



Prof. Dr. Rudi Balling |
Wissenschaftlicher Geschäftsführer der GBF | *Scientific Managing Director of GBF*

Quo vadis GBF?

Für die GBF ist das Jahr 2001 mit einer Neuausrichtung ihrer Forschungsaktivitäten verbunden. Die GBF entwickelt sich zu einem Forschungszentrum für Infektionskrankheiten. Im Mittelpunkt steht die Analyse bakterieller Infektionsprozesse und deren Abwehr durch den Wirt, mit dem Ziel, wichtige Beiträge in der Prophylaxe, Diagnose und Therapie von Infektionskrankheiten zu leisten. Mit der Entscheidung, sich erheblich stärker in der Gesundheitsforschung zu positionieren und das Thema der Infektionskrankheiten zur Widmungsaufgabe zu machen, geht die GBF neue Wege. Warum gerade dieses Thema, und wohin soll die Reise gehen?

Infektionskrankheiten als globale Herausforderung

Infektionen sind für ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich. Malaria, Tuberkulose und HIV wurden von der World Health Organization (WHO) als die Krankheiten identifiziert, die höchste Priorität in der globalen Krankheitsbekämpfung erhalten sollten. Aber auch andere wiederkehrende und neuauftretende Infektionserkrankungen stellen die nationalen Gesundheitssysteme immer häufiger vor kaum zu bewältigende Probleme. Während man noch vor wenigen Jahren dachte, Infektionskrankheiten gehörten in den entwickelten Ländern der Vergangenheit an, erkennt man jetzt, dass durch zunehmende Antibiotika-Resistenzen, durch demographische Veränderungen in Richtung älter werdende Gesellschaft sowie durch wachsende Mobilität Infektionskrankheiten eine immer größere Bedeutung erlangen. Mit der Erforschung von Infektionskrankheiten widmet sich die GBF damit einem Forschungsgebiet, das auf Grund der medizinischen Relevanz und des großen wissenschaftlichen Potenzials eine außerordentliche Bedeutung für die deutsche Gesundheitsforschung hat.

Neuausrichtung der GBF erhöht die Wettbewerbsfähigkeit

Die GBF ist die einzige Einrichtung innerhalb der Helmholtz-Gemeinschaft, die sich auf Infektionskrankheiten fokussiert. Zwar wird am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) an viralen Infektionen gearbeitet, der Schwerpunkt liegt aber auf den Entstehungsmechanismen von Krebs. Auch am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) und am GSF-

Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit spielen Infektionserkrankungen hauptsächlich als Pathogenesefaktor anderer Erkrankungen eine Rolle. Aus diesem Grunde nimmt die GBF durch ihre Entscheidung, sich schwerpunktmäßig der Erforschung von Infektionskrankheiten zu widmen, eine wichtige Alleinstellung innerhalb der Helmholtz-Gemeinschaft ein.

Entwicklungsgeschichte der GBF

Die Konzeption der GBF als „Nationales Zentrum für Biotechnologie“ erfolgte zu einem Zeitpunkt, als die technologischen Voraussetzungen für eine groß angelegte Fermentierung und Aufarbeitung von biologischen Substanzen und Wirkstoffen sowie das gesamte Methodenspektrum der rekombinanten DNA-Technologie erst noch geschaffen werden mussten. Hierin lagen die Schwerpunkte der GBF-Forschungsaktivitäten von den 70ern bis in die 90er Jahre. Auch wenn Fragen der Prozessentwicklung heute noch wichtig sind, hat sich das Forschungsinteresse in der Biotechnologie sehr viel stärker biologischen als technologischen Aspekten zugewandt.

Der Triumphzug der modernen Biotechnologie

Kaum ein anderes Forschungsgebiet hat in den letzten Jahren eine derart stürmische Entwicklung erlebt wie die moderne Biotechnologie. Es gibt nur wenige Fachgebiete, in die biotechnologische Fragestellungen nicht eingezogen sind. Zusätzlich ist ein völlig neuartiger Industriezweig – die Biotech-Industrie – entstanden, unbestritten eine der Schlüsseltechnologien dieses Jahrhunderts. Neue biochemische, zell- und molekularbiologische Methoden erlauben

Quo vadis GBF?

For the GBF the year 2001 is associated with a reorientation of its research activities. The GBF is developing into a research centre for infectious diseases. At the focus of research is the analysis of bacterial infection processes and their combating by the host with the aim of furnishing important contributions in the prophylaxis, diagnosis and therapy of infectious diseases. With the decision to position itself much more in health research and devote its efforts to infectious diseases the GBF is breaking new ground. Why did we choose this topic and where are we going?

Infectious diseases as a global challenge

Infections are responsible for one third of all deaths. Malaria, tuberculosis and HIV have been identified by the World Health Organization (WHO) as those diseases which should be given the highest priority in the global fight against disease. But recurring and newly occurring infectious diseases also confront the national health systems more and more frequently with problems that can hardly be coped with. Whereas it was thought just a few years ago that infectious diseases were a problem of the past in the developed countries, it is now recognized that they are gaining increasing significance due to rising antibiotic resistances, demographic changes towards an ageing society as well as growing mobility. With research into infectious diseases the GBF devotes itself to a field of study which is of exceptional significance for German health research on account of its medical relevance and great scientific potential.

GBF's new orientation increases its competitiveness

The GBF is the only institution within the Helmholtz Association which focuses its efforts on infectious diseases. Although the German Cancer Research Centre (DKFZ) is concerned with viral infections, the focus there is on the mechanisms of carcinogenesis. Infectious diseases also play a role mainly as a pathogenesis factor of other diseases at the Max Delbrück Centre for Molecular Medicine (MDC) and the GSF Research Centre for Environment and Health. For this reason, the GBF occupies an exclusive position within the Helmholtz Association with its decision to give priority to research into infectious diseases.

GBF development history

The concept of the GBF as a "German Research Centre for Biotechnology" was developed at a time when the technological prerequisites for a large-scale fermentation and processing of biological substances and

bioactive compounds as well as the whole range of methods of recombinant DNA technology still had to be created. This was the main task of GBF research activities from the 70s to 90s. Even if issues of process development are still of current interest today, research in biotechnology has turned much more strongly to biological rather than technological aspects.

The triumphal procession of modern biotechnology

Hardly any other field of research has experienced such rapid development in recent years as modern biotechnology. There are only a few subject areas into which biotechnological issues have not been incorporated. In addition, a completely novel branch of industry – the biotech industry – has emerged, indisputably one of the key technologies of this century. New biochemical, cytobiological and molecular biological methods allow us to better understand the basic mechanisms of gene expression, cell division, cell differentiation and metabolic activities today and are an indispensable prerequisite for deriving optimum benefit from biotechnology. However, the research topics have become so diverse and complex here that one single research centre can no longer cover many different topics of biotechnology. This makes it necessary to focus on just a few issues which, however, can then be dealt with in greater depth. Only in this way will it be possible to maintain GBF's competitiveness in bioscientific research and to attain an international top position.

Expertise and future specialization of GBF

The GBF therefore concentrates on a broad-based functional analysis of bacterial genes, because an understanding of infection processes presupposes basic insights into specific microbiological processes. This comprises investigations to elucidate

uns heute ein tieferes Verständnis der grundlegenden Mechanismen von Genexpression, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Stoffwechsellösungen und sind unabdingbare Voraussetzung dafür, den optimalen Nutzen aus der Biotechnologie zu ziehen. Hier sind aber die Forschungsthemen so divers und komplex geworden, dass ein einzelnes Forschungszentrum nicht mehr viele unterschiedliche Themenfelder der Biotechnologie abdecken kann. Dies macht eine Fokussierung auf einige wenige Fragestellungen erforderlich, die dann allerdings vertieft angegangen werden. Nur so kann die Wettbewerbsfähigkeit der GBF in der biowissenschaftlichen Forschung aufrechterhalten und eine internationale Spitzenposition erreicht werden.

