

Impressum

Konzept:

Dr. Ulrike Kaltenhauser

Gestaltung:

hr-design, München, Rainer Herrmann, hr-graphic.de

Druck:

Druckhaus Kastner, Wolnzach

© 2015 Alle Rechte vorbehalten

Mitglied im

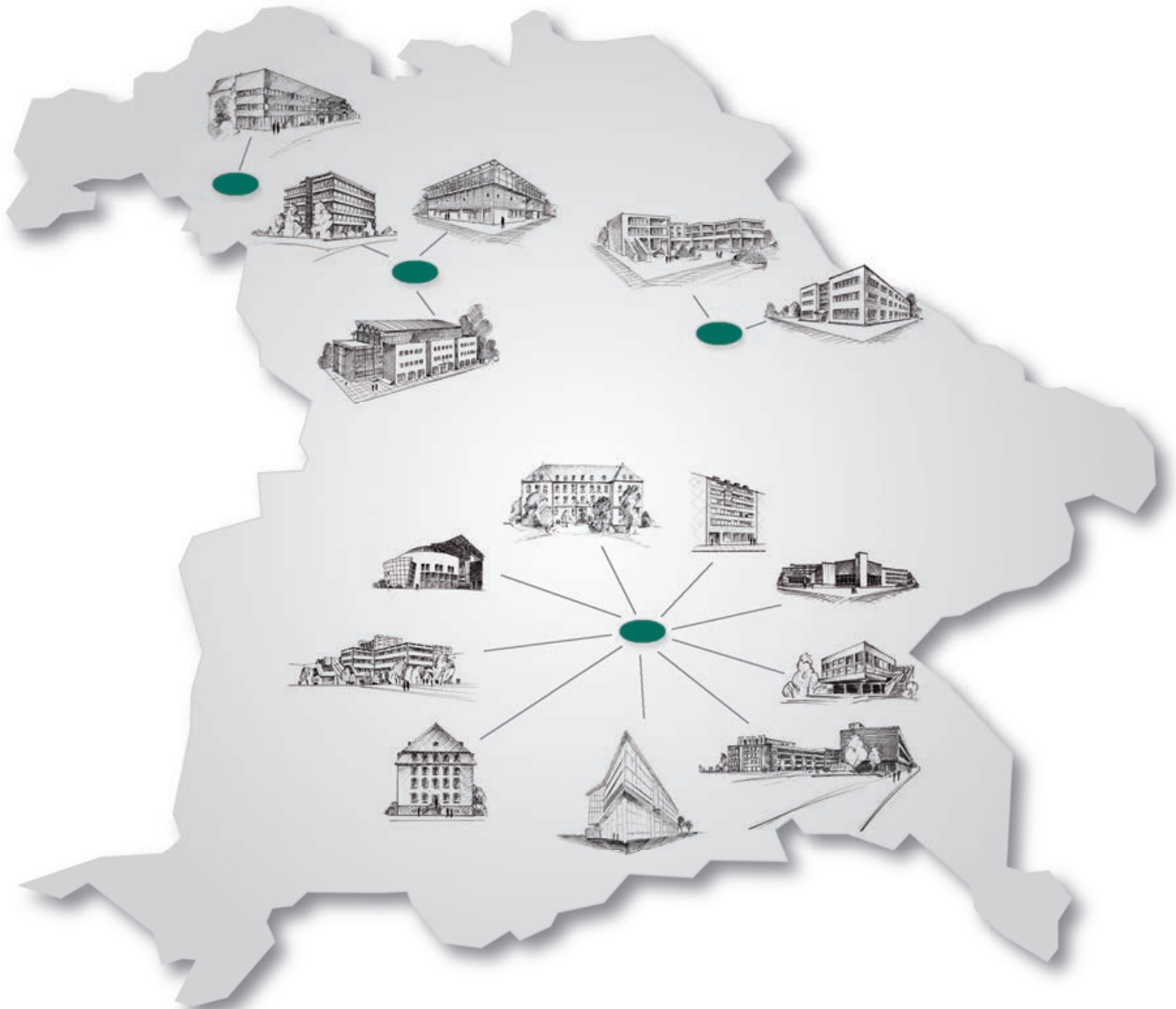
CLUSTER
BIOTECHNOLOGY
BAVARIA



Das Bayerische Forschungs-
netzwerk BioSysNet wird
gefördert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst







Inhalt

Grußworte

Dr. Ludwig Spaenle	Bayerischer Staatsminister für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst.....	6
Prof. Dr. Horst Domdey	Koordinator von BioSysNet.....	7

BioSysNet

Dr. Ulrike Kaltenhauser	BioSysNet stellt sich vor.....	8
-------------------------	--------------------------------	---

Reguläre Juniorgruppen

Dr. Ana Eulalio	RNA: Die fehlende Verbindung in der bakteriellen Pathogen-Wirt-Interaktion	12
PD Dr. Olaf Groß	Mechanismen und Auswirkungen der Inflammasom-abhängigen Proteinausschüttung	14
Dr. Tobias Madl	Ordnung in die Unordnung!	16
Dr. Jan Medenbach	Die Regulation der eukaryotischen Translation	18
Dr. Fabiana Perocchi	Calcium-abhängige Regulation des mitochondrialen Metabolismus und programmierter Zelltod	20

Assoziierte Juniorgruppen

Prof. Dr. Ulrich Gerland	Physikalische Biologie von Nucleosomenpositionierung, Remodeling und Transkriptionsregulation in Hefe	22
Prof. Dr. Mario Halic	Genetisches Silencing durch kleine RNAs in der Spalthefe	23
PD Dr. Philipp Korber	Evolutionärer Vergleich von Mechanismen der Nucleosomenpositionierung in weit divergierten Hefen	24
Dr. Cynthia Sharma	Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen in <i>Campylobacter jejuni</i>	25
Dr. Johannes Söding	Analyse und Modellierung von regulatorischen Protein-DNA-Bindeenergielandschaften.....	26
Prof. Dr. Dr. Fabian Theis	Wie potent ist eine Stammzelle?	27
Prof. Dr. Gil Westmeyer	Raumzeitliche Kontrolle der Genexpression	28
Prof. Dr. Beate Winner	Transkriptomanalysen zur Untersuchung der synaptischen Dysfunktion in Synucleinopathien	29

Assoziierte Seniorgruppen

Prof. Dr. Anja Bosserhoff	Das molekulare Verständnis des malignen Melanoms - Was können wir aus der Embryogenese lernen?	30
Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt	Kooperativität und Synergismus von microRNAs bei kardiovaskulären Erkrankungen	31
Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner	Molekulare Systeme des angeborenen Immunsystems	32
Prof. Dr. Christoph Klein	Ein systembiologischer Blick auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in der Pädiatrie	33
Prof. Dr. Andreas Ladurner	Das Zusammenspiel von Stoffwechsel, Genregulation und Umwelt	34
Prof. Dr. Gunter Meister	Identifizierung von zellulären Regulatoren der miRNA-Biogenese	35
Prof. Dr. Robert Slany	Regulation der transkriptionellen Dynamik als globaler Mechanismus zur Kontrolle von Selbsterneuerung und Differenzierung während der hämatopoietischen Entwicklung.....	36
Prof. Dr. Rainer Spang	Interzellulärer Plausch in Tumoren	37
Prof. Dr. Jörg Vogel	Kleine RNAs kontrollieren die Dynamik der Genexpression	38
Prof. Dr. Eckhard Wolf	Einfluss von mütterlichem Diabetes mellitus auf die embryonale, fötale und postnatale Entwicklung	39
Prof. Dr. Ralf Zimmer	Aufklärung und Erklärung von Expressionsmustern	40

Stiftungen

Prof. Dr. Christoph Klein	Care-for-Rare Stiftung	41
Prof. Dr. Beate Winner	Tom Wahlig Stiftung	42

Kooperationspartner aus der Industrie

43



Grußwort

Dr. Ludwig Spaenle,
Bayerischer Staatsminister für Bildung und Kultur,
Wissenschaft und Kunst

Kontakt

Bayerisches Staatsministerium
für Bildung und Kultur,
Wissenschaft und Kunst
Salvatorstraße 2
80333 München



BioSysNet - Das Bayerische Forschungs- Netzwerk für Molekulare Biosysteme

Die Forschung in den Lebenswissenschaften und die Biotechnologie in Bayern sind international sehr anerkannt. Mit dem Bayerischen Forschungsnetzwerk für Molekulare Biosysteme (BioSysNet) und dem Kernzentrum an der Ludwig-Maximilians-Universität München stärken wir die Konkurrenzfähigkeit Bayerns in diesem Bereich und erhöhen die internationale Sichtbarkeit der Biosystemforschung. Dafür hat der Freistaat rund 18,1 Millionen Euro zur Verfügung gestellt.

Die vorliegende Broschüre informiert über die wissenschaftlichen Ergebnisse der insgesamt 24 geförderten Projekte des Forschungsnetzwerks, auf deren Basis neue therapeutische Verfahren und diagnostische Methoden entwickelt werden. Um dieses ambitionierte Ziel zu erreichen, ist die interdisziplinäre Zusammenarbeit innerhalb des Netzwerks wesentlich. Denn die fächerübergreifende Expertise der einzelnen Projektgruppen hilft dabei, neue Einblicke und Erkenntnisse über die komplexen Vorgänge lebender Biosysteme zu gewinnen.

Durch die Etablierung dieses Forschungsnetzwerks ist es außerdem gelungen, herausragende junge Wissenschaftler von renommierten internationalen Forschungseinrichtungen an die beteiligten bayerischen Universitäten zu holen. So konnten fünf neue unabhängige Nachwuchsforschungsgruppen eingerichtet und in die bayerische Forschungslandschaft integriert werden. Darüber hinaus erhalten acht assoziierte Juniorforschungsgruppen sowie elf assoziierte Seniorforschungsgruppen, die in Bayern bereits etabliert sind und das Netzwerk durch ihre Expertise ergänzen, im Rahmen von BioSysNet eine ergänzende Finanzierung. Der rege Austausch zwischen den Mitgliedern von BioSysNet hat bereits Früchte getragen und eine Reihe eindrucksvoller Publikationen hervorgebracht. Auch Unternehmensausgründungen stehen kurz bevor. Die Projektleiter tragen durch ihre Arbeit dazu bei, biologische Systeme auf zellulärer und molekularer Ebene besser zu verstehen und leisten damit einen wertvollen Beitrag zur Weiterentwicklung der Biosystemforschung in Bayern. Allen Leserinnen und Lesern wünsche ich faszinierende Einblicke in diesen wichtigen Bestandteil unserer Spitzenforschung.

München, im August 2015
Dr. Ludwig Spaenle

*Bayerischer Staatsminister
für Bildung und Kultur, Wissenschaft und Kunst*

Grußwort

Prof. Dr. Horst Domdey,
Koordinator von BioSysNet



Interdisziplinäre Zusammenarbeit in der Bayerischen Forschungslandschaft

Die molekulare Biosystemforschung gehört wahrscheinlich zu den innovativsten und sich am rasantesten entwickelnden Forschungsthemen des 21. Jahrhunderts. Damit wurde sie zu einer der treibenden Kräfte der biologischen und medizinischen Forschung. Interdisziplinäre Ansätze helfen dabei, die meist sehr komplexen Fragestellungen zu bearbeiten.

In einem hochkompetitiven Begutachtungsprozess waren im Jahr 2011 insgesamt 24 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler für eine Förderung durch ein durch die Bayerische Staatsregierung neu eingerichtetes Förderprogramm auf dem Gebiet der molekularen Biosystemforschung ausgewählt worden. Zum einen handelte es sich um 19 WissenschaftlerInnen, die bereits in den Bayerischen Universitäten und Universitätsklinika etabliert waren, zum anderen um 5 herausragende (junge), aus dem Ausland nach Bayern berufene WissenschaftlerInnen, denen durch die Fördermaßnahme der Aufbau einer eigenen Arbeitsgruppe in diesem Forschungsgebiet ermöglicht werden sollte.

Seitdem arbeiten im Bayerischen Forschungsnetzwerk für Molekulare Biosysteme (BioSysNet) diese 24 ausgewählten wissenschaftlichen Gruppen fächerübergreifend zusammen mit dem Ziel, ein integriertes Bild aller regulatorischen Prozesse in einem Organismus über alle Ebenen hinweg zu bekommen. Die Strategie hinter diesem vom Land Bayern finanzierten Programm ist zum einen, die Kompetenzen der wissenschaftlichen Fachgebiete zu bündeln, und zum anderen, die Position der bayerischen Wissenschaft in diesem hochkompetitiven Feld auf globaler Ebene zu stärken. Wir sind

dabei überzeugt, dass die interaktive Herangehensweise an dieses Wissenschaftsfeld nicht nur unser Wissen im Bereich der Grundlagenforschung erhöhen wird, sondern dass sich damit auch neue Erkenntnisse und technische Möglichkeiten für die Diagnose und die Therapie von Krankheiten eröffnen werden. Durch die Etablierung des Zentrums für Molekulare Biosysteme (BioSysM), zu dem sowohl das Netzwerk BioSysNet wie auch das Genzentrum München und auch ein sich in der Entstehung befindender Forschungsneubau gehören, wird eine bayernweite Basis für Spitzenforschung in den modernen Life Sciences geschaffen.

Die Brücke, die von speziellen Themen der Grundlagenforschung hin zur personalisierten Medizin geschlagen wird, setzt einen intensiven und professionell geführten Technologietransfer und den Anschluss an die regional ansässige Industrie voraus. Nur so kann gewährleistet werden, dass die gewonnenen Erkenntnisse auch der Gesundheit der Menschen zu Gute kommen.

Wir haben der Bayerischen Staatsregierung, insbesondere dem Bayerischen Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst, zu danken, dass solche Verbundprojekte mit herausragenden Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern gefördert werden. Ich wünsche Ihnen, liebe Leser, viel Vergnügen bei der Lektüre dieser hoffentlich für Sie spannenden und anregenden Broschüre.

München, im August 2015

Prof. Dr. Horst Domdey

Kontakt

Bio^M Biotech Cluster
Development GmbH,
Martinsried
hierl@bio-m.de





BioSysNet stellt sich vor

Dr. Ulrike Kaltenhauser, Leitung der Geschäftsstelle

Kontakt

Dr. Ulrike Kaltenhauser,
Genzentrum,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
kaltenhauser@biosysnet.de



Ein Netzwerk für ganz Bayern

Neue Wege auf dem Gebiet
der molekularen Systembiologie

► Die Bayerische Staatsregierung unterstützt seit vielen Jahren zahlreiche Ansätze, die zum Ziel haben, den Forschungs- und Innovationsstandort Bayern weiter zu entwickeln. An erster Stelle wären hier das 2004 gegründete Bayerische Genomforschungsnetzwerk (BayGene) und das etwas später initiierte Bayerisches Immuntherapie-Netzwerk (BayImmuNet) zu nennen. Basierend auf den daraus resultierenden Erfolgen hat das Bayerische Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst Ende 2011 das Bayerische Forschungsnetzwerk für Molekulare Biosysteme (BioSysNet) ins Leben gerufen mit dem Ziel, lokale Expertise im Bereich der Systembiologie zu bündeln und ideale Forschungsbedingungen für die teil-

nehmenden Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler zu schaffen und nachhaltig zu etablieren. Die Kooperationen zwischen 24 herausragenden Forschungsgruppen an verschiedenen Universitäten in ganz Bayern sollen dabei helfen, einen umfassenden Einblick in die Regulation von lebenden Zellen und Zellsystemen zu erhalten. BioSysNet unter der wissenschaftlichen Koordination von Prof. Dr. Horst Domdey und der Geschäftsführung von Dr. Ulrike Kaltenhauser ist Teil des Bayerischen Forschungszentrums für Molekulare Biosysteme (BioSys^M). Ein Wissenschaftlicher Beirat, bestehend aus international anerkannten Experten auf diesem Gebiet, begleitet das Netzwerk seit seiner Entstehung und beim Fortschritt der Arbeiten.

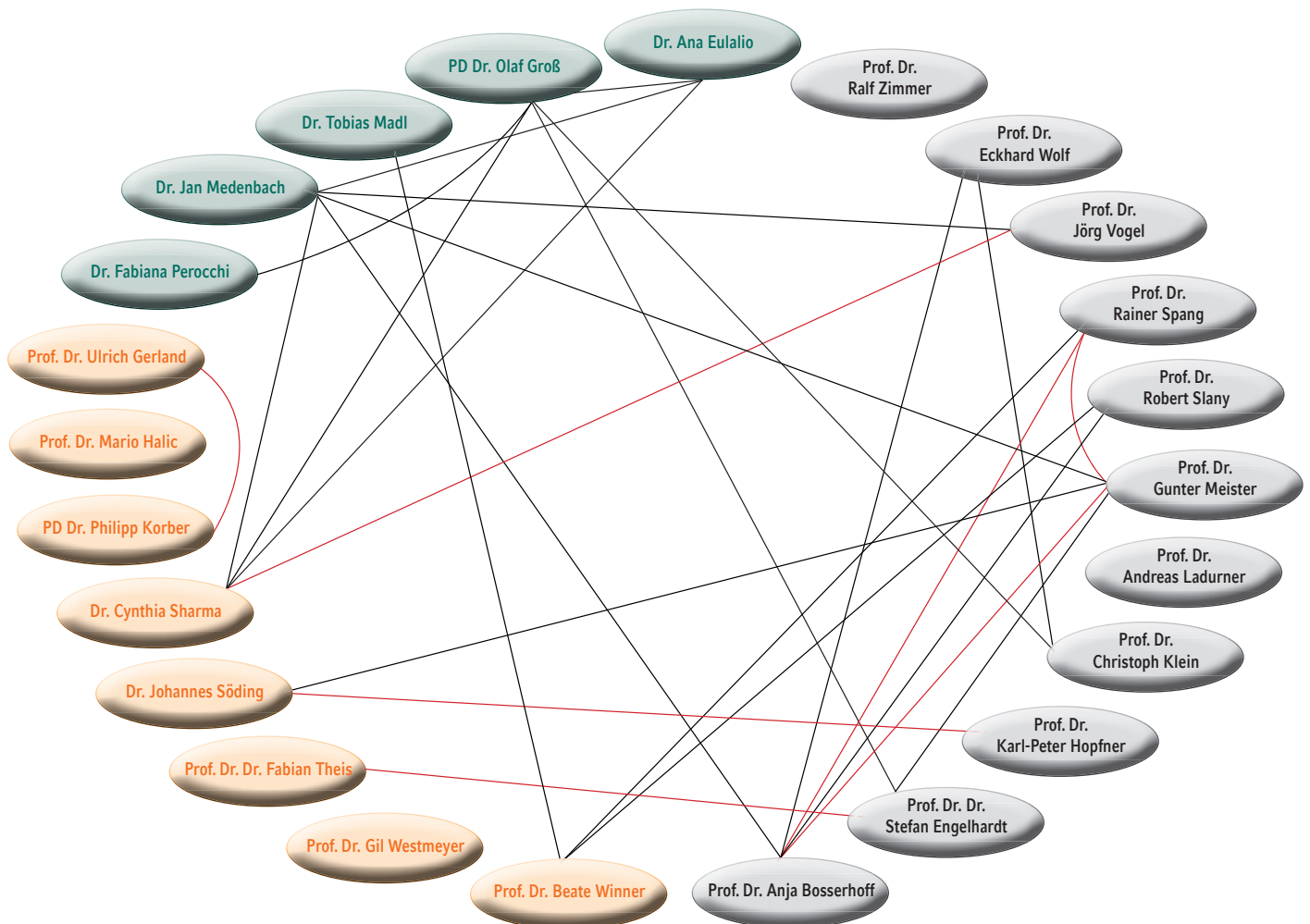


Abb. 1: Darstellung der Kooperationen innerhalb des Netzwerks. Grün sind reguläre Juniorgruppen, orange die assoziierten Juniorgruppen und grau die Seniorgruppen. Schwarze Verbindungslinien zeigen gemeinsame Kooperationen an, rote Linien zeigen gemeinsame Veröffentlichungen.

Heinrich A. Dittmar, Mitarbeiter der Geschäftsstelle
 Claudia Szeibert, Mitarbeiterin der Geschäftsstelle
 Gabriele Jeske, Mitarbeiterin der Geschäftsstelle



Die Forschungsgruppen des Netzwerks

► Die Systembiologie ist ein dynamisches und weitgehendes Feld der biotechnologischen Forschung. In den letzten Jahren wurden viele grundlegende Erkenntnisse gewonnen und bahnbrechende neue Technologien entwickelt. Insbesondere profitierten die Bereiche Diagnostik und Therapie von Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs und viele andere chronische Erkrankungen, von diesen neuen Entwicklungen. Die Förderung einzigartiger Spitzenprojekte in diesem Forschungsgebiet durch die Bayerische Staatsregierung soll solche Innovationen auch in Zukunft garantieren. Die besondere Struktur von BioSysNet, in dem sowohl neu gegründete unabhängige Juniorforschungsgruppen als auch bereits in Bayern etablierte Junior- und Seniorforschungsgruppen am Verständnis molekularer Biosystemen arbeiten, ist einzigartig.

Im Rahmen der Förderung erhalten fünf international ausgewiesene junge Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen die Möglichkeit, eine unabhängige Forschungsgruppe an Universitäten im Freistaat Bayern aufzubauen. Diese neuen Gruppen sind an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Dr. Ana Eulalio), an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Dr. Fabiana Perocchi), an der Technischen Universität München (Dr. Tobias Madl und PD Dr. Olaf Groß) sowie an der Universität Regensburg (Dr. Jan Medenbach) lokalisiert. Die neu gewonnenen Juniorgruppenleiter erhalten finanzielle Mittel in Höhe von jeweils bis zu 1,5 Millionen Euro über einen Gesamtförderzeitraum von fünf Jahren. Diese einmalige Chance wurde an die fünf besten Bewerber vergeben, die bereits an renommierten Forschungseinrichtungen im Ausland

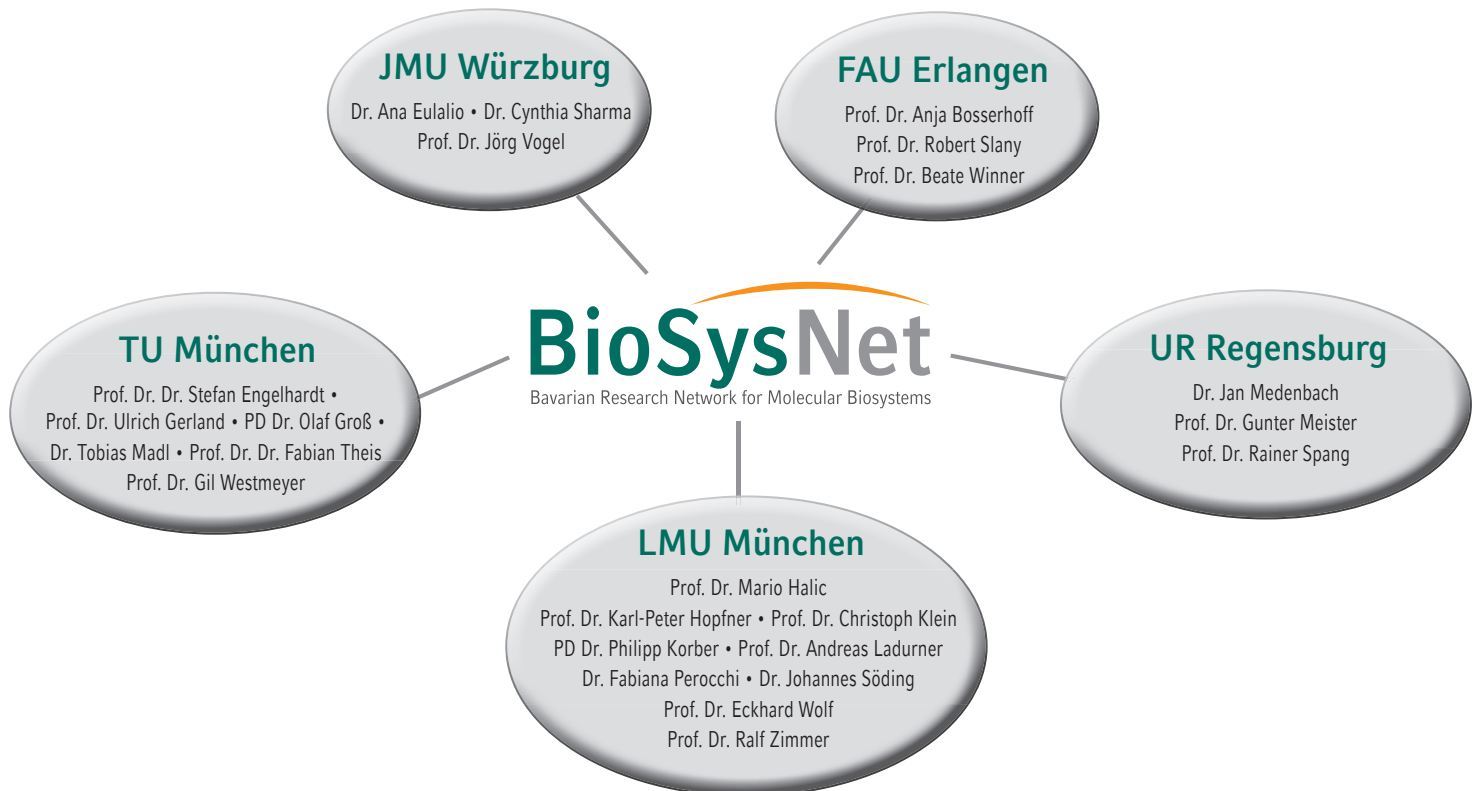


Abb. 2: Die Gruppen des Bayerischen Forschungsnetzwerks für Molekulare Biosysteme.



Erfahrungen und Expertise gesammelt hatten. Das Programm ermöglicht diesen talentierten und ambitionierten jungen Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern, ihre eigenen, unabhängigen Forschungsvorhaben zu realisieren. Darüber hinaus erhalten 19 assoziierte und bereits etablierte Forschungsgruppen in Bayern eine zusätzliche Finanzierung in Höhe von jeweils bis zu 250.000 Euro, ebenfalls über einen Zeitraum von fünf Jahren. Dies erlaubt ihnen, interessante Projektideen umzusetzen und relevante Technologien zu entwickeln. Zudem bieten diese assoziierten Gruppen für die neu gegründeten Juniorgruppen die Möglichkeit zu Kooperieren. Dies erleichtert ihnen den Start in den wissenschaftlichen Arbeitsalltag in Bayern. So finden diese leichter Anschluss an die internationale Forschungsgemeinschaft.

Seminare und Symposien, die über den Fortschritt der Projekte informieren, bilden die Basis für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung. Als essentielle Komponente des Netzwerkes steigern sie das Potenzial für den Austausch von Ideen und Erkenntnissen zwischen den Mitgliedern. Zudem sind alle geförderten Gruppen gleichermaßen eng mit ihrer aufnehmenden Hochschule assoziiert.

Verschiedene Einrichtungen unter einem Dach

► Die Entwicklungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass sich der Fokus in der Genomforschung zunehmend in Richtung Verständnis komplexer Systeme verschiebt. Ausgehend von den wissenschaftlichen Fragestellungen: „Wie ist die Genexpression reguliert? Welche Komponenten eines biologischen Systems sind für dessen Funktionsweise relevant? Wie interagieren diese Komponenten miteinander? Wie reagiert das System als Ganzes, wenn es unverändert bleibt oder auch gestört wird?“ ... versucht BioSysNet diesem Aspekt Rechnung zu tragen.

