

Vorstellung von Arbeitsgruppen des Instituts für Pharmakologie und des Instituts für Toxikologie

Ablauf: Jeder Praktikumsteilnehmer wählt aus dem folgenden Angebot drei Arbeitsgruppen aus und trägt sich in die ausgeteilte Liste ein; eine Teilnehmergruppe besteht aus 4-5 Personen.

Der Besuch der Arbeitsgruppen erfolgt von 17.05 - 17.45, 17.50 - 18.30 und 18.35 - 19.15 Uhr.

Arbeitsgruppe Prof Dr. E. Closs, Institut für Pharmakologie

Projekt: Aminosäuretransporter

Wir befassen uns mit den molekularen Mechanismen und der physiologischen Bedeutung des Transports basischer Aminosäuren. Aus murinen und humanen Zellen haben wir cDNAs kloniert, die für vier unterschiedliche Proteine kodieren (CAT, für cationic amino acid transporter), die alle den Transport von basischen Aminosäuren durch die Membran vermitteln, sich jedoch in Transporteigenschaften und Gewebsverteilung unterscheiden. Basische Aminosäuren sind an sehr vielen verschiedenen Stoffwechselprozessen beteiligt. Beispielsweise ist L-Arginin das Substrat für die intrazellulär lokalisierten Stickstoffmonoxid (NO)-Synthasen. Uns interessiert daher die Bedeutung des Transports von L-Arginin für die Substratversorgung dieser Enzyme.

Wir arbeiten mit molekularbiologischen, zellbiologischen und proteinchemischen Methoden, über die wir Ihnen einen kurzen Überblick geben werden. Danach können je nach Interesse etwa drei der folgenden Themen behandelt werden: Funktionelle Analysen an Transportern, die in Oozyten von *Xenopus laevis* (s.u.) exprimiert werden, Mutagenese von Proteinen, Analyse der RNA- und Protein-Expression in Säugerzellen, Nachweis der NO-Synthase-Aktivität, Aminosäureanalyse mittels HPLC, Gewinnung von Antikörpern.

Treffpunkt: 12. Stock, Raum 1215 (Stadtseite)

Arbeitsgruppenleiterin:

Prof. Dr. Ellen Closs, Tel.: 39 33178
E-Mail: closs@uni-mainz.de



QuickTime™ and a
Incompressed) decompressor
needed to see this picture.

Arbeitsgruppe PD Dr. C. Dietrich, Institut für Toxikologie

Die Proliferation nicht-transformierter Zellen unterliegt einer strikten Regulation durch mitogene und anti-mitogene Signale. Wichtige anti-mitogene Signale werden über Zell-Zell-Kontakte vermittelt, was als Kontaktinhibition bezeichnet wird. In vitro zeigt sich dieser Regulationsmechanismus darin, dass nicht-transformierte Zellen ihre Proliferation einstellen, sobald sie einen einschichtigen Zellrasen ausgebildet haben. Im Gegensatz dazu zeichnen sich transformierte Zellen durch einen Verlust der Kontaktinhibition in vitro und in vivo aus. Trotz der allgemein anerkannten fundamentalen Rolle der Kontaktinhibition in der Zellzyklusregulation sind die Kenntnisse über die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dürftig. Ziel unserer Arbeit ist es, die intrazelluläre(n) Signalkaskade(n) der Kontaktinhibition aufzuklären und wichtige Schlüsselproteine zu identifizieren.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt stellt der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) dar. Viele Fremdstoffe, wie zum Beispiel im Tabakrauch enthaltene polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) oder das Umweltgift Dioxin vermitteln ihre karzinogenen Wirkungen über die Aktivierung des AhR. Nach Ligandenbindung transloziert der AhR vom Zytosol in den Zellkern, wo er mit seinem Partner ARNT (Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuclear Translocator) interagiert und an Regulationseinheiten (sogenannte Dioxin-responsive Elemente) bestimmter Gene bindet und deren Transkription induziert. Dazu gehören Fremdstoff-metabolisierende Enzyme wie z.B. das Cytochrom P450 1A1. PAKs werden über diesen Weg zu gentoxischen Metaboliten aktiviert, was ihre karzinogene Wirkung erklärt. Dioxin dagegen wird nicht metabolisiert, und die molekularen Mechanismen seiner tumorpromovierenden Effekte sind nicht genau verstanden. Wir untersuchen deshalb die gentoxischen sowie nicht gentoxischen Wirkungen von PAKs und Dioxin auf molekularer Ebene und der dabei beteiligten intrazellulären Signalwege.

