



Vorwort

Günter Maaß¹

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) stellt hiermit ihren Ergebnisbericht 1999/2000 im neuen Gewand vor.

Die GBF ist Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF). Ihre Schwerpunkte in Forschung und Entwicklung liegen auf den Gebieten Umwelt und Gesundheit, wobei die „Biotechnologie“ gleichzeitig die verknüpfende Spange ist, aber auch die Begrenzung in der Fragestellung definiert.

Die Forschungsarbeiten bzw. Aufgaben werden im Rahmen der folgenden vier Forschungsschwerpunkte

1. Cytomics – Molekulare Analyse und Engineering von Zellen
2. Pathogenitätsforschung und Vakzinentwicklung
3. Neue Wirkstoffe
4. Umweltbiotechnologie

und den beiden neu geschaffenen Querschnittsfunktionen

1. Bioprozessentwicklung und -validierung
2. Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle

durchgeführt.

Diese Struktur wurde von den Wissenschaftlern der GBF entwickelt und nach ausführlicher Diskussion in den Aufsichtsgremien von diesen im Herbst 1998 verabschiedet. Die Forschungsthemen sind fast ausnahmslos der biologischen Grundlagenforschung zuzurechnen, haben aber zugleich unverkennbaren Anwendungsbezug, indem sie als langfristig angelegte Projekte auf die Sanierung und den Schutz der Umwelt sowie auf Verständnis, Diagnose, Prophylaxe und Therapie von Krankheiten fokussiert sind. Entsprechend den forschungspolitischen Prioritäten der Bundesregierung verfolgt die GBF in der Grundlagenforschung „interdisziplinäre Ansätze, die im Zusammenwirken zwischen Lebenswissenschaften, Physik, Chemie“, den Ingenieurwissenschaften und der Verfahrenstechnik entstehen.

Ausdruck findet diese Interdisziplinarität insbesondere im Forschungsschwerpunkt **Cytomics**. Hierbei geht es darum, Zellen mit definierten Eigenschaften und Funktionen, wie sie im Gewebeverband *in vivo* vorkommen, in ihrer Gesamtheit zu verstehen, sie experimentell zugänglich zu machen und im Sinne einer molekularen Medizin wie Gen-, Immun- oder Zelltherapie zu nutzen. Darüber hinaus wird schwerpunktmäßig die bereits bestehende und erfolgreich arbeitende Zell- und Gewebekulturtechnik zur Organkulturtechnik ausgebaut, um so zukunftsorientiert die Biotechnologie ganzer Systeme als „Systembiotechnologie“ an der GBF zu etablieren. Auf Grund der bereits vorhandenen Expertise sieht die GBF gute Chancen, in dem international hochkompetitiven Feld des „Tissue Engineering and Bioartificial Organs“ mit großem wirtschaftlichen Potential eine prominente Position zu erreichen. Durch enge Vernetzung mit der Medizinischen Hochschule Hannover ist der klinische Zugang gewährleistet. In der **Pathogenitätsforschung und Vakzinentwicklung** war die GBF mit Arbeiten zur Pathogenität von Streptokokken, Listerien, Shigellen, Bordetellen und Mycoplasmen, sowie zur Antigenpräsentation und Entwicklung neuer Antigen-trägersysteme erfolgreich. Nicht zuletzt auch wegen der zunehmenden Antibiotikaresistenzen gewinnt die Erforschung der Infektionskrankheiten mehr Bedeutung. Die Entwicklung neuer

¹Prof. Dr. G. Maaß ist Wissenschaftlicher Direktor der GBF | *is Scientific Director at the GBF*

Preface

The National Research Centre for Biotechnology (GBF) is presenting its 1999/2000 Annual Report in a new look.

GBF is a member of the Helmholtz Association of German Research Centres (HGF). Its main research and development focus is on the environment and health with "biotechnology" being the link between and at the same time the boundary of the topics involved.

The research activities and tasks are being performed in the following four priority areas:

1. cytomics – molecular analysis and engineering of cells
2. pathogenicity research and vaccine development
3. new bioactive compounds
4. environmental biotechnology

and within the framework of the two new networking tasks:

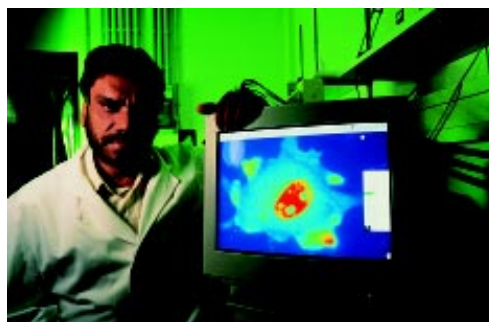
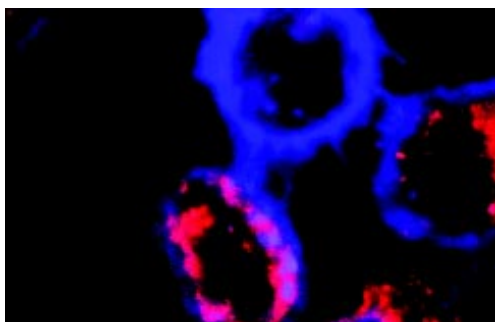
1. bioprocess engineering and validation
2. structure and function of biological macromolecules.

This structure was developed by the GBF's scientists and after in-depth discussions adopted by the supervisory bodies in autumn 1998. The research topics almost exclusively relate to biological basic research, but are also clearly application-oriented in that they are focused as long-term projects on the remediation and protection of the environment as well as on the understanding, diagnosis, prevention and therapy of diseases. In line with the Federal Government's research policy priorities, GBF pursues interdisciplinary basic research approaches emerging from the interaction between the life sciences, physics, chemistry, the engineering sciences and process engineering.

This interdisciplinarity is particularly reflected in the main research topic of **cytomics**. This involves the overall

understanding of cells with defined properties and functions, as occur in vivo in tissue complexes, making them experimentally accessible and utilizing them for the purposes of molecular medicine in gene, immune or cell therapy. Furthermore, importance is attached to the extension of already existing successful cell and tissue culture techniques to also cover organ culture techniques in order to establish the biotechnology of whole systems as „system biotechnology“ at GBF in a future-oriented manner. On account of its existing expertise the GBF sees good chances of attaining a prominent position in the internationally highly competitive field of tissue engineering and bioartificial organs with a large economic potential. Clinical access is ensured by close connections with the Medical University of Hanover.

In **pathogenicity research and vaccine development** the GBF has been successfully working on the pathogenicity of streptococci, listeria, shigella, bordetella and mycoplasma as well as on antigen presentation and the development of new antigen carrier systems. Research into infectious diseases is also gaining significance in view of increasing antibiotic resistance. The development of new vaccines, however, requires a detailed understanding of the processes that lead to infection. GBF will therefore increasingly endeavour to understand the interactions



Impfstoffe setzt jedoch ein detailliertes Verständnis der Abläufe von Infektionskrankheiten voraus. Daher wird sich die GBF dem Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt im Verlauf eines Infektionsprozesses verstärkt zuwenden. Die inzwischen erfolgte Inbetriebnahme eines hochmodernen Tierhauses erfüllt eine wesentliche Voraussetzung für diesen Forschungsschwerpunkt.

Die bislang sehr erfolgreich verlaufene Suche, Erzeugung und Entwicklung **Neuer Wirkstoffe** wird auch zukünftig ein wichtiges Forschungsgebiet der GBF sein. Das Epothilon erweist sich als Antikrebsmittel in der klinischen Entwicklung als vielversprechend.

Zur Entdeckung neuer Wirkstoffe kommen verschiedene Strategien zum Einsatz. Zum einen werden weiterhin neue bioaktive Naturstoffe aus Bakterien isoliert und charakterisiert. Die vor ungefähr zwei Jahren etablierte Nachwuchsgruppe zur Genetik der Myxobakterien erzielte Erfolge bei der Identifizierung und Sequenzierung der Biosynthesewege wichtiger Metabolite, eine wesentliche Voraussetzung für die Produktionsoptimierung der Myxobakterien oder den Gentransfer in andere, vorteilhaftere Produktionsorganismen.

In einem weiteren Projekt wird durch kombinatorische Synthese eine riesige Zahl verschiedener Peptide, Oligonucleotide und Naturstoffanaloga erzeugt, die auf ihre Wechselwirkung mit ausgewählten Zielmolekülen untersucht werden.

Eine international besetzte Strukturkommission hat der GBF empfohlen, im Bereich Naturstoffe eine weitere Nachwuchsgruppe einzurichten, um über die Myxobakterien hinausgehend neue Gebiete an Naturstoffreservoirs zu erschließen.

Die **Umweltbiotechnologie** ist neben der biomedizinischen Forschung der zweite Schwerpunkt des GBF-Forschungsprogramms. Hier werden auf mikrobieller Basis neue technische Ansätze zur Verhinderung und Eliminierung von Umweltverschmutzung erarbeitet und zum Einsatz gebracht. Zum Beispiel hat die GBF Quecksilber-resistente Mikroorganismen entwickelt, die ionisches Quecksilber enzymatisch in wasserunlösliches metallisches Quecksilber umwandeln. Eine mit der Preussag-Wasserchemie entwickelte Pilotanlage für Abwässer der Chloralkali-Elektrolyse läuft seit September 1999 kontinuierlich mit einer Rückhalte-Effektivität von 95 - 99%. Die so erreichten Quecksilberaustauschkonzentrationen liegen unterhalb der gesetzlich vorgeschriebenen Werte. Damit ist weltweit zum ersten Mal ein effektives mikrobiologisches Verfahren zur Rückhaltung von Quecksilber zur Anwendung gebracht worden.

Mit ihren umweltbiotechnologischen Aktivitäten schafft die GBF wichtige Beiträge zur Entwicklung neuer bzw. effizienterer Sanierungsverfahren für schadstoffbelastete Grundwasserleiter und Trinkwasserquellen sowie zur Erschließung mikrobieller Diversität, um damit Organismen mit neuen und besseren Stoffwechselaktivitäten zugänglich zu machen. Durch die Entwicklung bioabbaubarer Kunststoffe liefert sie einen Beitrag zur nachhaltigen Entwicklung unserer Gesellschaft. Sie verfolgt diese Ziele in internationaler Kooperation und auf nationaler Ebene in Strategiefondsprojekten mit Partnerinstituten der HGF.

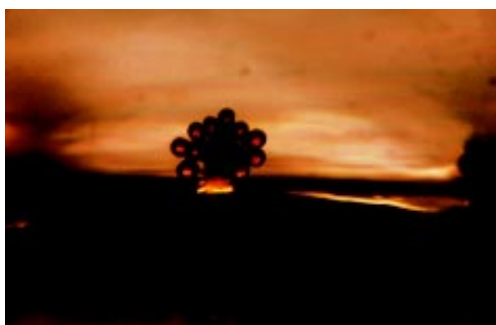
between pathogen and host in the course of an infection process. An ultramodern animal house meanwhile put into operation fulfils an essential prerequisite for this main area of research.

The search for, production and development of **new bioactive compounds**, which has been very successful in the past, will also be an important GBF research domain in the future. Epothilone has proved to be a promising anticarcinogenic agent in clinical development.

Various strategies are used for the discovery of new bioactive compounds. On the one hand, new bioactive natural products are isolated from bacteria and characterized. The group of young researchers established approximately two years ago for work on the genetics of myxobacteria have achieved successes in identifying and sequencing the biosynthesis pathways of important metabolites, an essential prerequisite for optimizing the production of myxobacteria or the transfer of genes into other, more advantageous production organisms.

In a further project, a huge number of different peptides, oligonucleotides and natural product analogues are produced by combinatorial synthesis and examined for their interaction with selected target molecules.

An international structure commission has recommended that GBF should establish a further group of young scientists in the field of natural products to open up new areas of research into natural product reservoirs going beyond myxobacteria.



Environmental biotechnology is the second main area in the GBF's research programme in addition to biomedical research. On a microbial basis, new technological approaches are being evolved and applied here to prevent and eliminate environmental pollution. For example, the GBF has developed mercury-resistant microorganisms which enzymatically convert ionic mercury into water-insoluble metallic mercury. A pilot plant developed jointly with Preussag-Wasserchemie for effluents from chlorine-alkali electrolysis has been in continuous operation since September 1999 with a retention efficiency of 95-99 %. The mercury exchange concentrations thus achieved are below the values stipulated by law. In this way, for the first time worldwide, an effective microbiological process for the retention of mercury has been brought to application.

With its activities in environmental biotechnology the GBF provides important contributions to the development of new and more efficient remediation processes for polluted aquifers and drinking water sources and to the exploration of microbial diversity in order to access organisms with new and better metabolic activities. GBF contributes towards the sustainable development of our society by developing biodegradable plastics. It pursues these goals in international cooperation and at the national level in strategy fund projects with HGF partner institutes.

Die Wahrnehmung von **Querschnittsfunktionen** ist eine zentrale Aufgabe der GBF, die sich in den beiden Projekten sowohl in interner Vernetzung als auch in externer Kooperation mit universitären und Industriepartnern ausprägt. Die in der **Bioprozeßentwicklung und -validierung** vorhandene Expertise stellt in zunehmendem Maße nachgefragtes Angebot insbesondere für junge Firmen der Biomedizin dar, die ihre Entwicklungen aus dem Labor zur klinischen Prüfung und zur Produktion bringen müssen und weder über eigene Anlagen, geschweige denn über das nötige Know-how und Know-why in der Bioverfahrenstechnik verfügen. Das wird besonders deutlich bei der Entwicklung biotechnologischer Wirkstoffherstellungsverfahren bis in den Pilotmaßstab und anschließend erforderlicher Verfahrensvalidierungsstudien unter vollständiger Berücksichtigung der Guten Herstellungspraxis (GMP), dem Qualitätssicherungssystem der pharmazeutischen Industrie. Seit Anfang 1997 verfügt die GBF mit ihrem GMP-Technikum über die Herstellungserlaubnis gem. §13 des Arzneimittelgesetzes (AMG). Damit ist sie als einziges der Helmholtz-Forschungszentren in der Lage, Herstellungsverfahren bis zur Anwendungsreife, d.h. zum Einsatz am Menschen in Form klinischer Prüfungen zu entwickeln. Die Nachfrage seitens kleiner und mittlerer Unternehmen ist so groß, dass das GMP-Technikum weiter ausgebaut wird.

Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle steht stellvertretend für das gesamte Spektrum der Molekulargenetik, das heute gemeinhin und „modern“ als „Functional Genomics, Functional Proteomics und Bioinformatics“ charakterisiert wird. Die GBF hat in der Vergangenheit aktiv und innovativ zu diesen Entwicklungen beigetragen. Das gilt insbesondere für die Genomsequenzanalyse, wo durch Neu- und Weiterentwicklungen der Megasequenzierungstechnologie und verstärkte Automatisierung Erfolge zu verzeichnen waren. Diese fanden jüngst ihren Ausdruck in der erfolgreichen Sequenzierung des humanen Chromosoms 21, an der die GBF

innerhalb eines deutsch-japanischen Konsortiums maßgeblich beteiligt war. Das in der Bioinformatik entwickelte Methodenspektrum führte zur Ausgründung der Firma BioBase, die mit ihrem Konzept im BioChance-Wettbewerb ausgezeichnet und finanziert wurde. Verfahren der physikalisch-chemischen Strukturanalyse (Röntgen- und NMR-Methoden, Massenspektrometrie und Proteinsequenzierung) komplettieren das Methodenspektrum, so dass die GBF für eine moderne biochemische Funktionsanalyse bis zum Protein-Design und „Structure-Based-Drug-Design“ gut gerüstet ist.

Der Technologietransfer wird von der GBF aktiv unterstützt und gefördert. Sie hat ein Gründerzentrum mit mehr als 1500qm Labor- und Bürofläche in ihren Gebäuden eingerichtet. Die Räume werden kostendeckend vermietet. Das Konzept hat große Akzeptanz gefunden. Bisher konnten auf dem Campus der GBF 17 Firmen angesiedelt und 130 Arbeitsplätze geschaffen werden. Von diesen Firmen wurden 7 von GBF-Mitarbeitern gegründet. Die GBF selbst ist an der Firma IBA-Biologics beteiligt, die Verfahrensentwicklung unter GMP-Bedingungen betreibt.

Im Rahmen von EU- und BMBF-finanzierten Projekten, deren Zahl im Berichtsjahr nochmals angewachsen ist, pflegt die GBF Kooperationen mit zahlreichen externen Forschungsgruppen. Sie bringt hier nicht zuletzt auch ihre technologische und apparative Expertise ein.



The performance of **networking task** is a central task of GBF, which is characterized in the two projects both by internal interlinkage and by external cooperation with university and industrial partners. The expertise existing in **bioprocess engineering and validation** represents a service increasingly in demand especially by young companies in biomedicine which have to transfer their developments from the laboratory to clinical testing and production and which have neither facilities of their own nor the necessary know-how and know-why in bioprocess engineering. This is particularly apparent in the development of biotechnological methods of active substance production up to the pilot scale and subsequent process validation studies with full consideration given to Good Manufacturing Practice (GMP), the quality assurance system of the pharmaceutical industry. Since early 1997 the GBF with its GMP pilot plant has been the holder of a production licence according to § 13 of the German Pharmaceuticals Act (AMG). GBF is thus the only Helmholtz research centre capable of developing production processes up to the stage of application, i.e. for clinical tests in humans. The demand by small and medium-sized companies is so large that the GMP pilot plant will be further expanded.

Structure and function of biological macromolecules represents the entire range of molecular genetics generally characterized today as “functional genomics, functional proteomics and bioinformatics”. The GBF has actively and innovatively contributed to these developments in the past. This applies, in particular, to genome sequence analysis, where success has been achieved by new and further developments in megasequencing technology and by increased automation. This has recently been reflected in the successful sequencing of the human chromosome 21 in which GBF played a decisive part within a Japanese-German consortium. The range of methods developed in bioinformatics has led to the foundation of the BioBase company by GBF staff members who received a BioChance award for their concept as well as financial means. Methods of physicochemical structural analysis (X-ray and NMR methods, mass spectrometry and protein sequencing) complete the range of methods so that GBF is well equipped for modern biochemical functional analysis up to protein design and structure-based drug design.

Technology transfer is actively supported and encouraged by GBF, which has established a start-up centre with more than 1500 m² of laboratory and office space on its premises. The rooms are rented at a price covering the costs. The concept has met with great acceptance. Up to the present, 17 companies are located on the GBF campus and 130 jobs have been created. Seven of these companies were founded by GBF staff. GBF itself has a share in IBA-Biologics which conducts process development under GMP conditions.

Within the framework of EU- and BMBF-financed projects, which again increased in number in the reporting year, GBF collaborates with numerous external research groups in which GBF's technological and instrumental expertise makes a major contribution.



Biologen lernen lesen – Anstöße aus der Genomforschung

Helmut Blöcker ¹

Ein sonnengebräunter Kalifornier schreckte vor rund 25 Jahren die Medien und die Biologie-Wissenschaften in Deutschland auf. Mit optimistischem Surfer-Lächeln verkündete Herb Boyer, ein Pionier der Gentechnik, bei einer Vortragsreise durch Deutschland in diverse Kameras: „We want to make dollars with biology!“

Das Bild des Biologen hat sich gewandelt

Schon damals waren Biologen auch in Deutschland nicht mehr ausschließlich jene sympathischen Menschen, die mit durchgeistigter Miene durch Wälder schwebten und seltene Schmetterlinge erhaschten. Aber sie waren praktisch ausschließlich der akademischen Grundlagenforschung verpflichtet. Die neu entstehende molekular orientierte Biologie war akademisch, aufregend, ungekannt dynamisch, und sie war seriell. Wurde etwa ein neues Protein isoliert, so war oft der nächste Schritt, das zugehörige Gen zu fischen. Über Veränderungen der genetischen Kodierung (Mutagenese) und Genexpressionsversuche wurde dann eine möglichst genaue Funktionsuntersuchung angegangen. War der Sachverhalt um ein Protein weitgehend abgeklärt, ging es nach diesem Muster an das nächste. Man kann festhalten: Ein Großteil des gegenwärtigen molekularbiologischen Wissens bis hinein in die Krebsforschung oder die Produktion von Wertstoffen ist nacheinander, ist seriell erarbeitet worden.

Über die letzten Jahre haben sich jedoch aus Gründen der Wirtschaftlichkeit zunehmend globale Strategien in der Molekularbiologie durchgesetzt. Nur wenn man Prozesse und Verfahren so weit

als möglich parallelisiert, miniaturisiert und automatisiert, können wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn und kommerzielle Perspektiven zu vertretbaren Kosten entstehen. So wird heute über genomweite Ansätze kostengünstig derart viel Information generiert, dass sich die serielle Analyse von einigen oder vielen Genen eines Organismus nicht mehr rechnet. Und nur wer technologisch mithalten kann, hat eine gute Chance, gegen internationale wissenschaftliche und kommerzielle Konkurrenz zu bestehen. Die generelle Zielsetzung bleibt aber bei den sich heute ergänzenden seriellen und parallelen Arbeiten in der Molekularbiologie die gleiche: Es sollen alle Potentiale der biologischen Zelle zur Synthese, Kommunikation und Regulation bestimmt und das Wissen darüber intelligent elektronisch gespeichert und abrufbar werden.

Genomanalytik heißt Automatisierung

Der Biologe von heute erlebt also einen permanenten Zwang zur Auseinandersetzung oder gar Vernetzung mit anderen Disziplinen wie Informatik, Robotik, Polymerchemie, Elektronik, Lasertechnik. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Genomsequenzanalyse. Ihr generelles Ziel ist

¹ Dr. H. Blöcker | Leiter der Abt. Genomanalyse in der GBF | Head, Dept. of Genome Analysis of the GBF – <http://genome.gbf.de>

Biologists Learn to Read – Impetus from Genome Research

Roughly 25 years ago, a suntanned Californian startled the media and the biosciences in Germany. With an optimistic surfer smile on his face Herb Boyer, a pioneer in gene technology, announced during a lecture tour through Germany in front of various cameras: “We want to make dollars with biology!”

The biologist’s image has changed

Even at that time in Germany, biologists were no longer just those nice people who, with an otherworldly expression on their face, dash through forests trying to catch rare butterflies. However, they were practically exclusively devoted to academic basic research. The emerging molecular-oriented biology was academic, exciting, dynamic as never before, and it was serial. If, for example, a new protein was isolated, the next step was often to fish for the associated gene. As precise a functional investigation as possible was then initiated through modification of the genetic coding (mutagenesis) and gene expression experiments. After these details concerning the protein had been clarified, a similar analysis was used for the next candidate. It may be stated that a large portion of the current knowledge in molecular biology, extending even into cancer research and the production of valuable substances, has been acquired sequentially.

Over the last few years, however, global strategies have increasingly gained ground in molecular biology for reasons of economic efficiency. Only if methods and processes are paralleled, miniaturized and automated as far as possible will it be possible to gain scientific knowledge and open up commercial prospects at reasonable cost. Thus, for example, such a lot of information is generated today through genome-wide approaches at reasonable cost that the serial analysis of a few or many genes of an organism is no longer economical. Only those who can technologically keep pace have a good chance of asserting themselves against international scientific and commercial competition. But the general aim of currently complementary serial and parallel work in

molecular biology remains the same: all potentials of the biological cell are to be determined for synthesis, communication and regulation and the relevant knowledge is to be electronically stored in an intelligent manner so as to be retrievable.

Genome analysis means atomation

The biologist of today is therefore permanently forced to consider or even become networked with other disciplines such as informatics, robotics, polymer chemistry, electronics and laser technology. A good example is genome sequence analysis. Its general aim is to determine the sequence of the genome building blocks A (Adenine), C (Cytosine), G (Guanine) and T (Thymine). A successful determination reveals the basic potential of the biological cell. In principle, for who can spontaneously read a book in a foreign language and with foreign characters with which he/she is confronted for the first time? Even if the characters are decoded, who can recognize the words, sentences, the contextual meaning of entire chapters and ultimately the literary value of the whole work?

Even the detection of all the individual letters of a genome is an enormous task. There are well-established procedures for the isolation of genomic DNA from the cell. But even a relatively small bacterial genome with only a few million building blocks evades the direct analysis of its building blocks in present

zunächst die Bestimmung der Abfolge der Bausteine des Genoms A (Adenin), C (Cytosin), G (Guanin) und T (Thymin). Mit der erfolgreichen Bestimmung liegt das Grundpotential der biologischen Zelle offen. Im Prinzip, denn welcher Mensch kann schon spontan ein Buch in einer fremden Sprache und mit fremder Schriftsymbolik lesen? Selbst wenn man die Zeichen entschlüsselt hat, wer erkennt die Worte, die Sätze, wer erkennt den Sinnzusammenhang ganzer Kapitel, und wer erkennt schließlich den literarischen Wert des Gesamtwerkes?

Schon das Aufspüren aller einzelnen Buchstaben eines Genoms ist eine riesige Aufgabe. Für die Isolierung genomischer DNA aus der Zelle gibt es gut etablierte Prozeduren. Aber selbst ein relativ kleines Bakteriengenom mit nur wenigen Millionen Bausteinen entzieht sich der direkten Analyse seiner Bausteine in den heutigen DNA-Sequenzanalytoren (Sequencern). Deshalb muss heute weltweit nach einem generellen 3-Stufen-Schema verfahren werden:

1. Zufallszerschneiden der DNA
2. Analyse der über Klonierung vereinzelter Fragmente
3. Zusammenbau der Einzelergebnisse am Computer

Das Zerschneiden der DNA in sich vielfach überlappende Fragmente geschieht im allgemeinen durch Anwendung von Scherkräften, etwa durch Ultraschall. Mit den geringen Mengen der Fragmente wird meist so verfahren: Sie werden in spezielle Vektoren inseriert, die dann ihrerseits in *E. coli*-Zellen gebracht werden. Da diese Vorgänge praktisch nie quantitativ verlaufen, enthalten Wirtszelle und Vektor ein Selektionssystem, das nach dem Wachsen vereinzelter (das heißt örtlich klar von einander getrennter) Klone auf Agarplatten eine Farbunterscheidung von positiven (weiß) und negativen (blau) Bakterienhaufen ermöglicht. Mit Material der positiven Klone werden Flüssigkulturen angeimpft, so dass über Nacht genügend Zellmasse zur Isolierung von ausreichenden DNA-Mengen entsteht. Nach Zellyse wird dann selektiv die Plasmid-DNA mit dem enthaltenen Fragment der Fremd-DNA über Filtrationsverfahren isoliert.

Soweit wird die Prozedur für viele nach einem Standard der allgemeinen Molekularbiologie klingen. In der Genomanalytik gewinnt das Vorgehen durch den Umfang der erforderlichen Arbeiten jedoch eine neue Dimension. Meist muss für die Herstellung von DNA-Fragmenten handhabbarer Länge der beschriebene Subklonierungszyklus zweimal durchlaufen werden. Aus genomischen Fragmenten der Größe von ca. 40 bis 200 Kilobasen (Kb) werden zunächst Bibliotheken aus BACs (bacterial artificial chromosomes) hergestellt, die in ihrer Gesamtheit das zu untersuchende Genom mehrfach abdecken. Dann wird eine Auswahl von BACs ermittelt, die das Genom mit möglichst wenig gegenseitiger Überlappung vollständig abdeckt. Aus allen verbliebenen BACs werden Schrotschuß-Bibliotheken (shotgun libraries) hergestellt, die zu analysierende DNA der Kettenlänge von 0,5 bis etwa 12 Kb tragen. Bei „schwierigen“ Sequenzen (hoher GC-Gehalt, viele Sequenzwiederholungen etc.) müssen pro BAC sogar mehr als die üblichen zwei Bibliotheken angefertigt werden. Erfahrungsgemäß müssen für die Analyse eines einzigen BACs der Länge 100 Kb etwa 2.000 Klone sequenziert werden. Schon für ein mittleres Bakterien-Genom wie *E. coli* bedeutet dies gut und gerne die Analyse von über 100.000 Klonen! Das sogenannte „whole genome shotgun“-Verfahren, das insbesondere von The Institute of Genomic Research (TIGR) und Celera Genomics (beide USA) kultiviert wird, geht in einem Durchgang direkt von genomischer DNA zu sequenzierfähigen Fragmenten. Dadurch fällt die Verankerung der Ergebnisse aus dem Sequencer an das BAC-Raster weg und deshalb müssen nochmal ca. 50 % mehr Klone analysiert werden.

DNA sequence analysers (sequencers). For this reason, a general 3-step procedure must be used today all over the world:

1. random cutting of the DNA
2. analysis of the fragments singled out through cloning
3. assembly of the individual results on the computer

Cutting the DNA into multiply overlapping fragments is generally effected by the application of shearing forces, for instance by ultrasound. The small amounts of fragments are often treated as follows: they are inserted into special vectors which are then transferred into *E. coli* cells. Since these processes practically never proceed quantitatively, host cell and vector contain a selection system which, after growing isolated (i.e. locally clearly separated) clones on agar plates, permits colour discrimination of positive (white) and negative (blue) bacterial clusters. Material of the positive clones is used to inoculate liquid cultures so that overnight sufficient cell mass is produced for the isolation of sufficient amounts of DNA. After cell lysis, the plasmid DNA containing the foreign DNA fragment is then selectively isolated using filtration methods.

Up to this stage, the procedure may sound to many people like a general molecular biology standard. In genome analysis, however, due to the extensive work required, the procedure takes on a new dimension. In most cases, the subcloning cycle described must be passed through twice in order to obtain DNA fragments of a length capable of being processed. From genomic fragments of approx. 40 to 200 kilobases (kb), first of all, libraries are produced from BACs (bacterial artificial chromosomes) which in their entirety cover the genome under investigation several times. A selection of BACs is then determined which completely cover the genome with as little mutual overlap as possible. From all remaining BACs shotgun libraries are then produced which carry the DNA to be analysed from a chain length of 0.5 up to about 12 kb.

For "difficult" sequences (high GC content, many repeats etc.) it is even necessary to produce more than the usual two libraries per BAC. According to experience, approximately 2,000 clones must be sequenced for the analysis of a single BAC 100 kb in length. Even for a medium bacterial genome like *E. coli* this easily means the analysis of more than 100,000 clones! The so-called "whole genome shotgun" process, which is especially cultivated by The Institute of Genomic Research (TIGR) and by Celera Genomics (both USA), proceeds in one passage directly from genomic DNA to fragments capable of being sequenced. This eliminates the preanchorage of the results from the sequencer to the BAC grid so that approx. 50 % more clones must be analysed.

As shown by this example, genome sequence analysis is highly repetitive in its operations on the megabase (mb) level and thus particularly tiring and error-prone for humans. At GBF, therefore, automation has been greatly advanced over the past five years by infrastructural measures and by extensive in-house developments. Thus, for example, a picking robot according to industrial standards was established for picking the bacterial colonies. For moderate interim demand, a manual picking tool capable of being automated was developed. The central part of development work, however, is a robotic environment. It serves for the isolation of DNA ready for sequencing and for the subsequent actual sequencing reaction. Wherever possible, commercial modules were employed. For a completely automated operation, however, considerable development and modification work had to be carried out.

Wie an diesem Beispiel gezeigt, die Genomsequenzanalyse auf der Ebene von Megabasen (Mb) ist in ihren Arbeitsgängen hochrepetitiv und dadurch für Menschen besonders ermüdend und fehleranfällig. In der GBF ist deshalb die Automatisierung über die letzten 5 Jahre durch infrastrukturelle Maßnahmen und durch umfangreiche Eigenentwicklungen weit vorangebracht worden. So wurde zum Picken der Bakterienkolonien ein Pick-Roboter nach Industriestandard etabliert. Für moderaten Zwischenbedarf wurde ein manuelles, aber automatisierbares Pick-Werkzeug entwickelt. Kernstück der Entwicklung ist aber eine Robotik-Umgebung. Sie dient der Isolierung von sequenzierfertiger DNA und der anschließenden eigentlichen Sequenzierreaktion. Wo immer möglich wurde auf kommerzielle Module zurückgegriffen. Für einen völlig automatisierten Ablauf mußten jedoch erhebliche Entwicklungs- und Modifizierungsarbeiten geleistet werden. Ein steuerbarer Schüttler für Mikrotiterplatten ermöglicht seine Be- und Entladung durch einen Logistikroboter immer an exakt der selben Stelle. Zwei verschiedene Vakuumkammern für gesteuerte Filtrationen machen uns unabhängig von nur einem einzigen Hersteller von Verbrauchsmaterialien. Alle Module der Anlage sind über einen Steuerrechner verbunden. Das Konzept (Design) der Kommunikations-, Steuer- und Auswertesoftware wurde objektorientiert angelegt. Es ist sehr flexibel und läßt sich auch außerhalb biotechnologischer Anwendungen zur Kontrolle heterogener Robotik einsetzen. Eine sensorische Rückkopplung (programmierter Verlauf von Drücken und Temperaturen) ist bereits in der Software implementiert. Die Software ist normgerecht validiert und dokumentiert. Für zahlreiche Entwicklungen zur Gesamtanlage wurde Patentschutz beantragt. Die Anlage erlaubt nach neuestem Stand einen Durchsatz von ca. 4.500 Klonen in 24 Stunden. Menschliche Intervention beschränkt sich auf logistische und gelegentliche Wartungsarbeiten. Eine erhebliche Ausweitung der Kapazität im Bedarfsfall ist leicht erreichbar.

Chromosom 21: ein Lern-Fall

Seit den Tagen von Herb Boyer und anderen Pionieren der modernen Biologie ist diese Wissenschaft weltweit erwachsen geworden. Es gibt eine nahezu verwirrend große Zahl von neu gegründeten Dienstleistungsfirmen. Große Pharmafirmen verkünden, dass sie alle künftigen diagnostischen und therapeutischen Entwicklungen auf Ergebnisse der Genomforschung aufbauen werden. Es wird sogar davon gesprochen, dass nach der Informationstechnologie die modernen Biowissenschaften die stärkste Job-Maschine darstellen werden. Auf besondere Weise im Zentrum des Interesses stand die Forschung rund um das Human-genom. Natürlich fesselt es grundsätzlich viele Menschen, Genaueres über die Entstehung von Krankheiten zu erfahren. Sie wollen wissen, welche neuen Ansätze es aus der Grundlagenforschung heraus für die sichere, frühe und preiswerte Diagnose von Krankheiten und welche Langzeitperspektiven es für deren Therapie geben könnte. Genomforschung berührt privateste Bereiche des Menschen. Was habe ich von meinen Eltern auf biologischem Sektor mitbekommen, was gebe ich meinen Kindern weiter?

Mit derartigen Zukunftsgedanken und Spekulationen im Kopf haben sich schon über die letzten 5 Jahre Leiter von zentralen Gruppen der Genomforschung verschiedener Länder („Bermuda-Gruppe“) regelmäßig getroffen. Sie legten fest, nach welchen Standards das Human-genom analysiert werden soll. Interessantester Punkt war vielleicht, dass unter der Beteiligung wichtiger Pharmafirmen eine überraschende Selbstverpflichtung erzielt wurde. Alle Sequenzinformation sollte ab einer Länge von ca. einer Kilobase innerhalb von 24 Stunden über das Internet frei verfügbar gemacht werden.



Robotik zur Genomsequenzanalyse. Basierend auf einer Reihe von eigenen Patentanmeldungen ist in der GBF kontinuierlich Robotik entwickelt und implementiert worden. Die Anlage in der Abbildung zeichnet sich durch hohe Exaktheit und Stabilität aus. Das objektorientierte Software-Design erlaubt den Aufbau ähnlicher Anlagen auch außerhalb biotechnologischer Anwendungen.

Robotics for the sequence analysis of genomes. Based on a number of patent applications, the GBF has continued to develop and implement robotics. The installation in the picture is distinguished by its precision and stability. The object-oriented software design allows the implementation of similar environments

A controllable shaker for microtitre plates permits loading and unloading by a logistic robot at always exactly the same place. Two different vacuum chambers for controlled filtration make us independent of any single manufacturer of consumables. All modules of the system are connected through a master computer. The design of the communications, control and evaluation software is object-oriented. It is very flexible and can also be used outside biotechnological applications for the control of heterogeneous robotics. A sensorial feedback (programmed variation of pressures and temperatures etc.) is already implemented in the software. The software is validated and documented in conformance with standards. Patent applications have been filed for numerous developments in connection with the entire system. The system currently allows a throughput of approx. 4,500 clones in 24 hours. Human intervention is restricted to logistic and occasional maintenance work. A considerable capacity expansion is easily possible in case of demand.

Chromosome 21: a learning case

Since the days of Herb Boyer and other pioneers of modern biology, this science has grown up worldwide. There is an almost confusingly large number of service start-ups. Large pharmaceutical companies announce that they will base all future diagnostic and therapeutic developments on the results of

genome research. There is even talk that after information technology the modern biosciences will be the largest job machine. Research related to the human genome in particular has been at the centre of interest. Of course, many people are fascinated by learning more about the genesis of diseases. They want to know what new approaches could arise from basic research for a reliable, early and inexpensive diagnosis of diseases and what could be the long-term prospects for their therapy. Genome research touches the most private spheres of humans. What have I got biologically from my parents and what do I transmit to my children?

With such thoughts about the future and such speculations in their heads, the leaders of central genome research groups from various countries ("Bermuda group") have met regularly over the past five years. They defined the standards for the analysis of the human genome. The most interesting aspect may have been that a surprising voluntary agreement has been reached involving important pharmaceutical companies. Any sequence information above a length of approx. one kilobase should be made freely available on the Internet within 24 hours.

Auch deutsche und japanische Gruppen schlossen sich der Bermuda-Initiative an. Aufgrund ihres biologischen Interesses, ihrer nicht überwältigend guten Fördersituation und des Wunsches nach der schnellen und modellhaften Entschlüsselung eines kompletten Chromosoms, einigte man sich auf eines der kleinsten aber medizinisch gesehen hoch interessanten der 23 menschlichen Erbsabschnitte, das Chromosom 21. Nach einer harten Zeit von drei Jahren intensiver Kooperation zwischen Tokio, Jena, Berlin und Braunschweig konnte im Mai 2000 die weitgehende Entschlüsselung des humanen Chromosoms 21 in der Zeitschrift *Nature* veröffentlicht werden. Es ist nach dem Chromosom 22 (Veröffentlichung fünf Monate früher) gegenwärtig erst das zweite menschliche Chromosom, das jemals entschlüsselt worden ist. Allgemein sind die Techniken und Verfahren in den öffentlichen Genomzentren für das internationale Human genom-Programm auf hohe Exaktheit der Daten optimiert. In einer bisher nicht übertroffenen Qualität bestimmte das deutsch-japanische Konsortium genau 33.546.361 Basenpaare aus den Bausteinen A, C, G und T auf Chromosom 21 und dies in einer Genauigkeit von mehr als 99,995 Prozent. Um diese Genauigkeit zu erreichen, wurden die Bausteine mit einer Redundanz von 8 bis 10 bestimmt. Die Summe der "Rohbasen" betrug also mehr als eine viertel Milliarde.

Warum dieser hohe Qualitätsanspruch mit seinem Riesenaufwand an speziell zu entwickelnder Infrastruktur und an Durchsatz gegenüber anderen Initiativen? Wenn es selbst zwischen den Genomen vom Menschen und vom Schimpanse nur einen Unterschied von ca. 1,6 Prozent gibt, so macht es keinen Sinn, bei einer Ungenauigkeit im Prozentbereich stehen zu bleiben. Es ist außerdem bekannt, dass Unterschiede von Mensch zu Mensch sogar nur im Promillebereich liegen. Oft entscheiden aber nur wenige Basenaustausche oder Basenverluste zwischen gesund und krank.

Was haben wir davon?

Was hat nun der Mensch von so vielen Daten und so hoher Exaktheit? Genomsequenzanalyse ist unverzichtbare Basisarbeit, Kärnerarbeit für die Biomedizin der Zukunft. Wenn wir einen neuen Kontinent erobern wollen, müssen wir zunächst zu ihm vordringen, ihn so weit wie möglich bereisen, ihn vermessen und schließlich die Information über alle seine wesentlichen Merkmale speichern. Das alles ist jetzt weitgehend gelungen für das Chromosom 21 und es gelingt in diesen Zeiten nach dem selben Muster für immer mehr Bereiche des menschlichen Genoms. Es ist zu vermuten, dass auf Chromosom 21 alle, natürlich auch die schon früher bekannten Gene genau lokalisiert worden sind. Von den bekannten Genen wissen wir schon länger, mit welchen Krankheiten sie in Verbindung gebracht werden. Es liest sich wie eine Liste der Krankheiten, die in aller Munde sind: Krebs, Alzheimer, Epilepsie, Down Syndrom, einige Autoimmunkrankheiten. Aber wofür tragen die neu, die zusätzlich gefundenen Gene Information? Wie vergleichen sich die beim Menschen gefundenen Gene mit denen von nahen oder fernen Verwandten des Menschen (Maus, Ratte, Zebrafisch einerseits und Pflanzen, Hefen, Bakterien andererseits)? Wie sehen die tatsächlichen Genprodukte (Proteine) aus? Welche Faktoren bestimmen die Stabilität des Genoms, die Aufnahme, Abgabe oder Variabilität von Genen? Wie wirken schließlich die Proteine aufeinander oder auf das Genom? Wie werden identische Gene in verschiedenen Organen unterschiedlich an- und abgeschaltet?

Die Beantwortung all dieser Fragen dürfte zunächst hauptsächlich für Wissenschaftler interessant sein. Aber ihre schrittweise Beantwortung bringt uns schon bald so manchen neuen genetischen Test. Und wir alle müssen uns in unserer Gesellschaft entscheiden, wie wir mit solchen Tests verfahren wollen. Die ethische und rechtliche Diskussion über Konsequenzen der Genomforschung ist ein weites Feld. Bei genetischen Tests scheinen mir persönlich drei Grundprinzipien besonders wichtig: Die strikte Freiwilligkeit bei der Einleitung eines

German and Japanese groups also joined this Bermuda initiative. Due to their biological interest, their not overwhelmingly good funding situation and the demand for rapid model decoding of a complete chromosome, it was agreed to address one of the smallest but medically extremely interesting of the 23 human hereditary segments, chromosome 21. After three years of very intensive cooperation between Tokyo, Jena, Berlin and Braunschweig, the almost complete decoding of the human chromosome 21 was published in *Nature* in May 2000. After chromosome 22 (publication five months earlier) it is currently the second human chromosome ever to be decoded. In general, the techniques and processes for the international human genome programme are optimized for high data exactness at the public genome centres. In a so far unrivalled quality, the Japanese-German consortium determined exactly 33,546,361 base pairs from building blocks A, C, G and T on chromosome 21, and this with a precision of more than 99.995 percent. In order to achieve this precision, the building blocks were determined with a redundancy from 8 to 10. The sum of the "crude bases" was thus more than a quarter billion.

Why this high quality requirement with its enormous expenditure on specially developed infrastructure and on throughput compared to other initiatives? If there is only a difference of approx. 1.6 percent between even the genomes of humans and chimpanzees, it does not make sense to stop the analysis at an inaccuracy in the percentage range. It is moreover known that differences between humans are only in the per mille range. Often only a few base exchanges or base losses decide between those who are healthy and those who are sick.

What do we get out of it?

What is the benefit for humans from so many data and such a high exactness? Genome sequence analysis is indispensable basic work, a tough job for the biomedicine of the future. If we wish to conquer a new continent, we must first penetrate into this continent, travel through and survey it, and finally store information about all its essential features. All this has largely been achieved for chromosome 21 and is becoming increasingly successful for more and more regions of the human genome according to the same pattern. It is to be assumed that all genes, including those already known before, have been located on chromosome 21. We have already been aware for some time of the diseases related to the known genes. It reads like a list of diseases on everybody's lips: cancer, Alzheimer's disease, epilepsy, Down syndrome, some autoimmune diseases. But what do the new, the additionally found genes carry information for? How do the genes found in humans compare with those from humans' near or distant relatives (mouse, rat, zebra fish on the one hand and plants, yeasts, bacteria on the other)? What do the actual gene products (proteins) look like? What factors determine the stability of the genome, the uptake, discharge or variability of genes? And finally, how do proteins act on each other or on the genome? How are identical genes in different organs differently switched on and off?

Answering all these questions should first of all be of prime interest to scientists. But if answered in stages they will soon bring us many a new genetic test. And we all must decide in our society how we want to proceed with such tests. The ethical and legal discussion on the consequences of genome research is a broad field. In connection with genetic tests I personally consider three basic principles to be of particular importance: strict voluntariness in introducing a test, personal right to dispose of the test results, and the professional performance of tests with prior expert consultation. The application of new, genome-based therapies of diseases should be based on analogous criteria. However, experts generally expect that the development of such therapies and also the development of new medicines will take several years, if not several decades.

Testes, das persönliche Verfügungsrecht über die Testergebnisse und die professionelle Durchführung der Tests mit vorgeschalteter fachlicher Beratung. Bei der Anwendung neuer, genombasierter Therapien von Krankheiten sollten analoge Kriterien angewandt werden. Allerdings ist die allgemeine Erwartung unter Fachleuten, dass die Entwicklung solcher Therapien und auch die Entwicklung neuer Medikamente etliche Jahre, wenn nicht sogar einige Jahrzehnte dauern wird.

Scherze unter Wissenschaftlern

Die Analyse der Basensequenz des Chromosoms 21 hat inzwischen zu einer fachlichen Kontroverse mit humoristischem Beigeschmack geführt. Wieviele Gene hat der Mensch? Wir haben aus der von uns gefundenen Zahl von 225 Genen (inklusive der 98 vorhergesagten) und der für Chromosom 22 gefundenen extrapoliert, dass es ungefähr 40.000 menschliche

Gene geben sollte. Diese Zahl wich drastisch nach unten von den bis Mai 2000 angegebenen Schätzungen ab. Auf dem 2000er Cold Spring Harbor-Meeting zu "Genome Sequencing and Biology" wurde deshalb unter den anwesenden Experten eine Wette zur Frage der Anzahl menschlicher Gene gestartet. Regeln, Definitionen und grafische Darstellungen der Wetten finden sich im Internet (<http://www.ensembl.org/genesweep.html>). Selbst wenn es nur relativ wenige Gene auf dem menschlichen Genom geben sollte, die Zahl der Genprodukte, der Proteine, wird wahrscheinlich um ein Vielfaches höher sein. Kodierende Bereiche können vielartig abgelesen werden, Proteine können auch nach ihrer Biosynthese innerhalb der Zelle modifiziert werden. So viel steht fest: Der Mensch hat bei weitem nicht das Genom mit der größten Anzahl von Bausteinen. Vielleicht werden wir wohl oder übel eines Tages damit leben müssen, dass es "primitivere" Lebensformen als den Menschen gibt, die mit einer höheren Anzahl von Genen ausgestattet ist. Aber beruhigenderweise besteht das Leben nicht nur aus Genomik.

Das Medien-Echo

Von Bild-Zeitung bis Tagesthemen, von Flensburg bis Passau, sogar buchstäblich auf allen Kontinenten wurde ab 8. Mai 2000 in den Medien über eine einzige naturwissenschaftliche Veröffentlichung berichtet. Nach Pressekonferenzen in Berlin und Tokio an diesem 8. Mai berichtete die Zeitschrift Nature erstmalig zunächst *online* und erst später in der Druckversion. In letzterer Version gab es zehn Tage später ein Titelfoto (Abbildung, Titelbild *Nature*) zur Trisomie des Chromosoms 21, die mit dem Down Syndrom assoziiert ist (etwa ein Neugeborenes von 700 ist durch diese schwere Entwicklungsstörung betroffen). Der Artikel selbst ist 9 Seiten lang und wird von 12 Seiten Ausklapp-Poster begleitet (*Nature* 405, 311-319, 2000). Wie kam es zu der überraschend starken öffentlichen Wahrnehmung einer molekularbiologischen Arbeit?

Titelbild der Ausgabe der Zeitschrift *Nature* vom 18. Mai 2000. Die Fluoreszenzaufnahme zeigt drei Kopien (in Rot) statt der üblichen zwei von Chromosom 21 – ein genomischer Beleg für eine schwere Entwicklungsstörung, das Down Syndrom. Die Überschrift „Counting down from 21“ bezieht sich auf unsere Hochrechnung zur Anzahl der menschlichen Gene. In dem Artikel ab Seite 311 der *Nature*-Ausgabe vermuten wir, dass es nur ca. 40 000 Gene gibt – weit weniger als alle früheren Schätzungen. Nachdruck mit Genehmigung von *Nature* 405: 18 May (2000) 311-319, copyright 2000 Macmillan Magazines Ltd.

Cover picture of the 18 May 2000 issue of *Nature*. The fluorescence picture shows three copies (in red) of chromosome 21 instead of the two as in the normal case – genomic evidence of a developmental retardation, the Down Syndrome. The headline "Counting down from 21" refers to our projection for the number of human genes. On page 311 and the following of the article of the *Nature* issue we assume, that there are only some 40,000 genes – far less than predicted earlier. Reprinted by permission from *Nature* 405: 18 May (2000) 311-319, copyright 2000 Macmillan Magazines Ltd.



Jokes among scientists

The analysis of the base sequence of chromosome 21 has meanwhile led to controversy among scientists with a touch of humour. How many genes do humans have? We extrapolated from the 225 genes found (including the 98 genes predicted) and from those found for chromosome 22 that there should be approximately 40,000 human genes. This figure was dramatically lower than the estimates reported before May 2000. At the 2000 Cold Spring Harbor Meeting on "Genome Sequencing and Biology", therefore, a bet was started among the experts present concerning the number of human genes. Rules, definitions and graphical representations can be found on the Internet (<http://www.ensembl.org/genesweep.html>). Even if there should only be relatively few genes on the human genome, the number of gene products, i.e. of proteins, will probably be many times larger. Coding regions can be read in many ways, proteins can also be modified within the cell after their biosynthesis. The fact is that man does not have the genome with the greatest number of building blocks by far. Perhaps, we will one day have to live with the fact that there are more "primitive" forms of life than man equipped with a greater number of genes. But we may find comfort in the thought that life does not only consist of genomics.

The media echo

From *Bildzeitung* (a German tabloid) up to the daily news on TV, from Flensburg in the north down to Passau in the south of Germany, and literally on all continents the media have been reporting since 8 May 2000 on one single scientific publication. After press conferences in Berlin and Tokyo on this 8 May, the journal *Nature* for the first time reported initially online and then in a print version, in which ten days later a cover photograph (*Nature* front cover) appeared on the trisomy of chromosome 21, which is associated with Down syndrome (approximately one newborn child out of 700 is affected by this serious developmental disturbance). The article itself has a length of nine pages and is accompanied by twelve folding poster pages (*Nature* 405, 311-319, 2000). What led to this surprisingly strong public perception of a molecular biological study?

Apart from the general human interest in inheritance, disease, diagnosis and therapy already mentioned above, the competition scenario reported in detail by the media for about the last two years also took effect. On our side, the 16 public research institutes worldwide which put all their results on the Internet within 24 hours to prevent broad monopolies in exploiting the "periodic table of biological elements" in the emerging biomedical revolution. On the other side, the American Celera Genomics company with a seemingly better technology (the "whole genome shotgun" already mentioned) which hopes to secure a billion-dollar market by means of patent applications and licences for genomic base information. A rivalry like in the old days between Americans and Soviets in space flight. Many of us are now aware that not only outer space, but also our inner "space" has "vast areas" in store for exploration. The benefit of genome research for medicine is immediately obvious to many people, so that we do not care about the origin of data as long as they are accurate enough and freely available. This has been the case for years in the public initiative, which also includes the genome centre at GBF.

Neben dem schon erwähnten allgemeinen menschlichem Interesse an Vererbung, Krankheit, Diagnose und Therapie verfehlte auch das in den Medien ausführlich dargestellte Konkurrenz-Szenario der letzten ungefähr zwei Jahre seine Wirkung nicht. Hier die 16 weltweiten, öffentlichen Forschungsinstitute, die alle Ergebnisse innerhalb von 24 Stunden ins Internet stellen, um breite Monopole bei der Verwertung des „Periodensystems der biologischen Elemente“, bei der sich anbahnenden biomedizinischen Revolution zu verhindern. Dort die amerikanische Firma Celera Genomics mit der nur scheinbar besseren Technologie (das erwähnte „whole genome shotgun“), die gerade mit Patentanmeldungen und Lizenzen zu genomischer Basisinformation einen Milliarden-Markt für sich sichern will. Ein Konkurrenzkampf wie vor Zeiten zwischen Amerikanern und Sowjets in der Raumfahrt. Vielen wird jetzt klar, dass nicht nur der Weltraum dort draußen, sondern auch der „Weltraum“ in uns „riesige Räume“ zur Erforschung bereit hält. Der Nutzen der Genomforschung für die Medizin leuchtet vielen Menschen unmittelbar ein. Insofern dürfte es uns allen gleich sein, woher die Daten kommen – solange sie nur exakt genug sind und solange sie frei zur Verfügung stehen. Bei der öffentlichen Initiative, zu der auch das Genomzentrum an der GBF gehört, ist dies seit Jahren der Fall.

Goldminen für die Zukunft

Die Bausteinanalyse der Chromosomen 22 und 21 und ihre grundlegende bioinformatische Analyse haben weitergehende Funktionsanalysen ermöglicht. Kontinuierlich werden zunehmend ähnliche Ergebnisse für die anderen

Chromosomen in die öffentlichen Datenbanken gestellt. Ein sichtbarer Meilenstein ist die Veröffentlichung einer Übersichtsversion des menschlichen Genoms („working draft“) Ende 2000. Bis 2002 werden alle menschlichen Chromosomen auf gleichem Qualitätsniveau wie jetzt schon 21 und 22 beschrieben sein. Zusammen mit den wichtigen Modellorganismen-Genomen (Ratte, Maus, Zebrafisch etc.) werden über die nächsten fünf Jahre riesige Goldminen zur funktionsanalytischen Ausbeutung freigelegt werden. Bei der Bewältigung der anstehenden Datenflut wird der Bioinformatik eine ganz zentrale Rolle zukommen. Hierauf ist die GBF gut vorbereitet. Kürzlich wurde eine neuartige Basistechnologie für die Bioinformatik zum Patent angemeldet. Sie dient der intelligenten Speicherung von Information und deren flexibler Filterung, neuartige Fragenkombinationen werden möglich. Nicht zuletzt durch erhebliche Geschwindigkeitssteigerungen und Kostenreduzierungen hat die neue GBF-Technologie das Potential, große Bereiche der Bioinformatik und damit auch der Genomforschung zu revolutionieren. Wissenschaftliche Infrastruktur, innovative Ideen und international sichtbare Leistungen wie die Analyse des Chromosoms 21 haben es bewirkt, dass Deutschland im Schlüsselgebiet Genomforschung nach wie vor auf der Landkarte geblieben ist. Inzwischen hat sich auch im politischen Raum die Erkenntnis breit durchgesetzt, dass Genomforschung „big science“ ist. Eine sich allmählich verbessernde Förderlandschaft könnte mithelfen, dass Deutschland bei der beginnenden biomedizinischen und biotechnologischen Revolution nicht hinter Schwellenländer wie China und Indien zurückfällt, vielleicht sogar mit einigen der führenden Länder wie USA, Großbritannien, Frankreich und Japan mithalten kann. Der internationale Lesewettbewerb der Biologen ist voll entbrannt.

Gold mines for the future

The building block analysis of chromosomes 22 and 21 and their basic bioinformatics analysis have enabled more extensive functional analyses. Similar results for other chromosomes are increasingly and continuously fed into public databases. A visible milestone is the publication of an overview version of the human genome ("working draft") by the end of 2000. All human chromosomes will be described by 2002 at the same quality level as chromosomes 21 and 22 today. Together with the important model organism genomes (rat, mouse, zebra fish etc.) huge gold mines will be opened up for exploitation by functional analysis over the next five years.

Bioinformatics will play a quite central role in coping with the forthcoming flood of data, for which GBF is well prepared. Recently, past, a patent application has been filed for a novel base technology for bioinformatics. It serves for the intelligent storage and flexible filtration of information enabling novel problem combinations. Not least due to considerable increases in speed and considerable cost reductions has the new GBF technology the potential to revolutionize large areas of bioinformatics and thus also of genome research. The scientific infrastructure, innovative ideas and internationally visible achievements such as the analysis of chromosome 21 have enabled Germany to remain on the map in the key area of genome research. In the meantime, even politicians have become aware that genome research is "big science". A gradually improving funding scene could help to prevent that Germany from falling behind threshold countries such as China and India in the beginning biomedical and biotechnological revolution, and perhaps even to keep pace with some of the leading countries, namely the USA, the United Kingdom, France and Japan. The biologists' international reading competition is in full swing.



Reference | Literatur

Nordsiek, G., K. Hornischer, P. Brandt, M. Scharfe, O. Schön, J. Reichelt, G. Kauer, H. Blöcker et al.: The DNA sequence of human chromosome 21, *Nature* **405** (2000) 311-319

Das beinahe komplette Chromosom-21-Team der GBF

The almost complete Chromosome-21-team at GBF



Epothilon – ein Naturstoff auf dem Weg zum Medikament

Gerhard Höfle¹

Gut Ding will Weile haben, sagt der Volksmund, wenn es gilt, ein Werk über viele Hürden zu einem guten Ende zu bringen. Dieser Spruch scheint ganz besonders auf die langwierige Entwicklung eines neuen Medikaments oder Pflanzenschutzmittels gemünzt zu sein. Auch wenn die Methoden zur Entdeckung eines neuen Wirkstoffs in den vergangenen Jahren wiederholt revolutioniert worden sind, dauert es auch heute noch 7-10 Jahre, bis ein neu entdeckter Wirkstoff in der Praxis eingesetzt werden kann. Dabei konnte gerade die Suche nach neuen Wirkstoffen durch die Fortschritte in der Molekularbiologie und Genetik auf eine neue Basis gestellt werden. Zielproteine, die im Zusammenhang mit einem Krankheitsgeschehen stehen, wurden zunehmend verfügbar und konnten in sogenannte Hoch- und Ultrahochdurchsatz-Screeningsysteme (HTS und UHTS) eingebaut werden, und auch die Zahl der zu testenden Proben und damit der Treffer im Test hat sich mit der Entwicklung der kombinatorischen Parallelsynthese dramatisch vergrößert. Immer noch schwierig und wenig planbar ist dagegen die Optimierung einer Leitstruktur im Hinblick auf metabolische Stabilität, Transport zum Wirkort und Entfaltung der gewünschten Wirkung in der komplexen Umgebung eines lebenden Organismus. Diese Optimierung fällt in die Phase der vorklinischen Entwicklung bzw. der ersten Feldversuche bei Pflanzenschutzmitteln, in der nicht

wenige hoffnungsvolle Entwicklungskandidaten bereits aufgegeben werden müssen.

Die anschließenden klinischen Prüfungen und die Untersuchung des Umweltverhaltens der Pflanzenschutzmittel nehmen die längste Zeit in Anspruch und verursachen den größten Teil der Entwicklungskosten. Hier haben die eingangs geschilderten neuen Methoden kaum eine Beschleunigung bewirkt. Ganz im Gegenteil, die gewachsenen Ansprüche an Arzneimittelsicherheit, Vermeidung von Nebenwirkungen und Umweltverträglichkeit bei Pflanzenschutzmitteln haben den Prüfaufwand und die Verlustrate von Entwicklungskandidaten immer wieder erhöht. Große Hoffnungen werden deshalb in jüngster Zeit in die Sequenzierung und Analyse des menschlichen und anderer Genome gesetzt. Es ist jedoch eine Illusion zu glauben, jetzt gleichsam per Mausklick vom Gen zum maßgeschneiderten Medikament zu kommen. Müssen doch unter den geschätzten 1 Million menschlichen Proteinen erst die für ein bestimmtes Krankheitsgeschehen relevanten identifiziert, isoliert und in Testsysteme zur Wirkstoffsuche eingebaut werden. Entdeckt man im Screening schließlich eine Substanz, die die Funktion dieses Proteins im gewünschten Sinne beeinflusst, steht man erst am Beginn der oben beschriebenen Entwicklung, die jeder neue Wirkstoff unabhängig von seiner Herkunft bis zum Medikament durchlaufen muß.

Prof. Dr. G. Höfle | Leiter des Bereichs Naturstoffe in der GBF | *Head of the Division Natural Products at the GBF*

Epothilone – A Natural Product on the Road to Becoming a Medicine

It takes time to do a thing well

is a popular saying if many hurdles have to be taken to bring a job to a satisfactory conclusion. This seems to be particularly true of the lengthy development of a new medicine or pesticide. Even if the methods for the discovery of a new active substance have been repeatedly revolutionized in recent years, it still takes seven to ten years to find a new substance and bring it to the market place, although progress in molecular biology and genetics has put especially the search for new substances on a new basis. Target proteins involved in a pathological process have become increasingly available and have been incorporated into so-called high- and ultrahigh-throughput screening systems (HTS and UHTS), and the number of samples to be tested and thus the hits have also significantly increased with the development of combinatorial parallel synthesis. In contrast, the optimization of a lead structure with respect to metabolic stability, transport to the target organ and deployment of the desired effect in the complex environment of a living organism is still difficult and can hardly be planned. This optimization falls into the phase of preclinical development or initial field tests for pesticides, where quite a number of promising development candidates must already be given up. Subsequent clinical testing and the investigation of the environmental behaviour of pesticides take most time and account for the largest portion of the development costs. The new methods described above have hardly caused any acceleration here. On the contrary, the increasing demands made on the safety of medicines, the avoidance of side effects, and environmental compatibility in the case of pesticides have again and again increased the testing expenditure and the loss rate of development candidates. Great hopes have therefore recently been placed in the

sequencing and analysis of the human and other genomes. It is, however, an illusion to believe that it is now possible to get from the gene to the tailor-made medicine just by a mouse click. From the estimated one million human proteins it is first necessary to identify and isolate those relevant for a particular pathological process and incorporate them into test systems to be used in the search for active substances. If a substance is eventually discovered which influences the function of this protein in the desired sense, this is only the beginning of the above-described development that any new substance must pass irrespective of its origin until a medicine is obtained.

What role can natural products play today in the search for bioactive substances?

In view of the large number of samples from combinatorial synthesis, the just over 100,000 natural products known today plus approx. 2,000 new ones added per year only seem to play a minor role in modern active substance research and, in many instances, this field is completely given up in favour of the combinatorial synthesis for reasons of cost reduction. Undoubtedly, the classics such as β -lactams (penicillin, cephalosporin) as well as the other antibiotics, the lipid-lowering substances of the mevinolin type and cyclosporin for organ transplantation still play a significant role. But even in the more recent past, natural products have still been able to assert themselves over pure synthetics in new registrations. Nearly half of the pharmaceutical substances registered between 1980 and 1994 are based directly or indirectly on natural products and even in the recent past there have been successful natural products such as the glucosidase inhibitor acarbose, the fungicides of the strobilurin type or the insecticides spinosad and imidacloprid. What

Welche Rolle können Naturstoffe bei der Wirkstoffsuche heute spielen?

Angesichts der großen Probenzahlen aus der kombinatorischen Synthese, scheinen die gut 100.000 heute bekannten und jährlich ca. 2.000 neu hinzukommenden Naturstoffe in der modernen Wirkstoffforschung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, ja ihre Bearbeitung wird im Zuge der Kostenreduktion zugunsten der kombinatorischen Wirkstoffsynthese vielfach ganz aufgegeben. Zweifellos spielen die Klassiker, wie die β -Lactame (Penicillin, Cephalosporin) und die Reihe der übrigen Antibiotika, die Lipidsenker vom Mevinolintyp und Cyclosporin für die Organtransplantation immer noch eine bedeutende Rolle. Aber auch in neuerer Zeit konnten sich Naturstoffe gegenüber reinen Synthetika bei Neuzulassungen noch gut behaupten. So gehen von den 1980-1994 zugelassenen Pharmawirkstoffen nahezu die Hälfte direkt oder indirekt auf Naturstoffe zurück, und auch aus jüngster Zeit gibt es erfolgreiche Naturstoffe, wie den Glukosidaseinhibitor Acarbose, die Fungizide vom Strobilurin-Typ oder die Insektizide Spinosad und Imidacloprid. Was macht also den Erfolg und gleichzeitig den schlechten Ruf der Naturstoffe aus? Naturstoffe sind *a priori* biologisch aktiv und in ihrer spezifischen Aktivität im Laufe der Evolution häufig bereits so hoch optimiert worden, dass sie direkt in die Anwendung kommen können. Auch bei einem ungünstigen Wirkprofil oder mangelnder Stabilität lassen sich durch semisynthetische Derivate (Penicilline) oder totalsynthetische Analoga (Strobilurine) oft ideale Wirkstoffe mit hohem Marktpotential entwickeln. Zum Nachteil der Naturstoffe wirkt sich die oft schwierige Zugänglichkeit im technischen Maßstab und die meist komplexe Struktur mit mehreren Stereozentren aus, die eine Verwendung als Leitstruktur erschweren. Nachteilig ist auch das Vorkommen von Naturstoffen in komplexen Gemischen (Rohextrakten), die mit den modernen molekularen Testsystemen nicht verträglich sind. Hier bahnt sich jedoch eine

Wende zum Vorteil an: Durch automatisierte chromatographische Fraktionierung werden aus Rohextrakten kleine Bibliotheken von (nahezu) reinen Naturstoffen gewonnen, die problemlos in ein HTS-Screening eingeschleust werden können. Dort sind sie sehr willkommen, denn die hochgesteckten Erwartungen in die kombinatorische Synthese bei der Wirkstoffsuche haben sich nicht erfüllt. Was die Naturstoffquellen angeht, so setzt man neben den klassischen Produktionsorganismen und der Suche nach neuen Organismengruppen, in Zukunft besonders auf die kombinatorische Biosynthese.

Myxobakterien, eine ergiebige Wirkstoffquelle

Dass auch aus einer begrenzten, früher kaum beachteten Organismengruppe entwicklungswürdige Wirkstoffe hervorgehen können, zeigt das Beispiel der Myxobakterien [1]. Von den ca. 100 an der GBF isolierten neuen Naturstoff-Grundstrukturen, wurden ein gutes Dutzend von verschiedenen Industriepartnern intensiv bearbeitet, und immerhin zwei kamen in die industrielle Entwicklung, Soraphen als Fungizid für den Pflanzenschutz [2a] und jetzt Epothilon als Zytostatikum. Von Epothilon, das sich derzeit in einer frühen Phase der klinischen Prüfung befindet, soll hier die Rede sein [3]. Ähnlich vielen anderen Naturstoffen hat die Entwicklung des Epothilons eher schleppend begonnen und war von längeren Pausen unterbrochen. Und selbst als sein wahres Potential erkannt war, dauerte es länger als 1 Jahr bis eine Pharmafirma für eine gemeinsame Entwicklung gewonnen werden konnte.

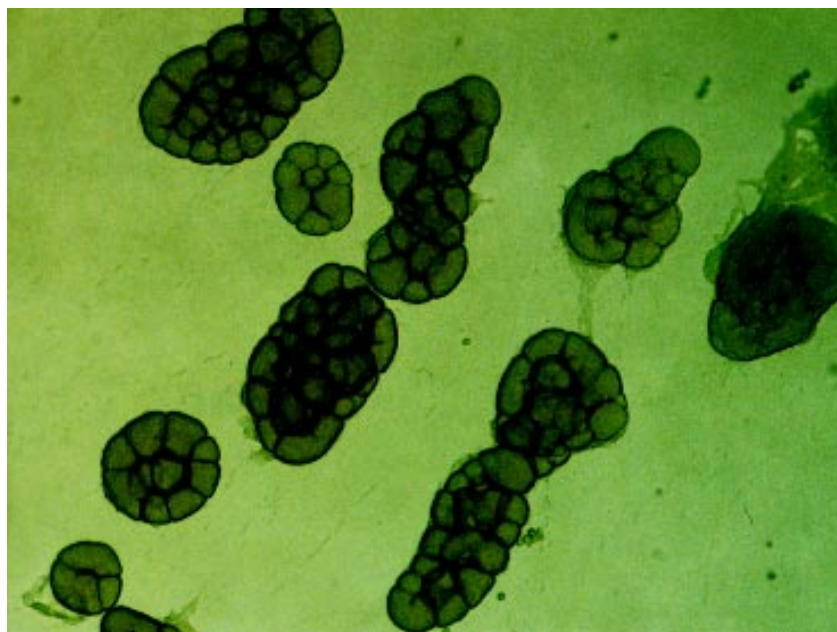
Epothilon wird entdeckt und auf praktische Anwendbarkeit geprüft

Die Entdeckung der Epothilone reicht zurück in das Frühjahr 1987, als der Mikrobiologe Klaus Gerth, ein Mitarbeiter der Abt. Naturstoffbiologie, Abt. NBI, neue Stämme des Myxobakteriums *Sorangium cellulosum* auf ihre antifungische Wirkung durchsuchte. Dabei fiel ein „So ce 90“ bezeichneter Stamm auf (Abb.1), den einige Jahre zuvor Hans Reichenbach, Leiter dieser Abteilung, aus einer am Ufer des Sambesi-Flusses gesammelten Erdprobe isoliert hatte. Erste

then accounts for the success and at the same time for the bad reputation of natural products? Natural products are a priori biologically active and their specific activity has been frequently optimized in the course of evolution to such a high level that they can be directly applied. Even in the case of an unfavourable activity profile or a lack of stability, ideal derivatives with a high market potential can be developed through semi-synthesis (penicillins) or totally synthetic analogues (strobilurins). Of disadvantage for natural products is the often difficult accessibility on a technical scale and the mostly complex structure with many stereocentres which make an application as lead structure difficult. Of disadvantage is also the occurrence of natural products in complex mixtures (crude extracts) which are not compatible with modern molecular test systems. Here, however, a change for the better is taking place: small libraries of (almost) pure natural products for easy introduction into a HTS system are obtained from crude extracts by automated chromatographic fractionation. These libraries are very welcome in HTS because the high hopes placed in the combinatorial synthesis in searching for new lead structures have not been realized. As far as natural product sources are concerned, in future, the focus will be on combinatorial biosynthesis in addition to the classical production organisms and the search for new groups of microorganisms.

Myxobacteria, a rich source of bioactive substances

The example of myxobacteria shows that substances worthy of development can also be obtained from a limited group of organisms hardly noticed before [1]. From approx. 100 new basic natural products isolated at GBF, about a dozen were intensively investigated by various industrial partners, and two of them actually reached industrial development: soraphen as a fungicide for plant protection [2a] and now epothilone as a cytostatic. Epothilone, which is currently in an early phase of clinical testing, will be the subject of this contribution [3]. Like many other natural products, the development of epothilone started rather sluggishly and was interrupted by prolonged breaks. And even after its true potential was recognized, it took more than one year to win a pharmaceutical company for joint development.



Epothilone is discovered and examined for practical applicability

The discovery of epothilones dates back to spring 1987 when the microbiologist Klaus Gerth, a staff member from the Dept. of Natural Product Biology (Dept. of NBI), screened new strains of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* for their antifungal effect. Attention was attracted by the strain designated "So ce 90" which Hans Reichenbach, head of this department, had isolated a few years earlier from a soil sample collected on the banks of the Zambezi river (Fig. 1). The first cultures landed in the Department of Natural Product Chemistry (Dept. of NCH), and were entrusted to the chemist Norbert Bedorf after it had been demonstrated that apparently hitherto unknown compounds were responsible for the effect. Within a few months, several new compounds were isolated from small fermenter batches and their structures elucidated. These were the later named epothilones A and B and spirangienes A-D [2b]. Dietmar Schomburg from the Department of Instrumental Analysis performed an X-ray structural analysis of the readily crystallizing epothilone B, which not only confirmed the structure but also

Abb. 1. *Sorangium cellulosum*, der Erfinder von Epothilone.

Fig. 1. *Sorangium cellulosum*, the inventor of epothilone.

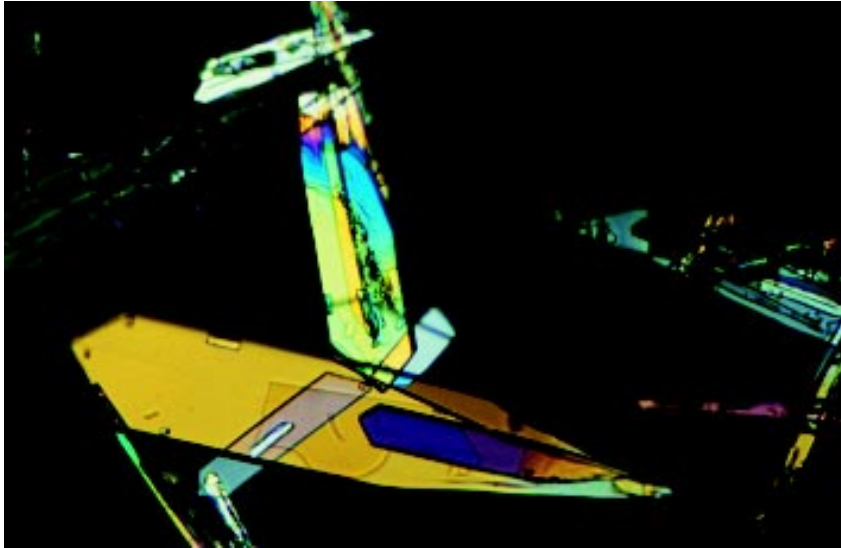


Abb. 2. Kristalle von Epothilone B.

Fig. 2. Crystals of epothilone B.

Kulturen kamen in die Abteilung Naturstoffchemie und, nachdem gezeigt war, dass offenbar neue Substanzen für die Wirkung verantwortlich waren, in die Hand des Chemikers Norbert Bedorf. Innerhalb weniger Monate wurden aus kleinen Fermenteransätzen mehrere Substanzen isoliert und in der Struktur aufgeklärt. Dies waren die später Epothilone A und B und Spirangien A-D genannten Verbindungen [2b]. Vom leicht kristallisierenden Epothilone B konnte Dietmar Schomburg, in der Abteilung Instrumentelle Analytik, eine Röntgenstrukturanalyse anfertigen, die nicht nur die Struktur bestätigte, sondern auch die Konfiguration der 6 Stereozentren aufklärte (Abb. 2/3). Als sichergestellt war, dass es sich um neuartige Naturstoffe handelte, wurde aus den funktionellen Gruppen Epoxyd, Thiazol und Keton der Trivialname Epothilone geprägt. Bei der genauen Untersuchung der antifungischen Eigenschaften dieser Verbindungen wurden auch andere biologische Eigenschaften erfaßt. So fand Florenz Sasse, Abt. NBI, dass nicht nur die Spirangiene sondern auch die Epothilone für tierische Zellkulturen eine beachtliche Toxizität aufwiesen. Diese Toxizität war für eine Anwendung im Pflanzenschutz eher hinderlich, für eine Anwendung als Antitumormittel erschien sie dagegen nicht ausreichend selektiv. So kam es, dass die Epothilone im Schatten der Entwicklung des Soraphens zum Pflanzenschutzmittel [2a] über 2 Jahre auf Eis gelegt und nicht eingehender untersucht wurden.

Die Industrie findet Interesse an Epothilone – und verliert es wieder

Erst Mitte 1991 fiel im Pflanzenschutzscreening der Ciba Geigy die selektive Wirkung gegen *Phytophthora* auf, ein immer noch gefürchteter Schadpilz, der u.a. für die Hungerkatastrophe im 19. Jahrhundert in Irland verantwortlich war. Parallel zu den nun folgenden Anwendungsprüfungen als Fungizid und einer Patentanmeldung [4], begann Michael Kiffe, Abt. NCH, im Frühjahr 1993 die chemischen Eigenschaften der Epothilone zu erkunden. Beides erforderte Nachschubfermentationen im größeren Maßstab, die in Zusammenarbeit der Abteilungen Naturstoffbiologie, Biotechnikum und Naturstoffchemie Gramm-Mengen der Epothilone Hauptkomponenten A und B lieferten. Die schwierige chromatographische Trennung der beiden Komponenten, die sich nur durch eine Methylgruppe unterscheiden, gelang Heinrich Steinmetz, der bis heute die Produktion der Epothilone in der Chemie betreut. Die Ergebnisse der ersten Derivatisierungen der Hydroxygruppen, der Ketogruppe, von Lacton und Epoxydring waren ernüchternd, denn keines der ca. 30 Derivate zeigte noch eine nennenswerte biologische Wirkung. Nachdem auch die Anwendungstests im Pflanzenschutz eine phytotoxische Nebenwirkung aufdeckten, wurde die weitere Bearbeitung der Epothilone für den Pflanzenschutz eingestellt.