Die Geheimnisse des Lebens zu beantworten, ist schon seit jeher ein zentrales Anliegen der Biowissenschaften; aktuell wachsen die Möglichkeiten, die einzelnen Komponenten, Interaktionen und Störungen auf molekularer Ebene mit hoher Auflösung zu untersuchen. Um das wissenschaftliche Blickfeld in der Systembiologie zu erweitern, ist es unumgänglich, sowohl akademische, als auch institutionelle Grenzen zu überwinden. Deshalb vereint das interdisziplinäre Vorhaben Fachbereiche wie Biologie, Biochemie, Chemie, Medizin, Physik, Mathematik und Informatik. Die kontinuierliche Entwicklung wichtiger Technologien spielt eine ebenso zentrale Rolle wie die Interpretation komplexer Interaktionen mit Hilfe bereits etablierter analytischer Methoden. BioSysNet hat das Ziel, neben den einzelnen Funktionen und Abläufen in Zellen und Organismen, auch Funktionsstörungen der Systeme, wie sie zum Beispiel im Krankheitsfall auftreten, aufzuklären und zu verstehen. Durch die gemeinsame Diskussion der Ergebnisse und den regelmäßigen Austausch im Rahmen des Netzwerkes kann die Bearbeitungsdauer für wissenschaftliche Fragestellungen erheblich verkürzt werden.

Ausblick

► Die Forschung im Bereich der Biowissenschaften und der Biotechnologie im Freistaat Bayern ist bereits heute außerordentlich leistungsstark und nimmt eine führende Rolle im europäischen Vergleich ein. Durch das Bayerische Forschungsnetzwerk für Molekulare Biosysteme sind neue Erkenntnisse in diesem Forschungsfeld zu erwarten. Förderprogramme, wie sie mit BioSysNet verwirklicht werden, tragen dazu bei, dass Bayern durch die Implementierung neuer Forschungsmethoden und technischer Innovationen im internationalen Wettbewerb Schritt halten kann. Die effiziente Bündelung der Forschungskompetenzen ermöglicht einen schnellen und reibungslosen Wissens- und Technologietransfer und fördert die Gründung neuer Unternehmen. Um die Spitzenstellung im europäischen Vergleich in den Lebenswissenschaften und der Medizin halten zu können, müssen rechtzeitig dafür notwendige Strukturen in der Wissenschaft geschaffen und dynamische Entwicklungsprozesse vorangetrieben werden. Nur so wird es uns gelingen, die großen Herausforderungen in der Zukunft zu meistern.

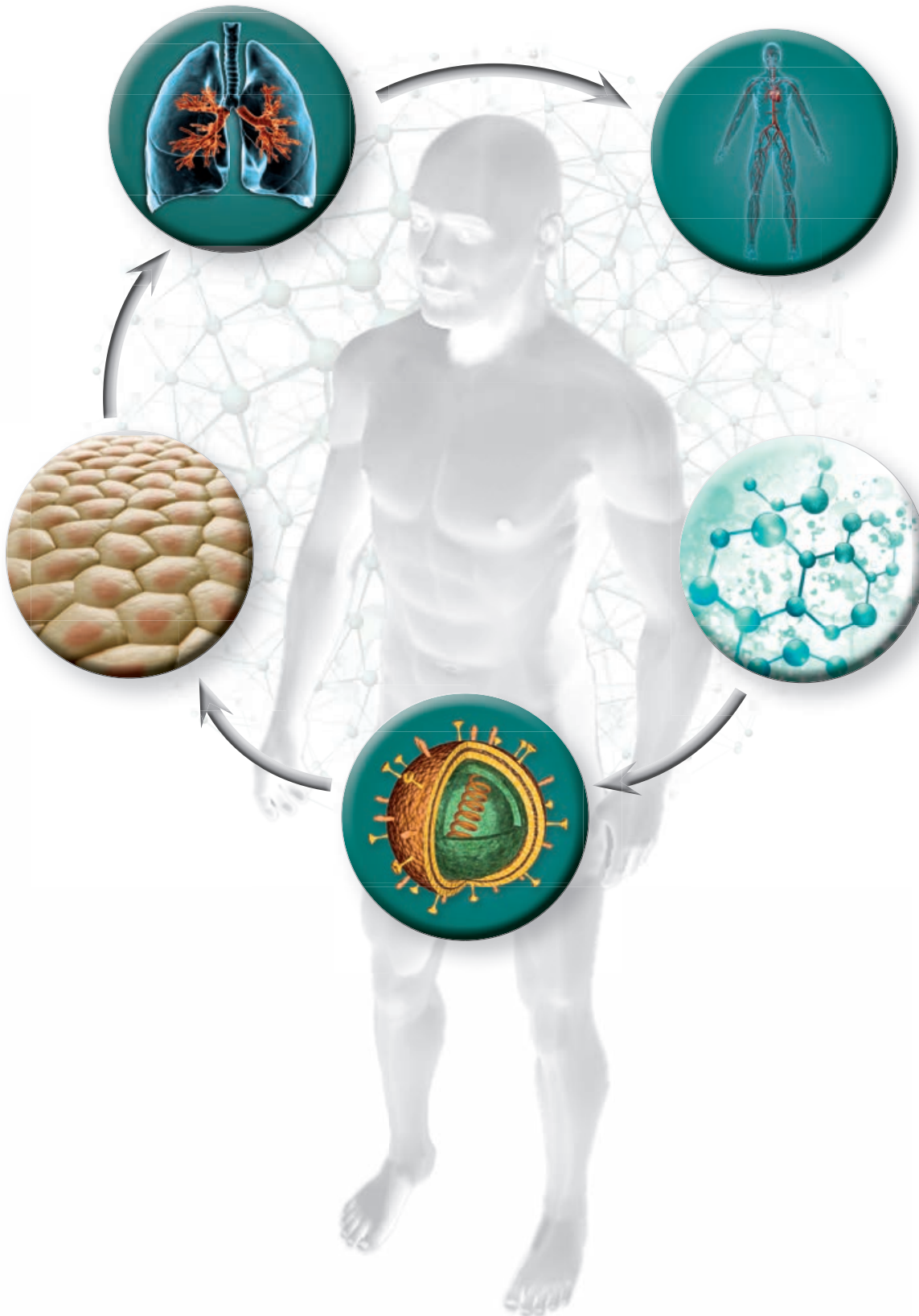


Abb. 3: Molekulare Biosysteme: Verstehen von komplexen Systemen ausgehend von der Zelle bis zum gesamten Organismus.



RNA: Die fehlende Verbindung in der bakteriellen Pathogen-Wirt-Interaktion

Entschlüsselung noch unbekannter Rollen der RNA im Zwischenspiel von bakteriellen Pathogenen und Säugerzellwirten

Dr. Ana Eulalio

Institut für Molekulare Infektionsbiologie (IMIB), Julius-Maximilians-Universität Würzburg
ana.eulalio@uni-wuerzburg.de

Einleitung

► Obwohl die große Mehrheit der Bakterien ungefährlich und sogar nützlich für den Säugerwirt ist, stellen pathogene Bakterien eine beträchtliche Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar und sind eine der Hauptursachen für die weltweite Mortalität und Morbidität. Während einer Infektion manipulieren bakterielle Pathogene eine große Anzahl von Wirtszellfunktionen um ihr Überleben und ihre Vermehrung zu sichern. Bakterielle Pathogene induzieren u.a. die Reorganisation des Wirtszell-Zytoskeletts und manipulieren Signalübertragungswege, den Membranverkehr und die pro-inflammatorische Antwort der Wirtszelle. Allerdings ist es eine weitestgehend unbeantwortete Frage im Zwischenspiel von Wirtszelle und Pathogenen, inwieweit die bakterielle Infektion einen Einfluss auf den Wirtszell-RNA-Stoffwechsel hat und wie die Konsequenzen für den bakteriellen Lebenszyklus aussehen. Ein funktionierender RNA-Stoffwechsel ist essentiell für eine Anzahl wesentlicher Wirtszellfunktionen und daher ist es nicht überraschend, dass Pathogene ausgeklügelte Strategien entwickelt haben um diese Signalwege zu ihrem eigenen Vorteil zu unterwandern.

Ziele des Projektes

► MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende RNAs die eine wichtige Rolle in der post-transkriptionalen Kontrolle der Genexpression und in vielen weiteren biologischen Prozessen spielen. Zunehmend wird die Regulation der Expression von miRNAs sowohl als ein wesentlicher Teil der Wirtsantwort auf die Infektion durch bakterielle Pathogene wahrgenommen, als auch als neue molekulare Strategie von Bakterien um Wirtszellsignalwege zu manipulieren.

Das Hauptziel unserer Forschung ist es einen umfassenden Überblick über die Rolle von miRNAs während der Infektion mit bakteriellen Pathogenen wie z.B. *Salmonella Typhimurium* und *Shigella flexneri* zu erhalten. Diese fakultativ intrazellulären Bakterien gehören zu den Pathogenen die die höchsten Letalitätsraten durch Lebensmittelbedingte Krankheiten verursachen. Um die Interaktion zwischen der Infektion mit *Salmonella Typhimurium* oder *Shigella flexneri* und den Wirtszell-miRNAs zu untersuchen, haben wir systembiologische Ansätze, insbesondere Hochdurchsatz-Screening und Deep-Sequencing, angewandt. Durch den Vergleich der so erzielten Ergebnisse haben wir entdeckt, dass *Salmonella* und *Shigella* Infektionen durch ein bestimmtes Set von Wirts-miRNAs reguliert werden. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die identifizierten miRNAs verschiedenen Stadien der Infektion wie Adhäsion, Invasion, Replikation und interzelluläre Ausbreitung beeinflussen.

Die Identifizierung von miRNAs und nachgeschalteter Signalwege die die Infektion kontrollieren, wird maßgeblich zur Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze gegenüber pathogenen Bakterien sein, entweder durch die Modulation der ausgewählten miRNAs oder ihrer Zielgene. Zusätzlich zur Rolle von miRNAs in der Interaktion zwischen Säugerzellen und bakteriellen Pathogenen gibt es weitere unterschiedliche Aspekte des Wirtszell-RNA-Stoffwechsels die im Kontext von bakteriellen Infektionen noch vollständig untersucht werden müssen. Diese beinhalten den Zusammenhang von bakteriellen Infektionen und RNA Granula, insbesondere P-Körperchen und Stress-Granula; zwei Strukturen die von wesentlicher Wichtigkeit für das Gleichgewicht des Wirtszell-RNA-Stoffwechsels sind.

Die fortlaufende Arbeit in meiner Forschungsgruppe zielt drauf ab ein besseres Verständnis von der Interaktion zwischen bakteriellen Pathogenen und Wirtszell-RNA-Granula zu erhalten. Ultimatives Ziel ist die Verbesserung des derzeitigen Verständnisses wie bakterielle Pathogene die Wirtszell-RNA-Stoffwechsel-Signalwege manipulieren.

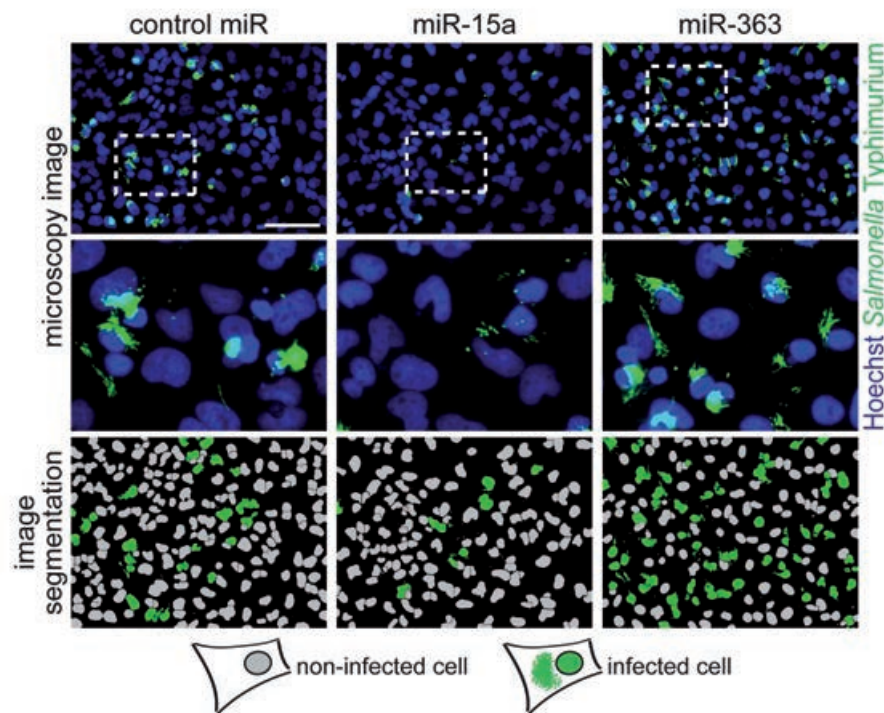


Abb. 1: MicroRNAs regulieren die Salmonellen Infektion.

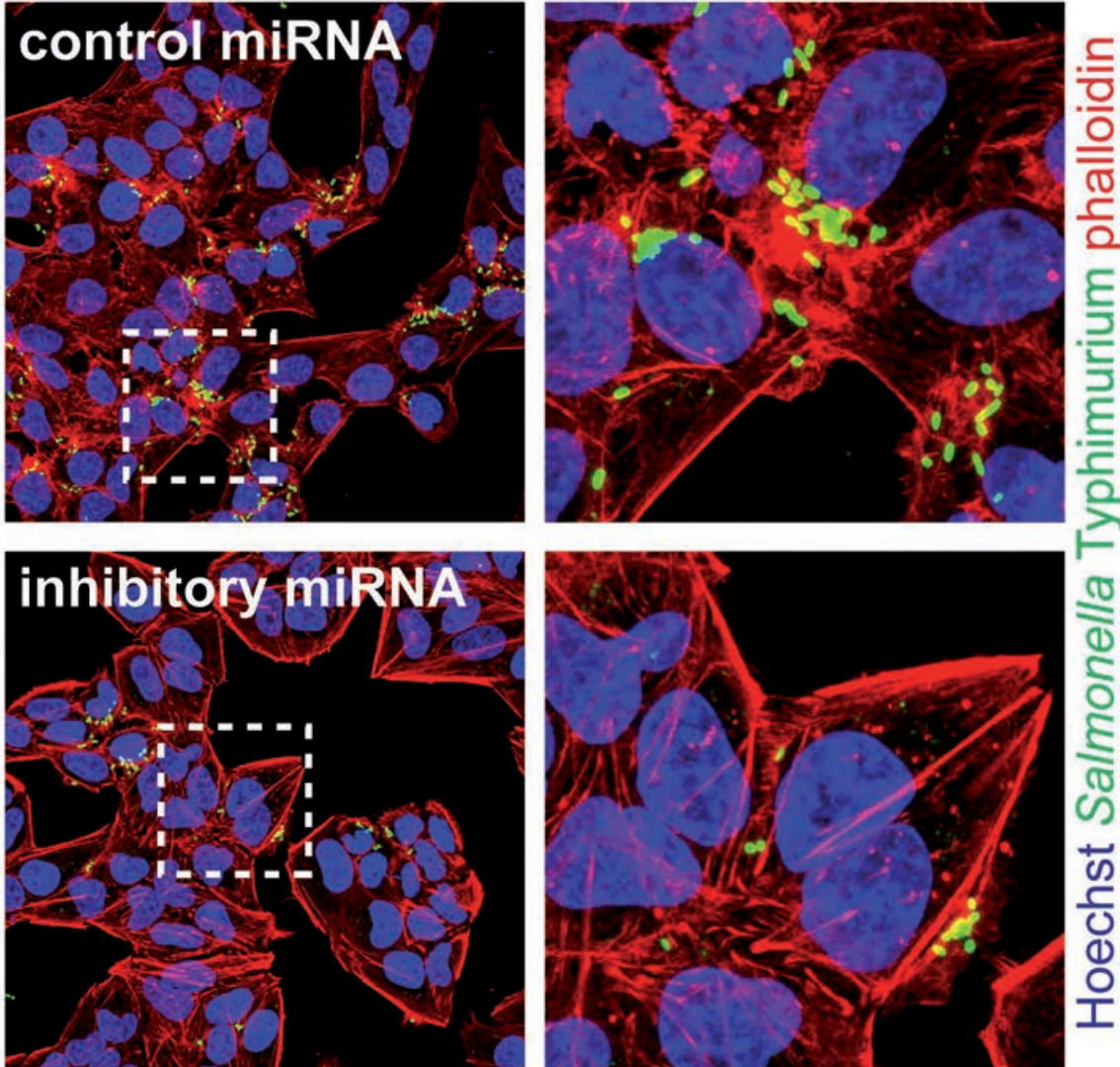


Abb. 2: Inhibition der Invasion von Säugerzellen durch Salmonellen mittels ausgewählter microRNAs.

Kooperationspartner

Dr. Miguel Mano,
International Centre for Genetic
Engineering and Biotechnology
(ICGEB), Trieste, Italy

UC-BIOTECH, Center for Neuro-
science and Cell Biology (CNC),
University of Coimbra, Coimbra,
Portugal

Prof. Dr. Jörg Vogel,
Institut für Molekulare Infektions
Biologie, Universität Würzburg,
Deutschland

Dr. Cynthia Sharma,
Zentrum für Infektionsforschung
ZINF, Universität Würzburg,
Deutschland

Dr. Jan Medenbach,
Universität Regensburg,
Deutschland

Zusammenfassung und Ausblick

► Insgesamt werden wir durch die Untersuchung wie bakterielle Pathogene mit dem RNA-Stoffwechsel der Säugerwirtszelle interferieren, und ob wir die RNA-abhängigen Signalwege manipulieren können, um einer bakteriellen Infektion entgegen zu wirken, das derzeitige Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion signifikant verbessern.

Darüber hinaus stellt unsere Arbeit den Nutzen von Systembiologischen Ansätzen heraus und zeigt dessen Potential zur Identifizierung neuer molekulare Signalwege mit dem das komplexe Zwischenspiel von Wirtszellen und bakteriellen Pathogenen beherrschbar wird.

Ausgewählte Publikationen

1. Maudet C, Mano M, Sunkavalli U, Sharan M, Giacca M, Forstner KU, Eulalio A (2014) Functional high-throughput screening identifies the miR-15 microRNA family as cellular restriction factors for Salmonella infection. *Nature Communications* 5: 4718.
2. Maudet C, Mano M, Eulalio A (2014) MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. *FEBS Letters* 588: 4140-4147.
3. Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M (2012) Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492: 376-381.
4. Schulte LN, Eulalio A, Mollenkopf HJ, Reinhardt R, Vogel J (2011) Analysis of the host microRNA response to Salmonella uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. *EMBO Journal* 30: 1977-1989.
5. Eulalio A, Frohlich KS, Mano M, Giacca M, Vogel J (2011) A candidate approach implicates the secreted Salmonella effector protein SpvB in P-body disassembly. *PLoS One* 6: e17296.



Mechanismen und Auswirkungen der Inflammasom-abhängigen Proteinausschüttung

Grundlagenforschung zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen – bedside to bench and back

PD Dr. Olaf Groß

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München

olaf.gross@tum.de

Einleitung

► Entzündungen sind ein wesentlicher Teil der Immunreaktion, können aber auch die Gewebe unseres Körpers schädigen oder sogar zerstören. Letzteres ist vor allem dann der Fall, wenn Entzündungen chronisch werden. Das kann mehrere Gründe haben: Zum ersten kommt es vor, dass das Immunsystem ein Problem erkennt, aber nicht lösen kann. Ein Beispiel hierfür ist Asbest. Eingeatmete Asbestfasern können von unserem Körper weder ausgestoßen noch abgebaut werden. Die mineralischen Fasern werden jedoch als Fremdkörper erkannt und aktivieren Immunzellen in der Lunge, so dass sich eine chronische Entzündungsreaktion entwickelt, die wiederum zur Entstehung von Krebs beitragen kann. Ähnlich ist es auch mit Harnsäurekristallen, die in den Gelenken von Gicht-Patienten vorkommen und ebenfalls eine chronische Entzündung auslösen, die bei den Patienten erhebliche Schmerzen verursacht. Eine zweite Möglichkeit ist, dass das Immunsystem gegen einen harmlosen Aktivator überreagiert. Hier ist die Interaktion mit der Darmflora ein gutes Beispiel. Eine überschießende Immunreaktion gegen die normalerweise im Darm vorkommenden und von den meisten Menschen tolerierten Bakterien führt bei manchen Patienten zu entzündlichen Darmerkrankungen wie z. B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Schließlich gibt es Erbkrankheiten, bei denen das

Immunsystem auch ohne einen äußeren Auslöser eine Reaktion startet. Bei solchen Erkrankungen entwickeln die Patienten z.B. einen spontanen Hautausschlag, Fieber und lokale Entzündungen in verschiedenen Organen. Die schwierige Situation für diese Patienten änderte sich erst vor wenigen Jahren, und zwar als direkte Folge der Entschlüsselung des menschlichen Erbguts um das Jahr 2001. Dabei wurde klar, dass viele dieser Patienten eine Mutation im Gen NLRP3 tragen. Es stellte sich heraus, dass das von NLRP3 kodierte Protein in Zellen des Immunsystems einen Komplex mit den Proteinen ASC und Caspase-1 bildet und die Ausschüttung des Botenstoffs Interleukin-1beta (IL-1 β) kontrolliert. IL-1 β ist ein hochpotentes Pyrogen, das heißt, es löst lokale Entzündungen und systemische Fieberreaktionen aus. Der Komplex aus NLRP3, ASC und Caspase-1 wird heute als Inflammasom bezeichnet. Durch diese bahnbrechenden Ergebnisse in der Grundlagenforschung konnte für diese Patienten eine Therapie entwickelt werden, die in der Neutralisation von IL-1 β , z. B. durch gegen IL 1 β gerichtete Antikörper besteht. Heute wissen wir, dass das Inflammasom auch durch die erwähnten Asbestfasern und Gicht-auslösenden Harnsäurekristalle, sowie durch verschiedenste Pathogene aktiviert wird und dadurch eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielt. Die Liste der mit dem Inflammasom in Verbindung gebrachten Krankheiten weist heute ein weites Spektrum auf und umfasst

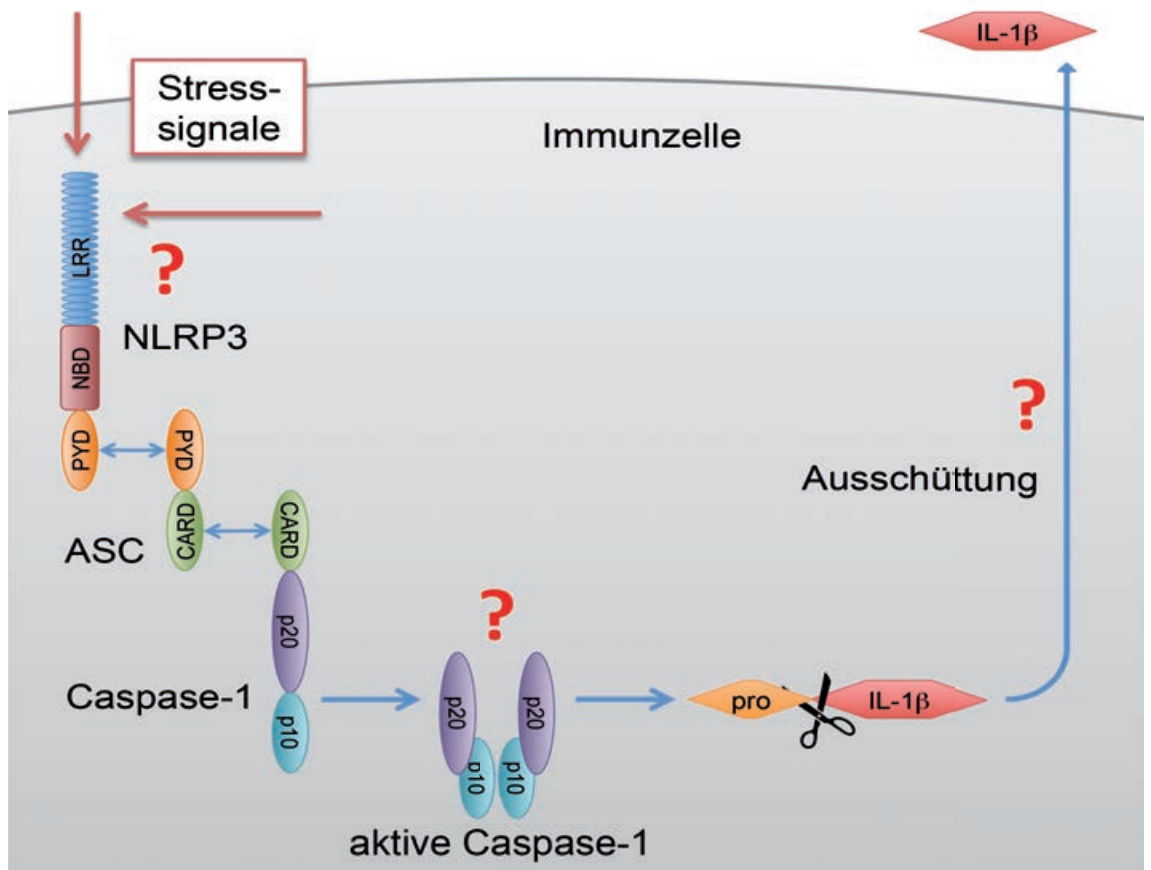
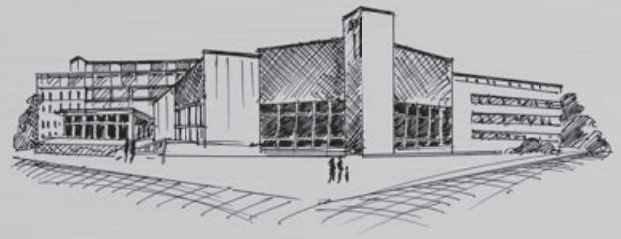


Abb. 1: Schematische Darstellung des Inflammasoms in Zellen des Immunsystems. Details, siehe Text. Die Fragezeichen markieren die im Text benannten Fragestellungen.



Arthritis, Arteriosklerose, Diabetes, Tumorerkrankungen und neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Multiple Sklerose. Es ist erstaunlich, dass so viele und unterschiedliche Erkrankungen mit demselben zellulären Grundmechanismus, nämlich dem Inflammasom, in Zusammenhang stehen sollen. Eine Erklärung dafür ist, dass NLRP3 wahrscheinlich als Sensor für zellulären Stress fungiert. Die Überproduktion von Sauerstoffradikalen trägt ebenso wie die Schädigung der Zellmembran zur NLRP3-Aktivierung bei. Damit stellt das Inflammasom eine mögliche mechanistische Erklärung dafür dar, wie andauernder Gewebstress zu Folgeerkrankungen führen kann.

