen eindeutigen Hinweis auf deren Funktion. Eine sinnvolle Antwort auf diese Herausforderung ist es, die Strukturaufklärung und bioinformatischen Ansätze mit einer *en masse*-Aktivitätsanalyse der Proteine zu kombinieren und die neuen Aktivitäten in biotechnologische Anwendungen einzuschleusen.

Projektziele

MAMBA zielt darauf ab, Enzyme und Stoffwechselwege extremophiler Mikroorganismen und die Metagenome mikrobieller Lebensgemeinschaften außergewöhnlicher mariner Lebensräume zu erkunden und neu identifizierte enzymatische Reaktionen in biotechnologischen Anwendungen umzusetzen. Das Projekt baut dabei auf der wissenschaftlich-technologischen Expertise seiner Partner aus Forschung und Industrie auf. Darüber hinaus setzt MAMBA auf die Anwendung hochmoderner Technologien zur Archivierung, zum molekularen Aktivitätsscreening, zur Proteinstrukturaufklärung, Enzymengineering und gerichteten Evolution, um neue biotechnologische Prozesse und Biokatalysatoren zur Synthese von Feinchemikalien zu etablieren.

Um die ganze Breite des marinen mikrobiellen Lebens abzubilden, werden Proben an marinen Hotspots gesammelt und unlängst sequenzierte Genome genutzt. Gleich zweierlei Nutzen verspricht dabei die Erforschung an den Grenzen des Lebens, also an hypersalinen Standorten, in sehr kalten oder heißen Biotopen sowie das Leben unter hohem Druck oder niedriger Wasseraktivität: Sie verbessert einerseits das Verständnis der Mechanismen, die das Überleben der Mikroorganismen unter extremen Bedingungen sichern, ist zugleich aber hochrelevant für das Auffinden industriell nutzbarer neuer Enzyme.

Im Rahmen des MAMBA-Projektes steht das aktivitätsbasierte Screening im Fokus. Es ermöglicht, individuelle, mit ihren Substraten interagierende Enzyme zu identifizieren. Neue Enzyme werden produziert, kristallisiert und strukturaufgeklärt. Die vielversprechendsten Kandidaten werden auf Aktivität gegenüber

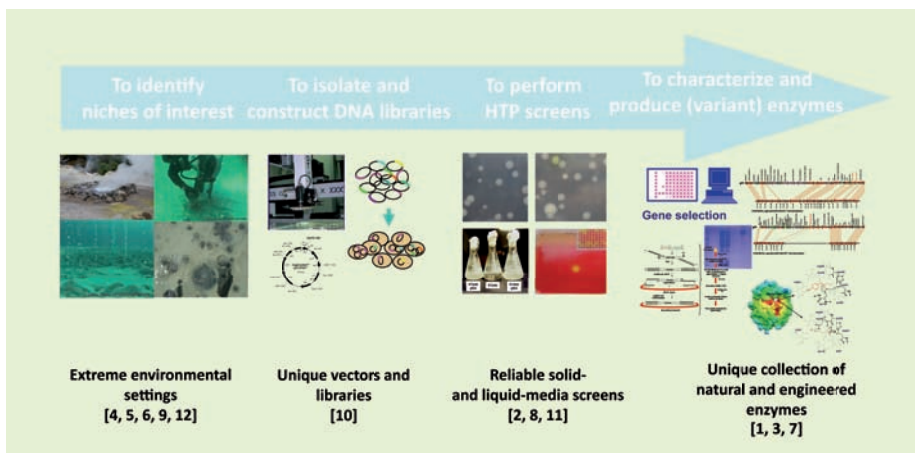


Abb. 1: Pipeline der aktivitätsgerichteten Enzymdeckung aus Umweltressourcen innerhalb des MAMBA-Projektes. Die Funktionsanalyse von Metagenomen stellt die Identifikation von Enzymen sicher, die auf definierte Substrate wirken. In Klammern angegeben sind Referenzen, die die erfolgreiche Implementierung des Ansatzes innerhalb von MAMBA dokumentieren.

einer Vielzahl chiraler und nicht-aktivierter biokatalytisch relevanter Substrate getestet, und ihre Fähigkeit, in wasserfreien Systemen zu arbeiten, wird geprüft.

Methoden der gerichteten und der ungerichteten Evolution werden angewandt, um beispielsweise die Aktivität oder die Spezifität der Enzyme zu verbessern (vgl. Abb. 1). Angemerkt sei hier, dass innerhalb des Projektes auch moderne bioinformatische Methoden zum Einsatz kommen: Eine umfassende bioinformatische Analyse entlang des gesamten Stammbaums zellulären Lebens soll Kandidaten in weiteren Organismen ermitteln, die Homologie zu den neuentdeckten Proteinen aufweisen – diese sollen kloniert und auf Funktionalität getestet werden (Abb. 2).

Die Implementierung der neuen Enzyme in biotechnologische Prozesse erfolgt in Kooperation mit kompetenten Partnern aus der Industrie. Wir erwarten nicht nur einen Quantensprung hinsichtlich der Leistungsfähigkeit und Spezifität neuer biotechnologischer Prozesse, sondern auch die Etablierung einer neuen Technologieplattform, um die noch unentdeckte marine Protein-Diversität zu erforschen.

Projekt-Highlights

Seit dem Projektstart im Jahr 2009, hat das MAMBA-Konsortium einige hundert Proteine und niedermolekulare Substanzen identifiziert und charakterisiert, die ein hohes Potential in den folgenden Applikationen haben:

- | Synthese von Feinchemikalien und biochemische Reaktionen mit Relevanz für die Pharma-Industrie
 - Ester zu Amiden (Lipasen, Amidasen)
 - Redoxreaktionen (Aldolasen und Oxidoreductasen)
 - Aktivierung von OH-Gruppen (Aldolasen)
 - Hydroxylierungen (Mono-/Dioxygenasen)
 - Lipidmodifikationen: Spezifische Umesterungen (Lipasen)
- | Lebensmittelverarbeitende Enzyme (Brot, Wein etc./Amylasen)
- | Textilverarbeitung: Enzyme aus aus halophilen Organismen zur enzymatischen Textilbehandlung (Baumwolle, Polyester usw., Laccasen/Cellulasen, Hemicellulasen)
- | Detergenzien: Enzyme mit höherer Stabilität (Proteasen)
- | Energie
 - Biomasse-Konversion (β-Glucosidasen)
 - Enzymatische Brennstoffzellen (Laccasen und Hydrogenasen)
- | Polymere
 - Monomer-Epoxidierung (Epoxidasen)
 - Polyester-Synthese (Lipasen, Esterasen)
- | Umwelt
 - Enzyme aus Extremophilen (aktiv bei tiefen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen für Entfärbungen/Laccasen, Peroxidasen)

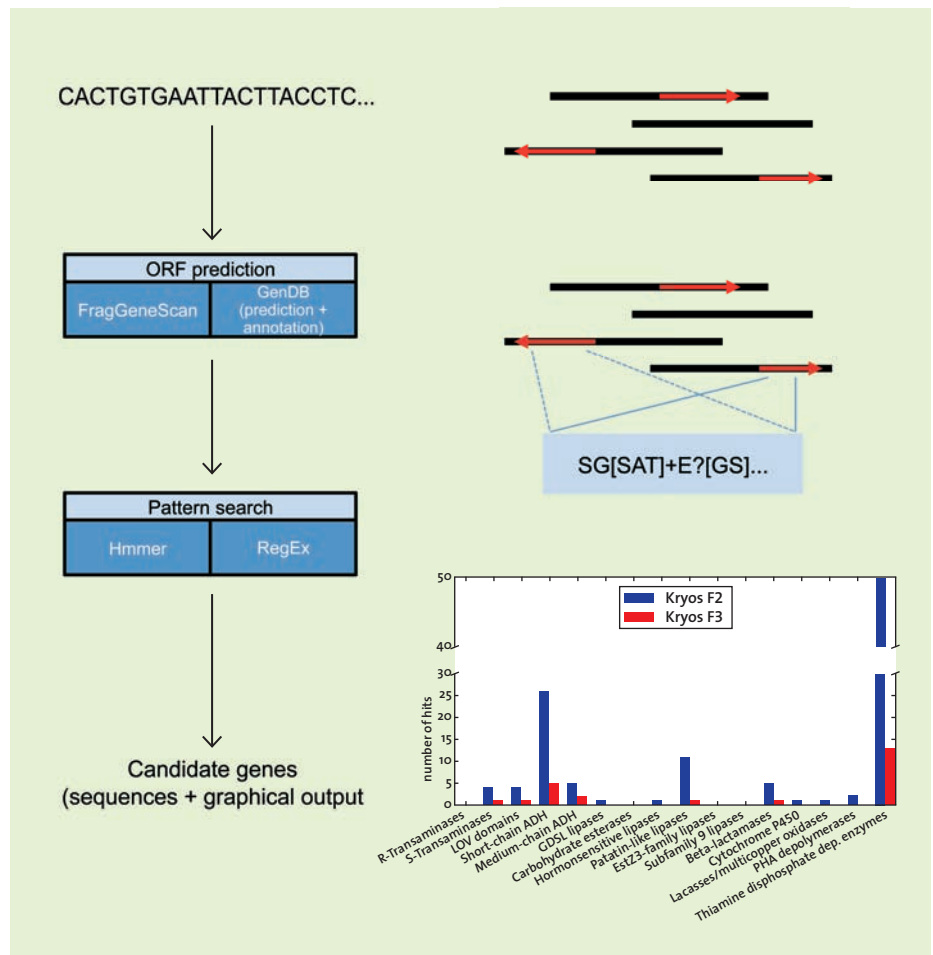


Abb. 2: Die Annotations-Pipeline für Metagenom-Sequenzierungsdaten – bioinformatikgetriebene Vorhersage von Stoffwechselwegen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften und die Entdeckung von biotechnologisch relevanten Enzymen. Kandidatenproteine werden nach ihrer *in silico*-Identifikation kloniert und funktionell sowie strukturell analysiert.

- Dekontamination (Esterasen, Mono- und Dioxygenasen, Dehalogenasen)
 - | Medizinisch relevante industrielle Prozesse
 - Antioxidanzien mit pharmakologischen Eigenschaften
 - Wirkstoffe gegen Darm-, Lungen- und Brustkrebs.
- Die Beteiligung der Industriepartner Pierre Fabre SAS (Paris), evocatal GmbH (Düsseldorf) und PharmaMar S.A. (Madrid) gewährleistet eine unmittelbare Übertragung akademischen Know-hows in Produkte, die relevant für die Hautpflege, Lebens- und Futtermittelproduktion und Feinchemikaliensynthese für medizinische Anwendungen sind.

Literatur

[1] Beloqui A, Polaina J, Vieites JM, Reyes-Duarte D, Torres R, Golyshina OV, Chernikova TN, Waliczek A, Aharoni A, Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN, Ferrer M. (2010). CHEMBIOCHEM 11(14):1975-1978.

[2] Ferrer M, Beloqui A, Golyshin PN. (2010) Methods Mol Biol. 668:189-202.

[3] Fernández-Arrojo L, Guazzaroni ME, López-Cortés N, Beloqui A, and Ferrer M. (2010). Curr Opin Biotechnol. 21:725-733.

[4] Ferrer M., Werner J., Chernikova T.N., Bargiela R., Fernández L., La Cono V., Waldmann J., Teeling H., Golyshina O.V., Glöckner F.O., Yakimov M.M., Golyshin P.N.;

MAMBA Scientific Consortium. (2012). Environ Microbiol. 14:268-281.

[5] Golyshina O.V. (2011) Appl Environ Microbiol. 77:5071-5078.

[6] La Cono V., Smedile F., Bortoluzzi G., Arcadi E., Maimone G., Messina E., Borghini M., Oliveri E., Mazzola S., L'Haridon S., Toffin L., Genovese M., Ferrer M., Giuliano L., Golyshin P.N., and Yakimov M.M. 2011. Environ Microbiol 13:2250-2268.

[6] Lemak S., Tchigvintsev A., Petit P., Flick R., Singer A.U., Brown G., Evdokimova E., Egorova O., Gonzalez C., Chernikova T.N., Yakimov M.M., Kube M., Reinhardt R., Golyshin P.N., Savchenko A., Yakunin A.F. 2012. Biochem J. 445:193-203.

[7] Röling WF, Ferrer M, Golyshin PN. (2010) Curr Opin Biotechnol. 21(4):532-538.

[8] Stock A, Breiner HW, Pachiadaki M, Edgcomb V, Filker S, La Cono V, Yakimov MM, Stoeck T. (2012). Extremophiles. 16(1):21-34.

[9] Troeschel S.C., Thies S., Link O., Real C.I., Knops K., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.E. (2012). J Biotechnol. (in press, PMID:22440389)

[10] Vieites JM, Guazzaroni ME, Beloqui A, Golyshin PN, and Ferrer M (2010) Methods Mol Biol. 668:1-37.

[11] Yakimov, M.M., La Cono, V., Smedile, F., Ferrer, M., De Luca, T.H., Juarez, S., Ciordia, S., Albar, J.P., Golyshin, P.N. and Giuliano, L. 2011. C ISME Journal 5:945-961.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Frank Oliver Glöckner
 Microbial Genomics and Bioinformatics
 Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie
 Jacobs University Bremen GmbH
 fog@mpi-bremen.de



Die sich schnell entwickelnden Omics-Methoden machen immer mehr Daten aus Zellen und Geweben zugänglich. Um wirklich valide Informationen aus den Biomaterialien zu gewinnen, sind nicht nur Kultur- und Lagerungsbedingungen wichtig, die die Zelle in ihrem natürlichen Zustand erhalten. Damit vergleichbare Daten erhalten werden, muss auch die Probenvorbereitung und -konservierung möglichst standardisiert erfolgen. Deshalb wird sowohl bei der Zellkultur als auch allen anderen Schritten ein möglichst hoher Automationsgrad angestrebt. Ein automatisiertes Protokoll zur Differenzierung und Tiefkühlagerung von Stammzellen stellen in diesem Spezial Forscher des Fraunhofer-IBMT vor (vgl. S. 20). Die Kultur der empfindlichen Stammzellen auf Carriern im hängenden Tropfen eröffnet eine Langzeitkultur und zugleich eine Möglichkeit, die Zellen beschädigungsfrei einzufrieren und zu lagern.

Biobanking

Entsprechend automatisierbare Tiefkühltechnologien werden dringend gebraucht, um medizinischen Nutzen aus den permanent anwachsenden Bio(material)banken ziehen zu können. Gemeinsam mit Unternehmen arbeiten Forscher der Biobank Graz und des BBMRI an Automationsprotokollen, um eine einheitliche Probenqualität in Europas größter Biobank sicherzustellen. In diesem Spezial stellen sie eine Automationslösung für das Einfrieren von Flüssigproben und die Verfolgung (Probentracking) von Paraffin-konservierten Geweben vor (vgl. Seite 24). Wie tiefgekühlte Proben sicher transportiert, Biobankproben automatisiert gelagert und mittels kryogängiger Memory Chip- und RFID-Technologie zuverlässig identifiziert werden können, beleuchten Experten ab Seite 27. Ein neues Tool, das die Analyse von Daten aus Kohortenuntersuchungen und Biomarkersuche signifikant verbessert, stellen zudem Haring et al. auf S. 22 vor.

Adhärenzte Zellkultur im „hängenden Tropfen“

Dr. Julia C. Schulz und Prof. Dr. Heiko Zimmermann, Fraunhofer-IBMT, St. Ingbert

Die Stammzellforschung ist eines der vielversprechendsten Gebiete der Biomedizin. Allerdings stehen immer noch nicht ausreichend Protokolle zur Verfügung, die eine hinreichend effiziente Expansion und gezielte Differenzierung erlauben. Insbesondere trifft dies auf die humanen embryonalen Stammzellen zu. Hier ist die Suche nach Differenzierungsmolekülen mit den gebräuchlichen manuellen Zellkulturmethoden zeitaufwendig und nicht zuletzt immer noch ein „Glücksspiel“. Auch die möglichen kombinatorischen Effekte auf die Entwicklung einer Zellkultur bei zwei oder drei molekularen Kandidatenfaktoren können aufgrund der Vielzahl der Möglichkeiten nur sehr oberflächlich untersucht werden.

Eine neue „alte“ Technologie hat nach unserer Einschätzung allerdings großes Potential bei der Bewältigung der beschriebenen Aufgabe. Der „Hängende Tropfen“ (Hanging Drop) ist als Kultivierungsmethode mehr als hundert Jahre im Einsatz und wurde schon zu Anfang des letzten Jahrhunderts als Kultivierungsmethode für Nervenzellen und für Untersuchungen der Embryonalentwicklung eingesetzt. Nahezu unverändert ist die Methode der Herstellung des „Hängenden Tropfens“: Er wird auf dem Deckel einer Petrischale plaziert, die dann mit geschickten Händen umgedreht wird und so einen Mini-Bioreaktor mit einem Volumen von wenigen 10 Mikrolitern ohne Anhaftungsflächen für Zellen schafft. Das geringe Volumen ist prädestiniert für einen ressourcenschonenden Kultivierungsvorgang und trotzdem ausreichend, um statistisch abgesicherte Versuche durchzuführen. Zudem ist eine perfekte und nahezu gradientenfreie Versorgung mit Gas gewährleistet, da die Zellen direkt an der Flüssig-Gasgrenzfläche kultiviert werden. Eventuellen Volumenänderungen des Tropfens lässt sich über eine Umgebung mit definierter Luftfeuchtigkeit entgegenwirken (zum Beispiel durch die Verwendung von Flüssigkeitsreservoirs direkt unter den Tropfen). Viele etablierte Differenzierungsprotokolle für Stammzellen, so zum Beispiel die Bildung von Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) basieren auf dieser Methode. Es wurden schon vor einiger Zeit von anderen Gruppen sehr erfolgreiche Ansätze zur Automatisierung durchgeführt, da sich die Zellen auch nach der Kultivierung im Tropfen ohne Zugabe von Enzymen (wie etwa Trypsin) weiterverwenden lassen. Eine Adhäsion der Zellen am Kultivierungsgefäß findet hier nicht statt, sondern die Zellen aggregieren untereinander und bilden eine Art Mikrogewebe oder Sphäroid.