Lediglich Untersuchungen der pharmakologischen Eigenschaften der Epothilone im Hinblick auf eine Pharmaanwendung wurden weitergeführt. Bereits bei sehr niedrigen Dosen wurde *in vitro* eine Hemmung der Lymphozytenproliferation festgestellt, die sich im Tierversuch als immunsuppressive Wirkung äußerte. Verglichen mit Cyclosporin, wiesen die Epothilone jedoch nur eine geringe Selektivität auf und wurden deshalb in dieser Hinsicht nicht weiter bearbeitet. Auch im Antitumorscreening des NCI (National Cancer Institute der USA) zeigten die Epothilone im 60 Zelllinien

elucidated the configuration of the six stereocentres (Fig. 2/3). After it had been ensured that a novel natural product was involved, the trivial name epothilone was derived from the functional groups epoxide, thiazole and ketone.

During an in depth investigation of the antifungal properties of these compounds, other biological properties were also discovered. For example, Florenz Sasse, Dept. of NBI, found that not only spirangienes but also epothilones exhibited a remarkable toxicity for animal cell cultures. This toxicity rather constituted an obstacle to application for plant protection, whereas it did not seem to be sufficiently selective for application as an antitumour agent. For this reason, epothilones were put on ice for more than two years in the shadow of the development of soraphen to a pesticide [2a] and not examined in more detail.

Industry is interested in epothilone – and loses interest again

It was not before mid-1991 that Ciba Geigy's plant protection department noticed the selective effect of epothilones against *phytophthora*, a still feared pathogenic fungus which was responsible, among other things, for the famine in Ireland in the 19th century. In parallel to subsequent application tests as a fungicide and to a patent application [4] Michael Kiffe, Dept. of NCH, started to explore the chemical properties of epothilones in spring 1993. Both required fresh supply fermentations on a larger scale, which provided gram amounts of the epothilone major components A and B in cooperation between the Departments of Natural Product Biology, Natural Product Chemistry and the Bio Pilot Plant. The difficult chromatographic separation of the two components, which only differ by a methyl group, was achieved by Heinrich Steinmetz who is still in charge of the production of epothilones in the chemistry department. The results of the first derivatizations of the hydroxy groups, of the keto group, of lactone and the epoxy ring were disappointing because none of the approx. 30 derivatives showed any appreciable biological effect. After the application tests of epothilone A and B in plant protection had also revealed a phytotoxic side effect, the further development of epothilones for plant protection was stopped.

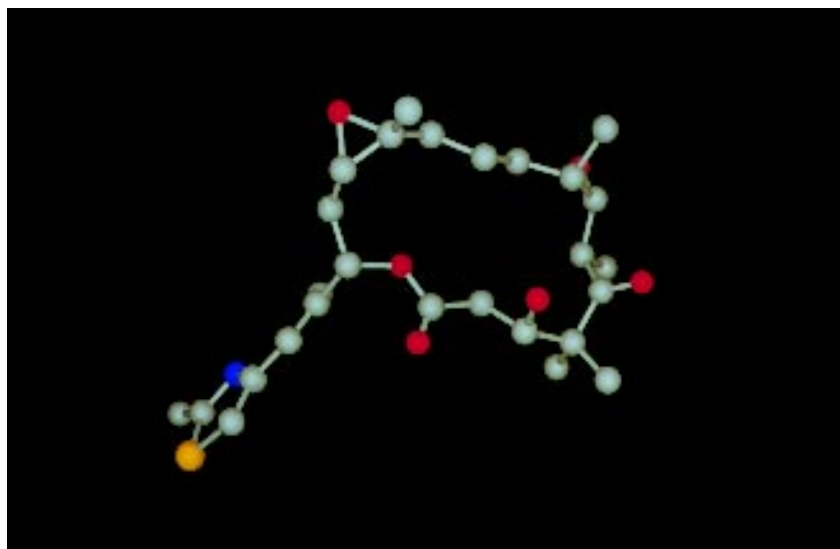


Abb. 3. Kristallstruktur von Epothilone B.

Fig. 3. Crystal structure of epothilone B.

Only investigations of the pharmacological properties of epothilones with a view to medicinal application were continued. An inhibition of lymphocyte proliferation was detected *in vitro* at very low concentrations, which manifested itself as an immunosuppressive effect in animal experiments. Compared to cyclosporin, however, epothilones only showed a low selectivity and were therefore no longer investigated in this respect. Similarly, in the antitumor screening of the NCI (National Cancer Institute, USA) epothilone showed good activity in the 60 cell line panel. However, it was not introduced in a more detailed study [5]. In this 1994 situation, who would have been interested in the mechanism of action of epothilones or even performed a test for a tubulin effect? At that time, epothilones were nothing more than a group of antifungal and toxic natural products apparently not suitable for application, as are described in large numbers in the literature.

Rediscovery and development as an anticancer drug

As chance would have it, at precisely that time a collection of 7,000 plant and microbial crude extracts were subjected to target-oriented screening in the Merck Sharp & Dohme research laboratories (MSD). The aim was to discover natural products inhibiting cell division in the same way as taxol, which was then the only substance known to exert this effect due to stabilization of microtubules and had just been registered as a cytostatic for the treatment of breast cancer. In this screening for taxol-mimics at MSD only one extract recovered from a *Sorangium cellulosum*

Panel zwar gute Wirkung, weiterführende Untersuchungen verliefen aber auch hier im Sande [5]. Wer hätte sich in dieser Situation 1994 für den Wirkmechanismus der Epothilone interessiert oder gar einen Test auf eine Tubulinwirkung durchgeführt? Waren die Epothilone damals doch nicht mehr als eine Gruppe von antifungischen und toxischen, für eine Anwendung offenbar nicht brauchbaren Naturstoffen, wie sie in großer Zahl in der Literatur beschrieben sind.

Wiederentdeckung und Entwicklung als Zytostatikum

Der Zufall wollte es, dass vermutlich eben zu dieser Zeit eine Kollektion von 7.000 pflanzlichen und mikrobiellen Rohextrakten in den Merck Sharp & Döhme Forschungslaboratorien (MSD) in ein Target-orientiertes Screening kam. Ziel war es dabei, Naturstoffe zu entdecken, die auf die gleiche Weise wie Taxol die Zellteilung hemmen. Taxol war damals die einzig bekannte Substanz, die diesen Effekt durch eine Stabilisierung der Tubulinstruktur auslöst und sie war kurz zuvor als Zytostatikum für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen worden. In diesem Screening nach Taxol-ähnlichen Verbindungen bei MSD erwies sich nur ein einziger, aus einem *Sorangium cellulosum*-Stamm gewonnener Extrakt aktiv (Abb. 4). Die für die Wirkung verantwortliche Substanz war rasch isoliert und als das von uns bereits zum Patent angemeldete Epothilon identifiziert. Sensationell an dieser Wiederentdeckung der Epothilone waren zwei Aspekte: es gab nun einen Naturstoff, der das inzwischen schon berühmte Taxol imitierte und sogar von der Bindestelle auf den Mikrotubuli verdrängen konnte und, noch bemerkenswerter, die Epothilonwirkung wurde durch die von Tumorzellen gegen Taxol und andere Zytostatika entwickelte Resistenz kaum beeinträchtigt. Diese von Bollag et al. [6] im Sommer 1995 publizierten Beobachtungen machten die Epothilone nahezu über Nacht weltweit bekannt und lösten vielfältige Aktivitäten aus.

Wir nahmen umgehend Kontakt mit deutschen Pharmafirmen auf, um einen Partner für eine gemeinsame Entwicklung zu finden, gleichzeitig lief die fermentative Herstellung und die chemische Derivatisierung der Epothilone wieder an. Andernorts wurde versucht mit spektroskopischen Methoden die relative Konfiguration der Stereozentren des Epothilons aufzuklären, um über eine Totalsynthese diese begehrten Verbindungen in die Hand zu bekommen. Wir haben schließlich Anfang Dezember 1995 begonnen die absolute Konfiguration der Epothilone und gelegentlich auch Informationen über die Reaktivität funktioneller Gruppen an interessierte Kollegen zu verbreiten [7], ein halbes Jahr später erschienen unsere Publikationen dazu [8]. Damit begann ein Wettlauf um die erste Totalsynthese der Epothilone, aus dem Ende 1996 kurz hintereinander die Arbeitsgruppen um Danishefsky (Sloan Kettering Cancer Research Centre, New York, USA), Nicolaou (Scripps Research Institute, La Jolla, USA) und Schinzer (damals Technische Universität Braunschweig) als erste Sieger hervorgingen [9a]. Damit war die Basis für eine von biologischen Quellen unabhängige breite Abwandlung der Grundstruktur und für *in vivo* Studien zur Antitumorwirkung geschaffen. Insbesondere aus den Arbeitskreisen Danishefsky und Nicolaou ging eine Flut von vielen hunderten, wenn nicht tausend Strukturanaloga hervor, von denen ein großer Teil in einem kombinatorischen Ansatz mit Hilfe von Chip-kodierten Minireaktoren gewonnen wurde [9a]. Weitere eigenständige und formale Totalsynthesen aus mehr als einem Dutzend Arbeitskreisen wurden bis heute publiziert. Nach und nach kristallisierten sich dabei die strategisch besten C,C-Verknüpfungen heraus, die in konvergenten Synthesen über linear mindestens 17 Stufen natürliche Epothilone und viele Strukturanaloga in Testmengen herzustellen erlaubten [9b]. Während in einigen Labors die Totalsynthese von Epothilonen zu einem technisch nutzbaren Verfahren optimiert wurde [10], haben wir in der GBF den Produktionsorganismus in einem Mutationsprogramm auf immer höhere Leistung und ein günstigeres Produktspek-

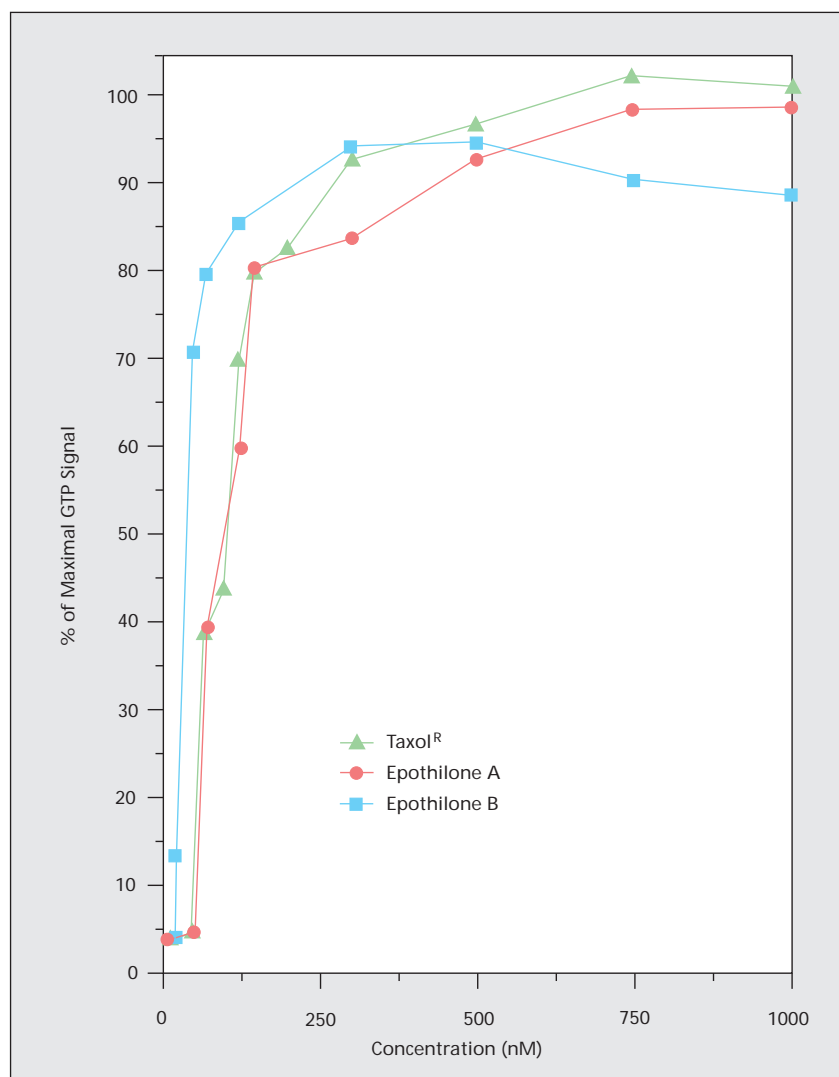
strain proved to be active (Fig. 4). The substance responsible for activity was rapidly isolated and identified as epothilone, for which we had already filed a patent application. Two aspects were sensational in this rediscovery of epothilones: a natural product had been found which was capable of imitating taxol and even displacing it from the binding site on the microtubules and, what was even more remarkable, epothilone activity was hardly impaired by the resistance to taxol and other cytostatics developed by tumour cells. These observations by Bollag et al. [6] published in summer 1995 made epothilones known worldwide nearly overnight and triggered a great many activities.

We immediately contacted German pharmaceutical companies in order to find a partner for joint development and simultaneously launched the fermentative production and chemical derivatization of epothilones again. Elsewhere, attempts were made to elucidate the relative configuration of the stereo-centres of epothilone in order to obtain these desirable compounds through a total synthesis. In early December 1995 we finally started to disclose the absolute configuration of epothilones and occasionally also information about the reactivity of functional groups to interested colleagues [7] and six months later our first publications appeared [8]. This initiated a race for the total synthesis of epothilones, from which the research groups around Danishefsky (Sloan Kettering Cancer Research Center, New York, USA), Nicolaou (Scripps Research Institute, La Jolla, USA) and Schinzer (then Technical University of Braunschweig) emerged as the first winners [9a]. This created the basis for a broad variation of the basic structure independent of biological sources and for *in vivo* studies on the antitumour effect. Especially Danishefsky's and Nicolaou's groups produced an abundance of many hundred, if not thousand structural analogues, of which a large portion was synthesized in a combinatorial approach with the aid of chip-coded microreactors [9a]. Further independent and formal total syntheses by more than a dozen international research groups have been published up to the present. The strategically best, C,C linkages gradually crystallized into convergent syntheses permitting the production of natural epothilones over linearly at least 17 steps and of many structural analogues in test amounts

[9b]. Whereas in some laboratories the total synthesis of epothilones has been developed into a process that can be technically utilized [10], we at GBF have trimmed the production organism in a mutation programme to increasingly higher performance and a more favourable product spectrum. By the end of 1998 more than 30,000 HPLC analyses had been carried out by Klaus Gerth, and the best strains were selected for further mutation. Together with Herbert Irschik and Roman Vetter, also microbiologists, the culture media and other culture conditions were optimized so that a technically useful production process was obtained. In the meantime, we had won an industrial partner, Bristol-Myers Squibb, (Princeton, USA), in May 1997 for the further development of epothilones. At this time, pure epothilones A and B were already available on the 30 g scale for biological testing and chemical derivatization. From the side-fractions collected during production (Fig. 6/7) Heinrich Steinmetz also succeeded in isolating the epothilone C and D,

Abb. 4. Effekt von Epothilon A und Epothilon B und Taxol® auf die Tubulin Polymerisation *in vitro* nach Bollag et al. [6].

Fig. 4. Effect of taxol, epothilone A and epothilone B on tubulin polymerization *in vitro* after Bollag et al. [6].

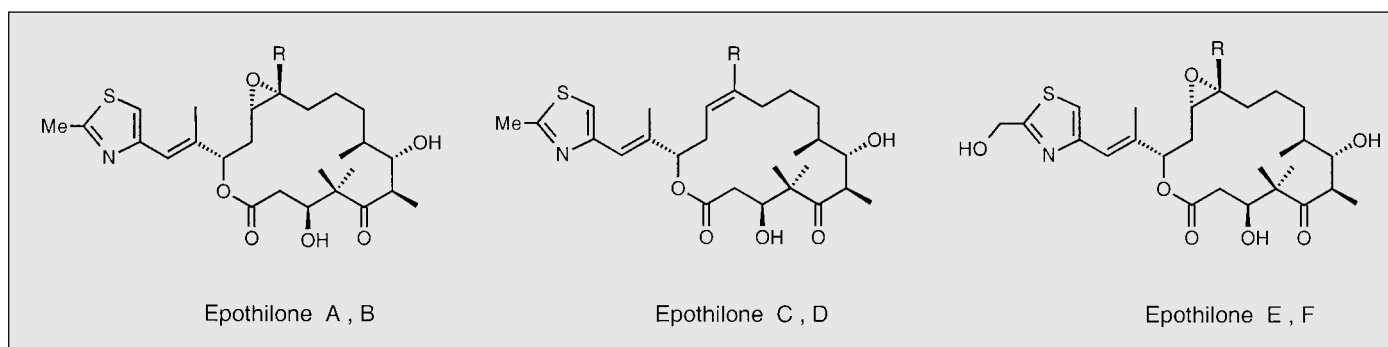


trum getrimmt. Bis Ende 1998 wurden dabei von Klaus Gerth über 30.000 HPLC-Analysen durchgeführt, und die jeweils besten Stämme für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Zusammen mit Herbert Irschik und Roman Vetter, ebenfalls Mikrobiologen, wurden auch die Nährmedien und andere Kulturbedingungen soweit optimiert, dass ein technisch nutzbares Herstellungsverfahren entstanden war. Inzwischen hatten wir im Mai 1997 mit Bristol-Myers Squibb, (Princeton, USA), einen Industriepartner für die weitere Entwicklung der Epothilone gewonnen. Bereits zu dieser Zeit waren reine Epothilone A und B im 30 g Maßstab für die biologische Prüfung und die chemische Derivatisierung verfügbar (Abb. 6/7). Aus den bei der Produktion anfallenden Randfraktionen konnte Heinrich Steinmetz auch die Biosynthesestufen Epothilon C und D sowie die ersten biologischen Abbauprodukte Epothilon E und F isolieren (Abb. 5) [2c]. Gut 30 weitere Neben- und Spurenkomponenten fielen Ingo Hardt bei HPLC-Trennungen von Randfraktionen in die Hand und wurden von ihm in der Struktur aufgeklärt [2c]. Sie erwiesen sich als Varianten mit einem unterschiedlichen Methylierungsmuster, einem verengten oder erweiterten Makrolidring oder einem Oxazolrings anstelle des Thiazolrings. Auch wenn die isolierbaren Mengen dieser Varianten vergleichsweise gering sind, haben selbst mg-Mengen einen unschätzbaren Wert für die Untersuchung der Strukturaktivitätsbeziehung, könnten diese

Verbindungen sonst doch nur in jeweils vielstufigen Totalsynthesen hergestellt werden. Daneben haben weitere Mitarbeiter der Abt. NCH bis heute die Chemie der Epothilone im Detail erkundet [11] und dabei über 200 Derivate hergestellt: Michael Sefkow untersuchte Reaktionen der beiden Hydroxygruppen, des Epoxids und die Metallierung im Thiazolrest, Dietmar Schummer die Abspaltung der Thiazolseitenkette, Thomas Leibold und Usama Karama ihren Wiederaufbau. Nicole Glaser bearbeitete die Synthese des N-Oxids, seine Polonovsky Umlagerung und Folgereaktion in der C-20 Position des Thiazolrings und der Autor schließlich wurde bei Bedarf für Synthesen in allen Regionen des Moleküls eingesetzt. Das Ergebnis dieser an der GBF und bei Bristol-Myers Squibb durchgeführten Derivatisierungsarbeiten zeigt, dass, entgegen der eingangs gemachten Erfahrungen, drei Regionen des Epothilon-Moleküls modifiziert werden können: Das Epoxid kann durch ein Cyclopropan, Aziridin, Episulfid oder eine cis-Doppelbindung, der Sauerstoff der Lacton-Gruppe durch Stickstoff und die Methylgruppe im Thiazolring durch eine Vielzahl anderer Substituenten ersetzt werden. Die meisten dieser Derivate verbinden eine hohe cytotoxische Aktivität mit veränderten pharmakologischen Eigenschaften. Beispielhaft seien hier die Synthese des 16-Aza-epothilon B (BMS 247550) von Vite et al. [12] und unsere Synthese von Epothilon F, einer zentralen Zwischenstufe zu C-20 Derivaten [13] vorgestellt.

Abb. 5. Die wichtigsten natürlichen Epothilone A, C, E: R = H
B, D, F: R = CH₃

Fig. 5. Epothilones A-F



biosynthesis precursors of A and B as well as the first biological degradation products, epothilones E and F (Fig. 5) [2c]. Approximately 30 further by-products and trace components were found by Ingo Hardt in HPCL separations of side-fractions and their structure was elucidated [2c]. They proved to be variations with a different methylation pattern, a contracted or expanded macrolide ring or an oxazole ring in place of the thiazole ring. Although the isolable amounts of these variants were comparatively small, even mg amounts were invaluable for investigating the structure-activity relationship because otherwise these compounds could only be produced in multi-step total syntheses. Apart from that, other staff members have meanwhile explored the chemistry of epothilones in detail [11] and produced more than 200 derivatives: Michael Sefkow examined reactions of the two hydroxy groups, of ketone and epoxide and the metalation in the thiazole residue. Dietmar Schummer studied the cleavage of the thiazole side-chain, Thomas Leibold and Usama Karama its reconstruction. Nicole Glaser worked on the synthesis of the N-oxide, its Polonovsky-type rearrangement and subsequent reactions in the C-20 position of the thiazole ring and the author finally was concerned with syntheses in all regions of the molecule, if required. The result of this derivatization work performed at GBF and Bristol-Myers Squibb shows that, contrary to initial experience, three regions of the epothilone molecule can be modified without loss of activity: the epoxide can be replaced by a cyclopropane, an aziridine, episulphide or a cis double bond, the oxygen of the lactone group by nitrogen, and the methyl group in the thiazole ring by a variety of other substituents. The majority of these derivatives combine a high cytotoxic activity with modified pharmacological properties. Examples are the synthesis of 16-aza-epothilone B (BMS 247550) by Vite et al. [12] and our synthesis of epothilone F, a central intermediate towards C-20 derivatives [13]. Key steps in these very short transformations are a palladium catalysed substitution of an allyl ester by azide with retention of configuration at C-15 resp. a Polonovsky-type rearrangement of a thiazole N-oxide intermediate with migration of the N-oxide oxygen to C-21 (Fig. 8 and 9).

Total synthesis or biosynthesis, that is the question!

Whereas for taxol a total synthesis is not economical due to the complex structure, several good total syntheses and two fermentation processes competing with them are meanwhile available for the production of

Abb. 6. Präparative Reversed-Phase Chromatographie zur Trennung von Epothilon A und B.

Fig. 6. Preparative separation of epothilones A and B by reversed-phase chromatography.



epothilones. After the trend had first favoured total synthesis, we at GBF from the very beginning envisaged a biological process for the basic products epothilone A and B. Since the development of soraphen we know that myxobacteria can be cultured and used for the production of secondary metabolites on a technical scale. This is also the case for epothilone. In conjunction with a few derivatization steps (see above) epothilones with high in vivo activity are obtained, so that the combined biological and chemical approach is clearly superior to the total syntheses available today. In the meantime,

Abb. 7. Eine 30 g Charge von Epothilon A.

Fig. 7. A 30 g batch of epothilone A.

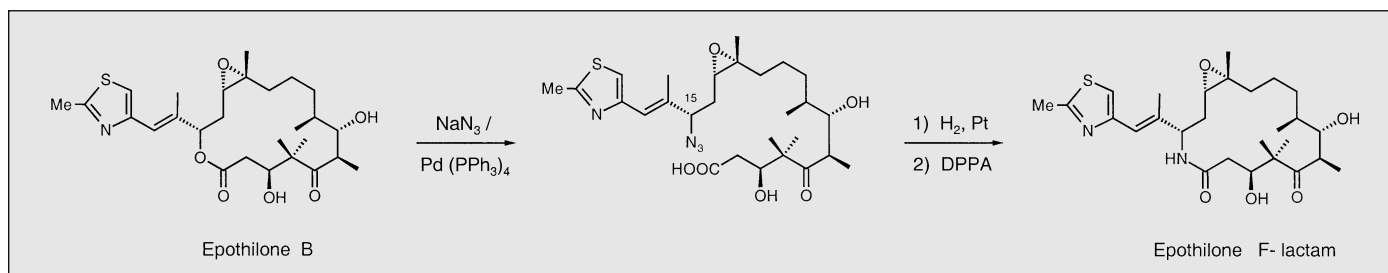


Abb. 8. Umwandlung von Epothilone B in Epothilone B-lactam nach Vite et al. [12].

Fig. 8. Conversion of epothilone B into 16-aza-epothilone B after Vite et al. [12].

Schlüsselschritte bei diesen sehr kurzen Synthesen sind eine Palladium-katalysierte Substitution des Allylesters durch Azid mit Retention der Konfiguration an C-15 bzw. eine Polonovsky-analoge Umlagerung einer Thiazol-N-oxid-Zwischenstufe, bei der der Sauerstoff des N-Oxids an das C-21 wandert (Abb. 8 und 9).

Totalsynthese oder Biosynthese, das ist die Frage!

Während beim Taxol eine Totalsynthese wegen der komplexen Struktur nicht wirtschaftlich ist, stehen für die Herstellung von Epothilonen inzwischen mehrere gute Totalsynthesen und in Konkurrenz dazu zwei Fermentationsverfahren zur Verfügung. Nachdem der Trend zunächst die Totalsynthese favorisierte, haben wir an der GBF von Anfang an für die Basisprodukte Epothilone A und B einen biologischen Prozeß vorgesehen. Seit der Entwicklung des Soraphens wissen wir, dass Myxobakterien auch im technischen Maßstab kultiviert und zur Produktion von Wirkstoffen eingesetzt werden können. Dies ist auch für Epothilone der Fall. In Verbindung mit wenigen Derivatisierungsschritten (s. oben) kommt man zu *in vivo* gut wirksamen Epothilonen, womit der kombinierte biologisch-chemische Weg den heute verfügbaren Totalsynthesen deutlich überlegen ist. Inzwischen geht auch die Novartis Pharma trotz anfänglich hoher Investitionen in die Totalsynthese diesen Weg und nutzt dabei den allgemein zugänglichen GBF-Patentstamm für die Herstellung von Epothilone A und B. Im Hinblick auf eine zukünftige Produktionsoptimierung wurden bei Novartis die Epothilone-Biosynthesegene dieses Stammes kloniert und sequenziert [14a, 2d]. Entsprechende Arbeiten wurden etwa zeitgleich von KOSAN Biosciences an dem von MSD benutzten *Sorangium cellulosum*

Stamm durchgeführt [14b]. Erwartungsgemäß sind die Sequenzen der 56 Kb (Kilobasen) großen Biosynthese-Genclustern nicht identisch, weisen jedoch eine sehr hohe Homologie von 99 % auf. Naheliegende Ziele sind nun, durch Genmanipulationen die Produktion von Epothilone B im Originalstamm und in z.B. rascher wachsenden Wirtstämmen zu steigern und durch Ausschaltung des für die Einführung des Epoxids zuständigen P450 Enzyms das für eine Anwendung interessante Epothilone D (= Desoxyepothilone B) zu gewinnen. Ein ferner liegendes Ziel ist, die Biosynthesegene tiefgreifend zu modifizieren und durch Einbau von Fremdgenen im Sinne einer kombinatorischen Biosynthese zu neuartigen Epothilonen mit möglicherweise nützlichen Eigenschaften zu kommen.

Sind Epothilone brauchbare Zytostatika?

Die in die Epothilone gesetzten Hoffnungen basierten zunächst hauptsächlich auf dem Wirkmechanismus und den *in vitro* Eigenschaften. Einmal war das therapeutische Prinzip der Tumorbekämpfung über eine Tubulin-Stabilisierung durch den klinischen Erfolg des Taxols bereits etabliert, zum anderen, im Falle multi-resistenter Tumore, sogar eine deutliche Überlegenheit der Epothilone zu erwarten. Erste *in vivo* Studien wurden von Danishefsky et al. bereits 1997 mit totalsynthetischem Epothilone B durchgeführt [15]. Dabei zeigte diese von allen Epothilonen aktivste Variante bei der Behandlung von sensitiven und

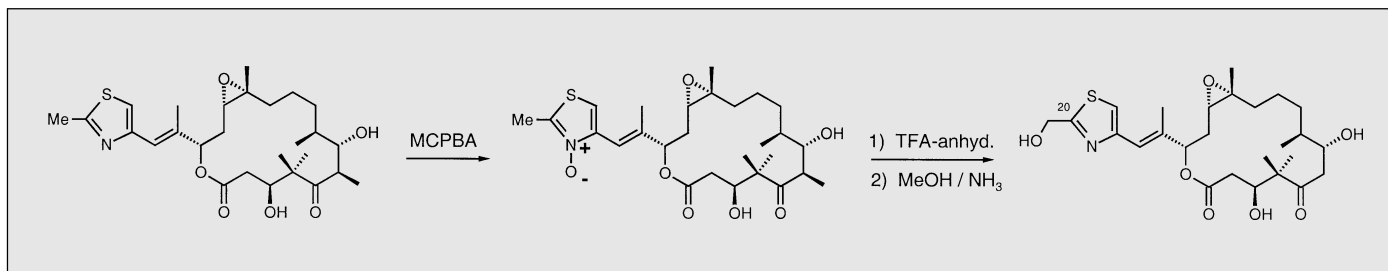


Abb. 9. Synthese von Epothilone F aus Epothilone B.

Fig. 9. Synthesis of epothilone F from epothilone B.

Novartis Pharma also follows this route in spite of initially high investments in total synthesis and uses the freely available GBF patent strain for the production of epothilones A and B. With a view to future production optimization Novartis cloned and sequenced the epothilone biosynthesis genes of this strain [14a, 2d]. Analogous work was carried out approximately at the same time by KOSAN Biosciences on the *Sorangium cellulosum* strain used by MSD [14b]. As expected, the sequences of the 56 kb (kilobase) large biosynthesis gene clusters are not identical, but show a very high homology of 99 %. Near-term aims are now to increase the production of epothilone B by genetic manipulations in the original strain and in e.g. faster growing host strains and to produce epothilone D (= desoxyepothilone B), which is of interest for application, by eliminating the P450 enzyme responsible for the introduction of the epoxide. A more distant aim is the in-depth modification of the biosynthesis genes and the production of novel epothilones with potentially useful properties by the incorporation of foreign genes in the sense of a combinatorial biosynthesis.

Are epothilones suitable anticancer agents?

The hopes placed in epothilones were initially based mainly on the mechanism of action and the in vitro properties. On the one hand, the therapeutic principle of combating tumours through tubulin stabilization had been established by the clinical success of taxol and, on the other hand, a clear superiority of epothilones was even to be expected in the case of multiresistant tumours. The first in vivo studies with totally synthetic epothilone B were conducted in 1997 by Danishefsky et al. [15]. It was found that this most active variant of all epothilones showed a clearly better effect than taxol in the treatment of sensitive and multiresistant human mammary carcinomas in nude mice (xenograft model). However, alarming side effects were also

observed indicating a very small therapeutic range. Further studies on a broader basis were performed later by Novartis Pharma. Good therapeutic effects, in part up to the remission of the tumour, were found during repeated intravenous applications of epothilone B [16]. On the basis of these results clinical studies (phase I) were commenced early this year. A number of patent applications of synthetic epothilone analogs indicate that also Schering AG is preparing a clinical study of an own candidate.

Danishefsky et al. already demonstrated in 1998 on totally synthesized epothilone D (desoxyepothilone B) that even epothilones with clearly weaker in vitro activity can also develop advantageous in vivo properties [17] (Fig. 10). In vitro 20 to 40 times less active, it has to be larger-dosed, but then also exhibits a good activity and is clearly better tolerated than epothilone B. At present, a clinical study with synthetic epothilone D is in preparation to commence early next year.

Some of the semisynthetic epothilones produced by us and by Bristol-Myers Squibb showed also promising properties in preclinical studies. Epothilone B-lactam (BMS-247550), which is obtainable in a few steps from the natural product, was selected early this year for clinical studies in cooperation with the NCI [12]. At present, this derivative is on the road to a phase II study in which an effect on selected tumours in man may be demonstrated for the first time.

Should this be the case, several years will again elapse and a number of additional hurdles have to be taken until epothilone can really be applied in clinical practice. Last, but not least in the interest of the many sufferers from cancer it may benefit, we hope that after many ups and downs epothilone will become a useful medicine. Until then, we would rather reverse the proverb cited at the beginning and hope that a fortunate outcome is worth waiting for.

Abb. 10. Therapeutischer Effekt von Epothilon D, Taxol® und Adriamycin gegen ein menschliches Mammakarzinom-Xenograft in der Nacktmaus (i.p. Gaben Tag 8, 10, 12, 14 und 16 nach Transplantation) nach Chou et al. [17].

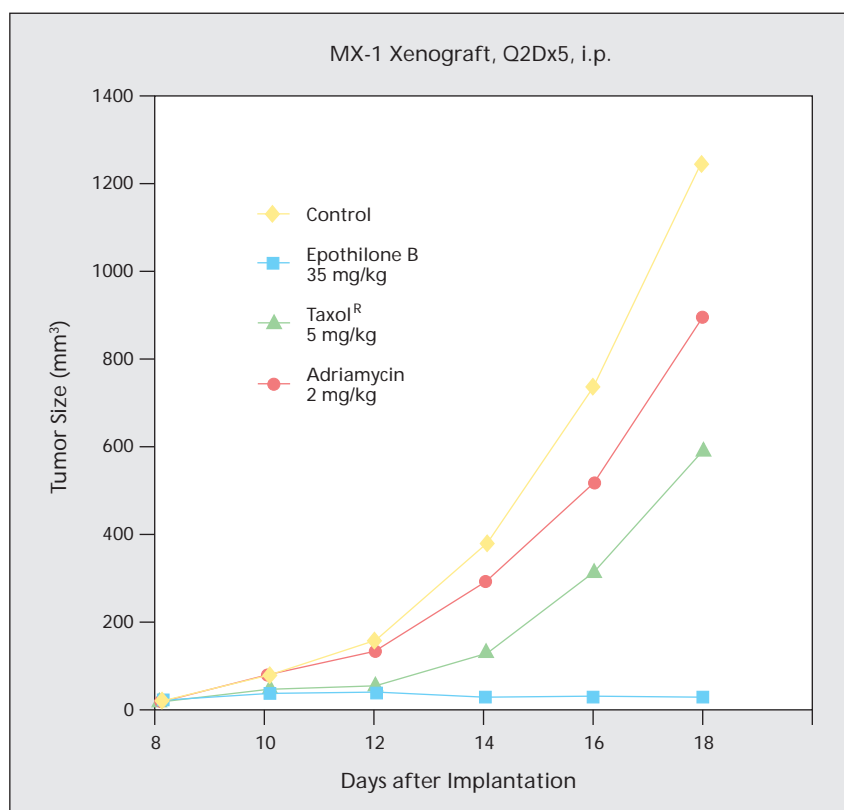
Fig. 10. Therapeutic effect of epothilone D, taxol® and adriamycin on a human mammary carcinoma xenograft in nude mice (i.p. doses at days 8, 10, 12, 14 and 16 after transplantation) after Chou et al. [17].

multiresistenten menschlichen Mammakarzinomen in der Nacktmaus (Xenograft-Modell) eine deutlich bessere Wirkung als Taxol. Allerdings wurden auch bedenkliche Nebenwirkungen beobachtet, die auf eine sehr geringe therapeutische Breite hinwiesen. Weitere Studien auf einer breiteren Basis wurden später bei der Novartis Pharma durchgeführt. Dabei wurden bei wiederholter intravenöser Applikation von Epothilon B gute therapeutische Effekte, teilweise bis zum Verschwinden des Tumors gefunden [16]. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde

Anfang dieses Jahres mit klinischen Studien (Phase I) begonnen. Zahlreiche Patentanmeldungen synthetischer Epothilonanaloga deuten darauf hin, dass auch die Schering AG klinische Studien eines eigenen Kandidaten anstrebt.

Dass auch *in vitro* deutlich schwächer wirksame Epothilone vorteilhafte *in vivo* Eigenschaften entfalten können, zeigten Danishefsky et al. bereits 1998 am totalsynthetischen Epothilon D (Desoxyepothilon B) [17]. *In vitro* 20 bis 40 mal weniger aktiv, muß es zwar höher dosiert werden, weist aber dann ebenfalls eine gute Wirkung bei deutlich besserer Verträglichkeit auf (Abb. 10). Gegenwärtig wird eine klinische Studie mit synthetischem Epothilon D vorbereitet, die Anfang nächsten Jahres beginnen soll.

Von den bei uns und bei Bristol-Myers Squibb hergestellten semi-synthetischen Epothilonen zeigten einige in vor-klinischen Studien ebenfalls erfolgsversprechende Eigenschaften. Für klinische Studien in Zusammenarbeit mit dem NCI wurde Anfang des Jahres das in wenigen Schritten aus dem Naturstoff zugängliche Epothilon B-lactam (BMS-247550) [12] ausgewählt. Gegenwärtig befindet sich dieses Derivat auf dem Weg in eine Phase II Studie, in der sich erstmals eine Wirkung auf ausgewählte Tumore beim Menschen zeigen könnte. Sollte dies der Fall sein, vergehen trotzdem noch einige Jahre und müssen eine Reihe von weiteren Hürden überwunden werden, bis Epothilon tatsächlich in die klinische Anwendung kommen kann. Nicht zuletzt im Interesse von vielen leidenden Menschen hoffen wir, dass nach wechselvoller Geschichte und langer Entwicklungszeit aus Epothilon ein nützliches Medikament wird. Bis dahin halten wir uns an die Umkehrung des eingangs zitierten Sprichwortes, und hoffen, „Was lange währt, wird endlich gut“.



References | Literatur

- [1] H. Reichenbach, G. Höfle, in: *Drug Discovery from Nature* (Grabley, S., R. Thiericke, eds.), Springer Verlag, 1999, 149-177
- [2] *Wiss. Ergebnisberichte der GBF*: a) 1994, 5-20; b) 1991, 65-67; c) 1997, 96-97; d) 1998, 33-34
- [3] Für einen früheren Review über Epothilon von H. Reichenbach siehe: *Wiss. Ergebnisbericht der GBF* 1996, 25-30
- [4] G. Höfle, N. Bedorf, K. Gerth, H. Reichenbach, *Chem. Abstr.* **119** (1993) 1805981
- [5] Das COMPARE Computerprogramm mit dem in der NCI Datenbank Substanzen mit verwandten Wirkmechanismen aufgespürt werden können, stand damals noch nicht zu Verfügung. Heute kann mit dem alten Datensatz sehr rasch Taxol^R als nächster Verwandter der Epothilone identifiziert werden.
At that time the COMPARE computer programme at the NCI was not yet available. Today this programme allows on the basis of the original data to identify taxol^R as the closest relative of the epothilones.
- [6] D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Z. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **55** (1995) 2325-2333
- [7] Neben anderen an Prof. S. Danishefsky, Prof. J. Mulzer und Prof. D. Schinzer, sowie Prof. K. G. Nicolaou anlässlich seines Besuches in der GBF im April 1996.
- [8] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chem.* **108** (1996) 1671-1673; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35** (1996) 1567-1569; K. Gerth, N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot.* **49** (1996) 560-563
- [9] Vgl. z. B. a) K.C. Nicolaou, F. Roschangar, D. Vourloumis, *Angew. Chem.* **110** (1998) 2120-2153, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37** (1998) 2014-2045; b) J. Mulzer, *Monatshefte für Chemie* **131** (2000) 205-238
- [10] M. D. Chappell, S. J. Stachel, C. B. Lee, S. J. Danishefsky, *Org. Lett.* **2** (11), (2000) 1633-1636 und dort zitierte Literatur
- [11] Vgl. z. B. G. Höfle, N. Glaser, T. Leibold, M. Sefkow, *Pure Appl. Chem.* **71** (2000) 2019-2024
- [12] G. Vite et al., 219th ACS National Meeting, San Francisco, 26. - 30. März 2000
- [13] G. Höfle, N. Glaser, M. Kiffe, H.-J. Hecht, F. Sasse, H. Reichenbach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1971-1974
- [14] I. Molnar, T. Schupp, M. Ono, R. E. Zirkle, M. Milnamow, B. Nowak-Thompson, N. Engel, C. Toupet, A. Stratmann, D. D. Cyr, J. Gorlach, J. M. Mayo, A. Hu, S. Goff, J. Schmid, J. M. Ligon, *Chem. Biol.* **7** (2000) 97-109; b) L. Tang, S. L. Chung, J. Carney, L. Katz, C. Khosla, B. Julien, *Science* **287** (2000) 640-642
- [15] D.-S. Su, A. Balog, D. Meng, P. Bertinato, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Angew. Chem.* **109** (1997) 2178-2180; D.-S. Su, A. Balog, D. Meng, P. Bertinato, S. J. Danishefsky, Y.-H. Zheng, T.-C. Chou, L. He, S. B. Horwitz, *Angew. Chem.* **109** (1997) 2178-2180
- [16] K.-H. Altmann, M. Wartmann, T. O'Reilly, *Biochim. Biophys. Acta* **1470** (2000) M79-M91
- [17] T.-C. Chou, X.-G. Zhang, A. Balog, D.-S. Su, D. Meng, K. Savin, J. R. Bertino, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 9642-9647; T.-C. Chou, X.-G. Zhang, Ch. R. Harris, S. D. Kuduk, A. Balog, K. A. Savin, J. R. Bertino, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** (1998) 15798-15802



Biologisch abbaubare Polymere

Rolf-Joachim Müller¹, Wolf-Dieter Deckwer¹

Einleitung

Die Natur kennt keinen Müll. Seit Millionen von Jahren funktioniert auf der Erde ein (fast) ideales Kreislaufsystem: Pflanzen bauen mit Hilfe der Sonnenenergie komplexe Substanzen wie beispielsweise Cellulose auf, tierische Lebewesen bauen diese um und Mikroorganismen bauen sie letztendlich wieder zu den Ausgangsstoffen pflanzlicher Synthesen ab.

Das änderte sich jedoch, als der Mensch mit Hilfe der modernen Chemie anfangs selber neue Molekülstrukturen herzustellen. Für viele dieser anthropogenen Verbindungen hatten die für die „Entsorgung“ zuständigen Mikroorganismen keine geeigneten Enzymsysteme entwickeln können; also blieben diese neuen Substanzen liegen und fingen an sich in der Umwelt anzusammeln. Eine besonders erfolgreiche Gruppe neuer chemisch-synthetischer Substanzen stellen die Kunststoffe dar. Seit den wegweisenden Arbeiten von Hermann Staudinger zu Beginn dieses Jahrhunderts sind polymere Werkstoffe (= „Kunststoffe“) zu wahren High-Tech-Materialien avanciert, die einen maßgeblichen Beitrag zu fast allen heutigen technischen Entwicklungen leisten (Luft- und Raumfahrt, Verkehr, Informationstechnik, Verpackungen etc.). Die universelle Anwendung, verbunden mit der „Unverwüstbarkeit“ der Kunststoffe, hat aber auch nachteilige Folgen – Kunststoffe, insbesondere aus kurzlebigen Verpackungen, werden mehr und mehr zu einem Entsorgungsproblem.

Als Alternative zum nur eingeschränkt sinnvollen Kunststoffrecycling oder der öffentlich sehr umstrittenen Müllverbrennung wurden seit Anfang der 90er Jahre intensive Bemühungen unternommen neue Kunststoffe zu entwickeln, die biologisch abbaubar sind und so etwa durch Kompostierung entsorgt werden können [1]. Die Relevanz der Problematik dokumentierte sich auch in den staatlichen Forschungsprogrammen; so wurde bereits im Förderprogramm „Biotechnologie 2000“ des BMFT im Jahr 1992 explizit die Entwicklung mikrobiell erzeugter, bioabbaubarer polymerer Werkstoffe (BAW) als Forschungsziel genannt, dem viele andere Programme auf Länder- und Bundesebene sowie im europäischen Rahmen folgten.

In der Arbeitsgruppe Umweltbioverfahrenstechnik des Bereiches Bioverfahrenstechnik werden seit nunmehr 10 Jahren Arbeiten zur Thematik bioabbaubarer Kunststoffe durchgeführt. Zentrale Fragestellung ist hierbei, warum nur ganz bestimmte Polymerstrukturen biologisch angreifbar sind und wie der Mechanismus des Bioabbaus der teilweise sehr komplexen BAWs abläuft. Die Untersuchungen an der GBF in diesem typisch interdisziplinären Bereich umfassen:

- die Entwicklung und Optimierung geeigneter Testsysteme,
- die Isolierung abbauender Mikroorganismen
- die Gewinnung, Charakterisierung und genetische Bearbeitung der

Biologically degradable polymers

Introduction

Refuse is unknown to nature. For millions of years, an (almost) ideal recycling system has functioned on earth: plants build up complex substances such as cellulose with the aid of solar energy, living animal organisms transform these substances, and microorganisms ultimately degrade them again into the starting substances of plant synthesis.

This changed, however, when humans started to produce new molecular structures themselves using modern chemistry. For many of these anthropogenic compounds, the microorganisms responsible for “disposal” had not been able to develop suitable enzyme system, so that these new substances began to accumulate in the environment. Plastics are a particularly successful group of new substances produced by chemical synthesis. Since the pioneering studies by Hermann Staudinger at the beginning of the 20th century, polymeric materials (= “plastics”) have been promoted to true high-tech materials which make a decisive contribution to nearly all present-day technical developments (aerospace engineering, transport, information technology, packaging etc.). The universal application in conjunction with the “indestructibility” of plastics, however, also has adverse consequences – plastics, especially from short-lived packaging, are more and more becoming a disposal problem.

As an alternative to plastics recycling, which is only meaningful to a limited extent, or to refuse incineration, which is a matter of great controversy among the general public, intensive efforts have been made since the beginning of the nineties to develop new plastics that are biologically degradable and can thus be disposed of, for example, by composting [1]. The relevance of the problems involved is also documented in the Government’s research programmes; thus, the “Biotechnology 2000” programme funded by the Federal Ministry of Research and

Technology in 1992 already explicitly mentioned the development of microbially produced, biodegradable polymeric materials as a research goal, which was followed by many other programmes at federal state and government level as well as on a European scale.

The Environmental Biochemical Engineering research group of the Biochemical Engineering Division has been working on biodegradable plastics for ten years now. The central question is: why can only very specific polymer structures be biologically attacked and how does the mechanism of biodegradation proceed for the in part very complex biodegradable materials. The investigations at GBF in this typically interdisciplinary area comprise:

- the development and optimisation of suitable test systems
- the isolation of degrading microorganisms
- the recovery, characterisation and genetic engineering of the corresponding enzymes
- degradation studies on specially synthesised and characterised polymers and low-molecular model substances
- investigations into the degradation mechanism including the identification of degradation intermediates

The basic findings obtained from this work form the basis for a number of practically relevant developments:

- optimisation of standardised test procedures and formulation of science-based evaluation criteria for biodegradable materials within the framework of national and international standardisation bodies;
- design of new biodegradable materials which combine biodegradability with good material properties;
- assessment of the environmental conformity of biodegradable materials with respect to possible persistent or toxic degradation intermediates.

- entsprechenden Enzyme
- Abbauproduktuntersuchungen an speziell synthetisierten und charakterisierten Polymeren und niedermolekularen Modellsubstanzen
 - Untersuchungen zum Abbaumechanismus einschließlich der Identifizierung von Abbauprodukten.

Die aus den Arbeiten gewonnenen grundlegenden Erkenntnisse bilden die Basis für eine Reihe praktisch relevanter Entwicklungen:

- Optimierung von standardisierten Testverfahren und Formulierung wissenschaftlich basierter Bewertungskriterien für bioabbaubare Werkstoffe im Rahmen nationaler und internationaler Normungsgremien.
- gezieltes Design neuer BAWs, die Bioabbaubarkeit mit guten Materialeigenschaften verbinden.
- Bewertung der Umweltkonformität von BAWs in Hinsicht auf eventuelle persistente oder toxische Abbauprodukte.

Allgemeiner Mechanismus

Technische Kunststoffe stellen in der Regel ein Gemisch verschiedener Substanzen dar. Neben den eigentlichen gerüstbildenden Makromolekülen (Polymeren) enthalten die Materialien verschiedene niedermolekulare Stoffe, wie etwa Weichmacher oder Verarbeitungshilfsmittel. Auch bei den hochmolekularen Stoffen selber werden manchmal Mischungen verschiedener Polymere (Blends) verwendet oder aber die Polymere sind aus

verschiedenen Bausteinen aufgebaut und enthalten in den Molekülketten Bereiche unterschiedlicher Strukturen (Copolymere).

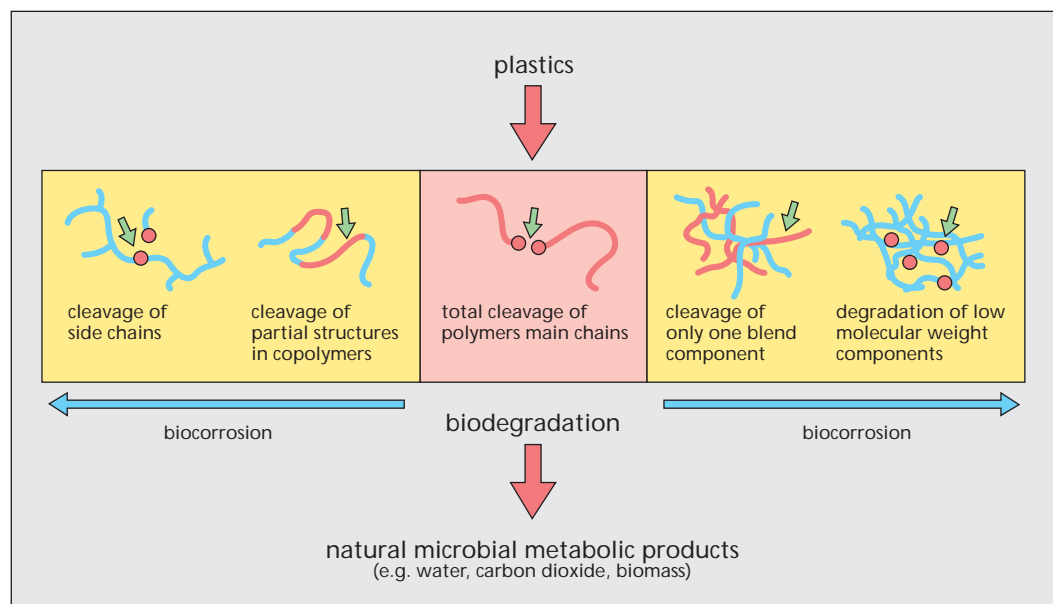
Dass Kunststoffe durch Mikroorganismen angegriffen werden können, weiß man schon seit vielen Jahren. Die „Biokorrosion“ von herkömmlichen Kunststoffen kann zu unerwünschten Veränderungen der Materialeigenschaften (beispielsweise Verfärbung oder Versprödung) führen. Bei Biokorrosionserscheinungen wird häufig nur ein Teil des Kunststoff-Materials durch die Mikroorganismen genutzt (beispielsweise niedermolekulare Weichmacher bei Polyvinylchlorid (PVC), Polymerseitenketten, Teilbereiche in Copolymeren oder Blends), was zu einer Versprödung und einem optischen Zerfall des Materials führen kann (Abb. 1).

Sollen Mikroorganismen jedoch unter anderem dazu dienen Kunststoffabfälle zu entsorgen, darf der „Bioabbau“ nicht nur in einem physikalischen Zerfall des Materials zu kleineren, nicht mehr sichtbaren Fragmenten bestehen, sondern alle niedermolekularen und hochmolekularen Komponenten müssen von den Organismen verdaut und so letztendlich zu Wasser, Kohlendioxid und anderen natürlichen Stoffwechselprodukten umgewandelt werden (Metabolisierung) (Abb. 2).

Da Kunststoffe in der Regel nicht wasserlöslich und deren polymere Bestandteile zu groß sind, um die Zellmembranen der Mikroorganismen zu

Abb. 1. Mögliche Angriffspunkte des biologischen Kunststoffabbaus

Fig. 1. Possible points of attack for the biodegradation of plastics



General mechanism

Technical plastics are generally a mixture of various substances. In addition to the actual backbone-forming macromolecules (polymers) the materials contain various low-molecular substances such as plasticizers or processing aids. For the high-molecular substances themselves, mixtures of different polymers (blends) are sometimes also used or the polymers are built up of different components and contain regions of different structures (copolymers) in the molecular chains.

It has been known for many years that plastics can be attacked by microorganisms. The "biocorrosion" of conventional plastics can lead to undesirable changes of the material properties (e.g. discoloration or embrittlement). In the case of biocorrosion phenomena, often only part of the plastic material is used by the microorganisms (e.g. low-molecular plasticizers in polyvinyl chloride (PVC), polymer side chains, subregions in copolymers or blends), which can lead to embrittlement or optical decomposition of the material (Fig. 1).

If microorganisms are intended, however, to be used for the disposal of plastic waste, "biodegradation" must not only consist in a physical decomposition of the material into smaller, no longer visible fragments, but all low-molecular and high-molecular components must be digested by the organisms and thus ultimately transformed into water,

carbon dioxide and other natural metabolites (metabolization) (Fig. 2).

Since plastics are generally not soluble in water and their polymeric constituents are too large to pass through the cell membranes of the microorganisms, the organisms must excrete enzymes from the cells and first reduce the chain length of the polymers until these are water-soluble. The dissolved intermediates can then be taken up by the cells and further metabolised there. Since the enzymes in turn cannot penetrate into the plastics due to their size, biodegradation is an interfacial process and the material is gradually removed from the surface (surface erosion).

In the case of unsuitable "biodegradable" plastics, ecologically problematic effects may be caused by the initial disintegration of the generally water-insoluble and nontoxic plastics into small, soluble and thus mobile fragments. Parts of these fragments can have such a structure that they cannot be further metabolised by microorganisms and accumulate in the environment during prolonged use of such plastics, or toxic intermediates may even be produced.

Added to the special aspects of "plastic" as a polymeric substrate are here of course the normal dependencies of microbial activities on environmental conditions such as oxygen supply, moisture and the availability of additional nutrients. On the whole, the biological degradation of plastics is a very

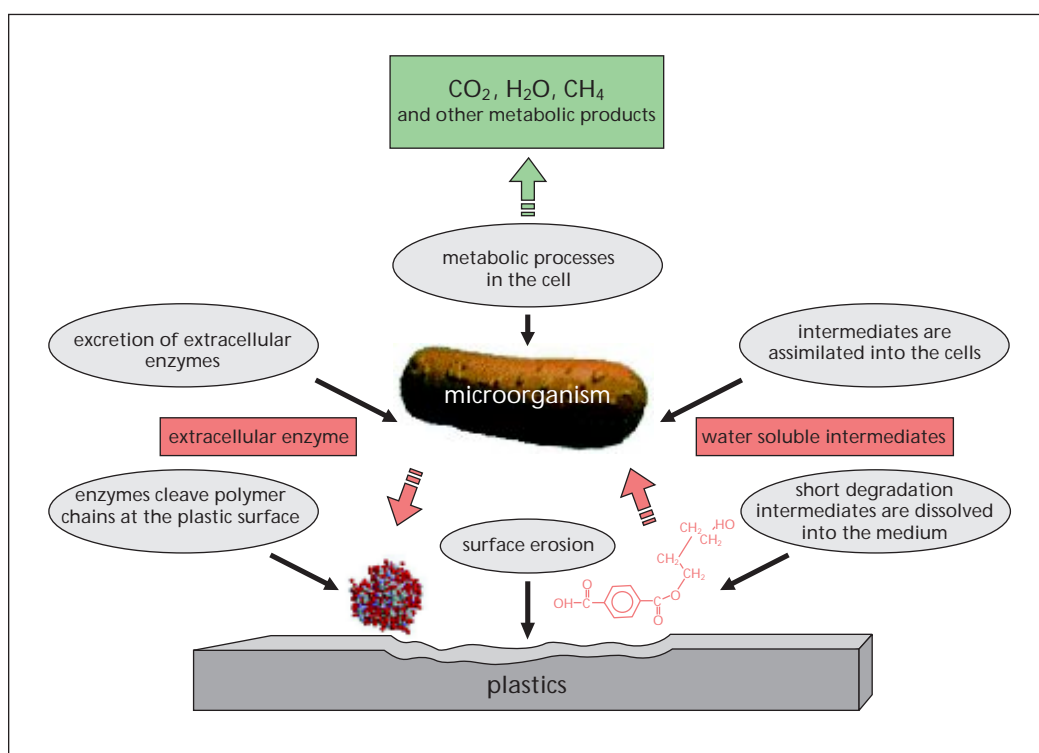


Abb.2. Prinzipieller Mechanismus des heterogenen Kunststoffabbaus; Interaktion von Wachstum und Polymerabbau

Fig. 2. Basic mechanism of heterogeneous plastics degradation; interaction of growth and polymer degradation

passieren, müssen die Organismen Enzyme aus den Zellen ausscheiden und zunächst die Kettenlänge der Polymere soweit reduzieren, bis diese wasserlöslich sind. Die gelösten Zwischenprodukte können dann in die Zellen aufgenommen und dort innerhalb der Stoffwechsellvorgänge weiter umgesetzt werden. Da die Enzyme wiederum aufgrund ihrer Größe nicht in die Kunststoffe eindringen können, stellt der Bioabbau einen Grenzflächenprozess dar und das Material wird nach und nach von der Oberfläche her abgetragen (Oberflächenerosion).

Bei ungeeigneten „bioabbaubaren“ Kunststoffen kann es durch die anfängliche Zerlegung der in der Regel nicht wasserlöslichen und nicht toxischen Kunststoffe in kleine, lösliche und damit mobile Bruchstücke unter Umständen zu ökologisch problematischen Effekten kommen. Teile dieser Bruchstücke können eine derartige Struktur besitzen, dass sie durch Mikroorganismen nicht weiter umgesetzt werden und sich bei längerfristigem Einsatz solcher Kunststoffe in der Umwelt anreichern oder sogar toxische Zwischenprodukte entstehen können.

Zusätzlich zu den speziellen Aspekten des polymeren Substrats „Kunststoff“ kommen hier natürlich die normalen Abhängigkeiten mikrobieller Aktivitäten von Umgebungsbedingungen wie Sauerstoffversorgung, Feuchtigkeit und die Verfügbarkeit zusätzlicher Nährstoffe hinzu. Insgesamt stellt sich der biologische Abbau von Kunststoffen als ein sehr komplexer Prozess dar und eine in Hinblick auf die Umweltsicherheit gerichtete Beurteilung dieser neuen Materialien erfordert relativ umfangreiche Untersuchungen. Hinzu kommt, dass in der Praxis oft auch abiotische Prozesse mit an den Abbauvorgängen beteiligt sind. So können Oxidation durch Sauerstoff, Einwirkung von Sonnenlicht oder aber chemische Hydrolyse durch eindiffundiertes Wasser wesentlich zur Spaltung der Polymerketten beitragen. Teilweise werden solche Reaktionen auch bewusst für biologisch abbaubare Kunststoffe genutzt (beispielsweise photoabbaubares Polyethylen oder primäre Hydrolyse von Polymilchsäure).

Grundsätzlich entscheidet allein die Struktur der Polymere über deren Angreif-

barkeit durch Enzyme und nicht etwa die Herkunft der Ausgangsmaterialien. So könnte man zunächst glauben, dass Polymere, die aus natürlichen Rohstoffen hergestellt werden, immer biologisch abbaubar und solche, die aus petrochemisch erzeugten Komponenten synthetisiert werden, biologisch inert sind. Diese Annahme ist jedoch nicht richtig. Zwar sind chemisch nicht veränderte natürliche Polymere wie etwa Cellulose, Stärke oder Proteine grundsätzlich biologisch abbaubar, aber durch chemische Modifizierungen (beispielsweise Veresterung zu Cellulosetriacetat) oder aber bei der Polymerisation natürlicher Monomere (beispielsweise Milchsäure) können Polymere entstehen, die durch Enzyme nicht mehr spaltbar sind. Auf der anderen Seite existieren eine Reihe von nachweislich bioabbaubaren Kunststoffen, die vollständig aus Substanzen der Petrochemie hergestellt werden (beispielsweise verschiedene Polyester, Polyesteramide, Polyesterurethane). Die Themengebiete „Bioabbaubarkeit“ und „nachwachsende Rohstoffe“ sind deshalb unbedingt differenziert zu betrachten.

Für die derzeit anwendungsreifen biologisch abbaubaren Kunststoffe kann man die Art der Rohstoffe in vier Bereiche gliedern (Abb. 3):

1. Natürliche Polymere
2. Modifizierte natürliche Polymere
3. Synthetische Polymere aus natürlichen Bausteinen
4. Synthetische Polymere aus petrochemischen Bausteinen.

Unter den natürlichen Polymeren sind zunächst Cellulose und Stärke zu nennen. Diese relativ billigen und ausreichend verfügbaren natürlichen Polysaccharide können jedoch nicht ohne weiteres durch Schmelzen beispielsweise zu Folien oder Fasern verarbeitet werden (keine thermoplastische Verformbarkeit). Dies ist jedoch eine wesentliche Voraussetzung der modernen Kunststofftechnologie. Zwar lässt sich Stärke mit bestimmten Zusätzen in einem thermoplastischen Verfahren umformen, jedoch sind die so erhaltenen Produkte (z.B. Folien, Becher, Einweggeschirr) sehr feuchtigkeitsempfindlich, was ihre Anwendbarkeit stark einschränkt. Reine, thermoplastisch aufgeschäumte Stärke findet jedoch trotzdem relativ weit

complex process and an evaluation of these new materials with respect to environmental safety requires relatively extensive investigations. In addition, in practice, abiotic processes are often also involved in the degradation processes. Thus, oxidation due to oxygen, exposure to sunlight, or chemical hydrolysis due to water diffusing into the material can essentially contribute towards cleavage of the polymer chain. In part, such reactions are also deliberately used for biologically degradable plastics (e.g. photo-degradable polyethylene or primary hydrolysis of poly(lactic acid)).

In principle, the structure of the polymers alone decides whether they are attacked by enzymes and not the origin of the starting materials. One could thus believe that polymers produced from natural raw materials are always biologically degradable and those synthesised from petrochemically produced components are biologically inert. However, this assumption is not correct. Although chemically unmodified natural polymers such as cellulose, starch or proteins are in principle biodegradable, polymers not cleavable by enzymes can be produced by chemical modifications (e.g. esterification into cellulose triacetate) or during the polymerisation of natural monomers (e.g. lactic acid). On the other hand, there exist a number of plastics known to be biodegradable, which are completely produced from petrochemical substances (for example, various polyesters, polyester amides, polyester urethanes). The issues of "biodegradability" and "renewable raw materials" should therefore be definitely considered in a more differentiated manner.

The raw materials for the biologically degradable plastics currently at the application stage can be divided into four types (Fig. 3):

1. natural polymers
2. modified natural polymers
3. synthetic polymers from natural components
4. synthetic polymers from petrochemical components

The natural polymers first of all include cellulose and starch. However, these relatively cheap and adequately available natural polysaccharides cannot be readily processed by melting, for example, into foils or fibres (no thermoformability). But this is an essential prerequisite of modern plastics technology. Although starch can be thermoformed with specific additives, the products thus obtained (e.g. foils, cups, disposable dishes) are very sensitive to moisture, which greatly restricts their applicability. Nevertheless, pure thermofoamed starch is relatively widely applied as an alternative to packaging chips of expanded polystyrene. Cellulose and starch are currently mainly used as components of biodegradable plastics in combination with synthetic polymers.

Another natural polymer is polyhydroxybutyrate (PHB). This polyester is produced by microorganisms under specific conditions and used by the cells for the storage of energy and carbon (similarly to fat in animals and humans). Optimised biotechnological processes (fermentation) can induce certain organisms such as *Alcaligenes eutrophus* to accumulate PHB up to a fraction of 80-90 % of their mass in the cells. After having been extracted from the organisms and purified, PHB

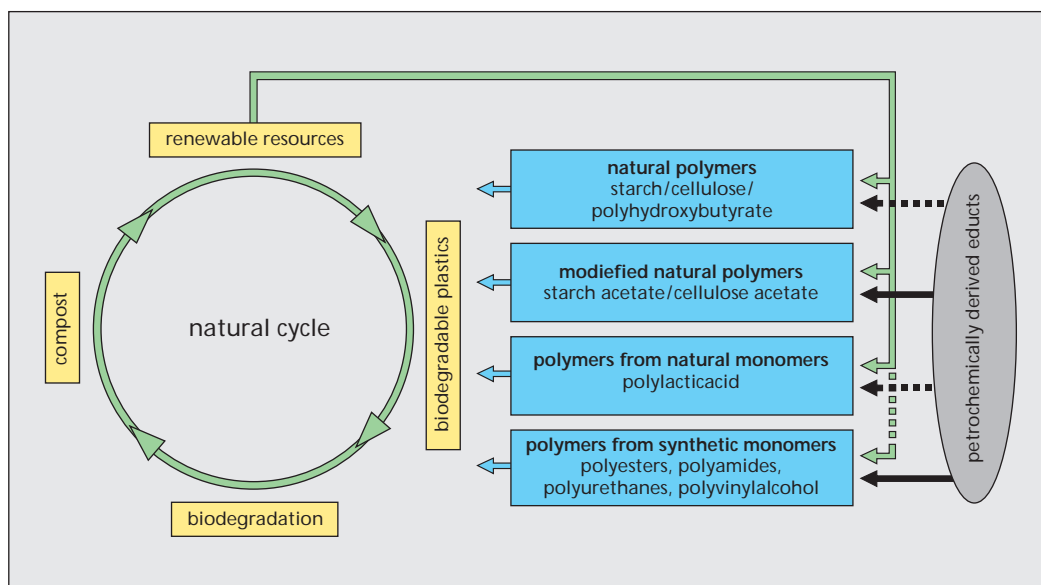


Abb. 3. Verschiedene Herstellungsverfahren bio-abbaubarer Kunststoffe und deren Einbindung in den natürlichen Stoffkreislauf

Fig. 3. Various production routes for biodegradable plastics and their incorporation into the natural material cycle.

verbreitete Anwendung als Alternative zu Verpackungschips aus expandiertem Polystyrol („Styropor“). Hauptsächlich werden Cellulose und Stärke derzeit als Komponenten von bioabbaubaren Kunststoffen in Kombination mit synthetischen Polymeren genutzt.

Ein weiteres natürliches Polymer ist das sogenannte Polyhydroxybutyrat (PHB). Dieser Polyester wird von Mikroorganismen unter bestimmten Bedingungen produziert und dient den Zellen als Speicher für Energie und Kohlenstoff (ähnlich wie Fett bei Tieren und Menschen). Durch optimierte biotechnologische Verfahren (Fermentation) können bestimmte Organismen wie beispielsweise *Alcaligenes eutrophus* dazu gebracht werden, PHB bis zu einem Anteil von 80-90% ihrer Masse in den Zellen anzureichern. Aus den Organismen extrahiert und gereinigt ergibt das PHB ein Polyester-material, das in Verarbeitbarkeit und Eigenschaften synthetischen Polymeren sehr nahe kommt und als rein natürliches Polymer auch biologisch abbaubar ist. PHB wurde hauptsächlich unter dem Handelsnamen „BIOPOL“ bis zum Herbst 1998 im technischen Maßstab hergestellt. Die Produktion wurde dann aber eingestellt, da der durch das relativ aufwendige Verfahren bedingte hohe Materialpreis von mehr als 15 bis 20 DM pro Kilogramm keine Wettbewerbsfähigkeit zu anderen bioabbaubaren Kunststoffen zuließ. Derzeit sind Bestrebungen im Gange, PHB durch gentechnische Manipulationen auch in Pflanzen produzieren zu können, um dann in (absehbarer?) Zukunft einmal preiswertes PHB beispielsweise aus „Plastikkartoffeln“ zu erhalten. Die eingeschränkten Verarbeitungs- und Anwendungseigenschaften der natürlichen Polymere Cellulose und Stärke kann man durch chemische Veränderung verbessern. Werden die in diesen Polysacchariden (Poly-Zucker) vorhandenen freien OH - Gruppen mit Säuren (beispielsweise Essigsäure) zu Estergruppen umgesetzt, ergeben sich schmelzbare Werkstoffe mit recht guten Eigenschaften (Cellulose- und Stärkeacetate – Abb. 3). Mit der chemischen Veränderung der natürlichen Polymere geht jedoch eine Abnahme der biologischen Abbaubarkeit einher (Abb. 4). In der Praxis muß der Umfang der

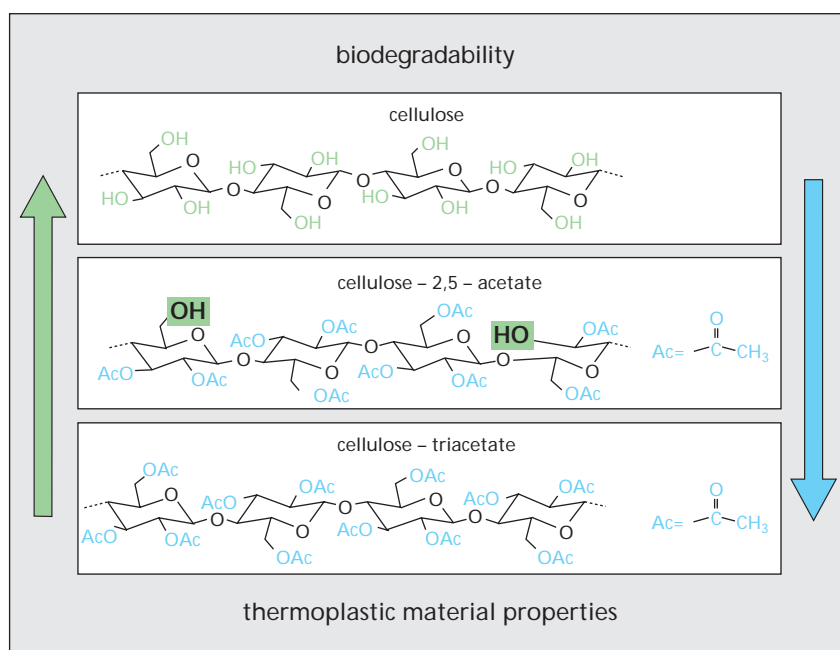
Veresterung so gesteuert werden, dass ein annehmbarer Kompromiss zwischen akzeptablen Eigenschaften und ausreichender Bioabbaubarkeit erreicht wird. Bei der Verwendung natürlicher beziehungsweise chemisch veränderter natürlicher Polymere treten nicht zu vernachlässigende Probleme hinsichtlich der Einstellung bestimmter Materialeigenschaften auf. Diese sind einerseits durch nicht konstante Polymerqualitäten aufgrund unterschiedlicher Umweltbedingungen (beispielsweise unterschiedliche Witterungen) und andererseits durch Einschränkungen bei der chemischen Umsetzung der natürlichen Polymere begründet.

Grundsätzlich kann man die Probleme umgehen, indem man aus natürlichen Rohstoffen hergestellte Bausteine (Monomere) nimmt und diese durch übliche chemische Syntheseverfahren (Polymerisationen) zu Polymeren verbindet. Auf diese Weise können definierte und komplexe Polymerstrukturen mit maßgeschneiderten Eigenschaften sehr reproduzierbar hergestellt werden. Da die Bioabbaubarkeit der Polymere aber, wie schon oben erwähnt, nicht von der Herkunft der Bausteine, sondern allein von der Polymerstruktur abhängt, sind die so erhaltenen Kunststoffe nicht automatisch biologisch abbaubar, sondern die Polymere müssen so synthetisiert werden, dass geeignete Strukturen für einen enzymatischen Angriff entstehen. In der Praxis wird beispielweise versucht verschiedene Zucker als Komponenten bioabbaubarer Kunststoffe zu nutzen. Weitere Ansätze sind die biotechnologische Herstellung von 1,3-Propanediol und Bernsteinsäure, die in Polyester eingebaut werden können [2]. In technischem Maßstab wird derzeit bereits die Herstellung von Polymilchsäure auf natürlich produzierter monomerer Milchsäure betrieben. Für die chemisch synthetisierte Polymilchsäure (PLA von „Polylactic acid“) konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden, dass sie durch Enzyme depolymerisiert wird, was der engeren Definition einer biologischen Abbaubarkeit entsprechen würde. Unter Bedingungen, wie sie beispielweise in einer Kompostierung vorliegen (Feuchtigkeit und Temperaturen im Bereich von

constitutes a polyester material which is very close to synthetic polymers with respect to processability and properties and as a purely natural polymer is also biologically degradable. PHB was mainly produced on a technical scale under the trade name "BIOPOL" until autumn 1998. Production was then stopped since the high material price of more than DM 15 to 20 per kilogram caused by the relatively expensive technique did not permit competitiveness with other biodegradable plastics. At present, efforts are under way to produce PHB by genetic engineering in plants in order to obtain a low-priced PHB, for example, from "plastic potatoes" in the (foreseeable?) future.

The limited processing and application properties of cellulose and starch as natural polymers can be improved by chemical modification. If the free OH-groups present in these polysaccharides (polysugar) are converted with acids (e.g. acetic acid) into ester groups, meltable materials are obtained with fairly good properties (cellulose and starch acetates – Fig. 3). The chemical modification of natural polymers, however, involves a decrease in biological degradability (Fig. 4). In practice, the extent of esterification must be controlled so that a reasonable compromise is reached between acceptable properties and sufficient biodegradability. The use of natural or chemically modified natural polymers poses problems with respect to establishing particular material properties which cannot be neglected. These are due, on the one hand, to non-constant polymer qualities caused by different environmental conditions (e.g. different weather conditions) and, on the other hand, to restrictions in the chemical conversion of the natural polymers.

In principle, these problems can be circumvented by combining compounds produced from natural raw materials (monomers) with polymers using conventional chemical synthesis techniques (polymerisations). In this way, defined and complex polymer structures with tailor-made properties can be reproducibly obtained. However, since the biodegradability of the polymers, as already mentioned above, does not depend on the origin of the components but solely on the polymer structure, the plastics thus obtained are not automatically biodegradable, but the polymers must be synthesised so that suitable structures for an



enzymatic attack are produced. In practice, for example, it is being attempted to use various sugars as components of biodegradable plastics. Further approaches comprise the biotechnological production of 1,3-propanediol and succinic acid, which can be incorporated into polyesters [2]. On a technical scale, poly(lactic acid) is currently already produced from natural monomeric lactic acid. For chemically synthesised poly(lactic acid) (PLA), however, it has not yet been possible to demonstrate that it is depolymerised by enzymes, which would correspond to the closer definition of biological degradability. Under conditions as are present, for example, in composting (moisture and temperatures in the range of 60°C), however, a relatively rapid chemical hydrolysis of PLA occurs in short chain fragments which are then respirable by microorganisms so that ultimately a biological conversion of the plastic is given.

The largest number of potentially technically relevant biodegradable plastics are currently based on chemically synthesised polymers from petrochemical components, which is due to their sufficient availability, the relatively low price, constant product quality and structural diversity. As a rule, an optimal compromise must also be achieved here between biodegradability and material properties, which is clearly facilitated, however, by the extensive opportunities of synthetic polymer chemistry and the diversity of available components. By far the majority of biodegradable plastics are currently based on various polyester structures.