Ziele, Ergebnisse und Perspektiven

► Die Behandlung von mit dem Inflammasom in Verbindung gebrachten Erkrankungen baut wie erwähnt zur Zeit in erster Linie auf dem Abfangen von IL-1 β auf. Das geschieht durch sogenannte rekombinante Proteine, die dem Patienten gespritzt werden. Dies stellt zwar eine sehr erfolgreiche und elegante, aber auch eine sehr teure Lösung dar, denn rekombinante Proteine sind in der Herstellung sehr kostenintensiv. Außerdem müssen sie, je nach Medikament, zum Teil täglich gespritzt werden, was gerade für Kinder sehr unangenehm ist. Daher erscheint es wünschenswert, die Produktion von IL-1 β zu verhindern, bevor es die Ursprungszelle verlässt. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes versuchen wir die molekularen Grundlagen für eine solche Therapie zu erarbeiten. Dabei beschäftigen wir uns mit 3 Kernfragestellungen: Zunächst versuchen wir zu verstehen, wie zellulärer Stress molekular von NLRP3 wahrgenommen wird. Zweitens wollen wir entschlüsseln, wie das Inflammasom durch seine Komponente Caspase-1 die Ausschüttung von IL-1 β kontrolliert. Schließlich interessieren wir uns dafür, wie der Ausschüttungsmechanismus von IL-1 β generell aussieht und abläuft und welche anderen Proteine neben IL-1 β ebenfalls über diesen Mechanismus ausgeschleust werden. Zu letzterem Aspekt konnten wir bereits zeigen, dass das Inflammasom durch Caspase-1 auch die Freisetzung von IL-1 α , dem Schwesterprotein von IL-1 β steuern kann. Dies ist erstaunlich, da IL-1 α im Gegensatz IL-1 β kein direkter Interaktionspartner von Caspase-1 ist. Bisher wurde angenommen, dass nur Proteine, die direkt an Caspase-1 binden (und von dieser geschnitten werden, siehe Abbildung 1) durch das Inflammasom ausgeschüttet werden können. Das bedeutet allgemein, dass noch weitere, bisher nicht beachtete Proteine zur Pathogenese beitragen könnten. Konkret bedeutet es, dass durch die Neutralisation von IL-1 β alleine Inflammasom-abhängige Entzündungen unter Umständen nicht effektiv behandelbar sind. In der Tat scheint dies bei einigen der durch Mutationen in NLRP3 erkrankten Patienten der Fall zu sein. Weiterhin eröffnet der Befund, dass Caspase-1 die Ausschüttung von nicht-Interaktionspartner steuern kann, neue wertvolle Einblicke in den Funktionsmechanismus von Caspase-1 selbst. Diese Erkenntnisse haben bereits auf die Entwicklung neuer Therapien Einfluss genom-

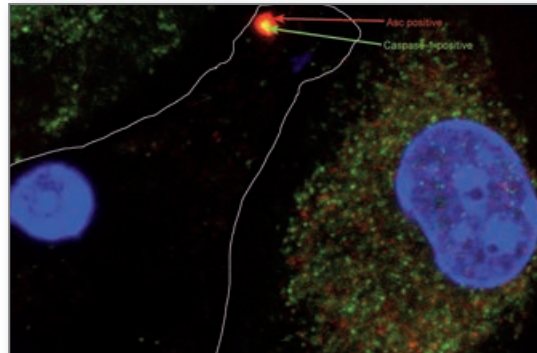


Abb. 2: Konfokalmikroskopie zeigt, dass Inflammasomaktivierung die zelluläre Lokalisation seiner Komponenten in der Zelle verändert. In einer ruhenden Zelle (rechts), sind ASC (rot) und Caspase-1 (grün) relativ gleichmäßig verteilt, liegen aber getrennt voneinander vor. Nach Aktivierung des Inflammasoms (links) formt ASC einen großen, unlöslichen Komplex, in dem auch Caspase-1 zu finden ist (gelb, Kolokalisation). Zur besseren Sichtbarkeit wurde der Umriss der aktivierten Zelle weiß markiert.

men. Darüber hinaus konnten wir neue Einblicke in die Mechanismen gewinnen, die zellulären Stress mit der Aktivierung des Inflammasoms verbinden. Es zeigte sich, dass die Schädigung der Zellmembran einen direkten Einfluss auf den Energiehaushalt der Zelle hat, was wiederum zur Aktivierung von NLRP3 beiträgt. Wir hoffen, dass diese Befunde neue Möglichkeiten zur gezielten Dämpfung von Zellstress und damit zur Verminderung von Entzündungen eröffnen. Zellschädigung und die Bildung von Sauerstoffradikalen sind direkt und über die Induktion von Entzündungen an der schleichenden Pathogenese vieler Erkrankungen sowie an Alterungsprozessen beteiligt. Bessere Einblicke in die molekularen Verbindungen von Stress, Radikalbildung und Entzündung sollten weitreichende Implikationen für Therapie und Prävention mit sich bringen.

Ausgewählte Publikationen

1. Neumann K, Castiñeiras-Vilariño M, Höckendorf U, Haneschläger N, Lemeer S, Kupka D, Meyermann S, Lech M, Anders HJ, Kuster B, Busch DH, Gewies A, Naumann R, Groß O, Ruland J. (2014) Clec12a is an inhibitory receptor for uric acid crystals that regulates inflammation in response to cell death. *Immunity*. 40(3):389-99.
2. Schweneker K, Gorka O, Schweneker M, Poeck H, Tschopp J, Peschel C, Ruland J, and Groß O. (2012) The mycobacterial cord factor adjuvant analogue trehalose-6,6'-dibehenate (TDB) activates the Nlrp3 inflammasome. *Immunobiology*. 218(4):664-73.
3. Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G, Quadroni M, Drexler SK, and Tschopp J (2012). Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity*. 36(3):388-400.
4. Groß O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Haneschläger N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mocsai A, Tschopp J, Ruland J (2009) Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 459(7245): 433-436.
5. Groß O, Gewies A, Finger K, Schafer M, Sparwasser T, Peschel C, Forster I, Ruland J (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442(7103): 651-656.

Kooperationspartner

Dr. Fabiana Perocchi, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Prof. Dr. Stefan Engelhardt, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Technische Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Christoph Klein, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Dr. Tobias Madl, Department Chemie, Technische Universität München, Deutschland

apceth GmbH & Co. KG, München, Deutschland

Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Biberach an der Riß, Deutschland

Adipogen AG, Liestal, Schweiz



© Andreas Heddergott / TUM

Ordnung in die Unordnung!

Strukturbiologische Untersuchung von Netzwerken ungeordneter Proteine und deren (Fehl)Regulation

Dr. Tobias Madl

Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie, Technische Universität München
t.madl@tum.de

Einleitung

► “Funktion erfordert Struktur” - das ist eine gängige Meinung in der Strukturbiologie. In der Tat müssen die meisten Proteine eine definierte dreidimensionale Struktur annehmen um ihre Funktion auszuüben. Ein großer Anteil des Genoms aller Organismen kodiert jedoch Proteine die, vollständig oder teilweise, keine definierte dreidimensionale Struktur annehmen aber dennoch wichtig für die Zellfunktion sind: die sogenannten intrinsisch unstrukturierten Proteine (engl. *intrinsically disordered proteins* IDPs). Angesichts ihrer Häufigkeit in menschlichen Krankheiten gibt es keinen Zweifel, dass diese Proteine bevorzugte Ziele in der Medikamentenentwicklung sind. Um diese Proteine in der Regel zu verstehen und Strategien zu liefern um deren Interaktionen für die Behandlung von Krankheiten zu modulieren, ist strukturelle Charakterisierung von IDPs und ihren biologischen Komplexen der Schlüssel.

Wir konzentrieren uns auf IDPs im Schnittpunkt der Wnt- und Insulin-Signalwege, welche grundlegende Prozesse in der Entwicklung von Zellen regulieren, und zur Entwicklung von Krankheiten beitragen. Neure Arbeiten haben gezeigt, dass die Regulation dieser Proteine einen komplizierten “Code” zahlreicher post-translatinaler Modifikationen (PTM) und Bindung einer Vielzahl von Co-Faktoren beinhaltet. Deregula-

tion dieser Proteine, einschließlich Einzelpunkt-Mutationen und Veränderungen in den Signalwegen, führt zu Krebs, Diabetes und Alterung. Trotz ihrer großen Bedeutung sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch weitgehend unbekannt. Dies liegt vor allem an ihrer strukturellen Flexibilität, was die Strukturanalyse durch herkömmliche Ansätze erschwert.

Ziel des Projektes

► Das zentrale Ziel des Projekts ist es, die strukturellen Anforderungen der Bindung zwischen strukturierten Proteinen (d.h. β -Catenin) und den unstrukturierten Regionen von Axin-1, APC, LEF-1 (Wnt) und FOXO4 (Insulin-Signalweg) zu identifizieren. Angesichts der Bedeutung dieser Proteine in menschlichen Krankheiten werden unsere Ergebnisse wesentliche strukturelle und funktionelle Daten für das Verständnis der Krankheit beitragen. IDPs und deren Komplexe sind sehr dynamisch und anspruchsvoll für konventionelle Techniken und müssen unter nativen Bedingungen untersucht werden. Deshalb verwenden wir unseren neu entwickelten multidisziplinären Ansatz, in dem wir Kernresonanzspektroskopie (NMR), Kleiwinkelröntgen/Neutronenstreuung (SAXS/SANS) und Modellierungsstrategien kombinieren, um die struk-

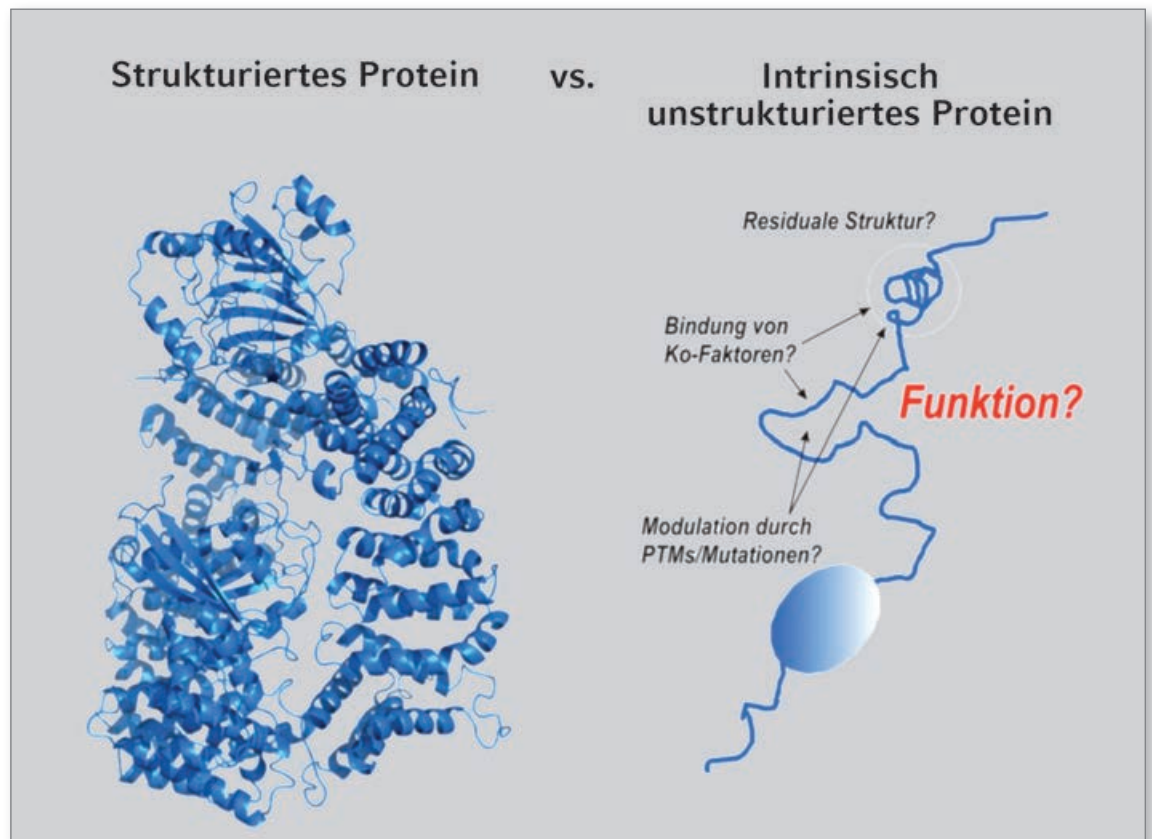


Abb. 1: Strukturierte vs. unstrukturierte Proteine.

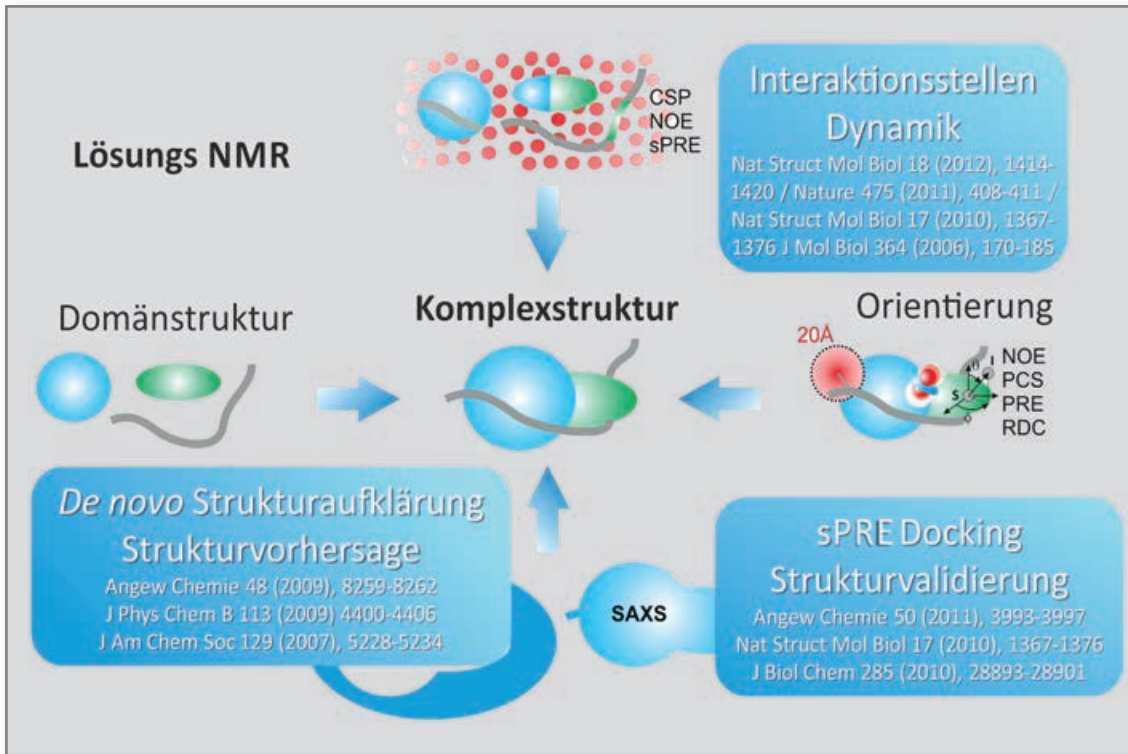


Abb. 2: Multidisziplinärer Ansatz zur Strukturaufklärung.

turellen Eigenschaften dieser krankheits-relevanten IDPs isoliert und im Komplex mit ihren gefalteten Protein-Cofaktoren, sowie die Modulation der IDP-Struktur und -Wechselwirkungen durch Modifikationen (PTMs, Mutation) untersuchen zu können.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Die molekularen Mechanismen, wie IDPs als Interaktionsplattformen für eine Vielzahl an Partnern fungieren, sind noch lange nicht verstanden. Wir erwarten, dass unsere Ergebnisse die Basis für eine neue Generation von Biomarkern zur Früherkennung setzen und es ermöglichen, neue Wege zur Entwicklung personalisierter Anti-Krebs Medikamente gegen Defekte der Wnt- und Insulin-Signalwege zu entwickeln.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Zusammenfassend kombinieren wir einen neuen, multidisziplinären Ansatz zur Strukturbestimmung mit der höchst relevanten Biologie der IDPs der Wnt und Insulin-Signalwege, um eine effiziente Verbindung von *in vitro* strukturellen und Interaktionsdaten und *in vivo* Biologie und umgekehrt zu ermöglichen. Dies ist der Schlüssel zum Verständnis dieser Proteine im Allgemeinen und bietet Ansätze, diese Interaktionen für die Behandlung von Krankheiten zu modulieren.

Ausgewählte Publikationen

1. Lorenz O., Freiburger F., Rutz D., Krause M., Zierer B., Alvira A., Cuéllar J., Valpuesta J.M., Madl T., Sattler M., Buchner J., Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein, *Molecular Cell* 53 (2014) 941-953.
2. Karagöz G.E., Duarte A.M.S., Akoury E., Ippel H., Biernat J., Luengo T.M., Radli M., Didenko T., Nordhues B.A., Veprintsev D.P., Dickey C., Mandelkow E., Zweckstetter M., Boelens R., Madl T., Rüdiger S.G.D., Hsp90-Tau complex reveals molecular basis for specificity in chaperone action, *Cell* 156 (2014) 963-974.
3. Göbl C., Madl T., Simon B., Sattler M., NMR approaches for structural analysis of multidomain proteins and complexes in solution, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 80 (2014) 26-63.
4. Putker M., Madl T., Vos H.R., de Ruiter H., Visscher M., van den Berg M.C.W., Kaplan M., Korswagen H.C., Boelens R., Vermeulen M., Burgering B.M.T., Dansen T.B., Redox-dependent control of FOXO/DAF-16 by transportin-1, *Molecular Cell* 49 (2013), 730-742.
5. Dormann D., Madl T., Valori C.F., Bentmann E., Tahirovic S., Abou-Ajram C., Kremmer E., Ansorge O., Mackenzie I.R.A., Neumann M., Haass C., Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS, *EMBO Journal* 12 (2012), 4258-4275.

Kooperationspartner

Prof. Boudewijn Burgering, Prof. Tobias Dansen, Molecular Cancer Research, University Medical Center Utrecht, Niederlande

Prof. Madelon Maurice, Cell Biology, University Medical Center Utrecht, Niederlande

Dr. Dorothee Dormann, Prof. Christian Haass, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Prof. Frank Gabel, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Institut Laue-Langevin (ILL), Grenoble, Frankreich

Prof. Michael Sattler, Biomolecular NMR, Technische Universität und Helmholtz Zentrum München, Deutschland

PD Dr. Olaf Groß, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Beate Winner, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung IZKF, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland



Die Regulation der eukaryotischen Translation

Wie viele unterschiedliche Proteine gibt es und wie wird ihre Synthese kontrolliert?

Dr. Jan Medenbach

Fakultät für Biologie und
Vorklinische Medizin,
Universität Regensburg

Jan.Medenbach@vkl.uni-regensburg.de

Projektbeschreibung

► Die Sequenzierung der genetischen Information des Menschen und einer Reihe weiterer Organismen war ein Meilenstein der Lebenswissenschaften und erlaubte nicht nur tiefe wissenschaftliche Einblicke sondern auch medizinischen Fortschritt. Noch immer aber beschäftigt uns eine wichtige Frage: Wie können aus der limitierten genetischen Information und der relativ kleinen Anzahl an Genen so komplexe und vielfältige Organismen entstehen?

Der Schlüssel dazu liegt in der unterschiedlichen Regulation der Gene und ihrer Produkte. Die Regulation der Genexpression ist äußerst komplex und plastisch und auch wenn ihre Grundlagen bereits aufgeklärt sind, so fehlt uns doch ein Verständnis des gesamten, komplexen Netzwerkes. Unser Hauptinteresse gilt einem wichtigen Schritt der Genexpression, der Synthese von Proteinen basierend auf einer RNA Sequenz: Der Translation.

Die Translation bildet die Schnittstelle zwischen zellulärer RNA (dem Transkriptom) und Proteinen (dem Proteom). Dabei dient die RNA als Anleitung für die Synthese von Proteinen durch Ribosomen, hochkomplexe Maschinen, die in allen bekannten Lebewesen vorkommen. Ursprünglich wurde angenommen, dass auf Ebene der Translation nur wenig Regulation stattfindet, heute jedoch verstehen wir, dass die Translationskontrolle weit verbreitet ist und einen zentralen Regulationsmechanismus der Genexpression darstellt. Sie erlaubt nicht nur eine zeitliche Regulation der Pro-

teinsynthese, sondern auch hochaufgelöste, räumliche Kontrolle. Damit ist sie essentiell für eine Vielzahl von biologischen Prozessen von der frühen Embryonalentwicklung (frühe Anlage der Körperachsen) bis hin zur Funktion unseres Nervensystems (Ausbildung und Plastizität der Synapsen).

Um tiefere Einblicke in die Regulation der Translation zu bekommen, verwenden wir die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus, in der wir die molekulare Funktion des Translations-Repressorproteins ‚Sex lethal‘ untersuchen. Dieses Protein ist ein wichtiger Regulator der Genexpression und ein genaueres Verständnis seiner Wirkungsweise erlaubt uns auch Rückschlüsse auf die Regulation der Translation im Menschen. Unser Interesse gilt insbesondere dem Zusammenspiel von ‚Sex lethal‘ (und einem nahe verwandten Protein) mit einer Klasse an genetischen Elementen – sogenannten ‚upstream open reading frames‘ (uORFs). uORFs befinden sich noch vor der eigentlichen Startstelle für die Proteinsynthese und ihre regulatorischen Eigenschaften wurden erst vor einigen Jahren erkannt. In letzter Zeit wurden immer mehr Beispiele entdeckt, bei denen uORFs eine fundamentale Rolle bei der Kontrolle der Expression unterschiedlichster Proteine spielen und so ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen von uORFs zur Entstehung einer Reihe von Krankheiten beitragen, wie z.B. Morbus Alzheimer, hereditäre Thrombocythämie und unterschiedliche Typen von Krebsleiden.



Abb. 1: Das Medenbachlabor (www.medenbachlab.de).

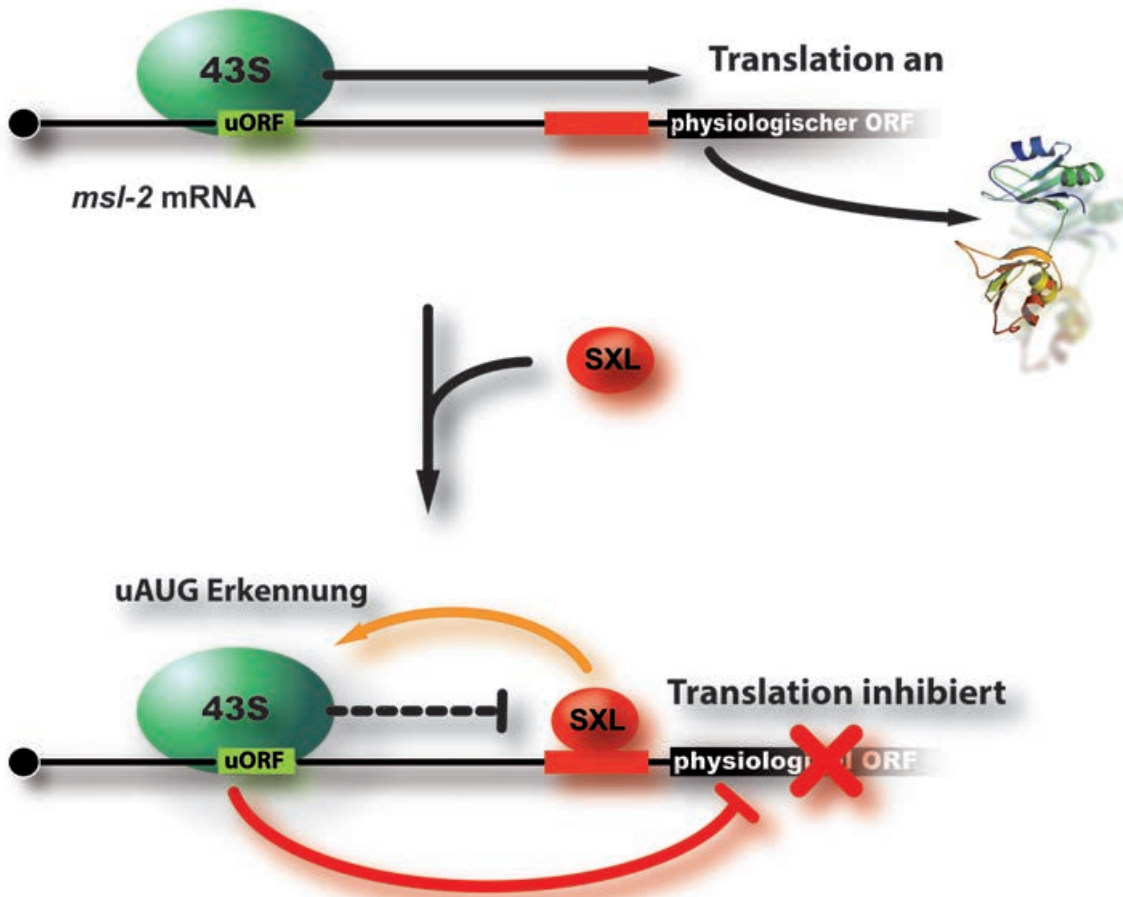


Abb. 2: Translationskontrolle durch das RNA-Bindeprotein SXL am Beispiel der *msl-2* mRNA.
 In Abwesenheit des regulatorischen Proteins wird das physiologische Leseraster (physiologischer ORF) der RNA translatiert und somit MSL-2 Protein produziert (oben dargestellt). Nach Bindung des SXL Proteins (rot) an die RNA fördert dieses die Erkennung eines sogenannten ‚upstream open reading frames‘ (uORF) durch initiiierende Ribosomen (grün dargestellt als 43S Partikel). Somit wird das inhibitorische Potential des uORFs voll ausgeschöpft und eine Translation des physiologischen ORFs wird verhindert (unten dargestellt).

Kooperationspartner

Dr. Ana Eulalia,
 Institut für Molekulare
 Infektionsbiologie – IMIB
 Universität Würzburg,
 Deutschland

Prof. Dr. Matthias Hentze,
 EMBL Heidelberg,
 Deutschland

Dr. Björn Tews,
 Deutsches Krebs-
 forschungszentrum,
 Heidelberg, Deutschland

Dr. Grischa Tödt,
 EMBL Heidelberg,
 Deutschland

Dr. Robert Ahrends,
 Leibniz-Institut für Analytische
 Wissenschaften ISAS
 Dortmund, Deutschland

Nicht nur im Menschen, auch in *Drosophila melanogaster* regulieren uORFs die Synthese von Proteinen. In der Vergangenheit konnten wir zeigen, dass das Protein ‚Sex lethal‘ (der Hauptregulator der weiblichen Fliegenentwicklung) die Aktivität von uORFs kontrollieren kann und somit Einfluss auf die Translation einer Reihe von wichtigen Proteinen nehmen kann. Unsere Einblicke beruhen in der Regel auf der Untersuchung des Einflusses des Regulatorproteins auf einzelnen RNA Spezies. Nun arbeiten wir daran unsere Studien auszudehnen, um ein globales Bild der Translationsregulation durch ‚Sex lethal‘ zu erhalten. Zu diesem Zweck setzten wir das sogenannte ‚Ribosomal profiling‘ ein – eine kürzlich entwickelte Technik, welche die Translation systemweit und hochauflösend abbilden kann. Dafür werden mittels modernster Sequenzier-Technologie die genauen Positionen von translatierenden Ribosomen auf RNAs kartiert. Die so gewonnenen Datensätze sollen nicht nur einem besseren Verständnis der Aktivität von ‚Sex lethal‘ dienen, sondern erlauben darüber hinaus weitere, fundamentale Einblicke in die zelluläre Translation

Ausgewählte Publikationen

1. Medenbach, J., Seiler, M., and Hentze, MW.: Translational control via protein-regulated upstream open reading frames. *Cell*, 2011, 145(6):902-13.
2. Rösel, TD., Hung, LH., Medenbach, J., Donde, K., Starke, S., Benes, V., Rättsch, G., and Bindereif, A.: RNASeq analysis in mutant zebrafish reveals role of U1c protein in alternative splicing regulation. *EMBO Journal*, 2011, 30(10):1965-76.
3. Trede, N.S., Medenbach, J., Damianov, A., Hung, L.-H., Weber, G.J., Paw, B.H., Zhou, Y., Hersey, C., Zapata, A., Keefe, M., Barut, B.A., Stuart, A.B., Katz, T., Amemiya, C.T., Zon, L.I., and Bindereif, A.: Network of coregulated spliceosome components revealed by zebrafish mutant in recycling factor p110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, 104(16): 6608-13.
4. Medenbach, J., Schreiner, S., Liu, S., Lührmann, R., and Bindereif, A.: Human U4/U6 snRNP Recycling Factor p110: Mutational Analysis Reveals the Function of the Tetratricopeptide Repeat Domain in Recycling“, *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 24(17): 7392-7401.