Expertise und zukünftige Spezialisierung der GBF

Die GBF konzentriert sich deshalb auf eine breit angelegte Funktionsanalyse bakterieller Gene, denn ein Verständnis von Infektionsprozessen setzt grundlegende Einblicke in bestimmte mikrobiologische Prozesse voraus. Dies beinhaltet Untersuchungen zur Aufklärung von Mechanismen des Zusammenlebens von Bakterien als Gemeinschaften, zum Beispiel in Biofilmen, der Untersuchung von Naturstoffen aus Bakterien sowie der Analyse von Mechanismen, die für die Virulenz und Pathogenität von

Bakterien verantwortlich sind.

Schon in den vergangenen Jahren hat die GBF zunehmend ihre Forschungsaktivitäten auf biologische Fragestellungen in der Gesundheitsforschung erweitert. In der Mikrobiologie wurde ein Programm zu den Mechanismen der Pathogenität von Bakterien aufgenommen. In der Zellbiologie wurde der Schwerpunkt auf Fragen der zellulären Mikrobiologie gelegt und beispielsweise Themen aufgegriffen, wie sich Bakterien nach einer Infektion innerhalb einer Wirtszelle fortbewegen und inwieweit bakterielle Proteine und Proteine des Wirts dabei zusammenwirken. Auch in der Molekularen Biotechnologie, der Naturstoffforschung und der Bioverfahrenstechnik arbeiten bereits jetzt eine Reihe von GBF-Wissenschaftlern an infektionsrelevanten Fragen, wie der Isolierung von antibakteriellen Substanzen, der Expression und Bedeutung einzelner Interferogene in Signaltransduktionsprozessen nach Infektionen oder der Produktion von Impfstoffen und anderen biopharmazeutischen Wirkstoffen nach arzneimittelrechtlichen Standards (GMP).

Ausgebaut werden an der GBF Forschungsaktivitäten über grundlegende molekulare, zellbiologische, immunologische und genetische Mechanismen, die an bakteriellen Infektionsprozessen beteiligt sind. Dazu gehören die Aufklärung von Interaktionen zwischen Pathogen und Wirtszellen, Untersuchungen über Invasionsmechanismen von Bakterien, die Identifizierung und Charakterisierung von Genen und Genprodukten, die an Abwehrreaktionen gegenüber Infektionen beteiligt sind, sowie die Aufklärung der räumlichen Struktur von Virulenzfaktoren und damit interagierenden Wirtszellproteinen bis hin zur Identifizierung von Impfstoffkandidaten und der Entwicklung von Impfstoffen.

Titelbild der Zeitschrift Nature vom 15. Februar 2001 anlässlich der Veröffentlichung der ersten Arbeitsversion des menschlichen Genoms. Das Bild symbolisiert, worum es den Wissenschaftlern des internationalen Konsortiums geht: Einerseits die chemische DNA, andererseits um die Menschen aller Kontinente, aller Hautfarben und jeglicher ethnischen Gruppen. Alle Ergebnisse des Internationalen Sequenzanalyse-Konsortiums sind frei verfügbar für jeden Interessenten. Mit freundlicher Genehmigung von Nature und Macmillan Magazine Ltd.

Cover picture of the 15 February 2001 issue of Nature on the occasion of the publication of the first „working draft“ of the human genome. The picture symbolizes what the work of the scientists of the international consortium is related to: On the one hand it is the chemical DNA, on the other hand it is mankind, no matter from which continent, of which colour or from which ethnicity. All results of the International Sequence Analysis Consortium are freely available to anybody. Permission kindly granted by Nature and Macmillan Magazine Ltd.



mechanisms of bacterial cohabitations as communities, for example, in biofilms, the investigation of natural products from bacteria as well as the analysis of mechanisms responsible for the virulence and pathogenicity of bacteria.

In recent years the GBF has already increasingly extended its research activities to cover biological issues in health research. In microbiology, a programme on the mechanisms of bacterial pathogenicity has been included. In cytobiology, priority has been given to issues of cellular microbiology addressing questions, for example, of how bacteria move after an infection inside a host cell and to what extent bacterial proteins interact with proteins of the host. In molecular biotechnology, natural product research and biochemical engineering, too, a number of GBF scientists are already concerned with infection-relevant questions, such as the isolation of antibacterial substances, the expression and significance of individual interferongenes in signal transduction processes after infections or the production of vaccines and other biopharmaceutical substances according to drug legislation standards (GMP).

Research activities concerning basic molecular, cytobiological, immunological and genetic mechanisms involved in bacterial infection processes are being extended at the GBF. This includes the elucidation of interactions between pathogen and host cells, the study of bacterial invasion mechanisms, the identification and characterization of genes and gene products involved in defence reactions to infections as well as the elucidation of the spatial structure of virulence factors and host cell proteins interacting with them up to the identification of candidate vaccines and the development of vaccines.

Expertise and extension of GBF genome research

Of particular importance in this field is bacterial and human genome research. The GBF already participated in the German Human Genome Project at an early stage, for example, with its contribution to the sequence analysis of chromosome 21 as well as functional analyses on chromosome 9. In the

recently established National Genome Research Network, the GBF is involved with a number of projects. This includes the construction of an "Infection Challenge" platform, which should help to identify human genes involved in a genetic disposition to infections via the model system of mice. Within the framework of the National Genome Research Network, a bioinformatics centre is also being established together with the TU Braunschweig, which will be concerned with the knowledge-based modelling of regulatory networks and the development of algorithms for the computer-assisted simulation of infection processes. The sequence analysis platform of GBF participates in the sequence analysis of the MHC complex of rats and rhesus monkeys, projects which are implemented jointly with the German Primate Center in Göttingen and institutes in Berlin and Jena.

Extension of mouse genetics for the functional elucidation of genes

One of the most successful approaches to the functional elucidation of genes is genetics. For this reason, the extension of mouse genetics and the genetics of other model organisms will be given particular priority at the GBF. The completion of the new animal house and the planned construction of an infection unit will create the necessary infrastructure prerequisites. It is planned to set up further working groups who will be concerned with experimental methods of mouse genetics such as conditional gene targeting, RNA interference, the establishment of infection models in model organisms or the study of genetic susceptibility to infections.

Mäuse, wichtiges Tiermodell für die Genetik bei der Infektionsbiologie

Mice, an important animal model for genome research in infectious biology



Expertise und Ausbau der GBF-Genomforschung

Eine besondere Rolle kommt dabei der bakteriellen und der Humangenomforschung zu. Die GBF hat sich bereits früh am Deutschen Humangenomprojekt beteiligt, wie ihre Beiträge zur Sequenzanalyse von Chromosom 21 sowie Funktionsanalysen am Chromosom 9 belegen. Im dem vor kurzem etablierten Nationalen Genomforschungsnetz ist die GBF mit einer Reihe von Projekten beteiligt. Dazu gehört der Aufbau einer „Infektions-Challenge“-Plattform. Diese soll über das Modellsystem Maus helfen, menschliche Gene zu identifizieren, die an einer genetischen Disposition gegenüber Infektionen beteiligt sind. Ebenfalls im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzes wird zusammen mit der TU Braunschweig ein Bioinformatik-Zentrum eingerichtet, das sich mit der wissensbasierten Modellierung regulatorischer Netzwerke und der Entwicklung von Algorithmen zur computergestützten Simulation von Infektionsprozessen befasst. Die Sequenzanalyseplattform der GBF beteiligt sich an der Sequenzanalyse des MHC-Komplexes aus Ratte und Rhesusaffe, Projekte, die gemeinsam mit dem Primatenzentrum in Göttingen und Instituten in Berlin und Jena durchgeführt werden.