Abb. 4. Abhängigkeit der biologischen Abbaubarkeit und der thermoplastischen Materialeigenschaften von der chemischen Modifizierung natürlicher Polymere am Beispiel von Celluloseacetat

Fig. 4. Dependence of biological degradability and thermoplastic material properties on the chemical modification of natural polymers using the example of cellulose acetate.

60° C), tritt jedoch eine relativ schnelle chemische Hydrolyse von PLA in kurze Kettenbruchstücke ein, die dann von Mikroorganismen veratmet werden können, so dass letztendlich eine biologische Umsetzung des Kunststoffes gegeben ist.

Die größte Anzahl potentiell technisch relevanter bioabbaubarer Kunststoffe basiert derzeit auf chemisch synthetisierten Polymeren aus petrochemischen Komponenten, was sich auf deren ausreichender Verfügbarkeit, dem relativ günstigen Preis, der gleichbleibenden Produktqualität sowie der strukturellen Vielfalt begründet. Auch hier muß in der Regel ein optimaler Kompromiss zwischen Bioabbaubarkeit und den Materialeigenschaften erzielt werden, was jedoch durch die weiten Möglichkeiten der synthetischen Polymerchemie und die Vielfalt der verfügbaren Bausteine deutlich erleichtert wird. Die weitaus meisten bioabbaubaren Kunststoffe gründen sich derzeit auf verschiedenen Polyesterstrukturen.

Trotz der unbestreitbar vorhandenen Vorteile von petrochemisch basierten bioabbaubaren Kunststoffen muß doch bei dieser neuen Materialgruppe letztendliches Ziel die Verwendung nachwachsender Rohstoffe sein, da die Materialien sich nur so richtig in den natürlichen Kreislauf einfügen können. Dieses Ziel wird sicherlich nur mittelfristig und schrittweise unter Nutzung der Kenntnis der genauen Mechanismen des Polymerabbaus realisierbar sein.

Definitionen/Testverfahren/Normung

Mit Beginn der Entwicklung bioabbaubarer Kunststoffe mußte die Definition des „Bioabbaus“ in Hinsicht auf Kunststoffe differenziert werden. Unter dem Begriff „Biokorrosion“ war schon seit langem die Wechselwirkung von polymeren Werkstoffen und Mikroorganismen Gegenstand intensiver Untersuchungen, wobei der biologisch induzierte Effekt, z.B. eine Verfärbung oder Versprödung der Materialien unerwünscht ist. Der Aufgabenstellung entsprechend basieren die meisten der angewendeten Testverfahren auf der Bestimmung der Veränderung von Materialeigenschaften wie etwa der Zugfestigkeit. Derartige Veränderungen können aber z.B. schon

durch die Herauslösung von Weichmachern bedingt sein und sagen nichts über die Einbeziehung einer Polymer-substanz in die Stoffwechselfvorgänge von Mikroorganismen im Sinne einer Metabolisierung aus.

Basierend auf spezifizierten Definitionen des „Bioabbaus“ von Kunststoffen wurde seit Anfang der 90er Jahre intensiv an optimierten Testverfahren und Strategien zur Bewertung der Bioabbaubarkeit (im Sinne der Metabolisierung) von Kunststoffen gearbeitet. Grundsätzlich tritt hier die gleiche Problematik wie bei allen Abbauntersuchungen in der Natur auf. Testverfahren unter natürlichen Bedingungen (Feldtests) repräsentieren zwar weitgehend die reale Umwelt, die Analysemethoden sind jedoch sehr beschränkt (visuelle Bewertung, Bestimmung des Masseverlustes). Auf der anderen Seite kann man in einem Labortest-Verfahren mit einem Reinstamm in einem synthetischen Medium oder gar unter Verwendung eines einzelnen Enzyms sehr genau und reproduzierbar messen (Abb. 5), jedoch stellt sich hier jeweils die Frage, in wie weit die Ergebnisse auf das Abbauverhalten der Substanzen unter realen Bedingungen übertragbar ist. Zusätzlich erschwert die oft komplexe Zusammensetzung von Kunststoffen und deren Wasser-Unlöslichkeit (heterogener Abbauprozess) die entsprechenden Testverfahren. Die Arbeiten an der GBF zum Thema Testverfahren für bioabbaubare Kunststoffe konzentrierten sich zunächst auf das Gebiet der Labortestverfahren unter dem Aspekt der Reproduzierbarkeit, Aussagekraft und breit gefächerten Einsetzbarkeit. Neben der routinemäßigen Anwendung von Simulationstests (z.B. Erdeingrabetest nach DIN 53739) konnte eine Verbesserung von respirometrischen Tests (Bestimmung der CO₂-Entwicklung im sog. „Sturm-Test“) durch Einführung einer Kohlenstoffbilanz erzielt [3,4] und in die nationale und internationale Normung eingebracht werden (DIN V 54900; ISO 14852).

Despite the undisputed advantages of petrochemically based biodegradable plastics, the ultimate goal for this new group of materials must nevertheless be the use of renewable substrates, since only then will the materials be able to correctly fit into the natural cycle. This goal will certainly only be achievable in the medium term and step by step using the knowledge of the precise mechanisms of polymer degradation.

Definitions/Test procedures/Standardisation

With the beginning development of biodegradable plastics the definition of “biodegradation” had to be differentiated with respect to plastics. Under the concept of “biocorrosion” the interaction between polymeric materials and microorganisms had already long been the subject of intensive studies with the biologically induced effect, e.g. a discoloration or embrittlement of the materials, being undesirable. According to the scope of tasks, most of the corresponding test procedures are based on the determination of the change in material properties such as tensile strength. However, such changes can e.g. already be caused by the extraction of plasticizers and they provide no information about the incorporation of a polymer substance into the metabolic processes of microorganisms in the sense of a metabolization.

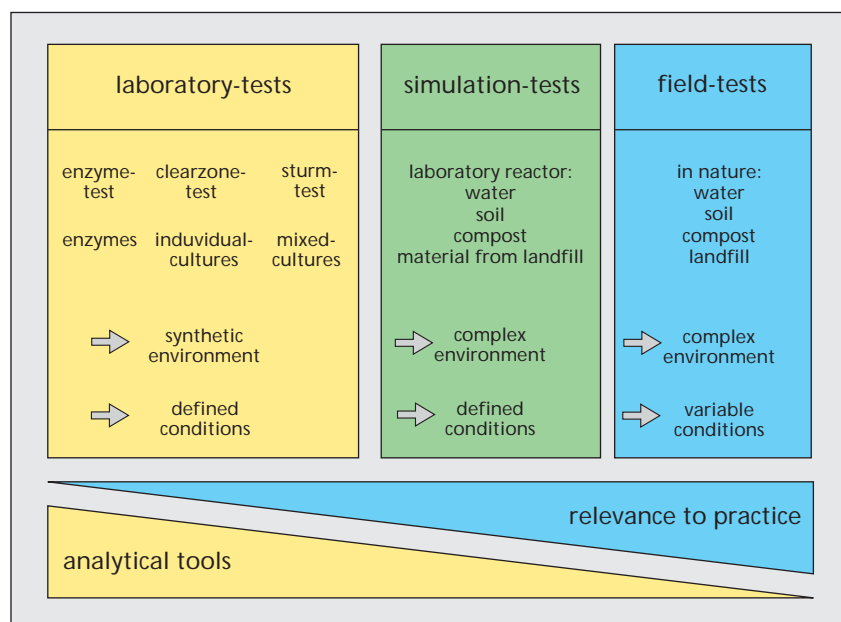
On the basis of specified definitions of the “biodegradation” of plastics, intensive studies have been conducted since the early nineties on optimised test procedures and strategies for assessing the biodegradability (in the sense of metabolization) of plastics. In principle, the same problems are encountered here as in all degradation studies in nature. Although test procedures under natural conditions (field tests) largely represent the real environment, the analytical methods are very restricted (visual assessment, determination of mass loss). On the other hand, very precise and reproducible measurements can be performed in a laboratory test procedure with a pure strain in a defined synthetic medium or even using a single enzyme (Fig. 5), but the question always arises here as to whether the results are transferable to the degradation behaviour of the substances under real conditions. In addition, the often complex composition of plastics and their water insolubility (heterogeneous degradation

process) complicates the respective test procedures. The work performed at GBF on test procedures for biodegradable plastics first concentrated on laboratory test procedures from the aspect of reproducibility, informative value and broad-based applicability. Apart from the routine application of simulation tests (e.g. soil burial test according to DIN 53739) it has been possible to improve respirometric tests (determination of CO₂ evolution in the so-called “Sturm test”) by the introduction of a carbon balance [3, 4] and to incorporate this improvement into national and international standardisation (DIN V 54900; ISO 14852).

An important priority is currently the isolation and characterisation of plastics-degrading organisms and the corresponding extracellular enzyme systems used as a tool e.g. for the investigation of degradation mechanisms. It is thus possible, for example, to systematically determine in a simple and rapid manner basic parameters of influence and mechanisms for the biodegradation of polyesters in an optimised titration test using lipolytic enzymes (e.g. lipases). The acids released during the enzymatically catalysed cleavage of ester bonds can be continuously determined titrimetrically [5]. In comparison, for example, to a soil burial test, which can take up to six months, information about the degradation behaviour can thus be obtained within a few hours (and even within seconds to minutes using polymer nanoparticles). Such rapid tests are an essential prerequisite for systematic studies of degradation mechanisms and influential parameters.

Abb. 5. Charakterisierung von Abbautests – Zunehmende Praxisnähe versus analytische Aussagekraft

Fig. 5 Characterisation of degradation tests – increasingly realistic conditions versus analytical information content.



Einen wichtigen Schwerpunkt stellt derzeit die Isolierung und Charakterisierung von kunststoffabbauenden Organismen und den entsprechenden extrazellulären Enzymsystemen dar, die als Werkzeuge z.B. zur Untersuchung von Abbau-mechanismen genutzt werden. So lassen sich grundlegende Einflussparameter und Mechanismen zum Bioabbau von Polyestern systematisch einfach und schnell in einem optimierten Titrations-versuch unter Verwendung von fettsplattend Enzymen (z.B. Lipasen) bestimmen. Die bei der enzymatisch katalysierten Spaltung der Esterbindungen freiwerdenden Säuren können kontinuierlich titrimetrisch erfasst werden [5]. Im Vergleich zu beispielsweise einem Erdeingrabetest, der bis zu einem halben Jahr dauern kann, sind so Informationen über das Abbauverhalten im Bereich einiger Stunden zu erhalten (bei Einsatz von Polymer-Nanopartikeln sogar im Bereich von Sekunden bis Minuten). Derartige schnelle Tests stellen eine wesentliche Voraussetzung für systematische Untersuchungen von Abbau-mechanismen und Einflussgrößen dar.

Polymerabbauende Mikroorganismen und Enzyme

Wie oben bereits erwähnt ist die Isolierung von polymerabbauenden Mikroorganismen ein wesentlicher Aspekt bei der systematischen Untersuchung von Abbauvorgängen an Polymeren. Von zentraler Bedeutung bei der Anwendung von BAWs ist die Nutzung der Kompostierung als Entsorgungsweg.

In diesem Zusammenhang konnten aus Kompost Stämme eines thermophilen Actinomyceten isoliert und identifiziert werden (*Thermomonospora fusca*), die u.a. synthetische, aliphatisch-aromatische Copolyester (z.B. BTA, ein Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthal- und Adipinsäure), die eine hohe technische Relevanz haben, schnell depolymerisieren [6]. Das Screening im Kompost zeigte, dass thermophile Actinomyceten eine wesentliche Rolle beim Abbau der synthetischen Polyester spielen (von 30 isolierten BTA-Abbauern gehörten 25 zur Gruppe der Actinomyceten). Bei einer Reihenuntersuchung von 1066 mesophilen und 87 thermophilen Stämmen

der Actinomycetensammlung der DSMZ konnten in Zusammenarbeit mit der DSMZ jeweils 17 mesophile und 17 thermophile BTA-abbauende Actinomyceten gefunden werden. Verschiedene Stämme thermophiler Actinomyceten erwiesen sich als sehr geeignet für Untersuchungen des Bioabbaus von verschiedenen Polyestern in Labortestsverfahren. Der notwendige Testzeitraum ließ sich so von Monaten in einer realen Kompostumgebung auf einige Tage in einem Agar-Platten-Test verkürzen (Abb. 6).

Für den Stamm *T. fusca* DSM 43793 gelang es, das extrazelluläre, polyester-spaltende Enzym zu isolieren, zu charakterisieren und in *E. coli* zu exprimieren. Es handelt sich hierbei um ein lipaseähnliches Enzym mit einer ungewöhnlich hohen Aktivität gegenüber den teilaromatischen Copolyestern. Während für aerobe Umgebungsbedingungen über eine Vielzahl von Abbauuntersuchungen existieren, ist der Bioabbau von Polymeren unter Sauerstoffausschluß bislang nur in den Anfängen untersucht. Mit der gleichen Zielsetzung wie bei den thermophilen aeroben Organismen wurden in den letzten Jahren eine Reihe anaerober, polyesterabbauender Mikroorganismen isoliert und ausgewählte Stämme taxonomisch bearbeitet. Alle identifizierten Isolate gehörten neuen Spezies an. Grundsätzlich scheint das Abbauverhalten unter anaeroben Verhältnissen ähnlich denen in Gegenwart von Sauerstoff. Beispielsweise kann kein Organismus, der die natürlichen Polyester der Polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerisiert, synthetische Polyester angreifen und umgekehrt. Wie bei aeroben Organismen scheint es auch bei den Anaerobiern recht spezifische PHA-Depolymerasen zu geben, während synthetische Polyester „per Zufall“ durch relativ unspezifische Lipase - ähnliche Enzyme depolymerisiert werden.

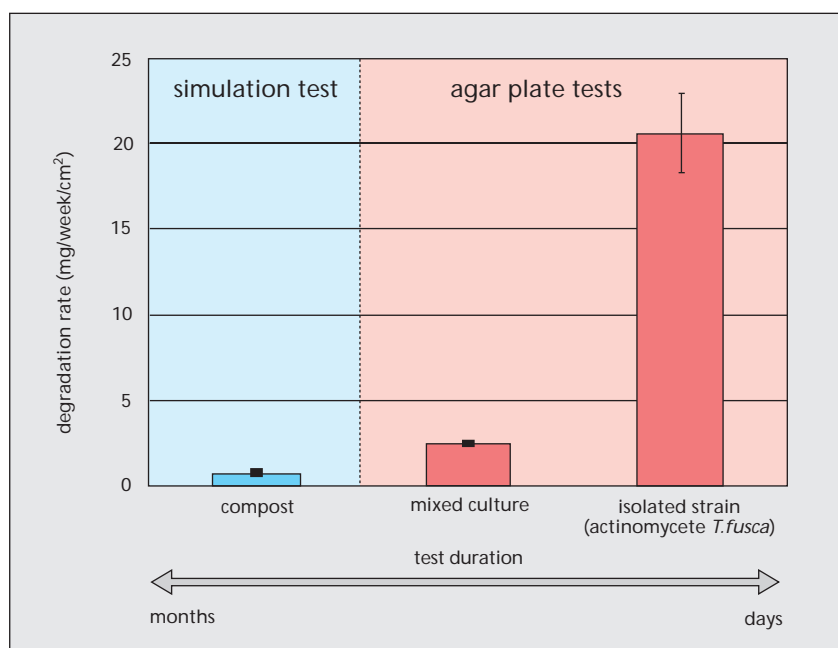
Lipasen haben sich in der Praxis als recht geeignete und gut verfügbare Enzyme herausgestellt, mit denen in kurzen Zeiträumen grundlegende Untersuchungen zum Bioabbau von Polymeren mit hydrolysierbaren Gruppen durchgeführt werden können. Neben vergleichenden Untersuchungen zum

Polymer-degrading microorganisms and enzymes

As already mentioned above, the isolation of polymer-degrading microorganisms is an essential aspect in the systematic investigation of degradation processes in polymers. Of central significance in the application of biodegradable materials is the use of composting as a disposal pathway.

In this context, it has been possible to isolate and identify strains of a thermophilic actinomycete (*Thermomonospora fusca*) from compost, which *inter alia* rapidly depolymerize synthetic, aliphatic-aromatic copolyesters (e.g. BTA, a copolyester of 1,4-butanediol, terephthalic acid and adipic acid) which are of great technical relevance [6]. The screening in compost showed that thermophilic actinomycetes play an essential role in the degradation of synthetic polyesters (25 of 30 isolated BTA degraders belonged to the group of actinomycetes). In a series investigation of 1066 mesophilic and 87 thermophilic strains of the DSMZ actinomycete collection it was possible to find 17 mesophilic and 17 thermophilic BTA-degrading actinomycetes each in collaboration with DSMZ. Various strains of thermophilic actinomycetes proved to be very suitable for investigating the biodegradation of different polyesters in laboratory tests. The necessary test period was thus shortened from months in a real compost environment to a few days in an agar-plate test (Fig. 6).

For the *T. fusca* DSM 43793 strain it was possible to isolate and characterise the extracellular, polyester-cleaving enzyme and express it in *E. coli*. This is a lipase-like enzyme with extremely high activity with respect to the partially aromatic copolyesters. Whereas a large number of degradation studies exist for aerobic environmental conditions, the biodegradation of polymers in the absence of oxygen has so far only been studied rudimentarily. With the same objective as for the thermophilic aerobic organisms, a number of anaerobic, polyester-degrading microorganisms have been isolated in recent years, and selected strains taxonomically treated. All the isolates identified belonged to new species. In principle, the degradation behaviour under anaerobic conditions seems to be similar to that in the presence of oxygen. For example, no organism which depolymerizes the natural



polyesters of the polyhydroxyalkanoates (PHA) can attack synthetic polyesters and vice versa. As in the case of aerobic organisms, there also seem to exist rather specific PHA depolymerases for the anaerobes, whereas synthetic polyesters are depolymerized “by chance” by relatively unspecific lipase-like enzymes.

In practice, lipases have proved to be fairly suitable and adequately available enzymes with which basic studies on the biodegradation of polymers with hydrolysable groups can be carried out within short periods of time. In addition to comparative studies on the influence of polymer-specific parameters on biodegradation, information about the degradation behaviour under natural conditions can also be gained under certain conditions from enzymatic degradation tests (see below). In general, it can be stated that while investigations with special polymer-degrading pure strains of micro-organisms and their enzymes cannot completely replace simulation tests for practical application, they are indispensable tools for the elucidation of degradation mechanisms.

Abb. 6. Variation der Abbaugeschwindigkeit bei Einsatz verschiedener biologischer Systeme

Fig. 6. Variation of the degradation rate using different biological systems

Einfluß vom polymerspezifischen Parametern auf den Bioabbau können unter bestimmten Voraussetzungen auch aus enzymatischen Abbautests Aussagen über das Abbauverhalten unter natürlichen Bedingungen gewonnen werden (siehe unten). Generell ist festzustellen, dass Untersuchungen mit speziellen polymerabbauenden Reinstämmen von Organismen und deren Enzymen zwar nicht Simulationstests für die praktische Anwendung vollständig ersetzen können, aber unverzichtbare Werkzeuge für die Aufklärung von Abbaumechanismen darstellen.

Polymerstruktur und Bioabbaubarkeit

Zentraler Aspekt der Arbeiten zu bioabbaubaren Kunststoffen an der GBF ist die Frage, warum bestimmte Polymere von biologischen Systemen angegriffen werden können und andere dagegen praktisch inert sind. Hier sind auf der einen Seite Aspekte der Biologie zu berücksichtigen (Vorkommen und Häufigkeit geeigneter Mikroorganismen, Einfluß der Umgebungsbedingungen auf die mikrobielle Aktivität, Struktur der depolymerisierenden Enzyme), auf der anderen Seite spielt die Struktur und die Morphologie des oftmals komplexen polymeren Materials eine ausschlaggebende Rolle. Dabei ist es unerheblich, ob die Edukte der Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen stammen oder aber petrochemischen Ursprungs sind. Rein natürliche, nicht chemisch modifizierte Polymere wie etwa Stärke, Cellulose oder PHB sind zwar per se bioabbaubar (sonst hätten sie sich in der Natur akkumuliert), aber schon eine Modifizierung z.B. von Cellulose zu Celluloseacetat (Veresterung der freien

OH-Gruppen der Cellulose) führt zu einem Verlust der Bioabbaubarkeit. Als weiteres Beispiel hierzu ist das Polypropylenterephthalat (PPT) zu nennen. 1,3-Propandiol, die Alkoholkomponente in diesem Polymer, ist ein natürliches Produkt, das technisch u.a. fermentativ aus Glycerin gewonnen werden kann. Wird 1,3-Propandiol nun mit Terephthalsäure zu PPT verestert, ergibt sich ein Polymer, was biologisch vollkommen inert ist. Auf der anderen Seite demonstrieren die aliphatisch-aromatischen Copolyester (z.B. BTA, siehe unten), dass auch rein synthetische Polymere vollkommen biologisch abbaubar sein können.

Bezüglich der Struktur biologisch abbaubarer Polymerer hat sich generell gezeigt, dass Ketten, die nur aus Kohlenstoffatomen aufgebaut sind (z.B. Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol) nicht enzymatisch angegriffen werden können (mit Ausnahme von Polyvinylalkohol/PVA). Fast alle heute bekannten abbaubaren Polymere enthalten Heteroatome wie Sauerstoff oder Stickstoff in den Hauptketten; die primäre Spaltung der Polymerketten erfolgt in der Regel hydrolytisch (z.B. an Ester- oder Amidgruppen).

Nun spielen neben der chemischen Struktur der Hauptkette aber noch eine Reihe weiterer Faktoren (z.B. Kettenlänge der Polymere, Schmelzpunkt des Materials, Kristallinität, Hydrophobizität und Morphologie der Materialoberfläche etc.) eine, oft ausschlaggebende, Rolle. Erschwert werden die Untersuchungen dadurch, dass die genannten Parameter nicht notwendigerweise unabhängig voneinander sind. Wird z.B. die Struktur der Polymerkette verändert, hat dies in der Regel auch einen Einfluß auf den Schmelzpunkt oder die Kristallinität. Um hier systematisch Arbeiten zu können, wurden an der GBF eine Reihe von definierten Polyestern und niedermolekularen Modellsubstanzen synthetisiert, eingehend charakterisiert und hinsichtlich der biologischen Abbaubarkeit untersucht. Als Testsystem wurde aufgrund des vertretbaren Zeitaufwandes und der guten Reproduzierbarkeit ein enzymatischer Abbau der Estersubstanzen mit Lipasen gewählt [7].

Polymer structure and biodegradation

The central aspect of work on biodegradable plastics at GBF is the question why certain polymers can be attacked by biological systems whereas others are virtually inert. On the one hand, aspects of biology must be considered here (occurrence and abundance of suitable microorganisms, influence of the environmental conditions on microbial activity, structure of the depolymerising enzymes) and, on the other hand, the structure and morphology of the often complex polymeric material play a decisive role. It is irrelevant whether the educts of the polymers originate from renewable resources or are of petrochemical origin. Although purely natural, not chemically modified polymers such as starch, cellulose or PHB are biodegradable per se (otherwise they would have accumulated in nature), even a modification e.g. of cellulose to cellulose acetate (esterification of the free OH-groups of the cellulose) leads to a loss of biodegradability. Another example is poly(propylene terephthalate) (PPT).

1,3-propanediol, the alcohol component of this polymer, is a natural product which can be technically obtained *inter alia* fermentatively from glycerol. If 1,3-propanediol is esterified with terephthalic acid to form PPT, a polymer is produced which is biologically completely inert. On the other hand, the aliphatic-aromatic copolyesters (e.g. BTA, see below) demonstrate that purely synthetic polymers can also be completely biodegradable. With respect to the structure of biologically degradable polymers it has been generally found that chains only built up of carbon atoms (e.g. polyethylene, polypropylene, polystyrene) cannot be attacked enzymatically (with the exception of polyvinyl alcohol/PVA). Nearly all degradable polymers known today contain heteroatoms such as oxygen or nitrogen in their main chains; the primary cleavage of polymer chains generally takes place hydrolytically (at e.g. ester or amide groups).

Apart from the chemical structure of the main chain, however, a number of other factors (e.g. chain length of the polymers, melting point of the material, crystallinity,

hydrophobicity and morphology of the material surface etc.) also play an often decisive role. These investigations are complicated by the fact that the above parameters are not necessarily independent of each other. If, for example, the structure of the polymer chain is modified, this has generally also an influence on the melting point or on crystallinity. In order to work systematically here, a number of defined polyesters and low-molecular model substances were synthesised at GBF, characterised in detail and examined with respect to biological degradability. The test system selected was an enzymatic degradation of the ester substances with lipases due to reasonable time requirements and good reproducibility [7].

It was possible to show that lipases are basically also able to cleave also ester bonds directly adjacent to aromatic components. This would mean, however, that in principle purely aromatic polyesters such as poly (ethylene terephthalate) (PET) would also have to be biologically degradable. Since this is not the case, other properties of the polymers also had to play a role. Such a parameter was found in the mobility of the polymer chains. Mobility in this connection means how strongly the individual chains are embedded in the material bond and can be described by the difference of the melting temperature of the material from the temperature at which degradation takes place: the closer one gets to the melting point, the easier is the formation of a temporary "free" polymer loop at the material surface. Such a mobile loop is necessary for the polymer chain to spatially fit into the active region of the enzyme. But even if chain regions are sufficiently mobile, various obstacles can still arise with respect to biological degradability. If the chain is not flexible enough e.g. in itself, it cannot adapt to the spatial conditions of the enzyme either. This has been demonstrated on a specific low-melting purely aromatic polyester and on cross-linked aliphatic polyesters. As a last hurdle, the polymer chain must of course

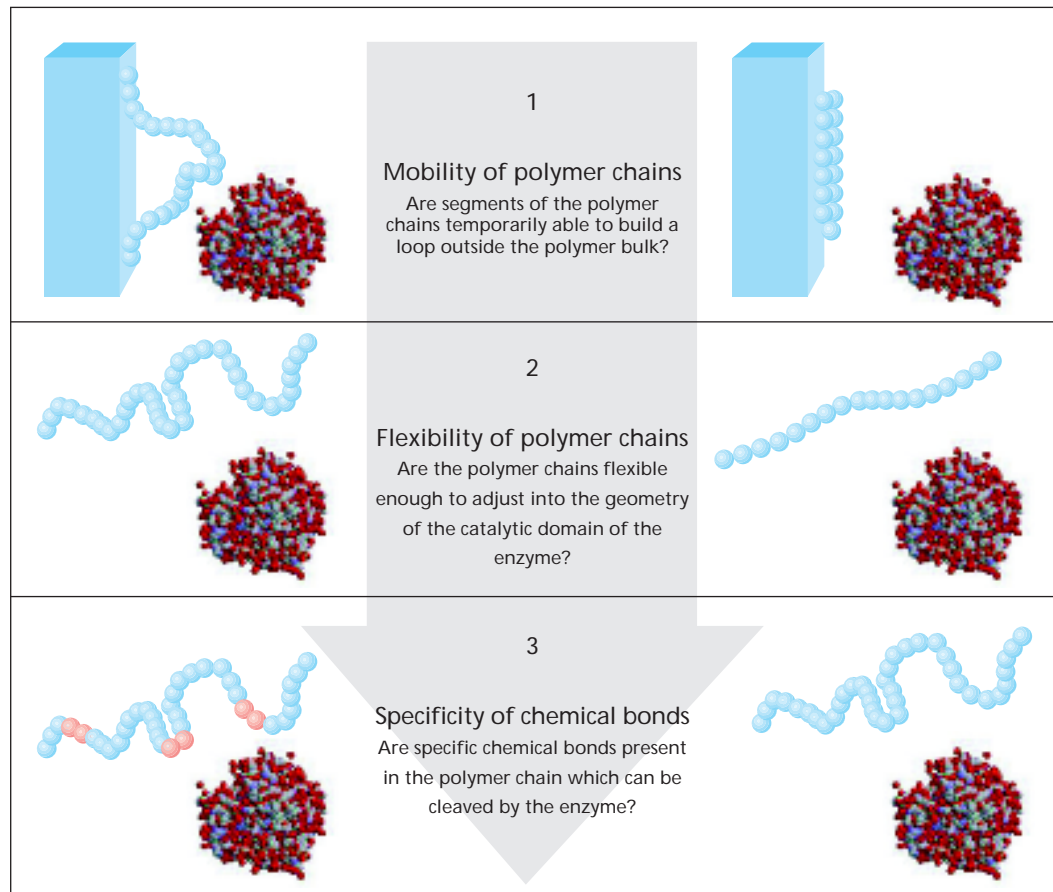
Hierbei konnte gezeigt werden, dass Lipasen grundsätzlich in der Lage sind, auch Esterbindungen in direkter Nachbarschaft zu aromatischen Komponenten zu spalten. Dies hieße aber, dass prinzipiell auch rein aromatische Polyester, wie etwa Polyethylterephthalat (PET) biologisch abbaubar sein müßten. Da dies nicht der Fall ist, mußten noch weitere Eigenschaften der Polymere eine Rolle spielen. Ein solcher Parameter wurde in der Mobilität der Polymerketten gefunden. Mobilität meint in diesem Zusammenhang wie stark die einzelnen Ketten in den Verbund des Materials eingebunden sind und läßt sich durch die Differenz von der Schmelztemperatur des Materials und der Temperatur, bei dem der Abbau stattfindet, beschreiben, je näher man an den Schmelzpunkt herankommt, je leichter kann sich eine temporäre „freie“ Polymerschleife an der Materialoberfläche bilden. Eine solche bewegliche Schleife ist notwendig, damit die Polymerkette sich in den aktiven Bereich des Enzyms räumlich einpassen kann.

Aber auch wenn Kettenbereiche genügend mobil sind, können sich noch verschiedene Hürden bezüglich der biologischen Abbaubarkeit ergeben. Ist die Kette z.B. in sich nicht flexibel („biegsam“) genug, kann sie sich ebenfalls nicht an die räumlichen Gegebenheiten des Enzyms anpassen. Dies konnte an einem bestimmten niedrigschmelzenden rein-aromatischen Polyester sowie an vernetzten aliphatischen Polyestern demonstriert werden. Als letzte Hürde muß dann die Polymerkette natürlich noch chemische Gruppen enthalten, die von den entsprechenden Enzymen überhaupt gespalten werden können (z.B. Ester- oder Amidgruppen für Hydrolasen) (Abb. 7).

Da sich die Ergebnisse der durchgeführten enzymatischen Untersuchungen im Labor auch auf das Verhalten der Kunststoffe unter realen Bedingungen übertragen lassen, stellen die gefundenen Abhängigkeiten wichtige Grundlagen dar, wenn möglichst gezielt neue bioabbaubare Kunststoffe entwickelt werden sollen.

Abb. 7. Voraussetzungen zum Abbau nicht wasserlöslicher, polymerer Substanzen – Mobilität, Flexibilität, Reaktivität.

Fig. 7. Prerequisites for the degradation of water-insoluble, polymeric substances – mobility, flexibility, reactivity.



still contain chemical groups which can be cleaved by the corresponding enzymes (e.g. ester or amide groups for hydrolases) (Fig. 7). Since the results of the enzymatic investigations carried out in the laboratory can also be transferred to the behaviour of plastics under real conditions, the dependencies found represent an important basis for the selective development of new biodegradable plastics.

Synthetic aliphatic-aromatic copolyesters of technical relevance

For a successful technical application of biodegradable materials, a number of further prerequisites must be fulfilled in addition to actual biodegradability. This, of course, primarily involves the price which is still the decisive obstacle for many biodegradable materials under development (granule prices of > 8-10 DM/kg). Moreover, application and processing properties comparable to conventional plastics are also an essential prerequisite for positioning biodegradable materials on the market.

Although, for example, poly(ϵ -caprolacton) (PCL), an aliphatic polyester frequently used in biodegradable polyester-starch blends, is biodegradable, it already melts at about 60° C. This property makes PCL and the respective blends unsuitable for many applications. In contrast, many aromatic polyesters (e.g. PET) are technically excellent, but biologically resistant materials.

By means of a suitable combination of aliphatic and aromatic components in aliphatic-aromatic copolyesters it has been possible at GBF to synthesise materials which combine biodegradability with acceptable material properties [8-10] (Fig. 8). The aliphatic components tested included a number of aliphatic dicarboxylic acids (e.g. succinic acid, adipic acid, sebacic acid etc.), aliphatic dialcohols (e.g. 1,2-ethanediol, 1,3-propanediol, 1,4-butanediol etc.) and terephthalic acid as an aromatic monomer. A combination of 1,4-butanediol, terephthalic acid and adipic acid has proved particularly suitable in this context (BTA copolymers). It has been found that, in general, an improvement of the properties (e.g. melting point) of the copolyesters with respect to many applications is achieved with increasing concentration of aromatic dicarboxylic acids

while the rate of biodegradation likewise decreases. In a range between 30 mol% and 60 mol% terephthalic acid concentration in the acid component, technically interesting materials are obtained which biologically degrade at a sufficiently fast rate under environmental conditions.

At present, companies such as Eastman or BASF produce biodegradable plastics based on aliphatic-aromatic copolyesters on a scale of a few thousand tonnes per year under the trade names Eastar and Ecoflex, which convincingly underlines the technical relevance of this group of materials. The success of the copolyesters is based, on the one hand, on the application and processing properties necessary for industrial application (which are in part superior to those of polyethylenes) but also on the price level (around 5 DM/kg) and on sufficient availability.

Great attention has been paid to the environmental safety of these new biodegradable plastics. Although it has been basically demonstrated by investigations into complex biological systems that the copolyesters are biologically attacked and also largely converted by the microorganisms at a determined rate, it has not been possible to preclude that parts of the polymer chains which mainly contain aromatic acids are not further degraded and could thus accumulate in the environment. It has been estimated from the structure of the statistical copolyesters [11] that e.g. in the case of a terephthalic acid content of 40 mol% approx. 8 % of the polymer mass is present as sequences of more than one aromatic acid located behind each other, which is regarded as potentially problematic with respect to degradation (very long aromatic polymer chains such as PET are no longer biologically degradable).

A first approach towards clarifying this important question under compost conditions was based on specially synthesised aromatic oligomers which served as models of aromatic chain sequences [12]. It was found that only very short oligomers (one and two terephthalic acid units) were rapidly degraded by various mixed populations of microorganisms, whereas longer aromatic oligomers changed little under natural conditions. This observation was explained by the bioavailability (transport of soluble substances into the cells).

Synthetische aliphatisch – aromatische Copolyester mit technischer Relevanz

Für eine erfolgreiche technische Anwendung von BAWs müssen neben der eigentlichen Bioabbaubarkeit noch eine Reihe weiterer Voraussetzungen erfüllt sein. Hier ist zunächst natürlich der Preis zu nennen, der für viele in der Entwicklung befindliche BAWs noch die entscheidende Hürde darstellt (Granulatspreise von >8-10 DM/kg). Aber auch mit konventionellen Kunststoffen vergleichbare Anwendungs- und Verarbeitungseigenschaften sind wesentliche Voraussetzung für eine Positionierung von BAWs auf dem Markt.

So ist beispielsweise Poly(ϵ -caprolacton) (PCL), ein aliphatischer Polyester, der vielfach in bioabbaubaren Polyester/Stärke-Blends verwendet wird, zwar bioabbaubar, doch schmilzt er schon bei etwa 60° C. Diese Eigenschaft macht PCL und die entsprechenden Blends für viele Anwendungen ungeeignet. Viele aromatische Polyester hingegen (z.B. PET) stellen technisch hervorragende Materialien dar, sind aber biologisch resistent.

Durch geeignete Kombination von aliphatischen und aromatischen Komponenten in aliphatisch-aromatischen Copolyestern ist es u.a. an der GBF gelungen Materialien zu synthetisieren, die Bioabbaubarkeit und akzeptable Materialeigenschaften vereinigen [8-10] (Abb.8). Als aliphatische Komponenten wurden hierzu eine Reihe aliphatischer Dicarbonsäuren (z.B. Bernsteinsäure, Adipinsäure, Sebacinsäure etc), aliphatischer Dialkohole (z.B. 1,2- Ethandiol, 1,3-Propandiol, 1,4-Butandiol etc.) und als aromatisches Monomer Terephthalsäure getestet. Eine Kombination aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure hat sich hierbei als besonders geeignet erwiesen (BTA-Copolymere).

Es zeigte sich, dass generell mit zunehmendem Anteil an aromatischen Dicarbonsäuren eine Verbesserung der Eigenschaften (z.B. Schmelzpunkt) der Copolyester in Hinsicht auf viele Anwendungen erreicht wird, die biologische Abbaugeschwindigkeit jedoch gleichermaßen sinkt. In einem Bereich zwischen 30 mol% und 60mol % Terephthalsäureanteil in der Säurekom-

ponente erhält man technisch interessante Materialien, die unter Umweltbedingungen genügend schnell biologisch abbauen.

Derzeit werden von Firmen wie etwa Eastman oder BASF bioabbaubare Kunststoffe auf Basis aliphatisch-aromatischer Copolyester im Maßstab von einigen tausend Tonnen pro Jahr unter den Markennamen Eastar und Ecoflex produziert, was die technische Relevanz dieser Materialgruppe eindrucksvoll unterstreicht. Der Erfolg der Copolyester begründet sich zum einem in den für eine industrielle Anwendung notwendigen Anwendungs- und Verarbeitungseigenschaften (die teilweise denen von Polyethylenen überlegen sind) aber auch im Preisniveau (um die 5 DM/kg) und der ausreichenden Verfügbarkeit.

Großes Augenmerk wurde auf die Umweltsicherheit dieser neuen bioabbaubaren Kunststoffe gelegt. Aus den Untersuchungen in komplexen biologischen Systemen konnte zwar grundsätzlich gezeigt werden, dass und mit welcher Geschwindigkeit die Copolyester biologisch angegriffen und auch größtenteils von den Mikroorganismen umgesetzt wurden, aber es konnte zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass Teile der Polymerketten, die hauptsächlich aromatische Säuren enthalten, nicht weiter abgebaut werden und sich so in der Umwelt akkumulieren könnten. Aus der Struktur der statistischen Copolyester [11] konnte abgeschätzt werden, dass z.B. bei einem Terephthalsäuregehalt von 40 mol% ca. 8% der Polymermasse als Abfolgen von mehr als einer aromatischen Säure hintereinander vorliegen, die als potentiell problematisch hinsichtlich eines Abbaus angesehen werden konnten (sehr lange aromatische Polymerketten wie Polyethylenterephthalat sind biologisch nicht mehr abbaubar).

Ein erster Ansatz zur Klärung dieser wichtigen Frage unter Kompostbedingungen basierte auf speziell synthetisierten aromatischen Oligomeren, die als Modelle aromatischer Kettensequenzen dienten [12]. Es ergab sich, dass nur sehr kurze Oligomere (ein und zwei Terephthalsäureeinheiten) schnell durch verschiedene Mischpopulationen von Mikroorganismen abgebaut werden

In the course of isolating special microorganisms capable of depolymerizing BTA copolymers it was then demonstrated in a laboratory degradation test on agar plates in a defined synthetic medium with a preadapted mixed culture that even longer aromatic sequences cannot only be cut from the polymer chains but can, in principle, also be cleaved into shorter fragments [13]. Proof of the complete biodegradability and ecotoxicological harmlessness of the BTA copolyesters was then provided with the aid of the above-mentioned, specially isolated organism *Thermomonospora fusca*. This bacterium cleaves the copolyester chains at a high rate, but is not in a position to use the fragments formed for itself. This phenomenon made it possible to generate a high concentration of primary cleavage products of chain degradation in a defined medium and to precisely analyse these cleavage products (by gas chromatography - mass spectroscopy coupling) in cooperation with BASF [14,15]. Products of the cleavage of the polymer chains were the adipic acid, terephthalic acid and butanediol monomers besides small amounts of monoesters of butanediol/adipic acid and butanediol/terephthalic acid. Balancing confirmed a more than 99 % degradation of the polymers. All primary cleavage products were completely and rapidly mineralised by a mixed culture of compost (conversion into CO₂, water and biomass). Toxicological tests on photogenic bacteria and daphnia

did not provide any indications of harmful toxic effects of the degradation intermediates.

Summary

On the whole, the investigations by GBF and various cooperation partners have shown that the microbial degradation of those plastics is basically possible in which the carbon chain is interrupted by heteroatoms (O, N). This is the point of attack by microbial extracellular hydrolases, especially lipases with low substrate specificity. An additional prerequisite is a certain flexibility or mobility of the polymer chain, which enables the polymer to fit into the catalytic centre of the enzymes. The mobility and degradability of the polymer decisively depends on the difference between degradation temperature and melting temperature of the polymer. The primary cleavage products of the hydrolysis – including aromatic esters and acids – are completely degraded in compost and other natural habitats by the autochthonous biocoenosis or by accumulated mixed cultures. The detection of the decisive structure-property correlations offers the possibility of developing polymers which combine biodegradability with good thermal and mechanical degradation properties. It is thus possible, for example, to produce aromatic/aliphatic copolyesters with a largely tailor-made property profile which, moreover, can be priced such that they will gain acceptance on the market.

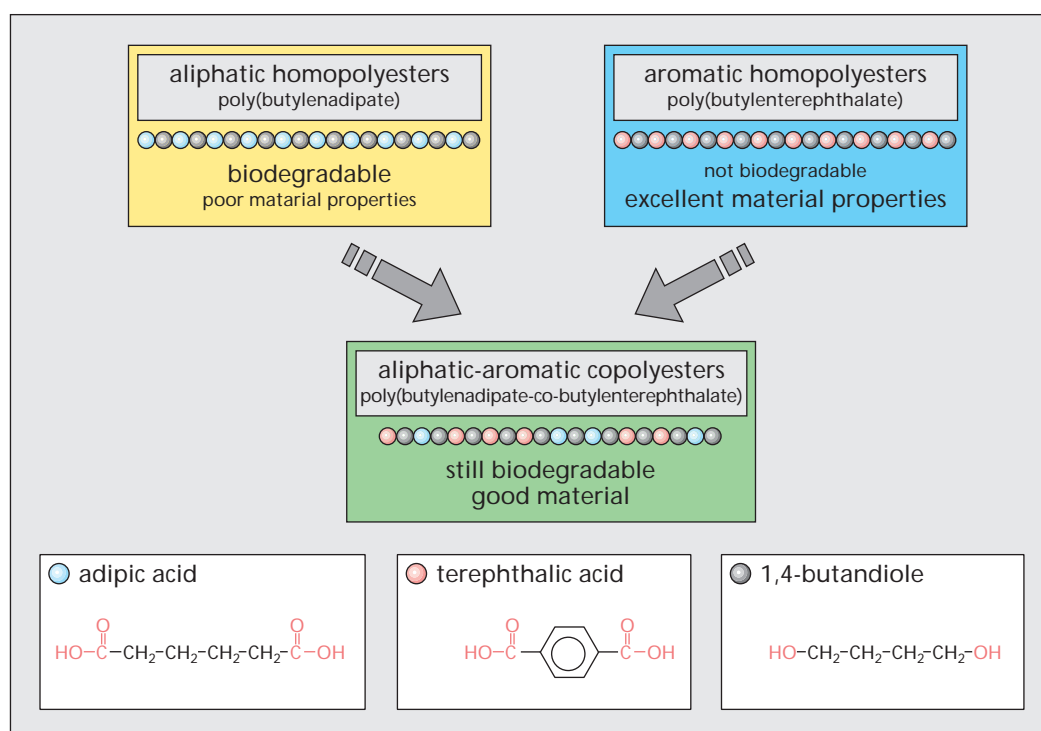


Abb. 8. Kombination von Bioabbaubarkeit und Materialeigenschaften bei der Synthese aliphatischer-aromatischer Copolyester aus petrochemischen Grundstoffen

Fig. 8. Combination of biodegradability and material properties in the synthesis of aliphatic-aromatic copolyesters from petrochemical base materials

konnten, während sich längere aromatische Oligomere nur wenig unter natürlichen Bedingungen veränderten. Diese Beobachtung konnte mit der Bioverfügbarkeit (Transport löslicher Substanzen in die Zellen) erklärt werden.

Im Rahmen der Isolierung von speziellen Mikroorganismen, die in der Lage waren BTA-Copolymere zu depolymerisieren, konnte dann in einem Labor-Abbautest auf Agarplatten in einem definierten synthetischen Medium mit einer voradaptierten Mischkultur gezeigt werden, dass auch längere aromatische Sequenzen nicht nur aus den Polymerketten herausgeschnitten, sondern auch grundsätzlich in kürzere Bruchstücke gespalten werden können [13]. Der Beweis der vollständigen Bioabbaubarkeit und der ökotoxikologischen Unbedenklichkeit der BTA-Copolyester gelang dann mit Hilfe des oben erwähnten, speziell isolierten Organismus *Thermomonospora fusca*. Dieses Bakterium spaltet die Copolyesterketten mit hoher Geschwindigkeit, ist jedoch selber nicht in der Lage die gebildeten Bruchstücke für sich zu nutzen. Durch dieses Phänomen konnte in einem definierten Medium eine hohe Konzentration an primären Spaltprodukten des Kettenabbaus erzeugt werden und in Kooperation mit der BASF eine genaue Analyse der Spaltprodukte (mittels Gaschromatographie-Massenspektroskopie-Kopplung) vorgenommen werden [14,15]. Produkte der Spaltung der Polymerketten waren neben geringen Mengen an Monoestern aus Butandiol/Adipinsäure und Butandiol/Terephthalsäure die Monomere Adipinsäure, Terephthalsäure und Butandiol. Aus einer Bilanzierung konnte ein über 99%iger Abbau des Polymeren sichergestellt werden. Alle primären Spaltprodukte wurden durch eine Mischkultur aus Kompost schnell vollständig mineralisiert (Umsetzung in CO₂, Wasser und Biomasse). Toxikologische Tests an Leuchtbakterien und Daphnien gaben keinerlei Hinweise auf bedenkliche toxische Auswirkungen der Abbauprodukte.

Zusammenfassung

Insgesamt haben die Untersuchungen der GBF mit verschiedenen Kooperationspartnern gezeigt, dass der mikrobielle Abbau von solchen Kunststoffen prinzipiell möglich ist, bei denen die Kohlenstoffkette durch Heteroatome (O, N) unterbrochen ist. Das ist der Angriffspunkt von mikrobiellen extrazellulären Hydrolasen, insbesondere von Lipasen mit geringer Substratspezifität. Vorausgesetzt werden muss dazu zusätzlich eine gewisse Flexibilität bzw. Mobilität der Polymerkette, die es ermöglicht, dass das Polymer sich in das katalytische Zentrum der Enzyme einpassen kann. Die Beweglichkeit und die Abbaubarkeit des Polymers hängt entscheidend von der Entfernung der Abbautemperatur von der Schmelztemperatur des Polymers ab. Die primären Spaltprodukte der Hydrolyse – einschließlich aromatischer Ester und Säuren – werden im Kompost bzw. anderen natürlichen Habitaten durch die autochthone Biozönose oder angereicherte Mischkulturen vollständig abgebaut.

Das Aufdecken der maßgeblichen Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bietet die Möglichkeit, Polymere zu entwickeln, die Bioabbaubarkeit mit guten thermischen und mechanischen Abbaueigenschaften vereinen. So lassen sich beispielsweise aromatisch/aliphatische Copolyester in gewissen Grenzen in ihrem Eigenschaftsprofil maßschneidern, die zudem preislich so gestaltet werden können, dass sie am Markt durchsetzbar sind.

References | Literatur

- [1] U. Witt, R.-J. Müller, J. Klein: *Biologisch abbaubare Polymere – Status und Perspektiven*, Franz-Patat-Zentrum, Wissenschaftliches Forum für Interdisziplinäre Polymerforschung e.V. (1997), ISBN 3-00-001529-9
- [2] H. Biebel, K. Menzel, A.P. Zeng, W.-D. Deckwer: *Microbial production of 1,3-propanediol*, *App. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 289-297
- [3] S. Urstadt, J. Augusta, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Calculation of Carbon Balances for the Evaluation of the Biodegradability of Polymers*, *J. Environm. Polym. Deg.* **3(3)** (1995) 121-131
- [4] R.-J. Müller, J. Augusta, M. Pantke: *An Interlaboratory Investigation into Biodegradation of Plastics; Part 1: A modified Sturm-test*, *Material und Organismen* **27/3** (1992) 179-189
- [5] T. Walter, J. Augusta, R.-J. Müller, H. Widdecke, J. Klein: *Enzymatic degradation of a model polyester by lipase from *Rhizopus delemar**, *Enzyme Microb. Technol.* **17** (1995) 218-224
- [6] I. Kleeberg, C. Hetz, R.M. Kroppenstedt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Biodegradation of aliphatic/aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates*, *Appl. Environ. Microbiol.* **64(5)** (1998) 1731-1735
- [7] E. Marten: *Korrelationen zwischen der Struktur und der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern*, *Dissertation (2000)*, TU-Braunschweig
- [8] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Biodegradation of Polyester-Copolymers Containing Aromatic Compounds* *Proceedings: Workshop on Biodegradable Polymers and Recycling*, 21.-23.04.1994, Stockholm, Sweden, *J. Macromol. Sci., Pure and Applied Chemistry* **A32/4** (1995) 851-856
- [9] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *New Biodegradable Polyester-Copolymers from Commodity Chemicals with Favorable Use Properties*, *J. Environm. Polym. Deg.* **3(4)** (1995) 215-223
- [10] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Biodegradation Behaviour and Material Properties of Aliphatic/Aromatic Polyesters of Commercial Importance*, *J. Environ. Polym. Deg.* **5(2)** (1997) 81-89
- [11] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Studies on Sequence Distribution of Aliphatic/Aromatic Copolyesters by High-Resolution ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Evaluation of Biodegradability*, *Makromol. Chem. Phys.* **197** (1996) 1525-1535
- [12] U. Witt, R.-J. Müller, W.-D. Deckwer: *Evaluation of the Biodegradability of Copolyesters Containing Aromatic Compounds by Investigations of Model Oligomers*, *J. Environ. Polym. Degrad.* **4(1)** (1996) 9-20
- [13] U. Witt: *Synthese, Charakterisierung und Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit von anwendungsorientierten biologisch abbaubaren aliphatisch/aromatischen Copolyestern*, *Dissertation (1997)* TU-Braunschweig
- [14] U. Witt, M. Yamamoto, U. Seeliger, R.-J. Müller, V. Warzelhan: *Biodegradable Polymeric Materials – Not the Origin but the Chemical Structure Determines Biodegradability*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38(10)** (1999) 1438-1442
- [15] U. Witt, T. Einig, M. Yamamoto, I. Kleeberg, W.D.-Deckwer, R.-J. Müller: *Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates* *Chemosphere*, in press



Koordinator | *Coordinator*: Dr. Hauser | Abt. Genregulation und Differenzierung | *Dept. of Gene Regulation and Differentiation*

Cytomics – Molekulare Analyse und Engineering von Zellen (SP 1)

Künftige medizinische Therapieansätze werden verstärkt den Transfer von Genen und die Transplantation von Zellen bzw. Geweben einbeziehen. Im Programm „Cytomics“ werden Grundlagenkenntnisse und Techniken moderner Gentherapien erarbeitet. Neue Entwicklungen auf den Gebieten Immunologie, Zell-, Entwicklungs- und Molekularbiologie versprechen neue, sehr gezielte Ansätze für das Verständnis und eine Therapie zahlreicher Krankheitsformen. Die Sequenzanalyse kompletter Genome und die Erkundung des Potentials definierter Zelltypen eines bestimmten Gewebes ermöglichen ein verbessertes Verständnis und eröffnen neue Dimensionen für spezifische therapeutische Eingriffe. „Cytomics“ gliedert sich in drei Projekte: das erste Projekt befasst sich mit spezifischen Zelltypen (im Zentrum stehen dendritische und mesenchymale Zellen), um deren Eigenschaften und Differenzierungspotential zu charakterisieren. Projekt 2 widmet sich Mechanismen der Genregulation und Signaltransduktion. Erkenntnisse von Grundlagenstudien werden für Vektorentwicklungen genutzt. Projekt 3 ist auf die Kultivierung von Zellen und Geweben gerichtet und zwar unter Bedingungen, die deren Expressionseigenschaften und Potential erhält. Alle Projekte sind miteinander vernetzt, um letztlich Regulationsprinzipien für das rationale Design von Vektoren zu nutzen und neuartige Wirkstoffe zum therapeutischen Gebrauch zu entwickeln.

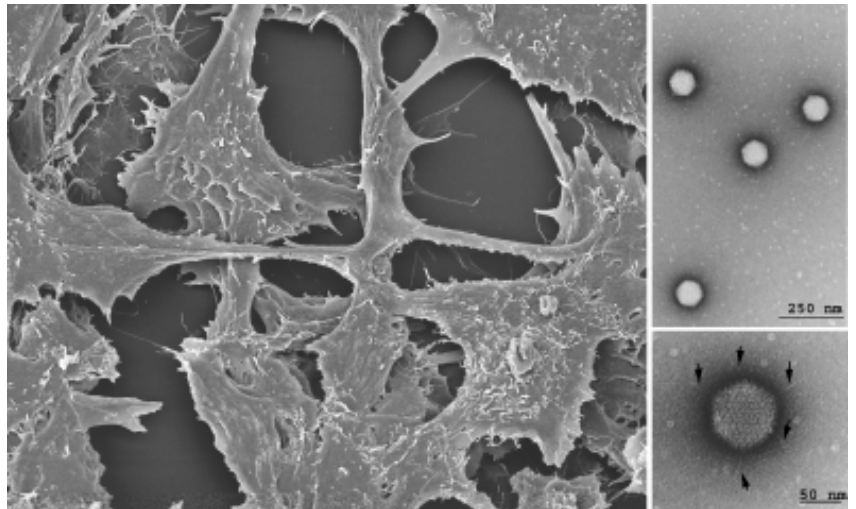
Eine Nachwuchsgruppe, die auf dem Gebiet des „tissue engineering“ arbeitet, ergänzt das Forschungsvorhaben „Cytomics“. Daneben wurde eine GMP-Einheit für die Herstellung rekombinanter Viren eingerichtet; als erstes Projekt hat diese Einheit die Produktion therapeutisch einsetzbarer Adenoviren zu Impfzwecken aufgenommen.

Cytomics – Molecular Analysis and Engineering of Cellular Systems (SP 1)

Future medical therapies will include gene transfer and transplantation of cells and tissue. Cytomics aims at establishing basic knowledge and techniques for modern gene and cellular therapies. Recent developments in immunology, cellular, molecular and developmental biology allow new and targeted approaches towards understanding and therapy of numerous diseases. The sequencing of complete genomes and the qualitative and quantitative characterization of the capabilities of defined cells from a certain tissue will allow an improved understanding and open new dimensions for therapeutic intervention. This knowledge will be used towards the development of specific therapies.

Cytomics is divided in three projects: The first deals with specific cell types, mainly dendritic cells and mesenchymal cells, to characterize their features and differentiation capacities. The second project covers gene regulation, signal transduction and vector development. Consequently, in the third project the cultivation of cells and tissue and the maintenance of their specific characteristics and potentials is studied.

A new research group dealing with »tissue engineering« is complementing the Cytomics R&D activities. In parallel a GMP unit for the production of recombinant viruses was established. As a first project the group will produce therapeutic adenoviruses for vaccination.



Zellsysteme für Therapie und Diagnostik (SP 1.1)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. H.-S. Conradt | Arb.Gr. Proteinglykosylierung | *Res. Group of Protein Glycosylation*

Projektmitarbeiter | *Project members*: M. Barthold, T. Behn, R. Bonewald, H. Bertram, Th. Böldicke, M. Brokelmann, S. Czichos, H. Ding, K. E. J. Dittmar, P. Eberle, E. Grabenhorst, G. Gross, H. Hannig, B. Haupt, A. Hoffmann, C. Hornig, W. Ju, C. Kaps, W. Lindenmaier, K. Littmann-Janßen, L. Macke, H. Mayer, S. Münch, M. Nimtz, S. Pohl, M. Rohde, D. Stellfeld, A. Tiephold, U. Wachtendorf, H. A. Weich, D. Wenzel, C. Wiethe, C. Wodarczyk

Ein molekulares Verständnis von Zellen, ihrer Interaktion untereinander und ihrer Architektur im gesunden Gewebeverband ist die Voraussetzung für sowohl die frühe Erkennung als auch die erfolgreiche Behandlung von Krankheiten. Erst der Einsatz von multidisziplinären Methoden ermöglicht eine Identifizierung von neuen diagnostischen Krankheitsmarkern sowie die Entwicklung moderner, erfolgreicher Therapieverfahren im Sinne einer molekularen Medizin.

Innerhalb dieses Projektes werden zelluläre Systeme untersucht wobei die Rolle von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie ihr Einfluß auf die Rezeptorsignalwege, die Organisation der intrazellulären Transportwege im Vordergrund stehen. Zusätzlich zu diesen grundlegenden zellbiologischen Fragestellungen werden Projekte bearbeitet, die zum besseren Verständnis des *ex vivo* Wachstums von primären und genetisch veränderten Zellen für die Human-Therapie führen; dies geschieht in enger Anbindung an klinische Einrichtungen.

Neue mikroanalytische Techniken zur Identifizierung von Veränderungen von Polypeptiden in pathophysiologischen Situationen sowie während der *ex vivo* Kultivierung von primären Zellen werden entwickelt die den Zugang zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen bilden.

Osteogenese

Prozesse, die die Regeneration von Bindegewebe und von Knochen regulieren, werden durch G. Gross und H. Mayer untersucht. Die Aufklärung und gezielte Veränderung von Signalkaskaden (Liganden, Rezeptoren, Signalmediatoren, Transkriptionsfaktoren) in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen (MSC's) wird bearbeitet und in *in vivo* und *in vitro* Maus- und Rattenmodellen überprüft. Die enge Zusammenarbeit mit klinischen Partnern zielt auf die Entwicklung von Zell-vermittelten Gentherapien von degenerativen Erkrankungen wie z.B. Osteoporose, rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis.

Angiogenese

Innerhalb dieses Projektes wird die Wechselwirkung angiogener Faktoren und deren Rezeptoren untersucht (H. Weich). Die Wechselwirkung rekombinanter und natürlich vorkommender löslicher Wachstumsfaktor-Rezeptoren wird in Zellulären Systemen und in einem transgenen Mausmodell untersucht. Weiterhin werden lösliche rekombinante Rezeptormoleküle verwendet um rekombinante Antikörper-Repertoires mittels Phage-Display Technologie zu erzeugen, die spezifische Zelloberflächenrezeptoren erkennen (T. Böldicke)

Cellular Models in Therapy and Diagnostics (SP 1.1)

The molecular understanding of cells, their interaction and the architecture of healthy tissues is a prerequisite for the treatment of diseases and the monitoring of clinical therapy. Multidisciplinary approaches are required to generate sufficient knowledge which ultimately may lead to the identification of new targets (diagnostics), the development of new drugs and novel successful therapeutic vectors based on molecular biology techniques.

Cellular models are being explored where the role of growth and differentiation factors and their receptors signaling pathways and the organisation of intracellular transport compartments are studied. This basic research programme is flanked by investigations aiming at the understanding of reproducible *ex vivo* growth of primary cells and genetically manipulated cells destined for clinical application and is performed in close collaboration with clinical institutions. New microanalysis techniques for the identification of malformed polypeptides in diseases and from *ex vivo* propagated cells are developed and are being used for the monitoring of alterations in differentiation and pathophysiological situations of cells and tissues.

Osteogenesis

Processes which regulate cartilage and bone regeneration are investigated in this project (G. Gross and H. Mayer). The elucidation and the intentional modification of signaling cascades (ligands, receptors, signaling mediators, transcription factors) in human and murine mesenchymal stem cells (MSCs) are assessed *in vitro* and *in vivo* in animal mouse and rat models. In collaboration with clinical partners, this is aimed at a cell-mediated gene therapy of degenerative skeletal diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Angiogenesis

In this project the interaction of angiogenic factors and their receptors is investigated (H. Weich). In more detail, the interaction of recombinant and naturally occurring soluble growth factor receptors with their ligand family is analyzed in cellular systems and controlled using a transgenic mouse model. Furthermore, native soluble receptor molecules are produced and applied for the generation of recombinant antibody repertoires recognizing specific cell surface receptors by the phage display technology (T. Böldicke). These novel tools will be used for primary cell sorting, staining and isolation of progenitor cells.

Biology of Primary and Recombinant Dendritic Cells for Immunotherapy

The functional and molecular properties of dendritic cells of various differentiation states are not understood in great detail. Within this project, human monocyte derived dendritic cell populations prepared by *in vivo* differentiation protocols are being isolated and characterised (K. Dittmar) from healthy individuals and tumour patients with respect to cell surface markers, capacity of pinocytosis/phagocytosis, interaction with bacteria and adenoviruses (gene delivery systems) by using confocal and electron microscopic techniques as well as detailed cell sorting approaches. These investigations are basic for subsequent application of GMP production of gene-modified dendritic cells destined for clinical application e.g. in tumour therapy.

Biologie primärer und rekombinanter dendritischer Zellen

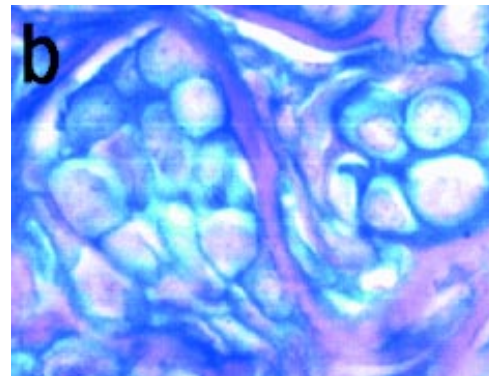
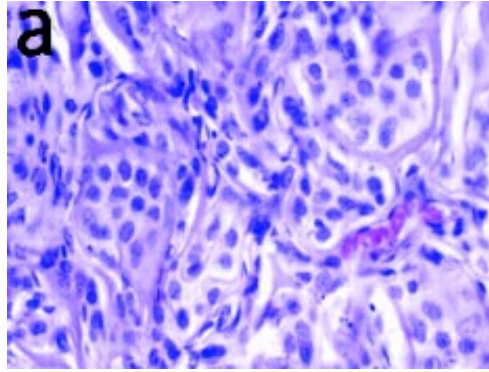
Die molekularen und funktionellen Eigenschaften humaner dendritischer Zellen sowie ihre verschiedenen Differenzierungsstadien sind bisher wenig verstanden. Innerhalb dieses Projekts werden aus humanen monocytären Zellpopulationen isolierte dendritische Zellen von gesunden Spendern und Tumorpatienten durch *in vivo* Differenzierungsprotokolle gewonnen und charakterisiert (K.E.J.Dittmar). Dabei werden Oberflächenmarker, Pinocytose/Phagocytose, die Interaktion mit Bakterien und Adenoviren (gene delivery system) durch konfokale und elektronenmikroskopische Techniken analysiert sowie durch Zellsortierungsmethoden. Diese Untersuchungen sind Grundlagen für die Anwendung von GMP-Produktionen von genetisch modifizierten dendritischen Zellen für die klinische Anwendung in Patienten z.B. in der Tumorthherapie.

Processing und Proteinmodifikation in Golgi-Subkompartimenten von gesunden und krankhaft veränderten Zellen

In erkrankten Geweben bzw. Zellen werden generell zahlreiche abberant modifizierte sekretorische Polypeptide oder Membranproteine beobachtet. Ein verändertes Polypeptid-processing oder eine veränderte Proteinglycosylierung weist auf Unterschiede in der Expression/Regulation der zellulären (ER- oder Golgi-lokalisierten) Modifikationsmaschinerie hin. Die Mechanismen des regulären Proteintransportes sowie die Regulation der Expression des Protein-modifizierenden Apparates der Zellen werden durch H.S.Conradt und Mitarbeiter studiert. U.a. wird die Proteindomänenstruktur von Golgi-lokalisierten Enzymen untersucht, wobei deren Beitrag zur korrekten Lokalisation der Enzyme, ihr Turnover in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen sowie in Differenzierungsvorgängen untersucht. Es werden neben der Anwendung rekombinanter Methoden hochsensitive MS/MS-MS Techniken entwickelt um neue Komponenten bzw. akzessorische Proteine des zellulären Golgisystems zu identifizieren. Darüberhinaus dienen die neuen Techniken zur Erkennung von „falschen“/abberant modifizierten Polypeptiden aus Spuren von Körperflüssigkeiten oder Geweben von Patienten.

Organisation of the Protein Modifying Machinery of Golgi Subcompartments in Diseases

Abberantly modified secretory or membrane bound polypeptides are generally observed in disease states. Altered glycosylation may indicate differences in glycosyltransferase expression or regulatory defects in the secretory pathway (ER, Golgi compartments) of cells. The organisation of the cellular machinery for transport and posttranslational modification of polypeptides is studied through the analysis of polypeptide domains of golgi glycosyltransferases that mediate correct in vivo functional subcompartmental targeting of the different enzymes, their turnover in differentiation and various diseases using recombinant techniques. Highly sensitive micro MS/MS-MS techniques are applied for the identification of new components/ accessory proteins of the Golgi apparatus as well as of malformed/aberrantly modified proteins in disease states using 2D-PAGE at the polypeptide level.



Transkriptionsfaktor-abhängige (T-Box Familie) Bildung proliferierender Chondrozyten und Knorpel in mesenchymalen Vorläuferzellen in den Abdominal-Muskel einer Maus (in Zusammenarbeit mit D. Gazit, Hebrew University, Jerusalem)

a. HE-Histologie
b. Alcian Blue Histologie

T-box transcription factor induced development of proliferating chondrocytes and cartilage from mesenchymal progenitors in vivo. Ectopic transplantation of engineered mesenchymal progenitors into the mouse abdominal muscle (in collaboration with D. Gazit, Hebrew University, Jerusalem).

a. HE-histology
b. Alcian Blue histology.

Publications | Veröffentlichungen

Bächner, D., Schröder, D., Betat, N., Ahrens, M., Gross, G.: Apolipoprotein E (ApoE), a Bmp-2 (Bone Morphogenetic Protein) Upregulated Gene in Mesenchymal Progenitors (C3H10T1/2), is Highly Expressed in Murine Embryonic Development, *BioFactors* 9 (1999) 11-17

Hornig, C., Behn, T., Bartsch, W., Yayon, A., Weich, H. A.: Detection and quantification of complexed and free soluble vascular endothelial growth factor receptor-1, *J. Immunol. Meth.* 226 (1999) 169-177

Grabenhorst, E., Conradt, H. S.: The Cytoplasmic, Transmembrane and the Stem Regions of Glycosyltransferases specify their in vivo functional sublocalization and stability in the Golgi, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36107-36116

Dittmar, K. E. J., Hiller-Holinka, C., Rohde, M., Dallmann, I., Lindenmaier, W., Weiß, S., Atzpodien, J.: Morphological Dynamics of Human Monocyte-derived Dendritic Cells, 2000, in press

Vektoren für die Gentherapie (SP 1.2)

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. J. Bode | Abt. Genregulation und Differenzierung | *Dept. of Gene Regulation and Differentiation*

Projektmitarbeiter | *Project members*: K.E.J. Dittmar, M. Wirth, U. Pägelow, W. Lindenmaier, D. Spitzer, J. Unsinger, H. Hauser, A. Baiker, A. Knopp, A. Baer, S. Goetze, M. Nourbaksh, A. Oumard, A. Kröger, P. Müller, E. Verhoeven

Das molekulare Verständnis von Krankheiten bildet die Grundlage neuer gentherapeutischer Behandlungsverfahren. Der Erfolg derartiger Ansätze hängt von geeigneten Vektoren ab, die eine effiziente, regulierbare und sichere Genexpression garantieren. Die Wahl des Vektorsystems wird nach wie vor durch die Art der Zielzelle und den Applikationsweg vorgegeben. Dabei sind die Besonderheiten der jeweiligen Therapieform zu berücksichtigen, die in einer kurzzeitigen Stimulierung des Immunsystems oder – bei Erbkrankheiten – in der andauernden Genkorrektur bestehen können. Diesen unterschiedlichen Anforderungen wird durch Arbeiten an drei Vektortypen, d.h. adenoviraler, episomaler und retroviraler Vektoren, Rechnung getragen. Bei den Entwicklungen stehen Stabilität, Reproduzierbarkeit und regulierte Genexpression im Vordergrund.

Vektorsysteme

Adenovirale Vektoren

Rekombinante Adenoviren erlauben den effizienten Transfer von Genen in eine Vielfalt ruhender oder sich teilender Zelltypen. Für die Konstruktion wird das hier entwickelte Adenocosmid-System eingesetzt. Zur Immuntherapie wurden verschiedene Expressionskassetten für Tumorantigene und Reportergene in die Vektoren eingeführt. Weiter wurden Expressionsvektoren für Faktoren der Knochenentwicklung und Gefäßbildung hergestellt. Zur koordinierten und regulierten Expression mehrerer Gene wurden verschiedene IRES-Elemente (s.u.) und regulierte Promotoren eingeführt, um den Vektor den jeweiligen Bedürfnissen anzupassen. Die Herstellung immuntherapeutischer Vektoren nach cGMP Richtlinien wurde in Angriff genommen.

Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren murinen Ursprungs infizieren ausschließlich teilende Zellen, haben jedoch den Vorteil einer stabilen

Integration in transkriptionsfördernde loci der Empfängerzelle. Sie erfüllen damit die Grundvoraussetzungen für eine langanhaltende, hohe Expression. Zur möglichen künftigen Anwendung am Menschen haben wir Complement-Resistenzproteine in die der viralen Hülle ('envelop') eingebettet, die Viruspartikel vor einer Inaktivierung durch Komponenten des humanen Serums schützen. Parallele Arbeiten haben gezeigt, dass die Expressionseigenschaften retroviraler Vektoren durch Anfügen von Kernmatrix-Erkennungsstellen (S/MARs) verbessert werden können, da die sonst typische Inaktivierung retroviraler Sequenzen durch Methylierung unterbunden wird.

Episomale Vektoren

Um eine langfristige Expression zu erreichen, ohne die potentielle Gefahr einer Insertionsmutagenese einzugehen, haben wir eine neue Klasse episomaler Vektoren entwickelt und patentiert. Konstrukte, in denen der SV40 Replikationsursprung durch ein S/MAR-Element unterstützt wird, zeigen auch ohne Selektionsdruck und in Abwesenheit viraler Faktoren eine extrachromosomale Replikation. Wir konnten zeigen, dass das S/MAR Element den Vektor an die Kernmatrix lenkt und damit seine Vervielfältigung und Segregation durch den zellulären Replikationsapparat ermöglicht.

Vectors for Gene Therapy (SP 1.2)

Understanding the molecular mechanism of human disease provides the basis for novel gene-based therapies. Presently, this approach suffers from a lack of vector systems for efficient, regulated, safe and reproducible gene expression. According to current knowledge, the choice of a vector system is still dictated by the nature of the target cell and the conditions of its application. The requirements for the gene transfer systems vary widely depending on the specific needs of the therapeutic application, e.g. short term stimulation for immunotherapy or long term gene correction for inherited diseases. To meet these needs three types of gene transfer vectors - retroviral vectors, episomal DNA vectors and adenoviral vectors- are investigated. In addition the question of stability, reproducibility and regulation of gene expression is addressed.

Vector Systems

Adenoviral Vectors

Adenoviral infection can be used for efficient gene transfer into a large variety of resting and dividing cells. To construct recombinant adenoviruses for gene therapy projects, we used our adenocosmid system. Various expression cassettes encoding tumor antigens, immunomodulatory genes and reporter genes were cloned for immunotherapy. In addition, vectors encoding proteins relevant to bone morphogenesis and angiogenesis have been produced. For coordinated and regulated expression of multiple genes IRES-elements and regulated promoters were introduced to allow the flexible adaption of the vectors to a given application. For use in immunotherapy adenoviral vector production has been initiated in compliance with cGMP regulations.

Retroviral vectors

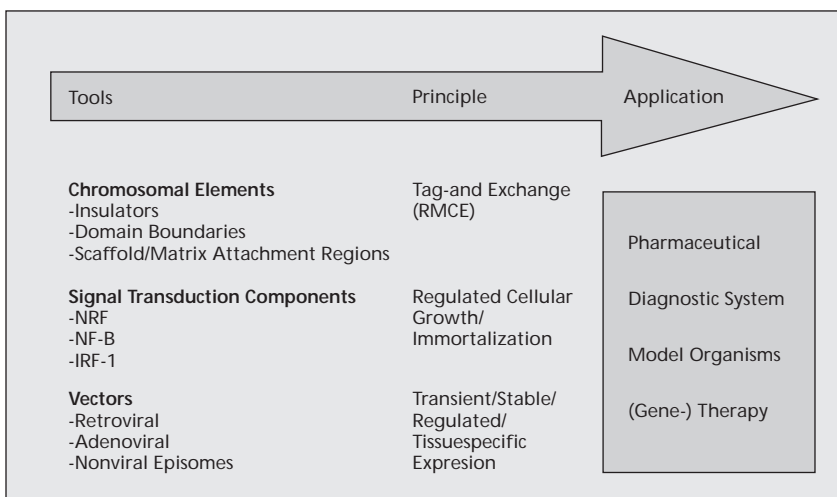
Vectors derived from murine retroviruses infect dividing cells only but have the benefit of stable integration into the host genome at transcriptionally active loci. This is one prerequisite for a long-term and high level expression. For use in human therapeutic applications we have engineered complement resistance proteins (CRPs) to the viral envelope that protect viral particles from inactivation by human serum. We have also demonstrated that long-term recombinant gene expression can be improved by the addition of nuclear matrix targeting elements (S/MARs) to the transgene to prevent methylation-dependent inactivation mechanisms .

Episomal DNA Vectors

To achieve long-term stable expression while avoiding any modifications of the host genome we have developed and patented an entirely new class of episomal vectors. Stable extrachromosomal maintenance in the absence without the requirement of vitally encoded factors and in the absence of selection pressure is provided by constructs in which the SV40 origin of replication is supported by a scaffold/matrix attachment region (S/MAR; see below). The S/MAR element results in the association of the vector with the nuclear matrix enabling its propagation and correct segregation in the complete absence of viral proteins.

Abb.1. Zielsetzungen im Projekt 1.2 „Vektoren für die Genterapie“.

Fig. 1. Conceptual background of the vectors group.



Regulation der Genexpression

Reproduzierbare Expression in autonomen Chromatindomänen

Der Interferon-Gencluster auf Chromosom 9 stellt einen der instabilsten genomischen Orte des Menschen dar. Deletionen in diesem Bereich sind Ursache zahlreicher Krebsformen. Die intakten Mitglieder unter den 26 Genen unterliegen einer strikten Regulation: durch virale Infektion wird schnelle Induktion der ansonsten völlig ruhiggestellten kodierenden Sequenzen erreicht. Sowohl die genomische Instabilität als auch die Transkriptionshöhe stehen in ursächlichem Zusammenhang mit den Matrix-Anheftungsstellen (S/MARs), die individuelle Transkriptionseinheiten voneinander isolieren. In Zusammenarbeit mit dem GBF-Sequenzierungszentrum und biomathematischen Einheiten der USA und Deutschlands wurden Algorithmen entwickelt, die die Lokalisierung funktionaler Gendomänen auf der Grundlage von DNA-Strukturanalysen erlauben. Hochexprimierte Chromatindomänen stellen attraktive genomische Orte zur gezielten Integration von Transgenen dar. Wir haben ein Kassettenaustauschverfahren (RMCE, Abb. 2) entwickelt, das die Insertion beliebiger Gene an zuvor charakterisierten und markierten Stellen erlaubt (zum Patent angemeldet).