Calcium-abhängige Regulation des mitochondrialen Metabolismus und programmierter Zelltod

Functional Genomics des mitochondrialen Signaling Networks

Dr. Fabiana Perocchi

Genzentrum
Ludwig-Maximilians-Universität München
perocchi@genzentrum.lmu.de

Einleitung

► Mitochondrien sind doppelwandige Zellorganellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen zu finden sind. Sie dienen als zentrales Element für die Energieproduktion, die Ionenhomöostase, den intermediären Stoffwechsel sowie den Zelltod. Mitochondrien entstammen einem besonderen evolutionären Ursprung – sie wurden in Form von Bakterien vor rund 2 Milliarden Jahren von Eukaryoten aufgenommen. Einige mitochondriale Funktionen sind über die Zeit erhalten geblieben, sodass einzellige Hefen und multizelluläre Organismen viele ähnliche mitochondriale Komponenten teilen [1,2] (Abb. 1).

Menschliche Mitochondrien enthalten ein winziges Genom, das 13 gut charakterisierte Proteine kodiert. Die verbleibenden ca. 1500 mitochondrialen Proteine werden von Genen des Zellkerns kodiert, ins Zytoplasma translatiert und zielgerichtet in die Mitochondrien importiert. Als Folge des doppelten genetischen Ursprungs der mitochondrialen Proteine erfordert die mitochondriale Biogenese und Funktion eine ausführliche Interaktion und Kommunikation zwischen zellulären und mitochondrialen Akteuren (Abb. 1). Ein bidirektionales Signaling zwischen Mitochondrien und anderen zellulären Komponenten reguliert dabei die dynamische und komplexe Remodellierung in Bezug auf mitochondriale Form, Motilität, Metabolismus und Proteom als Reaktion auf Umweltreize und energetische Anforderungen, die verstärkt während des Wachstums und der Entwicklung auftreten. Nichtsdestotrotz sind die molekularen Verbindungen zwischen intrazellulären Signalen und mitochondrialen Reaktionen in vielen Fällen nach wie vor unbekannt [3,4]. Was für eine Rolle spielen Mitochondrien in Signaltransduktionskaskaden? Welche mitochondrialen Proteine erfassen, modulieren und verbreiten intrazelluläre Signale? Wie wird der mitochondriale Signaling „Werkzeugkasten“ reguliert? Was passiert wenn die mitochondrialen Signalnetzwerke gefährdet sind und wie können wir schädliche Auswirkungen verhindern?

Ziele des Projekts

► Das langfristige Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, ein systemisches Verständnis der menschlichen Mitochondrien zu erlangen, um die Forschung in grundlegender und krankheitsrelevanter Biologie voran zu treiben [2] (Abb. 2). Insbesondere möchten wir die molekularen Maschinen und Mechanismen identifizieren, die für das Calcium Signaling in Mitochondrien verantwortlich sind. Zu diesem Zweck kombinieren wir großangelegte computergestützte und experimentelle Strategien mit zielgerichteten genetischen, biochemischen und physiologischen Studien mitochondrialer Funktionen in Pilz-, Maus- und menschlichen Zellen. Wir entwickeln Hochdurchsatzverfahren, um die Effekte genetischer und chemischer Störungen des mitochondrialen Calcium Signaling zu testen und zu revidieren, sowie um wichtige Signaling Checkpoints zu erfassen, die als potentielle pharmakologische Targets in Frage kommen. Wir führen umfassende und quantitative Messungen von Metaboliten, Proteinen und deren post-translationalen Modifikationen durch, um die Rolle von mitochondrialem Calcium Signaling im zellulären Metabolismus sowie in der Proteinregulation zu entziffern. In Anbetracht der fundamentalen Rolle des Calcium Signaling in Entwicklung, Lernprozess, Metabolismus und neuromuskulärer Funktion sowie der Fähigkeit von Mitochondrien in nahezu allen Gewebearten, die Calciumhomöostase zu regulieren, hoffen wir, dass unsere Forschung zum Verständnis der pathologischen Mechanismen vieler menschlicher Erkrankungen beitragen wird.

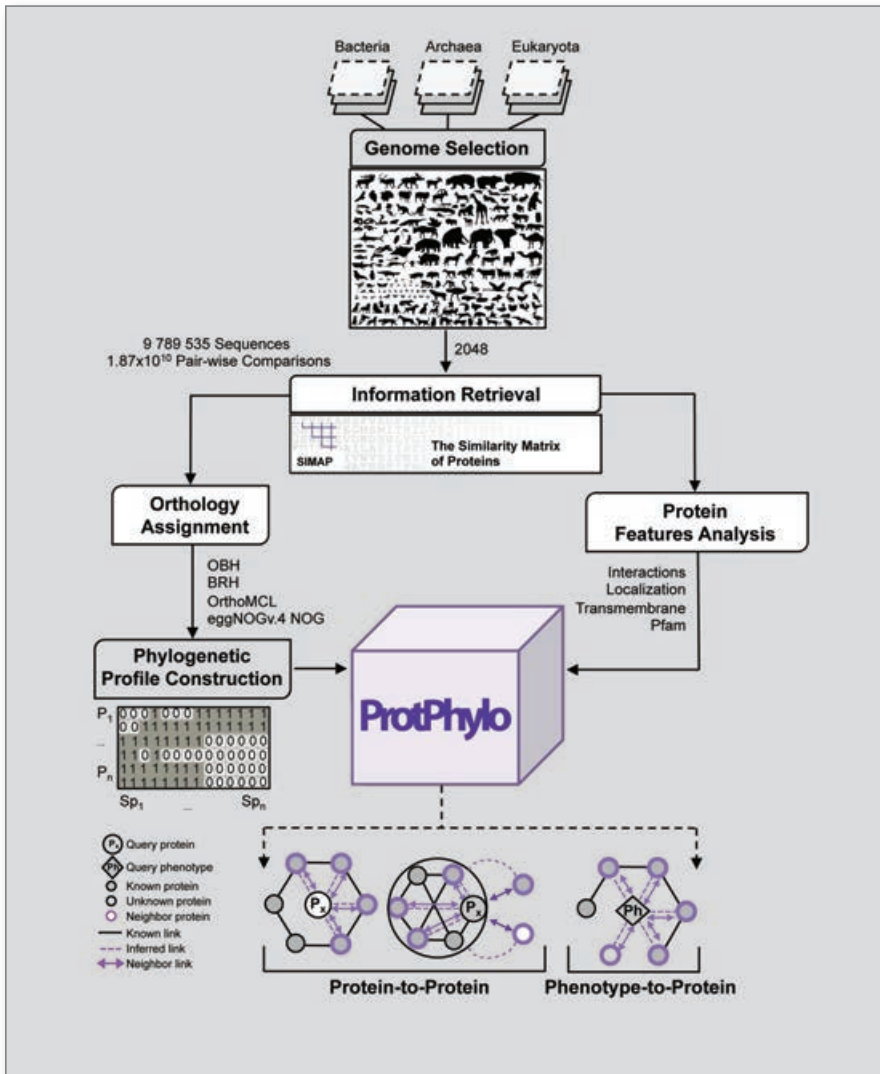


Abb. 1: Funktionales Netzwerk des mitochondrialen Systems in der Hefe: Ursprung, Konservierung und Crosstalk. Aus Perocchi et al., PloS Genetics 2006.

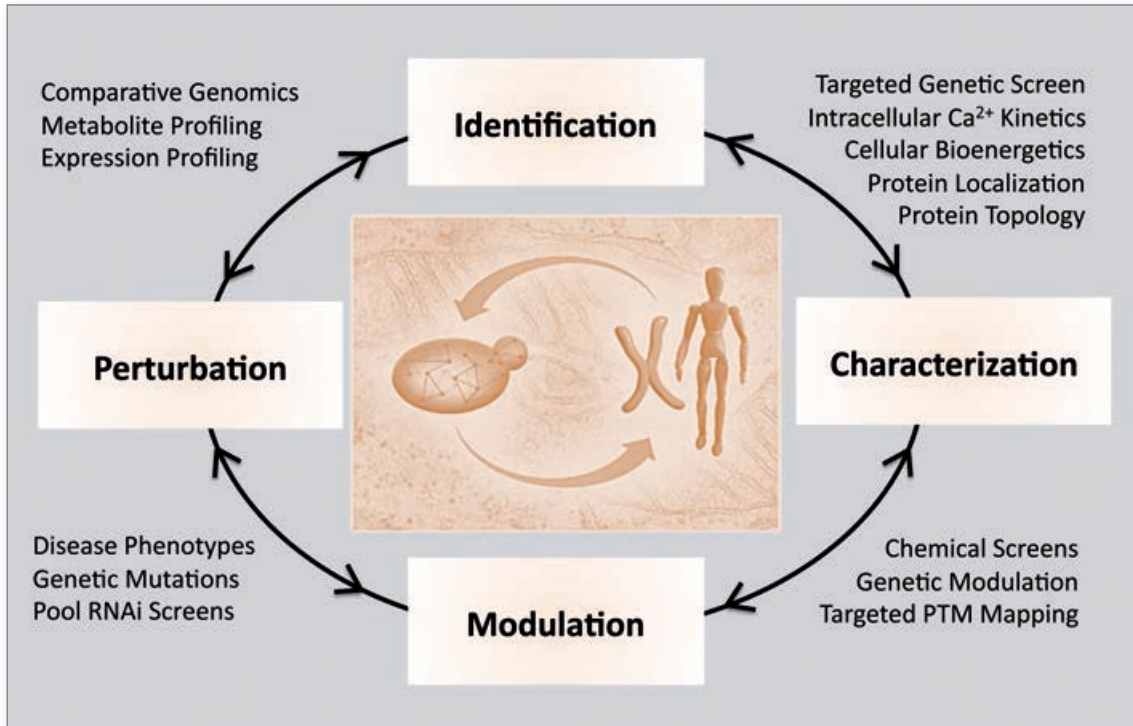
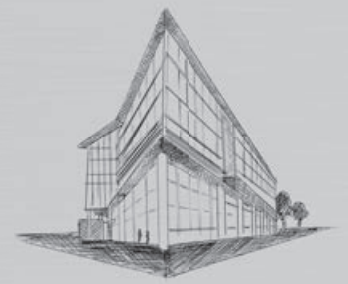


Abb. 2: Schematische Zusammenfassung der integrativen Herangehensweise zur Rekonstruktion mitochondrialer Signalnetzwerke.

Kooperationspartner

Prof. Dr. Thomas Misgled,
Institut für Neuronale Cell Biologie,
Technische Universität München,
Deutschland

Prof. Javier García-Sancho und
Dr. Maria Teresa Alonso,
Institut für Molekularbiologie &
Genetik, Universität Valladolid
und Spanish National Research
Council, Valladolid Spanien

Prof. Thomas Meitinger
und Dr. Holger Prokisch,
Institut für Humangenetik,
Helmholtz Zentrum München,
Deutschland

Dr. Olaf Gross,
Institut für Klinische Chemie
und Pathobiochemie,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München,
Deutschland

Dr. Dejana Mokranjac,
Department of Physiological
Chemistry, Ludwig-Maximilians-
Universität München,
Deutschland

Fazit und Ausblick

► Angesichts der Schlüsselrolle von Mitochondrien in der Zellphysiologie hat unsere Forschung weitreichende Auswirkungen auf das Verständnis um die menschliche Gesundheit und Krankheiten. Mitochondriale Dysfunktion wird mit nahezu jeder alters-assoziierten Krankheit, einschließlich Diabetes, Krebs und Neurodegeneration, in Verbindung gebracht. Zahlreiche Studien haben einen Zusammenhang zwischen bestimmten Erkrankungen und Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren, hergestellt – z.B. PINK1, PARK2 und DJ-1 in angeborener Parkinson-Krankheit oder L2HGDH in Glioma. Da immer mehr mitochondriale Gene durch Sequenzierungsstudien des gesamten Exoms erkrankter Patienten belastet werden, wird unsere funktionale Charakterisierung der mitochondrialen Signalwege einen wertvollen mechanistischen Einblick sowie neue Perspektiven für molekulare Eingriffe liefern.

Ausgewählte Publikationen

1. Perocchi F, Jensen LJ, Gagneur J, Ahting U, von Mering C, Bork P, Prokisch H, Steinmetz LM (2006). Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle. *PLoS Genetics*. 2(10):e170.
2. Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010). MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature*. 467(7313):291-6.
3. Baughman JM*, Perocchi F*, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476(7360):341-5
4. Cheng Y, Perocchi F (2015). ProtPhylo: identification of Protein-phenotype and protein-protein functional associations via Phylogenetic profiling. *NAR*.
5. Gohil VM*, Sheth SA*, Nilsson R, Wojtovich AP, Lee JH, Perocchi F, Chen W, Clish CB, Ayata C, Brookes PS, Mootha VK (2010). Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nature Biotechnology*. 28(3):249-55.

* These authors contributed equally



Physikalische Biologie von Nucleosomenpositionierung, Remodeling und Transkriptionsregulation in Hefe

Erforschung molekularer Wechselwirkungen mittels einfacher physikalischer Modelle

Prof. Dr. Ulrich Gerland

Physik Department der Technischen Universität München
gerland@tum.de



Kooperationspartner

PD Dr. Philipp Korber, Adolf-Butenandt-Institute, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Patrick Cramer, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland

Einleitung

► Eine zentrale Frage biologischer Forschung ist: Welche Mechanismen regulieren auf molekularer Ebene die Transkription von Genen, also das Ablesen genau bestimmter Teile der genetischen Information? Da diese komplizierten Prozesse nicht direkt beobachtet werden können, müssen sie rekonstruiert werden. Dazu bieten sich sowohl Faktoren an, welche die Transkription befördern oder einschränken (z.B. Transkriptionsfaktoren oder Nucleosomen), als auch gemessene Transkriptionsraten. Für die Rekonstruktion ist Modellbildung unentbehrlich.

Ziel des Projektes

► Durch Anwendung von Methoden der statistischen Physik soll die Regulation der Transkription beim Modellorganismus Hefe von zwei Seiten untersucht werden: Erstens ist DNA nicht zugänglich, die Nucleosomen formt - also eng um Histonproteine gewickelt ist. Wir bestimmen in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Philipp Korber physikalische Mechanismen der Positionierung dieser Nucleosomen. Zweitens sollen aus Daten von "Dynamic Transcriptome Analysis" (DTA) der Gruppe von Patrick Cramer effektive Mechanismen des Zusammenwirkens verschiedener, möglicherweise antagonistischer Einfüsse auf die Regulation einzelner Gene untersucht werden.

Ergebnisse

► Die Verteilung von Nucleosomen innerhalb Genkodierender Bereiche folgt, im Mittel, einem einfachen statistischen Muster, wenn man berücksichtigt, dass DNA sich z.B. aufgrund thermischer Fluktuationen kurzzeitig von den Histonproteinen löst [1]. Dieser und weitere Mechanismen ermöglichen auch, dass DNA schnell wieder Nucleosomen formt, nachdem diese entfernt wurden, z.B. um DNA-Replikation zu ermöglichen [2].

Darüberhinaus werden Nucleosomen durch "Remodeler-Enzyme" aktiv positioniert. Deren Einfluss wurde bisher entweder "top down" untersucht, z.B. durch Vergleich mit Remodeler-Mutanten oder spezifischen Remodeler-Zusammensetzungen *in-vitro* (in der Gruppe von Philipp Korber werden hierzu flexible Methoden entwickelt), oder "bottom-up" durch Experimente mit einzelnen Nucleosomen. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Philipp Korber nehmen wir einen "mitt-

leren" Standpunkt ein, und vergleichen mechanistische Modelle mit beobachteten Nucleosomenmustern [3], womit in Zukunft Remodeler-Mechanismen identifiziert werden sollen.

Auf der höheren Ebene der Genregulation haben wir eine Methode entwickelt, aus Veränderungen der Genexpressionsraten, z.B. während des Zellzyklus oder induziertem Stress, physiologisch relevante Genregulationsfunktionen zu bestimmen. Diese Methode wurde auf genomweite DTA-Daten der Cramer-Gruppe angewandt.

Ausgewählte Publikationen

1. Moebius, W., Osberg, B., Tsankov, A.M., Rando, O.J. and Gerland, U. (2013), Toward a unified physical model of nucleosome patterns flanking transcription start sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, 5719-5724.
2. B. Osberg, J. Nuebler, P. Korber and U. Gerland (2014), Replication-guided nucleosome packing and nucleosome breathing expedite the formation of dense arrays, *Nucleic Acids Research* 42, 13633-13645.
3. C. Lieleg, P. Ketterer, J. Nuebler, J. Ludwigsen, U. Gerland, H. Dietz, F. Mueller-Planitz and P. Korber (2015), Nucleosome spacing generated by ISWI and CHD1 remodelers is constant regardless of nucleosome density, *Mol. Cell. Biol.*, accepted for publication.

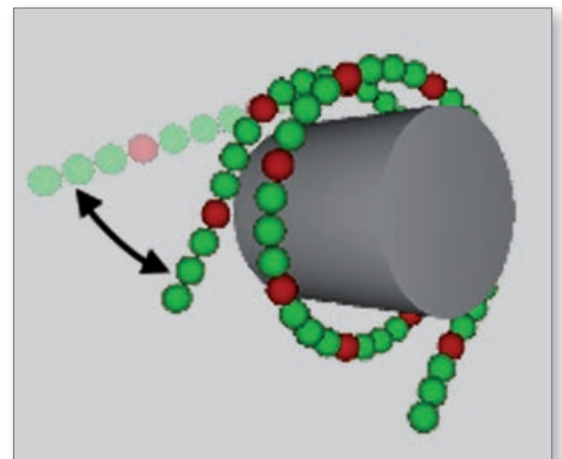


Abb. 1: Illustration eines vereinfachten physikalischen Modells eines Nucleosoms. Die um einen Kern aus Histonproteinen gewickelte DNA wird durch thermische Fluktuationen auf- und abgewickelt. Die variable Bindungslänge erleichtert es, Nucleosomen schnell dicht hintereinander zu packen.

Genetisches Silencing durch kleine RNAs in der Spaltheife



Projektbeschreibung

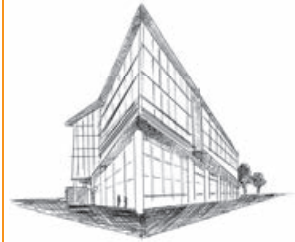
► Der menschliche Körper besteht aus vielen verschiedenen Arten von Zellen, die über die gesamte Lebensdauer eines Menschen ihre Identität wahren müssen. Ein Versäumnis in dieser Hinsicht kann schwerwiegende Konsequenzen haben und zur Entwicklung von Krebs und anderen Erkrankungen führen. Genregulation spielt eine essentielle Rolle im Prozess der Zelldifferenzierung und in der Entwicklung von Geweben und Organen. Viele Gene werden durch die Veränderung der Chromatinverpackung reguliert. Dies impliziert die Interaktion der DNA, also des Trägers genetischer Information, mit verschiedenen Proteinen. Die Verpackung erfolgt dabei auf ähnliche Weise sowohl in Einzellern wie z.B. Hefe als auch in hoch komplexen Lebewesen wie etwa dem Menschen. Unsere Forschung fokussiert sich auf die grundlegenden Prinzipien des transkriptionellen genetischen Silencings durch kleine RNAs. Kleine RNAs interagieren mit Ziel-RNAs und bewirken Chromatinmodifikationen, translationale Inhibition oder Degradation von komplementären RNAs. Die Abschaltung von Genen durch kleine RNAs spielt in der zellulären Kontrolle der Genexpression sowie beim Schutz des Genoms vor mobilen repetitiven DNA Sequenzen, Retroelementen und Transposons eine Rolle. Wir kombinieren genetische und genomische Ansätze mit biochemischen und strukturellen Methoden um aufzuklären, wie diese Elemente zunächst erkannt und dann in spezialisiertem Chromatin, dem

Heterochromatin, verpackt werden. Wir haben kürzlich eine neue Klasse von kleinen RNAs entdeckt, die mitunter die Amplifikation von siRNA sowie die Bildung von Heterochromatin innerhalb zentromerer Wiederholungssequenzen in der Spaltheife bewirken. Defekte in der Regulation der Genexpression durch kleine RNAs wurden bereits in zahlreichen Fällen menschlicher Krebserkrankungen beschrieben. Der Prozess des genetischen Silencings durch kleine RNAs ist hoch konserviert in allen Lebewesen. Ein grundlegendes Verständnis des Ablaufs wird uns helfen zu verstehen, warum manche Zellen ihre Identität verlieren und sich in Krebszellen verwandeln.

Ausgewählte Publikationen

1. Marasovic M, Zocco M, Halic M
Argonaute and Triman generate Dicer-independent priRNAs and mature siRNAs to initiate heterochromatin formation
Mol Cell. 2013.
2. Halic M and Moazed D
Dicer-Independent priRNAs and Argonaute Trigger RNAi and Heterochromatin Formation
Cell. 2010 Feb 19;140(4):504-516.
3. Halic M, Blau M, Becker T, Mielke T, Pool MR, Wild K, Sinning I, Beckmann R
Following the Signal Sequence from the Ribosomal Tunnel Exit to Signal Recognition Particle
Nature. 2006 Nov 23;444(7118):507-11.

Prof. Dr. Mario Halic
Genzentrum,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
halic@genzentrum.lmu.de



Kooperationspartner
Prof. Dr. Klaus Förstermann,
Prof. Dr. Roland Beckmann,
Genzentrum,
Ludwig-Maximilians-
Universität München,
Deutschland

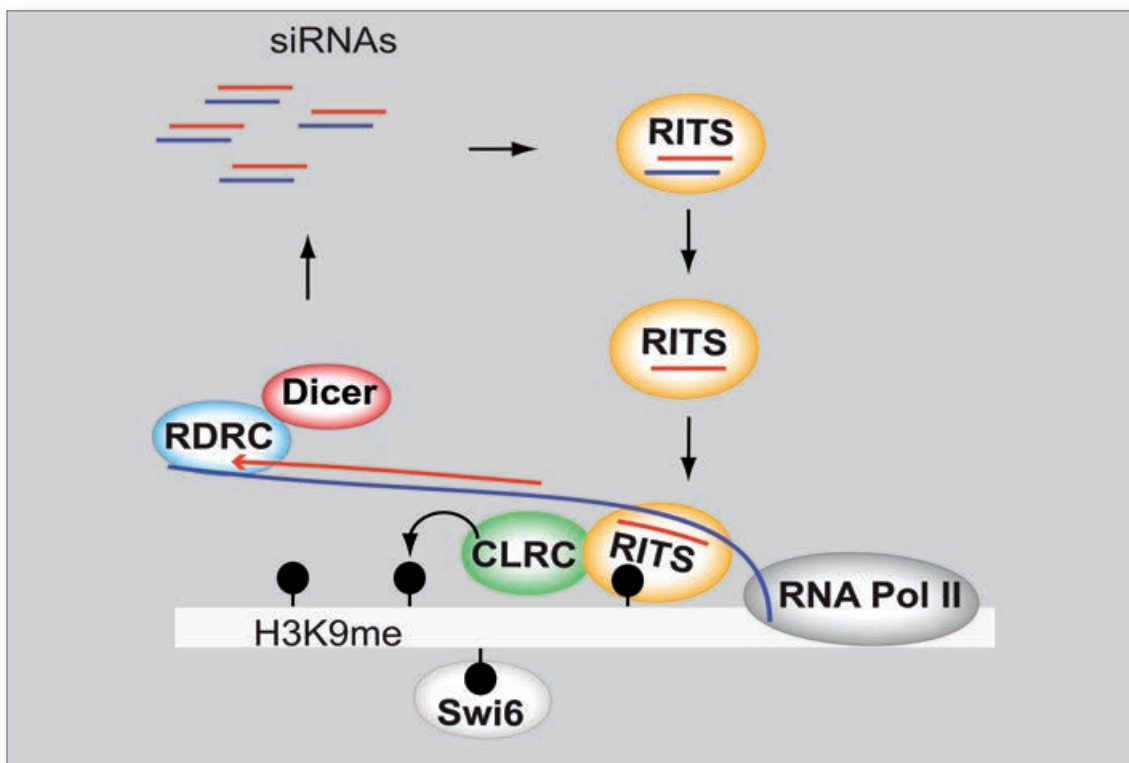
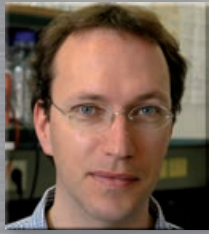


Abb. 1: siRNA vermittelte Bildung von Heterochromatin in Spaltheife. Der RITS Komplex (Argonaute) rekrutiert RDRC (RNA dependent RNA polymerase complex) und Dicer zur Synthese neuer dsRNA und Amplifikation von siRNA. RITS rekrutiert außerdem den CLRC Komplex zur Modifikation der Chromatinstruktur mit repressiven H3K9 Methylierungen. Eine H3K9 Methylierung bewirkt die Rekrutierung des HP1 Proteins Swi6 und löst die Bildung von Heterochromatin aus.



Evolutionärer Vergleich von Mechanismen der Nukleosomenpositionierung in weit divergierten Hefen

In vitro Rekonstitution der Nukleosomenpositionierung in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

PD Dr. Philipp Korber

Adolf-Butenandt-Institut,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
pkorber@lmu.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Ulrich Gerland,
Fakultät für Physik,
Technische Universität
München, Deutschland

Prof. Dr. Karl Ekwall,
Abteilung für Biowissen-
schaften und Ernährung,
Karolinska Institut,
Huddinge, Schweden

Einleitung

► Die genetische Information aller Zellen ist in DNA codiert. In Zellen mit Zellkern ist die DNA allerdings sehr komplex mit Proteinen in die sogenannte Chromatinstruktur verpackt. Die erste Verpackungsebene bilden die Nukleosomen, in denen eine DNA-Länge von 147 Basenpaaren um basische Histonproteine gewickelt sind. Die Nukleosomenstruktur erschwert den Zugang zur DNA, so dass die Position von Nukleosomen relativ zur DNA-Sequenz eine fundamentale Regulationsebene für alle Funktionen des Genoms darstellt (Abb. 1). Kurz, die genetische DNA-Information wird epigenetisch durch die Chromatinstruktur reguliert. Dieses generelle Prinzip wird aber in unterschiedlichen Spezies zum Teil sehr unterschiedlich umgesetzt.

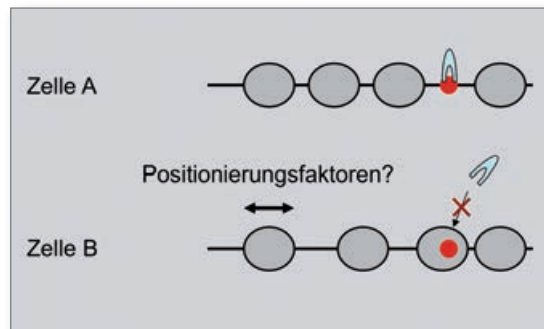


Abb. 1: Epigenetische Information der Nukleosomenpositionierung. Nukleosomenpositionen (graue Ovale) entlang der DNA (Linie) können sich in Zelle A versus Zelle B so unterscheiden, dass die DNA-Bindungsstelle (roter Punkt) für ein Protein (blauer Bogen) zugänglich ist oder nicht.