Ausbau der Mausgenetik zur Funktionsaufklärung von Genen

Einer der erfolgreichsten Ansatzpunkte zur Funktionsaufklärung von Genen ist die Genetik. Aus diesem Grund wird der Ausbau der Genetik von Mäusen und anderer Modellorganismen an der GBF eine besondere Priorität erhalten. Durch die Fertigstellung des neuen Tierhauses und der geplanten Errichtung einer Infektionseinheit werden dazu die notwendigen infrastrukturellen Voraussetzungen geschaffen. Es ist geplant, weitere Arbeitsgruppen einzurichten, die sich mit experimentellen Methoden der Mausgenetik, wie des konditionalen Gentergeting, der RNA-Interferenz, der Etablierung von Infektionsmodellen in Modellorganismen oder der Untersuchung der genetischen Suszeptibilität gegenüber Infektionen befassen.

Vom isolierten Gen zur komplexen Analyse aller Gene

Die Entwicklungen in der Genomforschung haben deutlich gemacht, dass häufig nicht mehr das isolierte Gen im Mittelpunkt experimenteller Untersuchungen steht, sondern idealerweise alle Gene gleichzeitig im Hinblick auf ihre differenzielle Regulation und die daraus folgenden Expressionsänderungen und weitere Parameter analysiert werden müssen. Expression-Profiling mit DNA- oder Oligonukleotidchips ist ein Weg, um das ganze Transkriptom zu untersuchen. An der GBF wurde Anfang des Jahres eine DNA-Array Expression Profiling Station aufgebaut. In vielen Experimenten ist allerdings kein globaler genomweiter Expressions-Chip notwendig, sondern es genügen „Custom-made-Expression-Chips“, wie ein Immuno- oder Infektionschip. Dieser besteht aus einigen hundert gezielt für das jeweilige Experiment ausgesuchten Genen, die im Labor selbst amplifiziert und gespottet werden. Auch diese Technologie wird an der GBF etabliert und soll damit sowohl GBF-Arbeitsgruppen als auch für Kooperationsvorhaben zur Verfügung stehen.

Proteinforschung zur Target Identifizierung in Infektionsprozessen

Einen besonderen Stellenwert an der GBF sollen in den nächsten Jahren die Proteinforschung und moderne Proteomics-Technologien erhalten. Neben der Strukturaufklärung von Proteinen, die an Infektionsprozessen beteiligt sind, verfügt die GBF auch über ein beträchtliches Know-how auf dem Gebiet der Proteinanalytik. Wenn es gelingt, dieses Know-how und die Ressourcen für die Untersuchung von Proteinen und ganzen Proteomen einzusetzen, besitzt die GBF damit einen Wettbewerbsvorsprung, wie er in der europäischen Wissenschaftslandschaft einmalig ist. Dazu gehören u. a. die Expertise auf dem Gebiet der Auftrennung von Proteinen, der Analyse von Glycoproteinen und der Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen

From isolated gene to complex analysis of all genes

The developments in genome research have clearly shown that the isolated gene is frequently no longer at the centre of experimental investigations, but that ideally all genes must be analysed simultaneously with a view to their differential regulation and the resulting expression changes and that further parameters need to be analysed. Expression profiling with DNA or oligonucleotide chips is one approach to investigating the whole transcriptome in 2001. At the GBF, a DNA array expression profiling station was set up early this year. In many experiments, however, a global genome-wide expression chip is not necessary but rather custom-made expression chips, such as an immuno or infection chip, are sufficient. The latter consists of a few hundred genes selectively chosen for the respective experiment, which are amplified and spotted in an in-house laboratory. This technology will also be established at the GBF and will thus be available both to GBF working groups and for cooperation projects.

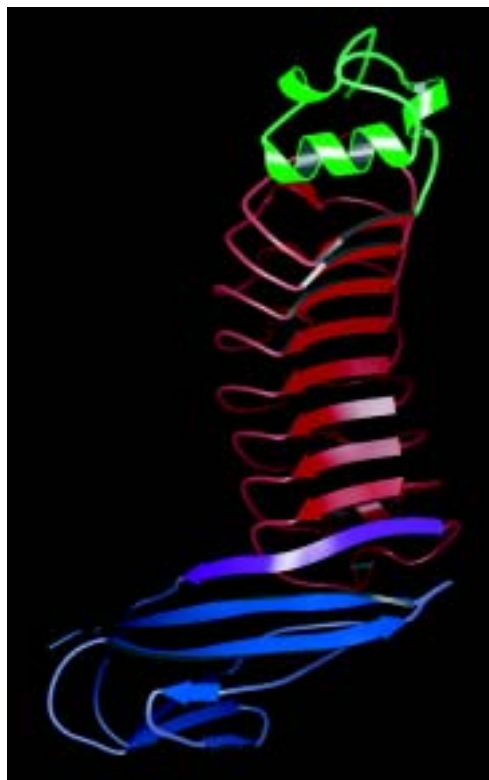
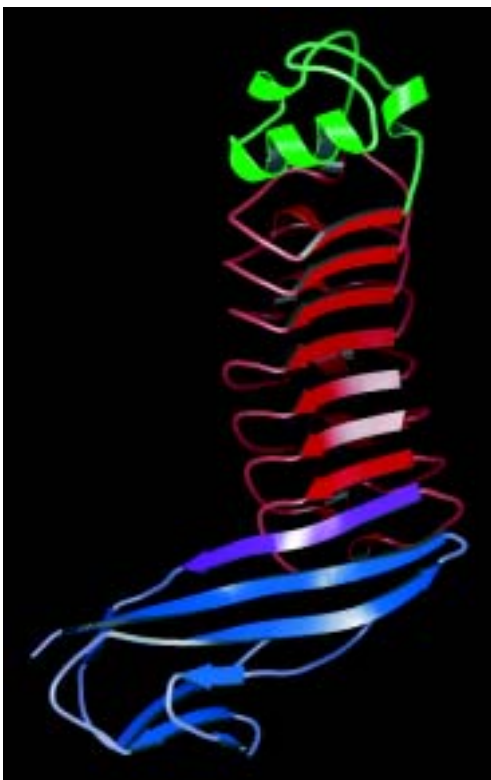
Protein research for target identification in infection processes

Protein research and modern proteomics technologies will be given special significance at GBF in the next years. In addition to the structure elucidation of proteins involved in

infection processes, the GBF also has considerable know-how in the field of protein analysis. If this know-how and the resources can be used to investigate proteins and whole proteomes, the GBF will have a competitive leading position unique in the European science scene. This includes e.g. expertise in the isolation of proteins, in the analysis of glycoproteins and the identification and characterization of proteins by mass spectrometry and protein sequencing. Methods of combinatorial chemistry developed at GBF will help to systematically search for proteins suitable for the diagnosis and/or therapy of infectious diseases using the genetically derived model systems in automated high-throughput processes.