Multicistronische Genexpression in Säugerzellen

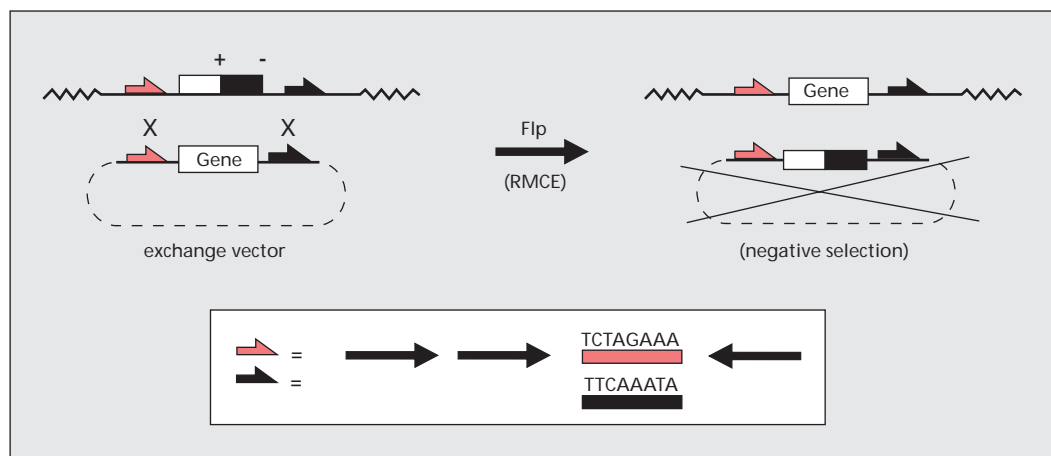
Die Möglichkeit, eine synchrone Expression zweier Proteine (bzw. deren Untereinheiten) zu erreichen, ist Ausgangspunkt für neue Vektorentwicklungen. Interne ribosomale Eintritt-Stellen (IRES-Elemente) viraler Herkunft waren die ersten Werkzeuge zur gleichzeitigen Translation mehrerer Proteinketten von einer mRNA. Kürzlich wurden IRES-Elemente auch in der Nähe zellulärer Gene entdeckt und deren Aktivität in den mRNAs des NRF (s.u.) und der Glucosamin-6-phosphat-Isomerase nachgewiesen. Diese Elemente werden seither zur Konstruktion von Vektoren zur Co-expression von Proteinen für biotechnologische und medizinische Anwendungen eingesetzt.

Faktoren im Interferon-Signalweg

NF-6B, ein Faktor, der als Antwort auf Pathogene unterschiedlichen Ursprungs ausgeschüttet wird, reguliert die Induktion von Cytokinen in zahlreichen Entzündungs- und Abwehrreaktionen, darunter Interferon β (IFN- β). Wir haben einen Faktor, NRF, identifiziert, der die konstitutive Repression des IFN- β Promoters vermittelt. NRE, die Erkennungssequenz für NRF, wird in mehreren entzündungsabhängig regulierten Genen gefunden. Daher ist davon auszugehen,

Abb. 2. Das hier entwickelte Kassettenaustausch-Prinzip zur gezielten Modifikation bestimmter genomischer Orte.

Fig. 2. The cassette exchange (RMCE-) Principle enables the modification of genomic targets without introducing auxiliary sequences.



Regulation of Gene Expression

Reproducible Gene Expression in Autonomous Chromatin Domains

The human interferon (huIFN) gene cluster represents one of the most unstable human genomic loci giving rise to oncogenic deletions. At the same time the 26 encoded genes are stringently regulated: whereas no constitutive transcriptional activity is detected, virus infection results in a drastic rapid induction. Both, genomic instability and transcriptional activity depend on scaffold- or matrix attached regions (S/MARs) which function to support transcription and delimit regions of transcriptional activity. In a cooperation with the GBF sequencing center and Biomathematics departments worldwide, algorithms are being developed to allow the prediction of functional domains based on dominant higher order DNA structures. Once highly expressed chromatin domains have been characterized, they represent attractive sites for the targeted integration of transgenes. A cassette-replacement technique has been developed to routinely allow the targeted insertion of genes at any genomic location.

Multicistronic Gene Expression in Mammalian Cells.

Co-expression of two proteins is a frequent need for the improvement of vectors. Viral elements (internal ribosomal entry sites, IRES) were the first tools which could be used to achieve coordinated translation of multiple proteins from a common mRNA. Highly efficient IRES elements were also detected in the cellular NRF mRNA (see below) and a type III IRES was characterized in Glucosamine-6-phosphate isomerase mRNA. These elements have been used for the construction of vectors for the coordinated expression of multiple proteins in biotechnological and medical applications.

Interferon Signaling Molecules

Consistent with a role of NF- κ B in pathogen responses it regulates inflammatory and protective cytokine induction such as for IFN- β . We have identified a factor (NRF) that is required for the constitutive repression of the IFN- β promoter. The sequence bound by NRF, the NRE, is part of many genes relevant to inflammation. Therefore, NRF is essential for preventing constitutive or proinflammatory protein expression.

IFNs are presently investigated as tumor therapeutics in clinical trials. The downstream effector IRF-1 induces many of the IFN specific effects and has tumor-suppressive activities. The anti-tumorigenic effects are validated in transgenic mouse models. In addition, proliferation-control systems based on IRF1 have been established in cell lines of medical and biotechnological relevance.

Transgenic Pigs for Xenotransplantation

Presently there is an acute shortage of donor organs to treat patients with acute liver failure, heart failure and others. An attractive strategy to compensate for the shortage of human donor organs would be the use of xenotransplants. The major barrier to this procedure is hyperacute rejection by the host. We have genetically modified pigs to express complement regulatory proteins by microinjecting DNA constructs into the pronuclei of pig zygotes but experienced unpredictable expression characteristics caused by their uncontrolled integration. We are therefore in the process of using the above-mentioned cassette-replacement techniques on regenerative pig cells for a targeted insertion into pre-characterized genomic loci to achieve predictable expression.

dass NRF die Expression dieser Gene unterdrücken kann. Interferone werden in zahlreichen klinischen Studien als Tumor-Therapeutika getestet. Viele durch IFN ausgelöste Effekte werden durch einen Faktor IRF-1 ausgelöst, der als solcher Tumor-supprimierende Eigenschaften aufweist. Diese Eigenschaften werden mit Hilfe transgener Mäuse validiert. Darüber hinaus wurden auf der Grundlage von IRF-1 Proliferationskontrollsysteme in Zelllinien mit medizinischem bzw. biotechnologischem Potential angelegt.

Transgene Schweine als Organdonoren für Transplantationszwecke

Die Behandlung von Patienten mit akutem Versagen von Leber, Herz und anderen Organen muss aufgrund Mangels geeigneter Spenderorgane häufig unterbleiben. Eine attraktive Strategie, den Mangel an Spendern auszugleichen besteht im Einsatz von Organen tierischer Herkunft. Allerdings scheitert dies bisher an Abstoßungsreaktionen des Empfängers ('hyperacute rejection'). Durch Mikroinjektion von DNA Konstrukten in Zygoten-Vorkerne haben wir transgene Schweine erzeugt, die humane CRPs (Complement-regulierende Proteine) exprimieren. Erste Erfahrungen mit diesem System zeigen die unvorhersagbare Expression infolge unbestimmter Integrationsorte. Daher wird gegenwärtig die oben beschriebene Kassetten-Austauschtechnik (RMCE) an regenerativen Schweinezellen eingesetzt, um durch gezielten Einbau eine verlässliche Expression zu erreichen (Abb. 2).

Veröffentlichungen | Publications

Seibler, J., D. Schübeler, S. Fiering, M. Groudine, J. Bode: DNA cassette exchange mediated by FLP recombinase: An efficient strategy for the repeated modification of tagged loci by marker-free constructs, *Biochemistry (accelerated publication)* **37** (1998) 6229-6234

Kirchhoff, S., H. Hauser: Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis, *Oncogene* **18** (1999) 3725-3736

Nourbakhsh, M., H. Hauser: Constitutive silencing of IFN- β promoter is mediated by NRF (NF-6B repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-6B, *EMBO J.* **18** (1999) 101-111

Spitzer, D., H. Hauser, D. Wirth: Complement resistant amphotropic retroviruses from murine packaging cells, *Hum. Gene Ther.* **10** (1999) 1893-1902

Bode, J. C. Benham, A. Knopp, C. Mielke: Transcriptional Augmentation: Modulation of Gene Expression by Scaffold/Matrix Attached Regions (S/MAR Elements), *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **10** (2000) 73-90



Zell-, Gewebe- und Organkulturtechnik (SP 1.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. R. Wagner | Arb. Gr. Zellkulturtechnik | *Res. Group of Cell Culture Technology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: A. Bader, Barthold, U. Bilitewski, C. Fortmann, C. Griesel, F. Hesse, V. Jäger, L. Just, C. Priesner, E. Schmelzer, F. Stahl, A.-P. Zeng

Im Projekt wird die *in vitro* Rekonstitution von organotypischen Geweben aus Einzelzellen oder Zellverbänden verfolgt (Tissue Engineering). Der *ex vivo*-regenerierte bioartifizielle Gewebeersatz soll zum therapeutischen Einsatz bei der Behandlung eines Organversagens sowie zur Reimplantierung eingesetzt werden. Darüber hinaus dienen die Arbeiten einer Erweiterung des grundlegenden Verständnisses vom Zusammenspiel komplexer Zellsysteme zur Generierung neuer Konzepte bei der Organentwicklung und der Entwicklung spezifischer Pharmazeutika. Die Hauptaktivitäten fokussieren auf die beiden Organsysteme Leber und Knochen, mit denen die angestrebten Ziele (Leber: Organversagen, Pharmatest / Knochen: Reimplantat) bearbeitet werden.

Tissue Engineering bei Hepatocysten

Alle Arbeiten strebten zunächst die Optimierung der Kulturbedingungen in speziellen Bioreaktorsystemen an. Eine Kontrolle der Zellen erfolgte hierzu bei embryonalen Ratten-Hepatocysten über den Zustand der Differenzierung mit Hilfe der leberspezifischen Proteinsekretion, der Cytochrom P450-Aktivität und des Phase-II-Stoffwechsels. Ein wichtiger Schritt war die Charakterisierung der expandierten Leberzellen durch immunocytochemische Methoden, RT-PCR sowie fluorimetrische Untersuchungen der Cytochrom P450 Aktivität. Die Ergebnisse fließen in die Neuentwicklung eines leberspezifischen DNA-Chips, welcher die gleichzeitige Expressionsanalyse von bis zu 200 leberspezifischen Genen zur Ermittlung des physiologischen Status erlauben soll. In diesem Zusammenhang wurde daher für die spätere Identifizierung funktionaler Gene der Differenzierung die Etablierung von Methoden zum Nachweis definierter Gensequenzen bzw. Mutationen zur Übertragung in Mikrochips angegangen. Vorarbeiten hierzu fanden am Modell der Punktmutation für den humanen Faktor V statt. Hierbei wurde insbesondere die Anwendbarkeit der Kapillarelektrophorese zum Nachweis von PCR-Produkten bzw. Restriktionsverdau-Fragmenten untersucht. Durch dynamische Beschichtung von unbehandelten Kapillaren mit speziellen Polymeren konnten verschiedene Genfragmente präzise voneinander getrennt und damit

der Nachweis der Mutation eindeutig geführt werden.

Auf der Proteinebene wurde insbesondere das Potential der Proteomanalyse mit Hilfe verschiedener primärer und immortalisierter Maus – und Rattenhepatocysten für eine Anwendung in *in vitro* Testsystemen zur Charakterisierung neuer pharmazeutisch wirksamer Substanzen evaluiert. Hierzu wurden zunächst definierte Kulturen auf Basis serumfreier Nährstoffmedien etabliert. Anhand einer immortalisierten humanen Hepatocysten-Zelllinie wurde die Kultivierung in serumhaltigem und proteinfreiem Medium vergleichend untersucht und deutliche Veränderungen in der Proteinexpression während und nach vollendeter Adaptation gefunden sowie für spätere Anwendungen charakterisiert. Die hier gewonnenen Erfahrungen sollen später in die Entwicklung von Protein-Mikrofluidikchips einfließen. Weitere Vorarbeiten hierzu wurden parallel durch die Etablierung eines nicht-radioaktiven Nachweises phosphorylierter Peptide (Peptide als Kinasesubstrate) und Proteine getätigt.

Cell, Tissue, and Organ Culture Technology (SP 1.3)

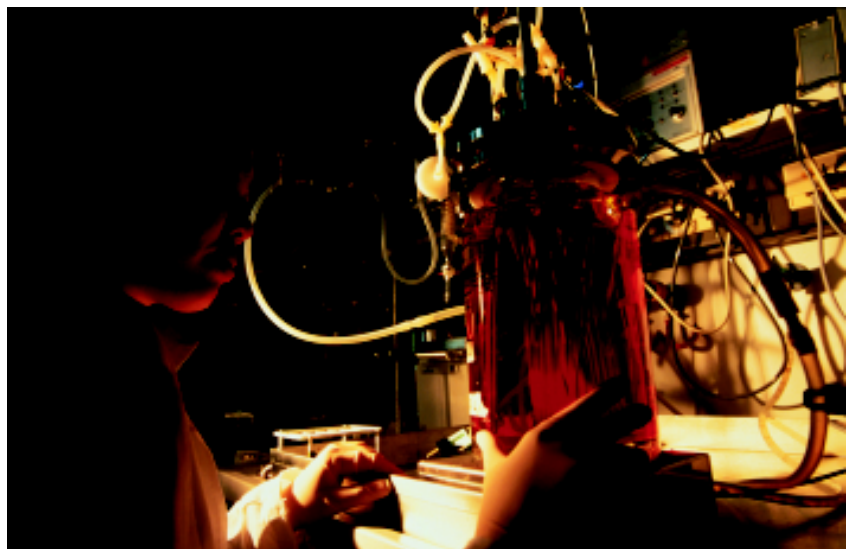
Aim of the project is the in vitro reconstitution of organ-like tissues from single cells or cell compositions (Tissue Engineering). The ex vivo regenerated bioartificial tissue substitute shall be used for reimplantation as well as for the treatment of organ failure. Moreover, the activities serve to increase the basic knowledge of the cooperation of complex cell systems to generate new concepts for the development of organs and specific pharmaceuticals. The main activities focus on the two organ systems liver and bone to achieve the aims (liver: organ failure, pharmatests / bone: reimplantation)

Tissue Engineering with Hepatocytes

As a first aim, all tasks endeavored to optimize the culture conditions in special bioreactor systems. To control the cultivated cells rat hepatocytes were monitored by primarily tissue differentiation parameters including the liver-specific protein secretion, the cytochrome P450 activity and the phase-II metabolism. The first step of our investigations was the characterization of the generated hepatocytes by immunocytochemistry, RT-PCR and flourometric analysis of the cytochrome P450 activity. The results will be used for the development of a DNA chip system based on liver-specific genes, which will become a new important tool to investigate the differentiation of the engineered cells. For future identification of functional genes of the differentiation we started to establish methods for the determination of defined gene sequences and mutations. Using the point mutation of the human factor V as a model the applicability of capillary electrophoresis was investigated for the detection of PCR products and restriction fragments. A mixture of special polymers was found to result in a reliable dynamic coating of originally uncoated capillaries leading to a reproducible separation of fragments. At the level of protein expression the potential of proteome analysis was evaluated for its application in in vitro assay systems for the characterization of new pharmaceuticals using different primary and immortalized mouse and rat hepatocytes. At first, defined cell cultures based on serum-free media were established. Cultivations of the immortalized human hepatocyte cell line under serum-containing and protein-free media conditions were compared resulting in distinct changes of the protein expression pattern during and after adaptation of the cells. These results will be used together with those obtained from investigations of the non-radioactive detection of phosphorylated peptides (peptides as substrates for kinases) for the development of a protein microchip technology.

Reconstitution of bone tissue

The extracellular matrix (ECM) is an important factor for the reconstitution of bone tissue. In a close collaboration with project SP 1.1 (H. Mayer) we used extracts of an ECM component mixture derived from a human osteosarcoma cell line as coating material for the cultivation of embryonic primary osteoprogenitor cells from chicken. As a result the differentiation of the primary cells was accelerated under preserved proliferation rates. In addition, the culture medium as an additional important component for the control of proliferation and differentiation was further developed towards a defined composition. Several basic culture media supplemented with different cytokines, vitamins and hormones were combined for optimization. The growth of primary osteogenic cells from rat bone marrow cultured in either defined or serum-containing media was compared resulting in similar or higher viability for the cells growing under serum-free conditions. The development of defined culture conditions was also applied to the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells for potential application in bone marrow transplantation and in gene therapy.



Züchtung von Knochengewebe

Bei der Züchtung von Knochengewebe *in vitro* stellt die extrazelluläre Matrix (ECM) der Zellen eine besonders wichtige Einflussgröße dar. In diesem Zusammenhang wurden in engem Verbund mit Projekt SP 1.1 (H. Mayer) Extrakte eines ECM-Komponenten-Gemisches aus einer humanen Osteosarkomzelllinie als Beschichtungsmaterial für die Kultivierung von primären Osteoblastenvorläufern aus Knochenmark des embryonalen Huhns eingesetzt. Hierdurch konnte unter Erhalt der Proliferationsraten eine Beschleunigung der Differenzierung der Primärzellen erreicht werden. Außerdem wurde das Kulturmedium als eine weitere entscheidende Komponente zur Steuerung der Proliferation und Differenzierung von Osteoblastenvorläufern in Richtung auf eine definierte Zusammensetzung hin entwickelt. Zur Optimierung eines serumfreien Mediums mit hohem mitogenen Potential wurden verschiedene Basalmedien sowie unterschiedliche Cytokine, Vitamine und Hormone kombiniert. Ein Vergleich des Wachstums primärer Rattenknochenmarks- und osteogenen Rattenzellen in serumhaltigem und serumfreiem Kulturmedium zeigte gleiche und zum Teil höhere Werte für die Vitalität unter serumfreien Bedingungen. Die Entwicklung definierter Kulturbedingungen wurde auch für die *ex vivo* Expansion hämatopoetischer Stammzellen zum Einsatz in Knochenmarkstransplantationen und in der Gentherapie verfolgt.

Veröffentlichungen | Publications

Bader, A., Frühauf, N., Tiedge, M., Drinkgern, M., Zech, K., Borlak, J., Steinhoff, G., Haverich, A.: Enhanced oxygen delivery reverses anaerobic metabolic states in prolonged sandwich rat hepatocyte culture, *Exp. Cell Res.* **246** (1999) 221-232

Hesse, F., Scharfenberg, K., Wagner, R.: Cryopreservation under protein-free medium conditions: A reliable way to safe cell banking. In: *Animal cell technology: Products from cells, cells as products* (Bernard, A., Griffiths, B., Noé, W., Wurm, F., eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/NL, 1999, pp. 501-503

Irani, N., Wirth, M., van den Heuvel, J., Wagner, R.: Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction, *Biotechnol. Bioeng.* **66** (1999) 238-246

Zeng, A.-P., Deckwer, W.-D.: Model simulation and analysis of perfusion cultures of animal cells at high cell density, *Biotechnol. Prog.* **15** (1999) 373-382

Hansen, T., Borlak, J., Bader, A.: Cytochrome P450 enzyme activity and protein expression in primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures, *Xenobiotica* **30** (2000) 27-46





Koordinator | *Coordinator*: Prof. Dr. G. S. Chhatwal | Abt. Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung | *Dept. of Microbial Pathogenicity and Vaccine Research*

Pathogenitätsforschung und Vakzinentwicklung (SP 2)

Infektionen sind die häufigsten Krankheitsursachen und weltweit die Ursache für die meisten Todesfälle. Dies gilt auch für die Industrienationen, obwohl im Vergleich zu den Entwicklungsländern die Folgeerscheinungen hier weniger dramatisch sind. Als Folge der früheren Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen wichtige Krankheitserreger, wie zum Beispiel das Polio- und Pockenvirus sowie den Diphtherieerreger, und der Verfügbarkeit anfänglich hochwirksamer Antibiotika wurde die Erforschung der Infektionskrankheiten in neuerer Zeit zugunsten der Erforschung anderer Krankheiten wie Krebs- und Herz-Kreislaufkrankungen zurückgedrängt.

Durch den massiven Einsatz von Antibiotika treten bei vielen pathogenen Keimen mittlerweile Antibiotikaresistenzen auf, die die kontinuierliche Entwicklung neuer Antibiotika erforderlich machen. Zusätzlich gewinnen aufgrund der Veränderungen unseres heutigen Lebensstils und Soziallebens "neue" Erreger, wie Legionella und HIV, große Bedeutung. Ein weiteres Problem sind körpereigene Reaktionen auf die Infektion, darunter Autoimmunerkrankungen, die als Folge von Infektionen mit z.B. Streptokokken, Borrelien, Mykoplasmen vorkommen können. Die Probleme Infektions- und Folgeerkrankungen sind also keineswegs gelöst.

Die Präventivmedizin bietet angesichts der steigenden Behandlungskosten vielversprechende Perspektiven für eine medizinisch und ökonomisch effektive Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Die Entwicklung neuer Impfstoffe setzt

ein detailliertes Verständnis der Abläufe von Infektionskrankheiten voraus. Dieses beinhaltet die Natur und die Funktionen der Virulenzfaktoren, ihre Wechselwirkungen mit Wirtszellkomponenten, die Reaktionen des spezifischen und nicht spezifischen Immunsystems und die genetische Veranlagung des Wirts.

Das Ziel des Schwerpunktes ist es, Pathogenitätsmechanismen und Wirtsabwehrreaktionen besser zu verstehen. Schwerpunktmäßig werden pathogene Keime der Schleimhäute in Verbindung mit dem Schleimhautimmunsystem bearbeitet. Die aus dieser Forschung gewonnenen Ergebnisse sollen dem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt im Verlauf eines Infektionsprozesses dienen. Unter anderem sollen diese Erkenntnisse zur Entwicklung und Herstellung neuer effektiver Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten verwendet werden. Darüber hinaus wird die genetische Basis der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung genauer untersucht, um neue Strategien zur Bekämpfung der Infektionskrankheiten zu entwickeln.

Pathogenicity and Vaccine Research (SP 2)

Infections are the major cause of disease and death worldwide. The development of effective vaccines against important diseases such as polio, smallpox and diphtheria, and the availability of highly effective antibiotics, resulted in a shift of public interest from infectious diseases towards other medical problems like cancer and heart disease.

Due to the extensive use of antibiotics several pathogens have developed antibiotic resistance which requires the continuous development of new antibiotics. Furthermore, due to the changes in our lifestyle “new” pathogens like Legionella and HIV have become serious problems of public health. Another problem are autoimmune diseases that are caused by pathogenic bacteria like streptococci, borrelia, and mycoplasma and which affect especially people who are genetically predisposed to these diseases. Therefore, the problem of infectious diseases and their sequelae continues to be a serious public health threat.

As a result of increasing costs for the treatment of infectious diseases, the preventive medicine, i.e. vaccination, is an attractive perspective to control infectious diseases both efficiently and economically. The development of new vaccines however requires a detailed understanding of the processes that lead to infection. This comprises the nature and the function of virulence factors, their interaction with host cell components, the respective host immune response and the genetic predisposition of the host.

The goal of this research area is a detailed understanding of pathogenic mechanisms as well as the host defence system. Our research is focussed on pathogens of mucosal surfaces (infections of the respiratory and the intestinal tract) and the response by the mucosal immune system. The results obtained by our research shall lead to a better understanding of the interactions between pathogen and host during the infection process. This knowledge will be the basis for the development and production of new effective vaccines against these infectious diseases. Furthermore, the genetic basis of host-pathogen-interaction will be studied in detail in this research area in order to develop new strategies for prevention and control of infectious diseases.

Mechanismen pathogener Prozesse (SP 2.1)

Pathogenitätsfaktoren von Streptokokken und Pneumokokken

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. G.S. Chhatwal | Abt. Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung | *Dept. of Microbial Pathogenicity and Vaccine Research*

Projektmitarbeiter | *Project members*: B. Behrendt, U. Carl, U. Kärst, M. Krause, D. Monner, S. Pistor, A. Sechi, R. Frank, W. Tegge, D. Heinz ; in Zusammenarbeit mit T. Chakraborty, Univ. Gießen, B. Jokusch, TU Braunschweig

Infektionen sind weltweit die Ursache für die meisten Todesfälle. Trotz Verfügbarkeit verschiedener Antibiotika bleiben die Infektionen durch Streptokokken und Pneumokokken ein ernstes Gesundheitsproblem. Ziel dieses Projekts ist die Aufklärung der Infektionsmechanismen dieser Krankheitserreger durch Struktur: Funktions-Analyse von Pathogenitätsfaktoren und durch Untersuchungen der Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen

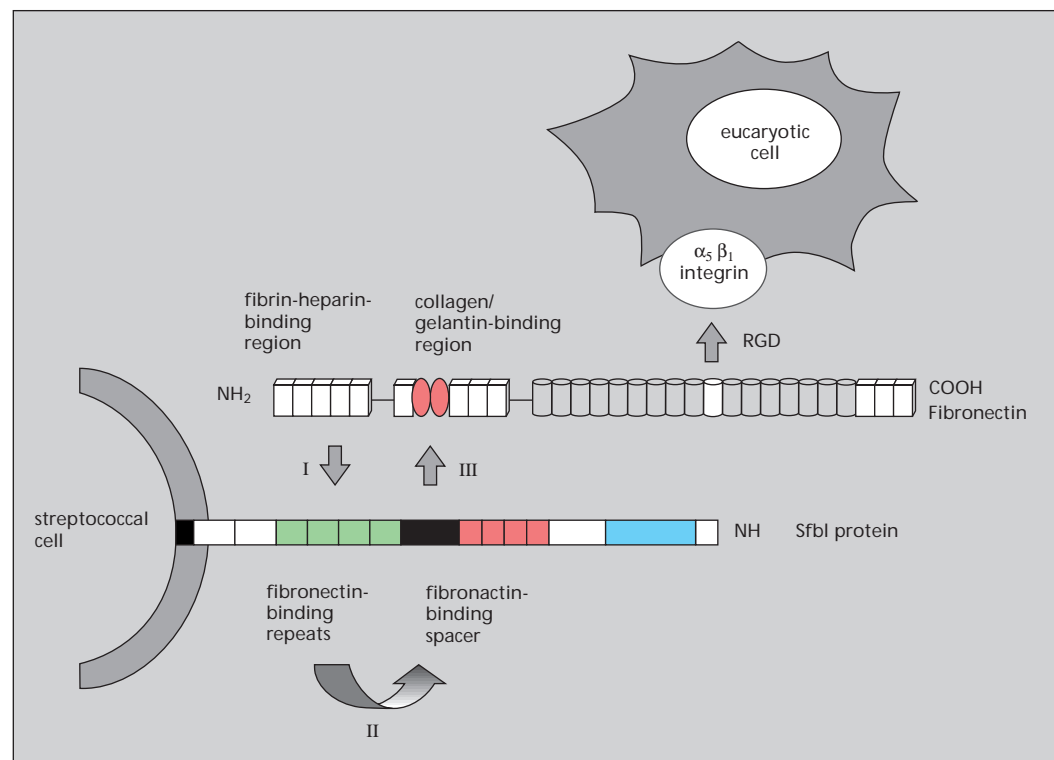
Aufklärung der Invasionsmechanismen bei Gruppe A Streptokokken

Gruppe A Streptokokken sind in der Lage, in Epithelzellen einzudringen und intrazellulär zu überleben. Invasion scheint ein wichtiger Pathogenitätsprozess zu sein, wodurch sich die Bakterien auch gegen die Wirkung von Antibiotika schützen können. Die Invasion der Streptokokken führt daher zur Persistenz der Bakterien im Wirt. Es ist bekannt, daß das SfbI Protein an Anheftung und Invasion der Streptokok-

ken beteiligt ist. Kürzlich haben wir zwei Domänen des SfbI Proteins identifiziert, wobei eine fibronectinbindende Repeat-Region für die Anheftung verantwortlich ist und die Spacer-Region zusammen mit der Repeat-Region an der Invasion beteiligt ist. Die Identifizierung der Spacer-Region als Invasionsfaktor ist für epidemiologische Studien von großer Bedeutung. Durch Sequenzanalyse konnten dann die persistierenden Stämme identifiziert werden.

Ein Modell für SfbI und fibronectinvermittelte Invasion der Streptokokken in Epithelzellen

A model depicting the mechanism of SfbI and fibronectin-mediated invasion of S. pyogenes in epithelial cells.



Mechanisms of Pathogenic Processes (SP 2.1)

Pathogenicity Factors of Streptococci and Pneumococci

Microbial infections are one of the major causes of human disease. In spite of the availability of antibiotics the infections caused by streptococci and pneumococci remain serious health problems. The aim of this project is the elucidation of infection mechanisms of these bacteria by structure: function analysis of their pathogenicity factors and by studying host-pathogen interactions.

Elucidation of invasion mechanisms of group A streptococci

Group A streptococci are capable of invading epithelial cells and of surviving intracellularly. Invasion seems to be an important pathogenicity process which also enables the bacteria to avoid the action of antibiotics. Invasion therefore leads to the persistence of streptococci in hosts. SfbI protein, a fibronectin binding protein of group A streptococci has been identified as an adhesin and invasin. We have recently identified two domains of SfbI protein, the fibronectin binding repeat region, which is required for adherence, and a spacer region, which, together with the repeat region, is involved in the invasion process. The identification of spacer region as an invasion factor is important for epidemiological studies, which will make it possible to identify persistent strains by sequence analysis.

A novel protective antigen of group B streptococci

Group B streptococci are the major cause of neonatal mortality. A surface protein of group B streptococci identified by us and designated R5 protein proved to be a protective antigen. Intranasal and intraperitoneal immunization of mice led to complete protection against challenge with a lethal dose of homologous and heterologous strains. R5 protein therefore seems to be a promising vaccine candidate.

The binding domain of secretory IgA binding protein SpsA from *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae belongs to the normal flora of human respiratory tract but can also cause serious invasive infections. We have described secretory IgA, the major antibody complex on mucosal surfaces, and SpsA protein of *S. pneumoniae*. By means of deletion derivatives of SpsA protein and overlapping peptides, we were able to identify a hexapeptide YRNYPT

as a sIgA binding motif. This motif is conserved in different serotypes and might therefore be important for developing a new vaccine.

Publications | Veröffentlichungen

Guzman, C. A., S. R. Talay, G. Molinari, E. Medina, G. S. Chhatwal: Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI, *J. Infect. Dis.* **179** (1999) 901-906

Hammerschmidt, S., P. Remane, G. Bethe, G. S. Chhatwal: Identification of the pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* **67** (1999) 1683-1687

Molinari, G., G. S. Chhatwal: Streptococcal invasion, *Curr. Opin. Microbiol.* **2** (1999) 56-61

Hammerschmidt, S., M. Tillig, S. Wolff, J.-P. Vaerman, G. S. Chhatwal: Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif, *Mol. Microbiol.* (2000), in press

Ein neuartiges Schutzantigen der Gruppe B Streptokokken

Die Gruppe B Streptokokken sind als Erreger von Hirnhautentzündungen in Neugeborenen von großer medizinischer Bedeutung. Das von uns identifizierte Oberflächenprotein der Gruppe B Streptokokken, genannt R5-Protein, erwies sich als ein Protektivantigen. Intranasale oder intraperitoneale Immunisierung der Mäuse führt zur vollständigen Schutz gegen Challenge mit letaler Dosis homologer und heterologer Gruppe B Streptokokken-Stämme. R5-Protein ist daher ein vielversprechender Impfstoffkandidat.

Das Bindungsmotiv für sekretorisches IgA Bindungsprotein SpsA von *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae gehören zur natürlichen Flora des oberen menschlichen Respirationstrakts, die aber auch in der Lage sind, ernste invasive Infektionen zu verursachen. Die spezifische Interaktion von sekretorischer IgA mit dem Oberflächenprotein SpsA von *S. pneumoniae* wurde von uns beschrieben. Unter Anwendung von Deletionsderivaten von SpsA-Protein und Spot-Membranen mit überlappenden Peptiden ist es uns gelungen, ein Hexapeptid YRNYPT als sIgA-Bindungsmotiv zu identifizieren. Dieses Motiv ist in verschiedenen Serotypen hochkonserviert und kann daher für die Entwicklung eines neuen Impfstoffs von Bedeutung sein.



Pathogenitätsmechanismen von Listerien

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. J. Wehland | Abt. Zellbiologie | *Dept. of Cell Biology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: B. Behrendt, U. Carl, L. Gröbe, U. Kärst, M. Krause, D. Monner, S. Pistor, A. Sechi, R. Frank, W. Tegge, D. Heinz

Listeria monocytogenes ist ein ubiquitär verbreitetes, Gram-positives Bakterium, das aufgrund seines intrazellulären Wachstums bei Mensch und Tier ernsthafte Infektionen hervorrufen kann. Neben der klinischen Relevanz stellen Listerien ein nahezu ideales Modellsystem sowohl für die Analyse von intrazellulärem Parasitismus als auch für die Aufklärung von Immunabwehrmechanismen dar. Nach Abschluss des Projekts zur Aufklärung der Genomsequenz von *L. monocytogenes*, wird die EU ab 2001 auch das Folgeprojekt über die funktionelle Genomanalyse von *L. monocytogenes* finanzieren. Die GBF ist an beiden Projekten beteiligt.

Molekulare Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt

Für die *in vivo* Analyse spezifischer Wirtszellproteine in einer mit Listerien infizierten Wirtszelle wurde die hochauflösende digitale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, um über das grünfluoreszierende Protein (GFP) als Fusionspartner die relevanten Proteine in einer Zelle quasi online zu verfolgen. Im Zusammenhang mit der Aktin-vermittelten intrazellulären Bewegung von Listerien konnten wir mit diesem experimentellen Ansatz zeigen, dass das Aktin-bindende Protein Profilin von Listerien rekrutiert wird, dass nur motile Listerien Profilin auf ihrer Oberfläche konzentrieren und dass die Menge an rekrutiertem Profilin direkt mit der Bewegungsgeschwindigkeit der Bakterien korreliert.

Intrazelluläre Listerien reorganisieren effizient über ihr ActA-Oberflächenprotein das Aktincytoskelett der infizierten Wirtszelle und nutzen dies für ihre intrazelluläre Bewegung aus. Bei der Suche nach ActA-Protein analogen Wirtszellproteinen identifizierten wir in einer embryonalen Mausgenexpressionsbank

das Fyb/SLAP Protein, dessen Vorkommen auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist und hier in der T-Zellrezeptorsignalkaskade involviert ist. Detaillierte Funktionsanalysen zeigten erstmalig, dass Fyb/SLAP ein wichtiges Bindeglied für die T-Zellrezeptor-vermittelte Aktinreorganisation im Verlauf der T-Zellaktivierung darstellt. Diese Beispiele belegen, dass die molekularen Analysen der Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt nicht nur ursächlich zum Verständnis des betreffenden Erregers beitragen, sondern dass diese Erkenntnisse, übertragen auf die Wirtszelle und den Wirtsorganismus, auch von grundlegender Bedeutung für komplexe zellbiologische und immunologische Fragestellungen sind.

Pathogenicity Mechanisms of *Listeria*

The Department of Cell Biology is focussing on *Listeria monocytogenes*, a ubiquitous Gram-positive bacterium, that due to its intracellular lifestyle can cause serious infections in both man and animal. In addition to its clinical relevance *Listeria* represent an ideal model system to analyse intracellular parasitism as well as to explore host immune defense mechanisms. Therefore the European Commission is not only financing a project for sequencing the genome of *Listeria monocytogenes* in which the GBF is involved and that will be finished at the end of 2000, but also a follow up project, that is focussing on the functional genome analysis of *Listeria monocytogenes*.

Molecular characterisation of the interactions between pathogens and the host

For in vivo analysis of specific host cell proteins to study their dynamics within an infected host cell. High resolution digital fluorescence microscopy was applied, that enables us to follow online the relevant proteins because of their linkage to the green fluorescent protein (GFP) within a cell. On the basis of our previous work on the actin-dependent intracellular motility of *Listeria* we were able to show that the actin-binding protein profilin is recruited by *Listeria*, whereby only motile *Listeria* concentrate profilin on their surface and that the amount of recruited profilin directly correlates with bacterial speed.

Considering the efficiency of intracellular *Listeria* to subvert and reorganize the actin cytoskeleton within an infected host cell which solely depends on the listerial surface exposed ActA-protein, we initiated a screen for host cell proteins, which mimic the functions of ActA. Using ActA-specific antibodies and a mouse expression library, we were able to identify the Fyb/SLAP protein. This protein is restricted to hematopoietic cells and in T-cell it is involved in T-cell receptor signalling. Our detailed functional analyses showed for the first time, that Fyb/SLAP is essential for the T-cell receptor-induced reorganisation of the actin cytoskeleton during the course of T-cell activation. These examples demonstrate that the molecular analyses of the interactions between pathogen and host not only contribute to our understanding of the respective pathogen, but also that this knowledge-being transferred to the host cell and organism-is of utmost importance to tackle complex cell biological and immunological problems.

Publications | Veröffentlichungen

Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Gertler, F. B., Carlier, M. F.: Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*, *J. Cell Biol.* **144** (1999) 1245-1258

May, R. C., Hall, M. E., Higgs, H. N., Pollard, T. D., Chakraborty, T., Wehland, J., Machesky, L. M., Sechi, A. S.: The Arp2/3 complex is essential for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*, *Curr. Biol.* **9** (1999) 759-62

Erck, C., Frank, R., Wehland, J.: Tubulin-tyrosine ligase, a long-lasting enigma. *Neurochem.*, in press

Geese, M., Schlüter, K., Rothkegel, M., Jockusch, B. M., Wehland, J., Sechi, A. S.: Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed, *J. Cell Sci.*, in press

Krause, M., Sechi, A. S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F. B., Wehland, J.: Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton, *J. Cell Biol.*, in press

Aufklärung des Phänotyps einer in seiner Funktion bisher unbekanntes Genes in *Salmonella typhimurium*

Projektleiterin | *Project leader*: Dr. U. Römling | Abt. NG Klonale Variabilität | *Dept. of Junior Research Group Clonal Variability*

Projektmitarbeiter | *Project members*: U. Gerstel, A. Kresse, X. Zogaj, W. Bokranz, J. Floßdorf

Der multizelluläre rdar Morphotyp kommt in natürlichen Isolaten von *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. vor. Der rdar Morphotyp ist geprägt durch die Ausbildung einer extrazellulären Matrix und äußert sich in einer Netzwerkstruktur der Bakterienkolonie auf Agarmedium, autoaggregativem Verhalten der Bakterien in Flüssigkultur und Biofilmbildung an abiotische Oberflächen.

Zwei divergent transkribierte *agf*-Operons, verantwortlich für die Biosynthese der dünnen, aggregativen Fimbrien, spielen eine zentrale Rolle in der Biofilmbildung. *AgfD* ist der positive transkriptionelle Regulator des gesamten multizellulären Verhaltens. Durch differentielle Transkriptionsanalyse wurde *adrA* (*agfD* regulated) als *agfD* reguliertes Gen in *S. typhimurium* identifiziert. *AdrA* ist ortholog zu *yaiC* in *E. coli*, über dessen Funktion und Phänotyp nichts bekannt ist. *AdrA* besteht aus einer *N-terminalen* Transmembrandomäne und einer *C-terminalen* GGDEF-Domäne, die in über 50 Proteinen von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien vorkommt. Transkriptionsanalysen zeigten, dass *adrA* unter den gleichen Umweltbedingungen wie der rdar Morphotyp exprimiert wird. *AdrA* ist für die Bildung einer unbekanntes, unstrukturierten extrazellulären Substanz verantwortlich. Diese Substanz vermittelt hauptsächlich elastische Zell-Zell-Interaktionen. Durch die Konstruktion einer Doppelmutante in *adrA agfBA* konnte gezeigt werden, dass *agfD* nur diese zwei Stoffwechselwege zu extrazellulären Substanzen vermittelt. Das bisher bekannte regulatorische Netzwerk zu extrazellulärem Verhalten ist in der Graphik abgebildet.

Durch die Untersuchung eines bisher wenig beachteten Verhaltens in *S. typhimurium* konnte der Phänotyp eines in seiner Funktion bisher unbekanntes Genes aufgeklärt werden. Dieses Gen enthält eine vermutlich regulatorische GGDEF-Domäne, die eine weitverbreitete, jedoch bislang unbekanntes Rolle in Stoffwechselwegen bei Prokaryonten innehat.

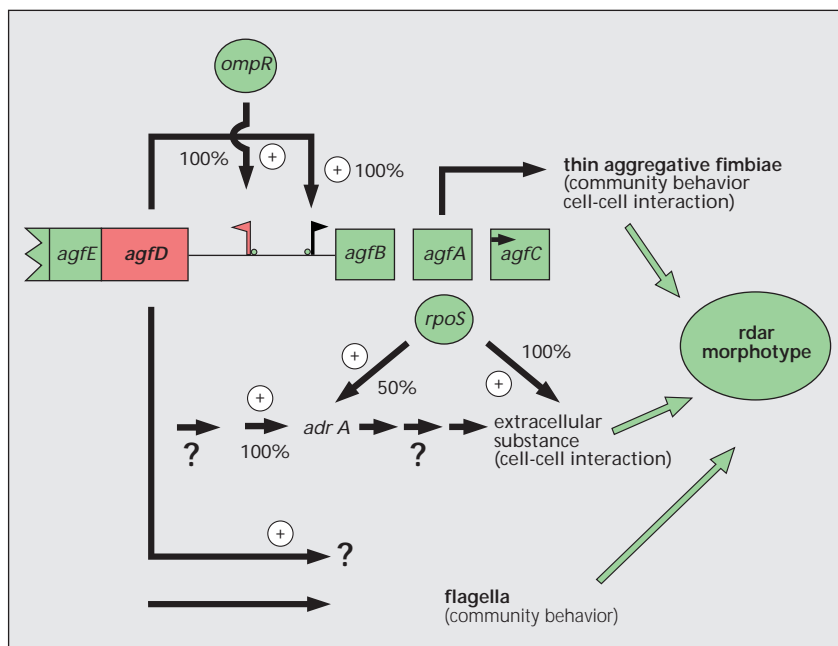
The Phenotype of a Gene with Unknown Function was Discovered in *Salmonella typhimurium*

The multicellular *rdar* morphotype is widely expressed among natural isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. It produces an extracellular matrix and is characterized by the network structure of the bacterial colony on agar plates, auto-aggregative behaviour of the cells in liquid culture, and biofilm formation on abiotic surfaces.

Two divergently transcribed *agf*-operons which control the biosynthesis of thin aggregative fimbriae play a central role in biofilm formation. *AgfD* is the positive transcriptional regulator which regulates also the whole multicellular behaviour. Differential transcription analysis identified *adrA* (*agfD* regulated) as *agfD* regulated in the *S. typhimurium* genome. *AdrA* is ortholog to *yaiC* in *E. coli* which is unknown in function and phenotype. *AdrA* consists of two domains, a N-terminal transmembrane domain and a C-terminal GGDEF domain which is present in over 50 proteins of Gram positive and Gram negative bacteria. Transcription analyses showed that *adrA* is expressed under the same environmental conditions as the *rdar* morphotype. *AdrA* is involved in the production of an unknown, extracellular substance which is mainly mediating elastic cell-cell interactions. Construction of an *adrA agfBA* double mutant showed that *agfD* seems to regulate only these two pathways.

The regulatory network describing the multicellular behavior is shown below.

The phenotype of a gene with unknown function was discovered by the analysis of a novel behaviour in *S. typhimurium*. *AdrA* contains a putative regulatory GGDEF domain which is widely distributed among the prokaryotes but of unknown function.



Publications | Veröffentlichungen

Römling, U., Rohde, M.: Flagella modulate the multicellular behavior of *Salmonella typhimurium* on the community level, *FEMS Microbiol. Lett.* **180** (1999) 91-102

Römling, U., Rohde, M., Olsen, A. *, Normark, S. *, Reinköster, J.: *AgfD*, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways, *Mol. Microbiol.* **36** (2000) 10-23

Impfstoffforschung (SP 2.2)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. C. Guzmán | Arb.Gr. Impfstoffforschung | *Res. Group of Vaccine Research*

Projektmitarbeiter | *Project members*: H. Jungnitz, E. Medina, K. Schulze, G. S. Chhatwal, G. Molinari, M. Rohde, S. R. Talay

Die Impfung ist die erfolgreichste Methode einer Infektionskrankheit vorzubeugen. Zusätzlich wird sie mehr und mehr zu einem erfolgreichen Werkzeug, um einem breiten Spektrum menschlicher Erkrankungen vorzubeugen oder sie zu behandeln. Die hauptsächlichen Aktivitäten der Impfstoffgruppe konzentrieren sich auf (i) die Identifizierung von vielversprechenden Vakzinantigenen, (ii) die Charakterisierung der Immunogenität und Wirksamkeit von Impfstoffprototypen und (iii) die Entwicklung von Strategien zur Vorhersage der Immunantwort nach erfolgter Impfung.

Entwicklung von Strategien zur Veränderung der Immunantworten, die durch lebende bakterielle Trägerstämme hervorgerufen werden

Der Einsatz von abgeschwächten *Salmonella*-Mutanten als Träger stellt einen der am besten untersuchten Wege dar, um Antigene über die mukosale Route einzubringen. Wir konnten zeigen, dass die Kinetik der Antigenproduktion auch das Muster der CD4⁺ T-Helferzellen beeinflusst. Tiere, die mit Trägerstämmen immunisiert wurden, welche konstitutiv das Modellantigen β -Galaktosidase (β -Gal) exprimieren, zeigten ein dominantes Th1/Th2-Muster, während ein Th1-Muster und eine effizientere CTL-Antwort beobachtet wurden, wenn ein *in vivo*-aktivierter Promotor eingesetzt wurde. Die letztere Gruppe zeigte eine Reduzierung im Tumorwachstum (Abb. 1) und in der Anzahl der Lungenmetastasen, wenn die Tiere mit einem Fibrosarkom, welches β -Gal als tumorassoziiertes Antigen exprimiert, behandelt wurden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Qualität der hervorgerufenen Immunantworten dadurch verändert werden konnten, wenn Trägerstämme eingesetzt wurden, die Mutationen an verschiedenen Positionen besaßen.

Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen *Salmonella* spp. und dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DZ) spielen eine entscheidende Rolle in der erworbenen Immunität, sie kommen in intestinal-assoziierten lymphatischen Zellen, Peyer's Patches und T-Zell abhängigen Bereichen der zentralen lymphatischen Organe vor. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass sie Ziele für Salmonellen-Invasionen während einer natürlichen Infektion darstellen. Wir haben herausgefunden, dass *S. typhimurium* in DZ überleben, sich aber nicht vermehren können. Im Gegensatz zu den Beobachtungen im Makrophagensystem, in dem *Salmonella* gegen einen lysosomalen Membranglykoprotein (LGP)-reichen Bereich der Vakuolen gerichtet ist, stellen diese LGP enthaltenden Vakuolen in DZ kein Ziel für *S. typhimurium* dar. Bakterien co-lokalisieren auch nicht mit den lysosomalen Markern Kathepsin-D und saurer Phosphatase oder dem späten endosomalen Marker rabG-GTPase. Diese Wechselwirkungen zwischen DZ und *Salmonella* deuten darauf hin, dass während einer natürlichen Infektion DZ Wirtszellen mit speziellen Funktionen darstellen.

Vaccine Research (SP 2.2)

Vaccination is the most effective strategy for the prophylaxis of infectious diseases. In addition, it is also becoming a powerful tool to prevent or treat a broader range of human diseases. The main activities of the Vaccine Group focus on (i) the identification of promising vaccine antigens, (ii) the characterization of the immunogenicity and efficacy of vaccine prototypes, and (iii) the development of strategies to obtain predictable immune responses following vaccination.

Development of strategies to modulate the immune responses elicited by live bacterial carriers

The use of attenuated mutants of *Salmonella* as carriers constitutes one of the most exploited strategies to deliver antigens by the mucosal route. We have demonstrated that the kinetics of antigen production also influences the major CD4+ T helper pattern elicited. Animals immunized with carriers expressing constitutively the model antigen β -galactosidase (β -gal) showed a dominant Th1/Th2 pattern, whereas a Th1 pattern and more efficient CTL responses were observed using an *in vivo*-activated promoter. When challenged with a fibrosarcoma expressing β -gal as a tumour-associated antigen, the latter group exhibited a reduction in tumour growth (Fig. 1), and in the number of lung metastasis. Further studies demonstrated that the quality of the responses elicited can be also modulated by using carriers harboring mutations in different loci.

Characterization of the interactions between *Salmonella* spp. and dendritic cells

Dendritic cells (DC) play a crucial role in acquired immunity, and are present in intestinal-associated lymphoid tissues, Peyer's patches and T-cell dependent areas of central lymphoid organs. Thus, it is highly likely that they are targets for *Salmonella* invasion during natural infections. We have found that *S. typhimurium* are able to survive but not to proliferate within DC. In contrast to what is observed in the macrophage system, in which *Salmonella* is targeted to a lysosomal membrane glycoprotein (LGP)-rich vacuolar compartment, the trafficking of *S. typhimurium* within DC was not characterized by bacterial targeting to host vacuoles containing LGPs. Bacteria also do not co-localize with the lysosomal markers cathepsin-D and acid

phosphatase, or the late endosomal marker rab6-GTPase. The novel interactions between DC and *Salmonella* suggest that DC are host cells with specialized functions during natural infections.

Characterization of novel biological properties from the SfbI protein of *S. pyogenes*

The fibronectin binding protein I (SfbI) of *S. pyogenes* plays a key role in bacterial attachment and infection. Our studies demonstrated that SfbI can also bind the Fc-fragment of human IgG leading to a reduction in Fc-dependent phagocytosis and antibody-dependent cytotoxicity by macrophages. Further studies showed that animals vaccinated with SfbI were protected against homologous or heterologous challenge (80-90% protection). This demonstrates that SfbI is a promising candidate for incorporation in vaccine formulations against *S. pyogenes*.

Abb.1
Lungenflügel von Mäusen, die mit plasmidlosen Trägerstämmen (links), bzw. mit Trägerstämmen, in denen die Expression des tumorassoziierten Antigens unter der Kontrolle eines konstitutiven (Mitte) oder eines *in vivo*-aktivierten Promotors (rechts) steht, immunisiert und nachfolgend einem Challenge mit einem Fibrosarkom unterzogen wurden.

Fig. 1
Lung lobes from mice immunized with plasmidless carriers (left), and carriers in which the expression of the tumour-associated antigen was controlled by a constitutive (middle) or an *in vivo*-activated promoter (right) and subsequently challenged with a fibrosarcoma.



Charakterisierung neuer biologischer Eigenschaften des SfbI Proteins von *S. pyogenes*

Das fibronectinbindende Protein I (SfbI) von *S. pyogenes* spielt eine Schlüsselrolle bei bakteriellen Infektionen. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass SfbI auch das Fc-Fragment von humanen IgG binden kann. Dieses führt zu einer Reduktion der Fc-abhängigen Phagozytose und der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität durch Makrophagen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Tiere, die mit SfbI geimpft waren, gegen einen homologen oder heterologen *Challenge* geschützt waren (80-90 %ige Schutzwirkung). Diese Versuche zeigen, dass SfbI ein vielversprechender Kandidat für eine Komponente in Impfstoffen gegen *S. pyogenes* ist.

Veröffentlichungen | *Publications*

Guzmán, C. A., Talay S. R., Molinari G., Medina E., Chhatwal G. S.: Protective immune response against *Streptococcus pyogenes* in mice after intranasal vaccination with the fibronectin-binding protein SfbI, *J. Infect. Dis.* **179** (1999) 901-906

Medina, E., Molinari G., Rohde M., Hasse B.*, Chhatwal G. S., Guzmán C. A.: Fc-mediated non-specific binding between the fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins, *J. Immunol.* **163** (1999) 3396-3402

Medina, E., Paglia P.*, Nikolaus T.*, Müller A., Hensel M. *, Guzmán C. A.: Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses, *Infect. Immun.* **67** (1999) 1093-1099

García-del Portillo, F.*, Jungnitz H., Rohde M., Guzmán C. A.: Interaction of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium with dendritic cells is defined by targeting to compartments lacking lysosomal membrane glycoproteins, *Infect. Immun.* **68** (2000) 2985-2991

Medina, E., Paglia P.*, Rohde M., Colombo M. P.*, Guzmán C. A.: Modulation of host immune responses stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen, *Eur. J. Immunol.* **30** (2000) 768-777



Antigenpräsentation und Immunantwort (SP 2.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. S. Weiß | Arb. Gr. Molekulare Immunologie | *Res. Group Molecular Immunology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: H. Bauer, H. Engel, A. Garbe, H. Herrmann, T. Jacobs, K. Kretschmer, S. Krusch, S. zur Lage, R. Lesch, M. Probst-Kepper

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems der Vertebraten ist die spezifische Abwehr von Krankheitserregern. Um diese Aufgabe zu erfüllen, haben sich im Laufe der Evolution das angeborene Immunsystem, das sehr früh während einer Infektion eingreift und durch Substanzen aktiviert wird, in denen sich das Pathogen und der Wirt grundsätzlich unterscheiden (z.B. Glykolipide), und das erworbene Immunsystem entwickelt. Letzteres reagiert spezifisch auf Antigene des Pathogens, benötigt aber längere Zeit um ausreichend Effektoren anzureichern. Derzeit wird jedoch klar, dass diese Unterscheidung sehr willkürlich ist. Beide Immunsysteme sind eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich gegenseitig. Das vorliegende Projekt befasst sich deshalb vornehmlich mit der Interaktion von bakteriellen Krankheitserregern und dem Immunsystem.

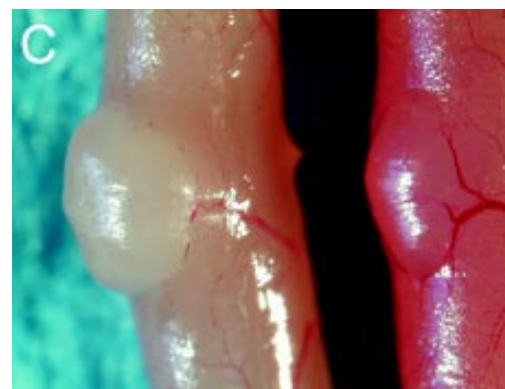
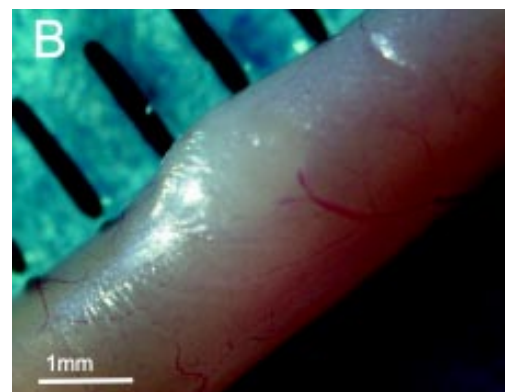
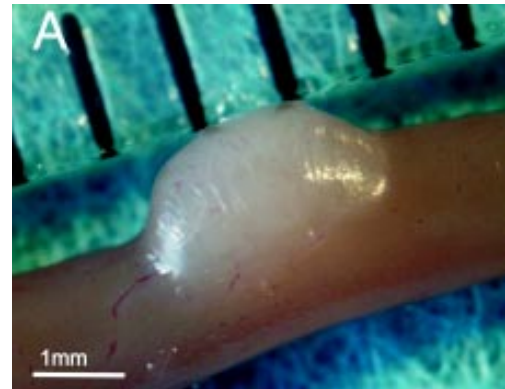
Abb. 1. Peyersche Platten von normalen Mäusen (A) und Mäusen, die eine leichte Kette als Transgen exprimieren und deren B-Zellen fast ausschließlich vom B1-Typ sind (B). Direkter Vergleich von Peyerschen Platten (C) von normalen (links) und transgenen (rechts) Mäusen.

Figure 1. Peyer's Patches from normal (A) and transgenic (B) mice. Direct comparison of Peyer's Patches (C) from normal (left) and transgenic (right) mice.

Ein transgenes B1-Zellmodell

Antikörper-produzierende B-Zellen lassen sich in B1- und B2-Zellen unterteilen. B2-Zellen werden im Knochenmark ständig neu gebildet und besitzen die Eigenschaften, die man B-Zellen normalerweise zuschreibt (Immunglobulin-Klassenswitch, somatische Hypermutation, Entwicklung in Gedächtniszellen). B1-Zellen sind dagegen immer noch wenig verstanden. Sie entstehen vorwiegend in der fötalen Leber, besiedeln vornehmlich Körperhöhlen und tragen bei der adulten Maus über 50 % zum Serum-IgM-Pool bei. Man nimmt deshalb an, dass sie für eine erste spezifische Antikörper-Barriere verantwortlich sind, die bereits zu Beginn einer Infektion wirksam ist.

Wir konnten ein transgenes Mausmodell etablieren, in dem die B-Zellen hauptsächlich vom B1-Typ sind. B-Zellen dieser Mäuse exprimieren fast ausschließlich eine einzige (transgene) leichte Immunoglobulin-Kette, wodurch ihr Antikörper-Repertoire stark eingeschränkt und somit einer sinnvollen Analyse zugänglich wird. In der Bauchhöhle dieser transgenen Mäuse wurden wiederholt B1-Zellen mit identischen schweren Immunoglobulin-Ketten gefunden, auch wenn verschiedene individuelle Mäuse verglichen wurden. In der fötalen Leber von derartigen Tieren (dem Hauptentstehungsort der B1-Zellen) wurden diese schweren Ketten jedoch nicht gefunden. Offensichtlich ist ihre Frequenz im



Antigenpresentation and Immune Response (SP 2.3)

The most important task of the immune system is the specific defence of the body against pathogens. To fulfill this task two sub-systems have evolved. The innate immune system that reacts early during infection towards compounds in which the pathogen and the host are basically distinct (like glycolipids) and the acquired immune system that reacts specific to antigens of the pathogen. However, the latter requires time to accumulate effector molecules or cells. To date it becomes increasingly clear that both sub-systems are intensively interconnected and regulate each other. Therefore, this project is concerned mainly with the interaction of bacterial pathogens and the immune system.

A transgenic B1 cell model

Antibody producing B cells can be subdivided into B1 and B2 cells. B2 cells are constantly generated in bone marrow and exhibit the properties that are usually associated with B cells (isotype switch, somatic hypermutation, differentiation into memory cells). In contrast, little is known about B1 cells. They mainly develop in fetal liver, populate the pleural and peritoneal cavity of the body and contribute more than 50 % to the serum IgM pool. Therefore, they are believed to be responsible for a first specific antibody barrier that already is present at the beginning of an infection.

We have established a transgenic mouse model in which the B cells are mainly of the B1 type. B cells in such mice express almost exclusively a single (transgenic) immunoglobulin light chain. Hence, their antibody repertoire is severely restricted, providing the possibility of a comprehensive analysis.

In the peritoneum of these transgenic mice we repeatedly found B1 cells bearing identical heavy chains even when different individual mice were compared. However, in fetal liver (the organ where they are mainly generated) these heavy chains were not found. Obviously, their frequency is below our detection limit in this organ. We take these results as evidence for an extremely strong antigen selection that acts on B1 cells in the adult animal.

Recently, an organogenic role of B cells in the development of Peyer's Patches has been described. In our transgenic mice only few and mostly smaller Peyer's Patches are found. In the meantime this phenotype could be reproduced in a second transgenic founder mouse (Fig. 1). This is taken as evidence that B1 cells are not or only poorly able to contribute to the organogenesis of Peyer's Patches.

Oral DNA vaccination using attenuated *Salmonella* as carrier

Recently we could show that it is possible to efficiently administer DNA vaccines via the oral route when attenuated *Salmonella typhimurium* was used as carrier. In further experiments we obtained first insights into which cells and mechanisms are involved. By measurement of antigen presentation in lymphoid tissue shortly after administering the *Salmonella* vaccine, we recognized that macrophages as well as dendritic cells are taking part. The antigen presenting capacity of macrophages was found to be very restricted. On the other hand, *S. typhimurium* is known to induce apoptosis in such cells. In addition, dendritic cells are known to phagocytize very efficiently apoptotic bodies which leads to presentation of the antigens expressed by such dying cells – so-called cross-presentation. Since dendritic cells have all the properties to optimally induce T cell responses, cross-presentation might be the reason for the strong immune response that is observed after oral administration of the *Salmonella*-DNA-vaccine.

Entstehungsorgan zu niedrig, um nachgewiesen zu werden. Wir werten unsere Befunde als Hinweis auf extrem starke Antigenselektion, dem die B1-Zellen im adulten Tier unterliegen.

Vor kurzem wurde eine Rolle von B-Zellen in der Organogenese von Peyerschen Platten beschrieben. In unseren transgenen Mäusen findet man jedoch nur noch wenige und in der Regel sehr kleine Peyersche Platten. Dieser Phänotyp konnte inzwischen mit einer zweiten Founder-Maus bestätigt werden (Abb. 1). Dies wird als Hinweis gewertet, dass B1-Zellen nicht oder nur sehr eingeschränkt in der Lage sind, zur Ausbildung von Peyerschen Platten beizutragen.

Orale DNA-Vakzinierung mit attenuierten Salmonellen als Carrier

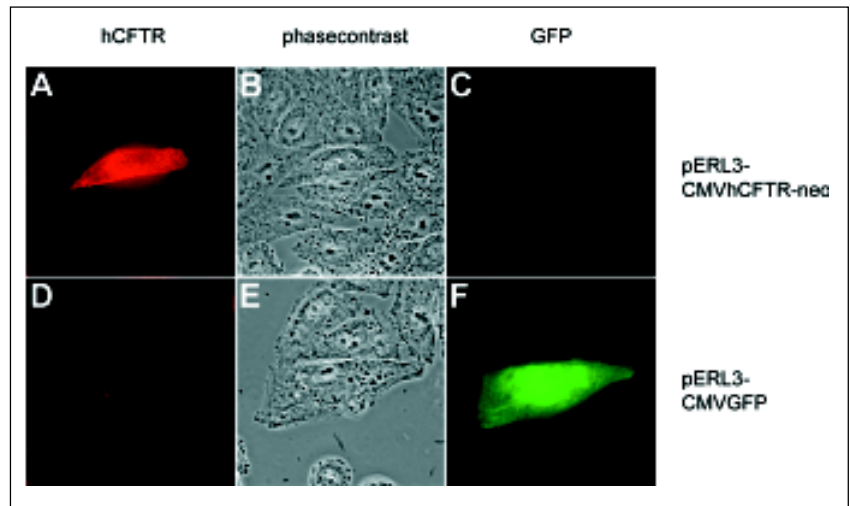
Kürzlich konnten wir zeigen, dass eine sehr effiziente orale DNA-Vakzinierung möglich ist, wenn abgeschwächte *Salmonella typhimurium* als Carrier verwendet werden. In weiterführenden Experimenten haben wir jetzt erste Hinweise auf die beteiligten Zellen und Mechanismen erhalten. Durch Nachweis von Antigen-präsentierenden Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen kurz nach Verabreichung der Salmonellen Vakzine konnten wir zeigen, dass sowohl Makrophagen als auch dendritische Zellen Anteil daran haben. Makrophagen zeigten dabei nur eingeschränkte Präsentationskapazität. Allerdings ist bekannt, dass *S. typhimurium* bei diesen Zellen Apoptose auslösen. Andererseits können dendritische Zellen sehr effizient apoptotische Zellen aufnehmen, was zur Präsentation von Antigenen führt, die von diesen sterbenden Zellen exprimiert werden – sogenannte Cross-präsentation. Da dendritische Zellen optimale Voraussetzungen zur Stimulation von T-Zellen besitzen, ist Cross-präsentation vermutlich der Grund für die effektive Induktion einer Immunantwort nach Verabreichung der Salmonella-DNA-Vakzine.

Listerien als Vektoren für die DNA-Übertragung

Ähnlich wie Salmonellen ist auch *Listeria monocytogenes* in der Lage, eukaryontische Expressionsplasmide in Wirtszellen zu übertragen. Für eine effiziente Übertragung ist dabei das Entweichen der Bakterien aus dem Phagosom essentiell. Inzwischen konnten wir dieses Transfektionssystem weiter verbessern. In Abb. 2 werden CHO-Zellen gezeigt, in die das Gen für GFP oder eine cDNA, die das humane CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Protein kodiert, übertragen und exprimiert wurde. Ursprüngliche Versuche zeigten, dass CHO-Zellen durch Wildtyp-Bakterien kaum zu transfizieren waren. Erst durch eine geeignete Attenuierung der Bakterien und eine Optimierung der Transfektionsprozedur waren wir in der Lage, transiente und stabile CHO-Transfektanten für CFTR zu erhalten. Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik konnte die Funktionalität des CFTR-Proteins nachgewiesen werden.

Listeria as vector for DNA transfer

Similar to *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* is able to transfer eukaryotic expression plasmids into host cells. In this case, the escape of the bacterium from the phagolysosome is essential for efficient DNA transfer to take place. In the meantime, we were able to further improve this transfection system. Fig. 2 shows CHO cells into which the gene for GFP or a cDNA encoding human CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) was transferred and expressed. Original experiments indicated that transfer into these cells using wild type bacteria was hardly possible. Appropriate attenuation and optimization of the transfection protocol finally allowed the establishment of transient and stable CFTR transfectants. Patch clamp technique revealed the functionality of the recombinant CFTR protein.



Publications | Veröffentlichungen

Engel, H., A. Rolink, S. Weiß: B cells are programmed to activate and for rearrangement at consecutive developmental stages, *Eur. J. Immunol.* **29** (1999) 2167-2176

Jacobs, T., M. D. Cima-Cabal, A. Darji, F. J. Méndez, F. Vázquez, A. A. C. Jacobs, Y. Shimada, Y. Ohno-Iwashita, S. Weiß, J. R. de los Toyos: The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolysins is involved in membrane binding, *FEBS Letters* **459** (1999) 463-466

Darji, A., S. zur Lage, A. I. Garbe, T. Chakraborty, S. Weiß: Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier, *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **27(4)** (2000) 341-349

Paschen, A., K. E. J. Dittmar, R. Grenningloh, M. Rohde, D. Schadendorf, E. Domann, T. Chakraborty, S. Weiß: Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity, *Eur. J. Immunol.* (2000), in press

Abb. 2. Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit GFP oder humanem CFTR mit Hilfe von attenuierten *L. monocytogenes*. Die CFTR-Expression wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

Figure 2. Transient transfection of CHO cells with GFP or human CFTR using attenuated *L. monocytogenes*. Expression of CFTR was revealed by immunofluorescence microscopy using a specific monoclonal antibody.

T-Zell-Toleranz und Mucosale Immunität

Projektleiter | *Project leader*: Dr. J. Buer | Nachwuchsforschergruppe Mucosale Immunität | *Junior Research Group Mucosal Immunity*

Projektmitarbeiter | *Project members*: J. Lauber, P. Gatzlaff, D. Bruder, A. Schrader, S. Bayrak, M. Templin, A. Westendorf, G. Tettweiler

Im Mittelpunkt unserer Forschungsaktivitäten steht die molekulare Erforschung der reziproken Wechselwirkung von mukosalem Immunsystem und Bakterien („Flora“). Dies erfordert die Entwicklung und Anwendung von Methoden zur dynamischen Analyse der Genexpression *in vivo*. Ziel ist es, im Tiermodell und am Patienten völlig neue und hocheffektive Therapien für Erkrankungen mit gestörter mukosaler Immunfunktion zu entwickeln.

T-Zell-Toleranz

Gemeinsam mit Harald von Boehmer vom Dana-Farber Cancer Institute der Harvard Medical School in Boston konnten wir vor kurzem differentielle Expressionsprofile von „anergen“ CD4+ T-Zellen erstellen und hierbei eine Reihe von Genen identifizieren, die für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wesentlich sind. Einige der identifizierten Gene wurden bisher nicht mit T-Zellregulation in Verbindung gebracht und stellen völlig neue Ansatzpunkte für eine gezielte Beeinflussung der T-Zellfunktion *in vivo* dar (Abb. 1).

Durch Einsatz einer Multiplex-Einzelzell-RT-PCR konnte erstmals der direkte Einfluß von Rezeptoren der TNF-Rezeptor Familie auf die Entstehung des Autoimmundiabetes nachgewiesen werden. Dieses *in vivo* Modell wird von uns zur Zeit intensiv genutzt um grundlegende Fragestellungen der peripheren Immunregulation aufzuklären.

Weitere Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit funktionellen und molekularen Analysen zur Entwicklung von prä-T-Zellen. Es konnten hierfür verschiedene „Knock-out“-Modelle und *in vitro* System an der GBF etabliert werden. Erste Ergebnisse zur prä-T-Zell-Rezeptor (prä-TCR) Signaltransduktion liegen vor.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie konnten wir ein TCR-transgenes Tumormodell in unserem Labor etablieren und Strategien zur Modulation der MHC-Klasse-II

Expression durch den Tumor entwickeln. Diese Arbeiten werden durch unsere aktuellen Arbeiten zur molekularen Charakterisierung der Tumorantwort bei Patienten mit Krebserkrankungen der ableitenden Harnwege erweitert. Durch Einsatz einer von uns etablierten Real-Time RT-PCR konnte hierbei ein Chemokin-/Chemokinrezeptor-„Pathway“ bei Nierenkrebs identifiziert werden, der für die Prognose und Therapie dieser Erkrankung von Bedeutung sein kann.

Mucosale Immunität

Eine zentrale Aufgabe des intestinalen Immunsystems ist die Entwicklung und Beibehaltung einer immunologischen Reaktionsunfähigkeit (Toleranz bzw. mukosale Anergie) gegenüber zahlreichen Antigenen. Dies drückt sich in der verminderten Stimulierbarkeit mukosaler T-Lymphozyten durch Antigene und Mitogene aus, sowie in der Produktion von Zytokinen mit Suppressoraktivitäten. Das Phänomen einer antigenspezifischen Suppression von systemischen Immunantworten nach Applikation oraler Antigene wird als Induktion oraler Toleranz bezeichnet. Systemische Toleranz wird hierbei entweder aktiv (Suppression) oder passiv (klonale Anergie oder Deletion) erreicht. Die Bedeutung lokaler immunologischer Reaktionen in der Darmmucosa für die Pathogenese verschiedener intestinaler Erkrankungen ist erst in den letzten Jahren zunehmend erkannt worden. Untersuchungen an Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass insbesondere eine gestörte Wechselwirkung von mukosalen T-Zellen und

T-Cell Tolerance and Mucosal Immunity

The emphasis of our research activities is on molecular research into mutual interactions between the mucosal immune system and bacteria ("flora"), which requires the development and application of methods of dynamic analysis of gene expression *in vivo*. Using animal models and patients, our aim is to develop completely new and highly effective therapies for diseases involving disturbance of the mucosal immune function.

T-cell Tolerance

Together with Harald von Boehmer of the Dana-Farber Cancer Institute at Harvard Medical School in Boston, we have recently been able to produce differential expression profiles of "anergic" CD4+ T-cells. Thereby we identified a number of genes essential for maintaining peripheral tolerance. Several of the identified genes have not previously been associated with T-cell regulation, and thus present the possibility of completely novel approaches to influencing T-cell function *in vivo* (Fig. 1).

Using a multiplex single-cell RT-PCR, it was possible to demonstrate for the first time the direct influence of receptors of the TNF receptor family in causing autoimmune diabetes. Currently, this *in vivo* model is being intensively used in our laboratories to elucidate fundamental questions related to peripheral immune regulation.

Other research involves functional and molecular analyses of the development of pre-T-cells, for which various knock-out models and *in vitro* systems have been established at the GBF. Investigations into pre-T-cell receptor (pre-TCR) signal transduction have already yielded initial results.

In co-operation with the research group Molecular Immunology, we have succeeded in establishing a TCR-transgenic tumour model in our laboratory, as well as developing strategies for modulating MHC-class II expression by the tumour. This research is extended by work we are currently conducting on molecular characterisation of tumour response in patients with cancer of the urinary tract collection system. The use of a real-time RT-PCR developed in our labs facilitated identification of a chemokine/chemokine receptor "pathway" in renal cell carcinoma, which may be of importance in the prognosis and therapy of this disease.

Mucosal Immunity

A central task of the intestinal immune system is to develop and maintain an immunological non-response capability (tolerance, or mucosal anergy) towards numerous antigens, revealed in a reduced sensitivity to stimulation of mucosal T-lymphocytes by antigens or mitogens, as well as in the production of cytokines with suppresser activity. The phenomenon of antigen-specific suppression of systemic immune responses following application of oral antigens is referred to as the induction of oral tolerance, whereby here systemic tolerance is achieved either actively (by suppression) or passively (by clonal anergy or deletion). Only in recent years the significance of local immunological reactions in the intestinal mucosa for the pathogenicity of various intestinal diseases has been increasingly recognised. Studies with knock-out mice have shown that disturbed interaction between mucosal T-cells and the normal microbial flora are particularly important. The molecular basis of such mucosal dysregulation and deliberate attempts at influencing it are poorly understood at present, but are the object of intensive current research, whereby an important focus of attention involves "therapeutic manipulation of the intestinal flora".

Using *E. coli* bacteria (strain NISSLE 1917), it was recently possible to create a universal bacterial antigen carrier system for the purpose of mucosal immunomodulation. NISSLE bacteria are characterised by their ability to colonise and are non-pathogenic in both mice and humans. We used an AIDA Typ I autotransporter as antigen presentation system. Initial *in vivo* experiments have already begun.

In addition to our work on establishing models for the study of the intestinal mucosal immune system, we are also developing a TCR transgenic mouse model for studying disturbances in the area of the pulmonary,

mikrobieller Normalflora hierbei eine besondere Bedeutung zukommt. Die molekularen Grundlagen dieser mucosalen Dysregulation und ihre gezielte Beeinflussung werden bisher nur unvollständig verstanden und sind Gegenstand intensiver Forschungs-bemühungen. Einen wichtigen Schwerpunkt bildet hierbei die „Therapeutische Manipulation der Darmflora“.

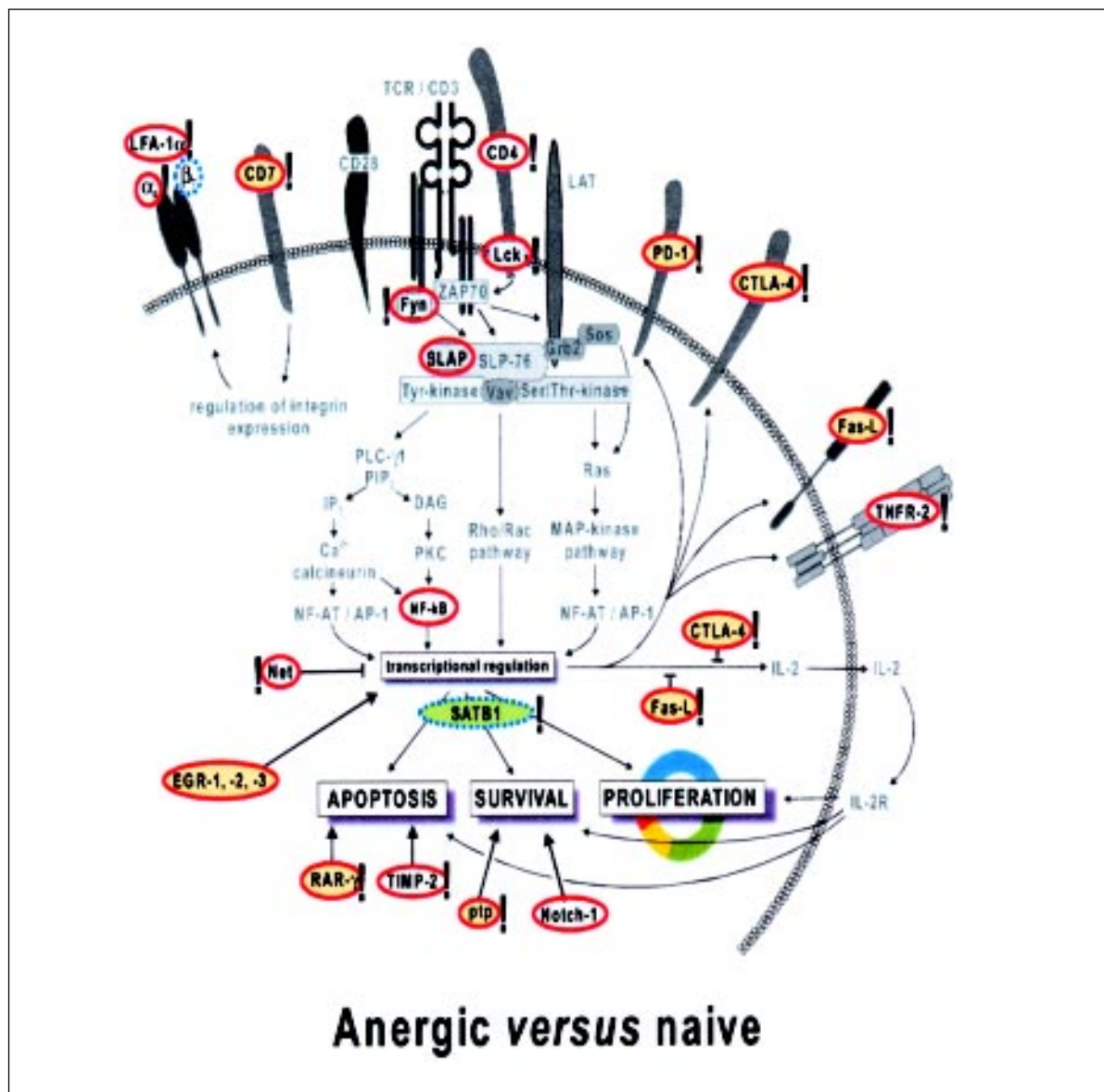
Kürzlich konnte ein universelles bakterielles Antigen-Carriersystem zur mucosalen Immunmodulation unter Verwendung von *E.coli* Bakterien vom Stamm NISSLE 1917 generiert werden. NISSLE Bakterien zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Kolonisierung aus und sind sowohl in der Maus als auch im Menschen apathogen. Als Antigenpräsentations-

system wird ein AIDA Typ I Autoporter von uns eingesetzt. Erste *in vivo* Versuche wurden bereits gestartet.