Ziel des Projektes

► Es ist noch nicht verstanden, auf Grund welcher molekularer Mechanismen die Nukleosomen dort sind, wo man sie in Zellkernen beobachtet (s. unseren umfassenden Übersichtsartikel Lieleg et al., 2014, Chromosoma). Wir untersuchen diese Nukleosomenpositionierungs-Mechanismen über einen biochemischen Rekonstitutionsansatz, versuchen also die Nukleosomenpositionierung entlang der DNA im Reagenzglas „nachzubauen“. Für die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist uns das bereits gelungen (s. Abb. 2; Zhang et al, 2011, Science). Nun etablieren wir das entsprechende System für die Spaltheefe *S. pombe*, die evolutiv von *S. cerevisiae* ähnlich weit entfernt ist wie *S. cerevisiae* vom Menschen. So unterscheiden wir, welche Mechanismen artspezifisch und welche universell sind. Dieser Ansatz beruht auch auf Vergleichen theoretischer Modellierungen, die von unseren Kollaborationspartnern in der Gruppe von Prof. Dr. Ulrich Gerland durchgeführt werden.

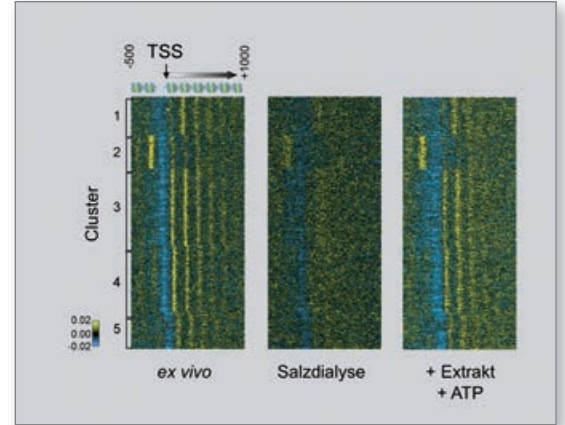


Abb. 2: Genom-weite *in vitro* Rekonstitution von *in vivo*-ähnlichen Nukleosomenpositionen für *S. cerevisiae*. Gezeigt ist der Nukleosomenbesetzungsgrad für ca. 4700 Gene (Reihen), ausgerichtet an der TSS, unterteilt (Cluster) nach Organisationssubtypen und farbcodiert (gelb für hohe, blau für niedrige Nukleosomenbesetzung). Nur wenige Nukleosomenpositionen werden durch rein biophysikalische „Salzgradientendialyse“ (nur DNA und Histone) richtig rekonstituiert. Aber zusammen mit Zellextrakt und ATP entstehen *in vivo*-ähnliche Nukleosomenmuster und v.a. auch arrays. Abbildung verändert aus Zhang et al., 2011, Science.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Gerade in Bezug auf die Modellrechnungen wurden erste Ergebnisse bereits veröffentlicht (s. Osberg et al, 2014, Nucleic Acids Research und Lieleg et al., 2015, Molecular and Cellular Biology). Desweiteren liefert der Rekonstitutionsansatz für *S. pombe* zur Zeit die ersten Daten, die wir einer theoretischen Modellierung unterziehen können.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Unser Ansatz kombiniert einen „vertikalen“ (*bottom up in vitro* Rekonstitution), einen „horizontalen“ (Spezies-übergreifende Genom-weite Analysen) und einen theoretischen Teil, so dass die Nukleosomenpositionierung nicht nur phänomenologisch, sondern auch mechanistisch und quantitativ verstanden werden kann.

Ausgewählte Publikationen

- Lieleg C, Ketterer P, Nuebler J, Ludwigsen J, Gerland U, Dietz H, Mueller-Planitz F#, Korber P#. Nucleosome spacing generated by ISWI and CHD1 remodelers is constant regardless of nucleosome density Mol Cell Biol, Mar 2. [Epub ahead of print]
- Lieleg C, Krietenstein N, Walker M, Korber P#. Nucleosome positioning in yeasts: methods, maps, and mechanisms. Chromosoma. 2014 Dec 23. [Epub ahead of print]
- Osberg B*, Nuebler J*, Korber P, Gerland U#. Replication-guided nucleosome packing and nucleosome breathing expedite the formation of dense arrays. Nucleic Acids Res. 2014 Dec 16;42(22):13633-45.
- Zhang Z*, Wippo CJ*, Wal M, Ward E, Korber P#, and Pugh BF# (2011). A packing mechanism for nucleosome organization reconstituted across a eukaryotic genome. Science 2011 May 20;332(6032):977-80.

(# korrespondierende Autoren, * geteilte Erstautoren)

Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen in *Campylobacter jejuni*

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von RNA-Protein-Komplexen in der posttranskriptionellen Genregulation des Humanpathogens *Campylobacter jejuni*



Einleitung

► In allen Domänen des Lebens spielt die posttranskriptionelle Genexpressionskontrolle eine zentrale Rolle und kontrolliert eine Vielzahl physiologischer Prozesse in der Zelle. In Bakterien agieren sogenannte kleine regulatorische RNAs (sRNAs für „small regulatory RNAs“) als Regulatoren der bakteriellen Stressantwort und der Virulenz von Pathogenen. Neben sRNAs spielen auch RNA-Bindeproteine eine entscheidende Rolle im RNA-Metabolismus und der posttranskriptionellen Genregulation. Das RNA-Chaperon Hfq ist ein wichtiger Kofaktor von sRNAs in Enterobakterien und auch mit der Virulenz von Pathogenen assoziiert. Epsilonproteobakterien, zu denen weitverbreitete Humanpathogene wie der Magenkeim *Helicobacter pylori* oder das Lebensmittelpathogen *Campylobacter jejuni* gehören, fehlt wie 50% aller Bakterien ein Homolog von Hfq. Somit stellt sich die Frage, ob in diesen Bakterien andere RNA-Chaperone in der posttranskriptionellen Kontrolle involviert sind oder ob sRNAs unabhängig von einem Proteinfaktor wirken.

Die Entzifferung von cDNA-Bibliotheken mittels Hochdurchsatzsequenzierungstechnologien (RNA-Seq) hat die Transkriptomanalyse von Pro- und Eukaryonten revolutioniert. Unsere differenzielle RNA-Sequenzierungsmethode (dRNA-Seq) erlaubt eine genomweite spezifische Bestimmung der 5'-Enden primärer Transkripte [1]. In einer vergleichenden dRNA-Seq-Analyse mehrerer Stämme von *Campylobacter jejuni*, dem derzeit häufigsten Erreger bakterieller Gastroenteritis, konnten wir global Transkriptionsstartstellen kartieren, sowie stammspezifische Transkriptionsmuster und sRNA-Kandidaten zeigen [2]. Letztere können die Grundlage von phänotypischen Unterschieden eng verwandter Stämme sein und eine Anpassung an verschiedene Nischen ermöglichen. Die Funktionen und Mechanismen der sRNAs sind bislang jedoch noch unbekannt.

Ziel des Projekts

► In diesem Projekt verwenden wir *C. jejuni* als neuen Modellorganismus für RNA-basierte Genregulation in Bakterien ohne Hfq. Unser Ziel ist es, Proteinfaktoren, die in der posttranskriptionellen Genregulation dieses Pathogens eine Rolle spielen, zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierfür kombinieren wir genetische Screens mit biochemischen Methoden zur Isolierung von RNA-Protein-Komplexen (RNPs) (Abbildung 1). Diese RNP-Komplexe analysieren wir dann mit Proteom- und RNA-Seq-Methoden, gefolgt von einer biochemischen und strukturellen Charakterisierung. Beispielsweise verwenden wir RNA-Seq, um global RNAs zu identifizieren die an Epitop-markierte RNA-Bindeproteine gebunden sind und mittels Koimmunopräzipitation aufgereinigt wurden [3]. Als erstes Beispiel haben wir mit solch einem RIP-Seq-Ansatz die direkten RNA-Bindepartner des Translationsregulators CsrA in *C. jejuni* analysiert.

Hierbei konnten wir zeigen, dass die mRNA eines Motilitätsgens nicht nur das Hauptzielgen von CsrA ist, sondern auch als ein regulatorischer RNA-Antagonist die Aktivität von CsrA kontrolliert. Neben RIP-Seq isolieren wir RNP-Komplexe mittels Affinitätschromatografie von Aptamer-markierten sRNAs, um neue RNA-Bindeproteine zu identifizieren [3]. Die Untersuchung von RNP-Komplexen in *Campylobacter* wird nicht nur neue Einblicke in die Virulenzkontrolle bringen, sondern auch unser Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen von posttranskriptioneller Genregulation verbessern. Die Identifizierung neuer Virulenzregulatoren kann zudem neue Angriffspunkte für antimikrobielle Therapien liefern.

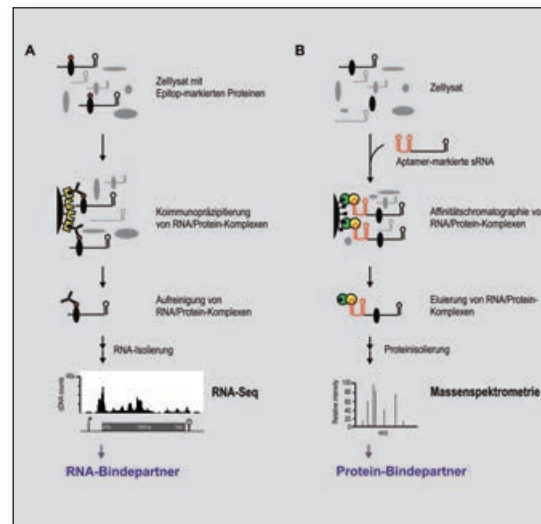


Abb. 1: Isolierung von RNP-Komplexen mittels (A) Koimmunopräzipitation von Epitop-markierten Proteinen in Kombination mit RNA-Seq und (B) Affinitätsaufreinigung von Aptamer-markierten sRNAs.

Ausgewählte Publikationen

1. Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R. et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 464, 250-255.
2. Dugar, G., Herbig, A., Forstner, K.U., Heidrich, N., Reinhardt, R., Nieselt, K. and Sharma, C.M. (2013) High-Resolution Transcriptome Maps Reveal Strain-Specific Regulatory Features of Multiple *Campylobacter jejuni* Isolates. *PLoS Genet*, 9, e1003495.
3. Rieder, R., Reinhardt, R., Sharma, C.M. and Vogel, J. (2012) Experimental tools to identify RNA-protein interactions in *Helicobacter pylori*. *RNA Biology*, 9.

Dr. Cynthia M. Sharma
Zentrum für Infektionsforschung (ZINF)
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
cynthia.sharma@uni-wuerzburg.de



Kooperationspartner
Dr. Ana Eulalia,
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland

Prof. Dr. Jörg Vogel,
Institut für Molekulare Infektionsbiologie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Deutschland

Dr. Kay Nieselt,
Integrative Transkriptomik, ZBIT (Zentrum für Bioinformatik Tübingen),
Universität Tübingen, Deutschland



Analyse und Modellierung von regulatorischen Protein-DNA-Bindeenergielandschaften

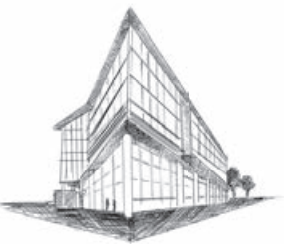
Systemisches Verständnis von Krankheitsprozessen und der Entstehung komplexer Organismen aus einer Zelle erfordert genaue Messungen und Analyse der Bindung regulatorischer Faktoren an das zelluläre Genom

Dr. Johannes Soding

Department für Biologie, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München
soeding@genzentrum.lmu.de

Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Computational Biology, Göttingen

soeding@mpibpc.mpg.de



Kooperationspartner

Dr. Stefan Krebs, LAFUGA, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Dr. Christophe Jung, Gaul Group, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Thomas Lahaye und Christina Wolf, Biologische Fakultät, Universität Tübingen, Deutschland

Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Einleitung

► Die Transkriptionsrate eines Gens wird reguliert durch die koordinierte Bindung aktivierender oder reprimierender Transkriptionsfaktoren an seine Promotorsequenz und andere, weiter entfernt vom Gen liegende cis-regulative Elemente. Um die Transkriptionsrate in Abhängigkeit der Konzentrationen der regulierenden Transkriptionsfaktoren berechnen und vorhersagen zu können, müssen wir die genauen Bindeenergien der Faktoren an sämtliche mögliche DNA-Bindesequenzen vorhersagen können. Nutiu und Mitarbeiter (Nature Biotechnology 2011) haben ein Hochdurchsatzverfahren entwickelt, das es erlaubt, die Bindeenergien eines Transkriptionsfaktors an Millionen verschiedene Bindesequenzen in einem modernen Hochdurchsatz-Sequenziergerät zu messen ("high-throughput sequencing-fluorescent ligand interaction profiling", oder HiTS-FLIP). Mit Hilfe dieser neuen Methode sollte es möglich sein, die Bindeenergien menschlicher Transkriptionsfaktoren für sämtliche mögliche Bindesequenzen zu bestimmen. Im Rahmen des BioSysNet Netzwerkes entwickeln wir das experimentelle Verfahren weiter in Hinblick auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit und wir entwickeln theoretische Methoden und Software, um die Messungen auszuwerten, zu interpretieren, und die gemessenen Bindeenergielandschaften durch statistische Modelle beschreiben zu können. Aufgrund des geringen Durchsatzes existierender Technologien konnten bislang nur sehr einfache Modelle verwendet werden, die auf stark vereinfachten Annahmen beruhen – wie etwa der Annahme, dass die verschiedenen Positionen in der Bindesequenz unabhängig voneinander additiv zur Gesamtbindeenergie beitragen. Diese Einschränkungen können mit dem HiTS-FLIP-Verfahren überwunden werden, was die Entwicklung neuartiger Modelle erfordert.

Ziele

► Ziel dieses Projekts ist die Entwicklung einer Analyse-pipeline für die quantitative Hochdurchsatzmessung von Protein-DNA-Interaktionen und die statistische Beschreibung der Proteinbindeaffinitäten mittels geeigneter statistischer Modelle. Hierzu müssen hunderttausende von im Hochdurchsatzsequenzierer gemessenen Bindekurven analysiert und quantitativ beschrieben werden. Die statistischen Modelle, die wir mit dieser Technologie für viele Transkriptionsfaktoren messen können, sind wichtige Voraussetzung für die quantitative Beschreibung und Modellierung von transkriptioneller Regulation, dem wichtigsten Regulationsmechanismus in der Zelle. Wir werden außerdem in Zusammenarbeit mit Experimentatoren den Einfluss von Kooperativität zwischen interagierenden Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der HiTS-FLIP-Technologie studieren.

Ergebnisse

► In unseren Experimenten und Auswertungen konnten wir bereits eine relative Genauigkeit der Messungen von tausenden von Dissoziationskonstanten erreichen, die vergleichbar ist zu der von Niedrigdurchsatzexperimenten wie EMSA. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass es mit HiTS-FLIP möglich ist unterschiedliche Bindemodi eines Transkriptionsfaktors an die DNA zu detektieren, was es erlaubt, unterschiedliche Genmenge zu finden, die *in vivo* durch verschiedene Stoffwechselwege reguliert werden.

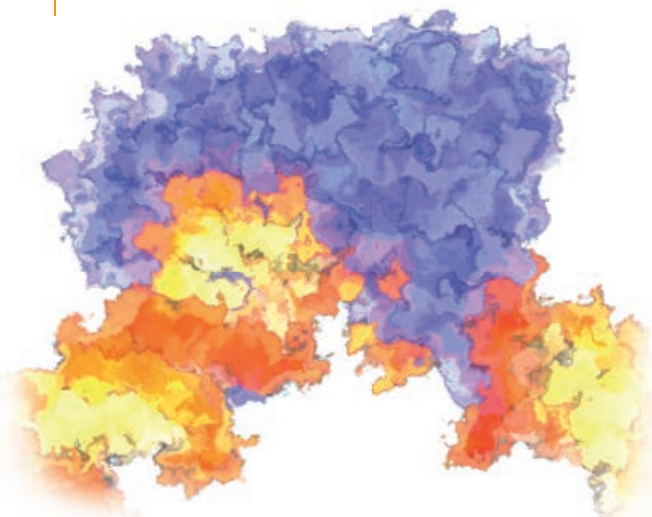
Ausblick

► Diese Arbeiten werden dazu beitragen, die komplexen regulativen Netzwerke besser modellieren und analysieren zu können, die in der Entwicklung von Organismen und für die Entstehung von Krankheiten gleichermaßen zentral sind.

Ausgewählte Publikationen

1. Andreani, J. and Soding, J. (2015) bbcontacts: Prediction of beta-strand pairing from direct coupling pattern Bioinformatics, in press. doi: 10.1093/bioinformatics/btv04.
2. Maier, A. and Soding, J. (2015) Context similarity scoring improves protein sequence alignments in the midnight zone. Bioinformatics, 31, 674–681.
3. Baejen C., Torkler P., Gressel S., Essig K., Soding J., and Cramer P.. (2014) Transcriptome maps of mRNP biogenesis factors define pre-mRNA recognition. Mol. Cell. 155, 1075-1087.
4. Seemayer S, Gruber M, Soding J (2014). CCMpred-fast and precise prediction of protein residue-residue contacts from correlated mutations. Bioinformatics. 30, 3128-30
5. Siebert M., and Soding, J. (2014) Universality of core promoter motifs? Nature (Brief Commun. Arising), 511, E11–E12.

Abb. 1: In dem Projekt entwickeln wir ein experimentelle und theoretisches Verfahren zur präzisen Messung der Bindeenergien, mit denen Proteine an die DNS in unseren Genomen binden, um die Transkription von Genen an- oder abzuschalten. Die genaue Kenntnis dieser Bindeenergien ist für das quantitative Verständnis der zellulären Regulationsmechanismen notwendig.



$$E_{\text{bound}} = \sum_{i=1}^l E(i, X_i) + \sum_{i=n}^l E(i, X_i, X_{i+1}) + \dots$$

Wie potent ist eine Stammzelle?

Quantifizierung von Stammzellphänotypen mittels molekularer Transkriptionslevel und Einzelzell-Genealogien



Projektbeschreibung

► In diesem Projekt beschäftigen wir uns mit zellulären Phänotypen und deren Änderung während des Differenzierungsprozesses von Stammzellen. Die Herausforderung besteht in der Identifikation und Quantifizierung morphologischer und regulatorischer Veränderungen, welche die Differenzierung einer Stammzelle begleiten und möglicherweise auslösen. Der Differenzierungsprozess selbst kann über mehrere Zellgenerationen hinweg andauern und durch die zelluläre und molekulare Umgebung bedingt sein.

Aufgrund heterogener Zellpopulationen und einer potentiellen Stochastizität in der Linienentscheidung ist es notwendig, Stammzellen einzeln zu beobachten. Hierfür werden von unserem kooperierenden Stammzellinstitut Zeitrasterfilme von embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen *in vitro* erstellt und die Expressionslevel von bestimmten Transkriptionsfaktoren über fluoreszierende Fusionsproteine quantifiziert. Mit Hilfe dieser Experimente wollen wir die Frage beantworten, welche zellulären Eigenschaften ab welchem Zeitpunkt des Differenzierungsprozesses ausreichen, um das Schicksal einer Stammzelle eindeutig zu bestimmen.

Daneben zeigen kürzlich publizierte Ergebnisse, dass Einzelzellanalysen eines sich entwickelnden Organs, gekoppelt mit rechnerischen Methoden, transkriptio-

nelle Programme aufzeigen können, welche der Organogenese zugrunde liegen (siehe Moignard et al.). Diese Methoden werden von uns erweitert und auf verschiedene Differenzierungsdatensätze angewandt. Auf lange Sicht möchten wir mit diesem Projekt die Effizienz von Differenzierungsprotokollen steigern und somit zum besseren Verständnis von Stammzellen in der Behandlung von schweren Krankheiten wie Leukämie beitragen.

Ausgewählte Publikationen

1. Moignard V, Woodhouse S, Haghverdi L, Lilly AJ, Tanaka Y, Wilkinson AC, Buettner F, Macaulay IC, Jawaid W, Diamanti E, Nishikawa SI, Piterman N, Kouskoff V, Theis FJ, Fisher J, Gottgens B (2015). Decoding the regulatory network of early blood development from single-cell gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* 33, 269-276.
2. Buggenthin F, Marr C, Schwarzfischer M, Hoppe PS, Hilsenbeck O, Schroeder T, Theis FJ (2013). An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy. *BMC Bioinformatics* 14:297.
3. Rinck A, Preusse M, Lagerbauer B, Lickert H, Engelhardt S, Theis FJ (2013). The human transcriptome is enriched for miRNA-binding sites located in cooperativity-permitting distance. *RNA Biol* 10(7):1125-35.
4. Haghverdi, L., Buettner, F., and Theis, F.J. (2015). Diffusion maps for high-dimensional single-cell analysis of differentiation data. *Bioinformatics*. In Print.

Prof. Dr. Dr. Fabian Theis
Zentrum Mathematik,
Technische Universität
München
fabian.theis@helmholtz-
muenchen.de



Kooperationspartner
Prof. Dr. Eckhard Wolf,
Molekulare Tierzucht
and Biotechnologie,
Genzentrum,
Ludwig-Maximilians-
Universität München,
Deutschland

Prof. Dr. Stefan Engelhardt,
Institut für Pharmakologie
und Toxikologie;
Technische Universität
München, Deutschland

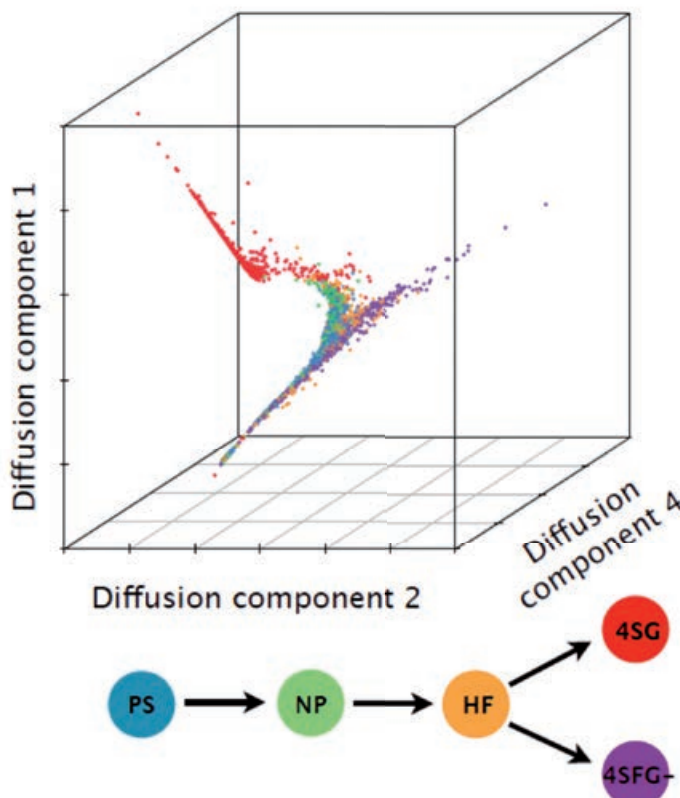


Abb. 1: Diffusion map identifiziert Entwicklungswege im embryonalen hämatopoetischen System der Maus.



Raumzeitliche Kontrolle der Genexpression

Ein molekulares Werkzeug zur Erforschung von Genexpressionsmustern

Prof. Dr. Gil Westmeyer

Nuklearmedizinische Klinik,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität München
gil.westmeyer@tum.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Markus Schwaiger,
Chair of Nuclear Medicine
Department,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität
München, Deutschland

Prof. Dr. Wolfgang Wurst,
Chair for Developmental
Genetics,
Technische Universität
München, Deutschland

Prof. Dr. Alan Jasanoff,
Departments of Biological
Engineering and Brain and
Cognitive Sciences,
Massachusetts Institute of
Technology, Boston, USA

Einleitung

► Für weit-verzweigte Zellen wie Neuronen ist die Genregulation eine große logistische Herausforderung, da sie zum Beispiel während des Wachstums oder nach synaptischer Erregung auf lokale Signale reagieren müssen, die in einer großen Distanz zum Zellkern eintreffen.

Ziel des Projektes

► Es ist daher das Ziel dieses Projektes, mit Hilfe von Proteindesign und molekularer Bildgebung ein genetisch exprimiertes molekulares Werkzeug zu schaf-

fen, dass es erlaubt, Genexpressionsmuster raumzeitlich zu kontrollieren. Genetisch adressierte Zellen können so durch externe Kontrollsignale dazu gebracht werden, ihre Genexpression zu verändern.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Diese Technik kann die systematische Erforschung koordinierter Veränderungen von Genexpressionsmustern ermöglichen und darüber hinaus generellere Anwendungen im Tissue Engineering oder in interventionellen *in vivo* Studien finden.

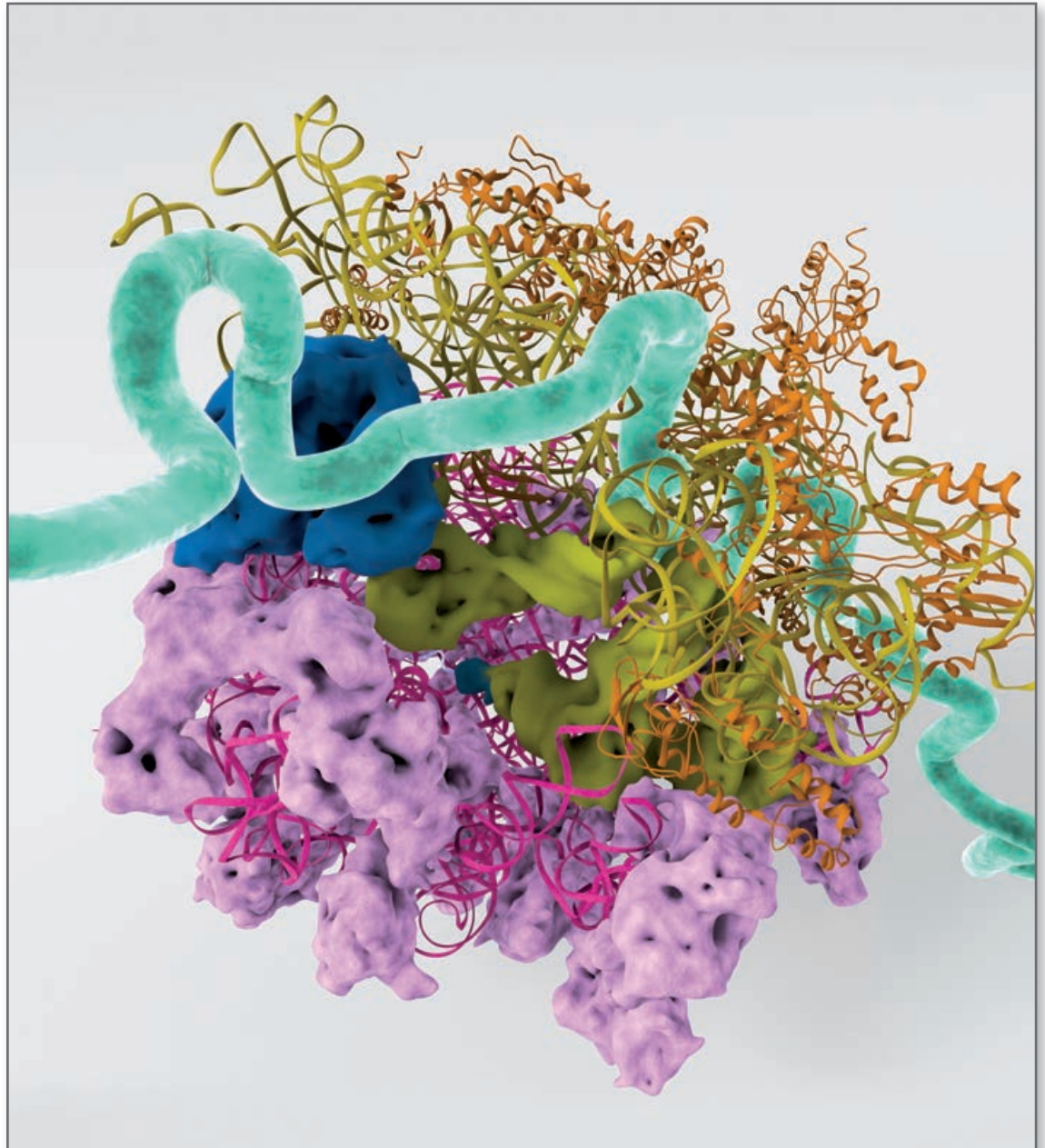


Abb. 1: Künstlerische Darstellung eines Ribosoms bei der Proteinsynthese.