Construction of an antibody library

Antibodies will be among the most important tools of future functional genome research. At the GBF, therefore, the capacity of the antibody laboratory will be expanded with the aim of selectively producing new antibodies for proteins involved in infection processes. Biochemical engineering will integrate the production of preparative quantities of monoclonal antibodies into its research activities. In this field, too, the GBF has facilities unique in Germany, which can be excellently used for dealing with questions of infection, genome and proteome research.



Strukturen der Rezeptorbildungsdomäne vom Internalin B (links) und Internalin H (rechts) von *Listeria monocytogenes*.

Structures of the receptor-binding domain of internalin B (left picture) and the homologous domain of internalin H (right picture) from *L. monocytogenes*.

durch Massenspektrometrie und Proteinsequenzierung. An der GBF entwickelte Methoden der kombinatorischen Chemie werden helfen, mit den genetisch erarbeiteten Modellsystemen in automatisierten Hochdurchsatzverfahren systematisch nach solchen Proteinen zu suchen, die zur Diagnose und/oder Therapie von Infektionskrankheiten geeignet sind.

Aufbau einer Antikörperbibliothek

Zu den wichtigsten Werkzeugen der zukünftigen funktionellen Genomforschung werden Antikörper gehören. An der GBF wird deshalb die Kapazität des Antikörperlabors ausgebaut mit dem Ziel, gezielt neue Antikörper für Proteine, die an Infektionsprozessen beteiligt sind, herzustellen. Die Bioverfahrenstechnik wird die Herstellung präparativer Mengen an monoklonalen Antikörpern in ihre Forschungsaktivitäten integrieren. Auch hier verfügt die GBF über in Deutschland einmalige Möglichkeiten, die für die Bearbeitung von Fragen der Infektions-, Genom- und Proteomforschung hervorragend genutzt werden können.

Probenahme bei einem 50 L Bioreaktor.

Taking a sample of a 50 L bioreactor.



Neue Strategien für die Entwicklung von Impfstoffen

Keine Entwicklung in der Medizin war so erfolgreich wie die Einführung der Vakzinierung. Impfstoffe werden auch in Zukunft zu den wichtigsten Präventivmaßnahmen gehören. In letzter Zeit werden auch starke Anstrengungen unternommen, Impfstoffe für therapeutische Zwecke nutzbar zu machen. Die Forschungsanstrengungen der GBF sind darauf ausgerichtet, neue Strategien für die Entwicklung von Impfstoffen zu entwickeln. Die Anwendung am Menschen steht damit eindeutig im Blickfeld der GBF-Forschung, auch wenn direkt an der GBF keine Klinik angesiedelt ist. Die GBF wird sich aus diesem Grund mit verschiedenen Kliniken über enge Kooperationen in klinisch orientierte Projekte einbringen. Dazu zählt die Produktion von Impfstoffen nach GMP-Standards. Zu unseren klinischen Partnern gehören bereits jetzt die Medizinische Hochschule in Hannover und das Städtische Klinikum in Braunschweig.

Expertise GMP – ein Wettbewerbsvorteil für die GBF

Die GBF ist die einzige nichtindustrielle Einrichtung in Deutschland, die eine Zulassung nach §13 Arzneimittelgesetz besitzt, um medizinische Wirkstoffe für den Einsatz am Menschen nach arzneimittelrechtlichen Regeln – den Vorschriften für die Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice – GMP) herzustellen. Auf Grund ihrer langjährigen Erfahrung ist die GBF auch in der Lage, die der Produktion vorausgehende Prozessentwicklung bis in einen halbindustriellen Maßstab selbst durchzuführen. Hier liegt ein Wettbewerbsvorteil, der eine wichtige Schnittstelle zwischen Grundlagenforschung und klinischer Forschung darstellt. Nach einem Papillomavirenvakzin und diversen DNA-Tumorvakzinen wurde zu Beginn dieses Jahres ein weiteres Projekt zu dieser Thematik begonnen, das sich mit der Prozessentwicklung und der Herstellung von Malaria-Vakzinen befasst.

New strategies for the development of vaccines

No development in medicine has been as successful as the introduction of vaccination. Vaccines will also be among the most important preventive measures in future. Recently, great efforts have also been made to harness vaccines for therapeutic purposes. The GBF's research efforts are aimed at developing new strategies for the development of vaccines. Application in man is thus clearly the focus of GBF research, even though there is no clinic affiliated directly to GBF. For this reason, GBF will take part in clinically oriented projects through close cooperations with various clinics. This will include the production of vaccines according to GMP standards. The Medical University in Hanover and the clinical centre of the city of Braunschweig are already among the clinical partners at present.

GMP expertise – a competitive advantage for GBF

GBF is the only non-industrial institution in Germany with a licence pursuant to § 13 of the Pharmaceuticals Act for the production according to good manufacturing practice (GMP) of medical substances for application in man, as stipulated by drug legislation. Due to many years of experience GBF is also in a position to perform process development prior to production up to a semi-industrial scale. This is a competitive advantage representing an important interface between basic and clinical research. After a papilloma virus vaccine and various DNA tumour vaccines, a further project on this topic was started early this year concerning the process development and production of new malaria vaccines.

The GBF as a regional resource centre

In order to help solve such enumerated scientific problems, the GBF has close contacts with other research institutes. Combined know-how and existing manpower can thus be optimally used. Moreover, many "platform" technologies established in the GBF require considerable investment and highly qualified personnel. Often it is the case that universities are not in a position to build up such resources because of the high costs involved and because such resources require continual upkeep. The GBF thus sees itself as

a resource centre which makes its key facilities available as bases – "platforms" – for process development.

The Technical University of Braunschweig is an excellent partner both in research and further education. Cooperation will be considerably intensified in the future, for example, in the recently approved "special research area" as well as in new proteomics and bio-informatics projects. There is close cooperation with the Medical University of Hanover, Max Planck Institutes, Fraunhofer Institutes and the Veterinary University of Hanover.

Changes at the Helmholtz Association

Apart from the scientific reorientation described above, the GBF will also be faced with a number of organizational and structural changes. Early in 2003, programme-oriented funding will replace current institutional funding in the Helmholtz Association. The individual Helmholtz centres will participate in research programmes in the issue area between cooperation and competition. Within the field of health research GBF takes part in the programmes "Infection and Immunity" as well as "Genome Research". Within the field of environmental research it participates in the "Biodiversity" programme. Programme-oriented funding implies a steering of the research centres according to considerations in which cost transparency and scientific controlling will play an important role. It is not yet clear, however, to what extent public research institutions constrained by staffing schedules, government accounting and collective salary structures can cope with these requirements. The instruments required for the implementation of programme-oriented funding still have to be created. In any case, by positioning itself in health research and by its clear decision to focus its activities on the research of infectious diseases, the GBF has created the prerequisites for its competitiveness in the national and international research scene.

Die GBF als regionales Ressourcen-zentrum

Um die aufgeführten wissenschaftlichen Fragestellungen zu lösen, ist die GBF eng mit anderen Forschungseinrichtungen vernetzt. So kann das gemeinsame Know-how und das vorhandene Potenzial optimal genutzt werden. Viele der in der GBF etablierten Plattformtechnologien erfordern zudem hohe Investitionen und qualifiziertes Personal. Aus Kostengründen, aber auch aus Gründen der erforderlichen Kontinuität, sind universitäre Institute oft nicht in der Lage, entsprechende Ressourcen aufzubauen. Die GBF versteht sich daher als Ressourcenzentrum, das seine Kerneinrichtungen als Plattformen übergreifend zur Verfügung stellt.