Zusätzlich zur Etablierung von Modellen, die der Erforschung des mucosalen Immunsystems des Darms dienen, wird ein TCR transgenes Mausmodell zur Untersuchung von Störungen im Bereich des Schleimhaut-assoziierten Immunsystems der Lunge entwickelt. In diesem Projekt wird Hemagglutinin als Antigen selektiv im Alveolarepithel von TCR-HA transgenen Mäusen exprimiert und untersucht, ob sich durch Bakterien-vermittelte Antigenexpression im Gastrointestinaltrakt eine Modulation des mucosalen T-Zellsystems der Lunge erzielen lässt. Erste transgene Founder-Mäuse konnten bereits generiert werden.

Abbildung 1: „Molecular Picture“ einer „anergic T-Zelle“ (Dargestellt sind differentiell exprimierte Gene und deren Rolle innerhalb der T-Zellaktivierung).

Figure 1: „Molecular Picture“ of an „anergic“ T cell“ (Interralationship between differentially regulated genes at the level of TCR signal transduction, regulation of transcription and cell fate).



mucosa-associated immune system. In this project, haemagglutinin as antigen is expressed and studied selectively in the alveolar epithelium of TCR-HA transgenic mice, to see whether modulation of the pulmonary mucosal T-cell system through bacteria-mediated antigen expression in the intestinal tract is possible. The first transgenic founder mice have already been produced.

Lechner, O., Saint-Ruf, C., Walter, U., Buer, J., Azogui, O.: Pleiotropic changes controlled by the pre-T cell receptor, *Curr. Opin Immunol.* **11** (1999) 135-142

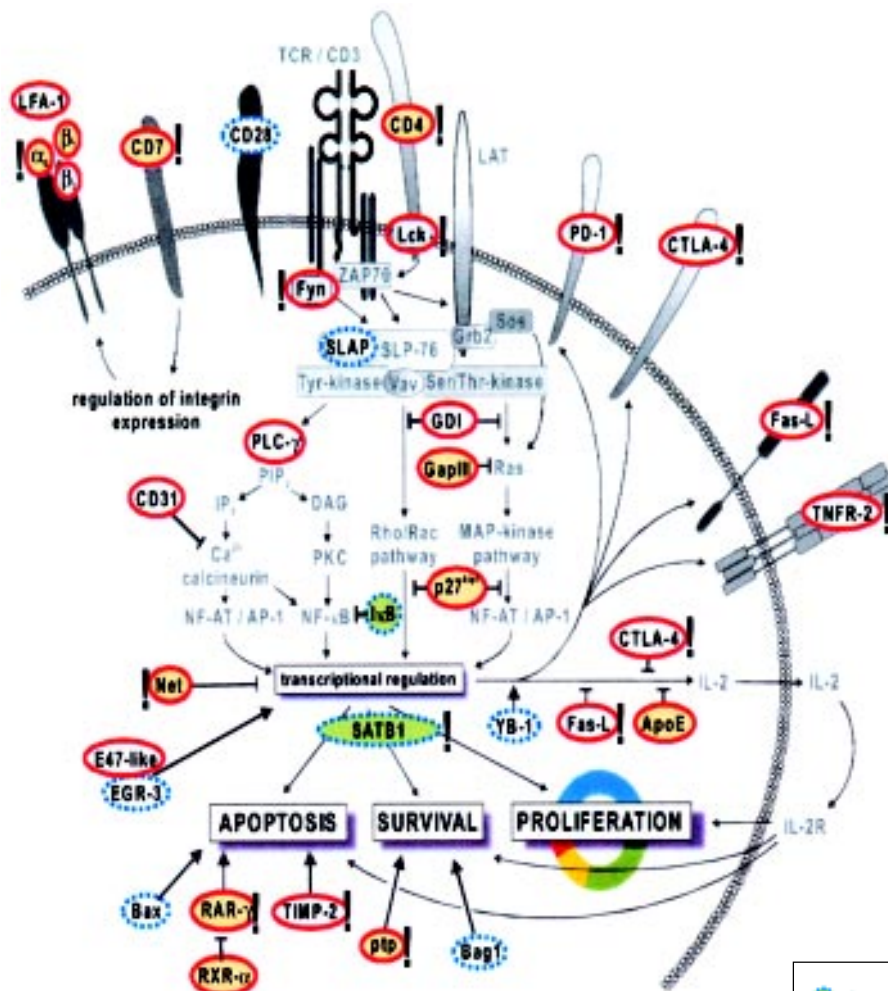
Walter, U., Franzke, A., Sarukhan, A., Zober, C., von Boehmer, H., Buer, J., Lechner, O.: Monitoring gene expression of TNFR family members by γ -cells during development of autoimmune diabetes, *Eur. J. Immunol.* **30** (2000) 1224-1232

Veröffentlichungen | Publications

Franzke, A., Peest, D., Probst-Kepper, M., Buer, J., Brabant, G., Kirchner, H., Ganser, A., Atzpodien, J.: Autoimmunity resulting from cytokine treatment predicts long-term survival in patients with renal cell carcinoma, *J. Clin. Oncol.* **17** (1999) 529-533

Schrader, A. J., Probst-Kepper, M., Grosse, J., Kunter, U., Schenk, F., Franzke, A., Atzpodien, J., Buer, J.: Molecular and Prognostic Classification of Advanced Melanoma: A Multi-Marker Microcontamination Assay of Peripheral Blood Stem Cells, *Melanoma Res.* (2000), in press

Von Boehmer, H., Aifantis, I., Feinberg, J.,



Anergic versus activated

● downregulated (> 4-times) ● downregulated — inhibition
● upregulated (> 4-times) ● upregulated ← stimulation
! specific regulation in anergic cells



Koordinator | *Coordinator*: Prof. Dr. G. Höfle | Abt. Naturstoffchemie | *Dept. of Natural Product Chemistry*

Neue Wirkstoffe (SP 3)

Für die Bekämpfung von Krankheiten und zum Schutz von Mensch, Tier und Nutzpflanzen vor Mikroorganismen, Parasiten und anderen Schädlingen steht uns heute eine Vielzahl von Wirkstoffen zur Verfügung. Dessen ungeachtet gibt es noch zahlreiche Krankheitsbilder, die nicht oder nur unzureichend behandelt werden können, wie z.B. Krebs oder bestimmte Trypanosomen-Infektionen. Die Antibiotikatherapie hat zunehmend mit Resistenzentwicklung zu kämpfen, wie z.B. bei Tuberkulose und Lungenentzündung. Ähnliches gilt für Protozoeninfektionen, vor allem Malaria. Auch im Pflanzenschutz ist diese Entwicklung zu beobachten, wo ebenfalls Pilze und Insekten zunehmend gegen etablierte Wirkstoffe resistent werden. Dies und der gesteigerte Anspruch an Effektivität und Sicherheit von Medikamenten sowie Umweltverträglichkeit von Pflanzenschutzmitteln erfordern eine ständige Suche nach und Entwicklung von neuen Wirkstoffen.

Viele der heute eingesetzten Wirkstoffe, besonders in der Humanmedizin, sind Naturstoffe oder chemisch synthetisierte Abkömmlinge von diesen. Mikroorganismen waren und sind eine reiche Quelle für Antibiotika, liefern aber auch mehr und mehr Substanzen mit pharmakologischem Potential. Deren Entdeckung wird durch eine große Zahl inzwischen entwickelter biochemischer und molekularbiologischer Tests ermöglicht. Im Projekt **Biologie, Chemie und Genetik mikrobieller Wirkstoffe** werden neue Mikroorganismen als Produzenten gesucht, Sekundärstoffe isoliert, ihre Struktur und ihr Wirkmechanismus aufgeklärt. Nach Entwicklung geeigneter Produktions- und Aufbereitungsverfahren werden die Substanzen an Industrie-

partner abgegeben, um dort auf Anwendung in Medizin und Pflanzenschutz geprüft zu werden. Weitere Ziele sind die Aufklärung der Biosynthese sowie die chemische Modifikation und Synthese analoger Strukturen mit verbesserten Eigenschaften.

Ganz andere Wege zu neuen Wirkstoffen werden im Projekt **Kombinatorische Molekülrepertoires** beschritten. Grundlage ist hier das biologische Prinzip der empirischen Suche in einer großen Vielfalt an möglichen Wirkstoffstrukturen mit Hilfe evolutiver und kombinatorischer Verfahren. Auf molekularbiologischem Weg können durch stochastische oder gezielte Mutagenese sehr viele (um 10^9) Peptidvarianten erzeugt werden. Mittels der an der GBF weiterentwickelten Phagemid-Display-Genbanken lassen sich daraus Varianten mit besonders fester Bindung an wichtige Zielstrukturen aussondern. Die kombinatorische chemische Synthese ist ebenso in der Lage sehr große Zahlen von Molekülvarianten (insbesondere Peptide und Oligonucleotide) zu erzeugen. In diesem Fall sind auch unnatürliche Varianten mit Bausteinen, die in der Natur nicht vorkommen zugänglich.

Diese Molekülsammlungen (Bibliotheken) werden auf biologische Aktivität hin durchsucht aber auch für systematische Studien über die Gesetzmäßigkeiten molekularer Wechselwirkungen und zur Identifizierung unbekannter zellulärer Zielmoleküle eingesetzt (**funktionelle Genom- und Proteomanalyse**). Die chemische Herstellung umfangreicher Molekülbibliotheken nutzt das Prinzip der Festphasensynthese und dafür werden auch neue Verfahren und Trägermaterialien entwickelt.

Bioactive Compounds (SP 3)

A large number of bioactive compounds are available today to combat diseases and for the protection of man, animals and cultivated plants from microorganisms, parasites and other pests. This notwithstanding, there are still a very large number of diseases which either cannot or can only inadequately be treated, for example cancer and certain trypanosome infections. Antibiotic therapy is increasingly being hindered by the development of resistance, such as in the case of tuberculosis and lung infections. The same problem affects protozoan infections, in particular malaria. A similar picture is apparent in agriculture, where fungi and insects are increasingly becoming resistant to established active ingredients. This together with growing demands on the effectivity and safety of pharmaceuticals, as well as on the environmental compatibility of pesticides, drive the continuous search for and development of new active substances.

Many of the active substances used today, in particular in human medicine, are natural products or chemically synthesised derivatives of the same. Microorganisms have been and still are a rich source of antibiotics, but are also capable of delivering more and more substances with pharmacological potential. Their discovery is made possible by a large number of recently developed biochemical and molecular-biological tests. The project Biology, Chemistry and Genetics of New Bioactive Compounds from Microorganisms focuses on the search for new microorganisms as producers, as well as on the isolation of secondary metabolites and elucidating their structures and mechanisms of action. Following development of suitable production and isolation methods the substances are transferred to partners in industry in order to have them tested for applications as medicines and pesticides.

Other objectives are the elucidation of the mode of action and the biosynthesis including molecular genetics. Structure-activity relationships are investigated for compounds of practical interest by chemical modification and synthesis of analogs with the aim of optimisation of useful properties.

Complementary to this classical approach, the project Combinatorial Molecular Repertoires is taking different paths to achieve novel active substances. Based on the biological principle of empirical search, a large diversity of molecular structures is produced and screened for biological activity using evolutive and combinatorial procedures. In the molecular-biological approach, the use of stochastic and targeted mutagenesis is able to generate a great number (around 10^9) of peptide/protein variants. By using phagemid-display gene banks, further developed at the GBF, those variants with particularly high affinity of binding to important biological target molecules can be selected.

Combinatorial chemical synthesis is also capable of producing very large numbers of molecular variants (in particular peptides and oligonucleotides). In this case, access is gained also to unnatural structures containing chemical components which do not occur in nature. These molecular collections (compound libraries) are tested for their biological activity and are also used in systematic investigations of the principles of biomolecular interactions as well as for the identification of unknown cellular target molecules (functional genome- and proteome-analysis). The chemical generation of large molecular libraries is based on solid phase synthesis and in this regard new processes and carrier materials have also been developed.

Biologie, Chemie und Genetik mikrobieller Wirkstoffe (SP 3.1)

Biologie mikrobieller Wirkstoffe

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. H. Reichenbach | Abt. Naturstoffbiologie | *Dept. of Natural Product Biology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: Y. Elnakady, E. Forche, K. Gerth, J. Heil, H. Irschik, M. Khalil, P. Knauth, H. Reichenbach, F. Sasse

Die weltweit größte Stammsammlung von Myxobakterien

Als Voraussetzung für alle Folgearbeiten zur Entdeckung neuer Wirkstoffe isolieren wir laufend neue Stämme von gleitenden Bakterien. Im Jahre 1999 haben wir unsere vorhandene Sammlung von 6960 Myxobakterien um 420 Stämme erweitert. Unsere Myxobakterien-Sammlung umfaßt fast alle beschriebenen Taxa sowie 18 neu entdeckte Arten aus 4 neuen Gattungen. Die Sammlung ist weltweit absolut einmalig, steht aber in Gefahr nach Ausscheiden ihres Leiters verloren zu gehen.

Alle neuen Stämme wurden für unsere Screening-Tests verwendet. Außer Tests mit lebenden Zellen wurden auch Enzymtests und Rezeptortests durchgeführt. Damit können wir Substanzen finden, die in Stoffwechsel und Wachstum von Bakterien, Pilzen und Tumorzellen eingreifen.

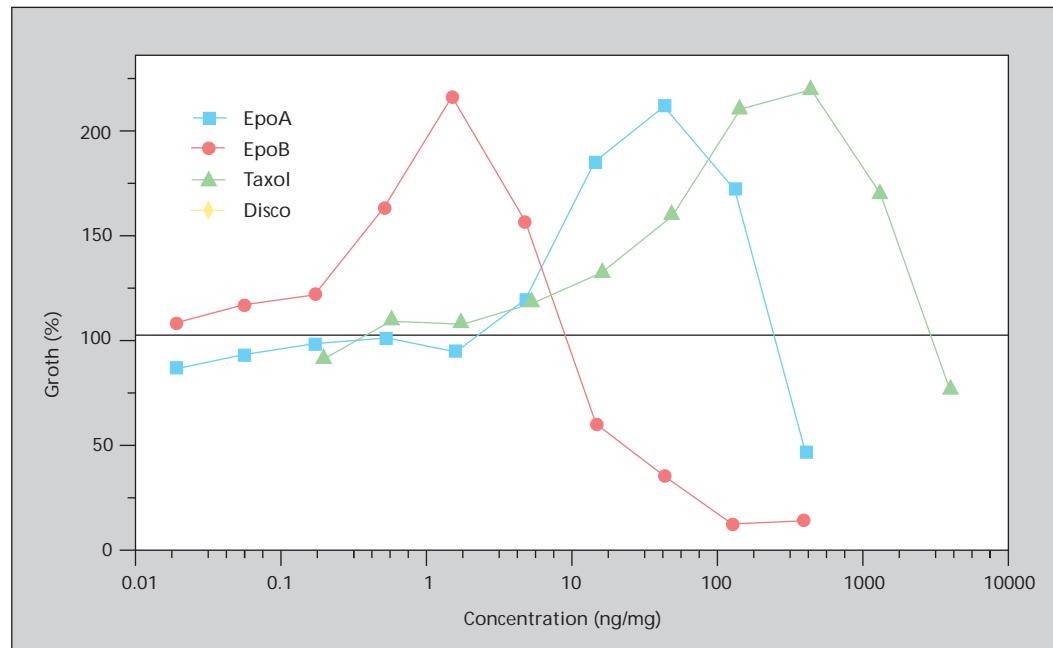
Neue Verbindungen

Im Berichtszeitraum haben wir wieder eine ganze Reihe von Verbindungen mit neuer Grundstruktur entdeckt: Hymenon; Cruentaren mit pilzhemmender und stark cytotoxischer Wirkung; Holmenon; Kulkenon; Lipoterrein; mehrere Noricumazole; 5,7-Dimethylmellein, als Ameisen-Spurenpheromon bekannt; Myxochromid S; Dawenol; Nortuggacine und Varnalamide. Einige weitere Substanzen sind derzeit in Bearbeitung.

Bisher haben wir 10 verschiedene neue Verbindungen aus Myxobakterien isoliert, die auf das Cytoskelett einwirken und damit als Tumor-Hemmstoffe von Interesse sein könnten. Chivosazol A und F lassen die Aktin-Mikrofilamente in Säugerzellen innerhalb von wenigen Minuten verschwinden. Disorazol hemmt das Wachstum humaner Tumorzellen im femtomolaren Bereich. Epothilon imitiert

Abb. 1. Die Epothilon-abhängige fibroblastenartige Mauszelllinie läßt sich zwar durch Taxol, nicht aber durch das ebenfalls Mikrotubuli-stabilisierende Discodermolide am Leben erhalten.

Fig. 1. The epothilon-dependent mouse fibroblast-like cell line can be rescued by Taxol, but not by microtubuli-stabilizer, discodermolide.



Biology and Chemistry of Microbial Bioactive Compounds (SP 3.1)

Biology of Bioactive Compounds

The worldwide greatest collection of Myxobacteria

As a prerequisite of all subsequent work on drug discovery, we continuously isolate new strains of gliding bacteria. In 1999, we added to our existing collection of 6960 myxobacteria 420 more strains. The myxobacteria collection comprises almost all described taxa, 18 new species, and 4 new genera. The collection is absolutely unique worldwide, but is in jeopardy to get lost after retirement of its head.

All new strains were subjected to our screening procedures. Besides tests with living cells, also tests with enzymes and with receptors were used. In this way we may find compounds that interfere with metabolism and growth of bacteria, fungi and tumor cells.

New compounds

Again a good number of compounds with novel structures have been obtained: hymenon; cruentaren with antifungal and strong cytotoxic effects; holmenon; kulkenon; lipoterrein; several noricumazols; 5,7-dimethylmellein, known as a track pheromone of ants; myxochromid S; dawenol; nortuggacins; and varnalamids. Several more substances are under study.

Thus far we isolated 10 different, new compounds from myxobacteria that act on the cytoskeleton and thus could be of interest as antitumor drugs. Chivosazol A and F cause the actin microfilaments in mammalian cells to disappear within a few minutes. Disorazol inhibits growth of human tumor cells at femtomolar concentrations. The Taxol-mimic, epothilon, is presently in first clinical tests. The material is produced by fermentation of the GBF-strain *Sorangium cellulosum* So ce90. With some effort an epothilon resistant mutant of a mammalian cell line was obtained. That mutant turned out to be in fact epothilon dependent. In the absence of the inhibitor caspase-3 and apoptosis is induced after a few days. The mutant can be rescued by taxol, not, however, by discodermolide (see Figures).

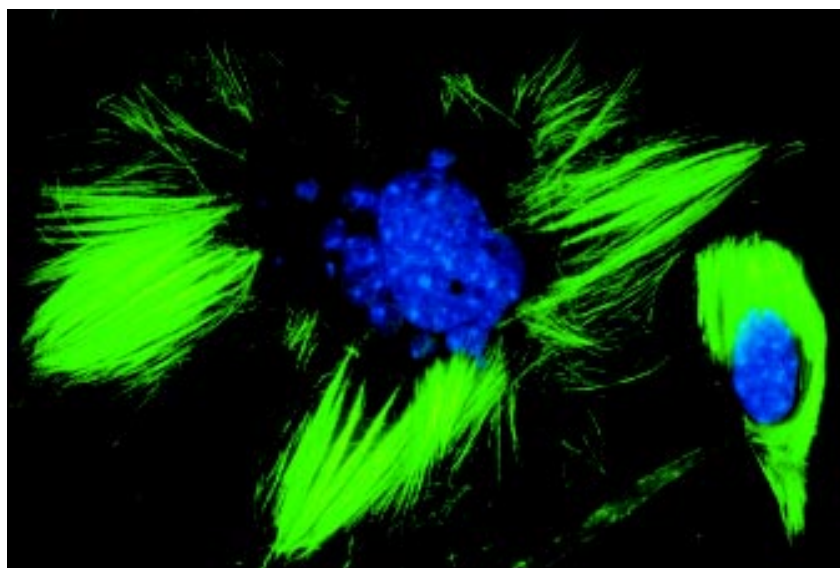
The mechanism of ambruticin

The mechanism of action of the myxobacterial antifungal compound ambruticin remained elusive for 30 years after its discovery. It could now be elucidated. The compound appears to act in a very similar way as pyrrolnitrin by disturbing the osmoregulation of fungi. Sensitive fungi accumulate glycerol within minutes after their exposition to ambruticin, which is followed by an increase of intracellular triacylglycerols and, a little later, of free fatty acids. The latter seem to kill the cells by making them leaky.

Gram amounts of various myxobacterial compounds were produced by fermentation for several industry partners and for sale as research chemicals.

Fig. 2. In spite of the addition of discodermolide, apoptosis takes place as indicated by a decay of the cell nucleus (blue) and the formation of microtubuli bundles (green).

Abb. 2. Trotz Zugabe von Discodermolid erfolgt eine Apoptose, wie durch einen Zerfall des Zellkerns (blau) und die Bildung von Mikrotubulibündeln (grün) angezeigt wird.



die Effekte des wichtigen Antitumor-
mittels Taxol und ist derzeit in ersten
klinischen Tests. Das Material wird durch
Fermentation des GBF-Stamms *Sorangium
cellulosum* So ce90 produziert. Mit einiger
Anstrengung gelang es, eine Epothilon-
resistente Mutante einer Säugerzelllinie zu
isolieren. Diese Mutante erwies sich als
tatsächlich Epothilon-abhängig. Fehlt der
Inhibitor in der Kultur, wird nach wenigen
Tagen eine Apoptose induziert. Die
Mutante läßt sich auch mit Taxol, nicht
aber mit Discodermolid am Leben
erhalten (s. Abbildungen).

Der Wirkmechanismus von Ambruticin

Der Wirkmechanismus des Myxo-
bakterien-Fungizids Ambruticin blieb für
30 Jahre nach seiner Entdeckung im
Dunkeln. Er konnte von uns kürzlich
aufgeklärt werden. Die Verbindung scheint
wie Pyrrolnitrin durch Störung der
Osmoregulation des Pilzes zu wirken.
Empfindliche Pilze reagieren innerhalb
von Minuten nach Zugabe von
Ambruticin mit einer Anhäufung von
Glycerin in den Zellen. Etwas später
kommt es zu einer Zunahme von
Triacylglyceriden und noch etwas später
von freien Fettsäuren. Letztere scheint die
Zellen abzutöten, indem sie die Zellmem-
bran durchlässig machen.

Von verschiedenen Myxobakterien-
Substanzen wurden durch Fermentation
Gramm-Mengen für verschiedene
Industriepartner wie auch zum Verkauf als
Forschungschemikalien hergestellt.

Publications | Veröffentlichungen

Reichenbach, H., G. Höfle: Myxobacteria as producers of secondary metabolites, in: *Drug Discovery from Nature* (Grabley, S., R. Thiericke, eds.), Springer Verlag, Heidelberg 1999, 149-177

Gronewold, T.M.A., F. Sasse, H. Lünsdorf, H. Reichenbach: Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells, *Cell Tissue Res.* **295** (1999) 121-129

Reichenbach, H.: Myxobacteria, in: *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis, and bioseparation* (Flickinger, M.C., S.W. Drew, eds.), John Wiley & Sons (1999) pp. 1823-1832

Chemie mikrobieller Wirkstoffe

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. G. Höfle | Abt. Naturstoffchemie | *Dept. of Natural Product Chemistry*

Projektmitarbeiter | *Project members*: H. Augustiniak, N. Glaser, R. Jansen, U. Karama, Th. Leibold, M. Schinner, U. Söker, H. Steinmetz, L. Vollbrecht, P. Washausen, S. Wassmann

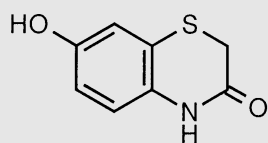
Im Berichtszeitraum 1999-2000 wurden 17 Myxobakterienstämme vertieft bearbeitet, um die in den verschiedenen Screeningssystemen aufgefallenen Substanzen in die Hand zu bekommen. Sieben der isolierten Substanzen weisen eine neue Grundstruktur auf: Cruentaren, Kulkenon, Holmenon, Danwenol, Tichunal, Hymeron und So 2129, ein 14-gliedriges β,δ -diketolacton. Zehn weitere, vermutlich ebenfalls neue Substanzen befinden sich im Stadium der Reinisolierung und Strukturaufklärung. Die vollständigen Strukturen werden veröffentlicht sobald die biologischen Eigenschaften näher charakterisiert sind.

Trichangion B

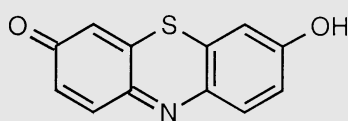
Im GBF Jahresbericht 1997 haben wir die relativ einfache Struktur von Trichangion A, einem neuen Metaboliten aus *Sorangium cellulosum*, Stamm So ce 880, vorgestellt. Ein tieferer Co-metabolit, Trichangion B, der gelegentlich in geringer Ausbeute isoliert worden war, konnte jetzt aufgrund der spektroskopischen Daten und durch Vergleich mit einer synthetischen Probe als 7-Hydroxyphenothiazin-3-on identifiziert werden. Die vermutete Biosynthese der Trichangione aus p-Benzochinon und Cystein als Schwefel und Stickstoff liefernde Komponente wird derzeit untersucht.

Tubulysin

Bei der Suche nach neuen Inhibitoren des Tubulin-Systems wurden Stämme von *Angiococcus disciformis* und *Archangium* sp. identifiziert, die in Zellkultur und *in vitro* den raschen Zerfall von Mikrotubuli auslösen. Die dafür verantwortlichen Tubulysin A-F genannten Substanzen werden nur in sehr geringen Mengen gebildet, erwiesen sich aber als außerordentlich toxisch für tierische Zellkulturen. Mit einer IC_{50} von 30 pg/ml für die Zelllinie L 929 ist Tubulysin D toxischer als Vinblastin (2 ng/ml) oder Dolastin-10 (0,1 ng/ml), die einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen. Struktur und Konfiguration der 7 Stereozentren wurden aus den spektroskopischen Daten und über den chemischen Abbau aufgeklärt. Fütterungsexperimente mit [$^{13}C_2$]Acetat und Methionin weisen auf eine gemischte Aminosäure/Polyketid-Biosynthese hin und belegen die Herkunft der ungewöhnlichen Formaldehyd-N,O-acetal-Gruppe aus der Oxidation einer N-Methylgruppe.



Trichangion A



Trichangion B

Disorazole

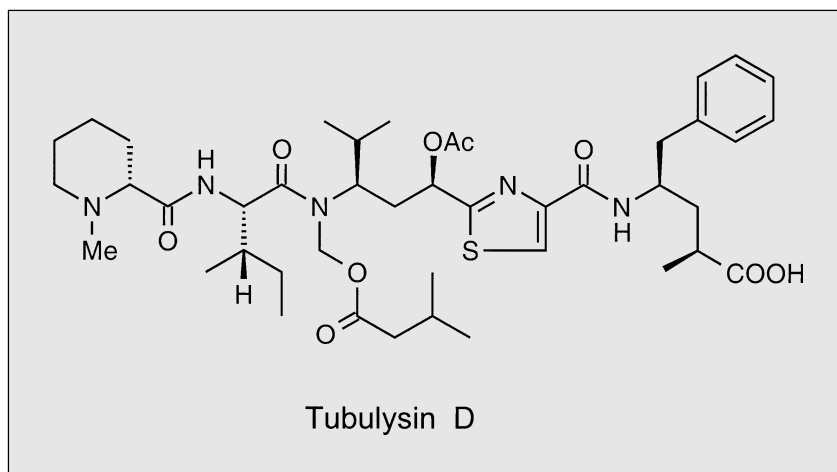
Die Disorazole bilden eine Gruppe komplexer 26-gliedriger Bis-lactone, die bei noch niedrigerer Konzentration als Tubulysin D den Zerfall von Mikrotubuli auslösen. Mit einer IC_{50} von 3 pg/ml für die Zelllinie L 929 weist Disorazol A die höchste jemals in unseren zellulären Testsystemen beobachtete Toxizität auf.

Chemistry of Bioactive Compounds from Microorganisms

In the research period 1999-2000, work focused on 17 myxobacterial strains, in order to isolate and elucidate the structure of new secondary metabolites, which have been recently identified in various screenings. Ten presumably new compounds from these strains are still at final purification stage or structure elucidation, whereas the basic structures of seven new compounds could be elucidated: cruentaren, kulkenon, holmenon, dawenol, tichunal, hymeron, and So 2129, a 14-membered β,δ -diketolactone. The complete structures of these compounds will be communicated as soon as their biological properties are known in more detail.

Trichangion B

In the 1997 GBF Annual Report the rather simple structure of trichangion A was reported as a new metabolite of *Sorangium cellulosum*, strain 880. In addition a deeply red coloured co-metabolite named trichangion B was observed in low yield. Recently, on the basis of spectral data the 7-hydroxy-phenothiazin-3-one structure was proposed and proven by comparison with an authentic synthetic sample. The presumed biosynthesis of trichangions from *p*-benzoquinone and cystein as donor of the sulfur and nitrogen atoms is under investigation.



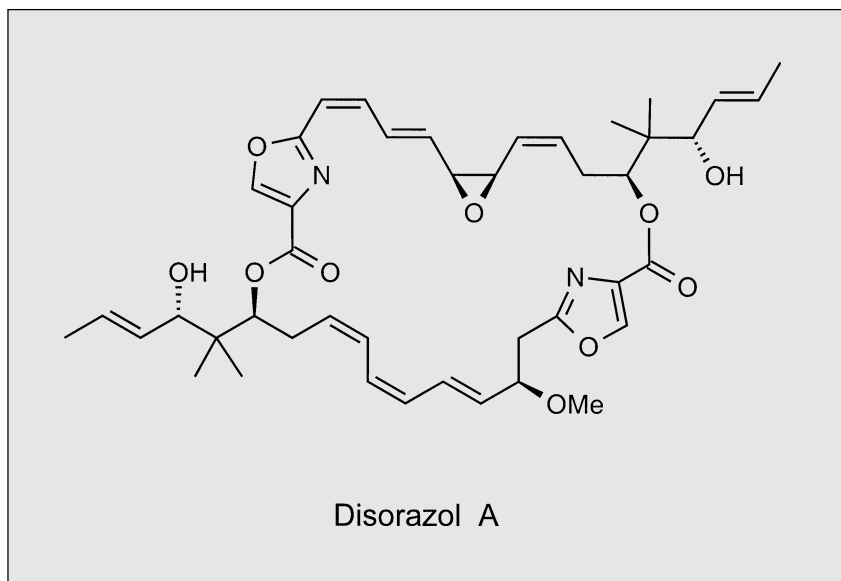
Tubulysin

In a screening for tubulin inhibitors strains of *Angiococcus disciformis* and *Archangium* sp. were identified to induce rapid decay of microtubules in animal cells and *in vitro*. The compounds responsible were formed only in minute amounts and had to be isolated and separated by multistep chromatography to give 6 components named tubulysin A-F. With an IC_{50} of 30 pg/ml for the mouse fibroblast cell line L 929 tubulysin D is more toxic than vinblastin (2 ng/ml) or dolastatin-10 (0.1 ng/ml) which are related by their mode of action. The structure and absolute configuration of the 7 stereogenic centers of tubulysin were derived from spectroscopic data and chemical degradation. Feeding experiments with ^{13}C -labeled acetate and methionine indicate a mixed amino acid/polyketide biosynthesis and prove that the unusual formaldehyde N,O-acetal group is formed from a N-methyl group by oxidation.

Disorazoles

Disorazoles are complex 26-membered bis-lactones, which have recently been identified as tubulin inhibitors, inducing decay of microtubules at even lower concentrations than tubulysin D. With an IC_{50} of 3 pg/ml for the cell line L 929 disorazole A is the most toxic compound ever tested in our system. Whereas the structures of disorazoles were elucidated years ago, the configuration of the 7 stereogenic centers has been assigned only recently after extensive degradation work. The disorazoles are too toxic for an application as antitumor agents, however, it may well be that chemical derivatives or analogs from total synthesis show a better therapeutic index.

Während die Struktur der Disorazole bereits vor mehreren Jahren aufgeklärt worden ist, konnte die absolute Konfiguration der 7 Stereozentren erst jetzt durch chemischen Abbau zugeordnet werden. Wenn auch die Disorazole selbst für eine Anwendung als Zytostatika zu wenig selektiv sind, so könnten doch semi-synthetische Derivate oder Analoga aus der Totalsynthese eine günstigere therapeutische Breite besitzen.

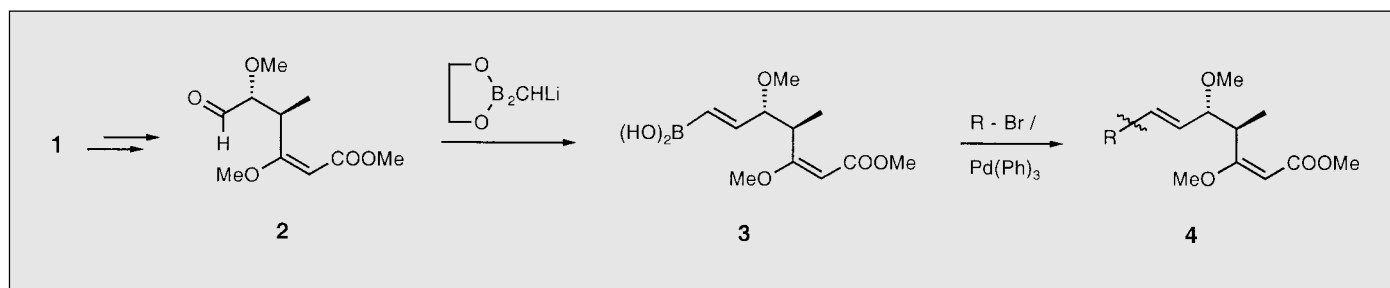


Semi-Synthese von β -substituierten β -Methoxyacrylat-Fungiziden

Durch die Isolierung der Melithiazole und die Derivatisierung von Myxothiazol wissen wir, daß der β -substituierte β -Methoxyacrylat-Pharmakophor in Verbindung mit geeigneten heterocyclischen Seitenketten hochwirksame Fungizide für den Pflanzenschutz mit sehr niedriger Warmblütlertoxizität ergibt. Um den Einfluß der Seitenkette u.a. auf die systemische Wirkung zu untersuchen, haben wir einen flexiblen Syntheseweg über das durch Fermentation gut zugängliche Myxothiazol (1) erschlossen. Nach Abbau zum Pattenden-Aldehyd (2) und Kettenverlängerung zur Vinylboronsäure 3 erfolgte mit heterocyclischen Bromiden eine glatte Suzuki-Kupplung zu den Melithiazol C-Analoga 4.

Semi-Synthesis of β -substituted β -methoxyacrylate fungicides

From isolation of the melithiazols and extensive derivatisation of myxothiazol we learned that the β -methoxy acrylate pharmacophore in combination with an appropriate heterocyclic side-chain leads to potent agricultural fungicides with very low mammalian toxicity. To investigate the influence of the side-chain on the systemic activity in more detail we developed a reaction sequence starting from myxothiazole A (**1**) obtained by fermentation. After degradation to the Pattenden-aldehyde (**2**) and chain extension to a vinylboronic acid **3**, Suzuki coupling with a variety of heterocyclic bromides smoothly gave melithiazol C analogs **4**.



Publications | Veröffentlichungen

Höfle, G., N. Glaser, M. Kiffe, H. J. Hecht, F. Sasse, H. Reichenbach: *N*-oxidation of epothilone A-C and *O*-acyl rearrangement to C-19- and C-21-substituted epothilones. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1971-1974

Söker, U., F. Sasse, B. Kunze, G. Höfle: Neighbouring-group Assisted Thiazole Ring-cleavage by DIBAL-H: An Expedient Synthesis of Melithiazol C from Myxothiazol A, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2021-2026

Höfle, G., N. Glaser, T. Leibold, M. Sefkow: Epothilone A - D and their Thiazole-modified Analogs as Novel Anticancer Agents, *Pure Appl. Chem.* **71** (2000) 2019-2024

Genetik der Sekundärstoffbildung bei Myxobakterien

Projektleiter | *Project leader*: Dr. R. Müller and Dr. St. Beyer | Nachwuchsforschergruppe Molekularbiologie der Myxobakterien | *Junior Research Group Molecular Biology of Myxobacteria*

Projektmitarbeiter | *Project members*: N. Gaitatzis, F. Gebhard, A. Hans, J. Knauber, B. Silakowski, St. Weinig

Myxobakterien produzieren zahlreiche biologisch aktive Moleküle. Diese auch als Sekundärmetabolite bezeichneten Substanzen finden z. T. Anwendung in der Pharma- und Agrochemie. Beispiele dafür sind Epothilon, ein vielversprechendes Medikament für die Krebstherapie und Myxothiazol, ein Inhibitor der eukaryontischen Atmungskette.

Zur Molekularbiologie der Sekundärstoffbildung in Myxobakterien ist bisher nur wenig bekannt. Für diese Organismengruppe auffällig ist das häufige Auftreten von Substanzen, die sowohl aus Carbonsäuren als auch aus Aminosäuren aufgebaut sind (z. B. Epothilon, Myxothiazol). Für die aufgestellte Hypothese, dass eine Kombination von zwei Enzymsystemen, sogenannten Polyketidsynthasen (PKS) und Polypeptidsynthetasen (NRPS), an der Biosynthese dieser Strukturen beteiligt sein könnten, existierten zu Beginn unserer Arbeiten nur sehr wenige Anhaltspunkte.

Genetisches Potenzial zur Bildung von Sekundärstoffen bei Myxobakterien

Wir isolierten aus verschiedenen Myxobakterien mehrere grössere DNA-Abschnitte, sogenannte Cluster, auf denen sowohl PKS- als auch NRPS-Gene vorlagen. Vier solcher Gencluster wurden in dem Epothilonproduzenten *Sorangium cellulosum* So ce90 identifiziert. Es gibt Hinweise, dass noch weitere, ebenfalls in Kombination vorliegende PKS- und NRPS codierende DNA-Abschnitte vorkommen. Eines dieser identifizierten Gencluster ist an der Biosynthese von Epothilonen beteiligt, wohingegen die Funktion der anderen unbekannt ist. Die funktionale Analyse der letzteren führt eventuell zu dem Auffinden von neuen Substanzen mit interessanter biologischer Aktivität. Analoge Untersuchungen bei *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 bestätigten die schon bei *Sorangium* gemachten Beobachtungen. Organismen aus dieser Bakteriengruppe besitzen ein viel höheres genetisches Potential zur Bildung von Sekundärstoffen, als zunächst aufgrund klassischer Screening-Experimente vermutet werden konnte.

Die Myxothiazolsynthetase besitzt ungewöhnliche Strukturmerkmale und katalytische Eigenschaften

Die molekulargenetische Analyse der Bildung von Myxothiazol in *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 ermöglichte die ersten Einblicke in das Zusammenspiel von Polyketidsynthasen mit Polypeptidsynthe-

tasen bei der Myxothiazolsynthetase, bei der Carbonsäuren mit Aminosäuren verknüpft werden. Für die Synthese von Myxothiazol werden insgesamt sieben Gene benötigt. Die davon abgeleiteten Genprodukte (s. Abb.) zeigen grosse Ähnlichkeiten zu PKS und NRPS aus Aktinomyceten und *Bacillus*. Es finden sich jedoch auch Abweichungen im Aufbau der Enzyme, die bisher nur sehr selten oder überhaupt nicht beobachtet wurden. Diese Strukturelemente können in biokombinatorischen Ansätzen zur Herstellung von neuen und interessanten biologischen Substanzen verwendet werden.

Veröffentlichungen | *Publications*

Beyer, S., B. Kunze, B. Silakowski, R. Müller: Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90, *Biochim. Biophys. Acta* **1445** (1999) 185-19

Silakowski, B., H. U. Schairer, H. Ehret, B. Kunze, St. Weinig, G. Nordsiek, P. Brandt, H. Blöcker, G. Höfle, St. Beyer, R. Müller: New Lessons for Combinatorial Biosynthesis from Myxobacteria: The Myxothiazol Biosynthetic Gene Cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 37391-37399

Genetics of Secondary Metabolism in Myxobacteria

Myxobacteria produce many biologically active compounds of low molecular weight. These so-called secondary metabolites and derivatives thereof are being used by the pharmaceutical or agrochemical industry. Examples are epothilon, a promising agent for the treatment of cancer, and myxothiazol, an inhibitor of the eukaryotic respiratory chain.

How secondary metabolites in Myxobacteria are produced is only poorly understood, especially in respect of the molecular genetics. It is interesting to notice that this group of organisms produces compounds, which are composed of both, carbonic acids and amino acids (i. e. epothilon, myxothiazol). At the beginning of our studies, the structural features of these molecules gave rise to the assumption, that a combination of two enzyme systems, polyketide synthases (PKSs) and nonribosomal polypeptide synthetases (NRPS) act in concert.

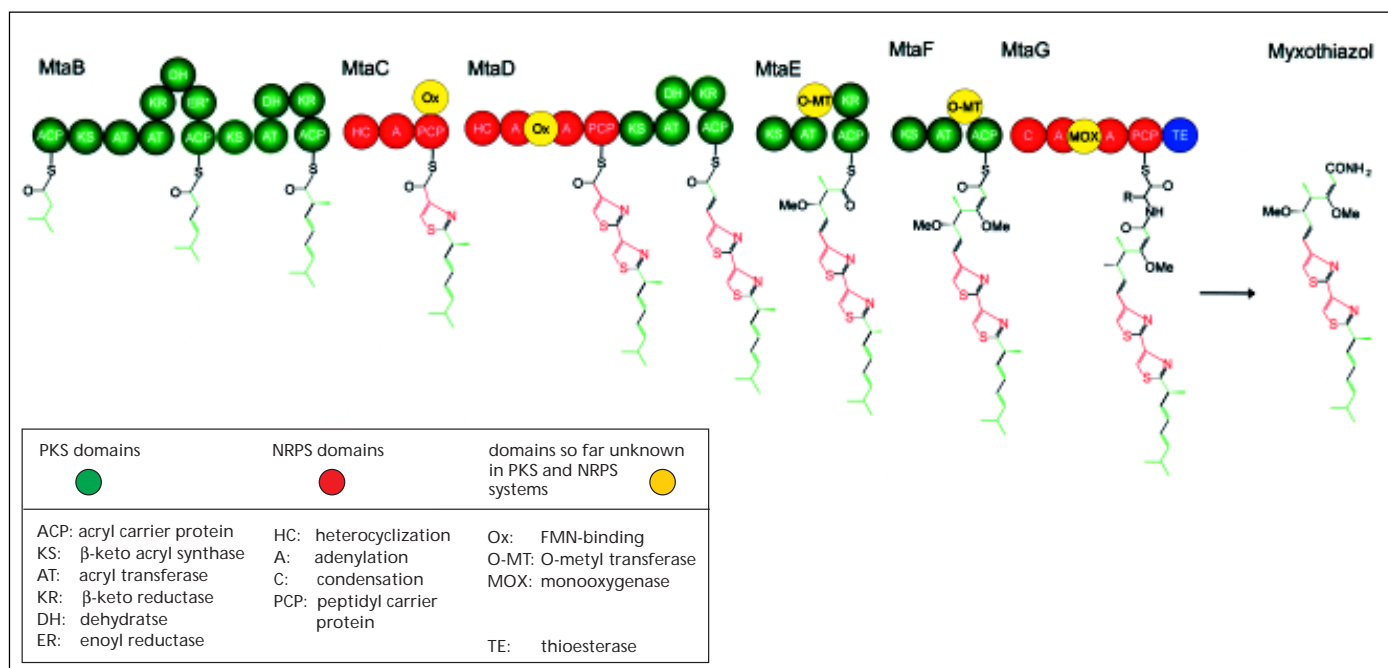
Genetic Potential of Myxobacteria to Produce Secondary Metabolites

We isolated from various Myxobacteria several large DNA fragments harbouring both PKS and NRPS genes (so-called gene clusters). For example, four gene clusters were isolated from *Sorangium cellulosum* So ce90. There is evidence for the existence of additional DNA fragments encoding a combination of PKS and NRPS enzymes. One of the identified gene clusters is involved in the biosynthesis of epothilons, whereas the functions of the others are still unknown. The functional analysis of the latter ones may lead to the discovery of new substances with interesting biological functions. Similar investigations with *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 confirmed the observation made with *Sorangium*. Organisms of the myxobacterial group possess a much higher genetic potential for the production of secondary metabolites than

expected when relying only on classical screening experiments.

The Myxothiazol Synthetase Contains Unusual Structural Features and Catalytic Activities

A molecular genetic analysis of the formation of myxothiazol in *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 gave first insight into the interaction of PKSs and NRPSs of the myxothiazol synthetase to generate covalent bonds between carbonic acids and amino acids. Seven genes are essential for the biosynthesis of myxothiazol. The gene products significantly resemble PKSs and NRPSs from actinomycetes and *Bacillus*. However, there are some intriguing deviations which have rarely or never been seen in known enzymes of this class (Fig). These structural elements might possibly be used in (bio-)combinatorial approaches in order to create new substances with interesting biological activity.



Kombinatorische Molekülrepertoires (SP 3.2)

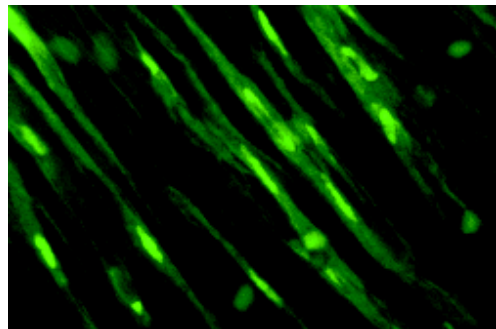
Projektleiter | *Project leader*: Dr. R. Frank | Arb. Gr. Molekulare Erkennung | *Res. Group Molecular Recognition*

Projektmitarbeiter | *Project members*: J. Collins, N. Horn, D. Stellfeld, W. Westphal; G. Bestetti, K. Bialek, S. Daenicke, J. Eichler, R. Frank, R. Gast, S. Heim, C. Hultschig, B. Kornak, Y. Melberg, K. Michaelis, M. Morr, H. Overwin, S. Pilawa, W. Tegge, A. Wiemann, J. Wissing, N. Zander; G. Höfle, J. Niggemann

Internationale Anerkennung

Die empirische Suche in einer grossen Sammlung möglicher Antworten ist inzwischen ein generell akzeptiertes Paradigma für die Lösung komplexer Fragestellungen wie z.B. auch die Suche nach neuen, pharmakologisch wirksamen Leitstrukturen geworden. Die „**Kombinatorische Synthese**“ zur effizienten Herstellung umfangreicher Sammlungen von Molekülstrukturen, sogenannten Substanzbibliotheken, hat sich in wenigen Jahren zu einem wichtigen und zukunftsweisenden Forschungsgebiet entwickelt. Für seine methodischen Pionierarbeiten auf diesem Gebiet wurde Dr. Ronald Frank 1999 mit dem „Advanced Chem Tech Award in Combinatorial Library Sciences“ als dritter Preisträger nach H.M. Geysen und R. Houghten ausgezeichnet. [siehe auch: *J. Comb. Chem* 1 (1999) 3-24; *Chem. Eng. News* 78 (2000) 25]

Fluorescence microscope image of the peptide distribution in smooth muscle cells of cerebral arteries from rat brain after treatment with one of the fluoresceine-labelled inhibitory peptides.



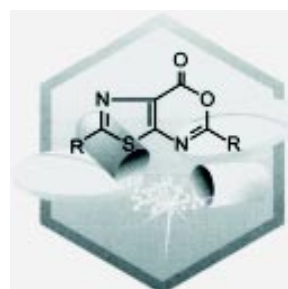
Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Peptidverteilung in glatten Gefäßwandmuskeln von zerebralen Arterien des Rattenhirns nach Inkubation mit einem der entwickelten Fluorescein-markierten inhibitorischen Peptide.

Die ersten spezifischen und zellmembrangängigen PKG-Peptidinhibitoren

Mit Peptidbibliotheken (SPOT-Methode) wurden optimale Sequenzen für die Bindung der cyclo-GMP abhängigen Proteinkinase I α (PKG) entwickelt. Basierend auf diesen Sequenzen wurden hochspezifische und zellmembrangängige inhibitorische Peptide für dieses Enzym hergestellt. Diese Sequenzen erlauben erstmals die selektive Blockierung von PKG und das *in vivo* Studium der physiologischen Effekte dieses wichtigen Enzyms. Mit Hilfe der Peptide wird z.B. die Regulation des Tonus von glatten Muskelzellen in Einzelzellen und im Gewebe untersucht.

Leitprojekt „The Drug Discovery Machine“

Die Firma Evotec AG in Hamburg und ihre Verbundpartner gehören zu den sechs Siegern der BMBF Leitprojektaus-schreibung „Diagnose und Therapie mit den Mitteln der Molekularen Medizin“ im Jahre 1998. Das Verbundprojekt „The Drug Discovery Machine“ umfasst 10 Gruppen mit einem Budget von 35 Mio. DM über vier Jahre. Wir sind als Substanzlieferanten („Compound Provider“) involviert und werden die Hochdurchsatzscreeninganlage von Evotec mit Substanzbibliotheken versorgen. Bis zu 1 Million Verbindungen sollen mit dem SPOT-Syntheseverfahren und Naturstofffragmenten als Synthesebausteine hergestellt werden.



Combinatorial Molecular Repertoires (SP 3.2)

International Acknowledgment

The empirical search within a large collection of possible answers has become a well accepted paradigm in the experimental work on complex problems such as the search for new pharmaceutical lead structures. Within a few years, combinatorial synthesis, which is providing the tools to rapidly generate large molecular collections („compound libraries“), has developed into a central and forward-looking field of research. In recognition of his pioneering work in this field, Dr. Ronald Frank received the „1999 Advanced Chem Tech Award in Combinatorial Library Sciences“, becoming the third recipient of this award after H.M. Geysen and R. Houghten. [see also: *J. Comb. Chem* **1** (1999) 3-24; *Chem. Eng. News* **78** (2000) 25]

The First Specific and Membrane-Penetrating Peptidic PKG-Inhibitors

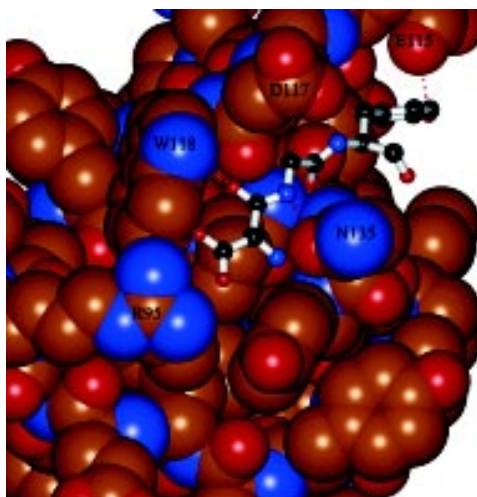
Optimal affinity ligands for the cyclic-GMP dependant protein kinase α were developed with peptide libraries generated and screened by the SPOT-method. Based on these sequences, highly specific and membrane penetrating inhibitory peptides for this enzyme were generated. These peptides allow for the first time the selective blocking of PKG and, thus, the *in vivo* study of the physiological role of this important enzyme. For example, the peptides are used in investigations of the regulation of the myogenic tonus of smooth muscle cells and arterial tissue.

“The Drug Discovery Machine“

The company Evotec AG and its joint partners are one of the six winners in the 1998 project competition on „Diagnosis and Therapy with the Help of Molecular Medicine“ of the BMBF. The joint project under the title „The Drug Discovery Machine“ guided by Evotec AG includes ten groups with a total budget of 35 Mio DM for a period of four years. We are one of these groups that contributes as compound provider. It is our aim to develop a suitable technology that will feed the high throughput screening (HTS) machinery of Evotec by supplying compound libraries. We will synthesize up to one million compounds utilizing the SPOT method and incorporating fragments of natural products as novel and unique building blocks.

Cosmix-plexing® Yields Ligands with a 1000-fold Higher Affinity

The Cosmix-plexing® variant of screening combinatorial phagemid display peptide libraries was applied to a series of src-homology domain type 3 (SH3) targets. Initially enriched weak binding populations of phages were subjected to a DNA recombination step which generated a new focussed diversity. The following iterative selection rounds led to highly specific ligands. As monomers, these peptides bind with subnanomolar binding constants. They are about 1000-fold more affine than those previously described and about 40.000-fold more affine than any known natural ligand. [PhD thesis of Nathalie Horn, TU-Braunschweig, March 2000].



Modell der festen Interaktion eines der Peptidliganden gebunden an die SH3-Protein-Domäne. -

Model of the tight binding interaction of one of the peptide ligands with the SH3 protein domain. (Model by H.-J. Hecht)

Liganden mit 1000-fach höherer Affinität

Die Cosmix-plexing® Variante des Screenings kombinatorischer Phagemid Peptidbibliotheken wurde auf verschiedene src-Homologie Domänen des Typ 3 (SH3) angewandt. Anfänglich schwach angereicherte Populationen wurden einem DNA-Rekombinationsschritt unterzogen, welcher eine neue zielorientierte Diversität generiert. Anschließende iterative Selektionsrunden führten zu hoch spezifischen Liganden, die als Monomere mit subnanomolaren Bindungskonstanten etwa 1000-fach stärker binden als solche, die bisher von anderen Labors berichtet wurden, und ca. 40.000-fach stärker als natürliche Liganden. (Dissertation Nathalie Horn, TU Braunschweig, März 2000).

Technologie-Transfer

Jerini BioTools GmbH, eine von Dr. J. Schneider-Mergener 1994 in Berlin gegründete Firma, hat die SPOT-Synthese zu ihrer zentralen Plattformtechnologie für Dienstleistung und Pharmazeutikentwicklung gemacht. Jerini hat jetzt die GBF-Patentfamilie zur SPOT-Synthese erworben.

Für die erfolgreiche Gründung der Firma Cosmix biologicals GmbH, die die Entwicklungen der Abt. Angewandte Genetik zum Phage-Display-Verfahren (siehe oben) kommerzialisiert, hat Herr Prof. Dr. John Collins im Dezember 1999 den Technologie-Transfer-Preis der IHK Braunschweig erhalten.

Technology Transfer

Jerini Bio Tools GmbH in Berlin, founded 1994 by Dr. J. Schneider-Mergener, has made SPOT-synthesis a central technology for their custom service and development business in the field of drug discovery. Jerini now has acquired the GBF patent family on SPOT synthesis.

In December 1999, Prof. Dr. John Collins received the Technology-Transfer-Award from the IHK Braunschweig in recognition of his successful foundation of Cosmix biologicals GmbH, which is commercializing the developments on phage display methodology achieved at the GBF department of Applied Genetics (see above).



IHK Präsident Dr. Klaus Schuberth überreicht die Preisurkunde an Prof. Dr. John Collins.

IHK President Dr. Klaus Schuberth handing over the award to Prof. Dr. John Collins.

Publications | Veröffentlichungen

*Howell, B. W., Lanier, L. M., Frank, R., Gertler, F. B., Cooper, J. A.: The Disabled-1 Phosphotyrosine-Binding Domain Binds to the Internalization Signals of Transmembrane Glycoproteins and to Phospholipids, *Mol. Cell Biol.* **19** (1999) 5179-5188*

*Gast, R., Glöckler, J., Höxter, M., Kieß, M., Frank, R., Tegge, W.: Method for the determination of protein kinase substrate specificities by the phosphorylation of peptide libraries on beads, phosphate-specific staining, automated sorting, and sequencing, *Anal. Biochem.* **276** (1999) 227-241*

*Llanos, R., Chevrier, V., Ronjat, M., Martinez, P., Frank, R., Bornens, M., Wehland, J., Job, D.: Tubulin binding sites on tubulin: identification and properties, *Biochemistry* **38** (1999) 15712-15720*

*Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.-G., Becker, W.: Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 2431-2438*



R. Frank, receiving the ACT award at the 16th American Peptide Symposium in Minneapolis, USA.

Verleihung des ACT-Preises an R. Frank auf dem 16. Amerikanischen Peptid Symposium in Minneapolis, USA.



Koordinator | *Coordinator*: Prof. Dr. K. N. Timmis | Abt. Umweltmikrobiologie | *Dept. of Environmental Microbiology*

Umweltbiotechnologie (SP 4)

Mikroorganismen sind ubiquitär; indem sie Umweltbedingungen tolerieren, die für höhere Organismen viel zu extrem sind, definiert ihr Lebensraum die Biosphäre. Mikrobielle Aktivitäten beeinflussen in hohem Maße sowohl globale Prozesse (z.B. den Kohlenstoffkreislauf und die globale Erwärmung) als auch lokale Prozesse (z.B. verursachen sie Krankheiten bei Mensch und Tier; stellen essentielle Nahrung für Pflanzen und Tiere zur Verfügung). Mikroben üben, positiv wie negativ, auf vielfältige Weise einen kritischen Einfluß auf den Menschen und seine Aktivitäten aus: einige von ihnen sind verantwortlich für den Großteil der menschlichen Krankheiten und Sterblichkeit, wohingegen andere uns wiederum Antibiotika zur Verfügung stellen um Krankheiten zu behandeln, wieder andere spielen eine wichtige Rolle bei der Reinigung unserer Umwelt von organischen Abfallprodukten. Ein großer Teil der Biotechnologie basiert auf Mikroben und ihren Produkten. Unsere Fähigkeit, mikrobielle Aktivitäten zu beeinflussen, um größeren Nutzen aus den positiven zu ziehen und die Auswirkungen der negativen zu verringern, setzt ein Verständnis dafür voraus, wie Mikroben in ihren Habitats leben und funktionieren und wie ihre Aktivitäten gesteuert werden.

Die klassische Mikrobiologie befaßt sich mit dem Studium von Reinkulturen, die unter Laborbedingungen wachsen. In der Natur jedoch wachsen Mikroben in komplexen, diversen und dynamischen Gemeinschaften, deren Mitglieder interagieren und die verfügbaren Ressourcen auf komplexe Weise teilen. Es sind diese Interaktionen sowie die Interaktionen mit anderen biotischen und

abiotischen Komponenten des Habitats, die die Aktivitäten der Gemeinschaft bestimmen. Zur Zeit haben wir kein allgemeines Verständnis dieser Interaktionen. Die Ziele des Forschungsschwerpunktes Umweltbiotechnologie bestehen darin, mikrobielle Gemeinschaften als funktionelle Einheiten zu verstehen, kritische Interaktionen, die die Aktivitäten von Gemeinschaften steuern, aufzudecken, Interventionen zu entwickeln und zu validieren, die zu substantiellen Erhöhungen von biotechnologisch interessanten Aktivitäten führen, sowie, durch Exploration der mikrobiellen Diversität, neue mikrobielle Produkte und Stoffwechselaktivitäten zu entdecken. Multiskaliger (Gen, Organismus, Gemeinschaft; Reagenzglas, Chemostat, natürliches Habitat) und multidisziplinärer Ansatz (mikrobielle Ökologie, Physiologie, Phylogenetik, Biochemie, analytische Chemie, Genetik/Genomik, Bioinformatik und Modellbildung) charakterisieren den Forschungsschwerpunkt. Wenn die gewonnenen Erkenntnisse auch allgemein für die meisten Arten mikrobieller Gemeinschaften anwendbar werden, so fokussiert sich unsere Forschung auf mikrobielle Gemeinschaften, die Umweltschadstoffe verstoffwechseln können, so daß ein wichtiges Ziel des Schwerpunktes darin besteht, einen Schlüsselbeitrag zur nachhaltigen Entwicklung unserer Gesellschaft zu leisten.

Environmental Biotechnology (SP 4)

Microorganisms are ubiquitous and, because they can tolerate environmental conditions far too extreme for higher organisms, their habitats define the biosphere. Microbial activities profoundly influence both global processes (e.g. the carbon cycle and global warming) and local ones (e.g. they cause diseases in plants and animals; provide essential nutrients for plants and animals). Microbes critically impact human beings and their activities positively and negatively in a multitude of ways: some are responsible for the greater portion of human disease and mortality, whereas others provide us with antibiotics to treat disease, and yet others play a critical role in cleansing our environment of organic wastes. Much of biotechnology is based on microbes and their products. Our ability to influence microbial activities, in order to obtain greater benefit from positive ones and to diminish the effects of negative ones, requires an understanding of how microbes live and function in their habitats, and how their activities are regulated. Classical microbiology focusses on the study of pure cultures growing under laboratory conditions. However, microbes in nature grow

as complex, diverse and dynamic communities, the members of which interact and share available resources in complex ways. It is these interactions, and interactions with other biotic and abiotic components of their environment, that determine community activities. At present we have no general understanding of such interactions. The goals of the Environmental Biotechnology research programme are to understand microbial communities as functional units, to elucidate the critical interactions that regulate community activities, to develop and validate interventions that result in substantive increases in activities of biotechnological interest, and to discover new microbial products and metabolic activities by exploring microbial diversity. A multi-scale (gene, organism, community; test tube, chemostat, natural habitat) and multi-disciplinary (microbial ecology, physiology, phylogeny, biochemistry, analytical chemistry, genetics/genomics, bioinformatics, and modelling) approach characterises the research programme. Though the results obtained will be generally applicable to most types of microbial community, our research focusses on microbial communities that metabolise environmental pollutants, and an important goal of the programme is to make key contributions to the sustainable development of our society.

Biodegradation organischer Schadstoffe (SP 4.1)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. D. Pieper | Arb. Gr. Biodegeneration | *Res. Group of Biodegradation*

Projektmitarbeiter | *Project members*: H.-A. Arfmann, M. D'Enza, B. Hofer, I. Hinner, E. Katsivela, M. Klemba, K. Pollmann, T. Potrawfke, P. Rapp, M. Zielinski

Ziel des Projektes ist es, das natürliche mikrobielle Potential zum Abbau hochtoxischer Verbindungen wie polychlorierte Biphenyle oder Benzole zu verstehen und handhabbar zu machen. Die Isolation neuer Gene und Enzyme mit Relevanz für den Schadstoffabbau wie auch die Charakterisierung neuer Abbauewege erweitert das verfügbare Spektrum an Werkzeugen zur Entwicklung effizienter Mikroorganismen, die toxische Schadstoffe unter vielfältigen Umweltbedingungen abbauen und für effektive Bioremediationsprozesse eingesetzt werden können. Erst ein Verständnis der Fähigkeiten von Mikroorganismen auf molekularer Ebene ermöglicht die Aufklärung von Engpässen im Schadstoffabbau und die experimentelle Entschärfung derartiger Engpässe.

Abbau von PCBs

Einer der erfolgsversprechendsten Mikroorganismen zum Umsatz polychlorierter Biphenyle ist *Rhodococcus globerulus* P6, der eine Vielzahl von PCBs umsetzen kann und auch bei niedrigen Temperaturen aktiv ist. In unseren vorherigen Arbeiten haben wir die initiale Dioxygenierung, einschließlich der Spaltung des ersten aromatischen Ringes, analysiert. Um den weiteren Metabolismus dieser Ringspaltungsprodukte zu untersuchen und um herauszufinden, ob derartige Reaktionen Engpässe bei der Verstoffwechslung von PCBs darstellen, haben wir das Gen der BphD-Hydrolase in *E. coli* exprimiert und die Transformation verschiedener Produkte der PCB-Ringspaltung in Benzoate und C5-Körper untersucht. Während Substrate, die nur am aromatischen Ring chlorsubstituiert wurden, eine hohe Umsatzrate aufwiesen, reduzierten entsprechende zusätzliche Substituenten am aliphatischen Teil des Substrates den Umsatz auf insignifikante Werte. Somit stellt der durch BphD katalysierte Umsatz einen weiteren Engpass beim Abbau von an beiden aromatischen Ringen chlorsubstituierten PCBs dar.

Abbau von Chlorbenzolen

(Polychlor)benzole abbauende Mikroorganismen können bezüglich ihrer Abbaufähigkeiten in solche, die niedrig chlorierte und unchlorierte Derivate abbauen können und in solche, die hohe Aktivitäten insbesondere mit hoch chlorierten Derivaten aufweisen, unterschieden werden. Am Stamm *Burkholderia sp.* PS14, einem der wenigen bisher isolierten Abbauer hochchlorierter Benzole, wurde sowohl in Flüssigkulturen als auch in Bodensystemen ein Abbau dieser Verbindungen bis unter die Nachweisgrenze von 0.1 ppb nachgewiesen. Die beobachtete hohe Affinität des Bakteriums für Tetrachlorbenzol auch im ppb-Bereich begünstigt hohe Stoffübergangsraten im Boden und wirkt so einer Diffusionslimitierung entgegen (Rapp und Timmis, Appl. Environ. Microbiol. **65** (1999) 2547-2552). Diese Eigenschaften lassen PS14 für eine Bioremediation von mit hochchlorierten Benzolen belasteten Böden geeignet erscheinen. Niedrig chlorierte Benzole sind die Hauptschadstoffe eines quartären Aquifers im Raum Bitterfeld, für den Sanierungsstrategien entwickelt werden. In einem Laborscreening wurden

Biodegradation of Organic Pollutant

The goal of the project is to understand and exploit the natural diversity for biodegradation of highly toxic compounds such as polychlorinated biphenyls and benzenes. The isolation of new genes, enzymes and metabolic routes relevant for biodegradation expands the toolbox available for the development of efficient bacterial strains capable of mineralizing toxic aromatic pollutants under a variety of environmental conditions. Understanding the capabilities of microorganisms at the molecular level allows identification of bottlenecks in biodegradation and opens up possibilities to experimentally alleviate such bottlenecks.

Degradation of PCBs

One promising organism for bioremediation is *Rhodococcus globerulus* P6, which can oxidize a broad spectrum of PCBs and is active at low temperatures. We have previously analyzed the initial oxidation reactions, including cleavage of the first aromatic ring. In order to study the subsequent metabolism of the ring cleavage products, and to assess whether such reactions constitute bottlenecks in PCB metabolism, we have expressed in *E. coli* the gene of the BphD hydrolase and analyzed the transformation of different PCB ring-cleavage products into benzoates and C5-carbon chains. Whereas substrates that are only chlorosubstituted in the aromatic ring are transformed at high rates, additional substituents on the aliphatic part of the molecule depressed formation to insignificant levels. Thus, the BphD catalyzed reaction constitutes a bottleneck in the degradation of PCB chlorosubstituted in both aromatic rings.

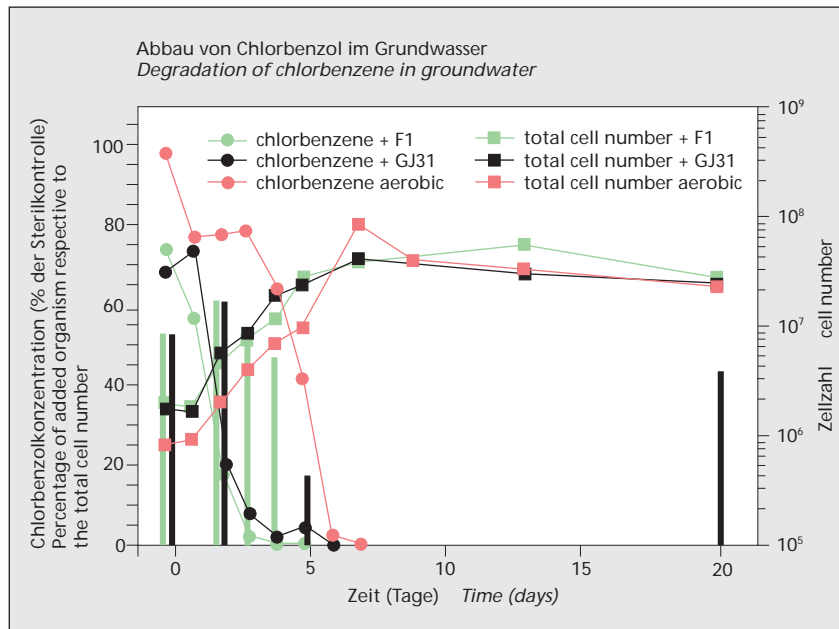
Degradation of chlorobenzenes

(Polychloro)benzene-degrading microorganisms can be differentiated into those capable of degrading lower chlorinated and unchlorinated derivatives, and those with high activity towards highly chlorinated derivatives. *Burkholderia* sp. PS14, one of the few microorganisms capable of degrading highly chlorinated benzenes, degrades such compounds to concentrations below the detection limit of 0.1 ppb, both in liquid culture as well as in soil microcosms. The high affinity of this organism for tetrachlorobenzene, even in the ppb range, will result in steep concentration gradients in soil that promote fast intraparticle mass transfer rates (Rapp and Timmis, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 2547-2552). These properties indicate PS14 to be a promising organism for bioremediation of sites contaminated with highly chlorinated benzenes.

Lower chlorinated benzenes are the major pollutants present in an aquifer of the Bitterfeld region of East Germany. We investigated two bioremediation strategies in aquifer microcosms, namely biostimulation of the indigenous groundwater microflora, and bioaugmentation (augmentation of indigenous biocatalysts by introduction of specialized strains). In the biostimulation experiments we could show an endogenous biodegradation potential of the indigenous microflora under aerobic as well as under anaerobic denitrifying conditions. Bioaugmentation with the *P. putida* strains F1ΔCC (a genetically engineered organism)

Betrieb des 100 l Pilotreaktors bei steigenden Zufuhrdaten an Dichlorpropen (1.8-15 mmol/h). Unten rechts eine elektronenmikroskopische Aufnahme des abbauenden Biofilms auf der Silikonmembran.

Operation of the pilot 100 l reactor with increasing dichloropropene feed rates of 1.8-15 mmol/h. The insert shows an electron micrograph of the degrading biofilm on the silicone membrane.



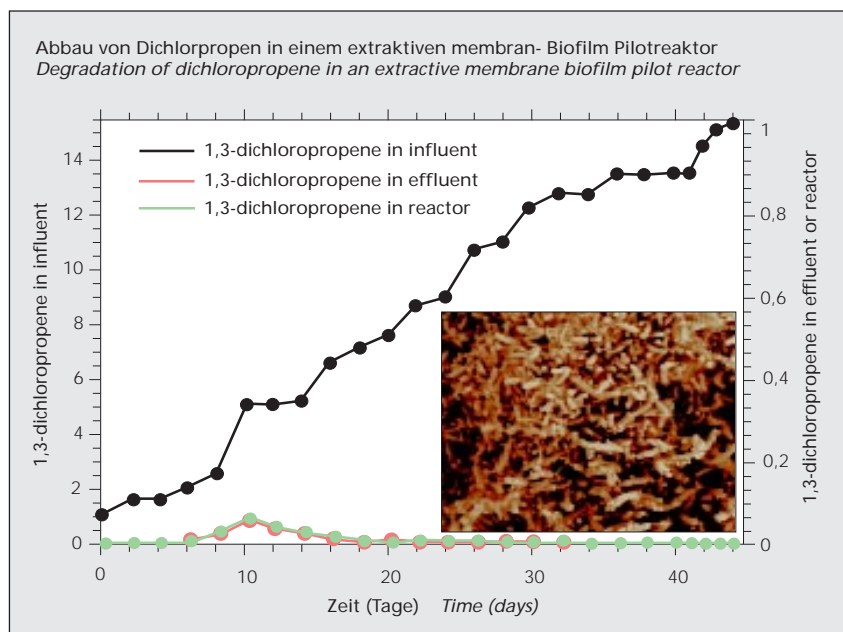
Chlorbenzolkonzentration (zu Beginn 30 mg/l) sowie Gesamtzellzahl in Biostimulations- (rot) und Bioaugmentationsversuchen (Zugabe von *Pseudomonas putida* F1 in grün, Zugabe von *Pseudomonas putida* GJ31 in schwarz), sowie der Anteil der Spezialstämme an der gesamten Mikroflora (Balken), nachgewiesen durch FISH (fluoreszierende in-situ Hybridisierung).

Chlorobenzene concentration (initially 30 mg/l) and total cell number in biostimulation- (red) or bioaugmentation experiments (addition of Pseudomonas putida F1 in green, addition of Pseudomonas putida GJ31 in black), as well as percentage of added organisms (indicated as bars) respective to the total cell number (estimated by FISH, fluorescent in-situ Hybridisierung)

für Bioaugmentationsversuche geeignete Chlorbenzol mineralisierende Bakterienstämme ausgewählt, und diese hinsichtlich ihrer Abbaukapazität unter umweltnahen Bedingungen und in Konkurrenz mit der autochthonen Mikroflora untersucht. In Biostimulationsversuchen konnten wir ein Abbaupotential der endogenen Mikroflora sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen nachweisen. Inokulation zweier Spezialstämme, des gentechnisch veränderten *P. putida* F1 Δ CC oder des Stammes *P. putida* GJ31, welcher einen bisher einzigartigen Abbauweg aufweist, beschleunigte signifikant den Abbau der Chlorbenzole. Während GJ31 nach Abbau der Chlorbenzole in batch-Ansätzen größtenteils verschwand, überlebte F1 Δ CC. Diese Versuche zeigen, dass Bioaugmentation eine erfolgversprechende Methode zur Sanierung von mit Chlorbenzolen kontaminierten Grundwasserleitern ist.