Da die Adhäsion an fremden Oberflächen aber für viele Zellen eine physiologische Grundbedingung ist, differenzieren sie, sobald diese verlorengelassen, die Zellen verlieren ihre charakteristischen Eigenschaften, oder es kommt gar zum programmierten Zelltod. Wir entschlossen

uns daher als neuen Ansatz das 3D-System „Hanging Drop“ mit dem klassischen 2D-Ansatz der Zellkultur zu kombinieren. Dazu wurden Microcarrier – kleine Trägermatrizen mit einem Durchmesser von 150 bis 200 µm – in jeden einzelnen Tropfen gegeben und so den Zellen eine biokompatible (und somit auch funktionalisierbare) Oberfläche angeboten. Die Zellen können auf einem oder mehreren Microcarriern anwachsen, zugleich ist aber die Kultivierung innerhalb des aufgrund seiner Größe leicht kontrollier- und standardisierbaren Tropfens möglich. Dabei konnten wir beobachten, dass die Zellen nach der Adhäsion schnell wieder mit der Zellteilung beginnen. Während der Proliferation vereinnahmten sie immer weitere Microcarrier, so dass ein ständig wachsendes Zell-Microcarrier-Aggregat entsteht. Es ist jedoch entscheidend, dass zu Beginn der Kultur im „Hanging Drop“ die Zahl an Zellen pro Microcarrier nicht zu gering ist, damit ausreichend Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden können. Dies eröffnet zusätzlich die Möglichkeit durch eine schrittweise Zugabe der Microcarrier eine dynamische Expansion der Zellen zu erreichen, so dass die Proliferationskapazität ständig erhöht werden kann. Die Bildung der Zell-Microcarrier-Aggregate führt auch zur Entstehung einer speziellen Mikroumgebung („Nische“), wodurch die Effizienz der Differenzierungsprotokolle möglicherweise erhöht werden kann, da die physiologischen Bedingungen im menschlichen Körper simuliert werden. Für eine reproduzierbare und standardisierte Anwendung dieser Methode stellt hierbei die Anzahl der Microcarrier pro Tropfen den kritischen Parameter dar, da momentan eine gleichmäßige Verteilung noch nicht gewährleistet werden kann.

Allerdings ist die „Hanging Drop“-Kultur noch sehr zeit- und arbeitsaufwendig, da zum Beispiel für eine längere Kultivierung von Zellen ein regelmäßiger Mediumwechsel notwendig ist. Dazu muss der Deckel mit den Tropfen vorsichtig gedreht und anschließend manuell das Medium jedes einzelnen Tropfens erneuert werden, ohne die Zellen zu verlieren. Um also

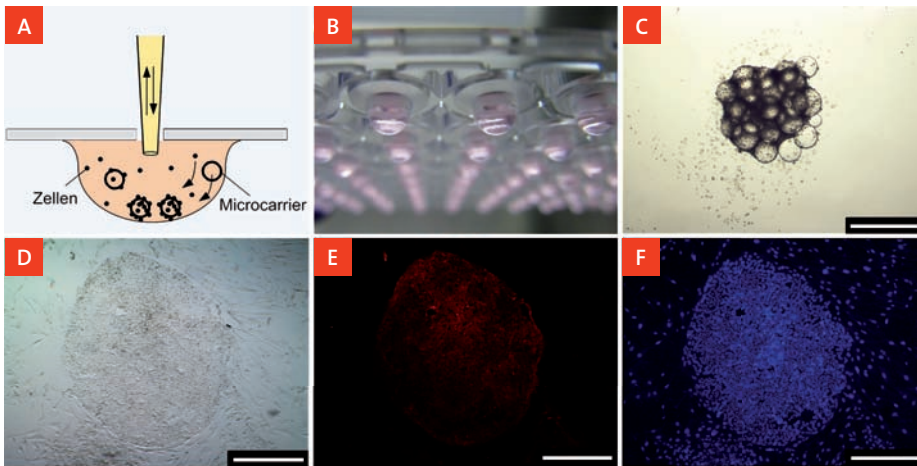


Abb. 1: Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen auf Microcarriern im Hanging Drop: A. Schemazeichnung einer Automatisierung der „Hanging Drop“-Kultur durch die Verwendung von Pipettierrobotern; B. „Hanging Drops“ an einer für die Automatisierung geeigneten Zellkulturplatte; C. Humane embryonale Stammzellen auf Microcarriern im Hanging Drop nach sieben Tagen manueller Kultivierung; D-F. Immunzytochemischer Nachweis der Pluripotenz von humanen embryonalen Stammzellen nach 10-tägiger manueller Kultur im Hanging Drop mit anschließender Kultivierung unter Standardbedingungen; D. Durchlicht-Aufnahme; E. HESCA-2 Färbung (Pluripotenzmarker); F. HOECHST33342-Färbung (Zellkern); Maßstab: 500µm

die Vorteile der „Hanging drop“-Kultur für eine breitere und größere Anwendung nutzbar zu machen, ist eine Automatisierung des Prozesses unerlässlich. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der automatischen Zugabe von Faktoren in einen derartigen „Hanging Drop“-Bioreaktor, eine bereits umgesetzte ist in Abbildung 1 A und B gezeigt. Jede Manipulation des Tropfens, vom Mediumwechsel über die Zugabe von Faktoren bis hin zur Ernte, kann durch die Verwendung einer speziellen Zellkulturplatte über eine Öffnung auf der Oberseite des Tropfens realisiert werden. Hierfür können die Vorzüge des breiten Angebotes und der unterschiedlichen Spezifikationen an Pipettier-Plattformen genutzt werden, so dass ein Großteil der manuellen Arbeit automatisiert und standardisiert werden konnte. Wir konnten damit nun im Rahmen des EU-Projektes HYPERLAB zeigen, dass humane embryonale Stammzellen ohne Verlust ihrer Pluripotenz im adhärenen Zustand im modifizierten „Hanging Drop“ für 10 Tage kultiviert werden konnten (Abb. 1 C-F). Zusätzlich konnten wir durch die Einbindung von Pipettierrobotern eine vollständige Automatisierung des Systems unter der Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen und humanen adulten Stammzellen demonstrieren.

Kryokonservierung

Durch die Entwicklung neuartiger Methoden im Bereich der Kryokonservierung, wie zum Beispiel der oberflächenbasierten Vitrifikation³ oder vollständig proteinfreier Kryomedien⁴, ist anschließend eine sichere und effiziente Lagerung der Zellen direkt im Tropfen möglich. Bei der oberflächenbasierten Vitrifikation könnten

die „Hanging Drop“-Bioreaktoren nach Zugabe der nötigen protektiven Stoffe direkt in flüssigen Stickstoff versenkt werden, so dass es zu einem sofortigem Erstarren aller Strukturen und der Einstellung aller biochemischen Prozesse kommt. Dabei kann enzymatischer Stress auf die Zellen vollständig vermieden werden, da diese adhären auf den Microcarriern eingefroren werden, so dass die zellulären Eigenschaften wie Membranintegrität und Fokalkontakte nicht gestört werden. Zusätzlich können die Zellen nach dem Auftauen direkt wieder die Zellteilungs- und Stoffwechsellvorgänge beginnen, ohne zuerst den komplexen Adhäsionsprozess durchführen zu müssen. Der modifizierte „Hanging Drop“ bietet hervorragende Möglichkeiten, Plattformen zur Optimierung von Protokollen zur Kultivierung, Differenzierung und Kryokonservierung zu entwickeln und damit endlich zu einer systematischen Entwicklung von Kulturmedien und Kulturbedingungen zu kommen.

Literatur

- [1] www.hyperlab.eu
- [2] Schulz, J. C., P. S. Stumpf, A. Katsen-Globa, A. Sachinidis, J. Hescheler and H. Zimmermann (2012). Engineering in Life Sciences, DOI: 10.1002/elsc.201100213.
- [3] Beier, A.F., Schulz, J.C., Dörr, D., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J. and Zimmermann, H. (2011). Cryobiology 63, 175-85.
- [4] Zeisberger, S.M., Schulz, J.C., Mairhofer, M., Ponsaerts, P., Wouters, G., Doerr, D., Katsen-Globa, A., Ehrbar, M., Hescheler, J., Hoerstrup, S.P., Zisch, A.H., Kolbus, A. and Zimmermann, H. (2011). Cell Transplantation 20, 1241-57.

Korrespondenzadresse

Dr. Julia C. Schulz
julia.schulz@ibmt.fraunhofer.de



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
Rue d'Egmont 15
B-1000 Bruxelles, Belgique

Tel: +32 2 50 08 531
Fax +32 2 64 92 989

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

Biomarker und System-Epidemiologie

Haring R, Rosvall M, Völker U, Völzke H, Kroemer H, Nauck M, Wallaschofski H. (2012): A network-based approach to visualize prevalence and progression of metabolic syndrome components, PLoS One. 2012;7(6):e39461

Einen neuen Ansatz, Herr der Flut an Biobank-assoziierten Daten zu werden, haben Greifswalder Forscher um Dr. Robin Haring und schwedische Kollegen vorgestellt. Mit einem neuen bioinformatischen Werkzeug zur statistischen Analyse von komplexen Risikofaktoren gelang es den Forschern, die Häufigkeit und das Fortschreiten des metabolischen Syndroms in einer Bevölkerungskohorte von 4.000 Personen anhand von fünf Biomarkern zu beschreiben und die Bedeutung der Biomarker Bluthochdruck, Fettleibigkeit und erhöhte Blutfette einzuordnen und graphisch darzustellen. Ziel der Wissenschaftler ist es indes, Daten aus Genom-, Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalysen zu integrieren und zur Auffindung molekularer Biomarker zu nutzen, die helfen, die Aussagekraft klassischer Biomarker bei der Krankheitsprädiktion und -prognose signifikant zu verbessern. Die Integration der Information aus Multi-Omics-Analysen verspricht Fortschritte im Feld der personalisierten Medizin.

LABORWELT:

Vor welchem Problem sehen sich Wissenschaftler bei der Auswertung großer Datenmengen wie zum Beispiel klinischen, serologischen und molekularbiologischen Daten aus Bevölkerungsstudien?

Haring:

Die Risikoabschätzung klinisch relevanter Endpunkte wie Schlaganfall, Herzinfarkt oder kardiovaskulärer Tod ist durch klassische Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Body Mass Index oder Rauchen bereits sehr verlässlich möglich, so dass neue potentielle Biomarker häufig nur relativ wenig zu einer Verbesserung des Risikos beitragen können. Beispielhaft für dieses Dilemma steht eine frühere Publikation unserer Arbeitsgruppe, die zeigte, dass die simple Frage nach dem subjektiven Wohlbefinden eine ebenso präzise Sterblichkeitsvorhersage erlaubt wie die Messung von 10 Biomarkern (BMC Med Res

Methodol. 2011;11:103). Statt „one size fits all“ zeichnet sich nun auf der Grundlage molekularer Biomarker ein Trend zur stärkeren Individualisierung in der Prognose und Prävention verschiedenster Erkrankungen ab.

LABORWELT:

Welche Werkzeuge stehen derzeit zur Verfügung und was muss verbessert werden?

Haring:

Standardwerkzeug zur Identifikation von Risikofaktoren und Krankheitsvorhersage sind Regressionsmodelle. Doch dieser traditionelle methodische Ansatz ist durch den eindimensionalen Bezug auf jeweils nur einzelne Risikofaktoren beziehungsweise Biomarker stark limitiert in der Auswertung nun verfügbarer multidimensionaler Datensätze und der Möglichkeit, individuelle Krankheitsverläufe zu identifizieren.

LABORWELT:

Was ist das neue an Ihrem Ansatz, wie funktioniert er und welche Ergebnisse hat er geliefert?

Haring:

Die statistische Integration sogenannter Multi-Omics-Datensätze (molekularbiologische Parameter des Genoms, Transkriptoms, Proteoms und Metaboloms) wird der nächste entscheidende Schritt zur Analyse individueller Krankheitsverläufe und deren Ursachen sein. Dazu haben wir ein Netzwerk-Analysemodell programmiert, um beispielhaft die Prävalenz und Progression des Metabolischen Syndroms zu analysieren und graphisch verständlich darzustellen. Mit Hilfe der Daten von 4.000 Probanden der Bevölkerungsstudie SHIP (Study of Health in Pomerania) konnten wir zeigen, dass die fünf Komponenten des Metabolischen Syndroms (Bluthochdruck, Bauchumfang, erhöhte Blutzuckerwerte, erhöhte Blutfette und erniedrigtes Cholesterin) einen jeweils unterschiedlichen Beitrag zum Krankheitsbild leisten. Wir konnten durch Netzwerk-analytische Methoden auch belegen, dass Bluthochdruck und Fettleibigkeit die wichtigsten Einflussfaktoren sind, während ein gestörter Blutfettstoffwechsel vor allem den weiteren Verlauf des Metabolischen Syndroms dominiert.

LABORWELT:

Was bedeutet dies für das Auffinden und Validieren neuer Biomarker?

Haring:

Diese neuen Netzwerk-basierten statistischen Verfahren könnten die Fülle an molekularen Biomarkern im Zusammenspiel mit klassischen Risikofaktoren integrieren und so den Zugang zu hochkomplexen Datensätzen vereinfachen. Auch das Bild der Epidemiologie wird sich dadurch hin zu einer System-Epidemiologie wandeln.

LABORWELT:

Wie geht Ihre spannende Forschungsarbeit nun weiter?

Haring:

Im Rahmen von GANI_MED (Greifswald Approach to Individualized Medicine) bzw. des Deutschen Zentrums für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK) werden wir am Forschungsstandort Greifswald die Identifikation und Integration molekularer Biomarker als Grundlage einer „Individualisierten Medizin“ vorantreiben. In unserer Arbeitsgruppe planen wir, die Anwendung integrierter personalisierter Omics-Profile im Rahmen einer klinischen Studie zur Testosterontherapie, um unsere bisherigen Beobachtungszusammenhänge aus epidemiologischen Studien zu validieren und Omics-Verfahren „from bench to bedside“ zu bringen.



Dr. Robin Haring

Dr. Robin Haring (30) ist Postdoc am Metabolic Center des Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald. Nach dem Diplom-Studium der Demographie an der Universität Rostock promovierte er 2010 im Fach Epidemiologie mit Auszeichnung. Im Anschluss verbrachte er als Stipendiat der Krupp-Stiftung ein Jahr an der Boston University als Research Fellow in der Framingham Heart Study. Seine Forschungen beschäftigen sich schwerpunktmäßig mit kardiovaskulären Risikofaktoren und Biomarkern, allen voran Testosteron.

Your Life Sciences Career.



Let's Start it!

Biowissenschaften | Chemie | Pharmazie | Medizin

Firmenkontaktmesse

Viele Firmen – Ein Weg – Dein Job

ScieCon NRW 2012
24. Oktober - Audimax
Ruhr-Universität-Bochum

ScieCon
NRW 2012 

Mit freundlicher Unterstützung von:



www.ScieCon.info

Biobanken – Optimierung durch Automatisierung

Univ.-Prof. Dr. Berthold Huppertz, Direktor und CEO, Biobank Graz, Österreich

Biobanken sind Infrastruktur-Einheiten, die eine immer größer werdende Anzahl von überwiegend humanen Proben beherbergen und – mit ihren entsprechenden klinischen Daten vernetzt – der Forschung zur Verfügung stellen. Erweitert wird dieses System der humanen Biobanken durch Biobanken, die Proben tierischen oder pflanzlichen Ursprungs beinhalten und auch dort wieder mit funktionellen Daten verknüpfen. In den vergangenen zehn Jahren ist nicht nur die Zahl der Biobanken deutlich angestiegen – auch die Zahl der in den einzelnen Biobanken gelagerten Proben hat enorme Ausmaße angenommen. So lagern heute in der UK Biobank eine Million verschiedene Proben von 500.000 Spendern und Spenderinnen im Alter von 40 bis 69 Jahren. In der Biobank Graz lagern fast sechs Millionen Proben von mehr als einer Million Spendern und Spenderinnen, die während der vergangenen 30 Jahre gesammelt wurden.

Die Sammlung und auch die Langzeitlagerung dieser großen Zahl an Proben erfordert ein immer höheres Maß an Automatisierung. Dies ist vor allem notwendig, um die Richtlinien der Qualitätsmanagementsysteme zu erfüllen, die mit manuellen Sammel- und Lagerstrategien bei diesen Probenzahlen nicht mehr umsetzbar sind. Hinzu kommt, dass immer ausgefeiltere Sammel- und Lagerprotokolle entwickelt werden, um die Proben möglichst hochwertig über lange Zeit und für jedwede analytische Anwendung zur Verfügung zu haben.

Die Zunahme an Proben ist verbunden mit einem noch viel größeren Zuwachs an klinischen und wissenschaftlichen Daten zu jeder Probe. Dies hat zur Folge, dass immer komplexer werdende IT-Strukturen entwickelt werden müssen,

um nicht nur die lokale Einordnung der Proben während der Lagerung, sondern auch die Vernetzung zwischen Proben und Daten zu jedem Zeitpunkt zu gewährleisten. Dabei müssen alle ethischen und legalen Erfordernisse zum Schutz der persönlichen Rechte der Spender berücksichtigt werden. Somit sind Entwicklungen auf verschiedensten Ebenen in Biobanken im Gange, um den steigenden Anforderungen gewachsen zu sein.

Automatisierungsentwicklungen

Automatisierungsentwicklungen für die Sammlung und Lagerung von Proben finden sich in fast allen großen Biobanken. Es zeigt

sich heute, dass der Weg von manuellen Systemen hin zu automatisierten Systemen zwingend erforderlich ist, um als Biobank internationale Akzeptanz zu erhalten und zu behalten. Nur eine zertifizierte und mit einem Qualitätsmanagement (QM)-System agierende Biobank wird heute als wissenschaftlicher Kooperationspartner ernsthaft in Betracht gezogen.

Unterstützung bei der Sammlung von Flüssigproben

Biobanken, die an Universitäten – besonders Medizinische Universitäten oder Fakultäten – angeschlossen sind, können daraus einen großen Nutzen für die Probensammlung ziehen. Die Anbindung an die klinischen Zentrallabors der entsprechenden Universitätskliniken ermöglicht einen direkten Zugang auf Flüssigproben (vor allem Blutproben) und – über die entsprechenden LIMS-Systeme – auch den direkten Zugriff auf die entsprechenden klinischen Daten. Der Transport dieser Proben von der Einzelklinik, in der die Blutabnahme erfolgt, hin zum Zentrallabor ist in den Universitätskliniken durch die klinische Routine optimiert. Somit können angeschlossene Biobanken hier durch eine direkte Anbindung eine optimale Probenqualität erhalten.

An dieser Stelle entscheidet das Probenmanagement einer Biobank über die weitere Handhabung der Proben auf Ebene der Biobank und damit über die Qualität der Probe für die Wissenschaft. Eine manuelle Probenaufteilung kann trotz aller Bemühungen eines effektiven QM-Systems eine gleichbleibende Qualität nicht auf Dauer garantieren, so dass eine Automatisierung zwingend erforderlich ist. Dafür stehen schon seit langem hochautomatisierte Pipettierroboter zur Verfügung, die hier zum Einsatz kommen.