Mit der Technischen Universität Braunschweig hat die GBF einen hervorragenden Partner in Forschung und Ausbildung. Die Zusammenarbeit beispielsweise in einem kürzlich bewilligten Sonderforschungsbereich sowie neuer Proteomics- und Bioinformatikprojekte soll in den nächsten Jahren noch erheblich intensiviert werden. Sehr eng ist auch die Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover, Max-Planck-Instituten, Fraunhofer-Instituten sowie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

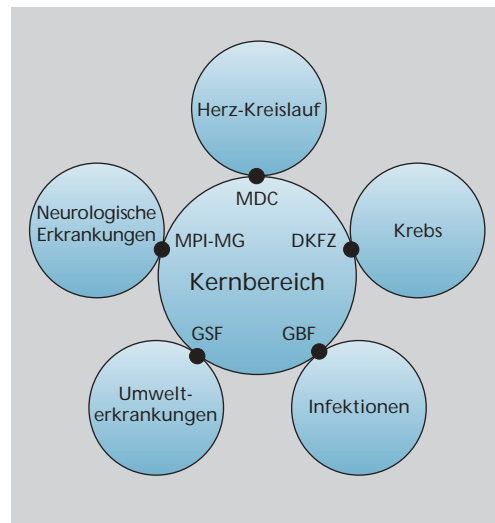
Wandel der Helmholtz-Gemeinschaft

Neben der genannten wissenschaftlichen Neuausrichtung werden auch eine Reihe von organisatorischen und strukturellen Änderungen auf die GBF zukommen. Anfang 2003 wird die programmorientierte Förderung die bisherige institutionelle Förderung in der Helmholtz-Gemeinschaft ablösen. Im Spannungsfeld zwischen Kooperation und Wettbewerb werden sich die einzelnen Helmholtz-Zentren an Forschungsprogrammen beteiligen. Die GBF nimmt innerhalb des Forschungsbereiches Gesundheit an den Programmen „Infektion und Immunität“ sowie „Genomforschung“ teil. Innerhalb des Forschungsbereiches Umwelt beteiligt sie sich an dem Programm „Biodiversität“. Programmorientierte Förderung beinhaltet eine Steuerung der Forschungszentren nach Gesichtspunkten, in denen Kostentransparenz und wissenschaftliches Controlling eine bedeutende Rolle spielen werden. Noch ist offen, inwieweit öffentliche Forschungseinrichtungen im Korsett von Stellenplan, Kameralistik und BAT-Gehaltsstrukturen diesen Anforderungen gewachsen sein können. Die notwendigen Instrumente für die Umsetzung der programmorientierten Förderung müssen erst noch geschaffen werden. Die GBF hat jedenfalls durch ihre Positionierung in der Gesundheitsforschung und die klare Entscheidung, den Schwerpunkt ihrer Aktivitäten auf die Erforschung von Infektionskrankheiten zu legen, die Voraussetzungen für ihre Wettbewerbsfähigkeit in der nationalen und internationalen Forschungslandschaft geschaffen.

Mit Genomforschung gegen Infektionskrankheiten

GBF übernimmt eine Schlüsselrolle im Nationalen Genomforschungsnetz

Bundesforschungsministerin Edelgard Bulmahn hat die GBF im März 2001 zu einer von fünf Einrichtungen im Kernbereich des Nationalen Genomforschungsnetz erklärt. Mit der vorhandenen Expertise und der Fokussierung auf die



Übersicht des Nationalen Genomforschungsnetzes: der Kernbereich und die fünf medizinischen Netzwerke.

Gebiete Infektions- und Genomforschung ist die GBF prädestiniert, eine wichtige Rolle im Netzwerk zu übernehmen. In den kommenden drei Jahren sollen mit Projektmitteln von 9,4 Mio. DM etablierte Plattformen aus- und neue aufgebaut werden. Für die Entwicklung von Plattformtechnologien werden weitere 5,4 Mio. DM an das von der GBF koordinierte Kompetenzzentrum Bioinformatik vergeben. Braunschweig bekommt somit in den nächsten drei Jahren einen kräftigen Schub als Standort der Genomforschung für Infektionskrankheiten. Infektionskrankheiten sind weltweit für ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich. Sie gehören zu den großen Volkskrankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Allergien.

Das nationale Genomforschungsnetz

Das nationale Genomforschungsnetz wird sich auf fünf Krankheitsbereiche konzentrieren: Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Erkrankungen des Nervensystems, Infektionskrankheiten sowie umweltbedingte Erkrankungen. Es besteht aus einem Kernbereich, der von fünf Instituten gebildet wird: dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, dem Max Delbrück Centrum für molekulare Medizin (MDC) sowie dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (MPI-MG). Außerdem werden fünf krankheitsspezifische medizinische Netzwerke aufgebaut, in denen die Erkenntnisse der Genomforschung zu einem umfassenden Verständnis der betrachteten Krankheiten führen sollen. Ferner werden zwei Technologieplattformen Bioinformatik und Proteomforschung gebildet, die als Querschnittstechnologien wichtige Aufgaben und Funktionen im Genomforschungsnetz abdecken.

Seite 13
Titelbild der Zeitschrift **Molecular Microbiology**, Vol. 40 (1), 2001, anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes "The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells" von Molinari G, Rohde M, Talay SR, Chhatwal GS, Beckert S, Podbielski A, S. 1-17. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlages.

Page 13
Cover picture of the **Molecular Microbiology**, Vol. 40 (1), 2001, on the occasion of the publication of the article "The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells" from Molinari G, Rohde M, Talay SR, Chhatwal GS, Beckert S, Podbielski A, pp. 1-17. The permission of Blackwell Publishing is gratefully acknowledged.

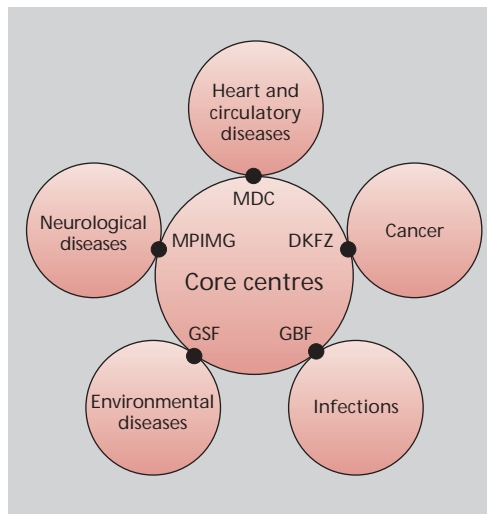
Genome Research Against Infectious Diseases

GBF takes on a key role in the National Genome Research Network

In March 2001 German federal research minister Edelgard Bulmahn declared the GBF to be one of five core institutions of the National Genome Research Network. With its expertise and focus on the fields of infection and genome research the GBF is destined to take on an important role in the network. In the coming three years, established platforms are to be expanded and new ones built up with project funds of DM 9.4 million. For the development of platform technologies, another DM 5.4 million will be allocated to the centre of competence for bioinformatics coordinated by GBF. Braunschweig will thus be given a vigorous impetus in the next three years as a site of genome research for infectious diseases. Infectious diseases are responsible for one third of all cases of death worldwide. They rank among the major widespread diseases such as cancer, cardiovascular diseases or allergies.

The National Genome Research Network

The National Genome Research Network will concentrate on five fields of diseases: cardiovascular diseases, cancer, diseases of the nervous system, infectious diseases as well as environmentally induced diseases. It consists of a core unit formed by five institutes: the German Cancer Research Centre (DKFZ), the German Research Centre for Biotechnology (GBF), the Research Centre for Environment and Health (GSF), the Max Delbrück Centre for Molecular Medicine (MDC) and the Max Planck Institute for Molecular Genetics (MPIMG). Moreover, five disease-specific medical networks will be built up, in which the findings of genome research are intended to lead to a comprehensive understanding of the diseases under consideration. Furthermore, two technology platforms for bioinformatics and proteome research will be established to cover important tasks and functions in the genome research network in their capacity as cross-sectional technologies.