Eliminierung von Chloraliphaten aus Abwasserströmen

Zur Entgiftung von toxischen Abläufen der chemischen Industrie wurde von Kooperationspartnern ein extraktiver Membran-Biofilm-Reaktor entwickelt. Um 1,3-Dichlorpropen- (DCPE, ein Nematozid) haltige Abwässer mittels dieses Reaktorsystems reinigen zu können, wurde von uns ein hocheffektiver Biofilm angereichert, der in der Lage ist, *cis*- und *trans*-DCPE zu mineralisieren. Der Biofilm besteht aus 5 Bakterien, von denen zwei (beides *Rhodococcus erythropolis*-Stämme) mit DCPE als einziger Kohlenstoffquelle wachsen können während ein *Pseudomonas*-Stamm Metabolite des Stoffwechsels verwertet. Dieser Biofilm ist auf der Bio-Medium Seite des Membranreaktors etabliert und baut das durch Diffusion durch die Membran gelangende DCPE ab. Diese Technik erlaubt sowohl einen biologischen Abbau des Schadstoffs als auch eine Wiedergewinnung der entgifteten anorganischen Salze, d.h. ein Recycling der Synthesebrühen. Das Verfahren wurde in einer 100 l Pilotanlage erfolgreich eingesetzt und erlaubte einen Abbau auch bei hohen Flußraten und Stoßbelastungen. Charakteristisch für den Biofilm war seine geringe Biomassenbildung, welche eine Reinigung oder Austausch der Membran unnötig macht, so dass das System im Langzeitbetrieb kostengünstig gefahren werden kann (Katsivela *et al.*, Appl Microbiol Biotechnol. 52:853-62).



or GJ31 (harboring a unique degradative pathway) resulted in a significantly enhanced chlorobenzene degradation. Whereas GJ31 largely disappeared from the microcosms after removal of the chlorobenzene, F1ΔCC persisted. These experiments indicate that bioaugmentation may be a promising technology for bioremediation of chlorobenzene-contaminated aquifers.

Elimination of chloroaliphatics from waste streams

Our cooperation partners had previously developed an extractive membrane biofilm reactor for the detoxification of chemical industry effluents. In order to treat 1,3-dichloropropene (DCPE, a nematocide)-containing effluents with this reactor system, a highly effective biofilm capable of degrading *cis*- and *trans*-dichloropropene was enriched on one side of a silicone extractive membrane biofilm reactor, with DCPE-containing industrial wastewater flowing on the other. This biofilm is able to mineralize DCPE that diffuses through the membrane. Five bacterial strains with degradation capabilities were isolated from the biofilm. Two *Rhodococcus erythropolis* strains grow with DCPE as sole carbon source whereas a third one, a *Pseudomonas* strain, utilizes DCPE metabolites. The process allows biological degradation of the pollutants and recycling of the inorganic salt burden. It was successfully applied in a 100 l pilot plant, and resulted in complete degradation of pollutants, even at high flow rates or with shock loads. The low biomass formation circumvented a necessity for frequent cleaning or exchange of membranes, and thus allows long performance at low costs (Katsivela et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 853-62).

Publications | Veröffentlichungen

Katsivela E., Bonse D., Krüger A., Strömpl C., Livingston A., Wittich R.-M.: An extractive membrane biofilm reactor for degradation of 1,3-dichloropropene in industrial waste water, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 853-862

Rapp P., Timmis K. N.: Degradation of chlorobenzenes at nanomolar concentrations by *Burkholderia* sp. strain PS14 in liquid cultures and in soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 2547-2552

Seeger M., Zielinski M., Timmis K. N., Hofer B.: Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachloro-biphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the *bph*-encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 3614-3621

Beil S., Timmis K. N., Pieper D. H.: Genetic and biochemical analyses of the *tec* operon suggest a route for evolution of chlorobenzene degradation genes, *J. Bacteriol.* **181** (1999) 341-346

Mikrobielle Entsorgungsverfahren (SP 4.2)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. V. Hecht | Arb.Gr. Umweltbioverfahrenstechnik | Res. Group *Environmental Biochemical Engineering*

Projektmitarbeiter: K. Jung, D. Abou-Zeid, S. Basei, H. Biebl, L. Bischoff, E. Grothe, R.-J. Müller, I. Kleeberg, E. Rantze, S. Rühle, H. Schwab-Hanisch, M. E. Shalaby, H. Schrader, K. Welzel, J. van den Heuvel, A.-P. Zeng, T. Gäbel, K. Gollmer, J. Nothnagel, Y. Li, H. von Canstein, I. Wagner-Döbler

Ziel ist die Entwicklung von Verfahrensstrategien für effektive biologische Abbauprozesse. Dies beinhaltet auch die Entwicklung neuer bioabbaubarer Materialien sowie den Einsatz nachwachsender Rohstoffe. Das Spektrum der bearbeiteten Themen reicht hierbei von grundlegenden Aspekten (Aufklärung von Abbaumechanismen, Erkennung limitierender Teilschritte) über die mathematische Modellierung von Abbauvorgängen bis hin zu anwendungsorientierten Entwicklungen.

Polymere

Beim Themenbereich Polymerabbau (Dr. R.-J. Müller) steht die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Polymerstruktur, biologischen Bedingungen und der Abbaubarkeit der Polymere im Zentrum der Arbeiten. Aus den gewonnenen Erkenntnissen konnten gezielt neue bioabbaubare Kunststoffe entwickelt und die Umweltsicherheit bestehender Produkte abgeschätzt werden (siehe „Biologisch abbaubare Polymere“, S. 35 ff). Eng verknüpft damit sind die Arbeiten zur mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol (Dr. H. Biebl), als Ausgangsmaterial (aus nachwachsenden Rohstoffen) beispielsweise für die Herstellung des Kunststoffes Polytrimethylenterephthalat (PTT). Eine Wirtschaftlichkeitsanalyse des entwickelten Produktionsverfahrens ergab, dass der mikrobielle Prozess gegenüber der chemischen Synthese durchaus konkurrenzfähig ist.

Schadstoffabbau in Bioreaktoren

Im Projekt Schadstoffabbau in Bioreaktoren (Dr. V. Hecht) wird der gezielte biologische Abbau einzelner umweltrelevanter Chemikalien unter reaktionstechnischen Gesichtspunkten untersucht. Auch hier ist der zentrale

Aspekt die Aufklärung der durch Wechselwirkungen von Abbaueg-Intermediaten (Inhibitionen) oft sehr komplexen Abbaumechanismen mit der Zielrichtung der Entwicklung leistungsfähiger technischer Entsorgungsprozesse. Auf der Basis eines Drei-Phasen-Wirbelschichtreaktors mit speziellen trägerfixierten Mikroorganismen (Zellrückhaltung) wurden Abbauprozesse entwickelt, die hohe Durchsätze mit guter Stabilität gegenüber Konzentrationsänderungen der Schadstoffe im Zulauf vereinen. Am Beispiel eines Phenol und Benzoesäure enthaltenen Modellabwassers konnte gezeigt werden, dass sich die Durchflussrate bis auf 6.14 h^{-1} bei vollständigem Abbau der beiden aromatischen Verbindungen steigern lässt. Dies entspricht einem Durchsatz von 147 Liter Modellabwasser pro Tag pro Liter Reaktorvolumen. Verglichen mit einem Reaktor ohne Zellrückhaltung bei gleichen Betriebsbedingungen bedeutet das eine mehr als zwanzigfache Steigerung des Durchsatzes.

Microbial Degradation Processes (SP 4.2)

The research activities are intended to recognize design strategies for efficient microbial degradation processes. Development of new biodegradable materials and the use of renewable resources are also part of the project. The thematic spectrum includes basic research topics such as identification of degradation mechanisms and rate limiting steps, mathematical modelling, as well as application oriented aspects.

Polymers

The work on polymer degradation (Dr. R.-J. Müller) deals primarily with the elucidation of the correlation between polymer structure and the biodegradability of the plastic materials under different biological environments. This was the basis for the synthesis of new tailor made biodegradable plastics and the assessment of the ecological safety of existing polymers, as well (see xxxxx). Closely related is the work on production of 1,3-propanediol (Dr. H. Biebl) from renewable resources. This compound is regarded as a valuable basic chemical and can be used, for example, for the production of the plastic polytrimethyleneterephthalate (PTT). Recently, an economical analysis of the developed process revealed that the microbial production may well compete with the chemical synthesis presently in use.

Degradation of pollutants in bioreactors

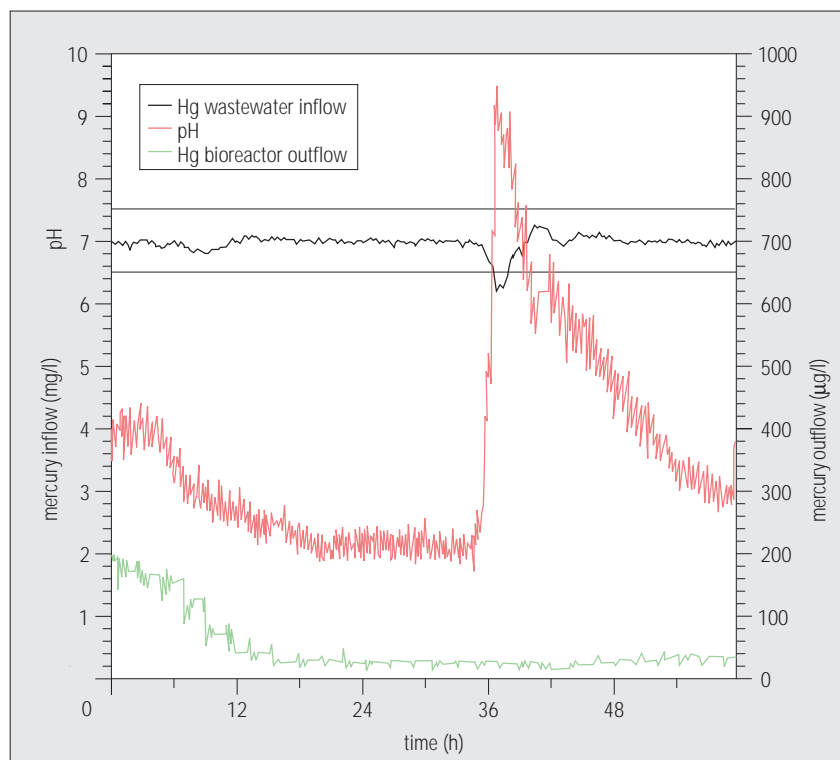
A systematic investigation of the microbial degradation of toxic organic chemicals using reaction kinetic methods is the goal of the project degradation of pollutants in bioreactors (Dr. V. Hecht). Here likewise, the central aspect is the elucidation of the complex degradation mechanisms, which are often subject to various inhibitions, and, on the basis of these investigations, to develop efficient degradation processes. In the last years, degradation processes, which combine high liquid flow with good stability to fluctuating feed concentrations of the pollutants, were developed using a fluidized bed reactor with immobilized microorganisms (cell retention). For a model waste water containing phenol and benzoic acid, it was shown that the dilution rate can be increased up to 6.14 h^{-1} under conditions of complete mineralization of both aromatic compounds. This corresponds to a flow of 147 liter of model waste water per day per liter reactor volume. Compared with a reactor without cell retention but using the same process conditions (feed concentrations), the efficiency is more than twenty times higher.

Mercury remediation with a pilot plant

(Dr. I. Wagner-Döbler) using microbes has been applied in technical scale. Mercury pollution of the environment is a severe problem. However, current technologies all have major drawbacks, including high costs, which prevent their use in poor countries. Therefore, we developed an end-of-pipe bioremediation technology which is based on the mercury detoxification mechanism of bacteria encoded by the mer operon. In 1999, we operated a pilot plant developed together with Preussag Wassertechnik. The complete robustness of the mercury reducing microbial consortium against all kinds of stresses encountered during on-site operation at a chloralkali electrolysis factory and its high efficiency was demonstrated. This is the first time worldwide that microbes have been successfully applied to an industrial mercury pollution problem.

Performance of the mercury remediation pilot plant after two months of continuous operation at ECI Elektrochemie Ibbenbüren. Process data recorded every minute are shown. Wastewater inflow rate was $1.2 \text{ m}^3/\text{h}$. The mercury retention efficiency is 99%.

Quecksilberrückhaltung der Pilotanlage nach zwei-monatigem kontinuierlichen Betrieb bei ECI Elektrochemie Ibbenbüren. Die Prozeßdaten wurden jede Minute aufgezeichnet. Die Zulaufrate des Abwassers betrug $1.2 \text{ m}^3/\text{h}$. Die Rückhalteeffektivität des Bioreaktors für Quecksilber betrug 99%.



Reinigung von Quecksilber-haltigen Abwässern

Der Einsatz von Bakterien zur Quecksilbersanierung (Dr. I. Wagner-Döbler) wurde erstmals im technischen Maßstab durchgeführt. Die Belastung der Umwelt durch Quecksilber ist ein sehr ernstes Problem. Alle zur Verfügung stehenden Reinigungstechnologien haben erhebliche Nachteile, einschließlich hoher Kosten. Wir haben eine End-of-pipe Technologie entwickelt, die auf dem durch das mikrobielle mer Operon kodierten Entgiftungsmechanismus für Quecksilber basiert. Im Jahr 1999 wurde eine Pilotanlage in Betrieb genommen, die zusammen mit Preussag Wassertechnik entwickelt wurde. Wir konnten die völlige Robustheit des Quecksilber reduzierenden mikrobiellen Konsortiums gegen alle Arten von Streß und die enorme Effektivität des Verfahrens bei der Reinigung des Abwassers einer Chloralkali-Fabrik vor Ort demonstrieren. Damit wurden weltweit zum ersten Mal Mikroorganismen erfolgreich für ein Quecksilberproblem in der Industrie eingesetzt.

Veröffentlichungen | *Publications*

Witt U., M. Yamamoto, U. Seeliger, R.-J. Müller, V. Warzelhan: Biodegradable Polymeric Materials - Not the Origin but the Chemical Structure Determines Biodegradability, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**(10), (1999) 1438-1442

Biebl H., K. Menzel, A.-P. Zeng, W.-D. Deckwer: Microbial production of 1,3-propanediol (mini-review), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 289-297

Canstein, H. v, Y. Li, K. N. Timmis, W.-D. Deckwe, I. Wagner-Döbler: Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 5279-5284

Hecht, V., O. Langer, W.-D. Deckwer: Degradation of phenol and benzoic acid in a three phase airlift reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **70** (2000) 391-399



Molekulare mikrobielle Ökologie (SP 4.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. W.- R. Abraham | Arb. Gr. Chemische Mikrobiologie | *Res. Group of Chemical Microbiology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: E. Moore, S. Baumgarte, A. Krüger, B. Nogales, A.-M. Osborn, B. Möller, R. Weller, C. Stömpl, A. Wasliczek, H. Lünsdorf, E. Haase, M. B. Jung, H. Jungnitz, A. Rabenau, A. Bennasar, K. Wilken, R. Erb, B. Hofer, R. Wittich, R. Sanjuan, D. Wenderroth, S. Hermann, C. Hesse, S. Langner, T. Jeschke, T. Niepel, P. Wolff, I. Wagner-Döbler, H. von Canstein, A. Felske, I. Pubantz, B. Pauling, H. Uphoff, M. Stätz, V. Heindl, S. Heim, D. Bludau, M. Höfle, I. Pöhler, S. Pretzer, J. Bötzel, D. Pieper, P. Rosenbock, G. Molinari, P. Golyshin, O. Golyshina, T. Chernikova, A. Prieto-Fernandez, R. Sanjuan; W. Muriiti, Nairobi University, Kenya

Mikrobielle Ökologie ist das Studium von mikrobiellen Gemeinschaften und versucht folgende Fragen zu beantworten: Welches sind die Mitglieder der Gemeinschaft? Welche Aktivitäten weisen diese auf und welche physiologischen Rollen spielen sie? Wie interagieren sie untereinander? Wie reagieren sie auf Veränderungen der Umweltbedingungen? Die Beantwortung der ersten Frage ergibt die mikrobielle Diversität eines Standortes und die zweite zeigt deren metabolische Diversität. Die Beantwortung der zweiten und dritten Frage schließlich ergibt das biogeologische Potential der Gemeinschaft und Ausblicke auf mögliche neue biotechnologische Anwendungen. Zusammen werden diese Informationen ein Verständnis ergeben, wie komplexe mikrobielle Gemeinschaften in natürlichen Habitaten funktionieren und welche Parameter die Aktivitäten der Gemeinschaften regulieren. Dieses Verständnis wiederum wird mögliche Wege aufzeigen, um vorteilhafte Aktivitäten zu optimieren und schädliche Effekte zu minimieren.

Tonpartikel helfen Bakterien der Gattung *Burkholderia* beim PCB-Abbau

Wir charakterisierten einen mit PCB-verunreinigten Standort und analysierten dessen mikrobielle Diversität. In 16S rRNA Genbibliotheken fanden wir viele Klone, welche zur Gattung *Burkholderia* gehörten, die auch die Hauptvertreter der Isolate beherbergt, welche auf Biphenyl und Chlorbenzoaten angereichert wurden. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von Sandpartikeln aus dem Boden zeigten Tonaggregate. Biofilme, die sich auf sterilen Trägermaterialien, welche auf der Oberfläche von Sand und Wasser Mikrokosmen schwammen, entwickelten, wiesen ebenfalls diese Tonaggregate auf. Transmissionselektronenmikroskopie von Ultradünnschnitten zeigte Bakterien innerhalb dieser Tonaggregate. Die chemische Analyse der Tonaggregate des Biofilms schließlich erbrachte, daß sie PCB enthielten. Demnach sammeln die Bakterien aktiv Tonblättchen, um sich das PCB zugänglich zu machen. Elementanalyse mittels EELS wies Partikel mit hohem Eisengehalt in den Tonaggregaten nach. Wir identifizierten einige der Bakterien, welche für die

Bildung der Tonaggregate verantwortlich sind, und fanden wiederum Stämme der Gattung *Burkholderia*. Diese Bakterien scheinen die Tonpartikel als Transportmittel für das in Wasser unlösliche PCB zu nutzen. Die Tonpartikel haben zudem die ökologische Funktion, die Bakterien gegen Fraßfeinde zu schützen und die Zellen mit Mikronährstoffen wie Eisen zu versorgen. Diese Ergebnisse weisen auf einen völlig neuartigen Mechanismus der Substratnutzung von wasserunlöslichen Substraten durch Bakterien.

Mikroorganismen reinigen Quecksilberhaltiges Abwasser

Quecksilber ist hochtoxisch und sammelt sich in der Nahrungskette an, wenn es in die Umwelt gelangt. Daher sind effiziente End-of-pipe Technologien für die Quecksilber emittierende Industrie notwendig. Die gegenwärtigen Reinigungsmethoden wie Ionenaustauscher sind teuer und werden daher wenig benutzt. Wir haben als Alternative eine hocheffiziente, umweltfreundliche und kostengünstige Technologie zur mikrobiellen Quecksilberabscheidung entwickelt. Das Quecksilberhaltige Abwasser fließt dabei kontinuierlich

Molecular Microbial Ecology (SP.4.3)

Microbial ecology is the study of microbial communities and their functioning, and seeks to answer the questions: Who are the members of the community? What activities do they exhibit and what physiological roles do they play? How do they interact with one another? How do they respond to environmental changes? Answering the first question reveals the microbial diversity within a habitat and the second reveals the metabolic diversity within it. Answering the second and third reveals the biogeological potential of the community and suggests possible new biotechnological applications. Together, this information will provide an understanding of how complex microbial communities function in natural habitats and of the parameters that regulate the activities of the communities. This understanding will, in turn, suggest possible intervention strategies to optimise beneficial activities and to lower deleterious effects.

Clay leaflets help bacteria from the genus *Burkholderia* to degrade PCB

*We characterized a PCB polluted site chemically and analysed its microbial diversity. In 16S rRNA gene libraries we found many clones belonging to the genus *Burkholderia*, which is also the main genus of the isolates from the site selected on biphenyl and chlorobenzoates. Scanning electron microscopic analysis of sand particles from the soil revealed clay aggregates. Biofilms that developed on steril support material floating on the surface of soil and water microcosm prepared from the site material also consisted of clay aggregates. Transmission electron microscopy of the ultrathin sectioned biofilms revealed bacteria within these clay aggregates. Chemical analysis of the biofilm clay aggregates showed that they contain PCB. Thus, the bacteria pick up clay leaflets to access the PCB substrate and successively build up the clay aggregates. Elemental analysis by EELS revealed that some particles in the clay aggregates contained high amounts of iron. We identified some of the bacteria responsible for the formation of the clay aggregates, and found again species of the genus *Burkholderia*. These bacteria seem to exploit the clay particles as transport shuttles for the water insoluble PCB substrate. Moreover, the clay aggregates exhibit another ecological function, namely protecting the cells from grazers and supplying micronutrients like iron. These results suggest a completely new mechanism of how bacteria access water insoluble substrates.*

Microorganisms clean mercury-containing wastewater

Mercury is highly toxic and accumulates in the food chain if discharged into the environment. Therefore, efficient end-of-pipe technologies are needed for mercury-emitting industries. Current treatment procedures, e.g. ion exchange columns, are very expensive and thus not widely used. As an alternative, we have developed a highly efficient, environmentally friendly and cost effective microbial mercury removal technology. The mercury-containing wastewater continually passes through a packed bed bioreactor on which mercury resistant bacteria grow as a biofilm and reduce mercury compounds to metallic mercury which accumulates as microdroplets. Mercury can ultimately be recovered from the bioreactor and recycled. We designed in cooperation with Preussag Wassertechnik an automated pilot plant for mercury remediation treating up to 4 m³ wastewater per hour. The mercury concentration in the outflow of the pilot plant was below 50 µg l⁻¹, thus fulfilling the discharge limit for industrial wastewater. Microbial mercury removal proved to be highly efficient and robust against large fluctuations in inflow parameters and the stresses

durch einen Festbettbioreaktor auf dem Quecksilber-resistente Bakterien wachsen und welche die Quecksilber-Verbindungen zu metallischem Quecksilber reduzieren, das anschließend zurückgewonnen werden kann. Zusammen mit Preussag Wassertechnik haben wir eine automatische Pilotanlage zur Quecksilber-Reinigung entworfen. Die Quecksilberkonzentration im Auslass liegt unter $50 \mu\text{g l}^{-1}$ und damit unter dem Grenzwert für Industrieabwasser. Die mikrobielle Quecksilberabscheidung erwies sich als sehr robust gegenüber großen Schwankungen in den Betriebsparametern. Dies ist das erste Mal weltweit, dass das Potential von Mikroorganismen zur Detoxifikation von Quecksilber für ein industrielles Reinigungsverfahren genutzt wurde.

Isolierung eines Bakteriums der bislang unbekanntten Familie *Ferroplasmacea*

Trotz ihrer Bedeutung sind noch immer die meisten Bakterien unbekannt und nur ein sehr kleiner Teil der Bakterien in der Umwelt wurde bisher isoliert und studiert. Es können daher noch immer Bakterien mit völlig neuen Eigenschaften aus der Umwelt isoliert werden. Wir haben aus einer Anlage zur mikrobiellen Erzlaugung ein acidophiles Archeon isoliert, welche noch bei pH 1.3 wächst, die Eisenoxidation als einzige Energiequelle benötigt und anorganischen Kohlenstoff fixieren und als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen vermag. Die 16S rRNA Gensequenz und andere Daten zeigten, daß es sich hier um einen Vertreter einer neuen Gattung handelt, so dass die Art als *Ferroplasma acidiphilum* beschrieben wurde, die der ebenfalls neuen Familie *Ferroplasmacea* angehört.

occurring during operation at the factory. This is the first time worldwide that the mercury detoxification potential of microorganisms has been applied successfully to an industrial clean-up problem. The process is now ready for commercialisation.

***Ferroplasma acidiphilum* - novel bacteria from an until now unknown family**

Despite their importance, microbes are largely unknown to Mankind because only a tiny fraction of microbes in the environment have been isolated and studied. Environmental samples still continue to supply bacteria with novel characteristics belonging to novel taxa. From a bioleaching pilot plant an acidophilic archaeon was obtained able to grow at pH between 1.3 and 2.2. The organism oxidizes ferrous iron, as sole energy source, and fixes inorganic carbon, as the sole carbon source. The cells are pleomorphic and without a cell wall. The analyses of the 16S rRNA gene sequence and the polar lipids together with physiological data revealed that this strain belongs to a new genus and it was described as *Ferroplasma acidiphilum* belonging to the new family Ferroplasmaceae.

Publications | Veröffentlichungen

Nogales, B., Moore, E. R. B., Abraham, W.-R., Timmis, K. N.: Identification of the metabolically-active members of a bacterial community in a polychlorinated biphenyl-polluted moorland soil, *Environ. Microbiol.* **1** (1999) 199-212

Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R.-M., Moore, E. R. B., Timmis, K. N., Abraham, W.-R.: Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unravelling the network of carbon sharing in a pollutant degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry, *Environ. Microbiol.* **1** (1999) 167-174

Von Canstein, H., Li, Y., Timmis, K. N., Deckwer W.-D., Wagner-Döbler, I.: Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain, *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (1999) 5279-5284

Golyshina, O. V., Pivovarova*, T. A., Karavaiko*, G. I., Kondrat'eva*, T. F., Moore, E. R. B., Abraham, W.-R., Lünsdorf, H., Timmis, K. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N.: *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an autotrophic iron-oxidizing archaeobacterium representing a new family of the order Thermoplasmatales, *Int. J. System Evol. Microbiol.*, in press

Lünsdorf, H., Erb, R. W., Abraham, W.-R., Timmis, K. N.: "Clay hitches": a novel interaction between bacteria and clay minerals, *Environm. Microbiol.*, in press

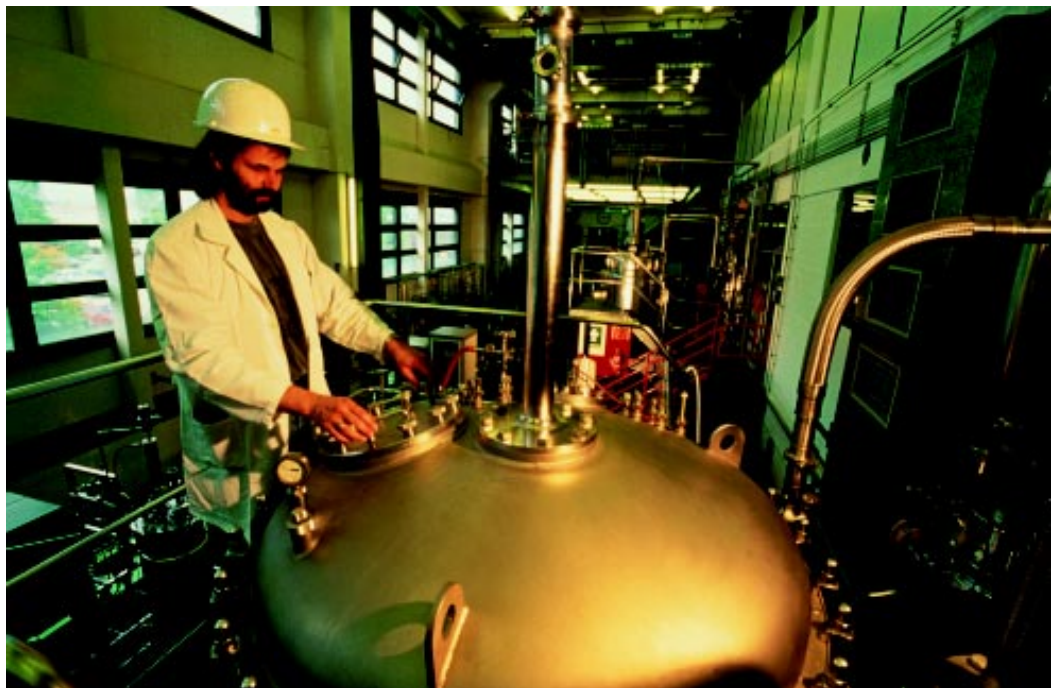


Koordinator | *Coordinator*: Prof. Dr. W.-D. Deckwer | Abt. Prozessentwicklung | *Dept. of Process Development*

Bioprozessentwicklung und -validierung (QF 1)

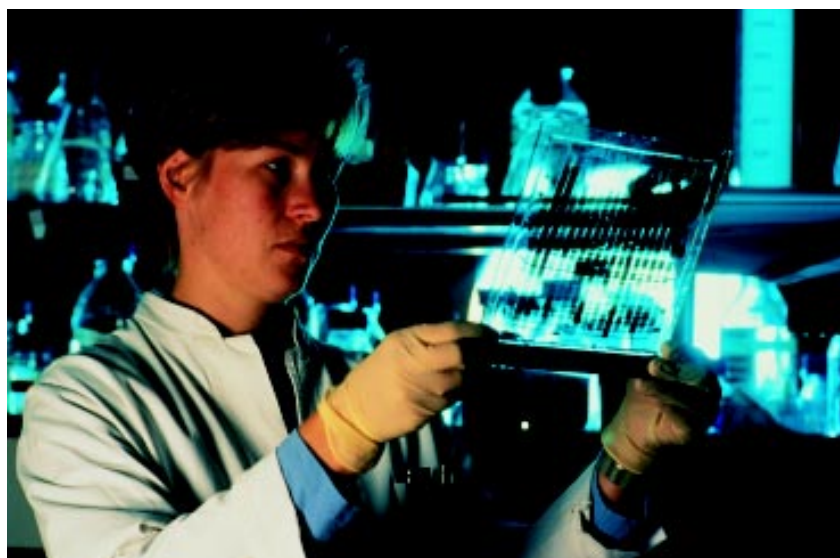
Die Durchführung biotechnologischer Prozesse mit verschiedenen Organismen bis in den Kubikmetermaßstab sowie die Abtrennung und Bereitstellung biologisch aktiver Substanzen, ggfs. auch unter GMP-Bedingungen, gehört zu den Aufgaben, die die GBF als nationales Forschungszentrum in dieser Querschnittsfunktion überregional wahrnimmt. Neben der Abwicklung von Aufträgen und praxisnahen Prozessentwicklungen durch die Abteilung Produktionstechnik konzentrierten sich die Aktivitäten auf die Weiterentwicklung des verfahrenstechnischen Methoden-

spektrums, speziell in Richtung auf verbesserte Produktreinigungsverfahren, quantitative Physiologie und Metabolic Engineering. Als biologische Systeme wurden dabei besonders Säuger-Produktionszelllinien (CHO, BHK) sowie *A. niger* und *Enterobacteriaceae* eingesetzt. Damit soll letztlich eine rationale Basis in Form von validierbaren Modellen für Herstellverfahren technisch und medizinisch einsetzbarer Bioprodukte geschaffen und effektive Prozessführungs- und Regelstrategien bereitgestellt werden.



Bioprocess Development and Validation (QF 1)

The task of this function is to perform biotechnological processes with various organisms up to the scale of several cubic meters. This includes the separation and production of biologically active substances, also under GMP compliances if desired. Production orders and process developments were carried out for a number of scientific and industrial partners. Otherwise, the activities concentrated to the development of improved product purification methods, quantitative cell physiology and metabolic engineering. Mammalian cell product lines, A. niger and Enterobacteriaceae were applied for these purposes. The results will form a rationale for models of biological production systems which will contribute to safe, robust, fast and economic transfer of technologies into larger scale and to provide efficient process and control strategies.



Expressions- und Produktionssysteme (QF 1.1)

Projektleiterin | *Project leader*: Dr. U. Rinas | Arb. Gr. Mikrobielle Systeme | *Res. Group* *Microbial Systems*

Projektmitarbeiter | *Project members*: M. Ganzlin, J. van den Heuvel, F. Hoffmann, S. Marten, U. Rinas, S. Trappe, J. Weber, U. Widow, U. Bilitewski, B. von Tiedemann, H. Weich, J. Schumacher, V. Jäger, G. Piehl, J. Nothnagel, N. Irani, C. Schulz, N. Schulze, R. Wagner, M. Hartlep, W. Hußmann, K. Jung, J. Modak, W. Sabra, A.-P. Zeng

Rekombinante Proteine: Herstellung, Reinigung und Analyse

Strategien für die effiziente Herstellung und Reinigung (gegebenenfalls Renaturierung) von pharmazeutisch relevanten rekombinanten Proteinen wurden entwickelt. Diese Forschungsarbeiten beinhalteten sowohl verfahrenstechnische Ansätze, als auch die Optimierung der Analytik, den gezielten Eingriff in das Erbgut der rekombinanten Organismen und die Charakterisierung der Physiologie der produzierenden Zellen.

Proteom- und Stoffflussanalyse während der heterologen Proteinproduktion mit *Escherichia coli* in der Hochzell-dichtekultur

Die Hochzelldichtetechnologie wurde für die Produktion pharmazeutisch bedeutungsvoller Proteine (Wachstumsfaktoren, Insulin, Interferone) weiterentwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Bakterien während der Produktion nicht nur Produkt, sondern auch vermehrt Stressproteine bilden (Abb. 1). Des weiteren zeigten Stoffflussanalysen, daß produzie-

rende Zellen einen wesentlich größeren Anteil der Kohlenstoffquelle in den energieerzeugenden Stoffwechselwegen (z.B. Tricarbonsäurezyklus, Atmungskette) metabolisieren als nicht-produzierende Kontrollzellen. Die zusätzliche Energie wird vorwiegend sowohl für die Synthese des Produktes als auch der Stressproteine benötigt.

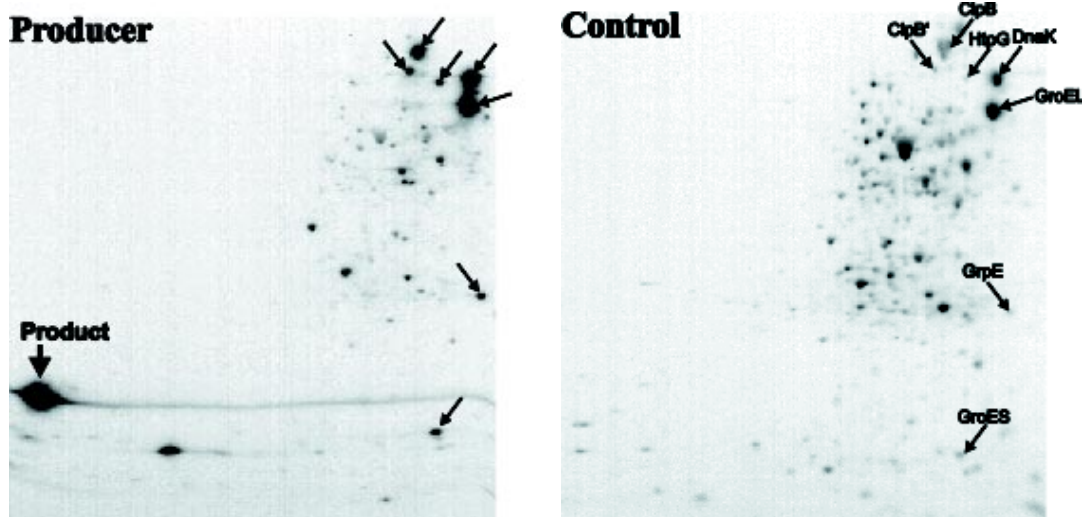
Regelung und Analyse der Produktion von rekombinanten VEGF mit *Pichia pastoris*

Für die Optimierung der Produktion von rekombinanten Proteinen mit dem *Pichia pastoris*-System ist die on-line Messung und Regelung der Methanolkonzentration im Fermenter eine essentielle Voraussetzung. Drei Messsysteme (Flammenionisationsdetektion, Gasdiffusion und Biosensor) wurden miteinander verglichen und werden derzeit eingesetzt, um die Regelungsstrategie zu optimieren.

Auf dieser Basis konnte die Ausbeute von VEGF (Vascular endothelial growth factor) von 70 mg/l auf 100 mg/l gesteigert werden.

Abb. 1. Die Analyse des zellulären Proteinsynthesemusters mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigt einen erhöhten Anteil an Stressproteinen (Hitzeschockproteine: ClpB, DnaK, GroEL, HptG, GrpE, GroES) bei den produzierenden Zellen im Vergleich zu den nicht-produzierenden Kontrollzellen.

Fig. 1. Analysis of cellular protein synthesis by two-dimensional gel electrophoresis revealed elevated synthesis rates of stress proteins (heat shock proteins ClpB, DnaK, GroEL, HptG, GrpE, GroES) in producing cells compared to non-producing control cells.



Expression and Production Systems (QF 1.1)

Recombinant Proteins: Production, Purification and Analysis

Strategies for efficient production, renaturation and purification of biologically active proteins using genetically modified expression systems were developed. The research included a biochemical engineering approach, optimisation of analytical techniques, defined genetic modifications of the recombinant cells and the characterisation of the physiology of the producing organisms.

Proteomics and metabolic flux analysis during heterologous protein production with recombinant *E. coli* in high-cell density culture

The high-cell density technology was further optimised for the production of various pharmaceutical proteins (insulin, interferon, growth factors). Elevated synthesis rates of stress proteins were observed in producing cell compared to non-producing control cells grown under identical culture conditions (Fig. 1). In addition, metabolic flux analysis revealed that producing cells metabolised a larger portion of the carbon substrate in the energy-generating catabolic pathways (e.g. tricarboxylic acid cycle, respiratory chain) compared to respective control cells. The additional energy was mainly utilized for product synthesis and synthesis of stress proteins.

Regulation and analysis of the production of recombinant VEGF (vascular endothelial growth factor) with *Pichia pastoris*

On line-determination and regulation of the methanol concentration during fermentation is essential for the optimisation of the *Pichia* protein production system. Three detection systems (flame ionisation, gas diffusion and biosensor-FIA-device) were compared and used to optimise the production process. The VEGF yield could be increased from 70 mg/l to 100 mg/l by optimisation of the methanol feed.

The quantification of VEGF (vascular endothelial growth factor) with a non-radioactive receptor-microtitreplate assay was shown to be faster and easier to analyse the biological activity of the produced protein, as compared to the traditional radioactive cellular thymidine incorporation assay (time for the receptor-based assay in a 96 well plate: 4.5 h, time required for the radioactive cell assay: 3-4 days).

Control of the glucose concentrations in animal cell cultivations using on-line glucose data

The establishment of an interface between the 3-channel-dialysis-FIA-system used previously for on-line monitoring of animal cell cultivations and the process control software UBICON allowed to control the medium supply rate to maintain constant glucose concentration during the cultivation of HeLa-cells. This led to an improved viability of the cells and an optimised consumption of medium.

Es wurde am Beispiel des VEGF gezeigt, dass zur Quantifizierung der biologischen Aktivität des produzierten Proteins der übliche radioaktive Zelltest (Thymidin-einbau) durch einen nicht-radioaktiven Rezeptor-Mikrotiterplattentest vereinfacht und deutlich beschleunigt werden kann (4,5 h statt 3-4 Tage).

Kontrolle der Glukosekonzentration über on-line Glukose-Daten während der Kultivierung tierischer Zellen

Die Etablierung der Kommunikation zwischen dem bereits früher zur on-line Überwachung von Kultivierungen tierischer Zellen eingesetzten 3-Kanal-Dialyse-FIA-System und dem Prozessleitsystem UBICON erlaubte die Beibehaltung einer nahezu konstanten Glukose-Konzentration während der gesamten Kultivierungsdauer von HeLa-Zellen über Steuerung der Medienzufuhr. Daraus resultierte nicht nur eine bessere Verwertung des Mediums, sondern, durch die konstanteren Kultivierungsbedingungen, auch eine höhere Lebensfähigkeit der Zellen.

Verbesserte Produktion von Erythropoetin

PYC2-exprimierende BHK-Zellen wurden zusätzlich mit dem Gen für das humane Erythropoetin (EPO) transfiziert. Die PYC2-exprimierenden Klone zeigten jeweils eine 2-fach höhere Glucose-spezifische Produktivität und Produktkonzentration im kontinuierlich-perfundierten Bioreaktor. Sie erreichten nahezu die maximale Produktivität unter Glucose-limitierenden Bedingungen von $0,05\text{ g l}^{-1}$ bis 1 g l^{-1} , so dass eine wesentlich geringere Lactat-Akkumulierung in Fed-Batch-Produktionssystemen zu erwarten ist. Aufgrund einer geringeren Glucose-verbrauchsrate verlängerte sich die Produktionsphase im Bioreaktor. Daher konnte EPO in einer Batch-Kultivierung auf der Grundlage einer Vitalität von über 80% genau 2 Tage (30%) länger produziert werden als bei der Kontrolle.

Intrazelluläre Akkumulation von Proteinen in Baculovirus-infizierten Insektenzellen

Für die intrazelluläre Akkumulation und inkorrekte Prozessierung rekombinanter Proteine aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Sf21, High Five) konnte für die Biosynthese des als Modell verwendeten rekombinanten β -Trace-Proteins (β -TP) durch Pulse-Chase-Experimente gezeigt werden, dass vorrangig ein biglycosylierter Precursor mit high mannose type Glycanen und in geringem Maße auch nichtglycosyliertes β -TP gebildet wurden. Mit zunehmender Infektionszeit verlängerte sich dabei die Zeit, die benötigt wurde, die Vorläufer zu prozessieren und zu sekretieren. Darüber hinaus wurde die nichtglycosylierte β -TP-Variante in den Zellen abgelagert und nicht sekretiert, so dass sie sich über den gesamten Infektionsverlauf intrazellulär akkumulierte und am Ende der Infektion in signifikanten Mengen vorlag.

Metabolic Engineering der mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol

Die Prozessentwicklung für 1,3-Propandiol-Herstellung wurde fortgesetzt, wobei das Substratspektrum erweitert und vertiefte Kenntnisse über die Zellphysiologie und die Interaktionen der genetischen und metabolischen Netzwerke gewonnen werden konnten. Dies führte zu einer Erhöhung der maximalen Wachstumsrate von *K. pneumoniae* von etwa $0,7\text{ h}^{-1}$ auf größer als $1,1\text{ h}^{-1}$ und einer hohen Propandiolkonzentration von fast 80 g/l in Fed-batch-Kulturen.

Better Production Conditions for Erythropoietin

PYC2-expressing cells were additionally transfected with a plasmid bearing the gene for human erythropoietin (EPO). PYC2-expressing clones showed both a 2-fold higher glucose-specific productivity and product concentration in a continuously perfused bioreactor. The cells could produce at nearly maximum productivity under glucose-limiting conditions of 0.05g l⁻¹ to 1g l⁻¹ which guaranteed a reduced accumulation of lactate in fed-batch production systems. Due to a reduced glucose consumption a prolonged production phase in bioreactors could be maintained. Therefore, EPO could be produced for 2 days (30%) more compared to the control due to a more economic exploitation of glucose and prolonged viability period of the cells using a batch cultivation.

Intracellular Accumulation of Proteins in Baculovirus-infected Insect Cells

It could be shown by pulse-chase experiments for the intracellular accumulation and incorrect processing of recombinant proteins in baculovirus-infected insect cells (Sf21, High Five) using the biosynthesis of β -trace-protein (β -TP) as a recombinant model that during the short time of the pulse there was primarily a formation of biglycosylated precursors with high mannose type glycans. Additionally small amounts of non-glycosylated β -TP were produced. With increasing post infection time the time required for processing and secretion of the precursors was prolonged significantly. It was also shown that the non-glycosylated β -TP-variant was not secreted but accumulated to finally substantial amounts within the cells.

Metabolic Engineering of Microbial Production of 1,3-Propanediol

Process development for microbial production of 1,3-propanediol has been continued to expand the substrate spectrum and to better understand the interactions of the genetic and metabolic networks for a more predictable metabolic engineering of pathways. By overcoming one of the metabolic bottlenecks the maximal growth rate of *K. pneumoniae* was increased from about 0.7 h⁻¹ to over 1.1 h⁻¹ and a high propanediol concentration of 80 g/l was achieved in fed-batch-culture.

Publications | Veröffentlichungen

Biebl, H., K. Menzel, A.-P. Zeng, W.-D. Deckwer: Microbial production of 1,3-propanediol, *App. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 289-297

Estapé, D., Rinas, U.: Folding kinetics of the all- β sheet protein human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin-1 β , *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 34083-34088

Müller, C., Rinas, U.: Renaturation of heterodimeric platelet-derived growth factor from inclusion bodies of recombinant *E. coli* using size exclusion chromatography, *J. Chromatogr.* **855** (1999) 203-213

Schmidt, M., Babu*, K. R., Khanna*, N., Marten, S., Rinas, U.: Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *E. coli*, *J. Biotechnol.* **68** (1999) 71-83

Schmidt, M., Viaplana*, E., Hoffmann, F., Marten, S., Villaverde*, A., Rinas, U.: Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *E. coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway, *Biotechnol. Bioeng.* **66** (1999) 61-67

Verfahrensentwicklung (QF 1.2)

Leiter | Head: Dr. A. Roß | Arb. Gr. Bioreaktionstechnik | Res. Group of Bioreaction Techniques

Mitarbeiter | Members: W. Kessler, R. Krützfeldt, H. Schüler, V. Jäger

Zentrales Thema dieses Projektes ist angewandte Prozessentwicklung auf den Gebieten Kultivierung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Aufkonzentrierung und Reinigung biotechnologischer Produkte sowie verschiedener analytischer Verfahren. Für diese Aufgabe stehen umfangreiche moderne Ressourcen, die ständig weiter entwickelt werden, zur Verfügung:

- insgesamt 25 Bioreaktoren vom Labormaßstab bis zu 2000 l Arbeitsvolumen für die Mikroorganismenkultivierung
- insgesamt 7 Reaktoren für den Batch- und Perfusionsbetrieb zur Züchtung von Zellkulturen bis zu 100 l Arbeitsvolumen
- Aufarbeitungsgeräte wie Zentrifugen, Zellaufschlußgeräte, Filtrationsanlagen, Verdampfer und Gefriertrocknung, die sowohl klassische Aufarbeitungsrouten für niedermolekulare Produkte ermöglichen wie auch moderne Prozeßstrategien für die Reinigung rekombinanter Proteine.
- Analysengeräte wie z.B. Aminosäure-HPLC, Nucleotid-HPLC, HPAEC-PAD.

Alle Arbeiten dieses Projektes werden mit Partnern aus Forschungsgruppen der GBF, Universitäten, öffentlichen Forschungseinrichtungen und der Industrie durchgeführt. Eine wichtige Aufgabe ist die Unterstützung von GBF-Forschungsgruppen durch Bereitstellung von Anlagen, Beratung und Durchführung von Untersuchungen zu verschiedenen Themen:

Arbeiten für und mit Partnern aus Universitäten und öffentlichen Forschungseinrichtungen werden als originäre Querschnittsaufgabe der GBF betrachtet. In 1999/2000 wurden solche Arbeiten für Forschungsgruppen der Universitäten Aachen, Braunschweig, Düsseldorf, Frankfurt, Hamburg-Eppendorf, Lübeck, Marburg und Stuttgart und das EMBL in Heidelberg durchgeführt. Im Durchschnitt werden 20-30 % der Projekte im mikrobiellen Bereich mit Industriepartnern durchgeführt; bei Säugerzellen liegt dieser Anteil bei 65 %. Im Berichtszeitraum waren dies zum überwiegenden Teil KMU's, davon jeweils ein Partner aus Großbritannien und aus Italien. Einige in 1999/2000 bearbeitete Themen seien hier exemplarisch genannt:

- Herstellung von Enzymen: β -Lactamase und Esterase für die Herstellung pharmazeutischer Produkte
- Rekombinante Proteine für die Strukturaufklärung: ^{13}C - und ^{15}N -markierte Enzyme des Peroxidmetabolismus von Trypanosomen
- Plasmid-DNA aus *E. coli*
- Herstellung div. rekombinanter Proteine aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen
- Herstellung von mehr als 50 kg HeLa-Zellmasse

Projektressourcen und Expertise werden bei der Gestaltung und Durchführung von Kursen im Rahmen des ITP-Programms intensiv genutzt.

Projekt	Themen
1.1	Aufkonzentrierung von Patientendialysat zur Isolierung von EPO-Varianten Herstellung verschiedener Wachstumsfaktoren mit dem Baculovirus-Expressionssystem
1.3	EU- Demonstrationsprojekt zur Zellkultivierung im Airlifreaktor
3.1	Kultivierung von Myxobakterien zur Herstellung niedermolekularer Produkte
4.3	EU- Demonstrationsprojekt zur Hg- Entfernung aus Abwässern
5.1	GOD- Produktion mit rekombinanten Aspergillus Propandiol aus Clostriden

Process Development (QF 1.2)

The main subject of this project is applied process development for cultivation of microorganism and cell cultures, isolation of biotechnological products as well as different analytical methods. For this task state-of-the-art equipment is available:

- 25 bioreactors from laboratory scale up to 2000 l working volume for cultivation of microorganisms
 - 7 bioreactors for batch and perfusion operation for cultivation of mammalian cells up to 100 l working volume
 - Downstream processing equipment like centrifuges and separators, homogenizers, filtration plants, evaporator and freeze dryer enabling classical DSP routes for low molecular weight products as well as modern processes for isolation of recombinant proteins
 - Analytical equipment such as amino acid-HPLC, nucleotide-HPLC, HPAEC-PAD.
- The work of this project is done in cooperation with partners from research groups of GBF, universities, public research institutes and industry. An important task is to support GBF research groups by provision of equipment, consulting and experimental research for many different subjects:

Support of research groups from universities and public research institutes has always been an original networking task of GBF. In 1999/2000 those projects have been done with partners at the universities of Aachen, Braunschweig, Düsseldorf, Frankfurt, Hamburg-Eppendorf, Lübeck, Marburg, and Stuttgart and the EMBL in Heidelberg. An average of 20-30 % of the projects with microbial systems are performed with industrial partners; for animal cell cultures this number is about 65 %. In the time reported here these were mainly SME's, one of them from UK and another from Italy.

Some of the projects realized in 1999/2000 shall be mentioned as example:

- Production of enzymes: a β -lactamase and an esterase for use in pharmaceutical production
- Recombinant proteins for structure elucidation: ^{13}C - and ^{15}N -labelled enzymes of the peroxide metabolism of Trypanosomes
- Plasmid-DNA from *E. coli*
- Production of various recombinant proteins from baculovirus-infected insect cells
- Production of more than 50 kg of HeLa cell mass

Training of students and scientists in biochemical engineering is an important part of the project activities (ITP-courses, experimental work for diploma thesis etc.).

Project	Subject
1.1	Concentration of dialysate from patients for isolation of EPO derivatives
	Production of several growth factors using the baculovirus expression system
1.3	EU-demonstration project on cultivation of CHO-cell line in an airliftreactor
3.1	Cultivation of gliding bacteria for production of low molecular weight compounds
4.3	EU-demonstration project on Hg-remediation from industrial waste water
5.1	GOD production by a recombinant <i>Aspergillus</i> strain 1,3-Propanediol from <i>Clostridia</i>

GMP-Verfahrensentwicklung (QF 1.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. H. Ziehr | Arb. Gr. GMP- Technikum | *Res. Group GMP Pilot Plant*

Projektmitarbeiter | *Project members*: J. Berlin, F. Bünsdorf, B. Börner, H. Hustedt, S. Kluger, K. Körner, R. Kraume-Flügel, K. H. Kroner, C. Mollenschott, N. Papamichael, J. Paulsen, I. Schuma, W. Stach, U. Willig

Aufgabe der Arbeitsgruppe GMP-Technikum ist es, auf Basis von Kooperationsvorhaben mit Dritten biotechnologische Wirkstoffherstellungsverfahren bis in einen solchen Pilotmaßstab zu entwickeln, dass ausreichend Material für die vorklinische und klinische Forschung erzeugt werden kann. Dies schließt Validierungsstudien ein und geschieht – wenn erforderlich – unter dem Reglement der Guten Herstellungspraxis (GMP), dem Qualitätssicherungssystem der pharmazeutischen Industrie.

GMP-Arbeitsgruppe der GBF – einzige innerhalb der Helmholtz – Zentren

Seit Anfang 1997 verfügt die Arbeitsgruppe GMP der GBF über eine Erlaubnis gem. § 13 des Arzneimittelgesetzes (AMG) zur gentechnischen Herstellung von Wirkstoffen. Damit war und ist die GBF als einziges HGF Forschungszentrum in der Lage, Herstellungsverfahren für rekombinante Wirkstoffe bis zur wirklichen Anwendung reife, das heißt zum Einsatz am Menschen in Form von klinischen Prüfungen zu entwickeln.

Seit 1998 verfügt die Arbeitsgruppe über eine hochkompartimentierte Mehrzweckbiotechnikumsanlage, die aus diversen separat zugänglichen Reinräumen besteht, und die über weite Bereiche dem aktuellen Stand der Technik entspricht und für die Bearbeitung komplexer biopharmazeutischer Prozesse ausgestattet ist.

Die lufttechnische Trennung der diversen Arbeitsräume (Zellkultur, Fermentation und Aufarbeitungstechnik) durch eigene Air-Handler und Luftschleusen ermöglicht ein zeitparalleles Arbeiten an verschiedenen Prozessen ohne eine potentielle Gefahr von Kreuzkontaminationen. Mikrobielle Vorkultivierung, Aufarbeitung und Zellkultur finden in Reinräumen der Klassen C und D statt. Die Bearbeitung mikrobieller Prozesse (Fermentation) im technischen Maßstab und unter GMP erfolgt in einer 10 Jahre alten Pilotanlage, die für diesen Zweck eigens umgewidmet wurde, aber in ihren technischen Möglichkeiten eingeschränkt ist.

Die Arbeitsgruppe GMP hat 1999 im Unterauftrag mehrerer pharmazeutisch-chemischer Industrieunternehmen Forschungs- und Entwicklungsvorhaben bearbeitet. Insbesondere die wichtige Querschnittsfunktion der GMP-Arbeitsgruppe für junge Biotechnologie-Unternehmen, die in der Regel weder über eigene GMP-Pilotanlagen geschweige denn über die erforderliche Erfahrung in GMP-gerechtem Arbeiten verfügen, wurde dabei deutlich.

Erfolgreiche Kooperationsvorhaben

- Gemeinsam mit dem Unilever Tochterunternehmen BAC b.v. (Bussum, Niederlande) wurden zwei großtechnische Chromatographieverfahren zur Isolation eines technischen Enzyms und eines Antikörperfragments entwickelt und wiederholt durchgeführt.
- In Zusammenarbeit mit der AG Zellkulturtechnik wurde für die italienische Pharmafirma Dompé Pharmaceutici s.p.a. (Mailand) das Herstellungsverfahren für einen Wirkstoff auf Basis von Insektenzellkultur und Baculovirus-expression im Pilotmaßstab entwickelt. Die dabei angefallenen Wirkstoffchargen wurden dem Auftraggeber für tierexperimentelle Studien überlassen.
- Nach einer im Jahre 1998 in Kooperation mit den Fa. BRAIN GmbH (Zwingenberg) und Madaus AG (Köln) abgeschlossenen Verfahrensentwicklung und anschließender Prozeßvalidierungsstudie (*E. coli*) für die Herstellung eines rekombinanten Wirkstoffs haben die Auftraggeber mit dem an der GBF

GMP Process Development (QF 1.3)

The GMP Pilot Plant group has set itself the objective of providing a process development service for active pharmaceutical ingredients (API) on a cooperative basis to third parties, to a scale allowing preclinical and clinical testing to be carried out. This includes process validation studies and, when necessary, is carried out under GMP conditions in consistency with quality assurance for the pharmaceutical industry.

GBF Pilot Plant Group – the only one within the HGF Research Centres

GBF was granted a license according to §13 of the German Drug Act (Arzneimittelgesetz) in early 1997 for the production of genetically engineered APIs. GBF is thus the only institute within the HGF Research Centres which can deliver processes for recombinant APIs to produce material for use in human drug trials.

Since 1998 the group has had a highly compartmented multi-purpose facility at its disposal, consisting of a number of separately accessible state of the art clean rooms allowing processing of complex biotechnological materials.

These rooms have separate HVAC (heating, ventilation and air conditioning) systems with air locks, allowing work on more than one process simultaneously without risk of cross-contamination. Microbial preculture, purification and cell culture are carried out in clean room classes C and D. Microbial fermentation and primary separation on a pilot scale are in closed systems in a non-clean room area.

The GMP group was involved in a number of R&D projects for pharmaceutical and chemical companies in 1999. Of special note is the involvement with young biotechnological companies which do not have access to GMP plants and have little or no practical experience within a GMP environment.

Successful Cooperation Projects

- Two large scale chromatography processes for the isolation of an industrial enzyme and an antibody fragment were developed and executed in repetition for BAC b.v. (Bussum, The Netherlands), a Unilever company.
- A production process for an API based on insect cell culture and Baculovirus expression was developed in association with the cell culture group at GBF for Dompé Pharmaceutici s.p.a. (Mailand), an Italian pharmaceutical company. Material produced during development was used by Dompé for animal studies.
- In 1998 the group developed a process in *E. coli* in cooperation with BRAIN GmbH (Zwingenberg) und Madaus AG (Köln) and subsequently carried out validation studies. In 1999 clinical studies (phases I and II) were successfully carried out. In addition, the production process was documented according to the Notice to Applicants of EMEA, the European drug control agency.
- A laboratory process for the production of an active substance based on recombinant virus like particles was scaled up and the documentation established for a GMP environment. This entailed extensive development to improve process reproducibility. After inspection of the cell culture plant by the local licensing authority and the Paul Ehrlich Institute, GBF was granted a license for the production of vaccine active substance. Validation studies were subsequently carried out on the process with GMP documentation. The material produced will be used in phase I/II clinical trials in the coming year (2000). A service for MediGene AG (Martinsried, Germany).

hergestellten Material erfolgreich eine klinische Prüfung der Phasen I/II durchgeführt. Zusätzlich wurde von der GBF in 1999 eine Dokumentation des Herstellungsverfahrens gemäß der Notice to Applicants der europäischen Arzneimittelbehörde EMA erstellt.

- Für die MediGene AG (Martinsried) wurde ein zuvor entwickeltes Wirkstoffherstellungsverfahren auf Basis rekombinanter Virus Like Particles (VLPs) in das GMP-Reglement überführt. Dabei wurden in erheblichem Umfang zusätzliche FuE-Arbeiten zur Verbesserung der Konsistenz des Herstellungsprozesses geleistet. Daran anschließend wurden Validierungsläufe unter striktem GMP-Reglement durchgeführt. Der dabei anfallende Wirkstoff ist arzneimitteltauglich und soll im Verlaufe des Jahres 2000 zu Phase I/II klinischen Prüfungen eingesetzt werden. Im Vorfeld zu den Prozessvalidierungsarbeiten war die GMP-Zellkulturanlage erfolgreich von Vertretern der lokalen Bezirksregierung und des Paul Ehrlich Instituts im Rahmen einer mehrtägigen Audits inspiziert und anschließend für die Herstellung von Vakzinwirkstoffen arzneimittelrechtlich zugelassen worden.
- Für die Qiagen GmbH (Hilden) wurde Lagerkapazität für Zellbanken bereitgestellt.
- In einem von der GBF erworbenen Mehrzweck - Laborgebäude wird bis 2001 auf einer Fläche von ca. 700 m² eine weitere GMP-Biotechnikumsanlage errichtet, die nach dem neuesten Stand der Technik für mikrobielle Prozesse ausgelegt wird und damit die gegenwärtig genutzte Forschungs-Biotechnikumsanlage ersetzen soll. Im Berichtszeitraum wurden von der AG-GMP Teile des Basic- und des Detail-Engineerings geleistet.

IBA Biologics – eine Neugründung

1999 wurde von der GBF und dem Göttinger Institut für Bioanalytik (IBA) das gemeinsame Unternehmen IBA-Biologics GmbH gegründet. IBA Biologics wird basierend auf der bereits etablierten GMP-Logistik mit eigener Betriebsmannschaft rein kommerzielle GMP-Dienstleistungen in den GMP-Anlagen der GBF für externe Auftraggeber durchführen.

- Cell banks were stored for QIAGEN GmbH (Hilden).
- Planning for a second GMP Pilot Plant was initiated. This 700 m² state of the art facility will be installed in a building acquired by GBF 6 years ago. The fermentation and primary separation equipment to be located in the plant will be used primarily for microbial processes as a replacement for the currently used plant. The GMP group was intimately involved in the basic and detail engineering and is responsible for specification and procurement of all plant equipment.

IBA Biologies – a new company

IBA Biologies mbH was founded jointly by GBF and IBA (Institut für Bioanalytik; Göttingen) in 1999. The company will offer purely commercial services to third parties using GBF plant facilities, organisation and logistics.

Koordinator | *Coordinator* | Dr. H. Blöcker | Abt. Genomanalyse | *Dept. of Genom Analysis*

Struktur und Funktion biologischer Makromoleküle (QF 2)

Fortschritte in Medizin und Biotechnik sind zu einem guten Teil von einer Vertiefung des biologischen Verständnisses abhängig. Der rationale Weg, dies zu erreichen, führt heutzutage über Globalstrategien. Mit ihrer Hilfe lassen sich ganze Verbindungsklassen der biologischen Zelle entdecken oder näher untersuchen. Dies wird im vorliegenden Schwerpunkt mit den Methoden der Genom- und Proteomforschung, der Bioinformatik sowie der Strukturanalyse angegangen. Es werden Beiträge geleistet, die zur vollständigen Beschreibung aller zellulären Potentiale zur Synthese, Regulation und Kommunikation führen werden.

Die **Genomsequenzanalyse** ist das klassische Beispiel für Globalstrategien. Durch die modernen Genomzentren wie die GBF wäre heute die serielle Analyse einiger oder vieler Gene eines Organismus eine Verschleuderung von Ressourcen. Mit Hilfe starker Automatisierung und Parallelisierung hat die GBF in den vergangenen Jahren eine exzellente Infrastruktur zur kostengünstigen Sequenzanalyse geschaffen und erfolgreich eingesetzt. Sie reicht von der Anlage der Klonbibliotheken bis zur bioinformatischen Funktionsanalyse. Die gegenwärtige Kapazität beträgt ca. 10 Megabasen interpretierter Sequenz pro Jahr. Derart massiv anfallende Sequenzinformationen haben den Blick wieder stärker auf die Untersuchung der Funktion und Wechselwirkung von Proteinen gerichtet. Die globale Strategie der **Proteomanalyse** bereitet dabei den Boden für die detaillierte biochemische und strukturanalytische Untersuchung der Funktion einzelner Proteine und ist essentiell für die Aufklärung regulatorischer Zusammenhänge in der Zelle. Die für die **Proteomanalyse** üblicherweise eingesetzten Basistechnologien - Massenspektrometrie, Proteinsequenzierung und 2D-Gelelektrophorese - bedürfen jedoch in der GBF wie andernorts starker Innovation in Richtung Geschwindigkeit, Kosten,

Zuverlässigkeit und Vollständigkeit der Erfassung des Proteoms. Methodische Fortschritte in der **Strukturanalyse** ermöglichen einen breiteren Einsatz dieser Methoden. Dies betrifft die Anwendung von MAD- und Cryotechniken unter Nutzung von Synchrotronstrahlung in der Proteinkristallographie, multi-dimensionale Hochfeld-NMR sowie hochauflösende Massenspektroskopie. Effiziente Genom-, Proteom- und Proteinstrukturanalyse ist in starkem Maße abhängig von funktionierender Datenverarbeitungsinfrastruktur und Verfahren der molekularen **Bioinformatik**. Aus der Datenmenge müssen sinnvolle Informationen gewonnen und intelligent gespeichert werden. Aus diesem Grund wird auch an der GBF aktive Forschungs- und Entwicklungsarbeit auf dem Gebiet der **Bioinformatik** geleistet. Bisher bezog sich dies auf Datenbank- und algorithmische Arbeiten zur Sequenzinterpretation regulatorischer Potentiale. Im Rahmen von „functional genomics“ wird sich die Bioinformatik zunehmend auf Genexpressionsdaten und -mechanismen, auf biologische Vernetzungen und deren medizinische Implikationen konzentrieren. Alle hier beschriebenen Aktivitäten der GBF sind stark international vernetzt und haben ihren eigenen Stellenwert nachgewiesen.

Structure and Function of Biological Macromolecules (QF 2)

It is now widely accepted that progress in medicine and biotechnology is greatly dependent on a deeper insight into biology. The most efficient way to achieve this is to apply global strategies. This enables researchers to discover new classes of cellular compounds or to study them in greater detail. In the current major research and development topic of the GBF this is being undertaken by concerted activities in the fields of genome and proteome research, bioinformatics as well as structural analysis. Contributions are being made to the complete description of all synthesis, regulation and communication potentials of the biological cell.

Genome sequence analysis is the classical example of the use of global strategies. With the modern genome centres (such as those of the GBF) at hand, the serial analysis of a few or many genes of any organism would be a waste of resources. Over the past few years the GBF has built up an excellent infrastructure for efficient sequence analysis, using mainly extended automation and parallelisation. The infrastructure extends from the generation of all clone libraries to the functional analysis by bioinformatic tools. The current annual capacity is about 10 megabases of interpreted sequence. Such large amounts of genomic sequence information has now drawn our attention more towards the investigation of protein function and interaction. The global strategy of **proteome analysis** provides the basis for the detailed biochemical structural analysis of the functioning of individual proteins and is essential for unravelling the regulatory links of the biological cell. Basic technologies in proteome analysis are mass spectrometry, protein sequencing and 2D gel electrophoresis. At the GBF and elsewhere these technologies must be improved substantially with respect to speed, cost, reliability and completeness of the proteome coverage. Recent methodological progress in **structural genomics** has led to a much broader application of this general technology. This applies particularly to MAD and cryo techniques using synchrotron radiation in protein crystallography, multi-dimensional

high-field NMR spectroscopy as well as high resolution mass spectrometry. Efficiency in genome, proteome and protein structure analysis depends to a large extent on a reliable data-handling infrastructure and procedures for molecular **bioinformatics**. Useful information must be gained from the large amount of data available and be made accessible in an intelligent fashion. Therefore the GBF has also ongoing research and development activities in bioinformatics. Until recently this was related to database and algorithm developments for the sequence interpretation of regulatory potentials. In the frame of "functional genomics" there will be a stronger bioinformatics focus on gene expression data and mechanisms, on biological networks and their medical implication. All GBF activities as described here have strong international links and have demonstrated their own worth.

Genomics und Proteomics (QF 2.1)

Projektleiter/ *Project leader*: Dr. H. Blöcker | Abt. Genomanalyse | *Dept. of Genome Analysis*

Projektmitarbeiter/ *Project members*: M. Böcher, P. Brandt, M. Czubyko, K. Hornischer, G. Kauer, B. Neelen, G. Nordsiek, M. Scharfe, O. Schön

In den letzten Jahren hat sich die Sequenzanalyse von sehr großen Bereichen genomischer DNA oder gar von kompletten Genomen als grundlegender und lohnender Ansatz für biotechnologische Forschung und Anwendung durchgesetzt. Unser Ziel ist es, hiervon ausgehend die spezifischen Chancen der Globalstrategien Genomsequenzanalyse und Proteomanalyse sowie der zugehörigen Bioinformatik in einem Wechselspiel von methodischen Entwicklungen und der Generierung großer Datenmengen überzeugend zu belegen.

Genomics

An der GBF existiert ein funktionierendes Genomlabor mit internationalem Anspruch. Die etablierte Infrastruktur deckt alle Arbeitsgänge von der Erstellung der Klonbibliotheken bis zur bioinformatischen Tiefenanalyse ab. Dies konnte durch die Beteiligung an mehreren erfolgreichen internationalen Kooperationen gezeigt werden (humane Chromosomen 9, 21 u.a.m.). Zur Zeit können bis zu ca. 2.500 Klone pro Tag analysiert werden. Die Jahreskapazität liegt bei ca. 10 Megabasen bioinformatisch detailliert untersuchter Sequenz.

Nach Beendigung unseres Beitrages zum Listerien-Genomprojekt der EU (ca. 3,5 Megabasen an Rohdaten) und am EU-Projekt *Arabidopsis thaliana*, laufen weiterhin größere Beteiligungen am Humangenomprojekt des BMBF. In letzterem wurden ca. 8 Megabasen aus den Chromosomen 21 und 9 sequenziert und annotiert. Herausragendes Ergebnis war hier die Veröffentlichung der Sequenz des humanen Chromosoms 21 und seine bioinformatische Analyse (deutsch-japanisches Konsortium) sowie der Abschluß der „working draft“-Phase des Humangenomprojektes (internationales Konsortium, „G16“). Außerdem wurde von uns mehr als 1.0 Mb an neuer humaner cDNA analysiert (deutsches Konsortium).

Durch Eigenentwicklungen (diverse Patentanmeldungen) ist die Roboterstraße zur automatischen DNA-Präparation und anschließender automatischer Sequenzierung weiter ausgebaut worden. Das objektorientierte Design und die

Implementierung der Software geben uns die Möglichkeit einer schnellen Erweiterung, Umgestaltung oder auch Umnutzung der Anlage. Weitere größere methodische Entwicklungen betreffen eine komplette Software-Umgebung für die digitale Bildverarbeitung und einen völlig neuen Ansatz zur Speicherung, Filterung und Sinnanalyse jeglicher sequenzbasierter Information.

Proteomics

Diese Arbeiten basieren auf der parallelen Auftrennung von Proteinen durch 2D-Elektrophorese und deren Identifizierung durch MS-Analytik und Proteinsequenzierung. Durch die Analyse von sekretorischen, Zellwand- und Membran-Subproteomen von *L. monocytogenes* werden bisher unbekannte Proteine identifiziert, die an der Virulenz und der Interaktion mit Wirtszellen beteiligt sind. Voraussetzung hierfür ist die komplette Sequenz des Genoms, die derzeit im Rahmen eines EU-Projektes, unter Beteiligung der GBF, bestimmt wird und voraussichtlich noch 2000 veröffentlicht wird. Es handelt sich hierbei um den EGD-Wildtypstamm von *L. monocytogenes*, mit dem an der GBF gearbeitet wird.

Genomics and Proteomics (QF 2.1)

The sequence analysis of large stretches of genomic DNA or even of complete genomes has recently found wide acceptance as a basic and profitable approach to biotechnological research and development. In an interplay of the development of methods and mass data production we are demonstrating the specific benefits of the two global strategies, genomics and proteomics, including accompanying bioinformatics.

Genomics

The GBF houses an active genome laboratory of high international standard. Its infrastructure covers all necessary steps from the generation of BAC libraries down to the in-depth analysis by bioinformatics. This was shown in a number of successful international collaborations (human chromosomes 9, 21 etc.). Currently the GBF lab has a throughput of about 2,500 clones per day. The annual capacity is about 10 megabases (Mb), including detailed analysis with bioinformatics tools.

After our contribution to the *Listeria* genome project of the EU (about 3.5 Mb of raw data) and the *Arabidopsis thaliana* EU project, we are now running a major contribution to the German human genome project (BMBF). 8 Mb of chromosomes 21 and 9 have been sequenced and annotated. The outstanding result in the frame of this activity was the publication of the sequence of the human chromosome 21 and its bioinformatical analysis (German-Japanese consortium) as well as the finishing of the working draft phase of the human genome project (international consortium, "G 16"). In addition, we analysed more than 1 Mb of new human cDNAs from various organs (as part of a German consortium).

The robotic environment for DNA preparation and subsequent automatic sequencing was substantially enhanced. This is mainly due to in-house developments (several patent applications). The object-oriented design and the implementation of the software enable us to expand or rearrange quickly the current robotic environment or even to use it for entirely different purposes. Further method developments were a complete software environment for image analysis and a novel approach to storage, filtering and conceptual analysis of sequence-based information.

Proteomics

Our work in the field of proteomics is based on the parallel separation of proteins by two-dimensional electrophoresis and their identification by mass spectrometry and amino acid sequencing. The analysis of sub-proteome fractions such as secretory, cell wall-associated, and membrane proteins of *L. monocytogenes* will enable us to identify further proteins involved in virulence and host-pathogen interactions. An essential prerequisite for this work is the knowledge of the complete genome sequence of this organism. This is currently being determined by an European consortium including the GBF, and will be published probably in 2000.

The secretory sub-proteome of *L. monocytogenes* is currently being mapped systematically within the framework of another European consortium (Realis) coordinated by the GBF. Additionally, the known virulence factors are being identified from comparative two-dimensional protein patterns produced from the *L. monocytogenes* wildtype (EGD) and mutants of this strain. This comparison of the wildtype patterns with those of deletion mutants of *L. monocytogenes* and non-pathogenic *Listeria* strains will allow us to discern the details of the function of virulence-related proteins and identify other proteins involved in pathogenesis. Combined with the unravelling of regulatory networks such as stress and virulence by a proteomics analysis of puls-labelled cells the complete dynamics of the gene expression programme of an organism can be analysed and described by models.

Eingebunden in ein von der GBF koordiniertes EU-Projekt (Realis) wird derzeit das sekretorische Subproteom vom *L. monocytogenes* systematisch kartiert. Zudem werden die bekannten Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes* durch Analyse des Wildtyps (EGD) und von Mutanten im 2D-Proteinmuster identifiziert. Durch einen Vergleich der Peptidmuster des Wildtyps mit vorhandenen Deletionsmutanten pathogener und nicht-pathogener Stämme können sowohl die Details der Funktion dieser Proteine und deren Regulation analysiert als auch weitere beteiligte Proteine identifiziert werden. In Verbindung mit der Aufklärung regulatorischer Netzwerke wie z.B. Stress und Virulenz durch 2D-Analyse nach gestaffelter Kurzzeit-Pulsmarkierung kann so langfristig die gesamte Dynamik des Genexpressionsprogramms eines Organismus analysiert und beschrieben werden.

Parallel hierzu wurde damit begonnen, das Methodenspektrum durch Verfahren für eine selektive Extraktion von Proteinen aus der Zellwand und Zellmembran und die Etablierung der Blue Nativ-Technik für die Analyse von Proteinkomplexen zu erweitern. Ziel ist hier, die Komplexität der Proben zu reduzieren und gleichzeitig Informationen über die Lokalisation von Proteinen zu erhalten. Zusammen mit der Untersuchung sekretorischer Proteine aus Kulturüberständen zielen diese Arbeiten darauf ab, weitere für die Interaktion mit Wirtszellen relevante Proteine zu identifizieren und ihre Funktion aufzuklären.

```

agttct cttagactttc tgtcaatcgt gcatgctgcc caatag
cctagt ttttttcttt aaaaatttta cttaaaaaatt ttcccc
aataaa acaaatttta tacttgctta ggttggacat tgatat
cacctg tattagtcca ttttcatgct gctgataaag tcacac
caaaaag aaagagggtt aattggactc acagttccat gtggct
cggcag aaggcaagga ggaacaagtc acgtcttgca tggatg
agaaag tttgctcagg gaaactccca tttctaaaac catcag
actatc aaaagaacag catgggaaag acctgcccc atgatt
ccctt ccacaacaca tgggaattcg agatgagatt tgggtg
atateg ttccgcccc gcccctccca aatctcatgt cctcac
ccttcc caacagtttc ccaaagtctt aactcatttc agcatt
ccaatg tctcatctga gacaaggaaa gcccttcca cttatg
caagtt agttacttcc tagatattat gagggtacag gcattg
aatgg gagaaaatag ccaaaacaaa ggggctgcag gccaca
cgggac agtaaaatct taaagctcca aatcatatc ctttga
ggtcac gctgatgcaa gagatgggct cccttggact tgggca
cgcagg gtatgcacc cttcctggct gcttcatgg gctggc
taccgg gtgcacagtg aaagctggca gtggatctac cattct

```

Parallel to the work described above we are also expanding our set of methods and tools by developing new procedures, e.g., for selectively extracting proteins from the cell wall and cell membrane, and establishing techniques such as Blue Native gel electrophoresis for the analysis of whole protein complexes. Our aim is to reduce the complexity of the samples to be analysed and at the same time obtain information on the cellular localization. Our main goal at present is to identify further proteins involved in the host-pathogen interaction and to clarify their function.

Publications | Veröffentlichungen

Nordsiek, G., K. Hornischer, P. Brandt, M. Scharfe, O. Schön, J. Reichelt, G. Kauer, H. Blöcker et al.: The DNA sequence of human chromosome 21, *Nature* **405** (2000) 311-319

Ausschnitt aus der Nucleotid-Sequenz des menschlichen Chromosoms 21. Ein deutsch-japanisches Konsortium hat die Sequenzanalyse im Frühjahr 2000 abgeschlossen. 33.546.361 Bausteine wurden bestimmt. Auf ihnen wurden 225 Gene gefunden oder vorhergesagt. Ergebnisse aus diesem und ähnlichen Projekten bilden die Grundlage für proteomanalytische Aktivitäten und weitergehende Funktionsanalytik wie sie auch in diesem GBF-Schwerpunkt betrieben wird.