Neuerungen bei der automatisierten Sammlung von Flüssigproben

Trotzdem bleibt meist ein manueller Schritt offen, nämlich die aliquotierten Proben aus dem Pipettierroboter in ihre entsprechenden Lagersysteme zu überführen. Dieser Schritt, der gerne in der Kette des Probenhandlings übersehen wird, kann sich entscheidend auf die Qualität der Proben auswirken, da unterschiedlich lange Zeiten zwischen Aliquotierung und Einfrieren gerade bei Flüssigproben wie Serum und Plasma entscheidende Qualitätsunterschiede nach sich ziehen können.

Die Biobank Graz ist diesem kritischen Schritt aktiv entgegengetreten und hat zusammen mit der Firma Hamilton, einem Hersteller von Pipettierrobotern einen neuen Typ von Robotern entwickeln lassen, der so bisher auf dem Markt nicht zur Verfügung steht. Das Novum an diesem

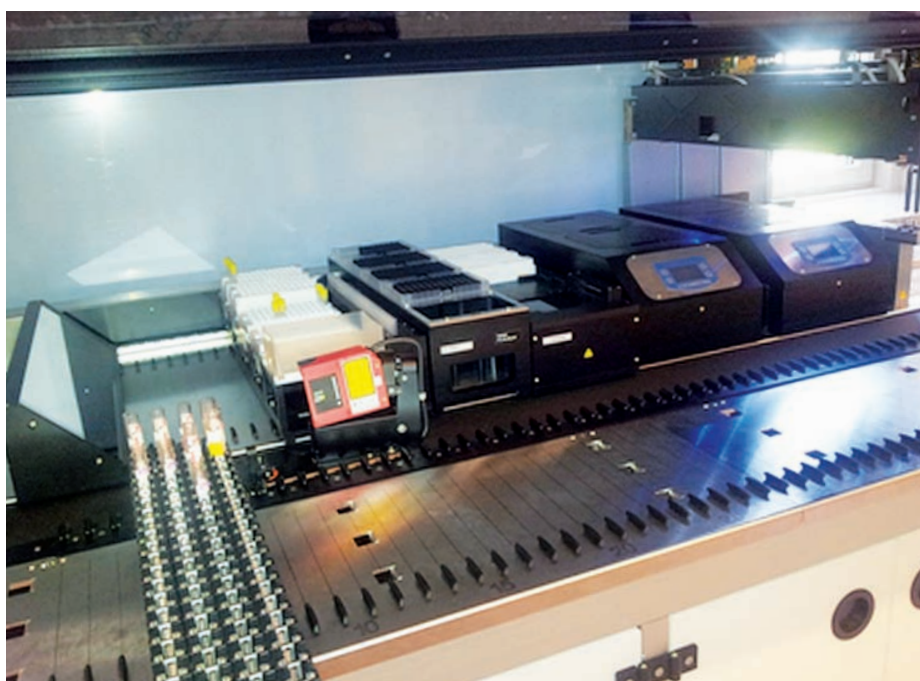


Abb. 1: Blick in den neuen Pipettierroboter der Biobank Graz mit den beiden Einheiten zum direkten Einfrieren von Einzelproben rechts im Bild (je mit kleinem, blauumrandeten Display)



Your DNA lab will move
faster
if it can see where it's going.



Fragment Analyzer™ replaces lab-on-a-chip for RNA, Next Gen Sequencing, gDNA and SSR Genotyping applications.

Fragment Analyzer™ customers since its January, 2012 introduction:

20 government institutes and labs in Germany, France, Austria, Switzerland, the United Kingdom, Italy, Japan, China, Brazil, Canada and the U.S.

13 medical genetic/genomics testing firms

7 U.S. medical schools

6 of the 10 biggest seed companies in the world.

International universities in Germany, France, Switzerland, Austria, Japan, Brazil, Canada and the United Kingdom

“We found speed, quality, resolution and versatility in the Fragment Analyzer.”

— Dr. Sunil Chandran, Senior Scientist, Amyris, Inc.



Info@aati-us.com www.aati-us.com

Call our lab in Heidelberg to learn more: 49-6221-868058-10



Abb. 2: Blick auf das neue Regalsystem der Biobank Graz mit einem AIV (automatischem intelligenten Vehikel) und den eigens für die Biobank entwickelten Lagerungsboxen in den Regalen

neuen Pipettierroboter ist, dass in das System des Gerätes zwei Bereiche integriert wurden, die Einzelproben auf minus 15 °C einfrieren und lagern können. Damit kann der Pipettierroboter nach dem Aliquotieren einer Probe jedes einzelne Aliquot direkt auf minus 15 °C einfrieren, ohne dass längere Stehzeiten bei Raumtemperatur zu Qualitätseinbußen führen.

Durch ein solches Einfriersystem (Abb. 1) im direkten zeitlichen und örtlichen Zusammenhang mit der Probenaliquotierung ist nicht nur eine Steigerung des Erhalts der Probenqualität möglich. Diese Kombination bringt auch eine deutliche Reduktion des Arbeitsaufwandes der Mitarbeiter einer Biobank mit sich. Musste bisher gewährleistet sein, dass sich permanent eine Person der Biobank in der Nähe des Pipettierroboters aufhielt, um anfallende Aliquots direkt einfrieren zu können, so wird dies durch den neuen Roboter übernommen. Da personelle Ressourcen in einer Biobank immer ein kritischer Faktor sind, wird sich der zusätzliche finanzielle Aufwand bei der Anschaffung eines solchen neuen Pipettierroboters schnell wieder amortisieren.

Neuer Nutzen von alten Paraffinproben

Die Fixierung und Einbettung von Gewebeproben in Wachs (Paraffin) ist schon seit langem eine der häufigsten Methoden, um Proben einer dauerhaften Lagerung zuzuführen. Paraffinproben, die über Jahrzehnte gelagert wurden, können anschließend noch zur Evaluation und Datenanalyse herangezogen werden. Mit heutigen Methoden ist zum Beispiel eine Extraktion von DNA möglich, um mit molekularbiologischen Untersuchungen weitere Analysen durchzuführen.

Die Langzeitlagerung von Paraffinproben eröffnet somit die Möglichkeit, Vergleichsstudien durchzuführen. Solche Studien können beispielsweise die Verwendung unterschiedlicher Medikationen über Jahrzehnte hinweg vergleichen oder aber die Veränderung der Lebensbedingungen an einem Ort mit dem Auftreten von bestimmten Erkrankungen korrelieren. Damit wird ein weites Feld für epidemiologische Forschungen aufgestoßen, das bisher nur sehr lückenhaft genutzt worden ist.

Eine Grundvoraussetzung für solche Studien ist allerdings nicht nur die eindeutige Zuordnung der Proben in den – meist ebenfalls sehr alten – Lagerungssystemen für Paraffinproben, sondern auch die eindeutige Zuordnung der klinischen Daten zu diesen Proben.

Neuerungen bei der automatisierten Lagerung von Paraffinproben

Klassischerweise werden Paraffinproben in den Archiven der Pathologien von (Universitäts-) Kliniken gelagert. Dort befinden sich in geeigneten Räumen spezielle Archivschränke, in denen die Paraffinblöcke gelagert werden. Anfangs ist noch versucht worden, die Proben nach Patient zu sortieren und hinter jedem Block Platz zu lassen, um bei einer neuen Probe des Patienten eine direkte räumliche Zuordnung zu gewährleisten.

Mit zunehmender Zahl an Proben erreicht allerdings jedes Lager irgendwann seine Grenzen. Dann ist eine dichte Lagerung ohne räumliche Zuordnung der Proben eines einzelnen Patienten notwendig. Diese neue chaotische Lagerung erhöht zweifelsohne die Gefahr einer Verschlechterung der Wiederfindungsrate von Proben, wenn nicht ein hohes Maß an Qualitätssicherung in einer solchen Biobank vorliegt.

Entsprechende automatisierte oder semi-automatisierte Lagerungssysteme für Paraffinblöcke sind seit längerem auf dem Markt erhältlich. Allerdings sind oft zwei Faktoren entscheidend, sich gegen solche Systeme zu entscheiden. Diese Systeme sind oft sehr kostenintensiv, und/oder sie erfordern sehr viel Platz. Diese Kombination verhindert oft die Anschaffung einer solchen automatisierten Infrastruktur.

Inzwischen drängen daher verstärkt Systeme in den Biobanken-Bereich, die aus der klassischen Lagersystem-Branche stammen. Mit entsprechenden Anpassungen können auch solche Systeme an den Biobanken-Bereich adaptiert werden. Ein solches Beispiel findet sich in der Biobank Graz. Hier wurde ein semi-automatisiertes Lagerungssystem der Firma YLOG mit automatischen intelligenten Vehikeln verwendet (Abb. 2), um die chaotische Lagerung von Paraffinproben zu einem hochdichten Lager zu optimieren. Zentraler Bestandteil dieses Systems ist eine Lagerungsbox, die im Rahmen einer Masterarbeit an der Technischen Universität Graz entwickelt worden ist (Abb. 2). Mit dieser Box ist die Verwaltung der Paraffinproben in dem hochdichten Lagersystem in der Biobank gerade in die Routine gegangen.

Ausblick

Die Auflistung von Neuerungen im Bereich der Biobanken ist inzwischen sehr lang und wird wohl jedes Jahr erneuert werden können. Das zeigt die Innovationskraft und Entwicklungsfähigkeit dieses Bereiches, vor allem auch für Firmen, die sich in diesem noch immer stark wachsenden Bereich engagieren wollen. Hinzu kommt, dass viele Biobanken inzwischen beginnen, ihre Betätigungsfelder zu erweitern, um vom reinen Probenlieferanten zu einem Forschungspartner zu werden. Experten-Zentren sollen die Forschung – auch die industrielle Forschung – näher an die Probensammlungen und ihre klinischen Daten heranbringen, um somit die Expertisen aller Seiten (akademisch, klinisch und ökonomisch) zu bündeln und synergistisch zu nutzen.

Korrespondenzadresse

Univ.-Prof. Dr. Berthold Huppertz
Direktor und CEO der Biobank Graz
Medizinische Universität Graz
Stiftingtalstr. 3.1
8010 Graz, Österreich
berthold.huppertz@medunigraz.at
www.medunigraz.at/biobank

Kryotechnik für Biobanken

Dipl.-Phys. Uwe Schön, Fraunhofer-IBMT, Sulzbach; Dr. Ben Spindler, Sysmex Bioscience Europe, Horgen, Schweiz; Prof. Dr. Heiko Zimmermann, Fraunhofer-IBMT, St. Ingbert

Seitdem Biobanken als Ressource für das Auffinden diagnostischer Signaturen betrachtet werden, sind immense Beträge investiert worden, um medizinische Informationen aus den Probenmaterialien zu gewinnen. Von erheblicher Bedeutung für die Analysenqualität: die standardisierte Probenentnahme, Probenvorbereitung und automatisierte beschädigungsfreie Probenlagerung.



Dr. Uwe Schön ist Physiker am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik in Sulzbach.

LABORWELT

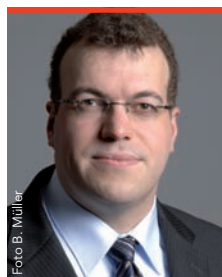
Vor welchen Herausforderungen stehen Logistiker beim Versenden von tiefgefrorenen Proben für Therapie und Forschung?

Schön

Das Versenden von medizinischen und biologischen Proben stellt die modernen Logistikunternehmen wie DHL, UPS auch in Zeiten von Amazon und anderen Internet-Versendern noch immer vor unlösbare Aufgaben. Insbesondere die Notwendigkeit einer lückenlosen Kühlkette – beginnend bei der Probennahme bis hin zur Einlagerung oder Anwendung für die häufig tiefgefrorenen Zellen – bleibt in vielen Fällen eine Sonderanforderung abseits der ganz großen Stückgutzahlen, die mit den üblichen Transportmitteln nicht zufriedenstellend erfüllt wird. Es existiert beispielsweise keine Firma am europäischen Markt, die für den vollständigen Umzug von Proben aus Kryolagerbehältern eine sichere Lösung ohne Unterbrechen der Kühlkette anbietet. Das impliziert in vielen Fällen ein erhöhtes Risiko der Erwärmung der Proben, da weder eine lückenlose Temperaturüberwachung der wertvollen Sammlungen nach der Entnahme aus dem Lagerbehälter durchgeführt wird, noch geeignete Schleusensysteme zum Umpacken vorhanden sind. Das Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik hat im Umfeld neuer Qualitätsstandards für die Behandlung von tiefkalten Kryoproben bis -196°C Lagertemperatur auf diesem Sektor Lösungswege geschaffen und geeignete Gerätschaften entwickelt. Die Erfahrung der Wissenschaftler und Techniker im Umgang mit Kryoproben konnte erfolgreich in Projekten eingesetzt werden. Dabei wurden die Proben aus dem Kryolager entnommen und am Ziel im Kryolager eingebracht. So wurde etwa das wertvolle Jahrzehnte-alte Archiv mit 300.000

LABORWELT

Humanproben der Umweltprobenbank des Bundes unter anderem aus sechs Behältern der Größe 1.400 Liter bei Temperaturen bis zu -196°C entnommen, über 500 km transportiert und anschließend wieder sicher eingelagert. Die Vorgänge wurden im Vorfeld simuliert und die Temperaturen lückenlos gemessen. Mit online-Überwachung auch während des Transports wäre auch ein etwaiges Überschreiten der zulässigen Lagertemperaturen per Alarm gemeldet worden. Mit auf dem Transportweg befanden sich die geeigneten Notfalllösungsmittel des Fraunhofer-IBMT wie Ersatzbehälter, genügend flüssiger Stickstoff zum Kühlen und hochqualifiziertes Personal zur Rettung der Proben.



Prof. Dr. Heiko Zimmermann ist Hauptabteilungsleiter des Fraunhofer-Instituts für Biomedizinische Technik in St. Ingbert.

LABORWELT

Welche kryobiotechnologischen Trends zeichnen sich derzeit im Biobanking ab?

Zimmermann

Das Biobanking unterliegt momentan einem rasanten Wandel: weltweit, aber gerade auch in Deutschland. Die explodierenden Probenzahlen und der Start der Beprobung von großen Kohorten mit krankheitsorientierten und epidemiologischen Fragestellungen haben zu einem Automatisierungsdruck in der Tieftemperaturlagerung geführt. Die Folge ist nun die Installation unterschiedlichster Systeme, über die einerseits noch keine Langzeiterfahrungen vorliegen und die andererseits – zumindest physikalisch – in nicht optimalen Temperaturbereichen für die Proben arbeiten. Gleichwohl bestimmen die Einfrier- und Lagertechnologien zweifellos die Qualität der Proben und die Aussagekraft der davon abgeleiteten Ergebnisse. Im Fokus der kryobiologischen Forschung wird daher nun die Etablierung retrospektiver Qualitätskontrollen stehen, die sowohl physikalische Messprinzipien

anwenden (z. B. die Eisstruktur einer Probe) als auch biologische Marker, um die Qualität einer Probe im Nachhinein zu bestimmen. Gleichzeitig müssen die Einfrier- und Auftauverfahren weniger invasiv und zugänglicher für die medizinische Zulassung werden, zum Beispiel durch die Verbesserung der Vitrifikations- und auch der Einfrierverfahren mittels Eisnukleation. Parallel dazu muss auch – gerade im Hinblick auf die Verwendung von konservierten Zellen und Gewebe im klinischen Kontext – die Invasivität der Konservierungsverfahren auf molekularbiologischer und funktioneller Ebene besser untersucht werden.



Dr. Ben Spindler ist Direktor der Sysmex Bioscience Europe, dem Schweizer Spezialisten für die Verarbeitung tiefgekühlter Proben.

LABORWELT

Wie lässt sich die beschädigungsfreie Lagerung von Zellen effizient automatisieren?

Spindler

Biobanken befinden sich im Wandel. Harmonisierungsbestrebungen, Kostendruck sowie gesteigerte Anforderungen im Qualitätsmanagement steigern das Bedürfnis nach automatisierten Lösungen. Die allseits bekannten Megabiobanken haben diesen Automationsbestrebungen mit Millionenbudgets entsprochen, jedoch ist hier die vollautomatisierte Lagerung im Idealzustand – bei Temperaturen unterhalb von -170°C – noch nicht Realität. Wegen der oft eingesetzten Mikroplatten-Formate ist die individuelle Probenansteuerung unerreicht, ebenso wie die dauerhaft erschütterungsarme und Wärmeexposition-eliminierende Lagerung. Auch kleinere Sammlungen beabsichtigen die Lagerbedingungen (ablösende Labels, Suchvorgänge und damit verbundene Probenerwärmung) und Probendokumentation (Inventarisierung) zur verbessern. Auch für dieses kleinere Segment ist die für Zelllinien so wichtige Automation der Stickstofflagerung nicht gelöst. 2013 wollen Anbieter, darunter Sysmex Bioscience, diese Lücke mit Systemen schließen, die Stickstofflagerung unter -170°C und Vollautomation vereinen. Passiert dies auf Basis einer „Cherry Picking“-Lösung mit der Möglichkeit einzelne Tubes ein- und auszulagern, bleibt die Qualität der Sammlung dauerhaft gesichert. Besonders spannend wird der Einzug neuer Identifizierungstechnologien, wie die kryogängige Memory Chip- und RFID-Technologie, die eine Unverwechselbarkeit von Proben sowie das elegante „Inventar auf Knopfdruck“ ermöglichen.

III Mikroskopie



Neue Lichtmikroskopiertechniken haben die Beugungsgrenze des Lichts hinter sich gelassen und erreichen Auflösungen von unter 100 Nanometern. Dieses Forschungsfeld der sogenannten hochauflösenden Mikroskopie stellen wir in diesem Spezialgenauer vor. Darunter sind sowohl „echte“ als auch „funktionelle“ Techniken der hochauflösenden Mikroskopie. Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) gehört zu ersteren Techniken, da bei ihr die Bildinformation aus den abgefangenen, abklingenden Lichtwellen selbst ermittelt wird. Reto Fiolka stellt einen neuen SIM-Aufbau vor, der schnell genug für Live-Aufnahmen lebender Zellen in 3D ist (Seite 32).

Lebende Zellen, lebende Mäuse

Sowohl die STED-Mikroskopie als auch dSTORM sind „funktionelle“ Techniken hochauflösender Mikroskopie, das heißt, dass sie über verschiedene Umwege zum eigentlichen Ziel kommen – dem detaillierten Bild. Die STED-Mikroskopie macht sich das nicht-lineare Antwortverhalten von Fluorophoren zunutze. LABORWELT hat mit Stefan Hell über die erstmalige *in vivo*-Anwendung der Technik am Gehirn lebender Mäuse gesprochen (Seite 36). Bei der dSTORM wechseln Fluorophore zufällig den Leuchtzustand. Aus hintereinander aufgenommenen Einzelaufnahmen wird dann das hochaufgelöste Bild errechnet. Jan Schmoranzer stellt auf Seite 28 die Weiterentwicklung SD-dSTORM vor. Das Prinzip der spektralen Entmischung ermöglicht es dabei, im Experiment zwei verschiedene Fluorophore zu unterscheiden und damit zwei distinkte Zellstrukturen abbilden zu können.