Overview of the National Genome Research Network: core and five medical networks.



Dr. Helmut Blöcker, Leiter der Genomforschung an der GBF, im Gespräch mit asiatischen Journalisten.

Dr. Helmut Blöcker, head of genome research at the GBF, talking with journalists from Asia.

Seite 14

Titelbild der Zeitschrift *Cellular Microbiology*, Vol. 2 (2), 2000, anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes "Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells" von Molinari G, Rohde M, Guzmán CA, Chhatwal GS, S. 145-154. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlages.

Page 14

Cover picture of the *Cellular Microbiology*, Vol. 2 (2), 2000, on the occasion of the publication of the article "Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells" from Molinari G, Rohde M, Guzmán CA, Chhatwal GS, pp. 145-154. The permission of Blackwell Publishing is gratefully acknowledged.



Prof. Dr. G. S. Chhatwal
Abt. Mikrobielle Pathogenität
und Impfstoffforschung | Dept.
of Microbial Pathogenicity and
Vaccine

Streptokokken – Krankheitserreger mit verblüffender Pathogenese

1994 starben in der Grafschaft Gloucestershire viele Menschen innerhalb kurzer Zeit an nekrotisierender Faszitis als Folge einer Infektion. Die verursachenden Bakterien wurden dann von Seiten der Medien als „Killerbakterien“ oder „fleischfressende Bakterien“ bezeichnet. Meldungen über gefräßige Bakterien haben die ganz Welt in Schrecken versetzt. Bei diesen Bakterien handelte es sich weder um ein neues Phänomen noch um einen neuen Erreger, sondern um Gruppe A Streptokokken, die seit vielen Jahrzehnten bekannt sind. Die Streptokokken bleiben immer noch ein Rätsel für Mediziner, Gesundheitsexperten und die Wissenschaft. Streptokokken sind in der Lage, viele verschiedene Krankheiten bei Mensch und Tier zu verursachen. Die Pathogenese von Streptokokken ist so verblüffend, dass die Infektion durch Streptokokken bis heute nicht richtig erklärt werden kann. Die Strategien der Streptokokken, den Wirt auszutricksen, sind sehr raffiniert. Um die spezifische Immunabwehr zu umgehen, kommen sie in Hunderten verschiedener Typen vor; sie binden Wirtsproteine zum eigenen Vorteil, um dadurch im Wirt Fuß zu fassen; sie zwingen die Wirtszellen, sie aufzunehmen, um dadurch persistieren zu können und die Wirkung der Antibiotika zu umgehen; sie besitzen Oberflächenproteine, die denen einiger Wirtsproteine so ähnlich sind, dass es zu einer Autoimmunreaktion kommt; sie sind in der Lage, genetisches Material horizontal an andere Streptokokkenserotypen und -spezies zu transferieren, um epidemiologische Erfassung zu erschweren; einige von ihnen sind Künstler darin, Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln. Alle diese Eigenschaften machen Streptokokken zu einem großen Gesundheitsproblem und zu einer Herausforderung für Wissenschaftler und Kliniker.

Streptokokken sind kugelförmige Bakterien, die in Ketten wachsen. Erstmals wurden sie 1874 durch Billroth beschrieben, der auch den Namen *Streptococcus* (aus zwei griechischen

Wörtern: *streptos* = Kette und *kokhos* = Beere) prägte. Am Anfang wurden die Streptokokken entsprechend der durch sie verursachten Krankheiten klassifiziert, bis die große alte Dame der Streptokokken, Rebecca Lancefield, in den dreißiger Jahren die Klassifizierung der Streptokokken anhand gruppenspezifischer Polysaccharide einführte. Bis jetzt sind 13 verschiedene serologische Gruppen von Streptokokken identifiziert, davon sind Streptokokken der Gruppe A, B, C, G und *S. pneumoniae* von großer gesundheitlicher Bedeutung. Gruppe A Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*) sind ausschließlich in menschliche Erkrankungen involviert. Gruppe B Streptokokken (*S. agalactiae*) sind für schwerwiegende Erkrankungen bei Neugeborenen verantwortlich. Gruppe C und G Streptokokken, die häufig bei Tierinfektionen vorkommen, gewinnen zunehmend auch für menschliche Erkrankungen an Bedeutung. *S. pneumoniae* zählen wegen der sich rasch entwickelnden Antibiotikaresistenzen zu den wichtigen humanpathogenen Bakterien.

Gruppe A Streptokokken (GAS)

GAS sind die Hauptverursacher von Streptokokkeninfektionen beim Menschen. Die Erreger siedeln sich in der Mundschleimhaut, im Atemtrakt, in der Schleimhaut der Rachenmandeln sowie auf der Haut an und rufen eine Vielzahl fieberhafter Krankheiten hervor, wie z.B. Tonsillitis, Pharyngitis, Scharlach und eiternde Hautentzündungen. Obwohl bekannt ist, dass GAS diese Krankheiten verursachen können, sind die schwerwiegenden Folgen dieser Infektionen nicht sehr bekannt. Rheumatisches Fieber und darauf folgend rheumatische Krankheit sind die Folgeerkrankungen, bei denen eine Entzündung der Herzklappen zur Zerstörung derselben führt und den Ersatz durch künstliche Herzklappen erforderlich macht. Zur Zeit leiden ca. 15 Mio. zwischen 5 und 15 Jahren an diesen Nachfolgeerkrankungen, dazu kommen 1 Mio. neue Fälle pro Jahr, was die Bedeutung der Streptokokkeninfektionen

Streptococci – persistent pathogens with perplexing properties

In 1994, many people died in the county of Gloucestershire within a short period of time due to necrotizing fasciitis, resulting from an infection. The causative bacteria were then labelled by the media as “killer bacteria”. The whole world was shocked to read about the flesh-eating bacteria. These bacteria were neither a new phenomenon nor an emerging pathogen. The infections were caused by group A streptococci, which had been identified many decades before. The streptococci have continued to be a puzzle for clinicians, scientists and the public health personnel. Streptococci can cause a wide spectrum of diseases in humans and animals. The pathogenesis of streptococci is so perplexing that the infections caused by these organisms have never been completely understood. The strategy of streptococci to outwit their host is absolutely genial. They evade host immune defence by appearing in hundreds of different serotypes; they bind and exploit host proteins for their own advantage and for establishing themselves in the host; they trigger their own internalization by host cells so that they can persist and evade the antibiotic reaction; they express surface proteins with similarity to host protein, which leads to autoimmune reactions; they are capable of transferring the genetic material horizontally to other streptococcal serotypes and species, making the epidemiological analysis very difficult; some of them are real artists in developing antibiotic resistance. And this list of perplexing properties is far from complete. Streptococci therefore remain a big health hazard and a challenge for scientists and clinicians.