Part of the nucleotide sequence of the human chromosome 21. A German-Japanese consortium finished the sequence analysis in spring 2000. The sequence of 33,546,361 building blocks was determined. 225 genes were found or predicted on this sequence. The results of this and similar projects provide the basis for proteome analysis activities and further functional studies as advanced in this major research topic of the GBF.

Datenbanken für „functional genomics“ (QF 2.2)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. E. Wingender | Arb. Gr. Bioinformatik | *Res. Group of Bioinformatics*

Projektmitarbeiter | *Project members*: A. Bischoff, M. Christensen, T. Crass, V. Drewes, R. Gohla, I. Liebich, C. Menzel, H. Michael, A. Potapov, K. Seidl

TRANSFAC: Die Datenbank für regulatorische Genomelemente und Transkriptionsfaktoren

Vor mehr als zehn Jahren haben wir begonnen, für die Transkriptionskontrolle relevante Informationen aus den einschlägigen Originalpublikationen zu extrahieren und in der Datenbank TRANSFAC aufzubereiten. Diese Datenbank enthält Informationen über die regulatorischen Genomelemente (Sequenzen, Lokalisationen) sowie über die Transkriptionsfaktoren, die diese erkennen und durch sie aktivierend oder reprimierend wirken. Für die Anwendung dieser Daten enthält die Datenbank weiterhin Beschreibungen der DNA-Bindungseigenschaften, Expressionsmuster sowie der zellulären Mechanismen, welche die Aktivität der Transkriptionsfaktoren steuern.

Unterschiedliche statistische Beschreibungen der DNA-Bindungseigenschaften sind in unseren Datenbanken enthalten und werden durch verschiedene Programme auf die Analyse von DNA-Sequenzen angewendet. Komplexe Muster von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen können besonders indikativ für bestimmte biologische Funktionen sein. In unserer Arbeitsgruppe haben wir entsprechende Programme entwickelt und auf die Identifizierung von neuen Zielgenen, die in der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielen können, angewendet. Die dabei vorgeschlagenen Zielgene werden derzeit experimentell überprüft und konnten teilweise auch als solche bestätigt werden.

PathoDB, S/MARtDB, TRANSPATH, CYTOMER®: Module zur Integration von Daten über Genregulation

Vor kurzem haben wir eine Reihe von Datenbank-Modulen entwickelt, welche die TRANSFAC-Datenbank erweitern. PathoDB ist eine Datenbank, in der Informationen über mutierte Transkriptionsfaktoren und Bindungsstellen gesammelt werden. Derartige Faktoren und Bindungsstellen führen aufgrund von Störungen in der Genregulation zu pathologischen Defekten.

S/MARtDB enthält Informationen über die innere Zusammensetzung, funktionelle Bedeutung und bindenden Proteine von S/MARs („scaffold“ oder „matrix attached regions“). Diese sind einige hundert Basenpaare große Regionen, welche das Genom durch Interaktion mit der Kernmatrix in funktionelle (regulatorische) Bereiche unterteilen. S/MARs sind bedeutsam für die Chromatinstruktur und somit auch für die Genregulation.

TRANSPATH enthält Informationen über Signaltransduktionswege und zelluläre Mechanismen, welche die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren. Mit Hilfe dieser Daten läßt sich die Dynamik regulatorischer Signalnetzwerke simulieren.

Schließlich modelliert die Datenbank CYTOMER® Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren über einen hierarchischen Satz von Tabellen für menschliche Zelltypen, Organe, physiologische Systeme und Entwicklungsstadien.

Databases for Functional Genomics (QF 2.2)

TRANSFAC: The database on eukaryotic cis-acting regulatory DNA elements and trans-acting factors

More than a decade ago we began to compile information on transcriptional control of genes from the relevant original literature and organized it into a database, TRANSFAC. This database contains information about regulating genome elements (sequences, localizations) as well as about the transcription factors that recognize those elements and act upon them in an activating or repressing manner. In order to apply these data, the database also comprises information about DNA-binding properties, expression patterns, and cellular mechanisms regulating the transcription factors.

Different statistical descriptions of DNA-binding properties contained in the databases are used by diverse programmes for analysing DNA sequences. Complex patterns of transcription factor binding -sites can be especially indicative of certain biological functions. In our group we have developed suitable programmes and have applied them in the identification of novel target genes involved in T-cell activation. The presumptive target genes resulting from these studies are now being experimentally tested and have been in part already confirmed.

PathoDB, S/MARtDB, TRANSPATH, CYTOMER®: Modules for integrating information on gene expression regulation

Recently, a number of database modules has been developed extending the TRANSFAC database. PathoDB is a database which aims at collecting data about mutated transcription factors and binding sites. Such factors and sites lead to pathological defects due to an impairment of gene regulation.

S/MARtDB provides information about the intrinsic composition, functional impact, and binding proteins of S/MARs (scaffold or matrix attached regions). These are genomic regions of several hundred base pairs that divide the genome in functional (regulatory) regions by their interactions with the nuclear matrix. S/MARs are important for the chromatin structure and, thus, participate in gene regulation.

TRANSPATH represents information about signal transduction pathways and cellular mechanisms regulating the activity of transcription factors. These data are intended for the simulation of signaling network dynamics.

Last but not least, CYTOMER® is a database that models expression patterns of transcription factors using a hierarchical set of tables for human cell types, organs, physiological systems and developmental stages.

The Helmholtz Network on Bioinformatics (HNB): Building a sustainable infrastructure

To ensure continuity in an urgently needed bioinformatics infrastructure as well as providing the dynamics typical for the research process, a project has been initiated that is connecting all German research centre in a coordinated effort to establish a stable bioinformatics structure for the German research community. Our group at GBF functions as central web coordinator for the project.

BIOBASE: Providing specialized databases for the biomedical market

For those database and software products which are ready for the market, a technology transfer concept has been developed which includes the commercialization of these products by a start-up company (BIOBASE GmbH). The company has acquired all commercial rights on the databases TRANSFAC, PathoDB, TRANSPATH and CYTOMER® and organizes the database updating which is done since the beginning of 2000 exclusively by BIOBASE.

Das Helmholtz Netzwerk für Bioinformatik (HNB): Aufbau einer stabilen Infrastruktur

Um sowohl die Kontinuität in der dringend benötigten Infrastruktur als auch die für Forschungs- und Entwicklungsarbeiten typische Dynamik zu gewährleisten, wurde ein Programm initiiert, welches alle deutschen Forschungszentren übergreifend in einer stabilen Bioinformatik-Infrastruktur verbinden soll. Unsere Arbeitsgruppe an der GBF fungiert als zentrale Web-Koordinationstelle für das Projekt.

BIOBASE: Spezialisierte Datenbanken für den biomedizinischen Markt

Für unsere marktreifen Datenbanken und Programme wurde ein Technologietransfer-Konzept entwickelt, welches die Vermarktung dieser Produkte durch die Start-up Firma BIOBASE einschließt. Die Firma hat alle Rechte an den Datenbanken TRANSFAC, PathoDB, TRANSPATH and CYTOMER[®] erworben und organisiert seit Beginn des Jahres 2000 exklusiv die Aktualisierung dieser Datenbanken.

Veröffentlichungen | *Publications*

Kel, A., Kel-Margoulis, O., Babenko, V., Wingender, E.: Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells, *J. Mol. Biol.* **288** (1999) 353-376

Wingender, E., Chen, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Prüß, M., Reuter, I., Schacherer, F.: TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation, *Nucleic. Acids Res.* **28** (2000) 316-319



Strukturanalyse (QF 2.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. H.-J. Hecht | Abt. Strukturforschung | *Dept. of Molecular Structural Research*

Projektmitarbeiter | *Project members*: K.-D. Aumann, K. Bruns, A. F. Bückmann, B. Hofmann, M. Kalisz, M. Nimtz, J. Reichelt, A. Schmidt, H. Tsai, V. Wray

3D-Struktur des Fibroblastwachstumsfaktors FGF9:

Fibroblastwachstumsfaktoren (FGF) beeinflussen diverse biologische Prozesse, inklusive Morphogenese, Angiogenese, Zellwachstum und Differentiation durch Aktivierung spezifischer Tyrosinkinase-rezeptoren. Die Struktur von glykosyliertem FGF9 (ca.30% Sequenzidentität zu FGF1) wurde mit Röntgenmethoden aufgeklärt. Während das Zentrum der FGF9 Struktur sehr ähnlich ist zu FGF1 und FGF2, formen die N-terminalen Aminosäuren bis 62 und die C-terminalen Reste ab 193 Ausläufer vom Strukturkern, die einen wesentlichen Teil der Kontaktfläche zwischen jeweils 2 FGF9 Molekülen bilden. Die bekannten Rezeptorbindungsstellen bilden einen weiteren Teil dieser Kontaktfläche. [Zusammenarbeit RDIF (H.Weich), Weizmann Inst. (A.Yayon)]

Charakterisierung der Hauptprotein-komponenten im Seminalplasma:

PSP I (Porcine Seminal Plasma) und PSP II Protein, die beiden Hauptprotein-komponenten im Seminalplasma von Ebern aus der Familie der Spermadhesine wurden isoliert, gereinigt und die enzymatisch freigesetzten Oligosaccharidstrukturen der jeweils einen Glykosylierungsstelle mittels tandemmassenspektrometrischer Untersuchungen (ESI-MS/MS) charakterisiert. Sechsenddreissig zum großen Teil noch nicht beschriebene Strukturen konnten aufgeklärt werden. Parallel wurde das kristallisierte PSPI/II Heterodimer durch HPLC in die beiden Glykoprotein-Komponenten getrennt, und die intakten Proteine mittels direkter massenspektrometrischer Analyse (MALDI/TOF-MS) charakterisiert. Anhand ihrer Molekularionen konnte die Koexistenz der Haupt-Glykoformen in ähnlicher Zusammensetzung wie in den gelösten Proteinen auch im Kristall

nachgewiesen werden. [Zusammenarbeit Strukturforschung / Proteinglykosylierung/Biomedizinisches Institut Valencia (J. Calvete)].

Charakterisierung der Virusprotein R des HIV-1:

Das Virusprotein R (Vpr) ist ein akzessorisches Protein, das am Kernimport des viralen Präintegrationskomplexes beteiligt ist und so die Integration der proviralen DNA in das Wirtszellgenom ermöglicht. Eine synthetische Form des Proteins (sVpr) wurde unter verschiedenen Lösungsbedingungen mit Hilfe von CD- und NMR-Spektroskopie sowie dynamischer Lichtstreuung untersucht. Das Lösungsverhalten von biologisch aktivem sVpr, insbesondere Aggregationsphänomene in Wasser und in membransimulierenden hydrophoben Lösungsmitteln, weisen darauf hin, daß das Protein in vivo strukturstabilisierende Faktoren wie etwa zelluläre oder virale Proteine und/oder Nukleinsäuren benötigt. Diese Befunde liefern die Grundlage für Untersuchungen der molekularen Wirkmechanismen von Vpr. (Zusammenarbeit mit NIH, Bethesda/Humboldt Univ. Berlin/UCSF San Francisco).

Structure Analysis (QF2.3)

3D-Structure of Fibroblast Growth Factor FGF9:

Fibroblast growth factors influence diverse biological processes, including morphogenesis, angiogenesis, cell growth and differentiation through activation of specific tyrosine-kinase receptors. The structure of glycosylated FGF9 (ca. 30% sequence identity with FGF1) has been elucidated by X-ray methods. The core unit of the FGF9 structure is very similar to those of FGF1 and FGF2, while the N-terminal residues prior to 62 and C-terminal residues after 193 form extensions, that provide a significant part of the contact area between two FGF9 molecules. The known receptor-binding sites form a further part of this contact surface. [Collaboration with RDIF (H. Weich), Weizmann Inst. (A. Yayon)]

Characterisation of the main components of seminal plasma:

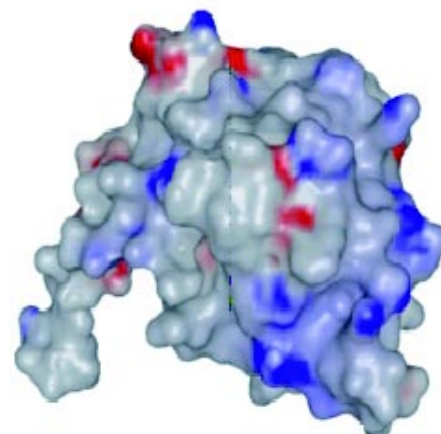
PSP I (Porcine Seminal Plasma) and PSP II proteins are the main components of boar seminal plasma and both belong to the spermadhesin family of proteins. They have been isolated, purified and the enzymatically released oligosaccharides from the various glycosylation sites have been characterised by tandem mass spectrometric (ESI-MS/MS) techniques. A significant number of these 36 components possessed novel structures. In parallel the crystallised PSPI/II heterodimer was separated by HPLC into the two glycoprotein components and the intact proteins were characterised by direct mass spectrometric analysis (MALDI/TOF-MS). The data showed the coexistence of major glycoforms of the protein in similar proportions in both the crystal and in solution. [Collaboration with Protein Glycosylation, and the Biomedical Institute of Valencia (J. Calvete)].

Characterisation of Virus protein R of HIV-1:

Virus protein R (Vpr) is an auxiliary protein that is involved in the nuclear import of the viral pre-integration complex and allows integration of the proviral DNA into the host cell genome. In the context of a structure-function analysis we have characterised a novel synthetic form of the protein (sVpr) under various solution conditions with the help of CD- und NMR-Spektroskopie as well as dynamic light scattering. The behaviour in solution of biologically active sVpr, in particular aggregation phenomena in water and in membrane-simulating hydrophobic solutions, imply that the protein in vivo requires structure-stabilising interacting factors such as cellular and viral proteins and nucleic acids. These findings provide, for the first time, a basis for the future investigation of the molecular mechanism of Vpr. (In collaboration with NIH, Bethesda/Humboldt Univ. Berlin/UCSF San Francisco)

Publication | Veröffentlichung

Henklein, P., Bruns, K., Sherman, M. P., Tessmer, U., Licha, K., Kopp, J., De Noronha, C. M. C., Greene, W. C., Wray, V., Schubert, U.: Functional and structural characterization of synthetic HIV-1 Vpr that transduces cells, localizes to the nucleus, and induces G₂ cell cycle arrest, *J. Biol. Chem.*, in press



Oberflächendarstellung von FGF9

Imagine of the surface of FGF9

Strukturelle Charakterisierung mikrobieller Pathogenitätsfaktoren

Projektleiter | *Project leader*: Priv.-Doz. Dr. D. Heinz | Nachwuchsforschergruppe Struktur Mikrobieller Pathogenitätsfaktoren | *Junior Res. Group Structure of Pathogenic Microbial Factors*

Projektmitarbeiter | *Project members*: W.-D. Schubert, M. Barzik, M. Machner, V. Beier, J. Moser, St. Ehinger, G. Göbel

Schwerpunkt unserer Untersuchungen ist die Strukturaufklärung pathogenitätsrelevanter Proteine, vorzugsweise aus dem humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* sowie ihrer Interaktionspartner in der Wirtszelle. Darüberhinaus sind auch Proteine von Interesse, die eine essentielle Funktion im bakteriellen Stoffwechsel einnehmen, sowie eukaryontische Zytoskelettproteine. Die Strukturen sollten zum einen unser Verständnis bakterieller Infektionen auf atomarer Ebene erweitern sowie andererseits eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zur gezielten Bekämpfung pathogener Keime schaffen.

Pathogenitätsfaktoren aus *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein humanpathogenes Bakterium, das auf Grund intensiver Erforschung inzwischen als Modellsystem für fakultativ intrazelluläre Erreger etabliert ist. Die Infektion erfolgt meist über kontaminierte Lebensmittel und kann zu schweren Erkrankungen führen (siehe Berichte in der Tagespresse). Das Bakterium verfügt über eine überschaubare Anzahl von Proteinen, sogenannte Virulenzfaktoren, die das Eindringen und die Fortbe-

wegung im Wirt ermöglichen. Ziel einer Kooperation mit J. Wehland (GBF) und T. Chakraborty (Giessen) ist die Strukturbestimmung listerieller Virulenzfaktoren.

Die Überexpression, Reinigung und Kristallisation einer verkürzten Form von Internalin A, welches für die Invasion der Bakterien in die Wirtszelle verantwortlich ist (Abb. 1). Die Strukturaufklärung des Proteins ist im Gange.

Die Kristallisierbarkeit des Internalin-ähnlichen Proteins IrpA konnte durch gerichtete Mutagenese verbessert werden. Auch hier ist die Strukturbestimmung im Gange. Kristalle konnten auch von einer verkürzten Variante von Internalin B erhalten werden. Ziel ist die Strukturbestimmung des Proteins in Komplex mit dem Wirtszellrezeptor.

Erstmals konnte das Oberflächenprotein ActA aus attenuierten Listerien überexprimiert und gereinigt werden. ActA kann als der bedeutendste Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* angesehen werden, da es die Fortbewegung der geißellosen Bakterien in der Wirtszelle durch Rekrutierung des Aktin-Zytoskeletts ermöglicht. In einer zentralen Domäne liegen vier repetitive prolinreiche Regionen (Sequenzmotiv FPPPP), die mit den EVH1-Domänen von Proteinen der Ena/VASP-Familie interagieren. Diese Interaktionen führen zu einer dramatischen Verstärkung der Aktinrekrutierung. In einer Kooperation mit C. Urbanke (MHH) konnte durch analytische Ultrazentrifugation die exakte Stöchiometrie des ActA-EVH1-Komplexes experimentell bestimmt werden.

Abb. 1. Kristalle von Internalin A.

Fig. 1. Crystals of internalin A.



Structural Characterization of Bacterial Virulence Factors

Our research project deals principally with the structure determination of bacterial virulence factors from the human pathogen *Listeria monocytogenes* as well as their interacting partners in the host cell. Furthermore we focus on the structures of proteins that play a major role in the bacterial metabolism and eukaryotic cytoskeletal proteins. The protein structures should broaden our knowledge about bacterial infections at the atomic level and lay the foundations for the development of novel drugs against pathogenic bacteria.

Virulence factors of *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes is a human pathogen, that has been established as a model system for the study of facultative intracellular bacteria. Infection which is caused by food contamination can lead to serious diseases (see reports in the daily press). The bacteria produce a limited number of proteins, the so-called virulence factors, that are responsible for the penetration of the host cell and movement within the host. A collaboration with the groups of J. Wehland (GBF) and T. Chakraborty (Giessen) aims at the structure determination of virulence factors from *L. monocytogenes*.

We were able to overexpress, purify and crystallize a shortened version of internalin A, that enables the bacteria to enter the host cell (Fig. 1). Structure determination of the protein is in progress.

Furthermore we succeeded in improving the crystallization of the internalin-related protein IrpA using site directed mutagenesis. Structure determination of this protein is also in progress. We also obtained crystals of a shorter version of internalin B. Here we try to solve the structure of the protein in complex with the host's receptor.

For the first time the overexpression and purification of the surface protein ActA from attenuated *Listeria* was achieved. ActA is the most prominent virulence factor from *L. monocytogenes*. It allows for the movement of the otherwise immobile bacteria in the host cell by recruiting the host's actin cytoskeleton. A central domain of the protein contains four repetitive proline-rich regions (sequence FPPPP), that interact with the EVH1-domains of the Ena/VASP-family of proteins. These interactions lead to a dramatic increase in actin recruitment. In a collaboration with C. Urbanke (MH Hannover) the precise stoichiometry of the ActA-EVH1-complex was experimentally determined.

Enzymes of the bacterial tetrapyrrole biosynthesis

The tetrapyrrole biosynthesis is a ubiquitous and central anabolic pathway that leads to the formation of essential tetrapyrroles like heme, siroheme, chlorophyll and vitamin B₁₂ from simple precursors. The main goal of a collaboration with the group of D. Jahn (Freiburg) is the elucidation of the 3D-structures of enzymes belonging to this pathway. Recently we solved the crystal structure of porphobilinogen synthase (PBGs) from *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 2). Important insights towards the elucidation of the catalytic mechanism of the enzyme were obtained by cocrystallization of the enzyme with substrate analogues. Recently a catalytic intermediate was observed in a PBGS crystal. Crystals of the first enzyme of heme biosynthesis in bacteria and plants, the glutamyl-tRNA-reductase, were obtained using an archaeobacterial enzyme (Fig. 3). The structure determination of this interesting enzyme is in progress.

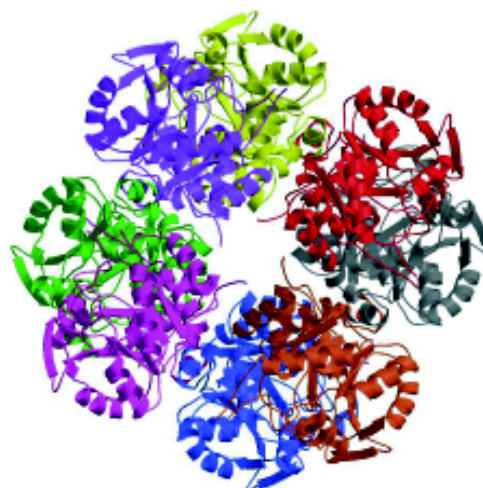


Abb. 2. Struktur der Porphobilinogen Synthase aus *Pseudomonas aeruginosa*.

Fig. 2. Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*.

Enzyme aus der bakteriellen Tetrapyrrolbiosynthese

Die Tetrapyrrolbiosynthese ist ein ubiquitärer und zentraler Stoffwechselweg, über welchen essentielle Tetrapyrrole wie z. B. Häm, Sirohäm, Chlorophyll und Vitamin B₁₂ aus einfachen Vorläufermolekülen gebildet werden. Ziel einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von D. Jahn (Universität Freiburg) ist die Aufklärung der Raumstrukturen von Enzymen dieses Stoffwechselweges. Die Kristallstruktur der Porphobilinogen-Synthase (PBGs) aus *Pseudomonas aeruginosa* konnte vor kurzem aufgeklärt werden (Abb. 2). Wichtige Beiträge zur Aufklärung des katalytischen Mechanismus des Enzyms konnten durch Kokristallisation von PBGS-Mutanten im Komplex mit Substratanaloga erhalten werden. Kürzlich konnte ein katalytisches Intermediat im Kristall nachgewiesen werden. Es war jetzt möglich, Kristalle einer archaebakteriellen Glutamyl-tRNA-Reduktase zu erhalten, welche den ersten Schritt der Hämbiosynthese in Bakterien und Pflanzen katalysiert (Abb. 3).

Veröffentlichungen | Publications

Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D., Heinz, D. W.: High resolution crystal structure of a Mg²⁺-dependent porphobilinogen synthase, *J. Mol. Biol.* **289** (1999) 591-602

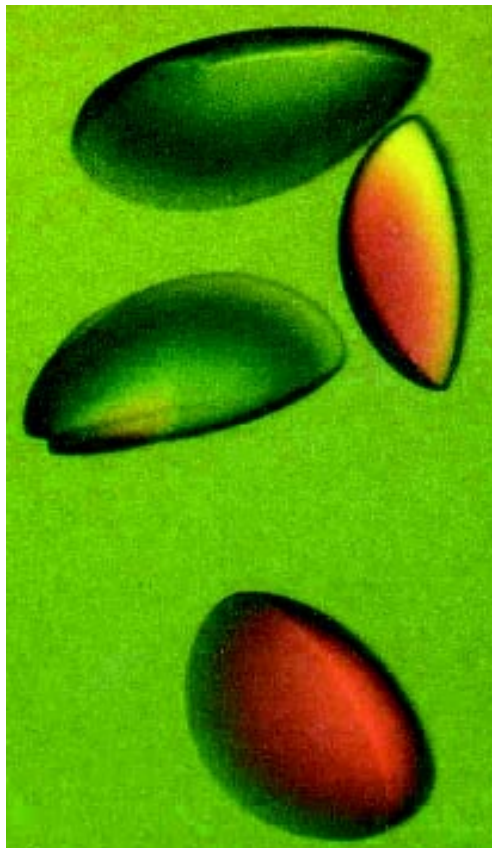
Frankenberg, N., Heinz, D. W., Jahn, D.: Production, purification, and characterization of a Mg²⁺-responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* contains, *Biochemistry* **38** (1999) 13968-13975

Heinz, D. W.: A phospholipase with a novel catalytic triad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 2348-2351; Eine Phospholipase mit einer neuartigen katalytischen Triade, *Angew. Chem.* **111** (1999) 2496-2499

Barzik, M., Schubert, W.-D., Carl, U., Wehland, J., Heinz, D. W.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of Vesl-2b, *Acta Crystallogr. Section D*, in press

Abb. 3. Kristalle von
Glutamyl-tRNA-Reduktase.

Fig. 3. Crystals of glutamyl-
tRNA-reductase.





Leiter | *Leader*: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Mitarbeiter | *Members*: H. Budde, S. A. Guerrero, B. Hofmann, T. Jäger, S. Kansal, S. Karge, H. Kollmus, U. Menge, M. Singh, P. Steinert, H. Sztajer, J. Wissing

TU Lehrstuhl für Physiologische Chemie in der GBF

Die Abteilung für Biochemie der Technischen Universität ist an der GBF untergebracht und wird durch diese teilweise finanziert. Ihre Forschungsaktivitäten umfassen die Biochemie des Selen, antioxidative Systeme pathogener Protozoen und Virulenzfaktoren von Mykobakterien.

Selenbiochemie: Die biologische Rolle der individuellen Glutathion-Peroxidasen

Projektleiter

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Von den in jüngerer Zeit entdeckten Isoenzymen genießt die gastro-intestinale Glutathion-Peroxidase (GI-GPx) wegen des auffälligen Expressionsmusters und der Resistenz gegenüber Selenmangel wachsendes Interesse. Die bevorzugte Bildung von GI-GPx unter limitiertem Selenangebot weist auf eine besondere Funktion dieses GPx-Typs hin [Zusammenarbeit mit DIfE, Potsdam-Rehbrücke (R. Brigelius-Flohé)].

Die Funktion der Phospholipidhydroperoxid-Glutathione-Peroxidase (PHGPx) bei der Spermienreifung wurde weiter analysiert. Überraschend erwies sich oxidativ vernetztes und enzymatisch inaktives PHGPx-Protein als Hauptbestandteil der „Mitochondrienkapsel“, einem keratinartigen Material, das die Mitochondrien-Helix im Mittelstück von Spermien einbettet. Der PHGPx-Anteil in der Mitochondrienkapsel entspricht weitgehend dem Selengehalt der Spermien und erklärt die bekannte Selenabhängigkeit der männlichen Fertilität von Säugetieren [Zusammenarbeit mit GBF (J. Wissing, S. Heim) and Università di Padova (F. Ursini)].

Antioxidative Systeme pathogener Protozoen

Projektleiter

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Parasitäre Protozoen sind auf einen effizienten Oxidationsschutz angewiesen, um sich gegen die Abwehrreaktion während des Infektionsprozesses behaupten zu können. Entsprechend darf von einer selektiven Hemmung der beteiligten Enzyme eine therapeutische Wirkung bei Protozoenerkrankungen erwartet werden.

Für den Trypanothion-abhängige Hydroperoxid-Stoffwechsel wurden die neu entdeckten Komponenten des Systems, Trypanothion-Reduktase, Tryparedoxin und Tryparedoxin-Peroxidase, durch molekulare Mutagenese, ergänzt durch kinetische Analysen, molekulare Modellierung und Kristallographie, charakterisiert [Zusammenarbeit mit der GBF (H.J. Hecht, H. Kalisz, A. Roß)].

Die Existenz und Relevanz des Stoffwechselweges konnte nicht nur für den Modellorganismus *Crithidia fasciculata*, sondern auch für die Pathogene *Trypanosoma brucei brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania major* und *L. donovani* gezeigt werden. [Zusammenarbeit mit Bernhard-Nocht-Inst. für Tropenmedizin, Hamburg (J. Clos) und der Universität São Paulo (W. Colli)].

GBF Hosted Department of Physiological Chemistry of TU Braunschweig

The Department of Biochemistry of the Technical University of Braunschweig is hosted and partially financed by the GBF. Its research efforts comprise three areas: biochemistry of selenium, antioxidant systems of pathogenic protozoa, and virulence factors of mycobacteria.

Biochemistry of selenium: the biological role of individual glutathione peroxidases

Project leader

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Among the more recently discovered isozymes, the gastrointestinal Glutathione peroxidase (GI-GPx) enjoys increasing interest because of its peculiar expression pattern and resistance to selenium deprivation. The preferential expression of GI-GPx under limited selenium supply points to a more important function than that of its congeners [Collaboration with DIFE, Potsdam-Rehbrücke (R. Brigelius-Flohé)].

The role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in sperm maturation was further analysed. Surprisingly, oxidatively cross-linked and enzymatically inactive PHGPx proved to be the major constituent of the „mitochondrial capsule”, a keratin-like material that embeds the helix of mitochondria in the midpiece of spermatozoa. The PHGPx fraction in the mitochondrial capsule accounts for most of the selenium content in sperm and probably explains the well documented selenium dependency of male fertility in mammals [Collaboration with GBF (J. Wissing, S. Heim) and Università di Padova (F. Ursini)].

The molecular events leading to the transformation of PHGPx from a soluble active peroxidase into a structural protein are currently being analyzed as part of a priority research programme of the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Antioxidant systems of pathogenic protozoa

Project leader

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Protozoal parasites depend on an efficient antioxidant defense to cope with the host defense reaction during the process of infection. Selective inhibition of enzymes involved is considered a promising approach to treat protozoal diseases.

The trypanothione-mediated hydroperoxide metabolism of trypanosomatids was further analysed. The novel constituents of the pathway which comprises trypanothione reductase, tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase, were characterized by site-directed mutagenesis complemented with kinetic analyses, molecular modelling and crystallographic approaches [Collaboration with GBF (H.J. Hecht, H. Kalisz, A. Roß)]. The existence and relevance of this metabolic pathway could be demonstrated not only for the model organism *Crithidia fasciculata*, but also for the pathogens *Trypanosoma brucei brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania major* and *L. donovani* [Collaboration with Bernhard Nocht Inst. Tropical Medicine, Hamburg (J. Clos) and University of Sao Paulo (W. Colli)].

Erste Ergebnisse legen nahe, dass der Trypanothion-abhängige Oxidationsschutz gleichermaßen für *Entamoeba histolytica* relevant ist. Hingegen bewerkstelligen *Plasmodia-Species* die Hydroperoxid-Entgiftung mit Glutathion. Eine selenfreie Glutathion-Peroxidase aus *P. falciparum* erwies sich allerdings als zu ineffizient, als dass sie den Oxidationsschutz dieses Pathogens erklären könnte [Zusammenarbeit mit dem Inst. Pasteur, Lille (C. Slomianny)].

Antigene und Virulenzfaktoren in Mykobakterien - Firmenausgründung
Projektleiter

Prof. Dr. M. Singh

Die Produktion von Antigenen von Mykobakterien, die auf eine etablierte Kooperation mit der WHO zurückgeht, wurde in eine von Mahavir Singh neugegründete Firma, Lionex GmbH überführt, während der Thiol-abhängige Peroxid-Stoffwechsel in Mykobakterien weiterhin in der Abteilung aktiv erforscht wird.

Preliminary evidence suggests that the trypanothione-dependent antioxidant defence may be equally relevant in *Entamoeba histolytica*. In contrast, *Plasmodia* species appear to depend on glutathione-dependent hydroperoxide removal. A non-selenium glutathione peroxidase from *P. falciparum*, however, could be shown to catalyse hydroperoxide reduction too inefficiently to account for the antioxidant defense in this pathogen [Collaboration with Inst. Pasteur, Lille (C. Slomianny)].

Antigens and virulence factors of pathogenic mycobacteria - Foundation of a new start-up company

Project leader

Prof. Dr. M. Singh

The production of antigens of mycobacteria, that goes back to a long-standing co-operation with the WHO, was transferred to a start-up company, Lionex GmbH, founded by Mahavir Singh (Lionex GmbH), while the research on thiol-dependent hydroperoxide metabolism in mycobacteria remains actively pursued within the compartment for the purpose of identification of drug targets and vaccine development.

Publications | Veröffentlichungen

Flohé, L., Hecht, H. J., Steinert, P.:
Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism, *Free Rad. Biol. Med.* (1999) 966-984.

Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. and Flohé, L.: Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation, *Science* **285** (1999) 1393-1396.

Steinert, P., Plank-Schumacher, K., Montemartini, M., Hecht, H.-J., and Flohé, L.: Permutation of the Active Site Motif of Tryparedoxin 2, *Biol. Chem.* **381** (2000) 211-219.



Die GBF bietet seit vielen Jahren Dienstleistungen auch für externe Nutzer an. Diese sind im Falle von GMP und Biotechnikum praktisch einzigartig in deutschen Forschungseinrichtungen. Die Abteilung für Instrumentelle Analytik verfügt über neueste Großgeräte zur Aufklärung (bio-)chemischer Strukturen biologisch wichtiger Moleküle. Die Bibliothek wird vor allem regional als spezialisierte Einrichtung ihrer Art genutzt. Die Abteilung Wissenschaftliche Information bietet neben dem Ergebnisbericht auch Informationen für Wissenschaftler aus Entwicklungsländern zu Fragen über Biotechnologieforschung und Forschungsförderung in Deutschland an. Mit der Eröffnung des FORUMs wird zudem wissenschaftlicher Informationsaustausch bei nationalen und internationalen Tagungen möglich sein. Das Rechenzentrum stellt vor allem für die wissenschaftliche und administrative Infrastruktur wichtigstes Rüstzeug zur Verfügung.

Biotechnikum

Leiter | *Head*: Dr. A. Roß | Arb. Gr. Bioreaktionstechnik | *Res. Group BioreactionTechniques*

Spektrum wissenschaftlicher Dienstleistungen Biotechnikum/BRT und ZKT

- Design und Optimierung von Prozessen zur Kultivierung von Mikroorganismen und Zellkulturen und zur Isolierung biotechnologischer Produkte, u.a.
 - Scale-up von der Laborvorschrift in den Produktionsmaßstab (bis zu 2000 l Kulturvolumen bei Mikroorganismen)
 - Analyse und Verbesserung einzelner Prozessschritte wie Kultivierung, Zellabtrennung, Zellaufschluß oder jegliche Art von Filtrationsprozessen
 - Adaption von Zellkulturen an serumfreie Medien
- Produktion biotechnologischer Produkte für die Forschung oder zur Verwendung als Testmaterial wie z.B. Biomasse von rekombinantem *E. coli* oder HeLa-Zellmasse für Forschungslaboratorien, Proteine für die Struktur-forschung, Enzyme oder niedermolekulare Produkte
- Validierungsstudien wie z.B. zur Frage der Sterilisierbarkeit von Geräten und Anlagen
- Beratung in jeder Frage, die im Zusammenhang steht mit biotechnologischen Prozessen für die Produktion von Proteinen und anderen Produkten aus Mikroorganismen und Zellkulturen. Tiefgehende Erfahrungen liegen vor mit Produktionssystemen wie rekombinantem *E. coli*, *P. pastoris* und *Baculovirus*; sie sind jedoch nicht auf diese Systeme begrenzt.

Since many years the GBF offers services also for external users and groups. In the case of the GMP Unit and the Biopilotplant Unit these services are practically unique within German research institutions. The Department of Instrumental Analytics disposes of very new equipment for the elucidation of (bio-)chemical structures of biological important molecules. The library is regionally being used as a specialised institution in the fields of biotechnology. The Department for Scientific Information offers beside the Annual Report information about biotech-research and research founding in Germany, especially for scientists from developing countries. The new FORUM will allow to have exchange of scientific information and knowledge by national and international meetings. The Computing Centre principally serves to give an optimal operating basis for the scientific as well as administrative infrastructure.

Bio Pilot Unit

Scientific Services Bio Pilot Plant Unit and Cell Culture Plant

- Design and optimisation of processes for cultivation of microorganisms and cell cultures and the recovery of bioproducts, which includes i.a.
 - scale-up from laboratory recipes to production scale (up to 2000 l cultivation volume in case of microorganisms)
 - analysis and improvement of single process steps like cultivation, cell separation, cell disruption or any type of filtration process
 - adaptation of cells to serumfree media
- Production of bioproducts for research or use as test material like recombinant E. coli-biomass or HeLa-cell mass for research labs, proteins for structure research, enzymes or low molecular weight compounds
- Validation studies like sterilisability of equipment
- Consulting in case of any question referring to biotechnological processes for production of proteins and other products from microorganisms and cell cultures. Indepth experience is available, but not limited to, for recombinant E. coli, P. pastoris and Baculovirus as production systems.

GMP-Technikum

Leiter | *Head*: Dr. H. Ziehr | Arb. Gr. GMP-Technikum | *Res. Group GMP Pilot Plant*

Die Arbeitsgruppe GMP Technikum (s.a. QF 1.3) führt gegenwärtig ausschließlich Service-Projekte für Klienten aus der pharmazeutisch chemischen- und Biotech-Industrie durch. Hierbei handelt es sich um die Bearbeitung vornehmlich bioverfahrenstechnischer- und GMP-Fragestellungen im Rahmen von Herstellungsprozessen neuer rekombinanter Pharmawirkstoffe. Es gilt in der Regel arzneimittelrechtliche Anforderungen insbesondere aber das Qualitätssicherungssystem Gute Herstellungspraxis (GMP) zur Anwendung zu bringen. Das Leistungsspektrum beinhaltet

- die Optimierung und Maßstabsvergrößerung von Kultivierungsverfahren,
- die Entwicklung dazu passender Produktreinigungsverfahren,
- die Entwicklung und Validierung von analytischen Verfahren für InProzesskontrollen und Produktfreigabe sowie
- die Validierung von Herstellungsverfahren (Konsistenz, Prozeßvalidierung).

Die Prozeßvalidierung erfolgt unter vollem GMP-Reglement und unter Einholen einer Herstellungserlaubnis gem. §13 des Arzneimittelgesetzes (AMG), so daß das dabei anfallende Wirkstoffmaterial anschließend für klinische Prüfungen eingesetzt werden kann.

GMP Unit

The GMP Unit (s.a. QF 1.3) is carrying out services mainly for clients from Biotech-Start-Up companies and pharmaceutical industry. The services are focussed on biochemical engineering topics with arise during the development of manufacturing processes for recombinant biologics and need an early taking into account of current Good Manufacturing Practices (cGMP) the quality assurances system of the pharmaceutical industry. The service portfolio includes

- development and scale up of microbial and animal cell cultivation processes,
- development of scale corresponding and quality convenient down stream processing scenarios,
- development of analytical procedures for in process control and release procedures, and
- the validation of single unit operations and entire production processes.

Process validations studies are carried out under full cGMP compliance and the auspices of the national regulatory authorities.

Pharmaceutical active ingredients (APIs) produced during GMP - consistency runs are suitable for further processing to clinical trials material.



Instrumentelle Analytik

Leiter | *Leader*: Dr. V. Wray | Abt. Molekulare Strukturforschung | *Dept. of Molecular Structure Research*

Mitarbeiter | *Members*: R. Christ, H.-J. Hecht, M. Kieß, M. Nimtz, E. Surges, A. Waßmann, H. Kalisz

Im Rahmen der analytischen Arbeiten wurden Massenspektrometrie (MS), Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR), Röntgenstrukturanalyse (RSA) und Protein-Sequenzierung eingesetzt.

NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie

Die Strukturen sowohl von niedermolekularen als auch hochmolekularen Naturstoffen können mittels der Kombination moderner massenspektrometrischer Techniken mit multidimensionalen NMR Verfahren aufgeklärt werden. Im allgemeinen wird folgende Vorgehensweise gewählt: Die komplette Struktur von niedermolekularen Naturstoffen wird routinemäßig mittels einer Kombination von EI/CI/ESI-MS mit 1D und 2D ^1H und ^{13}C NMR Spektrometrie aufgeklärt. Die Identität von Molekülteilen und deren Verknüpfung kann im Normalfall von dem 2D ^1H COSY/TOCSY und ^1H detektiertem ^{13}C - ^1H Korrelationen abgeleitet werden. ^1H Kern-Overhauser-Effekt Experimente liefern zusätzliche Informationen über Konfiguration und Konformation. Die Massenspektrometrie liefert das Molekulargewicht und das Fragmentierungsverhalten des jeweiligen Moleküls. Diese Informationen bestätigen und erweitern die Daten, die von den NMR Experimenten geliefert werden. Zudem sind auch extrem geringe Substanzmengen sowie Substanzgemische massenspektrometrischen Untersuchungen zugänglich.

Die direkte massenspektrometrische Analyse großer intakter Biomoleküle wie Proteine, Oligonukleotide und komplexe Kohlenhydrate ist routinemäßig mittels MALDI/TOF und ESI möglich. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen bis zu einem Molekulargewicht von 20 kDA kann durch eine Kombination von

2D/3D homo- und heteronuklearer Korrelations-NMR erhalten werden, wenn genügend isotopenmarkiertes (^{15}N , ^{13}C) Proteinmaterial vorhanden ist. Derzeit liegt der Schwerpunkt der makromolekularen Forschung aber auf der massenspektrometrischen Untersuchung von Glykoproteinen, deren Oligosaccharidanteil mittels von in der Abteilung entwickelten ESI-MS/MS-Techniken und hydrolytischen Mikroderivatisierungsmethoden, die die Kohlenhydratzusammensetzung und die Aufklärung der Verknüpfung der verschiedenen Monosaccharidbausteine („Methylierungsanalyse“) erlauben, charakterisiert wird. Neu aufgebaut wurden in 1999 massenspektrometrische Mikro-Techniken zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen aus 2 D Gelen („Proteomics“) anhand des Molekulargewichts ihrer proteolytischen Fragmente mittels MALDI/TOF-MS. Zusätzlich wurde die massenspektrometrische (Partial)-Sequenzierung dieser Peptidfragmente aus der ungereinigten proteolytischen Mischung mittels ESI-MS/MS etabliert. Die Empfindlichkeit letzterer Technik konnte durch Inbetriebnahme eines neuen Massenspektrometers (QTOF II, Micromass, Manchester) drastisch verbessert werden. Neben einer im Vergleich zum Vorgängergerät 100-fach erhöhten Empfindlichkeit ist auch die Auflösung um eine Zehnerpotenz verbessert.

Instrumental Analytics

The instrumental methods available are mass spectrometry (MS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), X-ray crystallography, and protein sequencing.

NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry

The structures of both small and large molecular weight natural products are accessible through the combination of modern mass spectrometric and multi-dimensional NMR spectroscopic techniques. In general for the majority of small natural products the total structure is elucidated in a routine manner from the combination of EI/CI/ESI MS and 1D and 2D homonuclear and heteronuclear ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The identity of fragments in the molecule and their sequence is normally deduced from 2D ^1H COSY/TOCSY and ^1H -detected multiple-bond ^{13}C - ^1H data, respectively. Additional ^1H nuclear Overhauser enhancement data affords configurational and conformational information. Mass spectrometric data provides explicit information on the mass and fragments present that are used to extend and confirm that gained during NMR studies, and has the added advantage of providing information for very small amounts of compound.

The direct analysis of large intact biomolecules such as proteins, oligonucleotides and complex carbohydrates is routinely available through the use of MALDI- and ESI-MS. While in solution the secondary and tertiary structure of peptides and proteins, with molecular weights up to at least 20,000, can be elucidated when appropriately labelled material (^{15}N and ^{13}C) is available through the application of a combination of 2D/3D homo- and heteronuclear correlation NMR spectroscopy. Currently the main emphasis in the macromolecular field has been concentrated on the MS elucidation of glycoproteins, in particular the characterisation of oligosaccharides using ESI-MS/MS techniques and hydrolytic micro-derivatisation methods developed in the department that allow determination of the carbohydrate composition and the linkages of the various monosaccharide units (methylation analysis). New MS micro-techniques have been developed in 1999 for the identification and characterisation of

proteins from 2D gels ("Proteomics") through the determination of the molecular weight of their proteolytic fragments using MALDI/TOF-MS. Partial MS-sequencing of these peptide fragments from unpurified proteolytic mixtures using ESI-MS/MS has also been established. The sensitivity of the latter has been significantly improved through the installation of a new hybrid mass spectrometer (QTOF II, Micromass, Manchester). In comparison to previous instruments this is 100-fold more sensitive and has a ten-fold increased resolution.

X-ray Crystallography

Structure determinations of low molecular weight compounds, mostly as a completion or confirmation of NMR/MS studies, can usually be routinely performed on suitable crystals using direct methods. The absolute configuration of such compounds, valuable especially for natural products, can be determined provided atoms with anomalous scattering are present.

The main emphasis in X-ray crystallography lies clearly in the structural analysis of proteins (see QF 2.3). In the department a pipette-robot as well as a X-ray unit with an area detector and rotating anode are available for crystallisation and data collection. The joint Max-Planck-Institute/GBF managed beamline BW6 at DESY allows in addition the measurement of high resolution data and phase determination using anomalous dispersion. Data processing and structural analysis, as well as modelling of homologous structures, can be performed on 5 graphic workstations in the department and on the numerous facilities available in the computer centre. Further development of the programme Bragi offers flexibility in the addressing of specific problems.

Röntgenstrukturanalyse

Meist in Ergänzung oder als Bestätigung von mittels NMR und Massenspektrometrie erhaltenen Ergebnissen kann im niedermolekularen Bereich eine Strukturbestimmung bei Vorliegen geeigneter Kristalle in der Regel mit Hilfe der direkten Methoden routinemäßig durchgeführt werden, wobei bei Anwesenheit von Atomen mit anomaler Streuung auch die, speziell bei Naturstoffen wesentliche, absolute Konfiguration der untersuchten Verbindung erhalten wird.

Der Schwerpunkt der Röntgenstrukturanalyse lag jedoch eindeutig bei der Strukturanalyse von Proteinen (s.QF 2.3). Zur Durchführung der bei Proteinen wesentlich aufwendigeren Arbeiten zur Kristallisation und Strukturlösung mittels molekularem oder isomorphen Ersatz stehen in der Abteilung ein Pipettierroboter sowie ein Meßplatz mit Flächenzähler und Drehanodengenerator zur Verfügung, ergänzt durch die von Max-Planck-Instituten und GBF gemeinsam betriebene Meßstation BW6 am DESY, die die Messung von hochaufgelösten Daten und die Phasenbestimmung über anomale Dispersion ermöglicht. Zur Datenauswertung und Analyse der Strukturen sowie zur Modellierung homologer Strukturen stehen in der Abteilung 5 Grafikrechner sowie umfangreiche Rechenmöglichkeiten auf Rechnern des Rechenzentrums zur Verfügung. Die Weiterentwicklung des Modellierungsprogramms Bragi ermöglicht dabei eine flexible Anpassung an neu auftretende Fragestellungen.

Proteinsequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgt mittels automatischem Edman-abbau mit Sequenzern von PE-Applied Biosystems (Procise 494A und 473A). Die Sequenzierung wurde eingesetzt zur Aufklärung neuer Proteinsequenzen, zur Gewinnung von Oligonucleotid-Sonden für die DNA-Sequenzierung bzw. Klonierung, für die Identifizierung von Proteinen in Datenbanken, sowie zur Kontrolle von Identität und Reinheit rekombinant hergestellter Proteine. Proben können sowohl in Lösung als auch auf PVDF-Membranen gebunden im unteren Picomolbereich analysiert werden. Die durchschnittliche Sequenzlänge beträgt dabei 17 Aminosäuren. Proteine, die N-terminal blockiert sind bzw. von denen zusätzliche interne Sequenzen benötigt werden, wurden enzymatisch oder chemisch gespalten, die erhaltenen Peptide über Kapillar-HPLC getrennt und zur Sequenzierung bzw. Aminosäureanalyse eingesetzt.

Die Aminosäureanalysen von Proteinen und Peptiden werden zusätzlich mit dem Aminosäureanalysator PE-ABI 420 A/H im pmol-Bereich durchgeführt. Anwendungen sind die Quantifizierung von Proteinmengen, die Überprüfung der Reinheit bzw. der Stöchiometrie von synthetischen Peptiden, die Identifizierung von Peptiden aus proteolytischen Maps anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung, und der Nachweis N-terminaler Blockierungen.

Protein Sequencing

N-terminal protein sequencing is performed by automated Edman degradation on PE-Applied Biosystems sequencers (Procise 494A und 473A). Applications include elucidation of new protein sequences, identification of proteins in data banks as well as the control of the identity and purity of recombinant proteins. Samples may be analyzed in solution as well as bound to PVDF membranes in the low picomole range. The average sequence length obtained is 17 amino acids. Proteins, that are *N*-terminally blocked or for whom internal sequences are

required, are cleaved enzymatically or chemically. The resulting peptides are separated by capillary-HPLC and subsequently subjected to sequencing as well as amino acid analysis.

Amino acid analyses of peptides and proteins are performed on an Applied Biosystems 420A/H analyzer in the picomole range. Applications include protein concentration determination, checking of purity as well as stoichiometry of synthetic peptides, identification of peptides from proteolytic maps through the amino acid composition and proof of *N*-terminal blocking.

Statistical Analysis 1999

1999	NMR	MS	SEQ
No. of samples analysed	3526	3029	687 ^a
% Internal GBF useage	67,9	88,3	97,8
% External useage	42,1	11,7	2,2
No. of GBF customers	41	58	44
No. of External Institutes ^b	15	11	3
Instrumentation available	Bruker DPX 300 Bruker ARX 400 Bruker DMX 600	QTOF II (Micromass) Finnigan GCQ Finnigan MAT 95 Finnigan TSQ 700 Bruker REFLEX Jeol JMS HX 110/110A	Applied Biosystems 420A Applied Biosystems 473A Applied Biosystems 494

^aProtein sequencing of 541 samples with 8716 cleavages, as well as 146 samples with 1097 amino acid analyses.

^bSamples from the following institutes were investigated in 1999: Berlin: TU, Humboldt-U. Institut für Pharmazie; Bielefeld: U-Fakultät Biologie; Bonn: U-Institut für Lebensmittelchemie; Braunschweig: TU-Institute für Botanik, Lebensmittelchemie, Organische Chemie, Pharmazeutische Biologie, Biochemie und Biotechnologie, Anorganische Chemie, Zucker Institut, DSMZ; Dresden: U-Klinikum-Institut für Immunobiologie; Düsseldorf: U-Institut für Pharmazeutische Biologie; Giessen: U-Veterinär-Institut für Biochemie und Endokrinologie; Greifswald: U-Institut für Pharmazie; Halle: Institut für Pflanzenbiochemie; Hannover: U-Organische Chemie, Tierärztliche Hochschule; Paderborn: U-Gesamthochschule; Würzburg: U-Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie.

Statistische Auswertung der Gerätenutzung 1999

1999	NMR	MS	SEQ
Untersuchte Proben (gesamt)	3526	3029	687 ^a
% Auslastung durch die GBF	67,9	88,3	97,8
% Auslastung durch externe Kunden	42,1	11,7	2,2
Anzahl der GBF Kunden	41	58	44
Anzahl der externen Institute ^b	15	11	3
Instrumente	Bruker DPX 300 Bruker ARX 400 Bruker DMX 600	QTOF II (Micromass) Finnigan GCQ Finnigan MAT 95 Finnigan TSQ 700 Bruker REFLEX Jeol JMS HX 110/110A	Applied Biosystems 420A Applied Biosystems 473A Applied Biosystems 494

^a Proteinsequenzierung 541 Proben mit 8716 Abbauschritten, sowie 146 Proben mit 1097 Aminosäureanalysen.

^b Proben folgender Institute wurden 1999 untersucht: Berlin: TU, Humboldt-U. Institut für Pharmazie; Bielefeld: U-Fakultät Biologie; Bonn: U-Institut für Lebensmittelchemie; Braunschweig: TU-Institute für Botanik, Lebensmittelchemie, Organische Chemie, Pharmazeutische Biologie, Biochemie und Biotechnologie, Anorganische Chemie, Zucker Institut, DSMZ; Dresden: U-Klinikum-Institut für Immunobiologie; Düsseldorf: U-Institut für Pharmazeutische Biologie; Giessen: U-Veterinär-Institut für Biochemie und Endokrinologie; Greifswald: U-Institut für Pharmazie; Halle: Institut für Pflanzenbiochemie; Hannover: U-Organische Chemie, Tierärztliche Hochschule; Paderborn: U-Gesamthochschule; Würzburg: U-Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie.

Rechenzentrum

Leiter | *Head*: Dr. N. Bedorf

Mitarbeiter | *Members*: K.-D. Aumann, E. Käbner, W. Lehnberg, U. Leuner, D. N. Lincoln, J. Reichelt

Zentralrechner

Die zentralen Fileserver – Digital Alpha-Server 2100 mit 200 MHz und 256 Mbyte Arbeitsspeicher – waren nach 6 Jahren Betrieb der gestiegenen Auslastung nicht mehr gewachsen. Als Ersatz wurde eine Doppelprozessor Alpha – Compaq ES40 – mit 2 GByte Arbeitsspeicher und 500 GByte Plattenkapazität in einem RAID-Subsystem beschafft. Als Betriebssystem wird zur Zeit VMS 7.2 mit den PC-Diensten Pathworks eingesetzt. Auf dieser Hardware ist aber auch ein Wechsel des Betriebssystems zu Tru64 Unix oder Linux denkbar.

Computerserver

Zum Ausbau der Leistung der Unix-Computerserver insbesondere für Anwendungen wie Blast und Fasta zum Sequence-Alignment wurde eine kleine ‚Linux-Farm‘ aus 6 Doppelprozessor Pentium III PCs mit 450 MHz und insgesamt 6 GByte Arbeitsspeicher als Testinstallation aufgebaut. Der Einsatz von preiswerten ‚off-the-shelf‘-Rechnern als Multiprozessor-Farm unter dem freien Betriebssystem Linux kann bei solchen ‚trivial-parallelisierbaren‘ Prozessen Rechenleistungen erzielen, die bisher nur mit erheblich teureren Computern zu erzielen waren. Erste Benchmarks mit dem Blast-Algorithmus zeigten dann auch einen 5,5fachen Performancegewinn gegenüber einer Zweiprozessor Alpha mit 500 MHz.

Eine solche Linux-Farm kann leicht durch weitere Standard-PCs erweitert werden, wobei die erreichbare Leistung – für die hier gestellten Probleme – linear mit der Anzahl der Server wächst.

Datenbankserver

Zwei der Terminalserver für PC-basierende Datenbanken – Medline, Current Contents, Römpf, Duden und andere – wurden durch Doppelprozessor PCs PIII 500 MHz mit je 512 MByte Arbeitsspeicher ersetzt, bei zwei weiteren Terminalservern wurde der Pentium Pro Prozessor 200 MHz gegen Celeron-Prozessor mit 500 MHz getauscht. Gleichzeitig wurde die Festplattenkapazität aller Terminalserver vergrößert, so dass fast alle Datenbanken jetzt von schnellen Festplatten und nicht mehr von CDs betrieben werden können. Das Antwortverhalten dieser Server, insbesondere unter der Last simultaner Zugriffe, konnte hiermit deutlich verbessert werden.

Computing Centre

Central Server

The central file server – Digital Alpha-Server 2100 with 200 Mhz and 256 Mbyte memory, after six years of operation with increasing demand, was no longer sufficient. As a replacement a double-processor Alpha – Compaq ES40 with 2 GByte memory and 500 GByte disk storage in a RAID-subsystem was acquired. Currently the VMS 7.2 operating system with Advanced Server for PC services is installed. It is possible to convert to Tru64 Unix or Linux with this hardware.

Compute Server

To increase the performance of the Unix compute servers, especially for applications such as Blast and Fasta for sequence alignment, a small 'Linux farm' of six double-processor 450 MHz Pentium III PCs and a total of six GByte memory were installed as a test. The use of inexpensive 'off-the-shelf' computers in a multiprocessor farm with the open-source operating system Linux can run these 'trivially-parallelizable' processes that previously could only be run with extremely expensive computers. The first benchmarks show a 5.5-fold performance improvement over a double-processor 500 MHz Alpha. Such a Linux farm can be easily expanded with additional standard PCs where the usable performance, for the applications mentioned, increases linearly with the number of servers.

Database Servers

Two of the terminal servers for PC based databases – Medline, Current Contents, Römpf Duden etc. – were replaced with double-processor 500 MHz Pentium III PCs, each with 512 Mbyte memory. Two additional terminal servers had their 200 MHz Pentium Pro processors exchanged for 500 MHz Celeron processors. At the same time the harddisk capacity for all terminal servers was increased so that practically all databases can now be accessed from fast harddisks rather than from Cds. The response time for these servers, especially under the demands of simultaneous access, were noticeably improved.



Wissenschaftliche Information und Bibliothek

Leiter | *Head*: Prof. Dr. Jonas

Mitarbeiter | *Member*: M. Kirchner

Bibliothek

Leiter | *Head*: A. Plähn

Mitarbeiter | *Members*: M. Hermes, H. Steinke

Die wesentlichen Aufgaben der Bibliothek sind:

1. Beschaffung und Bereitstellung der gedruckten Literatur in Form von Zeitschriften, Serien und Monographien für die wissenschaftlichen Bereiche und sämtliche Infrastruktureinrichtungen der GBF;

2. Beschaffung der nicht im Hause vorhandenen benötigten Literatur über elektronische und konventionelle Dokumentliefersysteme

3. Betrieb eines integrierten Bibliotheks-Informationssystems als Online-Benutzerkatalog der Bibliotheksbestände und zur Bibliotheksverwaltung;

4. Bereitstellung von elektronischer Information wie Literatur- und Faktendatenbanken über das CD-ROM-Netz der GBF oder über die Digitale Bibliothek im Intranet sowie von elektronischem Zugang zu Zeitschriftenvolltexten.

Die Bibliothek wird als Präsenzbibliothek geführt und steht neben den Mitarbeitern der GBF auch Wissenschaftlern aus anderen Forschungseinrichtungen und der Wirtschaft zur Verfügung. Mit den Bibliotheken der Region und den anderen HGF-Bibliotheken steht die GBF-Bibliothek in engem Kontakt und ständigem Gedankenaustausch.

Bestandszahlen

Die Bibliothek umfasste zum Ende des Berichtszeitraumes 12.560 Monographien, 21.050 gebundene Zeitschriftenbände, 5.000 Patentschriften, Dissertationen und Sonderdrucke sowie 294 Zeitschriftenabonnements, 88 fortlaufende Serien, 102 Loseblattsammlungen sowie 30 CD-ROM/Disketten-Abonnements. Der Zuwachs betrug bei den Monographien 514 und bei den Zeitschriften 850 Bände.

Fernleihe

Im Berichtszeitraum wurde die Umstellung auf die Nutzung elektronischer Dokumentenliefersysteme wie **Subito** oder **GBV-direkt** weiter zum Standardbeschaffungsweg ausgebaut. Die Lieferzeiten für die über Fernleihe zu beschaffende Literatur konnten dadurch drastisch verkürzt werden. Von den insgesamt 5.000 Fernleihbestellungen wurden ca. 60% über die Bibliothek aufgegeben. In der aktiven Fernleihe wurden 222 kopierte Artikel an andere Bibliotheken versandt.

Scientific Information and Library

Library

The main tasks of the library are:

1. To obtain and provide printed scientific literature to the staff
2. To offer interloan services to the staff
3. To operate a library automation system for providing an online library catalogue
4. To provide electronic information by way of CD-ROM-network, digital library on the intranet or access to fulltext of electronic journals

Though a reference library, the GBF-library is also accessible for external users, scientists or students from their research institutes or companies. The library is in close contact with other HGF-libraries and the scientific libraries of the region.

Stocks

The collection contains about 12,560 monographs, 21,050 journal volumes, 5,000 patents, dissertations and offprints as well as 294 journal subscriptions, 88 serial subscriptions, 102 loose-leaf subscriptions and 30 CD-ROM/diskette-subscriptions. In 1999 514 monographs were acquired and 850 journal volumes were bound.

Interloan

The GBF-library uses electronic document delivery systems like **Subito** and **GBV-direkt** for interloan. Most of the interloan documents were received within three days. There were 5,000 interloan orders in 1999. About 60 % were processed by the library staff. 222 articles were copied for external interloan requests.

Library Information System

Bibliotheca2000 is the new library information system which has been established to replace *URICA*. There was an update to an 32-bit version in Autumn. Data conversion from *URICA* did not cause any problems. *Bibliotheca2000* is NT-server-based and runs a Centura-SQL-base. The library catalogue can be accessed by way of intranet *WebOPAC* or by client workstations in the library.

Intranet Services

The intranet services of the library have been widely extended. A digital library has been launched beneath services like lists of the online-journals and the printed journals, the *WebOPAC* for catalogue searches and a news section.

Online Journals

GBF library provides electronic access to about 80 of the subscribed journals to the staff. The HGF-libraries have merged to a consortium to make contracts with the most important scientific journal publishers for accessibility of online journals on a fulltext basis. Contracts have been signed with Academic Press and Elsevier Science. By way of cross access there are many journals accessible, which are not subscribed in printed form. The current online journals list shows about 450 subject relevant journals.

Bibliotheksinformationssystem

Das integrierte Bibliotheksinformationssystem Bibliotheca2000 wurde als Nachfolgesystem für URICA etabliert. Im Herbst erfolgte ein Update auf eine neue 32-bit-Version. Die Datenkonvertierung verlief problemlos. Bibliotheca2000 läuft auf einem NT-Server und setzt auf der Centura-SQL-Base auf. Neben den Client-Arbeitsplätzen und Benutzerkatalogen (OPACs) in der Bibliothek sind die Daten auch über das Intranet abfragbar.

Intranet der Bibliothek

Die Bibliothek hat im Berichtsjahr ein umfassendes Intranet-Angebot aufgebaut und bereitgestellt, das von den Mitarbeitern sehr gut angenommen wurde. Neben aktuellen Hinweisen und Informationen zur Bibliothek wird hier eine Liste der Online-Zeitschriften angeboten, die Zeitschriftenliste der Bibliothek steht zur Verfügung, Informationen zum elektronischen Dokumentlieferdienst Subito stehen bereit, der WebOPAC ermöglicht die Recherche in den Bibliotheksbeständen und zahlreiche Links auf bibliographische und Faktendatenbanken im Internet ermöglichen einen direkten Zugriff auf interessante Informationen im www.

Elektronische Zeitschriften

Die HGF-Bibliotheken haben sich im Berichtsjahr zu einem Konsortium zusammengeschlossen um mit den großen wissenschaftlichen Zeitschriftenverlagen Verträge über die Nutzung der Online-Ausgaben abschließen zu können. Mit Academic Press und Elsevier Science wurden inzwischen Verträge unterschrieben. Durch den Cross Access haben wir somit auch Zugriff auf zahlreiche nicht abonnierte Zeitschriften, so dass die Online-Zeitschriftenliste der Bibliothek im Intranet ca. 450 fachlich relevante Zeitschriften verzeichnet.



GBF-Forum

Am 31. August 2000 wurde nach 1 1/2 jähriger Planungs- und Bauzeit das neue FORUM der GBF eingeweiht. Die GBF verfügte seit ihrer Gründung über keine adäquaten Vorlesungsräume sowie keine Möglichkeiten wissenschaftliche Tagungen zu veranstalten. Dies ist nun durch den architektonisch interessanten Neubau möglich geworden. Das FORUM verfügt über einen großen Saal, der bis zu 300 Personen Plätzen bietet, dazu können noch ein kleiner Saal mit etwa 75 Sitzplätzen und eine ebenso große Galerie „zugeschaltet“ werden. Neben diesen 3 Räumen gibt es noch einen Seminarraum für 20 - 40 Plätze. Das Foyer kann zu Ausstellungszwecken mitbenutzt werden. Nach Vorüberlegungen war Planungsbeginn im Februar 1999. Das Architekturbüro Husemann & Wiechmann, Braunschweig, wurde nach Entscheidung durch eine Jury mit der Planung des FORUMs beauftragt. Der baulich realisierte Entwurf lag im Mai 1999 vor. Nach Abwicklung der bürokratischen Wege und erfolgter Auswahl der Firma Munte als Generalunternehmer, wurde im November 1999 mit dem Bau begonnen. Einige Dinge der Infrastruktur wurden durch den Förderverein der GBF gestiftet.



GBF-Forum

On 31 August 2000 the new GBF FORUM was inaugurated after 1 1/2 years of planning and construction. Since its foundation the GBF had not possessed adequate lecture halls and there was no possibility to realize any scientific meeting within its facilities. Now this has been overcome with this architecturally interesting new building. The FORUM possesses a big lecture hall for 300 auditors, a smaller room for approximately 75 persons as well as a gallery of the same size can be added. Beside these 3 rooms a seminar room for 20-40 persons exists. The entrance hall can be used for exhibitions. After the first discussed ideas the phase of planning started in February 1999. The finally built model was presented by the architectural office Husemann & Wiechmann, which had been selected by a jury, in May. After the bureaucratic obstacles were overcome and the firm Munte was chosen as general contractor the construction was started in November 1999. A few things important for the infrastructure were donated by the Förderverein of the GBF.



Tagungen, Kurse und Lehrveranstaltungen

Die wesentlichen Elemente der wissenschaftlichen Zusammenarbeit und des Erfahrungsaustausches zwischen Mitarbeitern der GBF und denen anderer Forschungseinrichtungen und aus der Industrie waren im Berichtszeitraum weiterhin die Durchführung von Tagungen und Kolloquien, eigene Vortragstätigkeit, Aus- und Weiterbildungsfunktionen, Lehrtätigkeit von GBF-Mitarbeitern, Kooperationsprojekte und Technologietransfer.

Die **internationale Zusammenarbeit** wurde in 1999/2000 insbesondere mit Instituten, Universitäten und Industrien aus den Ländern Argentinien, Australien, Belgien, Brasilien, Chile, China, Dänemark, Finnland, Frankreich, Großbritannien, Israel, Italien, Kanada, Mexiko, Neuseeland, Niederlande, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, Tschechien und USA durchgeführt.

Tagungen und Workshops

- 18./19. 9. 2000 Deutsch-Indischer Workshop über Tuberkulose, gefördert durch den BMBF (Leitung: Prof. Chhatwal, GBF)
- 25.-28. 9. 2000 Internationales Symposium "Bionkonversion von Nachwachsenden Rohstoffen", gefördert durch Carl Duisberg Gesellschaft und UNESCO. Eröffnung am 25.9. auf der EXPO2000 in Hannover, anschließend Fortsetzung im GBF-FORUM. Teilnehmer aus 24 Ländern (Leitung: Prof. Jonas, GBF)
- 29. 9. 2000 Workshop INCO Projekt "PHA production from sugar cane derivatives", gefördert durch EU (Leitung: Profs. Steinbüchel, Universität Münster; Jonas, GBF)

GBF-Kolloquien

- 08.02.1999 Prof. Dieter Jahn, Universität Freiburg: Enzyme und Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese
- 03.06.1999 Prof. Dr. W. Wohleben, Universität Tübingen: Analyse der Biosyntheseleistungen von Actinomyceten am Beispiel der Glykopeptidproduzenten *Amycolatopsis mediterranei* DSM 5908
- 18.11.1999 Prof. Dr. D. Geffken, Inst. für Pharmazie, Universität Hamburg: Famoxadon – ein neues Breitspektrumfungizid: Von der universitären Grundlagenforschung zur Anwendung
- 19.01.2000 Prof. Bernd Bukau, Universität Freiburg: Protein folding in the E. coli cytosol
- 21.03.2000 Prof. Dr. S. Harayama, Marine Biotechnology Institute, Kamaishi City, Iwate/Japan: Petroleum bioremediation in marine environments
- 23.03.2000 Dr. Michael Sittinger, Rheumatologie der Charité Berlin: Knorpelzelltransplantationen mit primären Chondrozyten
- 07.04.2000 Dr. V. de Lorenzo, CNB, Madrid/Spanien: Engineering soil bacteria for remediation of heavy metal pollution
- 18.05.2000 Prof. Danny Huylebroeck, University Leuven, Belgium: Functional analysis of BMP- and TGF β -signaling in the mouse
- 03.08.2000 Prof. Robert Tindle, Royal Children Hospital Brisbane, Australia: Human Papillomavirus, Cervical Cancer and Immunological Tolerance
- 15.09.2000 Prof. Solomon Victor, The Heart Institute Madras, India: Genes and God
- 18.09.2000 Dr. Volker Sandig, ProBioGen Berlin: High capacity Adenoviruses – promising gene therapy vectors with production capability
- 10.10.2000 Dr. Vijai Nair, CSIR, Trivandrum, Indien: Strategies for the synthesis of heterocycles via novel multicomponent reactions
- 19.10.2000 Prof. Wolfram Bode, MPI Martinsried: Crystal structures of blood clotting factors - interesting targets for the design of antithrombotics

Es wurden im Berichtszeitraum mehr als 60 Bereichsseminare mit Gastvorträgen gehalten.

Meetings, Courses and Lectures

The essential elements of scientific cooperation and the exchange of experience between staff of the GBF and external research institutions as well as industry were the holding of meetings and lectures, training courses, teaching by the GBF staff, cooperation projects and technology transfer.

In 1999/2000 **international cooperation** was realised with groups from institutes, universities and industries from the following countries: Argentina, Australia, Belgium, Brazil, Chile, Denmark, Finland, France, Great Britain, Israel, Italy, Canada, Mexico, New Zealand, The Netherlands, Austria, Portugal, Sweden, Switzerland, Spain, Czech Republic, and USA.

Meetings, workshops, etc.:

- 18./19. Sept 2000 German Indian Workshop on Tuberculosis, supported by the BMBF (headed by Prof. S. Chhatwal, GBF)
- 25-28 Sept. 2000 International Symposium "Bioconversion of Renewable Raw Materials", supported by Carl Duisberg Gesellschaft and UNESCO. The opening ceremony was held at EXPO2000 in Hannover on 25 September. The symposium with participants from 24 countries continued at the GBF-FORUM (headed by Prof. R. Jonas).
- 29 Sept. 2000 Workshop within the INCO-project "PHA production from sugar cane derivatives", supported by EU (headed by Profs. Steinbüchel, University Münster, and Jonas, GBF)

GBF-Colloquium

- 08 Febr 1999 Prof. Dr. D. Jahn, University Freiburg: Enzyme und Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese
- 03 June 1999 Prof. Dr. W. Wohleben, University Tübingen: Analyse der Biosyntheseleistungen von Actinomyceten am Beispiel der Glykopeptidproduzenten *Amycolatopsis mediterranei* DSM 5908
- 18 Nov 1999 Prof. Dr. D. Geffken, Inst. für Pharmazie, University Hamburg: Famoxadon – ein neues Breitspektrumfungizid: Von der universitären Grundlagenforschung zur Anwendung
- 19 Jan 2000 Prof. Bernd Bukau, University Freiburg: Protein folding in the *E. coli* cytosol
- 21 Mar 2000 Prof. Dr. S. Harayama, Marine Biotechnology Institute, Kamaishi City, Iwate/Japan: Petroleum bioremediation in marine environments
- 23 Mar 2000 Dr. Michael Sittinger, Rheumatologie der Charité Berlin: Knorpelzelltransplantationen mit primären Chondrozyten
- 7 Apr 2000 Dr. Victor de Lorenzo, CNB Madrid, Spain: Engineering soil bacteria for remediation of heavy metal pollution
- 18 May 2000 Prof. Danny Huylebroeck, University Leuven, Belgium: Functional analysis of BMP- and TGF β -signaling in the mouse
- 3 Aug 2000 Prof. Robert Tindle, Royal Children Hospital Brisbane, Australia: Human Papillomavirus, Cervical Cancer and Immunological Tolerance
- 15 Sep 2000 Prof. Solomon Victor, The Heart Institute Madras, India: Genes and God
- 18 Sep 2000 Dr. Volker Sandig, ProBioGen Berlin: High capacity Adenoviruses – promising gene therapy vectors with production capability
- 10 Oct 2000 Dr. Vijai Nair, Council of Scientific and Industrial Research Trivandrum, India: Strategies for the synthesis of heterocycles via novel multicomponent reactions
- 19 Oct 2000 Prof. Wolfram Bode, MPI Martinsried: Crystal structures of blood clotting factors – interesting targets for the design of antithrombotics

In addition, more than 60 seminars with external speakers were organised by the divisions of the GBF with topics of interest for special departments.

Tagungen und Kolloquien

Aufgrund der problematischen Raumsituation wurden in 1999 nur wenige Tagungen und Kolloquien durchgeführt. Erst mit der Inbetriebnahme des neuen **GBF-FORUMs** im September 2000 wurden Tagungen, Kolloquien und Bereichsseminare in verstärktem Maße wieder durchgeführt.

Weiterbildungskurse

International Training Programme in Biotechnology (ITP): Der 13. Kurs des "International Training Programme in Biotechnology" fand vom 6. September 1999 bis 8. Oktober 1999 in der GBF statt und stand unter dem Thema "Introduction to Industrial Biotechnology". Teilnehmer waren 20 Wissenschaftler aus Asien, Afrika und Lateinamerika. Ziel des Kurses ist es, jungen Wissenschaftlern dieser Regionen mit der biotechnologischen Forschung in Deutschland bekannt zu machen und auf diese Weise die Grundlage für Kooperationen in Forschung und Anwendung in und mit den jeweiligen Herkunftsländern zu fördern.

Der 14. Kurs im ITP ist geplant für den Zeitraum vom 23. 10. 2000 bis 8. 12. 2000.

Training in Industrial Biotechnology and Technology Transfer for Biotechnologists from ASEAN Countries ("CDG-Kurs"): 1999 fand zum ersten Mal im Rahmen eines gemeinsamen Förderprogramms der Carl Duisberg Gesellschaft (CDG), der GBF und der BioRegioN ein

Trainingsprogramm für Biotechnologen aus den ASEAN-Ländern (Thailand, Malaysia, Indonesien, Philippinen, Vietnam) an der GBF statt. 20 junge Wissenschaftler von Universitäten und aus der Industrie erhielten nach einem Intensiv-Deutschkurs eine Einführung in Moderne Biotechnologie. Der Kurs dazu wurde vom 1.-31. 5. 1999 an der GBF gehalten. Anschließend gingen die Gäste zu einem mehrmonatigen Weiterbildungs-Aufenthalt in Biotech-Industrien und Forschungslaboratorien im Raum der BioRegioN. Im Herbst 1999 erhielten sie dann noch einen 14-tägigen Intensivkurs in Technologietransfer an der GBF sowie eine Einführung in Biotech Management an der CDG.

Im Jahr 2000 startete der 2. Kurs im Rahmen dieses Förderprogramms. Vom 19.6.-14.7.2000 fand hierzu der Einführungskurs in Moderne Biotechnologie an der GBF statt.

Weitere Kurse: 3.-5. 11. 1999 Fortbildungskurs nach §15 Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) (Leitung: Dr. Grund, GBF)

Lehrveranstaltungen von GBF-Mitarbeitern

Einige der Bereichsleiter der GBF sind in gemeinsamen Berufungsverfahren mit der TU Braunschweig und der GBF berufen worden und damit in das Vorlesungsangebot der TU Braunschweig eingebunden. Eine Reihe von weiteren Wissenschaftlern der GBF, darunter viele habilitierte, halten Vorlesungen, Seminare und Praktika an der TU Braunschweig und anderen Universitäten oder Fachhochschulen ab. Im Berichtszeitraum waren dies über 30 wissenschaftliche Mitarbeiter der GBF.

Meetings and lectures

On behalf of the critical situation with regard to lecture rooms only few meetings and lectures were realised in 1999. From September 2000 after the inauguration of the **GBF-FORUM** meetings, lectures and internal seminars were held more regularly.

Courses

International Training Programme in Biotechnology (ITP): the thirteens ITP course "Introduction to Industrial and Modern Biotechnology" took place in the GBF from 6 September to 8 October 1999. Twenty scientists from Asia, Africa and Latinamerica participated. By this course those scientists should get into touch with biotechnological research in Germany and receive information which will serve for further contacts, collaborative projects between institutions of both countries in basic and applied research.

The 14th course will take place from 23 October to 8 December 2000.