Dieses Mikroskopie-Spezial wird abgerundet von einem Expertenpanel zum Thema Optogenetik und der Vorstellung einer neuen Methode für die Elektronenmikroskopie. Auf Seite 30 erläutert Jürgen Plitzko, wie sich mit Ionenstrahlen äußerst dünne Probenschnitte fräsen lassen, so dass noch viel mehr Details im EM-Bild erkannt werden können als bisher.

Vielfarben-dSTORM mit Carbocyaninen

André Lampe, Dr. Jan Schmoranzer, Freie Universität Berlin

Wir haben eine neue Variante der direkten stochastischen optischen Rekonstruktions-Mikroskopie (dSTORM) mit dem Namen SD-dSTORM entwickelt¹. SD steht für spektrale Entmischung (engl. spectral demixing). SD-dSTORM kombiniert die photochemischen Vorteile rot strahlender Carbocyanin-Farbstoffe mit dem Prinzip der spektralen Entmischung. Dabei geht es um die neue Kombination der beiden für hohe Auflösungen geeigneten Carbocyanin-Farbstoffe Alexa Fluor 647 und Alexa Fluor 700, die einwandfreie, Puffer-kompatible Blink-Charakteristika zeigen. Diese Eigenschaft wird insbesondere bei der Lokalisierung von Einzelmolekülen benötigt. Für eine wirklichkeitsgetreue, hochauflösende Rekonstruktion linearer und punktförmiger biologischer Nanostrukturen benötigt SD-dSTORM im Vergleich zu anderen hochauflösenden Mikroskopie-Technologien eine deutlich reduzierte Laserleistung und auch weniger Einzelaufnahmen.

Unter den momentan für die Einzelmolekül-Lokalisierung verfügbaren organischen Photoschaltern sind die Carbocyanin-Farbstoffe Cy5 und Alexa 647 die effizientesten, da sie sehr photostabil sind (bis zu 6.000 Photonen je AN-Zyklus) und vor allem die Fähigkeit besitzen, in einer reduzierenden Umgebung sehr lang im AUS-Zustand zu verharren. Daher konzentrierten wir uns auf Alexa 647 und suchten einen Partnerfarbstoff, der sowohl den gleichen Puffer benötigt als auch jenen verlängerten AUS-Zustand aufweist. Schließlich wurde Alexa 700 ausgewählt. In einer 100 bis 300 millimolaren β -Mercaptoethylamin (MEA)-Lösung und bei Vorhandensein eines Fängers von Sauerstoffradikalen besitzt dieser Farbstoff bei einer Anregungswellenlänge von 643 nm den gewünschten verlängerten AUS-Zustand.

Ein Zweikanal-Emissionsteiler (Optosplit II, Cairn Research) wurde verwendet, um die sich überlappenden Emissionsspektren von Alexa 647 und 700 voneinander abzugrenzen. Die Emissionswellenlängen wurden mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels (710 DCXR) und zwei Emissionsfiltern (HC 687/40 und ET 794/160) in Kurz- und Langwellenemission aufgespalten, wobei sie nebeneinander auf der EMCCD-Kamera (iXon 897, Andor) registriert wurden. Der dichroitische Spiegel und die Bandpassfilter wurden sowohl an die Einzellaserlinie (643 nm) als auch an die Emissionsspektren angepasst, mit dem Ziel die für die spektrale Entmischung benötigte Signalüberlappung zu optimieren.

Um die Qualität der Trennung der Spektren von Alexa 647 und 700 einschätzen zu können, wurden die Mikrotubuli von BS-C-1-Zellen mit im Handel erhältlichen Zweitantikörpern getrennt für jeden Farbbereich eingefärbt. Dabei wurden die Proben in dSTORM-Puffer (MEA, Sauerstoffradikalfänger) aufgenommen. Vor der eigentlichen

Aufnahme der Bilder wurden die Fluorophore zunächst in den AUS-Zustand versetzt. Dazu wurde die Probe mit 3 bis 5 kW/cm² starkem Laserlicht (Wellenlänge 643 nm) so lange beleuchtet, bis die Mikrotubuli-Struktur nicht mehr erkennbar war, dafür aber das zufällige Blinken der Farbstoffe einsetzte. Typischerweise wurden für eine Anregungswellenlänge 5.000 bis 20.000 Einzelbilder aufgenommen. Die EMCCD-Kamera lief dabei durchgehend.

Nach der Akquise der Bilder wurden die Orte, an denen sich die Einzelmoleküle befanden und deren jeweilige, individuelle Intensität, über die gesamte Zweikanalansicht mit der Open Source-Software rapidSTORM

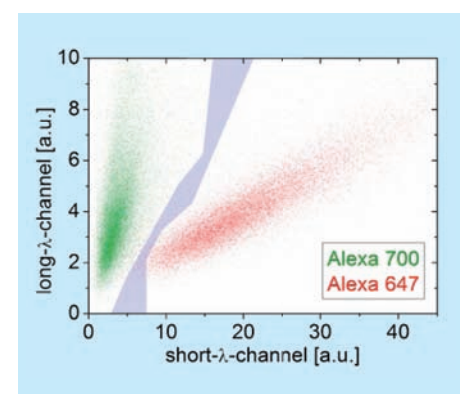


Abb. 1: SD-dSTORM-Rekonstruktion von Mikrotubuli. Mikrotubuli wurden separat mit Alexa 647 (rot) oder aber Alexa 700 (grün) angefärbt und mittels SD-dSTORM visualisiert. Die Intensitätswerte für die Lokalisation der beiden Farbstoffe zeigen in einem zweidimensionalen Intensitäts-histogramm unterschiedliche Lokalisationen. Lokalisierungen in Cross-talk-Regionen sind ausgeblendet (grau).

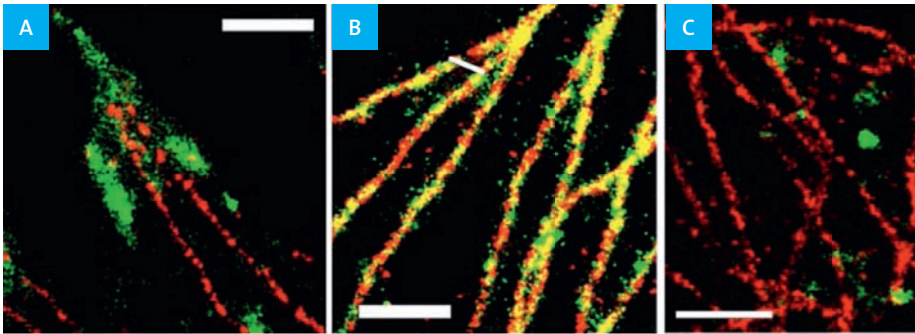


Abb. 2: SD-dSTORM-Rekonstruktion getrennter und co-lokalisierender Strukturen. SD-dSTORM von mit Alexa 647 (rot) gefärbten Mikrotubuli und fokale Adhäsionen (A), Clathrin-überzogene Grübchen (C) und Mikrotubuli (B, für Co-Lokalisationstest), die jeweils mit Alexa 700 (grün) gefärbt wurden. Balken: 1µm

bestimmt. Dabei verwendeten wir einen von uns selbst geschriebenen Algorithmus, um ein möglichst vollständiges, zweifarbiges SD-dSTORM-Bild der Probe herzustellen. In Abbildung 1 ist die Streuung der Einzelmolekül-Aufenthaltsorte dargestellt, was erst dank der experimentellen optischen Auflösung des zweifarbiges SD-dSTORM-Systems möglich wurde. Die Analyse zeigt, dass die Aufenthaltsorte als vollständig eigenständige Punkte erscheinen – ein Beweis für die saubere Trennung der Farbkanäle.

Ergebnisse

Die Auflösungen für beide Kanäle bewegen sich mit 22 nm für Alexa 647 und 30 nm für Alexa 700 in einem Bereich, der bereits zuvor für Alexa 647 bei der Lokalisierungsmikroskopie erreicht wurde. Die Anwendbarkeit von SD-dSTORM in der Zellbiologie wurde durch das Abbilden von Objekten des subzellulären Bereichs verdeutlicht. Für jene Objekte ist bekannt, dass sie je nach verwendetem Zweitantikörper unterschiedlich ausgeprägte Formen und räumliche Verteilungsmuster zeigen. Ausgewählt wurden sogenannte fokale Adhäsionen (engl. örtliche Anhaftungen, focal adhesions) – große Proteinkomplexe in der Peripherie der Zelle – und Clathrin-überzogene Membranrübchen (clathrin-coated pits), 150 nm große, vesikuläre Objekte in der Nähe der Plasmamembran.

Beide befinden sich an jeweils verschiedenen Orten in der Zelle und überlagern darüber hinaus auch nicht das Mikrotubuli-Netzwerk. Daher sollten beide Strukturen als distinkte subzelluläre Objekte erscheinen. Die Zweifarben-SD-dSTORM stellt Mikrotubuli und fokale Adhäsionen (Abb. 2A) beziehungsweise Mikrotubuli und Clathrin-überzogene Membranrübchen (Abb. 2C) gut getrennt und hochaufgelöst dar. Der Kontrollversuch (Abb. 2B) zeigt Mikrotubuli, die sowohl mit Alexa 647 als auch mit Alexa 700 angefärbt wurden. Hier zeigt sich deutlich eine Übereinstimmung zwischen beiden Kanälen und aufgrund der hohen Auflösung

auch die heterogene Verteilung der Proben auf derselben Struktur, die mit normaler Mikroskopie nicht sichtbar wäre.

Ausblick

Unser Ansatz ist ein bedeutender Fortschritt hin zu einer benutzerfreundlichen vielfarbiges Einzelmolekül-Mikroskopie. Er kombiniert die Vorteile der rot strahlenden Carbocyanin-Farbstoffe mit dem Prinzip der spektralen Entmischung, um dSTORM effizient, verlässlich und schnell durchführen zu können. SD-dSTORM bietet die Möglichkeit, auch auf mehr als zwei Farben ausgeweitet zu werden. Dabei kommen andere, verwendete rote Farbstoffe wie Alexa 750 in Frage. Außerdem kann die Technologie mit jeder kommerziell erhältlichen Lokalisierungs-Software wie QuickPALM and rapidSTORM kombiniert werden. Auch für die Echtzeitverfolgung mit Hilfe von tag-Technologien wird SD-dSTORM in Zukunft häufiger mit Erfolg eingesetzt werden.

Literatur

- [1] Multi-color direct STORM with red emitting carbocyanines, *Biology of the Cell* (2012), DOI: 10.1111/boc.201100011.

Korrespondenzadresse

Dr. Jan Schmoranzner
Group Leader in Super-Resolution Microscopy and Cell Polarity
Freie Universität Berlin
Institut für Chemie und Biochemie
Takustraße 6
14195 Berlin
Tel.: +49-(0)30-838-56-822
Fax: +49-(0)30-838-56-908
janschmoranzner@fu-berlin.de
www.sfb958.de

www.laborwelt.de

Next Generation Sequencing

Your Partner of Choice for DNA Sequencing Projects



- Small to large projects
- Coordination & flexibility between the 3 technologies
- Extended customer support
- Bioinformatics

+41 71 722 83 33
genome@microsynth.ch
www.microsynth.ch

„Minimal invasive“ Methoden in der Kryo-ET

Jürgen M. Plitzko, Alexander Rigort, Felix J.B. Bäuerlein, Tim Laugks, Miroslava Schaffer, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Ein Bild sagt mehr als tausend Worte – das gilt auch in den Naturwissenschaften. Seit jeher sind dabei mikroskopische Techniken ein wesentliches Hilfsmittel zur Bildgewinnung. Das Ziel ist es, ein möglichst detailgetreues Bild vom lebenden Organismus zu erstellen, um Strukturen und deren Funktionen zu untersuchen. Bis heute bleibt der Traum, die Einzelheiten bis hin zu den molekularen Bausteinen herauszuvergrößern. Hierbei kommt der Elektronenmikroskopie eine besondere Bedeutung zu, da mit ihr – im Vergleich zu Lichtmikroskopen – Objekte abgebildet werden können, die mehrere hundert mal kleiner sind. Mit Hilfe der hier von uns vorgestellten Präparationsmethode, den fokussierten Ionenstrahlen (FIB, engl.: *focused ion beam*) kann man so dünne Proben erzeugen, dass nun auch elektronenmikroskopische Blicke ins Innere einer Zelle möglich sind. So können erstmals die Vorgänge innerhalb der Zelle mit hoher Auflösung dreidimensional dargestellt und analysiert werden.

Die Bildgebung mit Elektronen kann entweder mit Hilfe der Raster-Elektronenmikroskopie, (kurz REM oder SEM) oder der Transmissionselektronenmikroskopie (kurz TEM) erfolgen. Die Kehrseite der Medaille dieser hochauflösenden Methoden: Lebende Organismen und Zellen können nicht direkt im Hochvakuum bei einem konstanten ‚Bombardement‘ mit Elektronen untersucht werden. Spezielle Präparationsmethoden sind deshalb notwendig, um die delikaten und vor allem strahlenempfindlichen Strukturen in ihrer wässrigen Umgebung zu erhalten und im Besonderen für die TEM zugänglich zu machen. Um die nötige ‚Transparenz‘ für Elektronen zu erreichen, müssen Dünnschnitte angefertigt werden, da Elektronen nur eine sehr kurze Distanz in Materie zurücklegen können. Die Ultramikrotomie ist dabei die Präparationsmethode der Wahl, um mechanisch Schnitte mit Dicken von ca. 50-500 Nanometern anzufertigen. Jedoch können diese ‚invasiven‘ Prozeduren zu massiven Strukturveränderungen der zu

untersuchenden Objekte führen und somit die erreichbare Auflösung im TEM einschränken.

Um biologische Objekte, wie beispielsweise Makromoleküle und Molekülkomplexe, innerhalb der Zelle in ihrer natürlichen wässrigen Umgebung sichtbar zu machen und zu charakterisieren, müssen Verfahren angewendet werden, die jegliche Strukturveränderungen ausschließen. Kryo-Präparationsverfahren ermöglichen es heute, den hohen Wasseranteil (> 70 %) von Zellen und Geweben aufrechtzuerhalten. Dies gelingt durch schockartiges Einfrieren der Proben innerhalb von Millisekunden auf -190°C . Die Wassermoleküle kristallisieren so nicht, und es bildet sich ein glasartiges (amorphes) Eis. Dieser Vorgang der Vitrifizierung erlaubt es, wenige Mikrometer dicke biologische Präparate einzufrieren. Für größere Objekte sind Hochdruckverfahren (‚high-pressure freezing‘) notwendig, die die Einfriertiefe nahezu verzehnfachen. Letzteres Verfahren erfordert die Anfertigung von

Dünnschnitten unter Kryo-Bedingungen (d.h. $< -140^{\circ}\text{C}$), um den vitrifizierten Zustand der Probe zu erhalten. Beim mechanischen Schneiden hochdruckgefrorener Proben treten ebenfalls irreversible Veränderungen auf, die eine Interpretation der anschließenden Strukturen in den mikroskopischen Aufnahmen erschwert.

Für die Mikroskopie mit vitrifizierten biologischen Präparaten bei Temperaturen unterhalb von -140°C wird üblicherweise der Präfix ‚Kryo‘ vorangestellt, wie beispielsweise bei der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie, kurz Kryo-EM. Neben der bestmöglichen Bewahrung biologischer Strukturen durch Vitrifizierung lassen sich zudem Strahlenschäden bei tieferen Temperaturen verringern.

3D-Bild aus Elektronentomogrammen

In der Elektronenmikroskopie an biologischen Proben spielt die Kryo-Elektronentomographie (kurz Kryo-ET) eine herausragende Rolle – denn selbst relativ dünne, durchstrahlbare Präparate haben eine räumliche Dimension, das heißt, die resultierenden TEM-Bilder sind nur zweidimensionale (2D-) Repräsentationen (Projektionen) einer dreidimensionalen Probe. Einzelheiten aus unterschiedlichen Ebenen innerhalb eines Objekts werden in einem Bild überlagert und lassen sich so in einer einzelnen 2D-Aufnahme nicht trennen. Ähnlich wie in der medizinischen Diagnostik werden tomographische Verfahren auf schockgefrorene Präparate angewendet, um dieses ‚Durcheinander‘, welches durch die Überlagerung struktureller Einzelheiten entsteht, zu beseitigen. Bei der ET wird die Probe in kleinen Winkelschritten durch den senkrecht dazu einfallenden Elektronenstrahl gedreht und für jeden Kippwinkel ein 2D-Bild aufgezeichnet. Durch anschließende Rekonstruktion dieser Serie von Projektionen lässt sich ein 3D-Bild des untersuchten Objekts erhalten. Nicht-‚invasive‘ Untersuchungen lassen sich mit Hilfe der Kryo-ET an kleineren

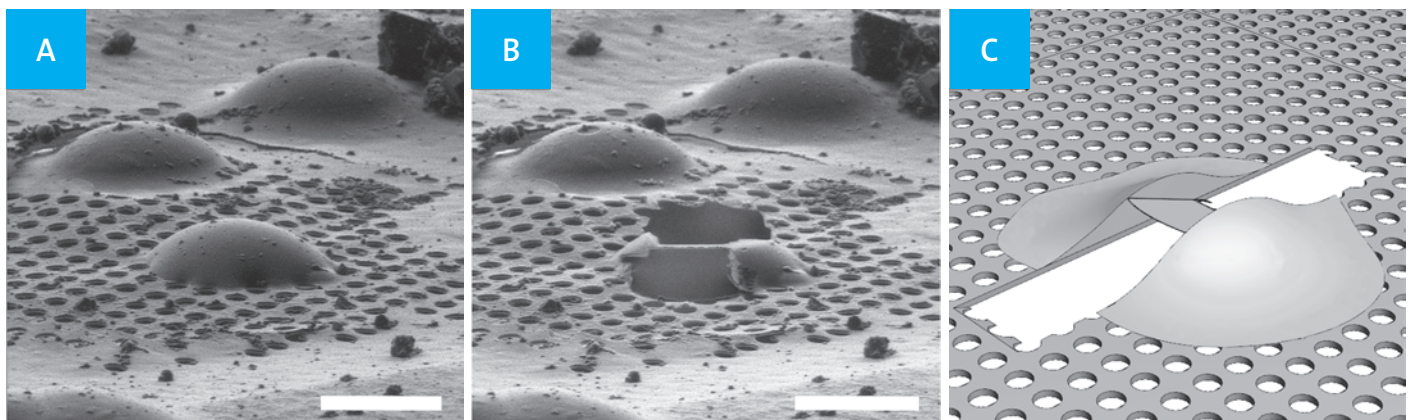


Abb. 1: Raster-Elektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen einer Kryo-FIB-Präparation (a) Vitrifizierte eukaryotische Zellen auf einem EM-Grid für die Elektronenmikroskopie mit regelmäßigen, löchrigem Kohle-Film (Maßstab 10 μm , Löcher der Kohlefolie 2 μm), (b) Zelle aus (a), Lamelle nach der Präparation mit dem Ionenstrahl-Mikroskop, (c) Schematische Ansicht der präparierten Zell-Lamelle aus (b)

– und vor allem dünneren – Objekten wie prokaryotischen Zellen und isolierten Organellen direkt durchführen. Auch flache Randbereiche eukaryotischer Zellen sind direkt zugänglich, wenn diese eine Dicke von ca. 500 nm nicht überschreiten. Um dickere Präparate, vor allem ganze eukaryotische Zellen, Zellverbände oder gar Gewebe untersuchen zu können bedarf es geeigneter minimal-invasiver Präparationsverfahren, die zudem mögliche Strukturveränderungen und Artefakte vermeiden.

