LABORWELT

Nr. 3 / 2008 – 9. Jahrgang

Zellbiologie & Imaging

Hochdurchsatz-Two Hybrid-Screening von Protein-Protein Interaktionen mit Zellarrays

iTRAQ-Analyse der Caspase-vermittelten Proteinsekretion in Säugerzellen

Ein neues System für das automatisierte Screening von Ionenkanälen

Marktübersicht: Cell-based Assays

BIOCOM

Immer näher an „in vivo“…

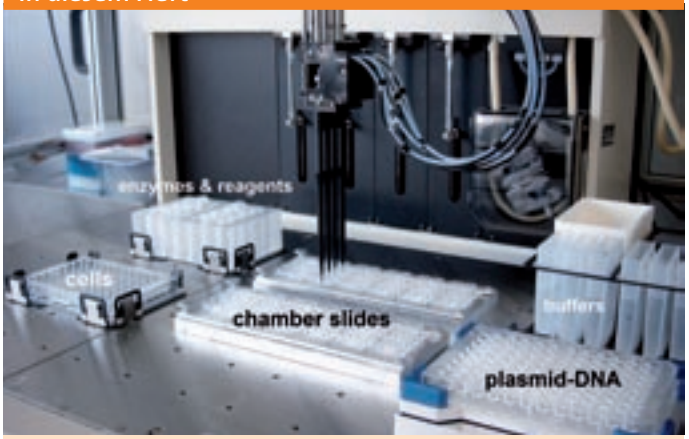
Einen ungeahnten Aufschwung erleben derzeit Ganzzelluntersuchungen, sogenannte cell-based Assays. Sage und schreibe 51 (!) Anbieter aus aller Welt hatten, kurz nachdem wir auf die aktuelle Marktübersicht „cell-based Assays“ hingewiesen hatten, Kontakt zur Redaktion gesucht. Das Thema trifft derzeit offenbar den Nerv. Denn komplementär zum klassischen biochemischen Endpunktassay versprechen die zellbasierten Tests mehr „*in vivo*“ – quasi einen Realitätstest der *in vitro*-Daten in einem lebendigen biologischen Modellsystem.

Einem Realitätstest möchte sich gerne auch die Redaktion von LABORWELT unterziehen, um die Zeitschrift möglichst nah an den Bedürfnissen von Ihnen, lieber Leser, zu orientieren: durch eine Leserumfrage. Für Ihre Anregungen gibt es natürlich auch eine kleine Belohnung. Gewinnen Sie einen iPOD Nano. Näheres erfahren Sie auf dem Fragebogen, der dieser Ausgabe von LABORWELT beiliegt. Sollte Ihnen dieser abhanden gekommen sein, mailen Sie uns einfach unter laborwelt@biocom.de – wir senden Ihnen die sechs Fragen dann rasch zu. Wir freuen uns, LABORWELT noch näher an „*in vivo*“-Bedingungen – nämlich Ihren Bedürfnissen – zu orientieren.

„*In vivo*“ ist auch das Thema dieser Ausgabe. Angesichts des Auftauchens einer Nachfolgefirma der gescheiterten Würzburger TeGenero AG wirft der „Ex-Würzburger“ Prof. Dr. Holger Reichhardt einen Blick auf die Forschungsfortschritte seit dem gescheiterten Erstversuch am Menschen mit TGN1412, dem CD28-Superagonisten von TeGenero. Unternehmensschwerpunkt des Nachfolgers TheraMAB werden übrigens molekulardiagnostische Dienstleistungen sein. Die in ein universitäres Setting eingebettete Forschung an TGN1412 ist nur ein – wenn auch hochinteressanter – Nebenkriegsschauplatz. Daneben gibt es in dieser Themenausgabe Aktuelles aus Asssayentwicklung, Ionenkanalscreening, der klinischen Krebs-, Haut- und Atheroskleroseforschung etc., etc. – Viel Lesevergnügen!

Thomas Gabrielczyk

In diesem Heft



Marktübersicht: Cell-based Assays

Sie messen die Wirkung von si- und miRNAs, die Induktion der Apoptose, zytotoxische Wirkungen und viele andere biologische Phänomene an lebenden Zellen. Darin sehen viele einen Vorteil der zellbasierten Assays gegenüber biochemischen Endpunktbestimmungen. Der Markt für immer neue Testsysteme und die benötigte Hardware boomt, denn die Nutzer kommen sowohl aus der Academia als auch aus Firmen (ab Seite 43).