*Streptococci are global organisms growing in chains. They were first described in 1874 by Billroth, who also used the term streptococcus (from two Greek words: streptos = chain, kokhos = berry). In the beginning, the streptococci were classified according to the disease they caused, until the grand lady of streptococci, Rebecca Lancefield, introduced the classification of streptococci in the 30ties. This classification was based on the presence of group specific polysaccharides. 13 different serological groups have so far been identified, out of which group A, B, C and G and S. pneumoniae are most important. Group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*) are the major human pathogen, causing a wide spectrum of diseases. Group B streptococci (*S. agalactiae*) are responsible for diseases of new-born. Group C and group G streptococci, which very often cause diseases in animals, are gaining importance for human health. *S. pneumoniae*, because of increasing antibiotic resistance, is becoming more and more of a health hazard.*

Group A streptococci (GAS)

Group A streptococci are the major cause of streptococcal infections in human beings. The organisms colonize oral mucosa and skin and cause a wide spectrum of pyogenic infections, such as tonsillitis, pharyngitis, scarlet fever, and skin inflammation. Although it is well known that GAS can cause these infections, not many people know about the serious post infection complications. Rheumatic fever and subsequent rheumatic heart disease are post streptococcal infection complications which involve inflammation of and damage to heart valves, requiring their replacement. About 15 million children between the age of 5 and 15 are suffering from rheumatic heart disease, approximately 1 million new cases are registered every year, which underlines the importance of streptococci as a serious health problem. Another complication of streptococcal infection is glomerulonephritis, which very often leads to kidney failure.

als ein großes Gesundheitsproblem bestätigt. Darüber hinaus kann es nach einer Streptokokkeninfektion zur Entzündung der Nieren und damit verbundenem Nierenversagen kommen.

Bis 1980 wurden GAS-Infektionen nicht als ernstes Gesundheitsproblem gesehen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden sie als unangenehme Kinderkrankheiten eingestuft. Seit 1980 jedoch sind GAS-Infektionen zu einer großen Bedrohung geworden. Aus allen Teilen der Welt mehren sich die Meldungen über eine steigende Zahl von Krankheitsfällen. Dieser Anstieg ist auch bei Bevölkerungsschichten zu beobachten, die medizinisch ausreichend versorgt werden. Das Wiederaufleben von Streptokokkeninfektionen wurde von zunehmenden Berichten über schwere und lebensbedrohliche Infektionen begleitet. Viele dieser Berichte beschreiben Patienten mit nekrotisierender Fasziitis. Diese Krankheit, die mit kleinen Hautverletzungen beginnt, kann sich jedoch schnell ausbreiten und umliegendes Gewebe zerstören. Trotz intensiver Behandlung mit Antibiotika entwickelt sich die Infektion sehr schnell und kann zu systemischen Erkrankungen bis hin zum Tod führen. Eine andere durch GAS verursachte lebensbedrohliche Komplikation ist das toxic shock-like Syndrom. Diese Krankheit beginnt häufig mit Fieber und starken Schmerzen und kann rasch zu multiplen Organversagen, Schock und Tod führen. Die Sterblichkeitsrate bei derartigen schweren

Fällen liegt über 30 %, weshalb es zu der Bezeichnung "Killerbakterien" kam. Die Gründe für das Wiederaufleben der Streptokokkeninfektion sind noch nicht klar, sie kann jedoch nicht nur als eine epidemiologische Kuriosität abgetan werden. Es erfordert vielmehr die Beachtung sowohl durch Mediziner und Gesundheitsbehörden als auch durch Personen, die in der klinischen Grundlagenforschung tätig sind. Das Gesamtspektrum der Krankheiten durch Gruppe A Streptokokken ist in Abbildung 1 beschrieben.

Zelluläre Struktur der Gruppe A Streptokokken

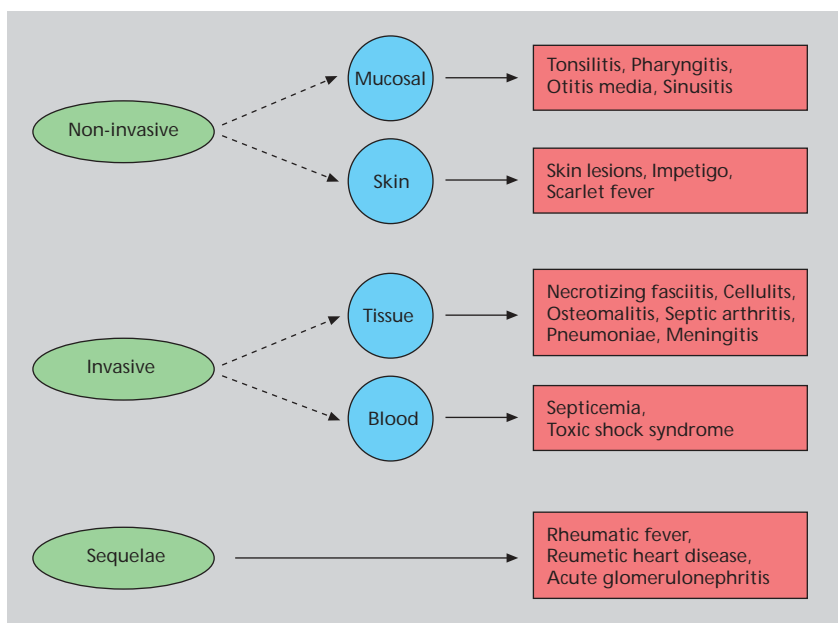
Die wichtigen strukturellen Komponenten der Gruppe A Streptokokken können grob in drei Kategorien eingeteilt werden (Abb. 2):

- Kapsel, gruppenspezifische Kohlenhydrate, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure
- an Zelloberflächen verankerte Proteine
- sezernierende Faktoren

Einige dieser Komponenten, insbesondere die Zelloberflächenproteine, sind wichtige Pathogenitätsfaktoren und bestimmen maßgeblich den Infektionsverlauf. Die Streptokokken sind mit einer Hyaluronsäurekapsel umhüllt, was bei der Pathogenität eine Rolle durch Resistenz gegen Phagozytose spielt. Die Streptokokken besitzen auch gruppenspezifische Polysaccharide. Diese Kohlenhydrate spielen keine Rolle bei der Infektion, aber die Antikörper gegen diese Polysaccharide finden eine Anwendung bei der Diagnose und Klassifizierung der Streptokokken. Die Streptokokken haben auch Peptidoglykan und Lipoteichonsäure als Strukturbestandteile, deren Rolle bei Infektion unklar ist. Neben der Kapsel spielen die Oberflächenproteine eine wichtige Rolle bei der Infektion. Zu diesen Proteinen gehören u.a. M-, T- und R-Proteine, Fibronektin bindende und andere Matrix bindende Proteine, Immunglobulin bindende Proteine, Opazitätätsfaktor, C5a-Peptidase usw. Diese Proteine sind durch einen Membrananker im C-Terminalbereich auf der Oberfläche verankert. Dieser Membrananker hat eine Anordnung von hydrophoben und geladenen Aminosäuren, wobei der hydrophoben