Transkriptomanalysen zur Untersuchung der synaptischen Dysfunktion in Synucleinopathien

Wir fokussieren auf die gestörte Konnektivität zwischen Nervenzellen zu einem frühen Stadium der Parkinson Erkrankung



Stand der Wissenschaft

► Alpha-Synuclein aggregiert in Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten in der Parkinson-Erkrankung und Lewy-Körperchen Demenz. Die Degeneration von Neuriten ist ein entscheidender und früher Schritt in der pathologischen Kaskade von alpha-Synuclein induzierter Neurodegeneration. Die postsynaptischen Mechanismen der alpha-Synuclein vermittelten Toxizität sind nicht vollständig verstanden.

Ergebniss und Ausblick

► Adulte Neurogenese ist in transgenen Tiermodellen von Synucleinopathien reduziert und alpha-Synuclein beeinträchtigt die Entwicklung von Neuriten und Ner-

venfortsätzen im Hippokampus. Wir verwenden hippocampale Kulturen aus alpha-Synuclein transgenen Mäusen zur Untersuchung der Geneexpression in Neuronen. Unsere bisherigen Untersuchungen haben den Proteinkinase C (PKC)-Signalweg als mögliche Zielstruktur der alpha-Synuclein induzierten Integrität von Nervenfortsätzen identifiziert und dieser Signalweg wird weiter untersucht werden. Darüber hinaus verwenden wir einen biosystemischen Ansatz und führen einen Vergleich der Transkriptomane der hippocampalen Kulturen durch, um die molekularen Mechanismen der Integrität der Fortsätze unter dem Einfluss von alpha-Synuclein zu verstehen. Wir werden die Daten der Genexpressions Arrays durch funktionelle Studien validieren und diejenigen Signalwege weiterverfolgen, die zwischen alpha-Synuclein und Kontrollen einen wesentlichen Unterschied zeigen. Da die Dysfunktion von Synapsen ein gemeinsames Merkmal in der Lewy-Körperchen Demenz und der Parkinsonerkrankung ist, analysieren wir, ob ähnliche Veränderungen im synaptischen Protein auch in aus pluripotenten Stammzellen von Parkinsonpatienten generierten Fortsätzen in Neuronen existieren.

Ausgewählte Publikationen

1. Winner, B., et al., Role of alpha-synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2012. 32(47): p. 16906-16.
2. Prots, I., et al., alpha-Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay. *J Biol Chem*, 2013. 288(30): p. 21742-54.
3. Perez-Branguli, F., et al., Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 2014. 23(18):4859-74.
4. Regensburger, M. et al., Adult hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: impact on neuronal survival and plasticity. *Neural Plasticity*. 2014, online.

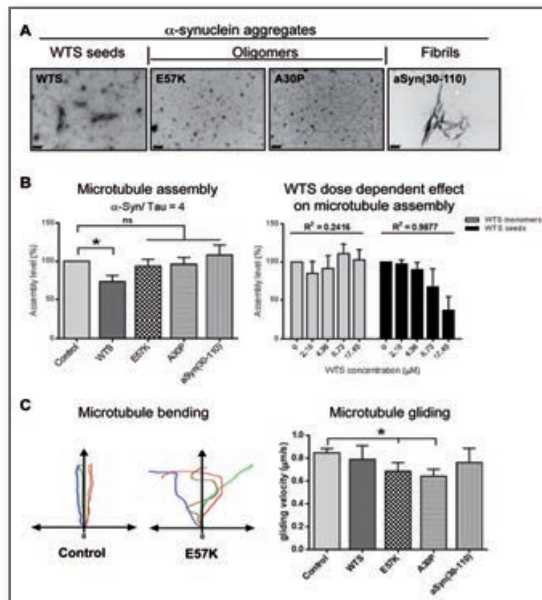


Abb. 1: Interaktion von alpha-Synuclein mit dem Mikrotubuli-Kinesin System *in vitro*. A: Alpha-Synuclein Aggregat. B: Tau abhängige Mikrotubuli Anordnung wird von alpha-Synuclein Aggregaten gehemmt. C: Alpha-Synuclein Oligomere hemmen die Bewegung von Mikrotubuli auf einer mit Kinesin benetzten Oberfläche.

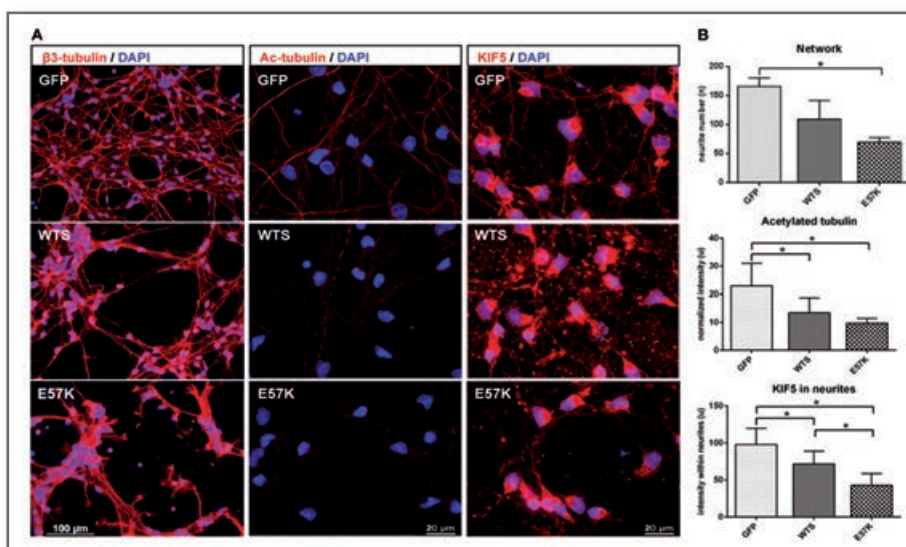


Abb. 2: Alpha-Synuclein Oligomere (E57K) und Aggregate (WTS) führen zu einer Störung des Zytoskelets in Neuronen. A: Färbung und B: Quantifizierung des neuritischen Netzwerks durch Färbung für Acetyliertes Tubulin und Kinesin.

Prof. Dr. Beate Winner

Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung IZKF, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
beate.winner@med.uni-erlangen.de



Kooperationspartner

Dr. Tobias Madl, Lehrstuhl für Biomolekulare NMR-Spektroskopie, Technische Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Jürgen Winkler, Abteilung für Molekulare Neurologie, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland



Das molekulare Verständnis des malignen Melanoms - Was können wir aus der Embryogenese lernen?

Das Verständnis der Entwicklung von Melanoblasten und der Differenzierung von Melanozyten hilft uns, die molekulare Entstehung des Melanoms besser zu verstehen

Prof. Dr. Anja Bosserhoff

Institut für Biochemie,
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
anja.bosserhoff@fau.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Lily Vardimon,
Universität Tel Aviv,
Israel

Prof. Dr. Colin Goding,
Ludwig Institute for
Cancer Research,
Universität Oxford, UK

Prof. Dr. Lionel Larue,
Institut Curie, INSERM-CNRS,
Orsay, Frankreich

Prof. Dr. Gunther Meister,
Lehrstuhl für Biochemie,
Universität Regensburg,
Deutschland

Prof. Dr. Christoph Klein,
Universität Regensburg,
Deutschland

Einleitung

► Zellen in der Embryogenese besitzen mehrere Eigenschaften, wie hohe proliferative Fähigkeit, die auch in Krebszellen gefunden werden. In der Embryogenese sind diese Eigenschaften jedoch streng kontrolliert, während in der Tumorerkrankung diese Regulation verloren ist. In diesem Projekt konzentrieren wir uns auf ein detailliertes Verständnis der Differenzierung und Migration von Melanozyten in der Embryogenese im Vergleich zu Melanomzellen. Hierdurch können wir molekulare Veränderungen in der Regulation herausarbeiten.

Ziele des Projektes

► Das maligne Melanom ist ein aggressiv wachsender Tumor mit hoher Inzidenz, die noch kontinuierlich ansteigt. Melanomzellen leiten sich von Melanozyten, die aus der Neuralleiste stammen, ab und zeigen mehrere Eigenschaften von neuronalen Zellen. Während der Embryogenese offenbaren Melanoblasten, die Vorläufer von Melanozyten, mehrere "tumorartige" Eigenschaften wie aktive Wanderung und invasives Verhalten. Diese Befunde führen zu unserer Hypothese, dass nur wenige, aber wichtige molekulare Veränderungen in Melanomzellen diese befähigen, die Eigenschaften von embryonalen Melanoblasten "wieder zu erhalten und zu nutzen". Daher



Abb. 2: Melanoblasten in Zellkultur. Makroskopische und mikroskopische Unterschiede in der Pigmentierung sind deutlich sichtbar.

wird ein detailliertes Verständnis der Neuralleistendifferenzierung und Melanoblastenmigration zu entscheidenden neuen Informationen in Bezug auf die Melanomentwicklung und -progression führen. Die Hauptziele basierend auf der Hypothese sind: 1. Nachweis von Molekülen, die die Differenzierung von Melanomzellen induzieren können und 2. die Bestimmung der molekularen Unterschiede zwischen Melanoblasten, Melanozyten und Melanomzellen.

Schlussfolgerung und Ausblick

► Unsere experimentellen Ansätze sind darauf ausgerichtet, neuartige zentrale Faktoren der Melanomentwicklung und -progression zu entdecken, die bislang noch nicht mit der Pathogenese dieser Tumorerkrankung in Zusammenhang gebracht worden sind. Ein besseres molekulares und zelluläres Verständnis dieses biologischen Systems wird langfristig in effizienten Melanomtherapien münden.

Ausgewählte Publikationen

1. Bosserhoff AK, Ellmann L, Kuphal S: Melanoblasts in culture as an in vitro system to analyze melanoma. *Exp Dermatol* 20: 435-440 (2011).
2. Massoumi R, Kuphal S, Hellerbrand C, Haas B, Wild P, Spruss T, Pfeifer A, Fassler R, Bosserhoff AK: Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* 206: 221-232 (2009).
3. Schmidt J, Friebel K, Schönherr R, Coppolino MG, Bosserhoff AK: Directed, migration-associated secretion of MIA at the cell rear regulates melanoma cell mobility. *Cell Res* 20: 1224-1238 (2010).

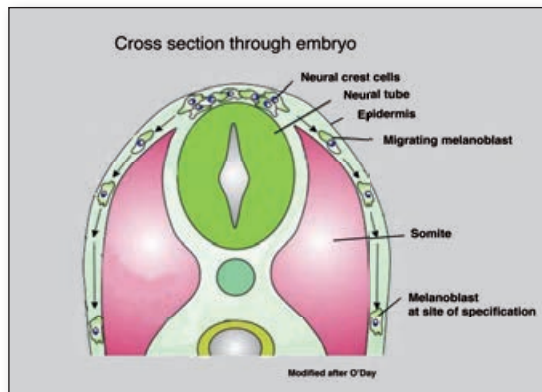


Abb. 1: Migration der Melanoblasten in der Embryogenese.

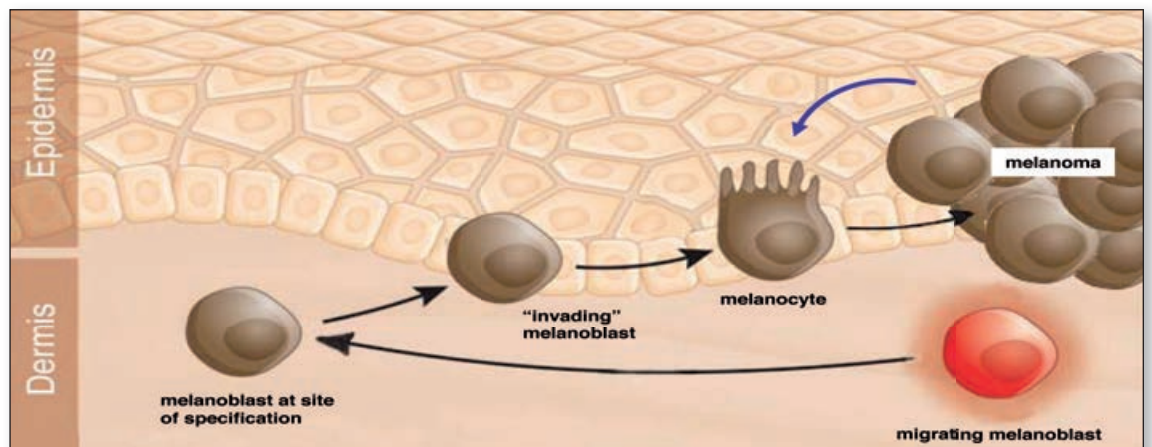


Abb. 3: Schematische Darstellung der Differenzierung und De-Differenzierung der melanozytären Zellen.

Kooperativität und Synergismus von microRNAs bei kardiovaskulären Erkrankungen

Über das Verständnis funktioneller microRNA-Interaktionen zu neuen Therapieansätzen für Herzinsuffizienz



Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Technische Universität München
pharma@ipt.med.tum.de

Einleitung

► Die Entdeckung von microRNAs vor 25 Jahren revolutionierte unser Verständnis der Genregulation. Diese nicht-kodierenden RNA-Moleküle bilden mit Proteinen sogenannte miRISC-Komplexe, die an mRNA binden und ihre Expression posttranskriptional unterdrücken. MicroRNAs werden in allen Lebensphasen eines Organismus benötigt, können aber auch Krankheiten ausprägen, darunter die sehr häufig tödlichen Herz-Kreislaufkrankungen.

Chronische Drucküberlastung des Herzens führt zur Vergrößerung des Herzmuskels (Hypertrophie) und Einlagerung von Bindegewebe (Fibrosierung), bis hin zur Herzinsuffizienz. Da microRNAs hieran beteiligt sind, werden in ihre therapeutische Beeinflussung große Hoffnungen gesetzt. Allerdings stellt uns schon die geringe Größe von microRNAs (nur 6-8 Nukleotide scheinen essentiell für mRNA-Erkennung zu sein) vor die Frage, welche Ziel-mRNAs tatsächlich von ihnen reguliert werden und nach welchen weiteren Kriterien dies erfolgt.

Ziel des Projekts

► In unserem Projekt verfolgen wir die Hypothese, dass microRNAs im Kontext der miRISCs miteinander wechselwirken, indem sie gegenseitig ihre Bindung an mRNA begünstigen (Kooperativität) oder gleichzeitig auf mehreren Ebenen eines Signalwegs wirken (Synergismus). Wir wenden hierzu bioinformatische Ansätze an und validieren diese experimentell in Herzmuskelzellen.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Mithilfe eines von uns entwickelten Verfahrens identifizierten wir miR-378 als microRNA, die der kardialen Hypertrophie entgegenwirkt. Anhand von Reporterassays *in vitro* und durch Manipulation der miR-378 *in vivo* validierten wir 4 Ziel-mRNAs, die demselben Signalweg (MAPK) zuzuordnen sind. Darüberhinaus

zeigte die bioinformatische Analyse humaner mRNAs, dass microRNA-Bindestellen darin häufiger als zufällig in Kooperativitäts-förderndem Abstand zueinander liegen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Unsere Ergebnisse stützen die Annahme, dass microRNAs besonders dann Wirkung zeigen, wenn sie mehrere Signalwegesebenen regulieren oder sich in ihrer Bindung an mRNA verstärken. Aktuell validieren wir das Konzept der kooperativen Bindung durch Kombination von microRNAs und Mutation ihrer Bindestellen.

Ausgewählte Publikationen

1. Jentzsch C, Leierseder S, Loyer X, Flohrschütz I, Sassi Y, Hartmann D, Thum T, Lagerbauer B, Engelhardt S. A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52:13–20.
2. Ganesan J, Ramanujam D, Sassi Y, Ahles A, Jentzsch C, Werfel S, Leierseder S, Loyer X, Giacca M, Zentilin L, Thum T, Lagerbauer B, Engelhardt S. MiR-378 controls cardiac hypertrophy by combined repression of mitogen-activated protein kinase pathway factors. *Circulation.* 2013;127:2097–2106.
3. Rinck A, Preusse M, Lagerbauer B, Lickert H, Engelhardt S* & Theis FJ*. The human transcriptome is enriched for miRNA-binding sites located in cooperativity-permitting distance. *RNA Biol.* 2013; 10, 1125-35. (*equal corresponding)

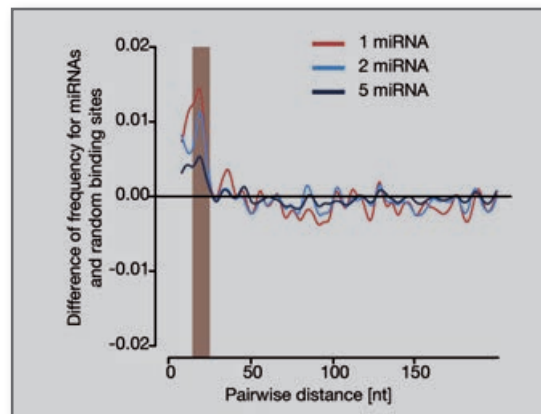


Abb. 2: Schematische Darstellung der kooperativen Bindung von miRNAs an mRNA.

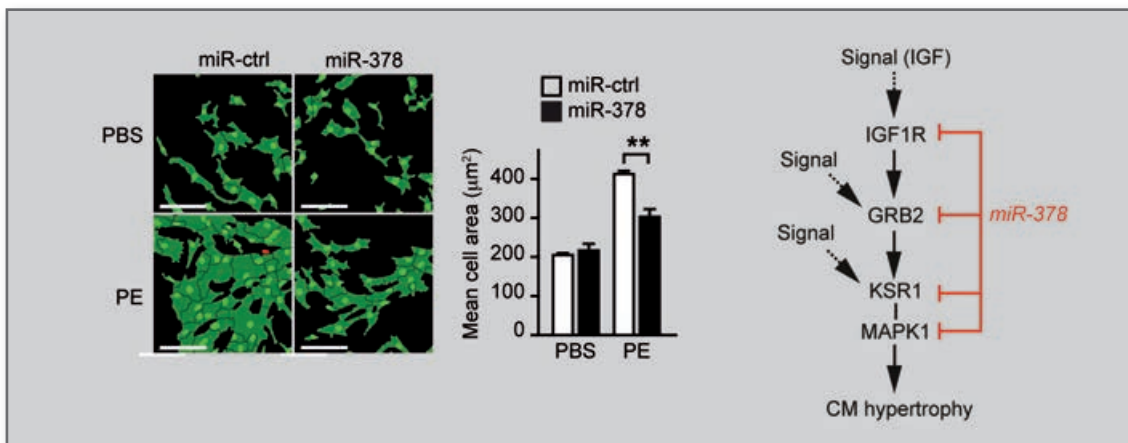


Abb. 1: MiR-378 unterdrückt Phenylephrin (PE)-induzierte Hypertrophie durch Regulierung mehrerer mRNAs im MAPK1-Signalweg.



Kooperationspartner

Prof. Dr. Gunter Meister,
Universität Regensburg,
Deutschland

Prof. Dr. Dr. Fabian Theis,
Center for Mathematics,
Technische Universität
München, Deutschland

PD Dr. Olaf Groß,
Klinikum rechts der Isar,
Technische Universität
München, Deutschland



Molekulare Systeme des angeborenen Immunsystems

Wie werden virale Nukleinsäuren durch cytosolische Rezeptoren erkannt?

Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner
Genzentrum,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
hopfner@genzentrum.lmu.de

Projektbeschreibung

► Das angeborene Immunsystem ist eine erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster wie z.B. virale RNA oder cytosolische DNA und aktivieren Signaltransduktionskaskaden, die zur Produktion von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen führen und damit die Abwehrmechanismen des Wirtes auslösen. Das angeborene antivirale Immunsystem ist bislang schlecht auf systemischer und quantitativer Ebene verstanden, da es z.B. unklar ist, welche molekulare Muster der unterschiedlichen RNA Moleküle RIG und MDA5 *in vivo* aktivieren, und wie virale Inhibitoren diese Prozesse blockieren.

In diesem Projekt untersuchen wir, ausgehend von der Struktur der RIG-I-artigen Rezeptoren, wie RIG-I und MDA5 Rezeptoren mit viraler RNA auf Systemebene interagieren und mit welchen Gegenmaßnahmen manche Viren z.B. MDA5 inaktivieren. Dazu verwenden und weiterentwickeln wir neben Struktur-Funktionsanalysen auch die PAR-CLIP Methode (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation), um *in vivo* Liganden von RIG-I und MDA5 aus virus-infizierten Zellen anzureichern und mit NGS (Next Generation Sequencing) zu identifizieren und zu quantifizieren. Diese Analysen sollen aufzeigen, welche Muster und RNA-Moleküle differentiell durch verschiedene RIG-I-artige Rezeptoren in einem Virus erkannt werden und inwieweit diese Rezeptoren miteinander kooperieren. Z.B. konnten wir zeigen, dass MDA5 Masernviren über AT-reiche Regionen erkennt und eventuell mit der mRNA der Viren interagiert, während RIG-I eher die Termini des viralen Genoms bindet. Zudem konnten wir zeigen, dass das V-Protein der Masernviren die ATPase Domäne des MDA5 Rezeptors teilweise entfaltet und damit inaktiviert. Langfristig wollen wir quantitativ verstehen, wie schon sehr geringe Mengen viraler RNA inmitten eines Überschusses zellulärer RNA eine robuste Interferonantwort auslösen

können, die Rezeptoren in Abwesenheit pathogener Muster aber inaktiv sind. Dies ist z.B. wichtig, um Autoimmunerkrankungen im Kontext steriler Aktivierung des Interferonsystems durch Varianten von RIG-I und MDA5 zu verstehen.

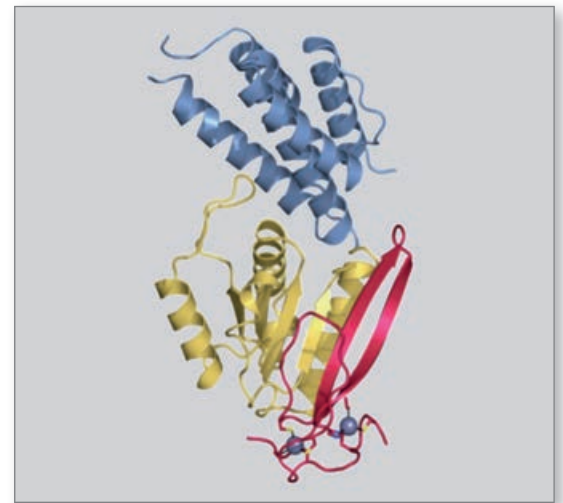


Abb. 2: Kristallstruktur der partiellen ATPase Domäne des RNA Rezeptors MDA5 (gelb/blau), gebunden an den viralen MDA5 Inhibitor V-Protein (magenta).

Kooperationspartner

Prof. Dr. Adolfo Garcia-Sastre,
Department of Microbiology,
Mount Sinai School of
Medicine, New York, USA

Karl-Klaus Conzelmann,
Genzentrum der
Ludwig-Maximilians-
Universität München,
Deutschland

Dr. Johannes Söding,
Max-Planck-Institut für
biophysikalische Chemie,
Göttingen, Deutschland

Ausgewählte Publikationen:

1. Runge S, Sparrer KM, Lässig C, Hembach K, Baum A, García-Sastre A, Söding J, Conzelmann KK, Hopfner KP. (2014) *In vivo* ligands of MDA5 and RIG-I in measles virus-infected cells. *PLoS Pathog.* 2014 Apr 17;10(4):e1004081. (Collaboration Hopfner-Söding)
2. Hornung V, Hartmann R, Ablasser A, Hopfner KP. (2014) OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids. *Nat Rev Immunol.* 14:521-8.
3. Motz C, Schuhmann KM, Kirchofer A, Moldt M, Witte G, Conzelmann KK, Hopfner KP. (2013). Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling. *Science.* 339(6120):690-3.

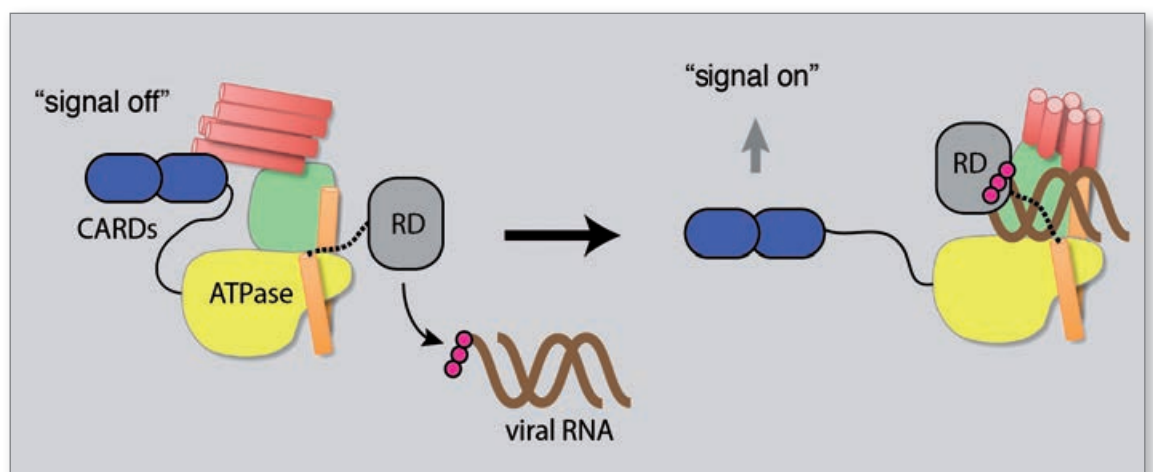


Abb. 1: Mechanismus der Aktivierung von RIG-I durch RNA Liganden.

Ein systembiologischer Blick auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in der Pädiatrie

Analyse der genetischen und immunologischen Pathomechanismen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Kindesalter unter Einbeziehung eines interdisziplinären Netzwerkes von Wissenschaftlern aus der klinischen Pädiatrie, Genomik, Proteomik und Bioinformatik



Einleitung

► Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) umfassen eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit einer chronischen Immunaktivierung und Zerstörung von Darmgewebe assoziiert sind. In Abhängigkeit von den klinischen und pathologischen Eigenschaften werden CED als Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder nicht klassifizierbare Colitis eingestuft. Die Ursachen für CED sind größtenteils noch nicht bekannt und umfassen sowohl extrinsische Faktoren (z. B. Umwelteinflüsse) als auch intrinsische Faktoren (genetische Prädisposition). Frühkindliche Verlaufsformen der CED können häufig nicht klassifiziert werden und es wird ein schwerer Krankheitsverlauf mit perianalen Abszessen bzw. Fisteln beobachtet. Die konventionellen therapeutischen Modalitäten sind unspezifisch und oft nicht ausreichend.

In der Vergangenheit hat unsere Arbeitsgruppe bereits die ersten rein monogenetischen CED-Varianten als *loss-of-function*-Mutationen in den IL-10R-Genen identifiziert. Vor dem Hintergrund der molekulargenetischen Aufklärung des zugrundeliegenden Gendefekts konnten IL-10R-defiziente Patienten mittels einer allogenen Knochenmarkstammzelltransplantation erfolgreich behandelt werden. Allerdings zeigen nur 10-15% aller Patienten mit frühzeitig auftretender CED eine Beeinträchtigung in der IL-10 vermittelten Signalkaskade.