Inhalt

Leserforum Statement
4 **Wechselwirkung: Politik und Stammzellforschung**
Prof. Dr. Anthony Ho, Medizinische Klinik V, Universität Heidelberg

Wissenschaft Translationale Medizin
6 **MIF: ein neuer Protagonist in der Atherosklerose**
Prof. Dr. Christian Weber et al., Klinikum der RWTH Aachen

Titel: **Zellbiologie & Imaging**
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme gegen Krebsantigene aktivierter T-Lymphocyten (orange) bei der Attacke einer Krebszelle.

Foto: © Steve Gschmeissner - Science Photo Library

Blitzlicht In-vivo-Imaging
10 **Echtzeit-Tumoranalyse mit rot fluoreszierenden Proteinen**
Prof. Dr. Christian Petzelt, MARINPHARM GmbH, Luckenwalde

Blitzlicht Zellkultur
12 **Serumfreie Langzeitkultur humaner Hepatozyten**
Dr. Dieter Runge et al., PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Schwerin

Report Tiermodelle
14 **Mausmodelle: Therapie-Entwicklung für Epidermolysis bullosa**
Dr. Anja Fritsch. Prof Dr. Leena Bruckner-Tuderman et al., Universitäts-Hautklinik Freiburg

Report Immunbiologie
18 **Tregs, Autoimmunität und CD28-superagonistische Antikörper**
Prof. Dr. Holger M. Reichardt et al., Universitätsmedizin Göttingen

Blitzlicht Zell-basierte Assays
24 **Gelbasierte Angiogenese-Assays**
Dr. Ulf Rädler et al., ibidi GmbH, Martinsried

Blitzlicht Hochdurchsatzanalyse
27 **Zellarrays zur Hochdurchsatzanalyse von Proteininteraktionen**
Dr. Andrea Fiebitz et al., MPI für molekulare Genetik, Berlin

Blitzlicht Proteomics/Zellbiologie
34 **iTRAQ: Identifikation unkonventionell sekretierter Proteine**
Dr. Martin Keller; Dr. Hans-Dietmar Beer, Institut für Zellbiologie, ETH Zürich

Blitzlicht Krebs
37 **Verstärkung der Chemosensitivität von Tumorzellen**
Prof. Dr. Rudolf Fahrig, RESprotect GmbH, Dresden

Blitzlicht Screening
39 **Ionenkanalscreening auf den Kopf gestellt**
Dr. Dirck Lassen et al., Flyion GmbH, Tübingen

Service Marktübersicht
43 **Cell-based Assays**

59 Verbände

60 Stellenmarkt

66 Produktwelt

69 Termine

70 Ausblick/Impressum

Verstärkung der Chemosensitivität von Tumorzellen mittels RP101

Prof. Dr. Rudolf Fahrig, RESprotect GmbH, Dresden

Die Chemotherapie ist derzeit die Standardtherapie für Krebserkrankungen. Die für die Therapie eingesetzten Zytostatika treiben Tumorzellen in den Selbstmord. Leider ist die erfolgreiche Behandlungsperiode mit den gegenwärtig auf dem Markt befindlichen Zytostatika meist nicht lang genug, um den Tumor gänzlich zu vernichten. Der Tumor entwickelt nämlich Abwehrmechanismen gegenüber der Behandlung; er wird resistent. Die von RESprotect entwickelten Arzneimittel verhindern diese Resistenzbildung von Tumorzellen gegenüber Chemotherapien und erhöhen die Immunabwehr der Patienten. Im Gegensatz zu den seit Jahrzehnten bekannten und meist erfolglosen Versuchen, existierende Chemoresistenzen zu umgehen oder zu mindern, gibt es für diesen technologischen Ansatz weltweit keine Konkurrenz. Das erste von uns entwickelte Arzneimittel RP101 zeigte in Kombination mit Zytostatika in zwei kleinen klinischen Studien mit Bauchspeicheldrüsen-Krebspatienten eine lebensverlängernde Wirkung, welche jene bisheriger Therapien bei weitem übertraf. Darüber hinaus führte die RP101-Behandlung zu keinen schädlichen Nebenwirkungen, wie sie bei Behandlung mit Zytostatika immer zu beklagen sind. Da RP101 potentiell mit jedem Zytostatikum und bei allen Krebsarten wirken sollte, eröffnen sich neue Möglichkeiten für die Chemotherapie und damit für die Patienten.