Dünne Proben dank Ionenstrahlen

Eine alternative Methode zum mechanischen Schneiden von größeren Objekten bietet das Ionenstrahl-Mikroskop (kurz FIB: ‚Focused Ion Beam‘). Hauptsächlich wird dieses Instrument in der Halbleiterherstellung zur Oberflächenanalyse und -bearbeitung eingesetzt. Es vereint die Vorteile eines REM und eines Ionenmikroskops. Letzteres kann nicht nur zur Bildgebung, sondern auch für eine gezielte Materialbearbeitung im Nanometerbereich verwendet werden. Schwere, große Ionen wie Gallium besitzen eine höhere Wechselwirkung und schießen förmlich einzelne Probenatome heraus. So ‚fräsen‘ sie sich (kontrolliert und schonend) Schicht für Schicht in das Probenmaterial, bis letztlich eine elektronentransparente Lamelle übrigbleibt. Neben der Vermeidung jeglicher mechanischer Interaktion, Schneidartefakten und den damit verbundenen Struktur-Veränderungen ergibt sich ein weiterer Vorteil dieser Methode: Zu jedem Zeitpunkt lässt sich dieser ‚Fräs‘-Prozess mit dem REM beobachten und damit gegebenenfalls korrigieren. Um empfindliche, eiseingebettete biologische Proben für dieses Verfahren zugänglich zu machen waren Neu- und Weiterentwicklungen methodischer und instrumenteller Art notwendig. Vor allem die restriktiven Temperaturbedingungen – die Probe darf nicht wärmer als -140°C werden – und die immanente Strahlenempfindlichkeit des biologischen Probenmaterials erforderten neue Konzepte.

Ein spezieller Kühlkörper und ein eigens dafür gebauter dreh- und kippbarer Probenhalter/Tisch bildeten die Grundlage, um die ersten ‚Fenster‘ in das Innere von Zellen zu öffnen. Der Kühlkörper selbst ist das Produkt einer weiteren neuartigen dreidimensionalen Fertigungstechnik, dem schnellen Modellbau, dem sogenannten ‚3D rapid-prototyping‘ (ein laserbasiertes dreidimensionales Druckverfahren). Mit herkömmlichen feinmechanischen Produktionsverfahren wäre dieser Kühlkörper nicht realisierbar gewesen.

Da das Ionen-‚fräsen‘ oder ‚dünnen‘ direkt auf einem TEM-Probenhalter (mit einer hauchdünnen löchrigen Kohlefolie belegtes Metall-Netzchen, welches auch EM-Grid genannt wird) stattfindet, ist es notwendig, den Ionenstrahl unter sehr flachen Einfallswinkeln

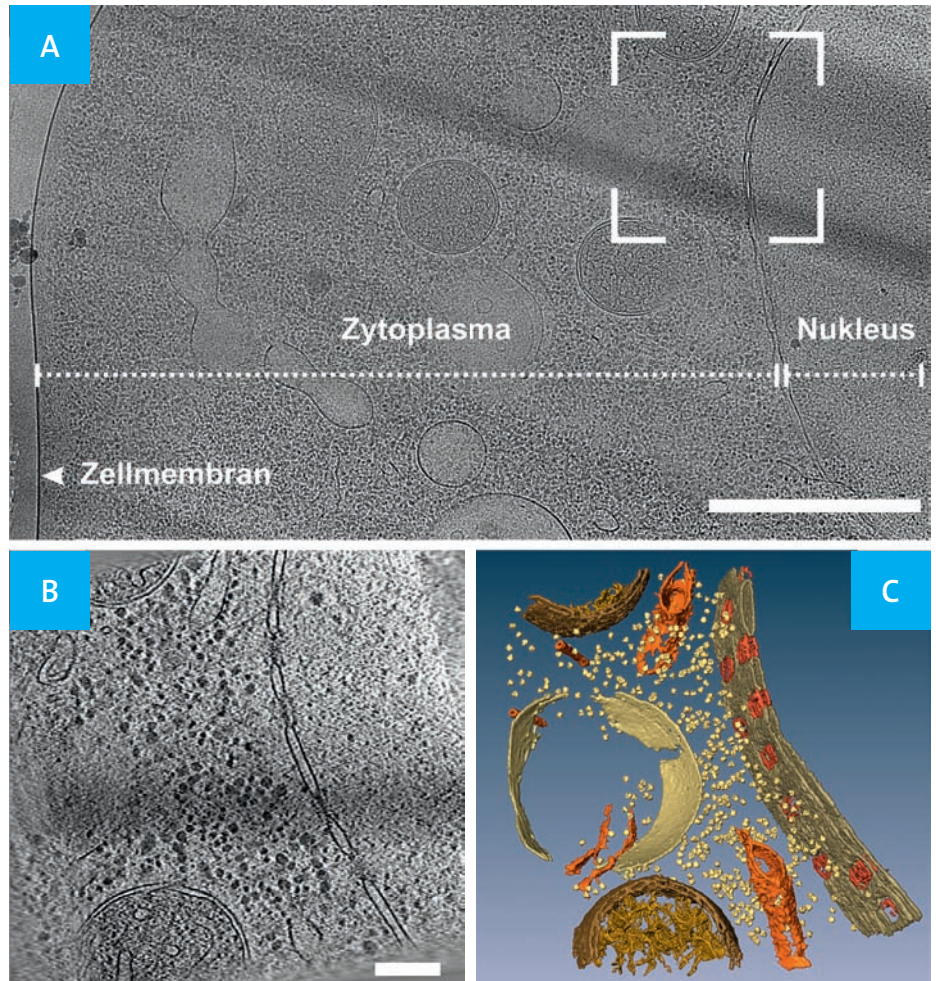


Abb. 2: Kryo-Transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) und -tomographische Aufnahmen einer FIB-präparierten Zelle: (a) Übersicht über das gesamte ‚Fenster‘ im Inneren der Zelle (Maßstab 1 μm) mit Zellkern und dem gesamten Zytoplasma bis hin zur Zellmembran, (b) Bereich aus (a), aus dem ein Tomogramm erstellt wurde (Maßstab 200 nm), (c) schematische Darstellung des Tomogramms aus (b) mit einem Teil des Zellkerns (grau-braun) samt Kernporen (rot) sowie Mitochondrien (braun), Ribosomen (gold-gelb) und Mikrotubuli (orangefarbene Röhrrchen)

auf das Präparat auftreffen zu lassen – ohne entsprechende Kippung und Drehung des Probenstückes eine nicht zu lösende Aufgabe. Zudem gewährleistet der ‚streifende Einfall‘ des Ionenstrahls eine minimale Strahlenbelastung für die entstehende Lamelle im Inneren der eiseingebetteten Zelle (Abb. 1). Sind die richtigen Voraussetzungen geschaffen, ist das eigentliche Ionenstrahl dünnen fast ein Kinderspiel. Jedoch müssen die Präparationsparameter, wie etwa die Verweilzeit des Ionenstrahls, Stärke des Ionenstroms und die Geschwindigkeit der Ionen, je nach Dicke und Beschaffenheit des Probenmaterials experimentell bestimmt und angepasst werden. Die Herstellung einer Lamelle dauert weniger als eine Stunde. Typischerweise werden bis zu 5-10 Probenbereiche pro EM-Grid so erschlossen. Die fertigen Präparate können anschließend ins Kryo-EM transportiert und mit Hilfe der ET untersucht werden. Dieser ‚Transport‘ ist ein weiterer kritischer Schritt, weil er unter Kryo-Bedingungen erfolgen muss.

Fazit

Mit Hilfe dieser neuen Methode ist es nun möglich, gezielt und vor allem reproduzierbar ‚Fenster‘ ins Innere von Zellen zu öffnen. In Kombination mit der Kryo-Elektronentomographie lassen sich nun Vorgänge innerhalb der Zelle mit hoher Auflösung dreidimensional darstellen und analysieren (Abb. 2). Diese detaillierten Einblicke in bisher unzugängliche molekularen Landschaften im Zellinneren eröffnen neue Ansätze für die Forschung und erweitern unser Verständnis der fundamentalen Prozesse des Lebens.

Korrespondenzadresse

Dr. Jürgen M. Plitzko, Projektleiter TEM
Abteilung Molekulare Strukturbiologie
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried

Hochaufgelöste *in vivo* 3D-Zeitserien mittels SIM

Dr. Reto Fiolka, Howard Hughes Medical Institute, Janelia Farm Research Campus, Ashburn, USA

Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (engl. structured illumination microscopy, SIM) kann die räumliche Auflösung eines Mikroskops verdoppeln. Die Methode ist sehr lichteffizient, aber bisherige Umsetzungen dieser Technik waren zu langsam, um Zellen live in 3D beobachten zu können. Dank neuer elektro-optischer Modulatoren und schneller Kameras ist es nun Forschern um Mats Gustafsson gelungen, 3D-Zeitserien von lebendigen Zellen in verschiedenen Farben mit verdoppelter Auflösung aufzunehmen.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein unerlässlich Instrument in der Biologie und den Lebenswissenschaften, da sie minimal-invasive, dreidimensionale Abbildungen von lebendigen Zellen in ihrer natürlichen Umgebung ermöglicht. Die Einführung von Fluoreszenz-Markern, allen voran GFP, führte zu molekularer Spezifität und ermöglichte somit das „Einfärben“ von verschiedenen Organellen und anderen Zellstrukturen mit extrem hohem Kontrast.

Unglücklicherweise ist das räumliche Auflösungsvermögen von optischen Mikroskopen stark eingeschränkt. Ernst Abbe bewies 1873,

dass zwei Punkte, die näher als $\lambda/(2 NA)$ nebeneinander liegen, nicht mehr unterscheidbar sind. λ ist dabei die Wellenlänge des Lichtes und NA die Numerische Apertur des Objektivs.

Abbes Diktum umgangen

Allerdings hat Abbe nicht die Fluoreszenzmikroskopie berücksichtigt, sondern nur die Transmissions- oder Reflexionsmikroskopie. Fluoreszenz-Emissionen sind proportional zur Intensität des Anregungslichts. Regt man

eine Probe mit „Flutlicht“ uniform an, dann resultiert in der Tat eine begrenzte Auflösung gemäß Abbe. Allerdings kann man das Anregungslicht auch formen und ihm eine Struktur geben. Konfokale Mikroskopie ist ein gutes Beispiel dafür: Die Anregungsstruktur ist ein fokussierter Laserstrahl. Zusammen mit einer Lochblende (engl. pinhole) ergibt sich schließlich eine höhere dreidimensionale Auflösung. Um die Jahrtausendwende demonstrierte Mats Gustafsson auf beeindruckende Weise, dass eine sinusoidale, stehende Welle als Anregungsstruktur noch höhere Auflösungen ermöglicht – die strukturierte Beleuchtung (engl. structured illumination) war geboren. Beim Einsatz der Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM) wird die Probe mit einem sehr feinen sinusoidalen Streifenmuster angeregt und dabei ein Bild aus der resultierenden Fluoreszenz-Emission aufgebaut. Die Streifen kodieren dabei räumliche Informationen der Probenstruktur, die mit normaler Mikroskopie nicht auflösbar sind. Mit geeigneten Streifenmustern lässt sich die Auflösung eines Mikroskops in allen drei Dimensionen um den Faktor 2 erhöhen¹. Dies resultiert in einer Auflösung von lateral (in x,y-Richtung) 110 nm, axial (in z-Richtung) 360 nm für grüne Emissionen². Der Preis für die erhöhte Auflösung ist allerdings, dass für die dreidimensionale, strukturierte Beleuchtung pro Fokusebene 15 Bilder mit unterschiedlichen Positionen des Streifenmusters aufgenommen werden müssen.

SIM – die Vorteile

Dies war auch lange Zeit ein Grund, dass strukturierte Beleuchtung nur für fixierte Zellen eingesetzt wurde, für das „Live imaging“ waren die experimentellen Mikroskope schlicht zu langsam. Allerdings blieb das Interesse groß, strukturierte Beleuchtung auch für lebendige Zellen einzusetzen. Im Vergleich zu anderen supraauflösenden Techniken bietet sie nämlich einige Vorteile:

- I Sie ist sehr effizient in der Beleuchtung und bei der Detektion von Fluoreszenz und kann daher auch bei einer sehr geringen Laserleistung zum Einsatz kommen. Das ist insofern wichtig, als dass die Zellen so in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden.
- I Es werden keine speziellen Fluorophore benötigt. Alle Fluorophore, die in normaler Weitfeld- oder Konfokalmikroskopie funktionieren, sind auch für die strukturierte Beleuchtung geeignet.
- I Im Gegensatz zur konfokalen Mikroskopie, bei welcher ein Laserpunkt durch die Probe geleitet wird, werden bei der strukturierten Beleuchtung viele Probenpunkte parallel gesannt. Auch die Detektion erfolgt parallelisiert. Mit den neuen SCMOS-Kameras (komplementärer Metalloxid-Halbleiter, engl. scientific complementary metal oxide

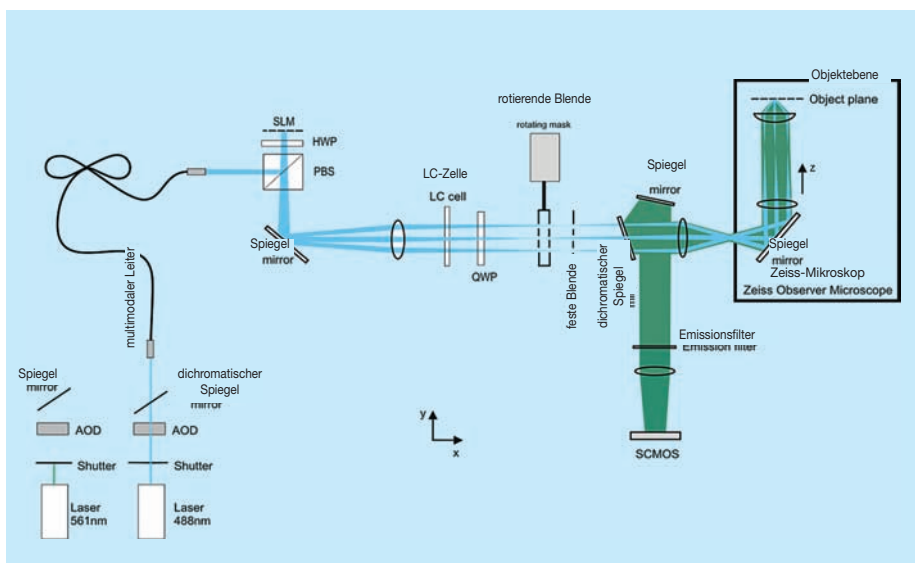


Abb 1: Experimenteller Aufbau für 3D-live-SIM. Laserlicht wird in einem multimodalen Leiter „gescrambelt“ und mit einer Linse kollimiert. Der Laserstrahl scheint auf das SLM-Display, auf welchem ein Streifenmuster dargestellt wird. Das Licht wird durch Beugung in mehrere Ordnungen reflektiert. Die Beugungsordnungen 0, 1 und -1 werden aufgefangen. Eine LC-Zelle wird eingesetzt, um die Polarisation der Laserstrahlen zu kontrollieren. Die drei Laserstrahlen werden in die Aperturbene eines Objektivs fokussiert und interferieren in der Objektebene. Die Fluoreszenz-Emission wird mit einem dichromatischen Spiegel gefiltert und auf einer Kamera abgebildet. Abkürzungen: AOD – Akustooptischer Deflektor, SLM – räumlicher Licht-Modulator (Spatial Light Modulator), LC-Zelle – Flüssigkristallzelle, QWP – lambda-viertel-Platte (Quarter Wave Plate), HWP – lambda-halbe-Platte (Half Wave Plate), PBS – Polarisationsplitter (Polarizing Beam Splitter), SCMOS – wissenschaftliche (scientific) CMOS-Kamera

Neu: www.laborwelt.de

Die nächste Generation digitaler Labor-Nachrichten: Komplett neues Design, viele zusätzliche Funktionen – die ideale Kombination aus Spaß und Information für die kurzen Pausen im Laboralltag! Nachrichten, Journal Club und Presseschau. Dazu Themendossiers zu neuesten Methoden, Techniken und Geräten. Erweitern Sie Schritt für Schritt das eigene Know-how und lernen Sie die Szene von ihrer unterhaltsamen Seite kennen – mit Videos und Fundstücken aus dem Netz.

www.laborwelt.de



- **Kostenloser eNewsletter**
Regelmäßig alle Neuigkeiten im Überblick
- **Aktuelle Nachrichten**
Neuigkeiten aus dem Labor und der Welt
- **Top Produktvideos**
Innovative Firmen und neueste Produkte
- **Presseschau**
Unterhaltsame Lesetipps zum Stöbern im Netz
- **Journal-Club**
Internationale Fachartikel im Überblick
- **Themendossiers**
Die informativen Themenschwerpunkte aus unserer Fachzeitschrift
- **Mehrere Videokanäle**
Etwas für jeden - unterhaltsam und informativ
- **Jobangebote**
Topaktuelle Stellenanzeigen aus den Bereichen Biotechnologie und Forschung
- **Firmen im Fokus**
Die wichtigsten Player, ihre Strategien und Geschäfte im Labormarkt
- **Blogs**
Einblick in die Welt der Wissenschaftsblogger - mit Ranking
- **Terminkalender**
Aktuelle Veranstaltungen und Konferenzen zum Thema Life Sciences

semiconductor) mit 5 Megapixeln können mittels strukturierter Beleuchtung extrem große Bildfelder in hoher Bildfolge aufgenommen werden.