Abb. 1: Jeder neue genetische Defekt bildet einen weiteren Bruchteil der Ursachen für CED ab – wie Teile eines komplexen Puzzles.

Ziel des Projektes

► Das umfassende Ziel dieses Projektes ist die Identifikation neuer monogenetischer Störungen, die zu einem frühzeitigen Auftreten von CED führen und die Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen der gestörten intestinalen Homöostase. Diese Befunde bilden die Grundlage zur Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien für Kinder mit therapierefraktären Verlaufsformen von CED.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Während der bisherigen Förderperiode haben wir ein Kollektiv von über 150 Kindern mit frühkindlicher CED mittels Exom-Sequenzierung analysiert. Im Rahmen dieses genetischen Screenings haben wir bereits mehrere neue Kandidatengene, die gegenwärtig experimentell validiert und charakterisiert werden, identifiziert. Die Entschlüsselung der komplexen regulatorischen Mechanismen erfordert die Zusammenarbeit in einem interdisziplinären Netzwerk, welches die Expertise von Kollaborationspartnern aus der Biochemie, Zellbiologie, Biophysik und Immunologie nutzt.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Die Untersuchung von Patienten mit frühzeitig auftretender CED ermöglicht die Analyse von Signalwegen, die die Homöostase des menschlichen intestinalen Immunsystems kontrollieren. Ein systembiologischer Forschungsansatz ist ein erfolgsversprechendes Konzept zur Identifikation neuer therapeutischer Angriffspunkte für Patienten mit CED.

Ausgewählte Publikationen

1. Murugan D, Albert MH, Langemeier J, Bohne J, Puchalka J, Jarvinen PM, Hauck F, Klenk AK, Prell C, Schatz S, Diestelhorst J, Sciskala B, Kohistani N, Belohradsky BH, Muller S, Kirchner T, Walter MR, Bufler P, Muise AM, Snapper SB, Koletzko S, Klein C, and Kotlarz D. Very early onset inflammatory bowel disease associated with aberrant trafficking of IL-10R1 and cure by T cell replete haploidentical bone marrow transplantation. *J Clin Immunol*. 2014 Apr;34:331-339
2. Kotlarz D, Beier R, Murugan D, Diestelhorst J, Jensen O, Boztug K, Pfeifer D, Kreipe H, Pfister ED, Baumann U, Puchalka J, Bohne J, Egritas O, Dalgic B, Kolho KL, Sauerbrey A, Buderer S, Gungor T, Enninger A, Koda YK, Guariso G, Weiss B, Corbacioglu S, Socha P, Uslu N, Metin A, Wahbeh GT, Husain K, Ramadan D, Al-Herz W, Grimbacher B, Sauer M, Sykora KW, Koletzko S, and Klein C. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology*. 2012 Aug; 143:347-355.
3. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hantscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderer S, Snapper SB, Grimbacher B, and Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009 Nov;361:2033-2045.

Prof. Dr. Christoph Klein

Dr. von Haunersches Kinderspital, Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

christoph.klein@med.uni-muenchen.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Eckard Wolf, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Matthias Mann, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland

PD Dr. Olaf Groß, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Beate Winner, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung IZKF, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Deutschland



Das Zusammenspiel von Stoffwechsel, Genregulation und Umwelt

Genom-weite Analyse der Mechanismen zur Gen-regulatorischen Anpassung an veränderte Stoffwechselbedingungen

Prof. Dr. Andreas Ladurner
 Adolf-Butenandt-Institut, LMU
 Biomedizinisches Centrum,
 Ludwig-Maximilians-
 Universität München
 andreas.ladurner@
 med.uni-muenchen.de



Kooperationspartner

Bartek Wilczynski,
 Institute of Informatics,
 University of Warsaw,
 Warszawa, Polen

Matthias Mann,
 Max-Planck-Institut
 für Biochemie,
 Martinsried, Deutschland

David Arnosti,
 Gene Expression in Develop-
 ment and Disease Initiative,
 Michigan State University,
 Michigan, USA

Joan Conaway,
 Stowers Institute for
 Medical Research,
 Kansas City, USA

Einleitung

► Damit Organismen überleben können ist ihre Anpassungsfähigkeit an veränderte Umwelt- und Stoffwechselbedingungen von großer Bedeutung. Abhängig von der Verfügbarkeit bestimmter Nährstoffe erreichen sie dies durch Anpassung ihres Wachstums, der Zellmorphologie und ihres Verhaltens. Wir untersuchen, wie Stoffwechseleränderungen dynamisch die Chromatin-Struktur regulieren und welchen Einfluss bestimmte Metabolite des Stoffwechsels auf epigenetische Mechanismen und nukleäre Prozesse, wie zum Beispiel die Expression bestimmter Gene, ausübt.

Es ist bekannt, dass bestimmte Zelltypen eines Organismus spezifische, einzigartige Reaktionen auf bestimmte Nährstoffangebote auslösen, um beim Prozess des Überlebens mitzuwirken. Diese spezifischen Zellen existieren jedoch oft in einem komplexen Zellverbund unterschiedlicher Zelltypen, die nicht einfach zu trennen sind. Zum Beispiel zeigen sowohl Pankreas als auch Gehirn lebensnotwendige, jedoch ganz spezifische Antworten auf Nährstoffangebote, die sich innerhalb dieser Organe von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden. Die große Herausforderung in unserem Forschungsfeld ist es daher verstehen zu lernen, wie die Genaktivität in einzelnen Zelltypen innerhalb eines Zellverbandes sich genom-weit und metaboliten-abhängig anpasst.

Ziel des Projektes

► In unserem BioSysNet Projekt verwenden wir neuartige, von uns entwickelte Methoden um detailliert zu untersuchen, wie Veränderungen des Stoffwechsels – und somit die Verfügbarkeit bestimmter Metabolite – zu unterschiedlichen, jedoch bestimmten Genexpressionsmustern in verschiedenen Zelltypen eines Organismus führen können. Darüber hinaus untersuchen wir auch, welche Mechanismen diese Anpassungen katalysieren. Wir stützen unser Interesse an der nährstoffbedingten, zelltyp-spezifischen Kontrolle der Genexpression auf neuartige, genetik-unterstützte Methoden im leistungsfähigen Modellorganismus *Drosophila melanogaster*, der Taufleie. Wir nutzen sowohl genomische Ansätze als auch bioinformatische Methoden, um gezielt spezifische Parameter zu analysieren, die durch metabolische Störungen zu einer epigenetischen und genregulatorischen Plastizität führen. Zu diesen Parametern gehören die Chromatin-Struktur, verschiedene Histon-Varianten und Histon-Modifikationen, sowie Transkriptionsfaktoren und die Quantifizierung aller mRNA Moleküle innerhalb der unterschiedlichen Zelltypen im Gehirn der Fliege.

Ausblick

► Dieses BioSysNet Projekt vereint unsere Interessen am Stoffwechsel, an der Epigenetik sowie der „Genomics“ durch die Kombination aus genetischen, biochemischen, physiologischen und „Proteomik“ Analysen des Metabolismus. Unsere langfristigen Ziele sind es, die epigenetischen und transkriptionellen Mechanismen zu identifizieren, zu studieren und in ein Modell zu formen, die die systematische Antwort eines Organismus auf eine veränderte Umwelt begleiten.

Ausgewählte Publikationen

- 1 CAST-ChIP maps cell-type-specific chromatin states in the *Drosophila* central nervous system“. Tamás Schauer, Petra C. Schwalie, Ava Handley, Carla E. Margulies*, Paul Flicek* and Andreas G. Ladurner* (2013), Cell Reports, Oct 17, vol. 5, no. 1, pp. 271-282. *Korrespondierende Autoren

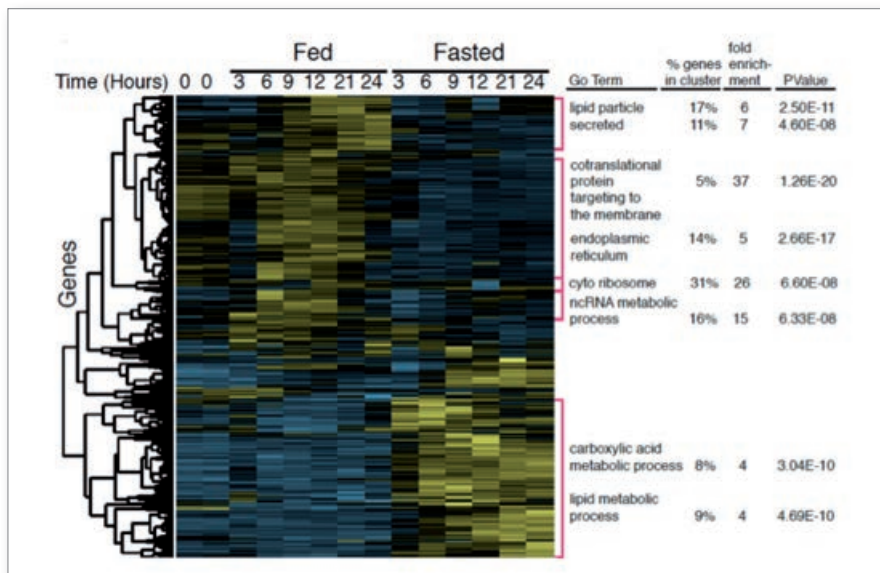


Abb. 1: Cluster bestimmter mRNA Expressionsprofile eines Zeitverlauf-Experiments aus gefütterten („Fed“) gegenüber gefasteten („Fasted“) adulten *Drosophila* Fliegen. Die Proben wurden alle 3 Stunden der ersten 12 Stunden des Fütterungsverlaufs aus Fliegenköpfen präpariert.

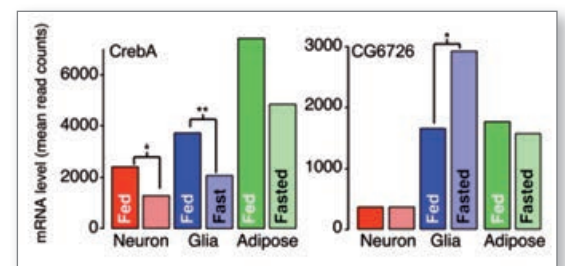


Abb. 2: Das sogenannte „Polysomen profiling“ aus *Drosophila* Köpfen zeigt sowohl globale, als auch Zelltyp-spezifische Transkriptions-Antworten. Im Zustand des Fastens („Fasted“) wird die Expression von CrebA in allen 3 Zelltypen runterreguliert (linke Abbildung), während die mRNA für das Gen CG6726 Glia-spezifisch zunimmt und in Neuronen und Fettzellen unverändert bleibt (rechte Abbildung).

Identifizierung von zellulären Regulatoren der miRNA-Biogenese

Regulation der miRNA-Prozessierung durch RNA-bindende Proteine



Prof. Dr. Gunter Meister
Lehrstuhl für Biochemie,
Universität Regensburg

gunter.meister@vkl.uni-regensburg.de



Kooperationspartner

Dr. Henning Urlaub,
Max-Planck Institut
für Biophysikalische Chemie,
Göttingen, Deutschland

Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt,
Institut für Pharmakologie
und Toxikologie,
Technische Universität
München, Deutschland

Prof. Dr. Anja Bosserhoff,
Institut für Biochemie,
Friedrich-Alexander-Uni-
versität Erlangen-Nürnberg,
Deutschland

Einleitung

► MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression negativ beeinflussen, indem sie die Translation inhibieren oder den Abbau der mRNA stimulieren. MiRNAs findet man in den Genomen von fast allen Eukaryoten. Sie werden während eines Reifungsprozesses aus primären Vorläufertranskripten herausgeschnitten. Dabei spielen die RNase III-Enzyme Drosha und Dicer eine wichtige Rolle (Abbildung 1). Im Menschen gibt es mehr als 1000 verschiedene miRNAs und ihre Expression ist durch zusätzliche Faktoren stark reguliert und unterschiedliche miRNA-Mengen wurden mit der Ausprägung von vielen Krankheiten, unter anderem auch Krebs, korreliert. RNA-bindende Proteine können hierbei mit verschiedenen miRNA-Prozessierungsintermediaten wechselwirken und die Expression der reifen miRNAs positiv oder negativ beeinflussen.

Ziele des Projektes:

► In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Arbeiten zeigen, dass die Biogenese von miRNAs auf vielen Stufen durch RNA-bindende Proteine reguliert werden kann. Allerdings ist bislang nur eine geringe Zahl solcher Proteine beschrieben worden. Es ist daher das Ziel unseres Projektes, solche Faktoren zu finden

und funktionell zu charakterisieren. Wir wählen hierzu einen biochemischen Ansatz, in dem wir miRNA-Vorläufer mit verschiedenen Zellextrakten inkubieren und die spezifisch gebundenen Proteine mittels Massenspektrometrie identifizieren. Wir haben hierzu ca. 100 verschiedene miRNAs und 11 verschiedenen Zelllinien ausgewählt. Wir erhoffen uns dadurch, miRNA-Regulatoren zu identifizieren, die eventuell sogar an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs beteiligt sein könnten.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► MiRNAs sind wichtige Regulatoren vieler zellulärer Prozesse und sind somit auch an der Ausprägung von verschiedenen Krankheiten beteiligt. Unsere Arbeiten tragen dazu bei, Gründe die zur Fehlexpression von miRNAs führen können besser zu verstehen. Dies wiederum trägt zu einem besseren Verständnis der molekularen Ursachen vieler Krankheiten bei. Die Modulierung solcher regulatorischen Netzwerke könnte sogar zu möglichen Therapieansätzen führen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Proteine, die RNA-Bindedomänen tragen, sind im menschlichen Genom sehr oft anzutreffen. Interessanterweise sind die meisten dieser Proteine nur wenig oder oft gar nicht funktionell charakterisiert. Da die miRNA-Biogenese an vielen verschiedenen Stufen reguliert wird, ist unsere Hypothese, dass solche RNA-bindende Proteine an miRNA-Vorläufer binden und ihre Prozessierung beeinflussen können. Man könnte sogar soweit spekulieren, dass miRNA-Familien oder auch einzelne miRNAs ein Repertoire an Proteinen besitzen, die unter verschiedenen Bedingungen die Expression steuern. Unsere Arbeiten sollen dazu beitragen diese wichtigen zellulären Prozesse besser zu verstehen.

Ausgewählte Publikationen

1. Loedige I., Stotz M., Qamar S., Kramer K., Hennig J., Schubert T., Löffler P., Längst G., Merkl R., Urlaub H. & Meister G. (2014) The NHL domain of BRAT is an RNA-binding domain that directly contacts the hunchback mRNA for regulation. *Genes Dev.*, 28(7): 749-764.
2. Weinmann, L., Höck, J., Ivacevic T., Ohrt T., Mütze J., Schwillie P., Kremmer E., Benes V., Urlaub, H., & Meister G. (2009) Importin 8 is a gene silencing factor that targets Argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell*, 136, 496-507.
3. Ender C., Krek A., Friedländer M.R., Beitzinger M., Weinmann L., Chen W., Pfeffer S., Rajewsky N. & Meister G. (2008) A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular Cell*, 32, 519-528.

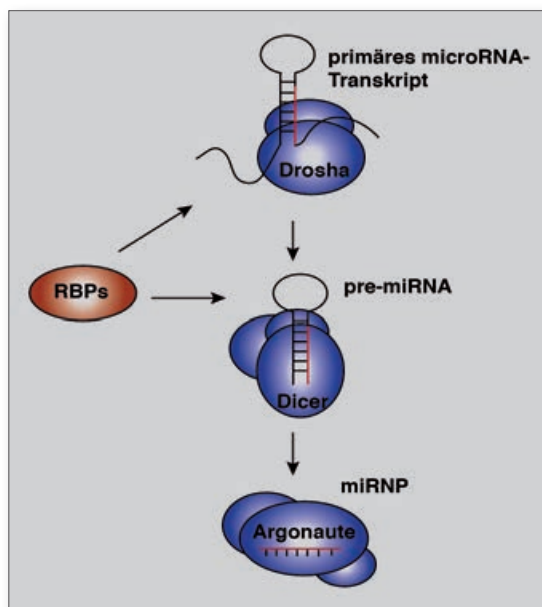


Abb. 1: Regulation der miRNA-Maturierung durch RNA-bindende Proteine. MiRNAs werden als primäre Transkripte synthetisiert und durch Drosha zu miRNA-Vorläufer-Molekülen (pre-miRNAs)prozessiert. Diese RNAs werden durch Dicer zu reifen miRNAs weiterprozessiert. Reife miRNAs interagieren mit einem Mitglied der Argonaute-Proteinfamilie und werden in komplexe RNA-Proteinstrukturen eingebaut (miRNPs). Ziel dieses Projektes ist es RNA-bindende Proteine zu finden (RBPs), die die Biogenese von miRNAs positiv oder negativ beeinflussen können.



Regulation der transkriptionellen Dynamik als globaler Mechanismus zur Kontrolle von Selbsterneuerung und Differenzierung während der hämatopoietischen Entwicklung

Untersuchung der globalen Transkriptions-Dynamik zur Studie von Leukämien

Prof. Dr. Robert Slany

Institut für Genetik,
Friedrich-Alexander
Universität Erlangen-
Nürnberg
rslany@biologie.uni-erlangen.de



Kooperationspartner

Prof. Markus Metzler,
Kinderklinik, Universität
Erlangen-Nürnberg,
Deutschland

Prof. Andreas Mackensen,
Med. Klinik V, Universität
Erlangen-Nürnberg,
Deutschland

Einleitung

► Leukämie ist letztlich die Konsequenz aus einer Reihe von genetischen Fehlentscheidungen, die eine Blutzelle genommen hat. Gesteuert von einem Genexpressionsprogramm, das normalerweise die vorübergehende und limitierte Expansion von hämatopoietischen Vorläuferzellen kontrolliert, vermehren sich diese jetzt unbegrenzt anstatt zu funktionalen Blutzellen zu reifen. Da viele der an diesem Prozess beteiligten Gene über ihre Ablesegeschwindigkeit (Transkriptionselongation) kontrolliert werden, kann über die globale Bestimmung der Transkriptionsdynamik ein Inventar der bei der Leukämie fehlgeleiteten Prozesse erstellt werden.

Ziel des Projektes

► In diesem Projekt modellieren wir die Vorgänge bei der Leukämieentstehung mit Hilfe von schaltbaren Onkogenen und verfolgen kontinuierlich und „live“ die genomweiten Änderungen der Gen-Ablesegeschwindigkeiten während der malignen Entartung von Blutzellen. Auf diese Weise entsteht ein zeitaufgelöster Über-

blick über diesen Prozess, der jetzt ähnlich wie in einer Aneinanderreihung von Einzelbildern einen „Film“ des „Tathergangs“ ermöglicht, um die verantwortlichen Akteure eindeutig zu identifizieren.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Aus den bisher erhobenen Daten lässt sich nicht nur ein lückenloses Gesamtbild der an der Leukämieentstehung beteiligten Faktoren, mit einer Reihe von bisher unbekanntenen Elementen zeichnen, sondern die mechanistische Analyse der darin involvierten Generegulationsmechanismen legt auch eine gezielte pharmakologische Interventionsstrategie nahe. In Zukunft kann das zu einer entsprechenden Anpassung bisheriger Behandlungsmethoden und zu effizienteren und nebenwirkungsärmeren Therapien führen.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Mit diesem Projekt erarbeiten wir die methodischen Grundlagen, die auch für andere Tumoren das Verstehen des dynamischen Zusammenspiels der an der Krebsentstehung beteiligten Prozesse über eine reine Katalogisierung hinaus ermöglichen, um so „persönlich maßgeschneiderte“ Therapien voranzutreiben.

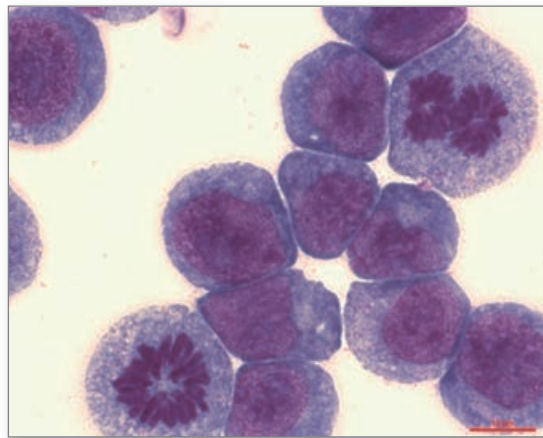


Abb. 1: Aggressive Leukämiezellen unter dem Mikroskop.

Ausgewählte Publikationen

1. Maethner E., et al (2013) MLL-ENL inhibits polycomb repressive complex 1 to achieve efficient transformation of hematopoietic cells, CellReports, May 30;3(5):1553-66.
2. Takacova S., et al (2012) DNA Damage Response and Inflammatory Signaling Limit the MLL-ENL induced Leukemogenesis *in vivo*, CancerCell,21(4):517-531.
3. Müller D., et al (2009) Misguided Transcriptional Elongation Causes Mixed Lineage Leukemia, PLOS Biology, 7(11):e1000249.

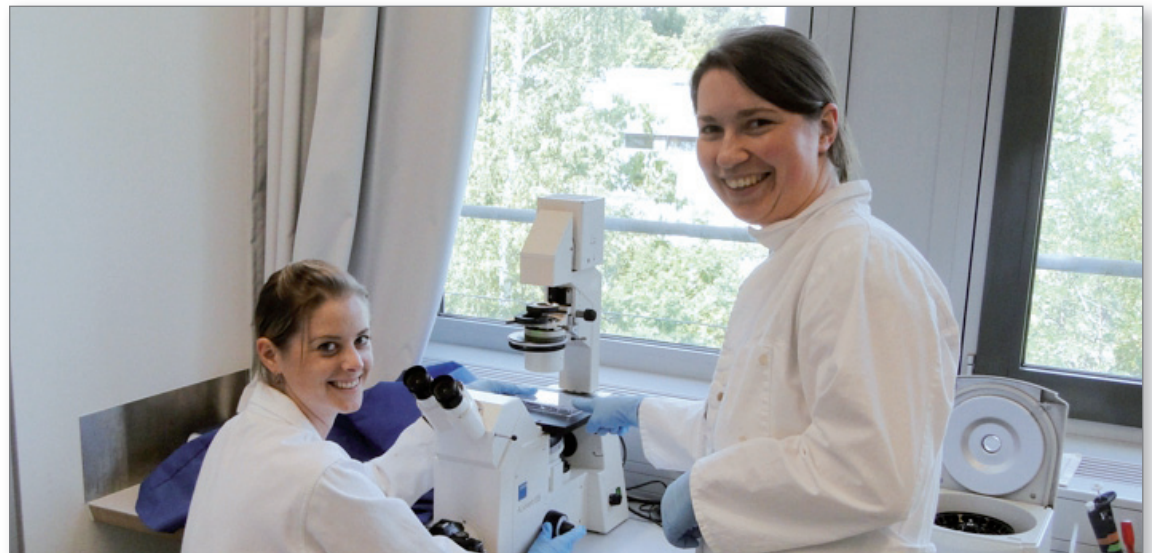


Abb. 2: Im Zellkulturlabor.

Interzellulärer Plausch in Tumoren

Modellierung der Zusammensetzung von Nachrichten



Prof. Dr. Rainer Spang

Institut für Funktionelle Genomik, Lehrstuhl für Statistische Bioinformatik, Universität Regensburg
rainer.spang@klinik.uni-regensburg.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Claus Hellerbrand, Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland

Prof. Dr. Peter Oefner, Institut für Funktionelle Genomik, Universität Regensburg, Deutschland

Einleitung

► Zellen kommunizieren in einem Gewebe über Signalproteine, die sie ausscheiden. Nichttumorzellen verständigen sich dadurch auch mit den Zellen eines Tumors. Wieso interessiert uns, was hier gesprochen wird? Brisant müssen diese Gespräche sein, denn ausgesendete Signale können einen Tumor zum Wachstum anstacheln oder ihn resistent gegenüber einer Chemotherapie machen. Wie in Gesprächen, ist auch diese Kommunikation wechselseitig, das heißt, der Tumor antwortet seinerseits mit Signalen, die von Nichttumorzellen in seiner Nähe (dem Stroma) empfangen, bearbeitet und beantwortet werden. Dabei wird ständig gleichzeitig gesprochen. Dies konnten wir experimentell unterbinden. In unseren Versuchsanordnungen gibt es immer nur Signale einer Senderzelle, die wir untersuchen können, und daraufhin eine Verarbeitung dieser Signale durch die Empfängerzelle, die wir ebenfalls untersuchen können. Zu einer Antwort lassen wir es nicht mehr kommen. Wir wollen zunächst nur verstehen, mithilfe welcher Moleküle welche Nachrichten transportiert werden. Dazu muss man wissen, dass eine Nachricht nicht aus einem einzigen dafür vorgesehenen Molekül besteht, sondern immer aus einer Mischung von hunderten solcher Moleküle. Es ist gerade die quantitative Zusammensetzung dieser Mischung, die Empfängerzellen interpretieren. Wie sie das tun, wollen wir verstehen.

Ziele dieses Projektes:

► Sowohl das Senden als auch das Verarbeiten empfangener Nachrichten wird durch komplexe molekulare Netzwerke in den Zellen bewerkstelligt. Die unterschiedlichen Signalmoleküle verbinden beide Netzwerke zu einem großen. Im Computer entwickeln wir Modelle, die diesen Vorgang nachbilden. Dies tun wir so, dass

wir virtuell mitreden können. Wir berechnen, was die Empfängerzelle wohl tun würde, wenn wir eine bestehende Nachricht verändern, zum Beispiel, indem wir die Menge eines bestimmten Moleküls in der Nachricht verdoppeln.

Zusammen mit den Laboren von Prof. Claus Hellerbrand und Prof. Peter Oefner, in Regensburg, kultivieren wir Senderzellen, getrennt von Empfängerzellen, in Lebertumoren und nutzen die ausgeschiedenen Signalmoleküle der Senderzellen (das konditionierte Medium) zur Stimulation der Empfängerzellen. Wir bestimmen dabei die molekulare Zusammensetzung der Nachricht, sowie das Transkriptom der Sender- und Empfängerzellen, als Charakterisierung ihrer internen Netzwerke. Diese Daten gehen in den Computer und werden modelliert.

Ausblick

► Unsere Vision ist es, nicht nur virtuell am Computer mitzureden, wenn sich Zellen im Tumor unterhalten, sondern auch in Form neuer Therapien im Patienten. Man kann sich zum Beispiel vorstellen, eine Nachricht, die „Wachse!“ bedeutet, mithilfe eines Inhibitors eines interzellulären Signalmoleküls so zu manipulieren, dass sie vom Tumor nicht mehr verstanden wird. Die Wirkung dieses Inhibitors wollen wir zuvor am Computer durchspielen. In anderen Worten, wir wollen mit unseren Programmen Ideen für neue Tumorthérapien entwickeln. Ganz konkret erhoffen wir uns, existierende Therapien (wie Chemotherapien) mit Modulatoren der interzellulären Kommunikation so zu kombinieren, dass der Tumor sensibler auf die Therapie reagiert, weil ihm Hilfe von den benachbarten Zellen entzogen wurde.