Training in Industrial Biotechnology and Technology Transfer for Biotechnologists from ASEAN Countries: This training programme which was supported by a joint venture from Carl Duisberg Gesellschaft (CDG), GBF, and BioRegioN was realised for the first time in 1999. Twenty young scientists from universities and industries from Thailand,

Malaysia, Indonesia, The Philippines and Vietnam participated in a Course "Introduction to modern biotechnology" held at the GBF from 1 to 31 May 1999. Afterwards they got further training in biotech industries and research labs within the BioRegioN region. In Autumn 1999 they participated in a 2-weeks course on technology transfer in the GBF and also received instructions on biotech management at the CDG.

The 2nd course in this programme started in 2000. The part "Introduction to modern biotechnology" was held at GBF from 19 June to 14 July 2000.

Further Courses: 3-5 November 1999: Advanced training course "Gene technology - safety decree" (GenTSV) (headed by Dr.Grund)

Teaching Engagements by GBF Employees

Several of the division heads at GBF were nominated in a joint appointment arrangement between the Technical University of Braunschweig and the GBF and, therefore, are involved in giving lectures at the TU Braunschweig. In addition, other GBF scientists give lectures and/or hold practicals at the TU Braunschweig and other universities or technical colleges. During the reported period more than 30 scientific employees were involved in those teaching engagements.



Technologietransfer, Lizenzen und Patente

Technologietransfer | *Technology Transfer*: Dr. D. Lobas, C. Schrader

Recht und Lizenzen | *Legal Affairs and Licenses*: Dr. C. Kügler-Walkemeyer

Patente | *Patents*: D. Meseke

Organisation

Die Bearbeitung der Patente ist in der GBF der administrativen Geschäftsführung, die Bearbeitung der Technologietransferprojekte der wissenschaftlich-technischen Geschäftsführung zugeordnet. Dabei ist in der Abteilung Recht und Lizenzen eine Juristin (0,3 Stellen) und in der Patentstelle ein Sachbearbeiterin (0,3 Stellen) beschäftigt, im Bereich Technologietransfer wird ein Wissenschaftler (0,5 Stellen) und eine Sachbearbeiterin (0,5 Stellen) eingesetzt. Ein TT-Fonds in Höhe von ca. 600 TDM steht für die Abwicklung von TT-Projekten zur Verfügung.

Die Abteilung Recht und Lizenzen, die Patentstelle sowie die Stabsstelle Technologietransfer unterstützen die Wissenschaftler der GBF organisatorisch und finanziell bei Patentanmeldungen und Patentverwertung. Nach Eingang der Erfindungsmeldung wird die Erfindung, sofern die Patentfähigkeit und -würdigkeit befürwortet werden kann, durch die Geschäftsführung in Anspruch genommen und an ein externes Patentanwaltsbüro zur Anmeldung beim Patentamt weitergeleitet. Die Patentverwertung erfolgt teilweise in Zusammenarbeit mit externen Industrieberatern, die auch als Ansprechpartner für die Erfinder bereitstehen.

Aufgaben

In der GBF besteht ein verstärktes Interesse an der Entwicklung innovativer Produkte, Verfahren und Dienstleistungen in der Kooperation mit industriellen Partnern. Ziel der GBF ist es, die im Rahmen der Forschungsleistung erbrachten Ergebnisse im Zuge des Technologietransfers zeitnah

und effektiv in die Anwendung zu bringen. Dabei bestehen in der GBF drei Ansätze mit gleicher Priorität:

- Service und Dienstleistung im Rahmen von Industriekooperationen
- Lizenzvergabe
- Ausgründung von Firmen

Allen Ansätzen liegt eine Sicherung des Know-how's zu Grunde. Diese erfolgt in der Regel im Rahmen von Patenten, die dann im Zuge des Technologietransfers lizenziert werden.

Auch im Jahr 1999 konnte wieder eine Steigerung der Einnahmen der GBF aus Industriekooperationen und Lizenzen erzielt werden, was die Richtigkeit dieses Konzepts beweist. Ferner ist eine wachsende Zahl von Aus- und Neugründungen in der GBF und deren Umfeld zu beobachten. Zunehmend siedeln sich auch externe BioTech-Firmen auf dem Campus der GBF oder dem angrenzenden städtischen BioTec-Park Braunschweig an, was zu einer zusätzlichen Attraktivitätssteigerung des Standorts führt.

Die GBF verstärkt derzeit ihre Aktivitäten zur Umsetzung von Ergebnissen der Forschung in die Wirtschaft. Es wird ein direktes Patent- und Technologiemarketing aufgebaut, um so über Firmenbesuche, Internet, Messen und Ausstellungen geeignete Technologienehmer zu finden. Zunehmend wichtiger wird dabei auch die Nutzung von branchenspezifischen Internetportalen.

Im Pharma- und Gesundheitsbereich wurde gezeigt, dass die in der GBF vorhandenen GMP-Kapazitäten einen wichtigen Beitrag zur Kooperation mit der Industrie bilden. Neben klinisch relevanten Eigenentwicklungen hat sich die GBF als wichtiger Partner für die Industrie bei Verfahrensentwicklungen unter GMP-Bedingungen erwiesen. Die Beteiligung der GBF an der IBA Biologics GmbH ist ein Schritt zur Loslösung dieser Aktivitäten von der GBF und Überführung in den kommerziellen Bereich.

Technology Transfer, Licences and Patents

Organization

Patents are dealt with at GBF by the administrative management, technology transfer projects are handled by the scientific and technical management. The Legal Affairs and Licences department employs one lawyer and the Patents department one official, while one scientist and one official are employed at the Technology Transfer department. A technology transfer fund to the amount of approx. TDM 600 is available for handling TT projects.

The above three departments assist the scientists at GBF organizationally and financially in matters of patent application and patent exploitation. Upon receipt of the report on an invention, provided that the invention is deemed patentable and worth patenting, it is claimed by the management and passed on to an external patent lawyer for application with the patent office. In some cases, patents are exploited in cooperation with external industrial consultants as contacts for the inventors.

Tasks

The GBF is increasingly interested in the development of innovative products, processes and services in cooperation with industrial partners. The aim is to rapidly and effectively apply the research results obtained by means of technology transfer. There are three approaches with the same priority at GBF:

- services within the framework of industrial cooperations
- granting licences
- establishing spin-out companies.

All approaches are based on safeguarding the know-how involved. This takes place, as a rule, by means of patents for which licences are then granted within the framework of technology transfer.

In 1999 it was again possible to increase GBF's revenues from industrial cooperations and licences, which confirms the appropriateness of this procedure. Moreover, a growing number of spin-out and start-up companies at GBF and in its vicinity may be observed. To an increasing extent, external biotech companies are also establishing themselves on the GBF campus or in the adjacent municipal BioTec Park Braunschweig, which additionally enhances the site's attractiveness.

GBF is currently intensifying its activities for the practical application of research results in industry. A direct patent and technology marketing concept is being built up in order to find suitable technology licensees through company visits, the Internet, trade fairs and exhibitions. In this connection, the utilization of sector-specific Internet portals is also becoming increasingly important.

In the pharmaceuticals and health sector it has been demonstrated that the GMP capacities available at GBF make an important contribution to cooperation with industry. Apart from clinically relevant in-house developments the GBF has also proved to be an important partner for industry in process developments under GMP conditions. GBF's participation in IBA Biologics GmbH is a step towards detaching these activities from GBF and transferring them to commercialization.

Erlöse aus Drittmitteln

Die Drittmittelerlöse der GBF konnten auch im Jahr 1999 wieder gesteigert werden. So wurden insgesamt rund

20,25 Mio DM erwirtschaftet. Diese Summe entspricht in etwa einem Drittel der Zuwendungen, die der GBF seitens Bund und Land gegeben wurden.

Erlöse aus Drittmitteln 1999

	1997	1998	1999
F&W-Tätigkeit			
F&E-Vorhaben/F&E-Aufträge	3.177 TDM	3.784 TDM	4.756 TDM
Lizenzverträge	616 TDM	1.050 TDM	1.275 TDM
Summe	3.793 TDM	4.834 TDM	6.031 TDM
Erlöse aus dem Infrastrukturbereich	k.A.	1.168 TDM	1.395 TDM
Erlöse aus nationaler Quelle	k.A.	8.174 TDM	9.003 TDM
Erlöse aus dem Ausland/supranationale Einrichtungen	k.A.	3.106 TDM	3.820 TDM
Erlöse/Drittmittel insgesamt	15.000 TDM	17.282 TDM	20.249 TDM

Patente

Im Berichtszeitraum 1999 wurden von der GBF 18 Basis-Patente neu angemeldet. 77 Patente basierend auf 20 Basisanmeldungen wurden erteilt. Die Aufschlüsselung nach inländischen und ausländischen Schutzrechten sowie EPA und PCT Anmeldungen sind aus der folgenden Tabelle ersichtlich. Aufgrund der ungewöhnlich hohen Patentierungsaktivitäten

der GBF im Jahr 1999 ist das Verhältnis der Einnahmen aus Lizenzen zu den Ausgaben für die Patenthaltung im Berichtszeitraum nahezu ausgeglichen. Den Ausgaben in Höhe von 1.293 TDM standen Lizezeinnahmen in Höhe von 1.275 TDM gegenüber. Dieses Ergebnis entspricht dennoch einer Steigerung der Einnahmen von rund 21,5 %.

Patentsituation der GBF 1999

	Summe	Inland	Ausland			
			EPA	PCT	USA	Japan
Angemeldete Patente	22	18	14	10	11	10
Erteilte Patente	2	0	24	0	22	9
Bestand gehaltener (erteilter) Patente	77	20				
Bestand gehaltener Patentanmeldungen	603	102	64	41	60	61
Summe aller Schutzrechte	680	122				

Patentstatistik

Schutzrechte	1997*	1998	1999
Inland	45	103	122
Ausland	340	446	558
Summe	385	549	680

*unterschiedliche Zählweise bei internationalen Mehrfachanmeldungen

Proceeds from Third-Party Funds

The GBF's proceeds from third-party funds were again increased in 1999 with earnings

totalling roughly DM 20.25 million. This sum approximately corresponds to one third of the grants received from the federal and state governments.

Proceeds from Third-Party Funds 1997-1999

	1997	1998	1999
<i>R&D Activities</i>			
<i>R&D Projects/R&D Contracts</i>	3.177 TDM	3.784 TDM	4.756 TDM
<i>Licence Contracts</i>	616 TDM	1.050 TDM	1.275 TDM
Sum	3.793 TDM	4.834 TDM	6.031 TDM
<i>Proceeds from the Infrastructure</i>	n.l.	1.168 TDM	1.395 TDM
<i>Proceeds from National Courses</i>	n.l.	8.174 TDM	9.003 TDM
<i>Proceeds from Exterior/Supranational Organisations</i>	n.l.	3.106 TDM	3.820 TDM
Total Proceeds from Third-Party Funds	15.000 TDM	17.282 TDM	20.249 TDM

Patents

In the 1999 reporting period the GBF applied for 18 new basic patents. 77 patents based on 20 basic applications were granted. The breakdown according to domestic and foreign patent rights as well as EPA and PCT applications can be seen from the table below. Due to the unusually high patenting

activities of GBF in 1999, the ratio of receipts from licences to expenditure on holding patents in the reporting period is nearly balanced. The expenditure to the amount of TDM 1,293 compares with income from licences totalling TDM 1,275. This result nevertheless corresponds to an income increase of roughly 21.5 %.

Patent Situation at the GBF 1999

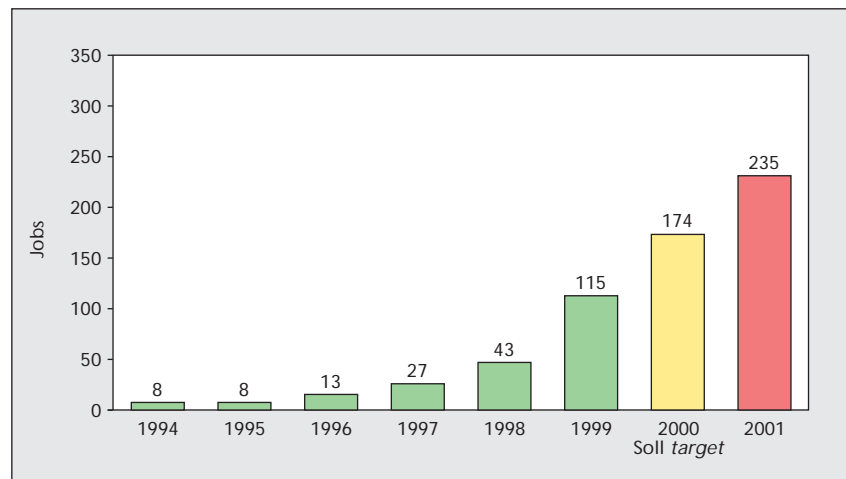
	Number	Germany	Exterior			
			EPA	PCT	USA	Japan
Patent Applications	22	18	14	10	11	10
Patent Granted	2	0	24	0	22	9
Holdings of Patents Granted	77	20				
Holdings of Patents Applications	603	102	64	41	60	61
Total Number	680	122				

Patent Statistics

Patents	1997	1998	1999
Germany	45	103	122
Exterior	340	446	558
Total Number	385	549	680

Lizenz- und Know-how-
Verträge

	1997	1998	1999
Einnahmen	616 TDM	1.050 TDM	1.275 TDM
Aufwendungen	157 TDM	710 TDM	1.293 TDM



Generierte Arbeitsplätze in den Gründerfirmen bei der GBF und DSMZ.

Generated jobs in the Start-up Companies at the GBF and DSMZ.

Ausgründungen

Ausgründungen stellen eine effektive Art des Technologietransfers dar, da die ausgründenden Wissenschaftler in aller Regel das Know-how aus ihrer wissenschaftlichen Tätigkeit als Basis der Unternehmensgründung einsetzen. Die GBF unterstützt dieses Anliegen und schließt in diesem Falle Lizenzverträge über die Nutzung der Schutzrechte mit den jungen Firmen.

Im Jahr 1999 kam es zu insgesamt vier Ausgründungen aus der GBF:

- RELIA Tech GmbH
- Lionex GmbH
- IBA Biologics GmbH
- GlycoThera GbR.

Bei der Unternehmensgründung IBA Biologics beteiligte sich die GBF erstmalig selbst an einer Unternehmensgründung mit Dritten. Die GBF und das Institut für Bioanalytik haben im September 1999 ein Joint Venture zur gemeinsamen Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Medizin gegründet. Das Joint Venture trägt den Namen IBA Biologics GmbH. Die neue Firma hat im Berichtsjahr seine Geschäftstätigkeit nur eingeschränkt aufgenommen, um künftig seine Aktivitäten auf dem GBF-BioTech-Campus zu entfalten. Die IBA Biologics GmbH wird sich vor allem als Dienstleister mit der Entwicklung von

pharmazeutischen Wirkstoffen, deren routinemäßiger Produktion sowie Vermarktung beschäftigen.

Firmen auf dem GBF BioTec-Campus

Neben diesen Firmen wächst das von der GBF initiierte BioTec-Gründerzentrum, das gemeinsam mit der Technologiepark Braunschweig GmbH betrieben wird. Parallel dazu unterstützt die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Gründer durch Vermietung von Räumen. Zum Jahresende 1999 waren 16 Firmen auf dem GBF-Campus aktiv. In diesen wurden insgesamt 130 neue Arbeitsplätze geschaffen. Die GBF stellte dazu 1540 qm ungenutzte (und unbenutzbare) Fläche zur Verfügung, die mit 450 TDM Fördermitteln des Niedersächsischen Ministeriums für Wirtschaft, Technologie und Verkehr erschlossen wurden. Die DSMZ steuerte weitere 1180 qm zur Vermietung an Unternehmensgründer bei.

Nach der Zurverfügungstellung der umzubauenden Flächen in der GBF-Gründeretage sind die räumlichen Möglichkeiten der GBF zur Unterstützung von Gründern erschöpft. Vor ca. 2 Jahren wurden deshalb Gespräche mit der Stadt Braunschweig aufgenommen, um die Planungen zur Errichtung eines BioTec-Parks auf den an die GBF angrenzenden Liegenschaften wieder aufzunehmen.

Nach Klärung der öffentlichen Fördermöglichkeiten ist nun im Rahmen einer Projektentwicklungsphase eine Bedarfserhebung im Gange. Im Spätsommer 2000 soll mit dem Bau eines öffentlich geförderten Labor- und Bürogebäudes mit 4000 qm Fläche angrenzend an die GBF begonnen werden, das als Keimzelle zur weiteren Entwicklung des BioTec-Parks Braunschweig dienen soll. Parallel dazu soll das Gelände durch den Bau der Straße „Am Schanzenkamp“ voll erschlossen werden.

	1997	1998	1999
Proceeds	616 TDM	1.050 TDM	1.275 TDM
Expenditure	157 TDM	710 TDM	1.293 TDM

Spin-Out Companies

Spin-out companies are an effective method of technology transfer since the scientists involved generally use the know-how from their scientific activity as a basis for founding an enterprise. The GBF supports this procedure and concludes licensing agreements on the utilization of patents with these young companies.

In 1999 four GBF spin-out companies were established in total:

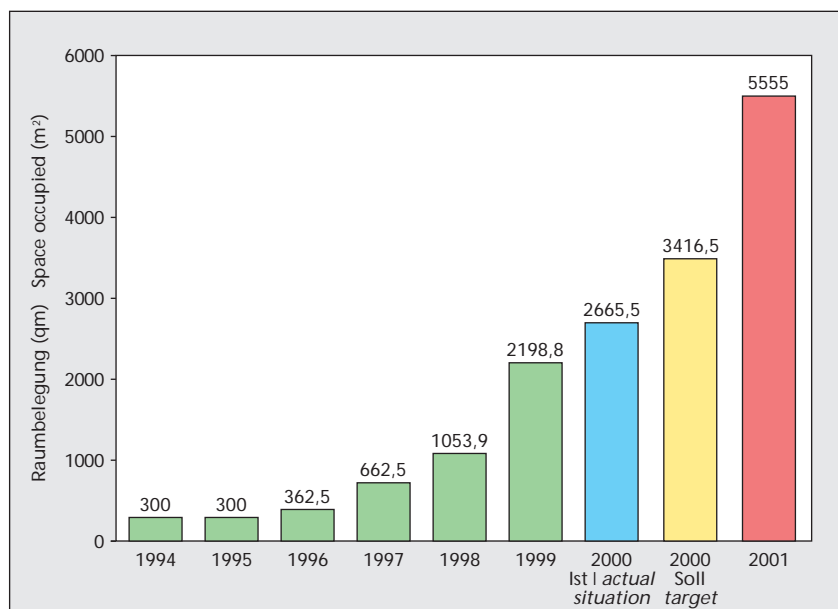
- RELIAtech GmbH
- Lionex GmbH
- IBA Biologics GmbH
- GlycoThera GbR.

In setting up IBA Biologics the GBF for the first time participated itself in the foundation of a company with third parties. The GBF and the Institute of Bioanalysis established a joint venture for the joint development of new active substances for medicine in September 1999. The joint venture's name is IBA Biologics GmbH. The new company only took up its business activities on a limited scale in the year under review in order to further develop its activities on the GBF's BioTech campus in the future.

IBA Biologics GmbH will above all provide services in the development of active pharmaceutical ingredients, their routine production and marketing.

Firms on the GBF BioTec Campus

In addition to the above firms, the BioTec Founder Centre initiated by GBF and operated jointly with Technologiepark Braunschweig GmbH is continuously growing. In parallel, founders are supported by the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) which rents out rooms. By the end of 1999 sixteen companies were active on the GBF campus creating a total of 130 new jobs. The GBF made 1540 m² unused (and unusable) space available, which was developed with funds to the amount of



TDM 450 from the Lower Saxon Ministry of Economics, Technology and Transport. The DSMZ contributed another 1180 m² to be let to company founders.

After having made available floor space to be modified on the GBF's founder floor, the GBF's assistance in terms of space for founders is exhausted. Approximately two years ago, discussions were therefore commenced with the city of Braunschweig to restart planning for the construction of a BioTec Park adjacent to GBF.

After clarification of the possibilities of public funding, an assessment of demand is now under way within the framework of a project development phase. In late summer 2000 a publicly funded laboratory and office building with 4000 m² floor space will be constructed adjacent to GBF to serve as a nucleus for the further development of the Braunschweig BioTec Park. In parallel, the area is to be fully developed by constructing the road "Am Schanzenkamp".

Raumbelegung durch
Gründerfirmen in der GBF
und DSMZ.

Space occupied by Start-up
Companies in buildings of
GBF and DSMZ.

Der Bedarf an Laborfläche für Unternehmen im Umfeld der GBF für das Jahr 1999 wurde wesentlich unterschätzt. Durch die schnelle Expansion von Firmen auf dem BioTec-Campus der GBF müssen die Planungsdaten kontinuierlich nach oben korrigiert werden. Im Jahr 2000 wird

somit ein Bedarf von 3500 qm bestehen, die für das Jahr 2005 angedachten 7000 qm werden wohl bereits im Jahr 2001 erschlossen und belegt sein. Für das Jahr 2000 wird der Personalstand in den Firmen auf dem GBF-BioTec-Campus bei rund 200 liegen.

Gründung	Ansiedlung (A) Ausgründung (G)	Name	Geschäftsführer/ Ansprechpartner
vor 1990	A	OMNILAB – LABORZENTRUM GmbH&Co. KG	M. Klink/H. Gieseke
1992	A	Hartmann Analytic GmbH	Dr. Ursula Hartmann
1992	G	TRACE Biotech AG	Dr. Wolfgang Künnecke
1992	G	ASA Spezialenzyme GmbH	Dr. Arno Cordes
10.10.1996	G	Bioinformation Systems e.V.	Dr. Edgar Wingender
01.10.1997	G	BIOBASE Biologische Datenbanken GmbH	Dipl. Chem. Holger Karas
01.10.1997	G	Cosmix molecular biologicals GmbH	Prof. Dr. John Collins
1997	A	SciNet Bioproducts GmbH	Dr. Thomas Wagner
10.04.1998	G	AIMS Scientific Products GmbH	Dr. Norbert Zander
10.07.1999	G	RELIATech GmbH	Dr. Herbert Weich
10.07.1999	G	Lionex GmbH	Dr. Mahavir Singh
01.10.1999	A	Affymetrix Inc. Büro Deutschland	Dr. Bernd Haase
01.09.1999	G	IBA Biologics GmbH	Dr. Herbert Stadler
01.12.1999	A	Voxna BioMed GbR	Herr Christian Hehn
01.12.1999	A	AMODIA Bioservices GmbH	Dr. Ulrich Krause
01.12.1999	G	Glyco Thera GbR	Dr. Harald Conradt

Kooperationsvorhaben

Die GBF hat im Berichtsjahr 1999 Projekte aus insgesamt 85 F&E-Vereinbarungen bearbeitet. Zusätzlich wurden Einnahmen aus 32 Lizenzverträgen erwirtschaftet, und die GBF beteiligte sich an sechs Strategie-fondprojekten und hat damit verteilt über

die Laufzeit des Strategiefonds insgesamt 3.147.550,00 DM eingeworben. Ferner beteiligt sich die GBF am BMBF-Leitprojekt: „Verbund Validierter Lead-Target-Systeme: Miniaturisierte, hoch-parallele Synthese neuer strukturdiverser Wirkstoffrepertoires“.

The demand for laboratory space by companies in the vicinity of GBF in 1999 was substantially underestimated. Due to the rapid expansion of firms on GBF's BioTec Campus the planning data must be continuously corrected upwards. In the year 2000, there

will thus be a demand for 3500 m², and the 7000 m² envisaged for 2005 will probably already be developed and occupied in 2001. The staffing level in the firms on the GBF BioTec Campus will be in the range of 200 in the year 2000.

Foundation	Settling (A) Spin-Out (G)	Name	Manager/Contact
Before 1990	A	OMNILAB – LABORZENTRUM GmbH&Co. KG	M. Klink/H. Gieseke
1992	A	Hartmann Analytic GmbH	Dr. Ursula Hartmann
1992	G	TRACE Biotech AG	Dr. Wolfgang Künnecke
1992	G	ASA Spezialenzyme GmbH	Dr. Arno Cordes
10 Oct 1996	G	Bioinformation Systems e.V.	Dr. Edgar Wingender
01 Oct 1997	G	BIOBASE Biologische Datenbanken GmbH	Dipl. Chem. Holger Karas
01 Oct 1997	G	Cosmix molecular biologicals GmbH	Prof. Dr. John Collins
1997	A	SciNet Bioproducts GmbH	Dr. Thomas Wagner
10 Apr 1998	G	AIMS Scientific Products GmbH	Dr. Norbert Zander
10 July 1999	G	RELIATech GmbH	Dr. Herbert Weich
10 July 1999	G	Lionex GmbH	Dr. Mahavir Singh
01 Oct 1999	A	Affymetrix Inc. Büro Deutschland	Dr. Bernd Haase
01 Sept 1999	G	IBA Biologics GmbH	Dr. Herbert Stadler
01 Dec 1999	A	Voxna BioMed GbR	Herr Christian Hehn
01 Dec 1999	A	AMODIA Bioservices GmbH	Dr. Ulrich Krause
01 Dec 1999	G	Glyco Thera GbR	Dr. Harald Conradt

Cooperation Projects

The GBF handled projects under a total of 85 R&D agreements in 1999. In addition, royalties from 32 licensing agreements were obtained and the GBF participated in six strategy fund projects and has thus acquired a total of DM 3,147,550.00 distributed over

the period of the strategy fund. Moreover, the GBF is taking part in the BMBF lead project: "Combination of Validated Lead-Target Systems: Miniaturized, massively parallel synthesis of new structurally diverse active ingredient repertoires".

Wissenschaftliche Bilanz in Zahlen | *Scientific Balance in Figures*

Im folgenden sind verschiedene Ergebnisse aus dem F&E-Bereich der GBF als Wissenschaftliche Bilanz zur besseren Übersicht seit 1997 tabellarisch aufgeführt: Veröffentlichungen und erfolgreich durchgeführte Diplom- und Doktorarbeiten.

Various results from R&D of the GBF are presented here as a scientific balance for the years 1997-1999/2000.

Veröffentlichungen | *Publications* 1997-1999

Jahr <i>Year</i>	Index. Zeitschriften <i>Index journals</i>	Nicht index. Zeitschriften <i>Non Index journals</i>	Bücher, Proceedings <i>Books, proceedings</i>	Sonstige Ver- öffentlichungen <i>Other publications</i>	Veröffentlichungen insgesamt <i>Total number of publications</i>
1997	157	6	30	9	202
1998	188	14	38	8	248
1999	226	7	41	–	274
1997-99	571	27	109	17	724

Diplomarbeiten, Dissertationen, Habilitationen | *Master thesis, PhD thesis, Habilitations 1997-2000*

Diplomarbeiten <i>Master thesis</i>	mit Aus- zeichnung <i>with distinction</i>	sehr gut <i>very good</i>	gut <i>good</i>	befriedigend <i>satisfactory</i>	ohne Notenangabe <i>Result not available</i>	Summe <i>Total Number</i>
1997		9	3		5	17
1998		18	3		3	24
1999/2000		24	4		-	28
insgesamt total		51	10		8	69
Dissertationen <i>Dissertations</i>						
1997	2	9	1		1	13
1998	3	12	3		3	21
1999/2000	8	20	3	1	-	32
insgesamt total	13	41	7	1	4	66

***Vier Wissenschaftler/innen der GBF habilitierten sich seit 1997: einer 1997, zwei 1998 und einer 1999.**

**Four GBF scientists concluded their habilitations since 1997: one in 1997, two in 1998 and one in 1999.*

Übersicht über an der GBF angefertigte Diplomarbeiten, Dissertationen und Habilitationen*

Overview of Master thesis, PhD thesis and habilitations that were elaborated at the GBF during the years 1997-2000.

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit

Leiter | *Leader*: Th. Gazlig, R. Radloff

Mitarbeiter | *Members*: R. Barthel, A. Koch

Die Presse- und Öffentlichkeitsarbeit wurde 1999/2000 konsequent weiterentwickelt und ausgebaut. So wurde ein zeitgemäßes und einheitliches äußeres Erscheinungsbild der GBF erarbeitet und die Kontakte mit den Medien intensiviert. Die interne Kommunikation verstärkt eine neue Hauszeitung: die GBFnews. Verantwortlich für die Inhalte ist ein Redaktionsteam mit Vertretern aus verschiedenen Gruppen der GBF.

Zukunftsorientiert und praktisch kommunizieren

Grundlage des neuen visuellen Erscheinungsbildes der GBF – des Corporate Designs – ist ein zukunftsorientierter Auftritt. Dabei geht es um mehr als nur um Äußerlichkeiten. Denn Corporate Design verrät viel über die Persönlichkeit. Seriosität und Kompetenz, Wissenschaftlichkeit und Dynamik, all das schwingt mit auf jeder Visitenkarte, mit jedem Briefbogen, in jedem Ergebnisbericht.

Die Gesellschaft für Biotechnologische Forschung ist ein High-Tech-Forschungsinstitut mit weltweiter Reputation. Und dies sollte auch durch das Erscheinungsbild dokumentiert sein. Die Konkurrenz unter den Forschungseinrichtungen nimmt zu, ein Grund mehr, aufzufallen. Aber das bisherige Erscheinungsbild ließ sich nicht mit dem Anspruch vereinbaren, State-of-the-art zu sein. Es bestand Handlungsbedarf.

Objektiv und kompetent unterstützte diese Arbeit die Braunschweiger Agentur „wir design“. Sie zählt seit Jahren zu den renommiertesten deutschen Design-Agenturen. Auf Seiten der GBF wurde eine Projektgruppe ins Leben gerufen, besetzt mit Vertretern aus Wissenschaft und Verwaltung. Sie hat die Agenturarbeit begleitet und die Rahmenbedingungen für das neue Corporate Design entwickelt.

Der neue Auftritt der GBF

Das Logo ist das wichtigste Element innerhalb eines visuellen Auftritts, wird es doch meist zuerst wahrgenommen. Der erste Eindruck muss stimmen, denn eine zweite Chance gibt es meist nicht. Das neue Logo symbolisiert analytisches Denken vom Kleinen zum Großen, vom Molekül zum Organismus. Es zeigt also mithin die Ar-

beitsweise der GBF und ihr wissenschaftliches Selbstverständnis. Unterstützt wird das Logo von zwei Schriften. Frutiger und Giovanni Book sorgen für einen reizvollen Kontrast innerhalb der Kommunikation: wissenschaftlich und objektiv die eine, warm und lebendig die andere. Die Farben – ein warmes Rot und ein dunkles Türkisblau – verkörpern die beiden Schwerpunkte der GBF, Gesundheit und Umwelt.

Geändert hat sich auch die englische Bezeichnung der GBF. Sie lautet jetzt „German Research Centre for Biotechnology“. Der neue Zusatz „German“ anstelle des bisherigen „National“ ist aussagekräftiger, da so zugleich auf den Standort Deutschland aufmerksam gemacht wird.

Den Dialog mit den Medien führen

Neben der Entwicklung des neuen Corporate Designs war es ein weiterer Erfolg, die Präsenz der GBF in den Medien qualitativ und quantitativ zu steigern. Insbesondere in der regionalen Presse- und Rundfunklandschaft wurde über die GBF regelmäßig berichtet. Zunehmend war die GBF auch überregional stärker präsent. Ausdruck hierfür waren zum Beispiel längere Fernsehbeiträge auf ARTE und im ZDF-Gesundheitsmagazin Praxis. Weitere umfangreiche Berichte erschienen unter anderem zu folgenden Themen: Genomforschung (insbesondere zur Entschlüsselung des Chromosoms 21), BioTec-Park und Existenzgründungen, Joint Venture IBA Biologics, Quecksilberprojekt, Biotechnologie im Umweltschutz, Biologische Ersatzsysteme für erkrankte Organe, therapeutische Impfstoffe, Verleihung der Inhoffen-Medaille und Messepräsentationen.

Press and Public Relations

In 1999/2000 our Press and Public Relations Department has continued to develop and extended its activities. A modern, consistent corporate design of the GBF has been elaborated and contacts with the media intensified. Internal communication is now supported by a new house organ, GBFnews, with an editorial team responsible for content that includes representatives from the GBF's different working groups.

Forward-looking and simplified communication

The GBF's new visual image – its corporate design – is based on a forward-looking self-presentation. Here we are dealing not simply with outward appearances: corporate design communicates much about an organisation's personality, seriousness, competence, science and dynamics, all of which must somehow be infused into each visiting card, letterhead and Annual Report.

The GBF is a high-tech research establishment with a global reputation, which should find expression in the image that it conveys. Competition among research institutes is increasing, which is another reason for the need to stand out. Up until now the GBF's image has not reflected its true state-of-the-art status. This was something that needed to be looked at and rectified.

Objective and competent support in achieving this task was obtained from "wir design" in Braunschweig, one of Germany's most renowned design agencies. For its own part, the GBF called into life a project group made up of representatives from both its scientific and administrative staff, which accompanied the agency's work and developed a framework for the new corporate design.

The GBF's new self-presentation

The logo is the most important element of a visual presentation, being the first thing that one sees; and it is well-known that first impressions are what count most. The new logo symbolises analytical thinking: from small to large, i. e. from molecule to organism, which is the way that the GBF actually works, and how it sees itself from a scientific point of view. The logo is supported by two typefaces. Frutiger and Giovanni Book provide a charming contrast in the establishment's written communications, one for the scientific and objective, the other being warm and vivacious. The colours - warm red and dark turquoise blue - stand for the areas focused on at the GBF, namely health and environment.

The English name for the GBF has also been changed, to "German Research Centre for Biotechnology". Replacing "National" with "German" makes the name more specific and emphasises the establishments location in Germany.

Cultivating dialogue with the media

Apart from developing a new corporate design, success has also been achieved in increasing the GBF's exposure in the media - both quantitatively and qualitatively. Particularly the local press and radio have regularly reported on activities at the GBF, while there has also been increased coverage in the national media. For example, lengthy TV programmes were broadcast by the Franco-German channel ARTE and in the health magazine (ZDF-Gesundheitsmagazin Praxis) of one of Germany's two main national channels. Other comprehensive reports appeared on subjects that included genome research (in particular regarding the decoding of chromosome 21), BioTec Park and the founding new businesses, the joint venture with IBA Biologics, the mercury project, biotechnology and environmental protection, biological replacement systems for diseased organs, therapeutic vaccines, awarding of the Inhoffen Medal and presentations at various exhibitions.

Leistungen präsentieren

Auf der Hannover Messe und der Biotop 99 in Brüssel zeigte die GBF ein einfaches und umweltfreundliches Verfahren zur Entfernung giftiger Quecksilbersalze aus Abwässern. Präsentiert wurde das Modell eines Bioreaktors, der das Herzstück der Anlage ist, die sich nach erfolgreichem Probetrieb jetzt im Industrieinsatz in der tschechischen Republik befindet.

Auf der BIOTECHNICA 99 präsentierte die GBF darüber hinaus Forschungsarbeiten zur Genimmuntherapie gegen Hautkrebs, zum „Tissue Engineering“, und vorgestellt wurden auch Leistungen zur GMP-Verfahrensentwicklung und die IBA Biologics GmbH, das Joint Venture der GBF mit dem Göttinger Unternehmen IBA GmbH.

Dass sich die moderne Biotechnologie immer mehr zu einem wichtigen Werkzeug entwickelt, um Umweltbelastungen zu vermeiden oder aufzufinden und zu beseitigen, war das Fazit der Fachtagung „Biotechnologie im Umweltschutz“. Die Tagung fand in Munster statt und wurde unter maßgeblicher Beteiligung der GBF organisiert.

Auf dem Neujahrsempfang der Industrie- und Handelskammer Braunschweig stellte die GBF „Epothilon“ als eine von sieben aussichtsreichen Erfindungen vor. Zu den Themen Technologietransfer und Existenzgründerzentrum präsentierte sich die GBF auf dem Biotechnologie-Forum der TU Braunschweig vor potenziellen Unternehmensgründern.

Ein neues Testverfahren zur Suche nach biologisch aktiven Molekülen für Diagnostik und Therapie und aktuelle Forschungsergebnisse aus der Umweltbiotechnologie zeigte die GBF auf der ACHEMA 2000 in Frankfurt. Die Forschungsprojekte zur Sanierung von schadstoffbelasteten Grund- und Oberflächenwassern im Raum Bitterfeld und in der Lausitz präsentierte die GBF gemeinsam mit dem Umweltforschungszentrum Leipzig (UFZ). Weitere Themen waren die Produktion von Wirkstoffen für klinische Anwendungen und die Reinigung von quecksilberbelasteten Abwässern.

Auf dem EXPO-Gelände fand vom 11. bis 13. Juli im Convention Center eine internationale Wissenschaftsveranstaltung – der Global Dialogue – statt, auf der in Vorträgen, Diskussionsrunden und in öffentlichen Konferenzen Wissenschaftler mit anderen Wissenschaftlern und Nicht-Wissenschaftlern in Diskurs traten. Als eines von vier Helmholtz-Zentren war die GBF bei dieser Veranstaltung Teil des Ausstellungsbereichs, dessen Motto „Forschung zum Anfassen“ war. Besucher konnten am GBF-Stand die Demonstrationssäule des Quecksilberprojektes betrachten und sich durch den begleitenden Film oder persönlich durch eine Standbetreuung die Wirkungsweise des Bioreaktors erklären lassen. Sitzkissen entpuppten sich beim Daraufsetzen als erzählende Riesenbakterien, mit Hilfe derer unterschiedliche Typen von Bakterien (an bzw. mit denen an der GBF geforscht wird) vorgestellt wurden.

Rund 170 GBF-Mitarbeiter nutzten die Gelegenheit, den Global Dialogue und die Expo zu besuchen.

Mit fast 50 Besuchergruppen war auch 1999 der Wunsch vieler regionaler und überregionaler Interessengruppen ungebrochen, sich vor Ort über die GBF zu informieren. Insgesamt waren es über 500 Besucher: Das Spektrum reichte von

Ministerpräsident Sigmar Gabriel (2. von links) zu Besuch auf dem GBF-Campus, hier bei BIOBASE in der Diskussion mit Dr. Edgar Wingender, Dr. Georg Frischmann und Gernot Tartsch (SPD).

Lower Saxony's prime minister (Ministerpräsident), Sigmar Gabriel (2nd from the left) during his visit to the GBF campus; here at BIOBASE, in conversation with Dr Edgar Wingender, Dr Georg Frischmann and Gernot Tartsch (SPD).



Presenting our achievements

At the Hannover Industrial Fair and Biotop 99 in Brussels the GBF presented a simple, environmentally friendly method of removing toxic mercury salts from wastewater. What was shown was a model of the heart of the decontamination plant, a bioreactor which, following successful trials, is now operational on an industrial scale in the Czech Republic.

At BIOTECHNICA 99 the GBF presented its work on gene therapy applied to skin cancer, and on tissue engineering, while also presenting its achievements in GMP process development, and from the IBA Biologics GmbH, the joint venture formed by the GBF and the Göttingen company IBA Biologics GmbH.

That modern biotechnology is gaining importance in efforts to avoid environmental pollution, as well as in the detection and remediation of contamination that has already occurred, were the subjects of the conference, "Biotechnologie im Umweltschutz", in the city of Munster, which was largely organised by the GBF.

At the New Year's reception of the chamber of commerce in Braunschweig the GBF presented "epothilon" as just one of seven very promising discoveries. At the Biotechnology Forum of the Technical University of Braunschweig (TU Braunschweig), the GBF presented itself to potential new business founders, showing what it has to offer in the way of technology transfer and otherwise helping to establish a new biotech business.

A new test method in the search for biologically active molecules, for diagnostic and therapeutic purposes, as well as the results of current research in the field of environmental biotechnology, were presented by the GBF at ACHEMA 2000 in Frankfurt. Research projects aimed at decontaminating ground and surface water in the district of Bitterfeld in former East Germany was presented together with the Environmental Research Centre (Umweltforschungszentrum - UFZ), Leipzig. Other topics were the production of active substances for clinical applications, and the purification of mercury contaminated effluent.

Global Dialogue at the EXPO

At the international science event, "Global Dialogue", held in the Convention Center at the World Exhibition, EXPO 2000, in Hannover, from 11th to 13th July, scientists from different fields and non-scientists were brought together in lectures, discussion circles and public conferences for the purpose of promoting dialogue and mutual understanding. As one of four Helmholtz Centres, the GBF was involved in the exhibition side of the event, the motto of which was: "hands-on research". At the GBF's stand, visitors were able to view a demonstration column from the mercury project and have its method of operation explained by an accompanying film or personally by one of the staff. Cushions revealed themselves as giant, talking bacteria when sat on, which told of the different kinds of bacteria that scientists work with at the GBF.

About 170 GBF staff took the opportunity to visit Global Dialogue and the World Exhibition, Expo 2000.

With almost 50 groups of visitors being welcomed during the course of 1999, the desire of many regional and national interest groups to visit the GBF and inform themselves at first hand is as strong as ever. Altogether we had more than 500 visitors in 1999, the spectrum extending from representatives, from home and abroad, of other scientific establishments, to local and national politicians, members of various clubs and associations, schools and A-level classes, and students. In addition, our annual open day attracted about 1,500 local people. In 2000 the GBF has so far attracted 350 visitors, the most prominent of which was the prime minister of Lower Saxony, Sigmar Gabriel, who, together with the chairman of the SPD coalition party in Braunschweig townhall, Gernot Tartsch, informed himself at first hand about the importance of biotechnology for the state of Lower Saxony.

Vertretern wissenschaftlicher Einrichtungen aus dem In- und Ausland, aus der lokalen, Landes- oder Bundespolitik bis zu Vereinen, Verbänden, Schulklassen und Leistungskursen sowie Studierenden. Darüber hinaus lockte der traditionelle „Tag der offenen Tür“ rund 1.500 Besucher aus Braunschweig und Umgebung an. Im Jahr 2000 besuchten bisher 350 Gäste die GBF. Prominentester Besucher war Ministerpräsident Sigmar Gabriel, der sich zusammen mit dem Vorsitzenden der SPD-Ratsfraktion Braunschweigs Gernot Tartsch an der GBF über die Bedeutung der Biotechnologie für Niedersachsen informierte.

Inhoffen-Medaille und Förderpreise

Die Hans Herloff Inhoffen-Medaille wurde 1999 an Professor Dr. Dr. h.c. Carl Djerassi von der Stanford Universität, USA, verliehen. Djerassi erhielt die Auszeichnung der Technischen Universität Braunschweig und des Fördervereins der GBF im Rahmen der öffentlich gehaltenen Inhoffen-Vorlesung für seine grundlegenden Forschungen auf dem Gebiet der Steroidhormone: Djerassi gelang erstmals die Synthese oraler Empfängnisverhütungsmittel auf Basis der Steroidhormone, besser bekannt als „die Pille“.

Für seine herausragende wissenschaftliche Leistung in der Steroidchemie für die Pharmaforschung erhielt Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Wiechert, der ehemalige Forschungsdirektor der Schering AG, Berlin, im Jahr 2000 die Hans Herloff Inhoffen-Medaille.

Herausragende Doktorarbeiten wurden 1999 und 2000 mit den Förderpreisen des GBF-Fördervereins ausgezeichnet: Dr. Axel Monsees (TU Braunschweig) beschäftigte sich mit Schlüsselschritten für eine Synthese des Quinocarcins, einer Antitumor-Substanz aus dem Bakterium *Streptomyces melanovinaceus*. Dr. Dirk Schübeler (GBF) entwickelte ein Verfahren, das wesentlich zur Effizienz-Steigerung der Gentechnik beiträgt. Mit seiner Methode können beliebige Fremdgene gezielt in das Erbmaterial eingebaut werden. Dr. Birgit Stallmeyer (TU Braunschweig) erhielt die Auszeichnung für ihre Forschungsarbeiten an einer erblich bedingten Stoffwechselerkrankung, der Molybdän-Cofaktor-Defizienz.

Preisträger im Jahr 2000 sind Dr. Armin Bauer und Dr. Ursula Deiters. Dr. Armin Bauer arbeitete an der chemischen Herstellung von Epothilon, das als mögliches Krebsmittel interessant ist. Wie ein bakterieller Wirkstoff - das MALP-2 - weiße Blutkörperchen anlockt und so zum Beispiel die Wundheilung beschleunigt, konnte die Biologin Dr. Ursula Deiters in ihrer Doktorarbeit bei der Arbeitsgruppe Immunbiologie der GBF zeigen.

Neben den Förderpreisen wurden 1999 und 2000 auch der Fritz-Wagner-Preis des gleichnamigen Fonds zur Förderung der Biotechnologie an Gesina Bethe und Dr. Gerhard Kauer vergeben. Die Forschungsarbeiten von Gesina Bethe lieferten wichtige Erkenntnisse für die Behandlung von Infektionen mit dem Erreger *Streptococcus pneumoniae*. Dr. Kauer beschäftigte sich mit Automatisierungstechniken für die Genomanalyse.

Inhoffen Medal and GBF Award for young scientists (Förderpreise)

In 1999 the Inhoffen Medal was awarded to Professor Dr Dr h.c. Carl Djerassi of Stanford University, USA. Professor Djerassi received the award of the Technical University of Braunschweig and the foundation, Friends of the GBF (GBF-Förderverein) in the course of the public Inhoffen Lecture for his fundamental research in the field of steroid hormones. He was the first to succeed in synthesising an oral contraceptive based on steroid hormones - better known as the "pill". Professor Dr Dr h.c. Rudolf Wiechert, former research director at Schering AG in Berlin, received the Hans Herloff Inhoffen Medal for the year 2000 for his outstanding scientific achievements in the pharmaceutical research of steroid chemistry.

Awards of the GBF "Förderverein" for young scientists for outstanding graduate research conducted in the course of their doctoral thesis were awarded in 1999 to Dr Axel Monsees (TU Braunschweig) for his work on key steps in the synthesis of quinocarcin, an antitumour substance produced by the bacterium Streptomyces melanovinaceus, and to Dr Dirk Schübeler (GBF) for developing a method by means of which foreign genes can be accurately incorporated into the host genome, thereby significantly increasing the efficiency of genetic engineering procedures. Dr Birgit Stallmeyer (TU Braunschweig) received the award for her research into the inherited metabolic disease, Molybdenum Cofactor Deficiency. GBF Award winners for the year 2000 were Dr Armin Bauer and Dr Ursula Deiters. Dr Armin Bauer worked on the chemical synthesis of ephothilon, a substance of interest for its antitumour properties. In her doctoral thesis, carried out in the research group Immune Biology, the biologist Dr Ursula Deiters was able to demonstrate how the bacterial substance MALP-2 attracts white blood cells and, for example, is capable of increasing the speed of wound healing.



Besides the GBF Awards, in 1999 and 2000 the Fritz-Wagner Award, from the foundation of the same name, for the promotion of biotechnology, was awarded to Gesina Bethe and Dr Gerhard Kauer. The research carried out by Gesina Bethe provided important insights into the treatment of infections by the pathogenic bacterium Streptococcus pneumoniae, while the work of Dr Kauer involved automation of the techniques of genome analysis.

Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Wiechert, Dr. Armin Bauer, Dr. Ursula Deiters und Dr. Gerhard Kauer (von links).

Prof. Dr Dr h.c. Rudolf Wiechert, Dr Armin Bauer, Dr Ursula Deiters and Dr Gerhard Kauer (from left to right)

Ehrungen

Drei GBF-Forscher wurden im Berichtszeitraum mit wissenschaftlich bedeutenden Preisen geehrt.

ESCMID Young Investigator Award für Dr. Ute Römling

Die European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases verlieh den 1999 neu geschaffenen Young Investigator Award und mit 11.500 Euro dotierten Preis im Mai 2000 an Frau Dr. Römling, Leiterin der Nachwuchsforschungsgruppe „Klonale Variabilität“ der GBF, für ihre erfolgreichen Forschungsarbeiten an zwei bakteriellen Erregern zur Aufklärung grundlegender Krankheitsmechanismen: *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium*. *P. aeruginosa* kann Wundinfektionen bis hin zur Lungenentzündung verursachen und stellt ein Problem für Patienten der Erbkrankheit Mukoviszidose dar. *S. typhimurium* bildet Biofilme, die sich auch an menschliche Zellen anhaften können. Die Arbeitsgruppe von Ute Römling untersucht, ob dadurch der Krankheitsverlauf oder Antibiotikaresistenzen beeinflusst werden können.

Ute Römling studierte Biochemie an der Universität Hannover, promovierte bei Prof. Maaß an der Medizinischen Hochschule Hannover. 1995 folgte ein zweieinhalbjähriger Forschungsaufenthalt am Karolinska Institut in Stockholm, seit 1998 arbeitet sie an der GBF.



Dr. Ute Römling

Der Technologietransfer-Preis der IHK Braunschweig für Prof. Dr. John Collins

Der Technologietransfer-Preis der Industrie- und Handelskammer Braunschweig wurde 1999 erstmals an einen Wissenschaftler der GBF vergeben. Prof. John Collins erhielt die mit 20.000 DM dotierte Auszeichnung für seine neuentwickelte Technologie – cosmix-plexing®. Sie ermöglicht es, aus einer Gen-Bibliothek für Millionen unterschiedlicher Peptid-Moleküle wenige gute Strukturen auszuwählen, die dann neu kombiniert werden, um bestmögliche Varianten für den jeweiligen Einsatz zu finden, sei es als pharmazeutischer Wirkstoff oder Diagnostika.

Mit der neuen Technologie können Entwicklungszeiten von etlichen Jahren auf einige Wochen reduziert werden.

Prof. Collins ist langjähriger Mitarbeiter der GBF, wo er die Abteilung für Angewandte Genetik leitet. 1997 gründete er außerdem die Firma COSMIX GmbH, eine Ausgründung aus der GBF, die mit Erfolg die neue Technologie vertreibt.

Der Amerikanische Forschungspreis „Advanced Chem Tech Award“ für Dr. Ronald Frank

Der Leiter der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung der GBF, Dr. Ronald Frank, erhielt im Mai 1999 den Preis des amerikanischen Unternehmens Advanced Chem Tech. Dieser Preis, der alle 2 Jahre vergeben wird, würdigt die Arbeiten Ronald Franks zur Kombinatorischen Molekülerkennung. Mit diesem Verfahren kann man in wenigen Tagen mehr Substanzen herstellen und testen als mit herkömmlichen Verfahren in Jahrzehnten. Die Anwendungsmöglichkeiten liegen bei der Früherkennung von Krankheiten sowie der Suche nach neuen Medikamenten mit veränderten Eigenschaften.

Ronald Frank ist langjähriger Mitarbeiter der GBF und der 3. Preisträger dieses Awards.

Awards

Three GBF researchers received scientifically important awards in 1999/2000.

ESCMID Young Investigator Award for Dr. Ute Römling

The European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases awarded Dr. Ute Römling, head of GBF's Junior Research Group "Clonal Variability" the 1999 created Young Investigator Award in May 2000. The laudatio emphasized her successful research work on the enlightenment of diseases caused by 2 bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*. *P. aeruginosa* may cause wound infections up to pneumonia. The bacterium is very harmful for patients with mucoviscidosis. *S. typhimurium* organizes itself by biofilms which can also adhere to human cells. Ute Römling and her research group are analysing whether this may influence the development of the disease or the resistance against antibiotics.

Dr. Römling studied biochemistry at Hannover University, did her PhD in the laboratories of Prof. Maaß at the Medical University Hannover. From 1995 she stayed for 2½ years as post-doc fellow at Karolinska Institute, Stockholm, and started her work at GBF in 1998.

Prof. Dr. John Collins received the Technology Transfer Award from the Braunschweig Chamber of Industry and Commerce (IHK)

The Technology Transfer Award of the IHK Braunschweig was given to Prof. John Collins from GBF for his newly developed *cosmix-plexing*® technology. This enables to select adequate structures from gene-libraries with data for millions of different peptide molecules. These structures can be combined to form very good variants for the best possible use as pharmaceutical drugs or diagnostics. Now it will be possible to reduce the times of development for drugs from several years to a few weeks.

Prof. Collins is working at GBF for more than 2 decades, where he is the head of the department for Applied Genetics. In 1997 he founded COSMIX Ltd. A new company where he is successfully selling that new technology.



Prof. Dr. John Collins

The "Advanced Chem Tech Award" for Dr. Ronald Frank

The head of the GBF research group Molecular Recognition, Dr. Ronald Frank, was awarded the prize of the American Enterprise Advanced Chem Tech. This award, which is granted every 2 years, honours Ronald Frank's research work about combinatorial molecular recognition. On the basis of this system it is possible to prepare and test more substances within a few days than with traditional methods within years. The possibilities of application can be the early diagnosis of a disease as well as the search for new medicines.

Dr. Frank has been working at GBF for many years. He was the 3rd researcher to receive that award.



Dr. Ronald Frank

Personal, Haushalt | *Staff, Budget*

Personal | *Staff*

Am 31.12.1999 wurden in der GBF 586 Mitarbeiter beschäftigt. Damit hat sich die entsprechende Zahl vom Jahresende 1998 von 575 geringfügig um 1,9 % erhöht. Die Mitarbeiterzahl setzt sich, wie in der Grafik dargestellt, folgendermaßen zusammen:

At the end of 1999 the GBF staff comprised 586 persons. The staff includes:

• Wissenschaftler <i>Scientists</i>	209
• Technische Angestellte <i>Technical assistants</i>	144
• Technischer Betrieb <i>General services and workshops</i>	50
• Sonstige (einschl. 59 Gastforscher, Gastdoktoranden) <i>Miscellaneous (incl. guest researchers)</i>	116
• Geschäftsführung, Stäbe u. Verwaltung <i>Management and administration</i>	67

59 Mitarbeiter mit fremder Staatsangehörigkeit kamen 1999 aus | *The 59 foreign staff in 1999 came from:*

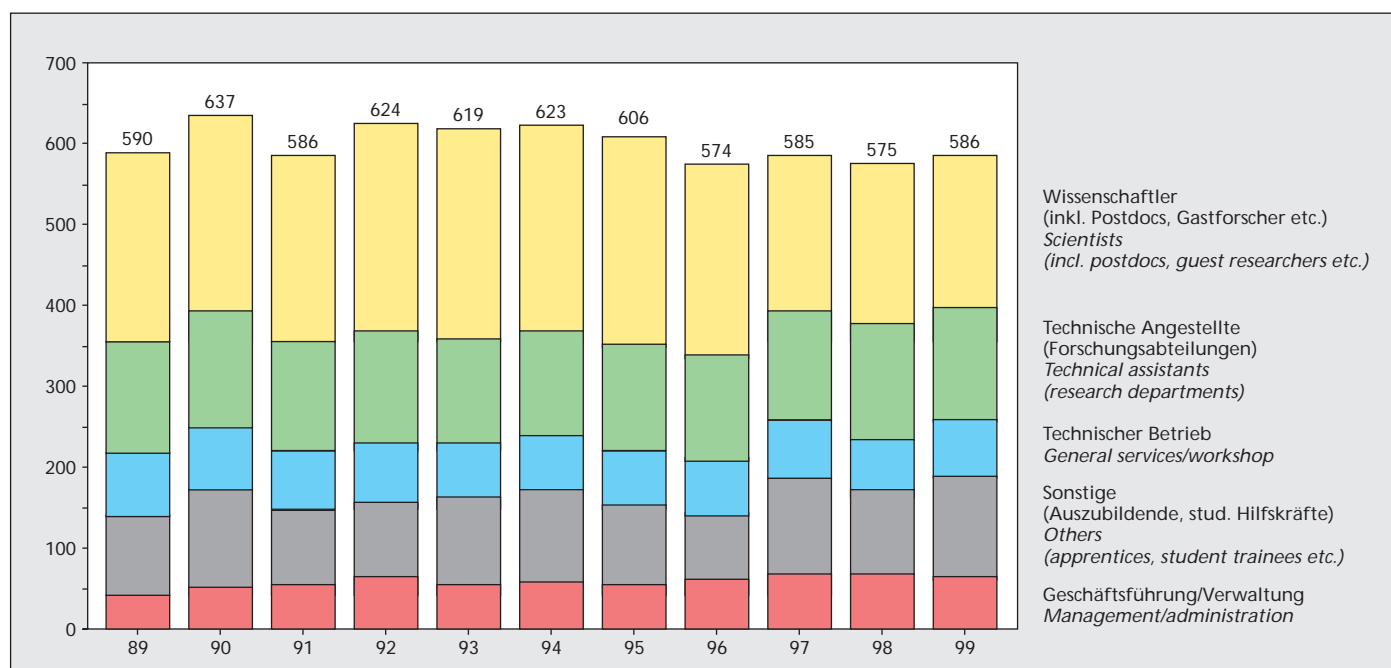
Ägypten | *Egypt* (3), Albanien | *Albany* (1), Australien | *Australia* (1), Belgien | *Belgium* (1), Brasilien | *Brazil* (2), Dänemark | *Denmark* (1), Frankreich | *France* (1), Griechenland | *Greece* (2), Großbritannien | *UK* (8), Indien | *India* (3), Iran | *Iran* (3), Italien | *Italy* (7), Kanada | *Canada* (1), Niederlande | *The Netherlands* (2), Österreich | *Austria* (2), Peru | *Peru* (1), Polen | *Poland* (1), Rußland | *Russia* (3), Spanien | *Spain* (4), Schweden | *Sweden* (1), Schweiz | *Switzerland* (1), Türkei | *Turkey* (2), Tunesien | *Tunesia* (1), USA | *USA* (3), VR China | *PR China* (4).

Zur Betreuung des Personals gehörte im abgelaufenen Wirtschaftsjahr 1999 auch die Abwicklung von 1.881 Dienstreisen und 85 Beihilfen, davon 137 bzw. 21 für die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Die Zahl der Fortbildungsmaßnahmen betrug 65, zu denen 182 Teilnehmer entsandt wurden.

Weiteren Arbeits- und Koordinationsaufwand erforderte die Betreuung von 161 Gästen/ Stipendiaten (davon 57 Praktikanten von allgemeinbildenden Schulen, Fachhochschulen und Universitäten), die in den wissenschaftlichen Bereichen der GBF beschäftigt wurden.

Mitarbeiterzahl der GBF.
Beschäftigte Personen
jeweils zum Jahresende.

*Staff of the GBF (on Dec. 31,
1999).*



Services provided by GBF administrative staff in the 1999 fiscal year involved, for example, the processing of 1881 business trips. The number of advanced training courses was 65, with 182 participants.

The support of 161 guests/scholarship holders from schools, polytechnic schools and universities, supervised in the scientific departments, represented additional work and coordination performed by the GBF.

Finanzen | Budget

	1998	1999
Aufwendungen Expenditure		
Investitionen Investments		
Ausbauinvestition Laboratory Investments	8,3	6,6
Laufende Investitionen Current Investments	9,1	12,2
Betriebsaufwendungen Company Expenditure		
Personalaufwendungen Staff	37,5	40,9
Sachaufwendungen Materials	19,0	21,2
Andere Aufwendungen Further Expenditure		
Zur Finanzierung von Umlaufvermögen verwendete Zuschüsse	2,4	1,1
Summe der Aufwendungen Total Expenditure	76,3	82,0
Erträge Income		
Institutionelle Förderung Institutional Support		
Bund institutionelle Förderung Federal Institutional Support	52,7	55,3
Land institutionelle Förderung State Institutional Support	5,9	6,1
Projektförderung Grants		
Bund Projektförderung Federal Project Grants	7,0	7,0
Land Projektförderung State Project Grants	0,0	0,5
Andere Erträge (Industrie, EU-Projekte etc.) Further Grants and Income	10,7	13,1
Summe Total Income	76,3	82,0

Die Bilanzsumme der GBF betrug zum 31. Dez. 1999 119,6 Mio. DM (31.12.1998 119,9 Mio. DM). Das Anlagevermögen hatte bei Anschaffungskosten von 272,7 Mio. DM am 31. Dez. 1999 einen Buchwert von 105,6 Mio DM.

The total balance account of GBF on 31 Dec 1999 was 129.5 Mio DM (31 Dec 1998 119.6 Mio DM). Capital assets, with acquisition costs of approx. 272.7 Mio DM had a book value of 105.6 Mio DM on 31 Dec 1999.

Organe und Gremien der GBF | *Boards and Assemblies of the GBF 1999/2000*

Die Organe der Gesellschaft waren 1999/2000 weiterhin die Gesellschafterversammlung, der Aufsichtsrat und die Geschäftsführung. Das Wissenschaftliche Komitee besteht aus Mitgliedern des Aufsichtsrats und extern berufenen Wissenschaftlern (s.u.).

In 1999/2000 the organs of the GBF were the Board of Trustees, the Supervisory Board and the Managing Directors. The Scientific Committee consists of representatives from the Supervisory Board and externally chosen scientists (s. below).

Gesellschafterversammlung

In der Gesellschafterversammlung sind die beiden Gesellschafter der GBF, die Bundesrepublik Deutschland und das Land Niedersachsen, durch ihre federführenden Ressorts, das Bundesministerium für Bildung und Forschung und Technologie und das Niedersächsische Ministerium der Finanzen vertreten.

Aufsichtsrat

Der Aufsichtsrat besteht aus höchstens 15 Mitgliedern. Er überwacht die Rechtmäßigkeit, Zweckmäßigkeit und Wirtschaftlichkeit der Geschäftsführung und entscheidet über die allgemeinen Forschungsziele sowie die wichtigen forschungspolitischen und finanziellen Angelegenheiten der Gesellschaft.

Board of Trustees

On the Board of Trustees are the two trustees of the GBF, the Federal Republic of Germany and the State of Lower Saxony, represented by their respective departments, the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and the Lower Saxony Finance Ministry.

Supervisory Board

The Supervisory Board oversees the legality, expedience and economy of the management. It decides on general research goals and important research policy and financial affairs of the company. It has not more than 15 members

Mitglieder des Aufsichtsrats | *Members of the Supervisory Board 1999/2000*

Prof. Dr. A. Kleemann* – Vorsitzender | *Chairman* – (Asta Medica AG, Frankfurt/M.), (bis | *until* 8.9.2000)

Min.Dir. Dr. W. Döllinger – stellv. Vorsitzender | *Vice-Chairman* – (BMBF, Bonn), (bis | *until* 8.9.2000), – Vorsitzender | *Chairman* – (ab | *from* 9.9.2000)

Min.Dir. Dr. K. Palandt – stellv. Vorsitzender | *Vice-Chairman* – (Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur, Hannover)

Min.Dir. Dr. K. Bauer (BMBF, Bonn), (bis | *until* 5.5.1999)

RD J. Deiters (Niedersächsisches Finanzamt, Hannover)

Prof. Dr. D. Bitter – Suermann* (Medizinische Hochschule Hannover)

Prof. Dr. J. Bode (GBF, Braunschweig), (bis | *until* 30.9.2000)

Prof. Dr. P. Buckel (Boehringer Mannheim, Werk Penzberg), (bis | *until* 5.8.1999)

Min.Rat Dr. H. Deyda (BMBF, Bonn)

Frau Prof. Dr. I. Grummt* (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg)

Frau Prof. Dr. B. Jockusch* (Technische Universität Braunschweig)

Dr. L. Müller-Kuhrt* (AnalytiCon Discovery GmbH, Potsdam), (ab | *from* 8.4.1999)

Frau Dr. D. Pfeiffer* (BST Biosensorenteknologie GmbH, Berlin), (ab | *from* 6.5.1999)

Prof. Dr. A. Pühler* (Univ. Bielefeld), (bis | *until* 19.5.2000)

Dr. W. Schiebeler* (Aventis Pharma AG, Frankfurt), (ab | *from* 1.11.1999)

Prof. Dr. J. Wehland (GBF, Braunschweig), (bis | *until* 30.9.2000)

Prof. Dr. E. Winterfeldt* (Univ. Hannover)

* Mitglieder des Aufsichtsrats und des Wissenschaftlichen Komitees | *Members of the Supervisory Board and of the Scientific Committee.*

Weitere Mitglieder des Wissenschaftlichen Komitees | *Further members of the Scientific Committee (bis | until 30.9.2000):*

Prof. Dr. P. Herrlich (FZK, Karlsruhe), Prof. Dr. M. Röllinghoff (Univ. Erlangen), Prof. Dr. B. Witholt (ETH, Zürich) und Prof. Dr. F. Wittinghofer (Univ. Dortmund).

Geschäftsführer

Im Berichtszeitraum waren Geschäftsführer der Gesellschaft Prof. Dr. Günter Maaß (Wissenschaftlicher Geschäftsführer) und Dr. Georg Frischmann (Administrativer Geschäftsführer).

Managing Directors

In 1999/2000 the Managing Directors of the Institute were Prof. Dr. Günter Maaß (Scientific Managing Director) and Dr. Georg Frischmann (Administrative Director).

Wissenschaftler-Versammlung

Die Wissenschaftler-Versammlung berät die Geschäftsführung in Angelegenheiten von grundsätzlicher wissenschaftlicher Bedeutung. Ihr gehören die Abteilungsleiter und Arbeitsgruppenleiter der GBF sowie gewählte Mitarbeiter aus dem Kreis der angestellten Wissenschaftler an. Die Wissenschaftler-Versammlung ist im Berichtsjahr viermal zu Beratungen zusammengetreten.

Vorsitzender war im Berichtszeitraum Frau PD Dr. U. Rinas, stellvertretender Vorsitzender war Herr PD Dr. R. Wagner.

Scientists Assembly

The Scientists Assembly advises the Management in scientific matters. Chairman was Dr. Ursula Rinas and vice-chairman Dr. Roland Wagner.

Betriebsrat

Dem Betriebsrat der GBF gehörten 1999/2000 neun Mitglieder an. Vorsitzender war im Berichtsjahr Herr A. Holtel, stellvertretende Vorsitzende Herr J. Aubert (bis Januar 1999) und Herr D. Räke (ab Febr. 1999).

Staff Council

The Staff Council has certain consultation and co-determination rights in personnel and social questions.

Frauenbeauftragte in diesem Zeitraum war Frau E. Rohn-Stenzel.

Representative of women was Mrs. Evelyn Rohn-Stenzel.

Nachfolge Prof. Dr. G. Maaß

In der Aufsichtsratssitzung vom Mai 2000 wurde der zuvor als Nachfolger von Prof. Maaß berufene Prof. Dr. Rudi Balling (GSF) als neuer Wissenschaftlicher Direktor der GBF bestätigt. Er wird sein Amt im Januar 2001 antreten.

Succession Prof. Dr. G. Maaß

In the Supervisory Board Meeting in May 2000 Prof. Dr. Rudi Balling from GSF was nominated successor of Prof. Dr. Günter Maaß who will retire at the end of 2000. From January 2001 Prof. Balling will take over his new task as Scientific Director of GBF.



Prof. Dr. Rudi Balling

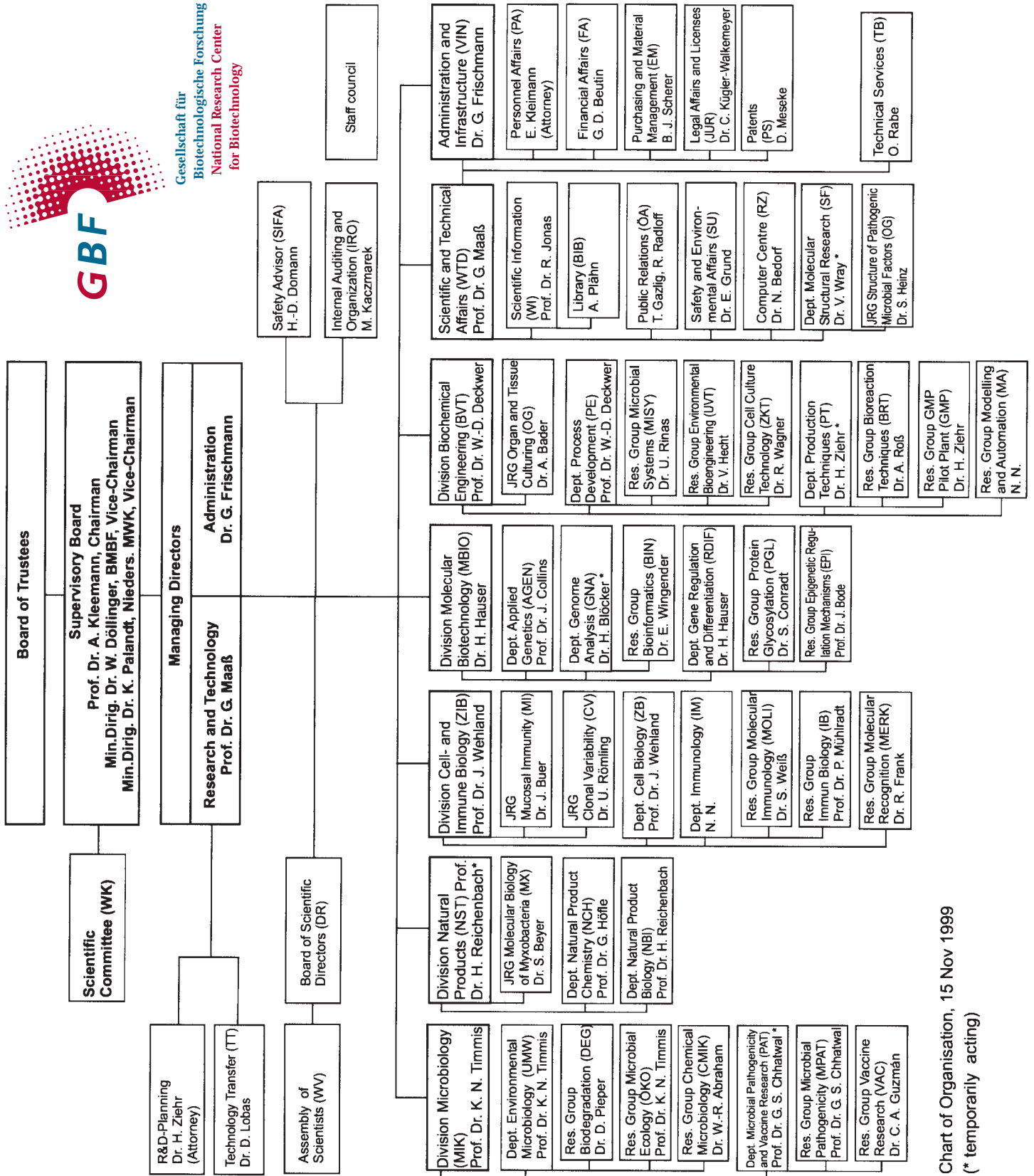
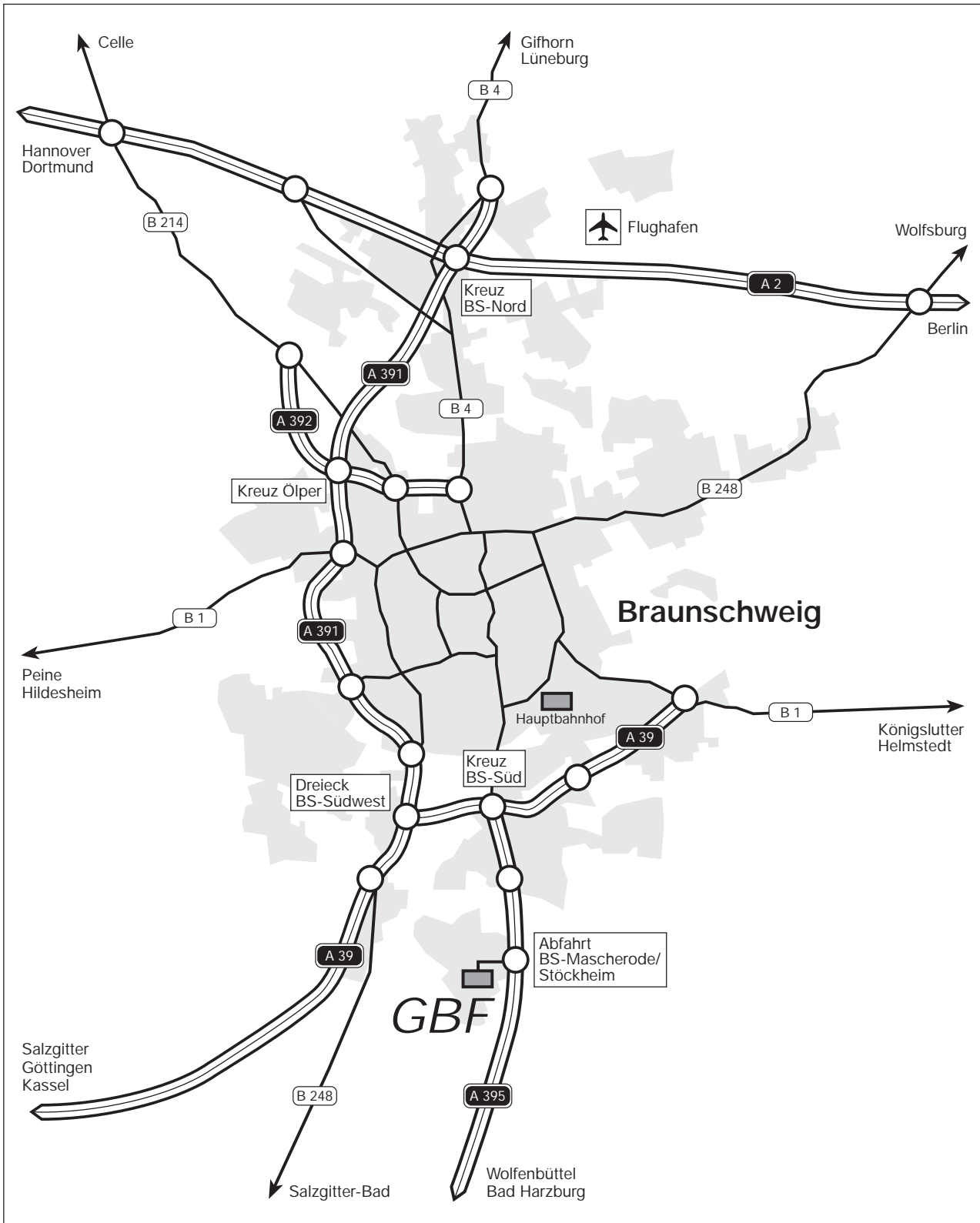


Chart of Organisation, 15 Nov 1999
 (* temporarily acting)



GBF

Lageplan der GBF | *Principal routes to the GBF*



Impressum

Ergebnisbericht | *Annual Report 1999* | 2000

Herausgegeben von | *Published by*
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
GBF – German Research Centre for Biotechnology Ltd.
Mascheroder Weg 1
D-38124 Braunschweig
Telefon +49-5 31/61 81-0
Telefax +49-5 31/61 81-515
E-mail: info@gbf.de
Web: www.gbf.de

Mitglied der | *Member of*
Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

Konzept und Redaktion | *Editor*
Prof. Dr. Rainer Jonas
E-mail: rjo@gbf.de

Redaktionsassistentz | *Editorial assistance*
Monica Kirchner
E-mail: mok@gbf.de

© 2000 GBF Braunschweig-Stöckheim

Layout und Gestaltung | *Layout and Design*
Alwina Unruh, Büro für Grafik Design, Braunschweig
E-mail: unruh@artmax.de

Fotografien | *Photographs*
Heinz Gramman, Seiten | *Pages:* 6, 162, 199
Jürgen Bansmann, Seite | *Page:* 176
Stephan Elleringmann, Seiten | *Pages:* 1, 201, 202
Florenz Sasse, Seite | *Page:* 98
Frank Bierstedt, Titelbilder Umschlag | *Pictures Front Cover and Back Cover,*
Seiten | *Pages:* 2, 4, 6, 7/8, 35, 55/56, 68, 70, 72, 73, 78, 86, 111, 120,
125, 142, 146, 152, 157/158, 168, 170, 172, 177/178, 182, 200
Übrige Fotos | *Other photographs:* Öffentlichkeitsarbeit und GBF
Arbeitsgruppen | *Public Relations and GBF research groups*

Herstellung | *Printed by*
Döring Druck, Druckerei und Verlag GmbH, Braunschweig

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier

ISSN 0935-0497