Aufbau des Experiments

Um strukturierte Beleuchtung für das live imaging einsetzen zu können, haben wir ein Mikroskop mit extrem schnellen, elektrooptischen Wandlern und einer schnellen sCMOS-Kamera entwickelt (Abb. 1)². Dabei werden auf einem Display, ähnlich denen in einem Fernseher oder Projektor (nur etwas schneller), die Streifenmuster in schneller Folge abgespielt und mittels verschiedener Laserquellen in die Objektebene des Mikroskopes projiziert. Die Umschaltzeit beträgt hierbei weniger als eine Millisekunde. Somit ist es nun möglich, ein Volumen von 100 x 100 x 1 Mikrometer in weniger als einer Sekunde aufzunehmen. Um einen zweifarbigen Datensatz aufzunehmen, muss dieser Vorgang wiederholt werden, da für unterschiedliche Anregungswellenlängen unterschiedliche Streifenmuster auf dem Display abgespielt werden müssen. Eine Mehrfarben-Aufnahme ist daher immer seriell.

In Abbildung 2 ist eine dreidimensionale Projektion maximaler Intensität (engl. maximum intensity projection) eines Datensatzes einer HeLa-Zelle abgebildet. Dabei wurde das Aktin-Skelett mit dem Fluoreszenz-Marker tdTomato rot und die Clathrin-überzogenen Vesikel (engl. Clathrin-coated vesicles, CCV) mit mEmerald grün eingefärbt. Abbildung 3 zeigt eine Zeitserie von einer HeLa-Zelle. Hier wurde abermals das Aktin-Zellskelett mit TdTomato eingefärbt und darüber hinaus die Mitochondrien mit MitoTracker Green. Es sind wieder dreidimensionale Projektionen der Datensätze dargestellt. Mit der erhöhten Auflösung von 3D-SIM lassen sich interne

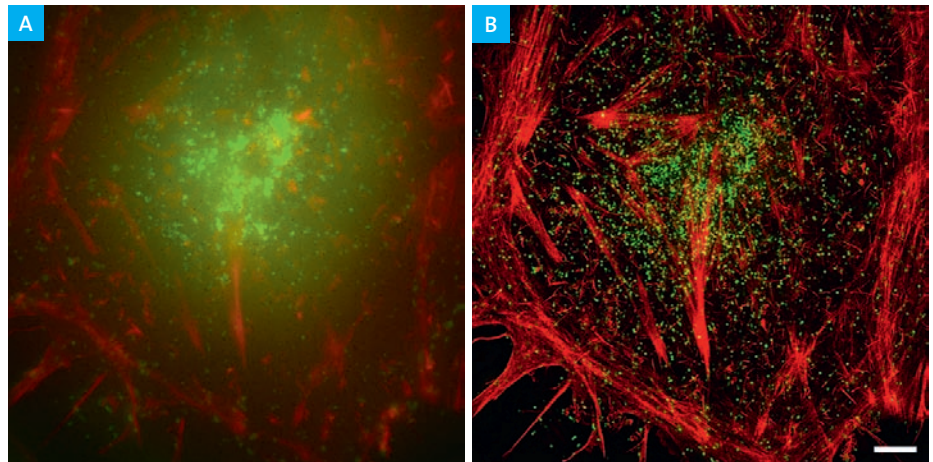


Abb 2: Aktin-Zellskelett (rot) und mit Clathrin überzogene Vesikel (CCV, grün) in einer HeLa-Zelle, abgebildet mit klassischer Weitfeldmikroskopie (a) und Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (b). Farbstoffe: Lifeact-tdTomato zur Visualisierung von F-Aktin, Clathrin-mEmerald zur Visualisierung von CCV. Maßstabsleiste: 5 Mikrometer.

Strukturen der Mitochondrien „live“ verfolgen. Diese Strukturen sind zum Beispiel innere Membranen, die sogenannten „Christae“. Normalerweise sind Christae nur unter dem Elektronenmikroskop zu sehen, allerdings ist dies dann alles andere als „live“.

Momentan können solche dreidimensionalen Abbildungen von ganzen, lebendigen Zellen nur mit strukturierter Beleuchtung in hoher Auflösung live aufgenommen werden. Andere Techniken mögen zwar noch höhere Auflösungen erreichen, sind aber entweder deutlich langsamer oder nicht in der Lage, solch große Bildfelder abzudecken wie die hier vorgestellte Methode^{3,4}. Durch die geringe Laserstrahlung bei strukturierter Beleuchtung werden die Zellen auch insgesamt weniger in ihrer Funktion beeinträchtigt. Außerdem werden die Farbstoffe langsamer ausgebleicht. Dadurch kann die Zelle über sehr lange Zeit beobachtet werden, andere Techniken bleichen die Zellen hingegen bis

zu zehnmal schneller aus. So konnten beispielsweise bis zu 100 aufeinander folgende Aufnahmen einer lebenden Zelle gemacht werden, wobei eine Aufnahme aus 360 bis 720 Einzelbildern besteht.

Fazit

Die Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung stellt damit einen guten Kompromiss zwischen räumlicher und zeitlicher Auflösung dar. Biokompatibilität, eine hohe Aufnahmerate, ein großes Bildfeld und minimale Laserbestrahlung – alles Qualitäten, die benötigt werden, um Zellen live zu beobachten. Wir glauben daher, dass SIM eine wichtige Rolle in der Biologie spielen wird und dabei helfen kann, wichtige Fragestellungen zu beantworten.

Literatur

- [1] Gustafsson M.G.L., et al, Three-Dimensional Resolution Doubling in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination, *Biophysical Journal*, Volume 94, Issue 12, pp 4957-4970, 2008
- [2] Fiolka R., Time-lapse two-color 3D imaging of live cells with doubled resolution using structured illumination *PNAS* 109 (14) pp 5311-5315, 2012
- [3] Jones SA, et al, Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat Methods* 8:499-508, 2011
- [4] Westphal V, et al, Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science* 320 pp 246-249, 2008

Korrespondenzadresse

Dr. rer. nat. Reto Fiolka
Howard Hughes Medical Institute
Janelia Farm Research Campus
19700 Helix Drive
20147 Ashburn, Virginia, USA
Tel.: +1-(0)571-209-4000-3027
fiolka@janelia.hhmi.org

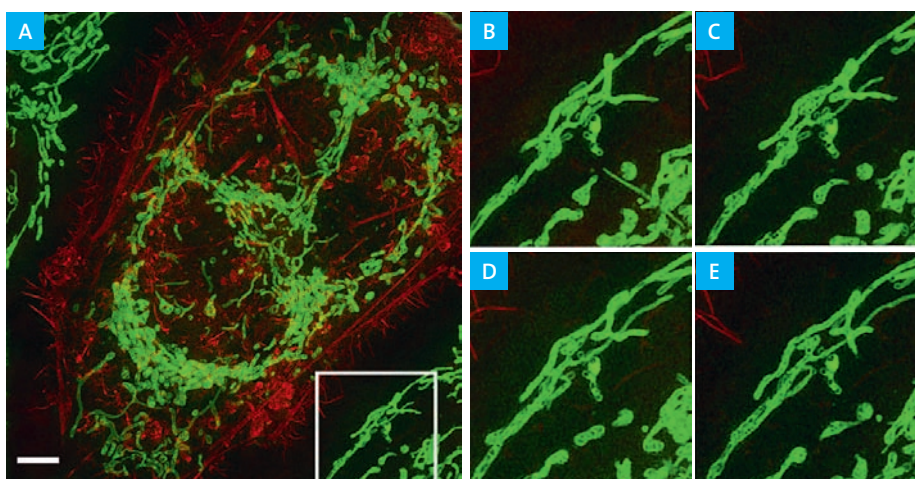


Abb 3: Aktin-Skelett (rot) und Mitochondrien (grün) in einer HeLa-Zelle abgebildet mit strukturierter Mikroskopie (a). Zeitserie (b – e) des mit dem weißen Quadrat umrahmten Ausschnittes in (a). Farbstoffe: Lifeact-tdTomato zur Visualisierung von F-Aktin und MitoTracker Green zur Visualisierung von Mitochondrien. Maßstabsleiste: 5 Mikrometer.

Zellvorgänge steuern mittels Optogenetik

Prof. Dr. Thomas G. Oertner, Dr. Rolf T. Borlinghaus

Die Optogenetik ermöglicht das schnelle und gezielte Steuern von biologischen Vorgängen. Dabei kann es sich bei dem Untersuchungsgegenstand um Zellen in Kultur oder gar um sich frei bewegende Tiere handeln. Das An- und Ausschalten dieser Vorgänge mit Hilfe von durch Licht steuerbaren Proteinen hat das Feld der nicht-invasiven Funktionsanalyse revolutioniert. Besonders große Fortschritte wurden bei der Kontrolle von Neuronen erzielt, so zum Beispiel mit Channelrhodopsin (ChR), Bakteriorhodopsin oder Halorhodopsin. Aber auch über die Neurowissenschaften hinaus gewinnt die Optogenetik an Bedeutung. Mittlerweile gibt es optogenetische Werkzeuge unter anderem für Gliazellen, Muskelzellen oder embryonale Stammzellen. In unserem Expertenpanel wird diskutiert, welche Möglichkeiten die immer größer werdende Zahl verschiedener optogenetischer Werkzeuge für die Planung von Experimenten bietet. Außerdem werden die aktuellen Entwicklungen im Bereich der Optogenetik-Mikroskopie vorgestellt.



Thomas Oertner
Direktor des
Instituts für Synap-
tische Physiologie
(ISP) am Zentrum
für Molekulare
Neurobiologie
Hamburg (ZMNH)

LABORWELT

Welche Möglichkeiten und Vorteile bieten zwei oder gar mehrere gekoppelte licht-aktivierbare Membranproteine?

Oertner

Um den Einfluss einer bestimmten Population von Nervenzellen auf das neuronale Netzwerk zu verstehen, ist es oft notwendig, die Aktivität dieser Neurone in positiver (d.h. Aktivierung) als auch in negativer Richtung (d.h. Hemmung) zu beeinflussen. Man möchte in ein- und derselben Population Aktionspotentiale künstlich auslösen und spontane Aktionspotentiale unterbinden können. Da uns mittlerweile sowohl de- als auch hyperpolarisierende optogenetische Wandler zur Verfügung stehen, kommt es nun darauf an, mehrere lichtgesteuerte Ionenkanäle oder Pumpen gemeinsam zu exprimieren.

Eine deutliche Verbesserung gegenüber der bekannten IRES-Strategie (interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. *internal ribosomal entry site*) brachte die Entdeckung viraler *self-cleaving* Sequenzen, die es erlauben, von einer mRNA zwei getrennte Proteine zu produzieren. Die vielleicht sicherste Methode ist die direkte Kopplung zweier optogenetischer Wandler über einen flexiblen Linker, der eine Transmembrandomäne enthält. In der Praxis muss es möglich sein, den de- und hyperpolarisierenden Wandler eines solchen Tandemkonstrukts selektiv zu aktivieren, d.h. die Aktivierungs-

spektren sollten möglichst wenig überlappen. Außerdem müssen die Photoströme ausreichend groß sein, um endogene (synaptische) Ströme komplett dominieren zu können.

Neben der Netzwerkanalyse haben Tandemkonstrukte noch ein zweites Anwendungsgebiet: Bei der Entwicklung verbesserter optogenetischer Werkzeuge ist es oft erforderlich, die neuen Konstrukte mit gut charakterisierten „Standards“ zu vergleichen. Tandemkonstrukte ermöglichen stöchiometrische Expression und erlauben dadurch einen direkten Vergleich der Performance, der nicht durch Unterschiede im Expressionsniveau verfälscht werden kann. Eine interessante Entwicklungsrichtung für die Zukunft wäre die Kombination von Wandlern und Sensoren, wie zum Beispiel einem GFP-basierten Kalziumreporter. Die rasante Entwicklung multispektraler, LED-basierter Lichtquellen wird komplexe optogenetische Experimente für viele Labore noch attraktiver machen.



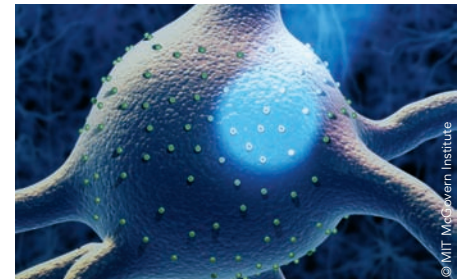
Rolf Borlinghaus
Scientific Advisor
bei Leica Microsys-
tems, Mannheim

LABORWELT

Welche Beleuchtungs- und Aufnahmetechnologien werden die Optogenetik in den nächsten Jahren voranbringen?

Borlinghaus

Um lichtgesteuerte Proteine zu aktivieren, bedarf es Licht von passender Farbe. Wie in vielen anderen Bereichen, ist eine deutliche



Optogenetik: Blaues Licht regt den Ionenkanal ChR2 an und aktiviert Nervenzellen.

Verbreiterung der Farbpalette bei den in der Optogenetik eingesetzten Proteinen zu erwarten. Darum wird das gesamte sichtbare Spektrum zwischen 400nm und 800 nm zu bedienen sein. Für Weitfeld-Geräte, also „gewöhnliche“ Mikroskope und Stereomikroskope sind zur Zeit Lichtemissionsdioden (LEDs) im Trend. Diese Quellen sind kompakt und intensiv. LEDs haben gegenüber klassischen Lichtquellen viele Vorteile, z.B. einfache Kollimation, schnelle Schaltzeiten, vergleichsweise geringe Abwärme und eine lange Lebenszeit. Hier wird in den nächsten Jahren sicher noch einiges an Entwicklungspotential ausgeschöpft werden.

Die Alternative zum Weitfeld sind Raster-Geräte. Insbesondere bekannt durch die konfokale Mikroskopie, wo zu einer Zeit immer nur ein Punkt beleuchtet wird, der möglichst klein (beugungsbegrenzt) sein soll. Für solche Anwendungen sind Laser nach wie vor die besten Quellen, da sie die höchste Leuchtdichte bieten und perfekt fokussierbar sind. Die Verbindung hochenergetischer Infrarot-Pulslaser mit einem Substrat zur Erzeugung eines sehr breiten Spektrums, etwa einer Faser mit einem Matrix-Kern (*photonic crystal fiber*), haben in der jüngsten Zeit den Traum einer weißen Quelle mit Lasereigenschaften Wirklichkeit werden lassen (*WLL: white light laser*). Solche Systeme können in Zusammenarbeit mit akustooptisch abstimmbaren Filtern (AOTF) jede beliebige Farbe des sichtbaren Spektrums erzeugen, wobei gleichzeitig mehrere Spektralfarben ausgewählt werden können – und die Auswahl in ein paar Mikrosekunden umgeschaltet werden kann. Das kann insbesondere für schnell synchronisierte Belichtungsmuster von unterschiedlichen lichtgesteuerten Proteinen sehr interessant werden.

Für Experimente mit lebenden Säugetieren werden Mikroskope eingesetzt, die über einen stabilen Tisch verfügen, auf dem die Tiere gut montiert werden können. Die Fokussierung muß dann über das Objektiv erfolgen, da das Untersuchungsobjekt oft mit allerlei Mikroelektroden verdrahtet ist, und dann nicht mehr bewegt werden kann. Hier sind vielfältige Neuerungen, sowohl in der optischen Fokussierung als auch bei Halterung und Versorgung des Objektes zu erwarten. Hinzu kommt der vermehrte Einsatz von Lichtleitern in Hirn- und Gewebesonden, die üblicherweise mit Lasern oder LEDs gespeist werden.

Scharfer Blick ins Gehirn lebender Mäuse

Berning S, Willig KI, Steffens H, Dibaj P, Hell SW. (2012): Nanoscopy in a Living Mouse Brain. *Science*, Vol. 335 no. 6068 p. 551, doi: 10.1126/science.1215369

Zum ersten Mal kann man Prozesse am lebenden Gehirn mit einer Auflösung von weniger als 70 Nanometern beobachten. Dabei war der Sprung von den Hirnschnitten zum Cortex laut Stefan Hell technisch gesehen gar nicht einmal so dramatisch. Der Wert der hier vorgestellten Publikation sei viel mehr, dass eine psychologische Barriere durchbrochen worden ist. LABORWELT sprach mit Hell aber auch über die Grenzen der STED (*stimulated emission depletion*)-Mikroskopie.

LABORWELT:

Was zeichnet die STED-Mikroskopie aus?

Hell:

Mit dem STED-Mikroskop kommt man über die Beugungsgrenze des Lichts hinaus und kann so detaillierter mikroskopieren. Über mehr als 1.000 Jahre war die Auflösungsgrenze bei einem Lichtmikroskop und dadurch inhärent auch bei einem Fluoreszenzmikroskop fundamental begrenzt auf etwa 200 nm. Zwar gab es viele Ideen, diese Grenze zu durchbrechen, aber bei einem fokussierenden Mikroskop ist man in der Praxis letztendlich nicht über 200 bis 150 nm hinausgekommen. Die STED-Mikroskopie war das erste Verfahren, das – in Konzept und Praxis – gezeigt hat, dass man deutlich über die Beugungsgrenze hinauskommt und Auflösungen auf Molekülgröße erreicht. Sie hat im Gegensatz zu anderen Konzepten das Fluoreszenzmolekül ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Anfang der 90er Jahre herrschte die Vorstellung, dass man die Beugungsgrenze erhöhen könne, wenn man das Licht selbst in seiner Ausbreitung einschränkt, indem man es durch eine winzige Spitze einer gezogenen Faser zwingt. Diese Nahfeldmikroskope funktionieren in den Materialwissenschaften an Probenoberflächen ziemlich gut. Innerhalb eines transparenten Materials wie der Zelle ist sie hingegen kaum realisierbar – schon gar nicht in einer lebenden Zelle oder in 3D. Bei der STED-Mikroskopie bleiben die Lichtwellen, was sie sind. Die Unterscheidung eng benachbarter Strukturen erfolgt über die Fluorophore. Im Falle zweier Mikrotubuli sorgt man beispielsweise dafür, dass die eine Struktur nicht leuchtet, wenn die andere leuchtet – und umgekehrt. So können die beiden Strukturen voneinander unterschieden werden.

LABORWELT:

Was war Stand der Technik vor der Entwicklung der *in vivo*-STED-Mikroskopie?

Hell:

Auch am lebenden Gehirn betrug die höchste erreichte Auflösung 300 nm. Dieser Wert wurde mit der 2-Photonen-Mikroskopie erreicht.

LABORWELT:

Wie schwierig war der Schritt vom Gehirnschnitt zur lebenden Maus?