Anhand von Posterdarstellungen können einige Ergebnisse sowie die hierfür verwendeten Methoden demonstriert und erläutert werden.

Treffpunkt: 4. Stock, vor den Personenaufzügen

Arbeitsgruppenleiterin: PD Dr. Cornelia Dietrich, Tel. 39 33066
E-Mail: cdietric@uni-mainz.de

Arbeitsgruppe Dr. Beate Köberle, Institut für Toxikologie

Chemosensitivität in Testis-Tumorzelllinien

Über 75 % der Patienten mit metastasierenden Testis-Tumoren können mittels Chemotherapie geheilt werden. Im Gegensatz dazu können metastasierende Tumore anderer Organe nur selten geheilt werden. Zelllinien, die aus Testis-Tumoren isoliert wurden, sind hypersensitiv gegenüber vielen DNA-schädigenden Chemotherapeutica sowie Bestrahlung. Welche Faktoren dieser Hypersensitivität zugrunde liegen, ist bislang nicht geklärt. Wir benützen Testis-Tumorzelllinien als Modellsystem, um der Frage der Chemosensitivität nachzugehen. Kenntnisse über die Grundlage der Chemosensitivität von Testis-Tumoren können möglicherweise dazu beitragen, die chemotherapeutische Behandlung anderer Tumore entscheidend zu verbessern.

Testis-Tumorzellen sind in ihrer Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeuticum Cisplatin vergleichbar zu Zelllinien, die von Patienten mit xeroderma pigmentosum (XP) isoliert wurden. XP ist ein vererbbares Syndrom, das auf einem Defekt in der DNA Reparatur beruht. Wir fanden, dass die Reparaturproteine ERCC1-XPF in Testis-Tumorzellen erniedrigt vorliegen. Die reduzierte Expression von ERCC1-XPF führt möglicherweise zu einer verminderten Reparatur Cisplatin-induzierter DNA-Schäden und folglich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeuticum. Diese Hypothese wird nun von uns untersucht.

Treffpunkt: 4. Stock, Raum 413

Arbeitsgruppenleiterin: Beate Köberle, Tel 39 33194

E-mail: Koeberle@uni-mainz.de

Arbeitsgruppe Dr. W. Roos, Institut für Toxikologie

Cellular responses following methylating damage to DNA: relevance for environment, foods and chemotherapy

Methylating agents are commonly found in the environment and food. They are also used in the treatment of cancer. Therefore, the importance of the cells response, as it relates to repair of DNA methylating damage or failure of repair, to these agents are of paramount importance. When considering methylating agents found in the environment and food, the responses of stem cells are the most important. Methylating agents methylate DNA at approximately twelve positions. The biologically most relevant lesion is O⁶-methylguanine, as this lesion leads to the formation of GC to AT point mutations during replication. How do stem cells protect against propagating these mutations to their offspring. The answering of this question is a high priority for our research.

The specific methylating agents used in cancer therapy are streptozotocine and temozolomide. Temozolomide is used in the treatment of glioblastoma, and as this cancer has such a high mortality incidence, it is clinically significant to determine the mode of cell kill in brain cancer cells for this agent. When the molecular mechanism of cell kill has been determined, it is envisioned that therapy could be modified in order to obtain a better treatment outcome.

Treffpunkt: 4. Stock, Raum

Arbeitsgruppenleiterin: Dr. Wynand Roos

E-Mail: wynandpaulroos@yahoo.co.uk

Arbeitsgruppe Dr. M. Christmann, Institut für Toxikologie

Mechanismen und Regulation der DNA-Reparatur

DNA-Reparaturmechanismen sind wichtige Faktoren, die das Resistenzverhalten von Normal- und Tumorzellen gegenüber Zytostatika determinieren. Es werden die unterschiedlichen DNA-Reparatursysteme hinsichtlich ihrer Funktion und Spezifität, sowie die funktionellen Bedeutung für das zelluläre Resistenzverhalten gegenüber chemischen Mutagenen und Strahlung in allgemeinverständlicher Form vorgestellt.

Bestimmte Onkogene (z.B. c-fos) und Tumorsuppressorgene (z.B. p53) werden durch genotoxische Verbindungen induziert. Die entsprechenden Genprodukte spielen als Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Regulation protektiver oder apoptotischer Mechanismen und nehmen so Einfluß auf das zelluläre Überleben. Zur Regulation protektiver Mechanismen gehört die transkriptionelle Aktivierung von DNA-Reparaturgenen. Es werden Strategien zur Identifizierung neuer DNA-Schadens-induzierbarer Gene vorgestellt (DNA-Microarray), und die Signifikanz dieser Induktion am Beispiel der Alkyltransferase (MGMT), sowie der "Flap Endonuklease 1" (FEN1), welche bei der Reparatur von O⁶-Methylguanin bzw. der Prozessierung von Zytostatika-induzierten DNA-Vernetzungen und hierüber induzierter DNA-Replikationsblöcken involviert sind diskutiert.