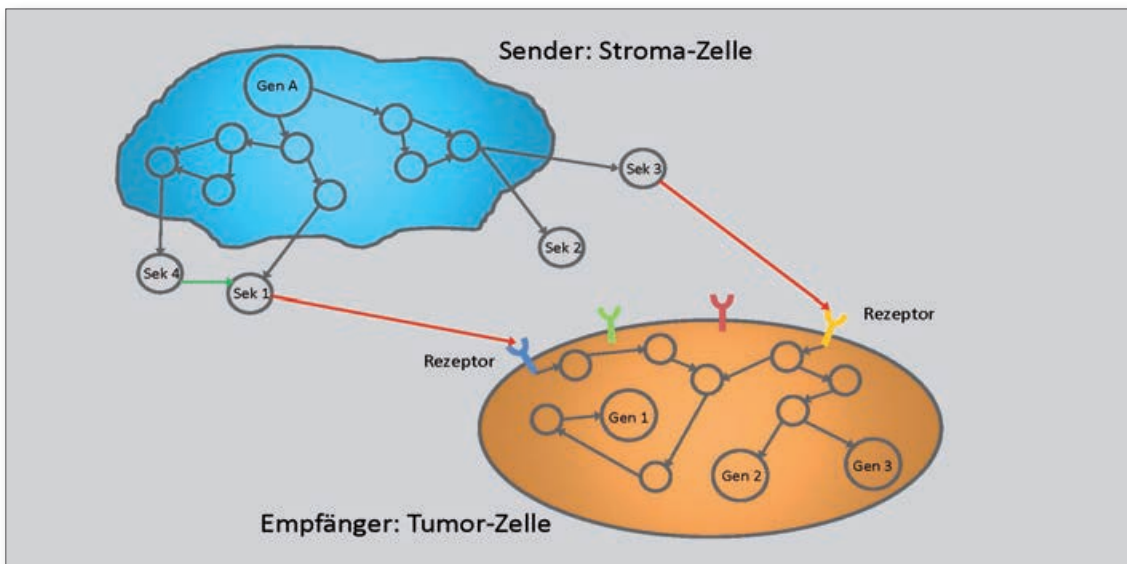


Abb. 1: Kommunikation zwischen Tumor und Nichttumorzellen: Das molekulare Netzwerk einer Sender-Zelle bestimmt die Zusammensetzung unterschiedlicher Moleküle und sendet so eine Nachricht an die Empfänger-Zelle. Das intrazelluläre Netzwerk der Empfängerzelle verarbeitet die Nachricht und trifft dann Entscheidungen wie Wachstum, Teilung oder Freitod (Apoptose).



Kleine RNAs kontrollieren die Dynamik der Genexpression

Wir untersuchen den Einfluss von nichtkodierenden RNA-Molekülen auf den zeitlichen Ablauf von Genexpressionsveränderungen im Modellpathogen *Salmonella*

Prof. Dr. Jörg Vogel
Institut für Molekulare Infektionsbiologie,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

joerg.vogel@uni-wuerzburg.de



Cooperation partners

Dr. Cynthia Sharma,
Zentrum für Infektionsforschung (ZINF),
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Deutschland

Dr. Ana Eulalio,
Institut für Molekulare Infektions Biologie (IMIB),
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Deutschland

Prof. Dr. Ben Luisi,
Department of Biochemistry,
University of Cambridge,
80 Tennis Court Road
CB2 1GA, Cambridge,
UK

Projektbeschreibung

► Eine überraschende Erkenntnis der Genomik in den letzten zehn Jahren war, dass Bakterien mindestens genauso viele regulatorische RNA-Moleküle wie Transkriptionsfaktoren besitzen. Insbesondere die nicht-kodierenden kleinen RNAs im Modellorganismus *Escherichia coli* oder dem engverwandten Humankeim *Salmonella* scheinen in der Lage zu sein, einen beträchtlichen Teil der Gene dieser Bakterien zu regulieren. Dies geschieht nach der Transkription und ähnlich wie bei den eukaryontischen microRNAs durch sehr kurze, hochspezifische Basepaarungen. Es ist bisher wenig verstanden, wie sich die Genregulation durch kleine RNAs von der Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren unterscheidet, aber es weist alles darauf hin dass kleine RNAs weniger als binäre Schalter und eher als Modulatoren und Vernetzer von Stressantworten und Virulenzprogrammen agieren.

In unserem Projekt wollen wir deswegen herausfinden, wie kleine RNAs die Dynamik und Schwellenwerte von allgemeinen Stressantworten und Übergangszuständen bei Infektionsvorgängen verändern. Dazu benutzen wir den vielseitigen Keim *Salmonella Typhimurium* den wir in den letzten Jahren als einen der wichtigsten Modelorganismen in der RNA-Biologie etabliert haben. Wir fokussieren uns hier auf die sogenannten Hfq-abhängigen kleinen RNAs und bei den physiologischen Prozessen auf den Metabolismus und Veränderungen an der Zellhülle. Methodisch gesehen ruht unser Projekt sehr stark auf Hochdurchsatz-Technologie zur RNA-Sequenzierung (RNA-seq) für die wir auch neue Methoden entwickeln.

Unser Projekt ist sowohl für die Infektionsbiologie als auch die Biotechnologie von hoher Bedeutung. Wir erwarten neue Ansatzpunkte dafür, wie wir menschliche Keime in ihrer Fähigkeit, den Menschen zu infizieren, mit alternativen Ansätzen schwächen können, was angesichts der akuten Krise bei Antibiotika immer wichtiger wird. Zum anderen kann ein tieferes Verständnis der Funktionsweisen kleiner RNAs dazu genutzt werden, Bakterien die in der pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie verwendet werden mit neuen RNA-basierten Schaltkreisen auszustatten und somit zum Nutzen des Menschen zu verändern.

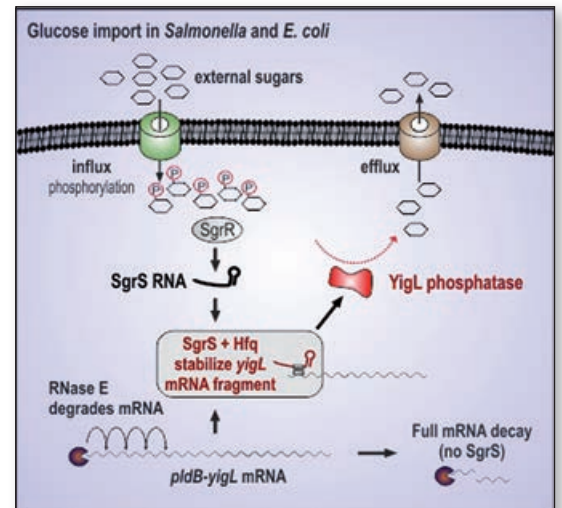


Abb. 2: Neuartiger molekularer Mechanismus der Genaktivierung durch die kleine RNA SgrS, der es Salmonellen ermöglicht, sich gegen giftige Zucker aus der Umgebung zu wehren (Papenfert K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J (2013) Cell 153:426-37).

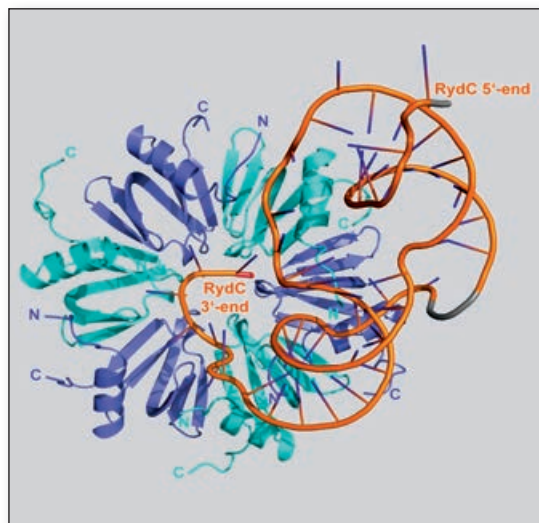


Abb. 1: Kristallstruktur der kleinen RNA RydC von *Salmonella* im Komplex mit dem Hfq-Protein (Dimastrogiovanni D, Fröhlich KS, Bandyra KJ, Bruce HA, Hohensee S, Vogel J, Luisi BF (2014) eLife 3:e05375).

Ausgewählte Publikationen

- Miyakoshi M, Chao Y, Vogel J (2015) Crosstalk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA EMBO Journal in press.
- Papenfert K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J (2013) Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis Cell 153:426-37.
- Chao Y, Papenfert K, Reinhardt R, Sharma CM, Vogel J (2012) An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. EMBO Journal 31(20):4005-19.

Einfluss von mütterlichem Diabetes mellitus auf die embryonale, fötale und postnatale Entwicklung

In diesem Projekt werden entwicklungsbiologische Effekte von mütterlichem Diabetes mellitus mit Hilfe von genetisch maßgeschneiderten Maus- und Schweinemodellen untersucht



Projektbeschreibung

► Diabetes mellitus vor bzw. während der Schwangerschaft birgt Risiken für die embryonale, fötale und postnatale Entwicklung. Allein in Deutschland entwickeln mehr als 20.000 Frauen pro Jahr während der Schwangerschaft einen Diabetes mellitus (= Gestationsdiabetes), bei weiteren ca. 5000 Frauen besteht bereits vor der Schwangerschaft eine Diabeteserkrankung (= präkonzeptioneller Diabetes mellitus). Bei mütterlichem Diabetes mellitus treten bestimmte Embryopathien, wie Neuralrohrdefekte und Herzmissbildungen, vermehrt auf. Zudem haben Nachkommen diabetischer Mütter ein höheres Risiko, selbst Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus zu entwickeln.

Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang unvollständig geklärt und können am Menschen aus ethischen Gründen auch nur sehr eingeschränkt untersucht werden. Daher sind geeignete Tiermodelle für die Untersuchung dieser Fragestellung unverzichtbar. Die meisten Studien verwenden dafür diabetische Mausmodelle, allerdings unterscheidet sich die Embryonalentwicklung der Maus in wichtigen Aspekten, wie z.B. im Zeitpunkt der Aktivierung des embryonalen Genoms, deutlich von der des Menschen. Zudem werden Mäuse unreifer geboren als menschliche Babys, so dass für das letzte Drittel der Schwangerschaft der Frau kein entsprechender Trächtigkeitsabschnitt der Maus existiert.

Neue Modelle und experimentelle Ansätze

► Wir haben genetisch (prä-)diabetische Schweinemodelle entwickelt, die aufgrund ihrer dem Menschen näheren Entwicklungsbiologie wichtige zusätzliche Einblicke in die Auswirkungen des mütterlichen Diabetes auf die Nachkommen liefern können. Transgene Schweine, welche die Insulinmutante C94Y exprimieren,

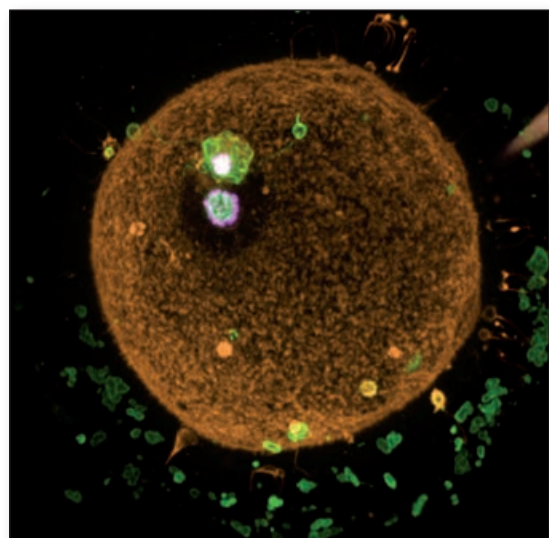


Abb. 1: Eizelle eines langzeit-diabetischen Schweines.

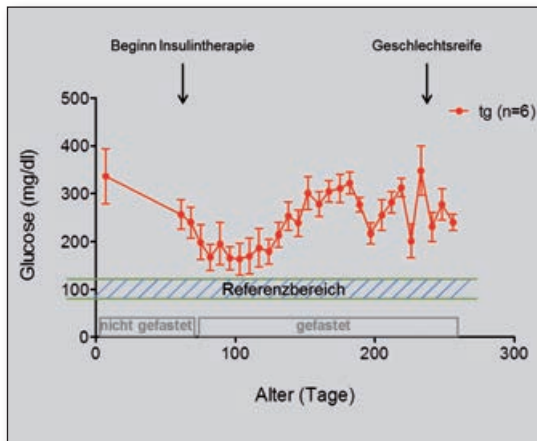


Abb. 2: Blutzuckerspiegel von langzeit-diabetischen Schweinen.

entwickeln einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus, können aber mit Insulin so gut eingestellt werden, dass sie trächtig werden und Nachkommen haben können [1]. An diesem Modell untersuchen wir Effekte eines präkonzeptionellen mütterlichen Diabetes mellitus auf die Entwicklungskapazität von Eizellen sowie auf die frühe Embryonalentwicklung. Dafür haben wir ein Verfahren auf der Basis von RNA-Sequenzierung entwickelt, mit dem das Timing der Aktivierung des embryonalen Genoms mit der Auflösung einzelner Gene untersucht werden kann [2]. Darüber hinaus haben wir Schweinemodelle generiert (Übersicht in [3]), die während der Trächtigkeit erhöhte Nüchtern-Blutzucker-Spiegel entwickeln und als Modelle für den Gestationsdiabetes dienen. In diesen Modellen untersuchen wir Effekte auf die Fötalentwicklung, insbesondere auf die Struktur und Funktion der Pankreasinseln und die fötale Blutzucker-Regulation.

Erwartete Ergebnisse

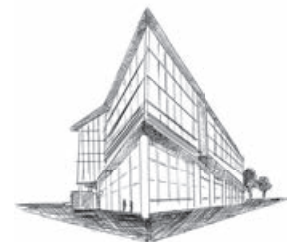
► Durch die Identifizierung besonders vulnerabler Entwicklungsphasen und ein besseres Verständnis der biologischen Mechanismen, die zu einem erhöhten Risiko für diabetische Schwangerschaften führen, sollte es mittelfristig möglich sein, therapeutische und diätetische Interventionsstrategien für die betroffenen Frauen zu entwickeln, die das Risiko diabetesassoziierter Entwicklungsstörungen senken.

Ausgewählte Publikationen

1. Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wünsch A, Kessler B, Kurome M, Bähr A, Klymiuk N, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E. Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes*. 2013 May;62(5):1505-11.
2. Graf A, Krebs S, Zakhartchenko V, Schwab B, Blum H, Wolf E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 18;111(11):4139-44.
3. Wolf E, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S. Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic Res*. 2014 Feb;23(1):27-38.

Prof. Dr. Eckhard Wolf

Molekulare Tierzucht und Biotechnologie, Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität München
ewolf@lmb.uni-muenchen.de



Kooperationspartner

Prof. Dr. Rüdiger Wanke, Dr. Andreas Blutke, Institut für Tierpathologie, Ludwig-Maximilians Universität, München, Deutschland

Dr. Helmut Blum, Dr. Georg J. Arnold, Laboratorium für funktionale Genomanalyse (LAFUGA), Genzentrum, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland

Prof. Dr. Martin Hrabec de Angelis, Dr. Jerzy Adamski, Institut für Experimentelle Genetik, Helmholtz Zentrum München, Deutschland

Prof. Dr. Dr. Fabian Theis, Zentrum Mathematik, Technische Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Christoph Klein, Dr. von Haunersches Kinderspital, Universitätsklinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Prof. Dr. Ralf Zimmer, Institute für Bioinformatik, Department für Informatik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland



Aufklärung und Erklärung von Expressionsmustern

Regulatorische Netzwerke der Host Antwort auf Herpes Virus Infektionen

Prof. Dr. Ralf Zimmer
Institut für Bioinformatik,
Department für Informatik,
Ludwig-Maximilians-
Universität München
Ralf.Zimmer@ifi.lmu.de



Kooperationspartner
Prof. Dr. Lars Dölken,
Lehrstuhl für Virologie,
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg, Deutschland

Prof. Dr. Dr. Jürgen Haas,
University of Edinburgh,
UK

Prof. Dr. Eckhard Wolf,
Genzentrum, Ludwig-
Maximilians-Universität
München, Deutschland

Einleitung

► Das EXP3 Projekt entwickelt einen iterativen Ansatz zur Aufklärung und Erklärung von Expressionsmustern in regulatorischen Netzwerken. Dazu werden zielgerichtete, kombinatorische Perturbationen (Mengen) von Genen gefolgt von Messungen der Gen- und Proteinexpression der perturbierten Systeme durchgeführt und mit Vorhersagen verglichen.

Ziel des Projektes

► Ausgehend von explorativen Hochdurchsatz-Daten und Netzwerk-, Interaktions- und Prozess-Modellen werden geeignete und informative Perturbationen und relevante Target-Gene vorgeschlagen. Durch Einzelzell-Messungen, kombinatorische Knockdowns von vorhergesagten Genen mit nachfolgenden funktionalen Assays und Hochdurchsatz-Messungen der Expression der Target-Gene werden die vorgeschlagenen Modelle experimentell untersucht.

Kausale, zeitlich und räumlich aufgelöste, ausführbare Petri-Netz-Fuzzy-Logik-Modelle (PNFL) werden iterativ für die Vorhersage von neuen Target Mengen und Perturbationen eingesetzt. Die bioinformatisch-experimentelle System-Methode EXP3 soll zunächst für die Untersuchung von Herpes Virus Infektionen eingesetzt werden. Dabei sollen relevante Host-Faktoren aufgeklärt und Mechanismen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems systematisch und in viel größerer Tiefe als bisher möglich untersucht werden.

Wir untersuchen insbesondere die kombinatorischen regulativen Effekte von (Herpes-viralen) miRNAs auf Protein-Isoformen und ihre Strukturen.

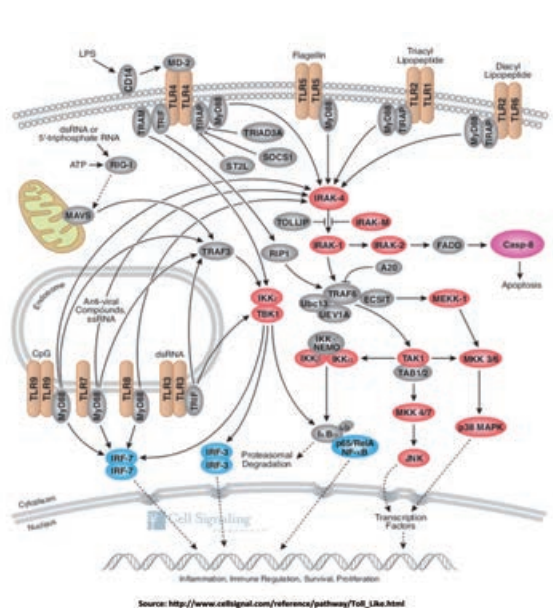


Abb. 1: Lehrbuchdarstellung von Netzwerken der Immunantwort auf virale Infektionen [Quelle: http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Toll_like.html].

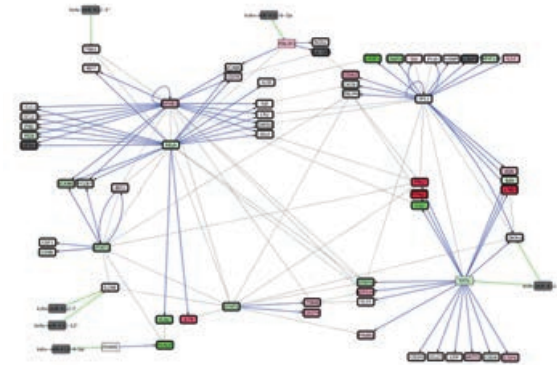


Abb. 2: Initiales Modell für Perturbationsexperimente. Aus diversen eigenen Hochdurchsatzdaten [1-3] wurden fünf miRNA Targets mit Relevanz für die Immunantwort identifiziert, deren Netzwerke jetzt durch kombinatorische Knockdowns und high throughput PCR (Fluidigm) und Sequenzierung (RNA-Seq) untersucht werden sollen.

Ergebnisse, Zukunftsperspektive

► Abb. 1 zeigt einen Überblick über Target Netzwerke der Immunantwort bei Virus-Infektionen. Tatsächlich ist selbst das derzeit bekannte relevante Netzwerk sehr viel größer und komplexer. Für viele Kanten des Netzwerks sind auch weitere Annotationen (Richtung, Vorzeichen, Stärke, Konfidenz, Kontext) verfügbar. Es wurden schon eine Reihe unterschiedlicher Hochdurchsatzdaten zu verschiedenen Herpes Virus Infektionen gemessen [1-3] und daraus geeignete erste Modelle (siehe Abb. 2) und Perturbationen abgeleitet. Die zugehörigen Experimente sind derzeit in Bearbeitung. Die EXP3 Methode versucht dann aus diesen groben Netzwerken mechanistische PNFL Modelle abzuleiten, die die vorliegenden Daten qualitativ und semi-quantitativ erklären können.

Schlussfolgerungen und Ausblick

► Der EXP3 Ansatz ist auf eine breite Palette von systembiologischen Fragestellungen anwendbar. Die Anzahl der notwendigen Experimente um zu kausalen Modellen zu kommen, wird drastisch reduziert. Da die mechanistischen PNFL Modelle prädiktiv sind, können daraus auch Validierungsexperimente abgeleitet werden.

Ausgewählte Publikationen

1. Rutkowski AJ, Erhard F, L'Hernault A, Bonfert T, Schilhabel M, Crump C, Rosenstiel P, Efstathiou S, Zimmer R, Friedel CC, Dölken L. Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. Nat Commun. 2015 May 20;6:7126. doi: 10.1038/ncomms8126. PMID: 25989971
2. Erhard F, Haas J, Lieber D, Malterer G, Jaskiewicz L, Zavolan M, Dölken L, Zimmer R. Widespread context dependency of microRNA-mediated regulation. Genome Res. 2014 Jun;24(6):906-19.
3. Griffiths SJ, Koegl M, Boutell C, Zenner HL, Crump CM, Pica F, Gonzalez O, Friedel CC, Barry G, Martin K, Craigon MH, Chen R, Kaza LN, Fossum E, Fazakerley JK, Efstathiou S, Volpi A, Zimmer R, Ghazal P, Haas J. A systematic analysis of host factors reveals a Med23-interferon-λ regulatory axis against herpes simplex virus type 1 replication. PLoS Pathog. 2013;9(8):e1003514.

Stiftung für Kinder mit seltenen Erkrankungen

Kinder mit seltenen Erkrankungen sind die „Waisen der Medizin“. Viele Krankheiten sind noch unerforscht und können bislang nicht oder nur unzureichend behandelt werden. Über 7.000 seltene Erkrankungen sind derzeit bekannt, allein in Deutschland sterben ca. 3.000 Kinder jährlich an den Folgen.

Für die Medizin stellen seltene Erkrankungen eine Herausforderung dar: Oft dauert es sehr lang, bis eine korrekte Diagnose gestellt werden kann, für viele Patienten gibt es noch keine adäquaten Behandlungsmöglichkeiten. Viele betroffene Kinder sterben an einer dieser – meist durch einen Gendefekt ausgelösten – Krankheiten, manchmal schon in den ersten Lebensjahren. Neue Forschungsanstrengungen sind dringend nötig, um Pathomechanismen besser zu verstehen und neue therapeutische Strategien entwickeln zu können.

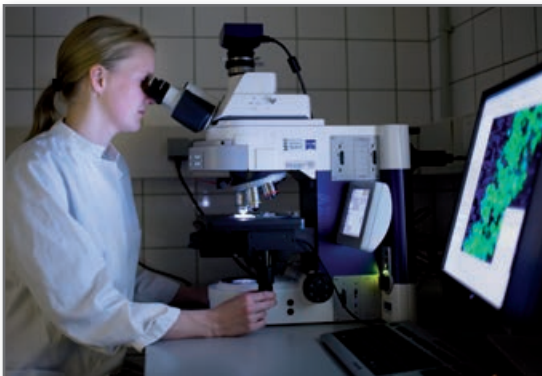


Gemäß ihres Grundsatzes „erkennen – verstehen – heilen“ nimmt die Care-for-Rare Foundation am Dr. von Haunerschen Kinderspital in München sich dieser Kinder an – unabhängig von Herkunft, Religion und finanziellen Möglichkeiten. Durch die Förderung von Forschungsprojekten, den Ausbau internationaler Expertennetzwerke sowie die Förderung von Nachwuchswissenschaftlern und -ärzten engagiert sich die Stiftung nachhaltig für Kinder mit seltenen Erkrankungen. Sämtliche Spendengelder fließen ohne Abzüge in die Stiftungsprojekte.

Spendenkonto:

Bank: Stadtsparkasse Ulm
IBAN: DE93 6305 0000 0000 0035 33
BIC: SOLADES1ULM Bank

Herzlichen Dank für Ihre Unterstützung!



Kontakt

Prof. Dr. Christoph Klein,
Dr. von Haunersches
Kinderspital,
Universitätsklinikum der
Ludwig-Maximilians-Universität
München, Deutschland
christoph.klein@med.uni-muenchen.de



Kontakt

Prof. Dr. Beate Winner,
Interdisziplinäres Zentrum
für Klinische Forschung IZKF,
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg, Deutschland
beate.winner@med.uni-erlangen.de

Helfen Sie uns helfen!

HSP, das ist die Hereditäre Spastische Spinalparalyse, eine seltene, unheilbare Erbkrankheit, die oft in der Kindheit einsetzt und sich stetig verschlimmert. HSP – das sind drei Buchstaben, die das Gehen erschweren und ein Leben im Rollstuhl bedeuten können. Zwischen 2000 und 3000 Menschen sind in Deutschland an der Hereditären Spastischen Spinalparalyse erkrankt.



Zu diesem Zweck hat Dr. Tom Wahlig aus Münster/Westfalen, dessen Sohn Henry selbst seit Kindheit an HSP erkrankt ist, 1998 die nach ihm benannte Stiftung gegründet. Um den Anfang dieses Weges zu erleichtern, hat die Tom Wahlig Stiftung seit 1998 in Kooperation mit vielen Kliniken in ganz Deutschland und Österreich HSP-Sprechstunden eingerichtet. Die Förderung der Forschung zu HSP durch Anschubfinanzierung von Projekten, die Verleihung der Förderpreise und die Schaffung von Netzwerken durch unser Symposium sind Kernaufgaben der Tom Wahlig Stiftung.

Als die Tom Wahlig Stiftung 1998 gegründet wurde, war noch keines der Gene bekannt, das durch eine Mutation HSP verursachen kann. Mittlerweile sind fast 90 Genorte und 63 Gene bekannt. Die mit diesen Entdeckungen verknüpfte Hoffnung auf eine kausale Therapie hat sich allerdings noch nicht erfüllt.

Eine der BioSysNet Projektleiter, Frau Prof. Dr. Beate Winner, wird gemeinsam mit Ihren Kollegen derzeit auch durch ein Advanced Fellowship der Tom Wahlig Stiftung in Ihrer Arbeit unterstützt.

HSP ist nicht heilbar – noch. Die Arbeit von Medizinern, Biologen und Forschern anderer Fachgebiete gibt den Betroffenen jeden Tag Hoffnung, dass eine Möglichkeit zur Heilung oder Linderung der Krankheit gefunden wird. So konnte die Stiftung seit 1998 die HSP-Grundlagenforschung nach fast 100-jährigem Stillstand entscheidend voranbringen und viele neue Erkenntnisse sind durch die Förderung der Tom Wahlig Stiftung entscheidend unterstützt worden.

Helfen Sie uns helfen!

Helfen auch Sie den Betroffenen, indem Sie an der Vision einer Zukunft ohne HSP mitarbeiten. Die Stiftung wird Sie dabei mit allen Mitteln unterstützen!

<http://www.hsp-info.de>



Das Bayerische Forschungsnetzwerk für Molekulare Biosysteme unterstützt Kollaborationen mit akademischen Forschungsgruppen außerhalb des Netzwerks in Deutschland und weltweit. Darüber hinaus werden Kooperationen mit Industriepartnern angestrebt, zumal beide Seiten davon profitieren können.



BioSysNet

Bavarian Research Network for Molecular Biosystems

Genzentrum LMU
Feodor-Lynen-Str. 25
D-81377 München
Tel: +49-(0)89-8 59 50 54
Fax: +49-(0)89-85 66 16 80
Mail: info@biosysnet.de
www.biosysnet.de

gefördert durch

Bayerisches Staatsministerium für
Bildung und Kultur, Wissenschaft und Kunst