Hell:

Das wohl Schwierigste war, den Mut zu haben, das zu machen. Technisch gesehen ist der Schritt gar nicht so groß. Die Maus muss gut anästhetisiert sein. Wir haben Herzschlag, Atmung und Blutfluss kontrolliert und ganz allgemein für ein stabiles System gesorgt. Alles in allem wurden dafür ganze vier Wochen investiert. Allerdings war die Methode bei uns schon an lebenden Gehirnschnitten etabliert. Bei Kollegen ohne das entsprechende Vorwissen war hingegen eine gewisse Skepsis verbreitet.

LABORWELT:

Was haben Sie im Maus-Cortex beobachtet?

Hell:

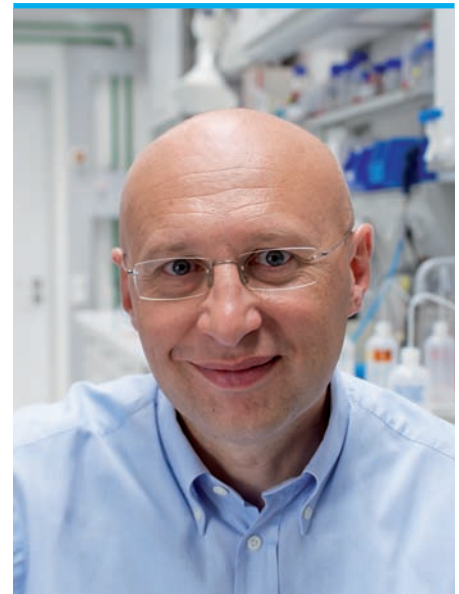
Es finden kleine morphologische Veränderungen im Gehirn der erwachsenen Maus statt. Die kleinen Fortsätze der Dendriten, die sogenannten Dornen, bewegen sich. Um auszuschließen, dass diese Bewegung nicht aufgrund eines sich ändernden Fokus zustande kommt, haben wir die Bilder in verschiedenen Ebenen aufgenommen und miteinander abgeglichen. Über die Art der Bewegung, die Frequenz und den Grund wissen wir allerdings noch gar nichts.

LABORWELT:

Wie könnte man die Technik noch verbessern?

Hell:

Der Einfachheit halber haben wir uns zunächst für ein sich frei im Zellplasma bewegendes Fluorophor entschieden. Das Protein ist abundant und man kann so die Zellplasmagrenzen gut erkennen. Momentan arbeiten wir mit angehefteten Fluorophoren, um auch nur an bestimmten Stellen vorhandene Proteine darzustellen. Das Potential ist immens.



Stefan Hell

Stefan W. Hell studierte ab 1981 Physik an der Universität Heidelberg und promovierte dort 1990. Danach ging er an das Heidelberger European Molecular Biology Laboratory. Von 1993 bis 1996 forschte er in Turku und Oxford. Seit der Habilitation in Physik 1996 in Heidelberg leitet er eine selbständige Nachwuchsgruppe am Göttinger MPI für biophysikalische Chemie, seit 2003 ist er Direktor am Institut. Hell erhielt etliche Preise, so etwa den Carl-Zeiss-Forschungspreis, den Berthold-Leibinger-Innovationspreis, den Helmholtz- und den Karl-Heinz-Beckurts-Preis.

Demnächst wird so die Proteinverteilung in den Dornen auf der Nanometerebene beobachtet werden können.

Die STED-Mikroskopie hat aber auch Grenzen, die von den Eigenschaften des Fluorophors abhängig sind. Dabei ist entscheidend, wie gut sich der Farbstoff an- und ausschalten lässt. Für STED gilt: Wenn ich das STED-Licht anmache, geht das Fluorophor automatisch sofort aus. Die sogenannte abregungsstimulierte Emission ist ein Prozess, der unter einer Femtosekunde abläuft. Etwas anders läuft das bei einer Weiterentwicklung unseres Labors, der RESOLFT-Mikroskopie (engl. reversible saturable optical (fluorescence) transitions), ab. Ein durch zwei, drei Mutationen schaltbar gemachtes Fluorophor kann durch photoinduzierte Isomerisierung ständig reversibel in einen leuchtenden und wieder zurück in einen nicht leuchtenden Zustand geschaltet werden. Diese Prozesse verlaufen langsamer und benötigen daher eine geringere Lichtleistung. Für die Beobachtung der Dornen ist das zwar nicht nötig, wenn man aber eine noch höhere Auflösung möchte, dann wird die RESOLFT-Mikroskopie interessant.

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
 Friesdorfer Str. 153
 53175 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



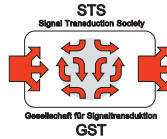
Netzwerk Nutrigenomik
 Arthur-Scheunert-Allee 114
 14558 Nuthetal
 Tel.: +49-(0)-33200-88-301
 Fax: +49-(0)-33200-88-541
 mail@nutrigenomik.de
 www.nutrigenomik.de

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

DiagnostikNet-BB



Netzwerk Diagnostik
 Berlin-Brandenburg e.V.
 Neundorfstraße 17
 16761 Henningsdorf
 Tel.: +49-(0)-3302-55-199-14
 Fax: +49-(0)-3302-55-199-10
 f.adams@diagnostiknet-bb.de
 www.diagnostiknet-bb.de

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

Verband der Diagnostica-Industrie e.V.



Verband der
 Diagnostica-Industrie e.V.
 Neustädtische Kirchstr. 8
 10117 Berlin
 Tel.: +49-(0)-30-200-599-40
 Fax: +49-(0)-30-200-599-49
 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
 Lützowstraße 33–36
 10785 Berlin
 Tel.: +49-(0)-30-2649-21-27
 Fax: +49-(0)-30-2649-21-11
 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

Danaher, der unbekannte Riese aus dem Markenzoo

Dr. Patrick Dieckhoff, BIOCUM AG

Milliardenschwere Übernahmen sind gang und gäbe im Labormarkt. Grund genug, in dieser LABORWELT-Serie einen Blick auf die Player, ihre Strategien und Deals zu werfen. Klar ist: Elefantenhochzeiten bleiben an der Tagesordnung. Die Preise bleiben hoch, genauso wie die Wahrscheinlichkeit, dass sich der Labormarkt in zehn Jahren völlig anders darstellen wird als heute. Der US-amerikanische Technologie-Spezialist Danaher hat bereits mehr als 400 Übernahmen abgewickelt. Vor fünf Jahren kaufte sich der Konzern in die Life Sciences ein. Bisheriger Höhepunkt: die Übernahme von Beckman Coulter. Wenn es nach CEO Larry Culp geht, war das jedoch nicht der letzte Streich.

Was haben Leica, AB Sciex und Beckman Coulter gemeinsam? Sie alle gehören zum Danaher-Konzern, der hierzulande kaum bekannt ist. Dabei machen die US-Amerikaner pro Jahr einen Umsatz von mehr als 16 Mrd. US-\$ und sind mit rund 35 Mrd. US-\$ an der Börse bewertet – ein Riese also, der Branchengrößen wie Thermo (Umsatz: 12 Mrd. US-\$, Marktkapitalisierung 20 Mrd. US-\$) oder Life Technologies (3,7 Mrd. US-\$/8 Mrd. US-\$) locker übertrumpft. In Internetforen wird Danaher schon als nächste General Electric gehandelt.

Life Sciences für den Mischkonzern

Genauso wie der US-Technologiekonzern ist Danaher ein echter Gemischtwarenladen. Zum Konzern gehören mehr als 400 Marken und Unternehmen. Darunter befinden sich vor allem in den USA bekannte Werkzeughersteller wie Armstrong oder Craftsmen oder

auch Fluke, ein Marktführer im Bereich der Kalibrierungssysteme in der Elektronik.

Der Einstieg in die Life Sciences glückte dem Unternehmen in Washington mit dem Kauf der deutschen Leica Microsystems. Im Jahr 2005 ließen sich die Amerikaner den Optik-Spezialisten in Wetzlar 440 Mio. Euro kosten. Es folgte der Einstieg in die Massenspektrometrie mit der Übernahme von AB Sciex für 1,1 Mrd. US-\$ im Jahr 2009 sowie der Kauf des Instrumentations- und Reagenzien-spezialisten Molecular Devices.

Im vergangenen Jahr krönte Danaher seine Life Sciences-Aktivitäten und ging mit einem Gebot über 5,8 Mrd. US-\$ als Sieger aus der Übernahmeschlacht um Beckman Coulter hervor. Seitdem stehen Life Sciences und Diagnostik vor Messtechnik, Umwelt, Industrietechnologie und Dentalapplikationen mit einem Spartenumsatz von 6,4 Mrd. US-\$ ganz oben im Konzern. Danaher setzt auf direkten Vertrieb. Nur zu einem geringen Teil erfolgt der Verkauf über Distributoren. Auch die

Danaher in Zahlen:

Umsatz: 16 Mrd. US-\$
Gewinn (EBITDA): 1,9 Mrd. US-\$
Operative Marge: 16,6%

Börsenwert (gesamt): 37 Mrd. US-\$
Mitarbeiter: 59.000
CEO: Larry Culp

Umsätze Life Sciences nach Regionen

Europa: 37%
Asien/Australien: 27%
USA: 31%
andere: 5%

Sparten nach Umsatz:

Test & Measurement: 21%
Environment: 18%
Life Sciences & Diagnostics: 29%
Dental: 13%
Industrial Technologies: 19%

Herstellung wird global auf vier Kontinenten unternommen – Europa, Asien, USA und Australien. Allein in Deutschland sind rund 8.000 Angestellte beschäftigt. Immer lässt der Konzern statt seinem eigenen den Markennamen den Vortritt. So sind Leica Microsystems, AB Sciex, Molecular Devices und Beckman Coulter auch heute noch ein Begriff in vielen Laboren. Mit einem Umsatz von etwa 950 Mio. US-\$ ist die akademische Forschung noch vor Pharmakunden (500 Mio. US-\$) und Kliniken (180 Mio. Euro) der wichtigste Absatzmarkt für Danahers Forschungsprodukte. Diese bestehen hauptsächlich aus Instrumenten (80%) und weniger Verbrauchsmaterialien und Services (20%). In der Diagnostik ist das Bild genau andersherum: zu 75% werden Verbrauchsmaterialien und nur zu 25% Instrumente verkauft.

Restrukturierung steht an

Doch auch ein Riese bleibt nicht von schlechten Nachrichten verschont. So musste CEO Larry Culp bei der Präsentation der Quartalszahlen im Juli die Jahresprognose kassieren und Restrukturierungsmaßnahmen ankündigen. Zwar verdoppelten sich die Umsätze im Life Sciences-Bereich dank des Kaufs von Beckman. Konzernweit sank der Gewinn jedoch im zweiten Quartal um knapp 50 Mio. Euro. Ein Alarmzeichen für das Management. So sei der US-Markt zwar stark. Mit einem Viertel der Umsätze ist Danaher aber auch von der wirtschaftlichen Situation in Europa abhängig. „Essentially flat“ beschreibt der Konzern die Nachfrage in diesen Märkten. Und so kommt es wie es kommen muss: Das Management setzt das Wörtchen Sparen ganz oben auf die Agenda. Gleichzeitig, auch das ist nicht überraschend, werden Übernahmen angepeilt. Budget dafür in den kommenden zwei Jahren: 5 Mrd. US-\$.



Seit 22 Jahren bei Danaher und heute laut Washington Post mit 21,6 Mio. US-\$ im Jahr einer der bestbezahlten CEOs der börsennotierten US-Unternehmen: Larry Culp (49)

Reichelt Chemietechnik

Halbzeuge aus Elastomer oder Kunststoff

Mit dem Handbuch THOMAPLAST®-II stellt Reichelt Chemietechnik ein innovatives Halbzeug-Programm vor. Entscheidend hierbei ist, dass alle Produkte auch in kleinen Mengen, das heißt in kleinen Abschnitten beziehungsweise Zuschnitten, abgegeben werden, so dass der Anwender im Betrieb, im Technikum oder in der Forschung genau die für ihn interessante, bedarfsbezogene Menge bestellen kann.

Das Handbuch umfasst Elastomere aus FPM, PI, PUR, EPDM, CSM, CR, NBR, IIR, SBR sowie Rundschnüre aus Silikon, EPDM/PP und TPE, speziell für Pharmaanwendungen. Abgerundet wird das Elastomer-Programm durch Moosgummi-Abschnitte sowie Zellkautschukplatten aus FPM, CR, NBR, PUR oder EPDM.

Das Kunststoff-Sortiment ist ebenfalls sehr umfangreich. Auch hier werden Abschnitte und Teilmengen in unterschiedlichen Größen angeboten, wie Folien aus den Materialien ECTFE, PTFE, FEP, PVDF, PEEK, PI, PA sowie PE. Daneben umfasst das Halbzeug-Programm Platten, Rohre und Stäbe aus PTFE, PVDF, PCTFE, PEEK, PI, PA, PE, POM, PVC, PS, PC sowie PMMA. Darüber hinaus beinhaltet das Handbuch Platten und Vollstäbe aus Glas-Keramik.



Alle Produkte werden im Detail beschrieben, bezogen auf die Produktspezifikation, die chemische Charakteristik sowie die technische Spezifikation. Das Handbuch stellt somit gleichzeitig ein kleines „Nachschlagewerk“ dar, eine Sammlung für technische Parameter der unterschiedlichsten Werkstoffe. Es kann kostenlos angefordert werden.

Reichelt Chemietechnik GmbH + Co.
Silvia Krön
 Englerstr. 18
 69126 Heidelberg
 Tel.: +49-(0)-6221-3125-0
 Fax: +49-(0)-6221-3125-10
 rct@rct-online.de
 www.rct-online.de

Porvair

Arbeitsplatzverdampfer zur HPLC-Probenpräparation

Der Ablaseverdampfer MiniVap™ von Porvair Sciences benötigt nur wenige Minuten, um die flüchtigen organischen Lösungsmittel von den HPLC-Fractionen zu entfernen, die in 24er oder 96er Mikrowellplatten aufgefangen wurden.

Durch seine kompakte Bauart lässt sich der MiniVap™ aus dem erschwinglichen Preissegment ganz einfach aufstellen, betreiben und warten. Zur Inbetriebnahme ist lediglich eine Gasversorgung und eine herkömmliche Netzstromversorgung erforderlich. Der sichere Betrieb des Gerätes ist gewährleistet, da das mit dem CE-Logo gekennzeichnete, kompakte Gerät unter jeden Dunstabzug passt.

Durch den MiniVap – ausgestattet mit einem hochmodernen Verdunster, der den erhitzten Stickstoff zeitgleich direkt in die einzelnen Schalen einer Mikroplatte injiziert – gehört der übliche Engpass im Labor bei der Lösungsmittelverdampfung von HPLC-Fractionen der Vergangenheit an.



Porvair Sciences Ltd.
Dr. Bill Bradbury
 Tel.: +44-(0)-208-546-0869
 info@primetek-solutions.com
 www.porvair-sciences.com

Sensirion

Dynamische Flüssigkeitsdosierung sicher überwachen

Der Schweizer Sensorhersteller Sensirion AG hat die SLI Durchflusssensor-Familie für Flüssigkeiten im Mikroliter- und Milliliter-Bereich vorgestellt. Keine bewegten Teile, ein patentiertes mediengetrenntes Mikrosensormessverfahren und ein gerader, völlig hindernisfreier Strömungskanal gewährleisten hohe Zuverlässigkeit. Gleichzeitig stellen die chemisch inerten, biokompatiblen Materialien (Glas, PEEK™, Teflon®) eine hervorragende Medienkompatibilität der medienberührten Teile sicher, was für eine Vielzahl von kritischen Anwendungen von entscheidender Bedeutung ist. Die RS485-Schnittstelle dieser Flüssigkeitsmesser bietet zusätzliche Features zur Prozessdatenverarbeitung. Detaillierte Messungen hochdynamischer Dosierprozesse können damit im Hintergrund aufgezeichnet und später weiterverarbeitet werden. Der Nutzer kann sich so je nach Bedarf zum Beispiel darauf beschränken, nur das automatisch bestimmte Gesamtvolumen jedes Dosiervorgangs auszuwerten. Die hohe Geschwindigkeit der Durchflussmesser (Reaktionszeit von nur 30 ms) kann mit dieser Interfacelösung voll ausgeschöpft werden. Hochdynamische Prozesse werden so problemlos und effizient überwacht.

Die neuen Mikrosensoren sind für hochpräzise Prozessüberwachung in Anwendungen mit geringen Dosiermengen entworfen worden. Die Zuverlässigkeit solcher flu-



idischer Systeme wird dadurch deutlich verbessert. Durch die geringe Größe und die Leichtigkeit der Geräte sind sie für den Einsatz in verfahrenstechnischen Anlagen und in Anwendungen der Pharma- und Medizinindustrie perfekt geeignet. Die Sensoren sind für maximale Flussraten von 0,0008 ml/s bis 0,08 ml/s (0,05 bis 5 ml/min) bei wässrigen Flüssigkeiten oder von 0,008 ml/s bis 1,3 ml/s (0,5 bis 80 ml/min) beim Einsatz mit Ölen, Kraftstoffen und Lösungsmitteln erhältlich.

Sensirion AG
Jennifer Wagner
 Tel.: +41-(0)-44-306-4022
 Fax: +41-(0)-44-306-4030
 jennifer.wagner@sensirion.com
 www.sensirion.com

Bioline

Zuverlässig: SensiFAST real-time PCR-Kits

SensiFAST™ beinhaltet das komplette Segment der real-time PCR-Kits von Bioline für Anwendungen mit RNA bzw. DNA als Ausgangsmaterial. In den Kits werden die neuesten Erkenntnisse der Pufferchemie und Enhancer-Technologien genutzt. Zusammen mit der Antikörper-inhibierten hot-start DNA-Polymerase lassen sich hohe Sensitivität und sehr kurze Reaktionszeiten kombinieren, ohne dabei auf Leistung, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit verzichten zu müssen.



SensiFAST SYBR ist auf Grund der kurzen Reaktionszeiten bei gleichbleibender Qualität perfekt für den Einsatz in Hochdurchsatz-Anwendungen geeignet. SensiFAST Probe ist ideal für die Nutzung in Multiplex-Anwendungen auf Sondenbasis und reduziert dabei gleichzeitig die Optimierung, die häufig bei diesen Assays notwendig ist. Dieser Kit bietet eine deutlich höhere Effektivität bei sondensbasierten Technologien, wie beispielsweise TaqMan®, Scorpions® und Molecular Beacon Probes, als andere Kits führender Anbieter in diesem Segment. SensiFAST one-step Kits sind äußerst sensitiv und enthalten alle Reagenzien, um eine reproduzierbare qRT-PCR in einem Tube zu gewährleisten.