Treffpunkt: 4. Stock, Raum 445 (Klinikseite)

Arbeitsgruppenleiter: Dr. M. Christmann, Tel. 39 30133

e-Mail: mchristm@uni-mainz.de

Arbeitsgruppe PD Dr. H. Kleinert, Institut für Pharmakologie

Analysen zur Regulation der Expression pro-inflammatorischer Gene

An der Pathogenese vieler chronisch-inflammatorischer Erkrankungen (Rheuma, Asthma, Autoimmunerkrankungen und vielleicht auch Atherosklerose) ist die Fehlsteuerung der Expression pro-inflammatorischer Gene (wie iNOS, COX-2, TNF-) beteiligt. Daher erscheint es für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze bei diesen Erkrankungen sinnvoll, die Regulation der Expression dieser Gene genau zu analysieren.

Die Expression pro-inflammatorischer Gene wird auf verschiedenen Stufen reguliert. Hierbei sind Mechanismen der Regulation der Promotoraktivität und der Regulation der mRNA-Stabilität von entscheidender Bedeutung.

Die Analysen zur Expressionsregulation pro-inflammatorischer Gene erfolgen daher auf der Ebene Promotoraktivität und der mRNA-Stabilität.

Für diese Analysen benutzen wir folgende Methoden, die bei der Vorstellung der Arbeitsgruppe demonstriert oder besprochen werden sollen:

- Zellkultur von eukaryoten und prokaryoten Zellen
- analytische und quantitative reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) zum qualitativen und quantitativen (Real-Time-RT-PCR) Nachweis von iNOS-, COX-2- und TNF- mRNA und zur Amplifikation genomischer DNA (PCR)
- Klonierung von DNA- und cDNA-Fragmenten, DNA-Sequenzierung
- Nachweis der pro-inflammatorischen Proteine durch Immunoblots mit spezifischen Antikörpern und Detektion der Immunkomplexe durch Chemilumineszenz
- Messung der NOS-Aktivität durch Bestimmung des Nitrit/Nitrat-Gehalts im Medium der Zellen oder die Konversion von radioaktiv markiertem Arginin zu Citrullin
- transiente und stabile Transfektion von Zellkulturzellen mit Promotor-Reportergen (Luziferase, Renilla-Luziferase) Konstrukten
- Bestimmung der Promotor-Aktivität in den transfizierten Zellen mit Hilfe eines Lumineszenz-Meßgerätes
- Bestimmung der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren in Kernproteinextrakten mit Hilfe der Gelretardationsanalyse ("gelshift")
- Bestimmung der Bindungsaktivität von RNA-bindenden Proteinen durch UV-Licht-“crosslinking” in Extrakten
- Überexpression und Herabregulation der Expression wichtiger Regulatorgene durch transiente und stabile Transfektion von eukaryoten Expressions-Plasmiden (sense und antisense-RNAs) sowie durch siRNAs

Treffpunkt: 11. Stock, Raum 1143 (Klinikseite)

Arbeitsgruppenleiter:

PD Dr. Hartmut Kleinert, Tel.: 39 33245

E-Mail: kleinert@mail.uni-mainz.de

Arbeitsgruppe Dr. H. Li / Prof. Dr. U. Förstermann, Institut für Pharmakologie

Pharmakotherapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Das von endothelialer NO-Synthase (eNOS) gebildete NO ist ein potenter Vasodilatator und spielt eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation. Durch Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und -Adhäsion, Hemmung der Leukozyten-Adhäsion, sowie Hemmung der Gefäßmuskulatur-Proliferation, schützt NO die Gefäße vor Entstehung und Entwicklung einer Atherosklerose.

Kardiovaskuläre Erkrankungen (wie z.B. Hypertonie, Arteriosklerose, Diabetes mellitus), gehen häufig mit einem erhöhten oxidativen Streß und einer verminderten NO-Bioaktivität einher. Unterdrückung des oxidativen Stresses und Steigerung der NO-Bioaktivität könnte als eine potentielle präventive und therapeutische Strategie für kardiovaskuläre Erkrankungen eingesetzt werden.