Die von RESprotect genutzte Technologie, die Chemogenomik, besteht in der Verwendung kleiner Moleküle (small molecules), welche die Expression bestimmter Gene in einer für den Patienten günstigen Weise beeinflussen. Die Konzentration auf bestimmte biologische Prozesswege führt zu einem besseren Verständnis der Wirkung eines Arzneimittels.

Auf diese Weise ist die Entdeckung von Arzneimitteln möglich, deren Wirkung auf die Ursachen und nicht die Symptome einer Krankheit gerichtet ist. Die Arzneimittel von RESprotect werden zusätzlich zur Standard-Chemotherapie verabreicht. Die Chemotherapie beruht darauf, dass Tumorzellen in den Selbstmord (Apoptose) getrieben werden. Hauptproblem der Chemotherapie ist das Auftreten von Chemoresistenz, welche die Apoptose verhindert.

Die RESprotect-Technologie, die Chemogenomik, führt zur Identifizierung von Zielgenen, die an der Entwicklung der Chemoresistenz beteiligt sind.

Unser erstes Arzneimittel RP101 unterdrückt die Überexpression Apoptose-hemmender Gene, die durch die Behandlung mit Zytostatika induziert wird.

RP101-Effekt auf Pankreaskrebszellen

In Pankreaskrebszellen (Bauchspeicheldrüsenkrebszellen) wird das Onkogen, das heißt krebserzeugende Gen STAT3 häufig überexprimiert und durch die Zytostatika-

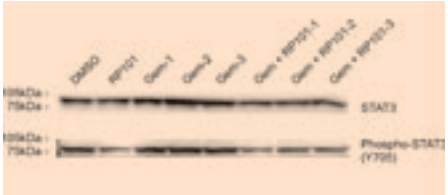


Abb. 1: Wirkung von RP101 auf STAT3-Proteinmenge (1,2 und 3 stellen die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Versuchen dar).

behandlung noch weiter hochreguliert. Hierdurch wird die durch Zytostatika induzierte Apoptose (Selbstmord der Tumorzellen nach Schädigung) verhindert und die Krebszellen zeigen dementsprechend keinerlei Reaktion auf eine Chemotherapie.

Die RP101-Ko-Behandlung verhindert jedoch die Hochregulierung von STAT3 und dessen Zielgen VEGF und macht die Zellen hierdurch empfindlich gegenüber der Chemotherapie.

Behandlung mit Zytostatika führt in Krebszellen zur Schädigung der Erbsubstanz DNA und treibt die Zelle hierdurch zum Selbstmord. Tumorzellen, insbesondere Pankreaskrebszellen können dem Selbstmord (Apoptose) durch Überexpression des DNA-Reparaturgens APEX/ref-1 entgehen und hierdurch resistent gegenüber der Chemotherapie werden. RP101-Ko-Behandlung verhindert diese Überexpression und erhält auf diesem Wege die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Zytostatikabehandlung aufrecht.

Spezifisch in Pankreaskarzinomzellen wird durch RP101-Ko-Behandlung die Hochregulierung der Uridin-Phosphorylase (UPase) verhindert.

Die Expression der UPase scheint durch Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Zytokine kontrolliert zu werden, und die Aktivität der UPase ist in Tumoren meist höher als in gesundem Gewebe. Patienten mit erhöhtem UPase-Spiegel haben eine schlechte Prognose.

More Modes

Molecular Devices' multi-detection readers: SpectraMax M5e (top) and FlexStation 3 with integrated fluid transfer (bottom).

Molecular Devices is the #1 supplier of tunable microplate readers. Our two dual-monochromator multi-detection readers—the SpectraMax® M5e and FlexStation® 3 with integrated compound addition—give you superior results in all modes.