SensiFAST HRM nutzt interkalierende Farbstoffe, extrem genaue Schmelzkurven und die Verwendung spezifischer statistischer Anwendungen, um SNPs innerhalb der DNA-Sequenz erkennen zu können. SensiFAST-Kits können auf allen real-time PCR-Geräten genutzt werden und sind ebenfalls perfekt für die neue Generation Fast-Cycler geeignet.

Bioline GmbH
Holger Berthel
 Tel.: +41-(0)-160-90144-316
 hberthel@bioline.com
 www.bioline.com/sensifast

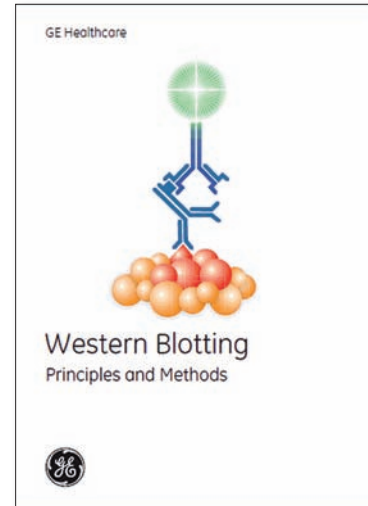
GE Healthcare

Western Blotting-Handbuch

Das Handbuch „Western Blotting Principles and Methods“ von GE Healthcare stellt einen Leitfaden dar, der Anfängern den Einstieg erleichtert und Fortgeschrittenen Hilfestellung und Inspiration gibt, um mehr aus ihren Western Blot-Experimenten herauszuholen.

Das Buch führt durch den gesamten Prozess, von der Probenvorbereitung bis zur Detektion und Auswertung. Kapitel 2 bis 8 erklären den Western Blot Schritt für Schritt und gehen neben der praktischen Durchführung auch auf die theoretischen Hintergründe ein. Beispiele für typische Anwendungen und neue Ansätze werden in Kapitel 9 gegeben.

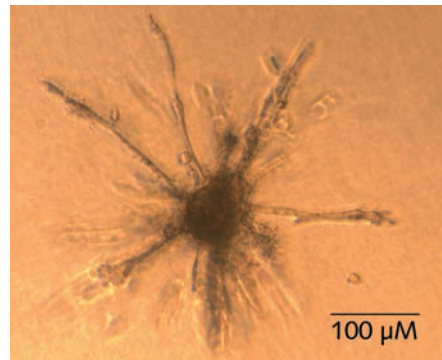
Im vergangenen Jahrzehnt haben Weiterentwicklungen von Nachweismethoden und Software die quantitative Auswertung von Western Blots ermöglicht. Auch dazu bringt das Handbuch Beispiele und Anleitungen. Zum Abschluss gibt es einen Troubleshooting Guide und eine Rezeptesammlung, einschließlich eines empfohlenen Standardprotokolls, auf dem aufbauend, eigene Experimente entwickelt werden können.



GE Healthcare Europe GmbH
Dr. Michael Walther
 Tel.: +49-(0)-89-962-810
 Michael.Walther@ge.com
 www.gelifesciences.com

PromoCell

Maßgeschneiderte Angiogenese-Assays



PromoCell bietet vier verschiedene gebrauchsfertige Angiogenese-Modelle an, mit denen *in vitro* der gesamte Prozess der Angiogenese oder einzelne Abschnitte des Prozesses simuliert werden können. Die Angiogenese-Modelle ermöglichen eine schnelle und effiziente pro- oder anti-angiogenetische Testung.

Das PromoCell 3D-Angiogenese-Assay simuliert *in vitro* dreidimensional den gesamten Prozess der Angiogenese. Der Assay besteht aus Endothelzellsphäroiden, die in eine Kollagenmatrix eingebettet sind. Nach erfolgreicher Stimulation sprießen innerhalb von zwei Tagen neue Blutgefäße aus den Sphäroiden in die umgebende Kollagenmatrix. Die Anzahl und die Länge der neuen Blutgefäße korrespondiert zur pro- oder anti-angiogenetischen Wirkung einer Testsubstanz. Die einfache Auswertung

des Assays erfolgt ohne Färbung der neuen Blutgefäße. Das PromoCell 3D-Angiogenese Assay wird gebrauchsfertig versandt. Zum Starten müssen nur die Testsubstanzen hinzugegeben werden.

Einzelne Stadien der Angiogenese können mit dem PromoCell Transmigration-Kit, dem PromoCell Invasion-Kit und dem PromoCell Planar Migration-Assay untersucht werden.

Der Transmigration-Kit nutzt die Migration von Endothelzellen entlang eines Zytokingradienten, um die chemotaktische Fähigkeit einer Substanz zu messen.

Beim PromoCell Invasion-Kit wird die proteolytische Aktivität von Endothelzellen und deren gerichtete Migration *in vitro* simuliert. Dies ermöglicht, den Einfluss von Substanzen auf die proteolytische Aktivität und die Migration von Endothelzellen in einem Assay zu beobachten.

Der PromoCell Planar Migration-Assay erlaubt es, schnell und einfach den Einfluss von Substanzen auf die Migration von Endothelzellen zu untersuchen.

PromoCell GmbH
 Sickingenstraße 63/65
 69126 Heidelberg
 Tel.: +49-(0)-6221-649-340
 Fax: +49-(0)-6221-649-3440
 info@promokine.info
 www.promokine.info

September – November 2012

Veranstaltungskalender

2.-6.9.12

biocat 2012, Hamburg

Info: Gerlinde Loebkens, TuTech Innovation GmbH
Web: www.biocat2012.de

5.-8.9.12

3rd European Congress of Immunology – ECI 2012, Glasgow (UK)

Info: EFIS/BSI, Web: <http://eci-glasgow2012.com>

6.-7.9.12

3. Kongress Industrielle Zelltechnik, Lübeck

Info: Norgenta GmbH,
Web: www.zelltechnik-kongress.de

10.-13.9.12

30. Jahrestagung der Biotechnologen und ProcessNet-Jahrestagung 2012, Karlsruhe

Info: Barbara Feißt, Dechema e. V.,
Web: <https://ssl.dechema.de/jt2012.html>

16.-19.9.12

46. Jahrestagung der DGBMT, Jena

Info: DGBMT/VE Konferenz-Service,
Web: www.bmt2012.de

18.9.12

jobvector career day, Düsseldorf

Info: Dr. Martina Sribar, jobvector,
Web: www.jobvector.de/careerday

18.-19.9.12

6th European Pharma Licensing Symposium, Budapest (HU)

Web: www.plgeurope.com/Budapest_2012



18.-20. September 2012, Bad Tölz

ECA – Proteinanalytik

Im Workshop „ECA – Protein Analysis Technologies! werden in Fallbeispielen verfügbare Technologien, deren Vor- und Nachteile sowie Optimierungsmöglichkeiten vorgestellt. Weitere Informationen: www.bio-conference.org



20.-21. September 2012, Berlin

Diagnostics 2.0

Der von der Scienion AG veranstaltete Workshop „Diagnostics 2.0 – Turning Content into Multiplex Assays“ stellt innovative Technologien für diagnostische Tests und Screeningversuche in den Fokus.
Info: www.scienion.de

18.-19.9.12

5. NRW Nano-Konferenz, Dortmund

Info: NMW.NRW – Cluster NanoMikro+Werkstoffe
Web: www.nmw.nrw.de/nanokonferenz

18.-19.9.12

Labor-Impuls-Forum 2012, Frankfurt/Main

Info: Akademie für Fort- und Weiterbildung, Web:
www.labor-impuls-forum.de

19.-21.9.12

BioSpain 2012, Bilbao (ES)

Info: ASEBIO, Web: www.biospain2012.org

19.-22.9.12

GCB 2012 – German Conference on Bioinformatics, Jena

Info: Dr. Margit Leitner, Jena Center for Bioinformatics, Web: www.gcb2012-jena.de

20.9.12

5. CIB Partnering Konferenz, Frankfurt/Main

Info: Cluster Integrierte Biotechnologie,
Web: www.cib-frankfurt.de

21.9.12

Moderne Anwendungen der Biotechnologie, Dresden

Info: Dr. Maik Stiehler, TU Dresden,
Web: <http://biosaxony.com>

23.-26.9.12

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biophysik 2012, Göttingen

Info: Susanne Enigk, Deutsche Gesellschaft für Biophysik, Web: www.biophysical-congress.de

24.-26.9.12

16. Heiligenstädter Kolloquium – Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, Heiligenstadt

Info: Inst. für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V., Web: www.iba-heiligenstadt.de

25.-26.9.12

Biobasierte Polymere –**Kunststoffe der Zukunft, Berlin**

Info: Dr. Gabriele Peterek, FNR e.V./BMELV,
Web: www.fnr.de/biokunststoffe-2012

26.-29.9.12

9. Jahrestagung der DGKL, Mannheim

Info: PD Dr. Uta Ceglarek, Universitätsklinikum Leipzig Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik,
Web: www.dgkl2012.de

30.9.-3.10.12

64. Jahrestagung der DGHM, Hamburg

Info: Conventus GmbH, Web: www.dghm-kongress.de

30.9.-2.10.12

28. Ernst-Klenk-Symposium in Molecular Medicine The Genomic Future of Medicine, Köln

Info: Dr. Debora Grosskopf-Kroiher, Zentrum für Molekulare Medizin, Uni Köln,
Web: www.zmmk.uni-koeln.de

30.9.-4.10.12

Animal Cell Technology Course, Costa Brava (E)

Info: António Roldão, ESACT, Web: www.esact.org



20. November 2012, Straubing

Biopolymere

Themenschwerpunkte des Kooperationsforums Biopolymere sind Technologien für zellulosebasierte Materialien und Verbundwerkstoffe sowie industrielle Anwendungen von Biopolymeren.
Info: bayern-innovativ.de/biopolymere2012

Ende der unregulierten Genom-Ära?

Thomas Gabrielczyk, BIOCOM AG

Die Interpretation der funktionellen Bedeutung genomischer Daten ist selbst für Experten ein hartes Brot. Umso schwieriger scheint die Aussage über Krankheitsrisiken und -prognosen auf Basis der Flut an genetischen Daten für den einfachen Bürger. Was manche Firmen zu ihrem Geschäftsmodell erkoren haben, wollen Experten aus 27 europäischen Wissenschafts- und 14 EU-Medizinakademien jetzt unter strengere Marktaufsicht stellen: Gentests, die direkt an die Konsumenten gerichtet sind, ihnen verraten, ob sie auf bestimmte Therapien ansprechen, oder die präsymptomatische Diagnosen monogenetischer Krankheiten gestatten. Mitte Juli forderten 20 Experten des European Academies Science Advisory Council (EASAC) und der Federation of European Academies of Medicine (FEAM) in einem gemeinsamen Bericht ein Verbot des Direktmarketings für vier Arten von Gentests an Konsumenten sowie eine Begutachtung entsprechender genomischer Tests vor Vermarktung. Entsprechende Regelungen sollen in die EU-IVD-Richtlinie aufgenommen werden. Akademische Forscher sollen zudem aufgefordert werden, Standards zu entwickeln, die eine bessere Einschätzung der Vorhersage von Krankheitsrisiken auf Basis genomischer Daten gestatten.

„Derzeit möchten wir Konsumenten nicht ermutigen, Direct-to-Consumer-Gentests zu nutzen“, heißt es in dem Bericht, den 20 Experten der Akademien Mitte Juli vorgestellt haben. Sie empfehlen stattdessen einen vorsichtigen Umgang mit Genomanalysen, die von Unternehmen wie Sequenom oder 23&me angeboten werden, und wollen bestimmte Firmenangebote sogar verbieten. Dazu zählen etwa die Direktvermarktung von Tests auf ernste monogenetische Erkrankungen mit hoher Penetranz oder das pränatale Screening inkl. Tests fetaler Zellen im Blutstrom der Mutter. Auch von Nutrigenom-Tests raten die Wissenschaftler ab, da sie mit einer Kaufempfehlung für Produkte verbunden seien, deren Gesundheitsnutzen oft nicht nachweisbar sei. Zudem sollen Minderheiten und Behinderte grundsätzlich nicht die DCT-Angebote wahrnehmen.

Standards und Regularien

Die Vermarktung der Gentests sowie das sich rasch entwickelnde Feld der Whole Genome-Sequencing-Studien wollen die Wissenschaft-

ler künftig stärker reguliert sehen. Dazu sollen Regelungen in die zur Revision anstehenden IVD-Richtlinie aufgenommen werden, die die Hersteller verpflichten:

- l die Assoziation zwischen DNA-Markern und dem Krankheitsrisiko nachzuweisen,
- l neben der Testqualität auch die Qualität des begleitenden Beratungsangebotes nachzuweisen,
- l die Produktinformation nach noch zu etablierenden Standards auszurichten,
- l entsprechende Einwilligungserklärungen der Kunden einzuholen.

Die EASAC- und FEAM-Experten schlagen zudem vor, ein Register aller angebotenen Gentests einzurichten, in dem die Validität, der Nutzen und die Verfügbarkeit vormarktl. überprüfter Tests dokumentiert ist.

Da immer mehr Großforschungsprojekte auf die Entdeckung molekularer Biomarker abzielen, empfehlen die Experten den Fördermittelgebern Standards zu etablieren, mit denen die klinische Validität entsprechender Marker und Tests beurteilt werden kann und die die Risikoprädiktion in diversen Populationen erlauben.

Inserentenverzeichnis

BioKryo GmbH	17
BIOCRATES Life Science AG	7
BIOCOM AG	13, 14, 33
Bioline GmbH	10, 11
Advanced Analytical Technologies	25
GeneArt AG	U3
Microsynth AG	29
New England Biolabs GmbH	U4
Porvair Sciences Ltd.	13
Roche Diagnostics GmbH	U2

Vorschau Heft 4/2012



Themen Bioanalytik

Der Nachweis von DNA, Kontaminationen in Lebensmitteln und von endokrinen wirksamen Substanzen im Trinkwasser sind nur einige Anwendungen der Bioanalytik, dem nächsten Thema von LABORWELT. Daneben wirft LABORWELT einen Blick auf zwei weitere, hochaktuelle Forschungsfelder: die Stammzellforschung und die digitale PCR. Aktuelle Beiträge, Expertenpanels und Top-Publikationen finden Sie auf der Online-Plattform LABORWELT.de. Bei Interesse, einen Beitrag beizusteuern, hilft die Redaktion (E-Mail: t.gabrielczyk@biocom.de) gerne weiter.

Expertenpanel Imaging

Werbekunden bietet diese Ausgabe eine optimale Plattform für ihre Produkt- und Imageanzeigen. Reservieren Sie Ihren Werbeplatz in LABORWELT bis spätestens zum 2. November 2012. Ergänzend zum Thema „Bioanalytik“ kommen Automations- und Diagnostikexperten zu aktuellen Entwicklungen im Anwendungsfeld „Imaging“ zu Wort. Informationen zur möglichen Teilnahme einer Ihrer Experten sowie über die aktuellen Themen gibt Oliver Schnell (Tel.: +49-30-264921-45, E-Mail: o.schnell@biocom.de).

Impressum

LABORWELT (ISSN 1611-0854)
erscheint vierteljährlich im Verlag der

BIOCOM AG
Lützowstraße 33–36
10785 Berlin, Germany
Tel.: 030/264921-0
Fax: 030/264921-11
laborwelt@biocom.de
www.biocom.de

Redaktion
Dipl.-Biol. Thomas Gabrielczyk
Tel.: 030/264921-50
Dr. Martin Laqua
Tel.: 030/264921-68

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

Leserservice
Angelika Werner
Tel. 030/264921-40

Graphik-Design
Michaela Reblin

Druck:
Druckhaus Humburg 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. Titelbild: 123rf.com

© BIOCOM AG, Berlin

BIOCOM AG

LIFE TECHNOLOGIES
SYNTHETIC BIOLOGY

MADE IN
GERMANY

GeneArt® Gensynthese Services made in Germany

- Erhöhte und stabile Proteinexpression
- Verbesserte Proteineigenschaften
- Verkürzte Entwicklungszeiten

Der Katalysator für Ihre Forschung und Produktion

Die neue Generation von GeneArt® Gensynthese Services und Produkten

Neue und bewährte GeneArt® Services und Produkte bieten Ihnen höchste Qualität und Verlässlichkeit. An unserem ausgebauten Standort in Regensburg entwickeln wir Technologien für Ihre Life Science-Forschung. GeneArt® steht für Kundennähe, kurze Lieferwege und höchste Produktivität.

Mit GeneArt® Gensynthese, Mutagenese, Proteinproduktion, Genome Editing mit Precision TALs, DNA Assembly Tools und weiteren GeneArt® Services und Produkten setzen Sie Ihre Ideen von morgen um.

Mehr Information finden Sie unter www.lifetechnologies.com/geneart oder senden Sie einfach eine E-mail mit Ihren Fragen an geneartsupport@lifetech.com

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT INTENDED FOR ANY ANIMAL OR HUMAN THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC USE.
©2012 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners. CO26158

life
technologies™

Invitrogen™

Applied Biosystems®

Gibco®

Molecular Probes®

Novex®

TaqMan®

Ambion®

Ion Torrent™

For more information, including our
FREE SAMPLE special offer, visit
www.neb-online.de

Fidelity at its finest.

Q5[™] High-Fidelity DNA Polymerase

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase sets a new standard for both fidelity and performance. With the highest fidelity amplification available (>50X higher than *Taq*), Q5 DNA Polymerase results in ultra-low error rates. Its unique buffer system provides superior performance for a broad range of amplicons, regardless of GC content. Available in master mix and hot start formulations, Q5 DNA Polymerase represents the finest in fidelity.



ALSO AVAILABLE:
Optimized NEBNext[®] formulation for
Next-Gen-Seq library amplification

Mandarin Ducks (*Aix galericulata*) are frequently featured in Chinese art and are regarded as a symbol of fidelity.

Robust amplification even with high GC amplicons



Amplification of two human genomic amplicons of mid to high GC content. All reactions were conducted using 30 cycles of amplification and visualized by microfluidic LabChip[®] analysis. All polymerases were cycled according to manufacturer's recommendations. For the 78% GC amplicon, GC Buffers or enhancers were used when supplied with the polymerase.

Q5 = Q5[™] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)
B = Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)
C = KOD DNA Polymerase (Merck)
D = PfuUltra[™] High-Fidelity DNA Polymerase (Agilent)

PHUSION[®] is a registered trademark and property of Thermo Fisher Scientific. Phusion[®] DNA Polymerase was developed by Finnzymes Oy, now a part of Thermo Fisher Scientific. PFUULTRA[™] is a trademark of Agilent Technologies, Inc. LABCHIP[®] is a registered trademark of Caliper Life Sciences, part of Perkin Elmer, Inc. Q5[™] is a trademark of New England Biolabs, Inc.