In unserer Arbeitsgruppe werden mit molekularbiologischen Methoden die Genexpression der eNOS sowie der NADPH-Oxidasen in kardiovaskulären Geweben erforscht. Es wird nach Substanzen gesucht, die die eNOS-Expression erhöhen und gleichzeitig die Expression der NADPH-Oxidase vermindern. Therapeutisches Potential solcher „doppelt protektiven“ Verbindungen wird dann in Tiermodellen überprüft.

Treffpunkt: 12. Stock, vor den Personenaufzügen
Arbeitsgruppenleiter: Dr. Huige Li, Tel. 39 36929
E-Mail: huigeli@uni-mainz.de

Arbeitsgruppe Dr. S. Horke / Prof. Dr. U. Förstermann, Institut für Pharmakologie

Kardiovaskuläre Komplikationen sind die hauptsächliche Ursache für Erkrankungen und Tod in westlichen Zivilisationen. Arteriosklerose („Arterienverkalkung“) nimmt hierbei eine Schlüsselstellung ein und resultiert im Wesentlichen aus einer Ablagerung von Blutfetten, Thromben und Bindegewebe in der Gefäßwand. Zusätzlich kommt es hier zu einer erhöhten Freisetzung radikaler Sauerstoffverbindungen, welche verschiedenste Moleküle oxidieren und die Zellen vermehrt schädigen. Darüber hinaus findet man eine starke Erhöhung von Entzündungsprozessen. Folglich ist die Arteriosklerose eine multifaktorielle Erkrankung von wesentlicher medizinischer Bedeutung.

Wir beschäftigen uns in unserer Arbeitsgruppe mit einem in der Gefäßwand natürlich vorkommendem Enzym, der Paraoxonase-2. Dieses Enzym kann die Freisetzung radikaler Sauerstoffverbindungen reduzieren und möglicherweise jene Vorgänge vermindern, welche Entzündungsprozesse in der Gefäßwand verursachen können. Folglich repräsentiert dieses Enzym wahrscheinlich einen natürlichen Verteidigungsmechanismus gegen die Entstehung von Arteriosklerose.

Am Beispiel der Arteriosklerose und Paraoxonase-2 werden wir besprechen, mit welchen molekularbiologischen Strategien die Funktionen eines anti-atherosklerotischen Proteins aufgeklärt werden können. Die Funktionsweise der entsprechenden Methoden werden wir daran diskutieren und erklären, um somit einen Überblick zu geben über die entsprechenden Techniken.

Treffpunkt: 12. Stock, vor den Personenaufzügen
Arbeitsgruppenleiter: Dr. Sven Horke, Tel.: 39 34425 / 39 36929
E-Mail: horke@uni-mainz.de

Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. Wojnowski, Institut für Pharmakologie

Unsere Arbeitsgruppe untersucht den Einfluss der individuellen genetischen Ausstattung auf die Wirkung von Arzneimitteln (Pharmakogenetik). Wir beschäftigen uns schwerpunktmäßig mit zwei Fragestellungen:

- den Ursachen für die variable Expression der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase 3A (CYP3A)
- der genetischen Prädisposition für die Arzneimittel-induzierte Kardiotoxizität

Inter-individuelle Unterschiede in der Expression und Aktivität von CYP3A. Die Enzyme der CYP3A-Unterfamilie spielen wegen ihrer starken Expression in Leber und Darm und ihrem breiten Substratspektrum eine wichtige Rolle bei der Biotransformation von Arzneistoffen und Umweltschadstoffen. Arzneistoffe, die durch CYP3A metabolisiert werden, zeigen eine große pharmakokinetische Variabilität, die vermutlich auf der unterschiedlichen hepatischen und intestinalen Expression dieser Enzyme in der Bevölkerung beruht. Es wird angenommen, dass durch die gleiche Variabilität auch die individuelle Veranlagung zur Krebsentstehung bei Fremdstoffen, die Substrate von CYP3A sind, bestimmt wird. Die inter-individuellen Unterschiede in der Expression von CYP3A werden zum größten Teil durch noch nicht aufgeklärte genetische Faktoren verursacht. Außer CYP3A untersuchen wir auch die funktionelle Bedeutung von genetischen Varianten anderer Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen und von Transportsystemen für Fremdstoffe.