- Widest spectrum of absorbance, fluorescence, and luminescence applications in microplates or cuvettes
- FP performance that is unparalleled by any tunable instrument
- TRF, HTRF®, IMAP® TR-FRET, and other TR-FRET assay capabilities
- Integrated plate stacker option for SpectraMax M5e
- Direct reagent transfer with 8- or 16-channel pipettor option on FlexStation 3 to increase kinetic assay throughput
- Complete SpectraTest™ hardware and SoftMax® Pro GxP software validation tools

Whether you're screening at high throughput or developing assays in cuvettes or 6- to 384-well microplates, the SpectraMax M5e and FlexStation 3 can address a wider array of assays.

Molecular Devices
now part of MDS Analytical Technologies
tel. +44-118-944-8000 | www.moleculardevices.com

MDS Analytical Technologies

Tab. 1: Genregulation in Pankreaskrebszellen als Resultat der RP101-Behandlung – Quantitative real-time PCR

Genregulation als Resultat der RP101-Behandlung	Hum. Pankreas-Adenokarzinom-Zellinie	RP101 vs. DMSO Kontrol. (%)	Gemcitabine + RP101 vs. GEM allein (%)
uridine phosphorylase, UPase	BxPC-3 AsPC-1	keine Veränderung ↑ 64	↓ 66 ↓ 73
natural killer cell transcript 4, NK 4, IL-32	CAPAN-2 AsPC-1	↑ 160 ↑ 50	↑ 125 ↑ 63
lymphotoxin-alpha, LTB tumor necrosis factor C	CAPAN-2 AsPC-1	↑ 180 ↑ 370	↑ 224 ↑ 760
lymphotoxin beta, LTA, tumor necrosis factor beta	CAPAN-2 AsPC-1	↑ 20 ↑ 70	↑ 76 ↑ 94
tumor necrosis factor LIGHT, TNFSF14	CAPAN-2 AsPC-1	↑ 10 ↑ 30	↑ 85 ↑ 200
ICAM-1	CAPAN-2 AsPC-1	↑ 32 ↑ 53	↑ 54 ↑ 135
VEGF, vascular endothelial growth factor	CAPAN-2 AsPC-1	↓ 37 ↓ 6	↓ 34 ↓ 27
APEX, ref-1, apurinic endonuclease	CAPAN-2	keine Veränderung	↓ 36

Spezifisch in Pankreaskarzinomzellen werden durch RP101-Ko-Behandlung die Lymphotoxine alpha und beta, das „natural killer cell trancript 4“, der „tumor necrosis factor LIGHT“ und ICAM-1 hochreguliert. Die Produkte dieser Gene erhöhen die Anti-Tumor-Immunität. Die Wirkungen von RP101 in Pankreaskrebszellen auf Genebene finden sich in Tabelle 1.

In Abbildung 2 ist zu sehen, dass Kobehandlung mit RP101 die Wirkung von „killer cells“ erhöht, also einen positiven Einfluss auf die Immunabwehr ausübt. Die gelben Flächen zeigen die durch Abtötung der Tumorzellen entstandenen Lücken im Zellrasen.

Wirkung auf Krebspatienten

In zwei voneinander unabhängigen Phase I/II-Studien mit metastasierten Bauchspeicheldrüsenkrebspatienten wurde RP101 in Kombination mit Gemcitabin, der gegenwärtigen Standardtherapie, sowie mit Gemcitabin + Cisplatin eingesetzt. Diese Ergebnisse wurden kürzlich veröffentlicht[1]. Die RP101-Ko-Behandlung führte zu einer ungefähren Verdoppelung der medianen Überlebenszeit. Darüber hinaus lebten vier- beziehungsweise fünfmal mehr Patienten mit Fernmetastasen (Stadium IV) ein Jahr oder länger im Vergleich zu den Patienten, die mit Chemotherapie allein behandelt worden waren.

Phase II – Pilotstudie

Dreizehn Patienten mit Metastasen (neun mit Fernmetastasen in Stadium IV und vier mit Nahmetastasen in Stadium III der Krankheit) wurden mit in einer klinischen Phase II-Studie mit Gemcitabin, Cisplatin und RP101 behandelt. 77% der Patienten mit Fernmetastasen lebte länger als ein Jahr nach Start der Behandlung. Dies bedeutet, dass von den Patienten in Stadium IV viermal mehr ein Jahr überlebten als Patienten, die nur mit Zytostatika behandelt wurden.