Kardiotoxizität von Anthracyclinen

Anthracycline werden als antineoplastische Arzneistoffe erfolgreich bei der Therapie von verschiedenen hämatopoetischen und anderen Tumorerkrankungen eingesetzt. Die Krebsbehandlung mit Anthracyclinen ist jedoch oft von einer ausgeprägten Kardiotoxizität begleitet, die bis zum Herzversagen führen kann. Untersuchungen mit Mäusen deuten darauf hin, dass die individuelle genetische Ausstattung eine wichtige Rolle bei der Toxizität von Anthracyclinen spielt. Daher wird auch beim Menschen eine genetische Veranlagung als Ursache für die großen Unterschiede in der individuellen Empfindlichkeit gegen Anthracycline angenommen. Tatsächlich konnten wir vor kurzem genetische Polymorphismen der NAD(P)H-Oxidase und der Familie der "multi-drug resistance" Transportproteine identifizieren, die für das durch Anthracycline hervorgerufene Herzversagen verantwortlich sein können. Diese Ergebnisse sollen jetzt in zusätzlichen funktionellen und klinischen Untersuchungen bestätigt werden. Sie könnten zu spezifischen, Genotyp-basierten individuellen Therapieschemata mit Anthracyclinen führen. Außerdem wird dadurch ein besseres Verständnis der Arzneimittel-induzierten Kardiotoxizität und der Pathophysiologie anderer Typen der akuten und chronischen Herzinsuffizienz erwartet.

Treffpunkt: 13. Stock, Raum 1350 (Klinikseite)

Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Leszek Wojnowski, Tel. 39 33460

E-Mail: wojnowski@uni-mainz.de

Homepage: www.pg-mainz.de

Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. Gerhard Fritz

1. Genotoxin-induzierbare zelluläre Stress-Antworten und Drug-Resistenz

Eukaryontische Zellen reagieren auf Genotoxin-Exposition mit einer Vielzahl von Stress-Antworten, die letztendlich wesentlich über das Überleben bzw. den Untergang (Apoptose) der exponierten Zellen entscheiden. Die im Rahmen dieser Stress-Reaktionen induzierten komplexen Veränderungen in der Aktivität von Proteinkinasen, Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren und Apoptoseregulatoren können ihren Ursprung sowohl in der Schädigung der DNA, als auch anderer zellulärer Strukturen (insbesondere membranärer Rezeptoren) haben und entweder rasch (innerhalb von Minuten) oder verzögert (innerhalb von Stunden bis Tagen) auftreten. Membrangebundene kleine GTP-bindende Proteine der Ras/Rho-Familie stellen zentrale Regulatoren früher DNA-schadensunabhängiger zellulärer "Stress-Antworten" dar. Die Projektgruppe beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Frage nach der physiologischen Relevanz Rho-regulierter Stress-Antworten für die zelluläre Resistenz gegenüber genotoxischen Noxen, wobei chemische Umweltmutagene, Tumorthérapeutika (Zytostatika) und Strahlung (UV-Strahlung und ionisierende Strahlung) Gegenstand der Untersuchungen sind.

2. DNA-Schäden als „Trigger“ der Aktivierung von Stress-Kinasen

Es wird bisher angenommen, dass die rasche Aktivierung von Stress-Kinasen (i.e. SAPK/JNK und p38 Kinase) DNA-schadensunabhängig erfolgt. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass auch DNA-Schäden zu einer – zeitlich verzögerten – Aktivierung von Stress-Kinasen beitragen können, wobei offensichtlich enorme agensspezifische Unterschiede bestehen. Die hierbei beteiligten Mechanismen genauer zu charakterisieren, ist Gegenstand unserer Arbeiten.

3. Pharmakologische Modulation Rho-regulierter Funktionen

Wie oben bereits erwähnt, nehmen Rho-GTPasen eine zentrale Stellung bei der Regulation zellulärer Stress-Antworten, Zellzyklusprogression, Apoptose und Metastasierungsvorgängen ein. Aus diesem Grunde untersuchen wir gegenwärtig die Auswirkungen einer pharmakologischen Hemmung von Rho-Aktivitäten auf Genotoxin-induzierbares Stress-Signaling, Genexpression, Apoptose und Tumormetastasierung. Im Rahmen unserer bisherigen, unter Verwendung von HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren durchgeführten Analysen, konnten wir zeigen, dass Lovastatin pleiotrope inhibitorische Wirkungen auf Rho/Ras-regulierte Prozesse, einschließlich Genotoxin-induzierbares Signaling, Zelltod und Metastasierung hat.

Treffpunkt: 15. Stock, Raum 1536 (Klinikseite)

Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Gerhardt Fritz, Tel. 39 33247

E-Mail: fritz@uni-mainz.de