Phase II – Dosis-Findungs-Studie

Eine Phase II-Dosis-Findungs-Studie mit 22 metastasierten Patienten wurde in drei Zentren in Deutschland durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit denen der Pilotstudie überein. Die Ein-Jahres-Überlebensrate betrug 43%.

Alle diese Patienten waren in Stadium IV, hatten also Fernmetastasen (Leber, Lunge etc.). Von diesen Patienten mit der normalerweise geringsten medianen Überlebenszeit erlebten fünfmal mehr ein Jahr als Stadium IV-Patienten der Kontrollgruppe. Die jetzt begonnene klinische Studie schließt aus diesem Grund ausschließlich Stadium IV-Patienten ein.

Es zeigte sich hierbei außerdem die Tendenz, dass sich die Lebensqualität der behandelten Patienten durch RP101-Ko-Behandlung verbesserte. Es konnten keine negativen Nebenwirkungen festgestellt werden. Eine Phase II/III Studie begann im Oktober 2007 in den USA und Europa. Etwa 55 Zentren und 153 Patienten mit Fernmetastasen werden involviert sein.

Tab.2: Überlebenszeit bei Standardtherapie, in der Dosisfindungs- und Pilotstudie

Therapie	6 Monate	12-Monate
Chemotherapie allein ohne RP101	45 %	22 %
RP101 + Gemcitabin	71 %	43 %
RP101 + Gemcitabin + Cisplatin	92 %	77 %

Literatur

[1] Fahrig, R., Heinrich, J.C., Nickel, B., Wilfert, F., Leisser, C., Krupitza, G., Praha, C., Sonntag, D., Fiedler, B., Scherthan, H., and Ernst, H. Cancer Res. 63 (2003) 5745 -5753.

[2] Fahrig, R., Quietzsch, D., Heinrich, J-C., Heinemann, V., Boeck, S., Schmid, R.M., Praha, C., Liebert, A., Sonntag, D., Krupitza, G., and Haenel, M. Anti-Cancer Drugs 17 (2006) 1045-1056.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Rudolf Fahrig
RESprotect GmbH
Fiedlerstr. 34
01307 Dresden
Tel.: +49-(0)351-450-3201
Fax: +49-(0)351-450-3210
fahrig@resprotect.de
www.resprotect.de

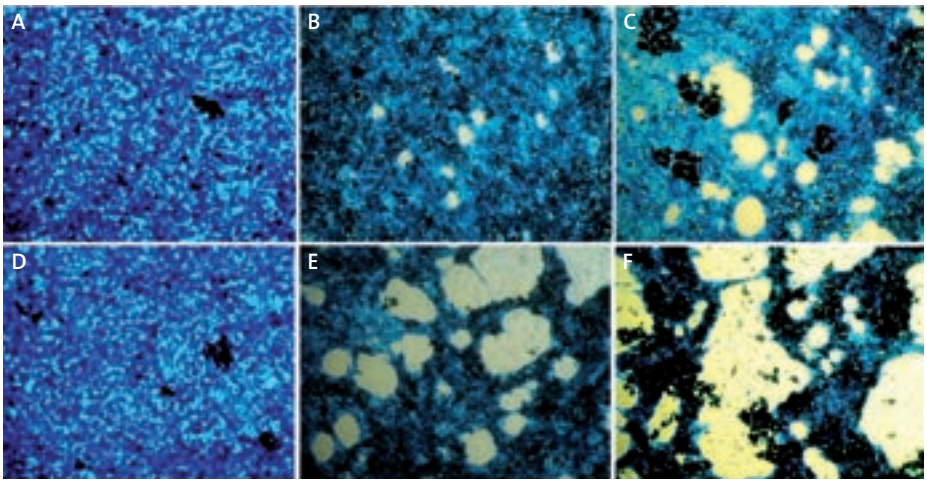


Abb. 2: Wirkung von RP101 auf die zytolytische Aktivität von NK-92-„natural killer cells“ . (a) CAPAN-2-Zellen+GEM. (b) CAPAN-2-Zellen+NK-92-Zellen. (c) CAPAN-2-Zellen+GEM+NK-92-Zellen. (d) CAPAN-2-Zellen+GEM+RP101. (e) CAPAN-2-Zellen +RP101+NK-92-Zellen. (f) CAPAN-2-Zellen +GEM+RP101+NK-92-Zellen.