Abb. 1. Krankheitsspektrum der Gruppe A Streptokokken-Infektionen

Fig. 1. Disease spectrum of group A streptococcal infections

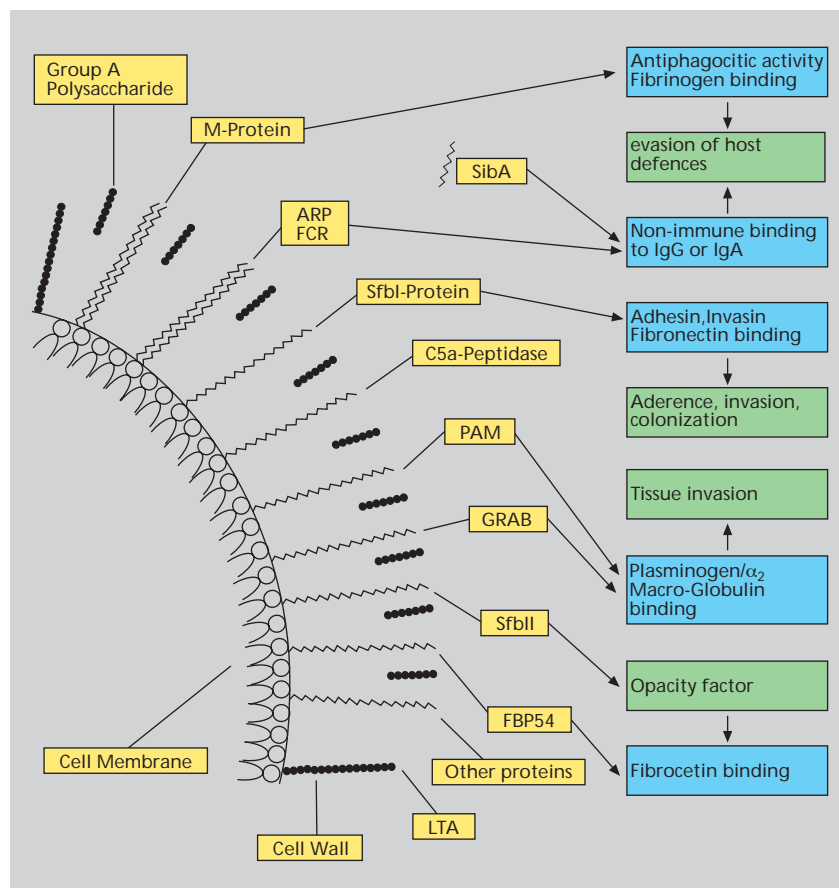


Until 1980, GAS infections were not considered a serious health problem and, with few exceptions, were regarded as an irritation by the pediatricians. Since 1980, group A streptococcal infections have re-emerged as a serious health problem. From all parts of the world increased numbers of streptococcal diseases were registered. The increase in streptococcal infections was also observed in populations with access to excellent medical facilities. The resurgence of these infections was accompanied by reports of serious and life-threatening diseases. Many of these reports described patients with necrotizing fasciitis, a streptococcal disease which starts with a small skin wound and can spread very fast, and leads to the extensive damage of the tissue. In spite of antibiotic treatment the infection develops rapidly and can lead to systemic disease and even death. One complication of invasive streptococcal infection is toxic shock syndrome. The disease often starts with fever and intensive pain and can rapidly lead to multiple organ failure, shock and death. The mortality rate in these cases is about 30 %, which explains the designation of "killer bacteria" for group A streptococci. The reasons for the resurgence of streptococcal infections are not completely understood, but it cannot be taken as an epidemiologic curiosity. The attention of clinicians, public health people and the basic scientists is required to understand this phenomenon and define the strategies for the control and management of these infections. The spectrum of the diseases caused by group A streptococci is illustrated in Fig. 1.

Cell structure of group A streptococci

Group A streptococci have been extensively studied and several structural components and their biological functions have been identified (Fig. 2). These components can roughly be divided into three categories:

- capsule, group specific carbohydrates, peptidoglycan and lipoteichoic acid
- proteins anchored on the cell surface
- secreted factors.



Many of these components, especially the cell surface proteins, are important pathogenicity factors, which determine the progress of the infection. The streptococci are covered with a hyaluronic acid capsule, which plays a role as antiphagocytic factor. The group specific polysaccharides of streptococci do not play a role in the infection, but antibodies against these polysaccharides are extensively used for the diagnosis and classification. The streptococci also possess peptidoglycan and lipoteichoic acid as a part of their structure, whose role in the pathogenesis is not yet clear. Beside capsule, the surface proteins are considered as important pathogenicity factors. These proteins include M, T and R proteins, fibronectin and other matrix binding proteins, immuno-globulin binding proteins, opacity factors, C5a peptidase etc. These proteins are anchored on the surface by their C-terminal end at which the membrane anchor is located. The membrane anchor consists of hydrophobic and charged amino acid sequences, with a highly conserved 6 amino acid sequence. M protein and fibronectin binding proteins are the most important virulence factors of group A streptococci.

Abb. 2. Strukturelle Komponenten der Gruppe A Streptokokken und ihre biologische Funktion

Fig. 2. Structural components of group A streptococci and their biological functions

Region immer eine kurze, evolutiv kaum veränderte Sequenz von sechs Aminosäuren vorgelagert ist. M-Protein und Fibronektin bindende Proteine sind jedoch die wichtigsten Virulenzfaktoren bei Gruppe A Streptokokken.

Verlauf der Gruppe A Streptokokken-Infektion

Die Infektion beginnt mit dem Kontakt, entweder in der Mundhöhle oder durch Wunden auf der Haut. Danach erfolgen Anheftung und Kolonisierung. Im Mundhöhlenbereich findet die Anheftung an Schleimhaut und in Wunden meist an Fibringerinnseln statt. Die weitere Vermehrung ist abhängig von der anti-phagozytischen Wirkung der Isolate. Die invasiven Eigenschaften der Streptokokken sowie die genetische Suszeptibilität des Wirtes bestimmen den weiteren Verlauf der Infektion, und es kann zu verschiedenen Krankheitsformen kommen. Drei bis sechs Monate nach der primären Infektion können dann bei anfälligen Personen Nachfolgerkrankungen wie rheumatisches Fieber oder Nierenentzündung auftreten. Der Verlauf der Gruppe A Streptokokkeninfektionen ist in Abb. 3 dargestellt.

Das M-Protein

M-Protein stellt das Hauptoberflächenprotein der Streptokokken dar und verleiht den Streptokokken Resistenz gegenüber Phagozytose. M-Protein hat die Fähigkeit, an Wirtsproteine wie Fibrinogen oder den Komplementfaktor H zu binden und damit in die Aktivierung des alternativen Komplementsystemweges einzugreifen. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Antigenreaktivität sind ca. 100 verschiedene Serotypen des M-Proteins bekannt. Bis auf wenige Ausnahmen wird pro Stamm nur ein Serotyp gebildet. Die Antikörper gegen M-Protein bieten einen effektiven Schutz vor nachfolgenden

Infektionen, aber nur mit dem homologen M-Typ. Aufgrund dieser Eigenschaften stellte das M-Protein das schützende Antigen der Wahl dar. Daher stand M-Protein für zwei Jahrzehnte im Mittelpunkt der Streptokokkenforschung. So gewann man zahlreiche Erkenntnisse über die Struktur und Funktion des M-Proteins. Die komplette Sequenz verschiedener M-Protein-Serotypen ist bekannt, und B- und T-Zell-Epitope wurden identifiziert. Die Struktur des M-Proteins beinhaltet repetitive Sequenzen und einen konservierten Anker. Die vier Repeat-Blöcke des M-Proteins, A, B, C und D, unterscheiden sich hinsichtlich Größe und Sequenz. Beim Sequenzvergleich zwischen M-Protein und verschiedenen Wirtsproteinen zeigt sich eine große Übereinstimmung mit menschlichem Myosin und Tropomyosin. Diese Ähnlichkeit kann immunologische Konsequenzen haben, wenn auch die genaue Rolle des M-Proteins bei der Entstehung rheumatischer Herzerkrankung noch nicht geklärt ist.

Anheftung der Streptokokken an die Wirtszelle

Die Anheftung der Streptokokken an eine Wirtszelle ist ein essentieller Schritt für die Entstehung einer Infektion. Für die Anheftung sind die Adhäsine auf der Bakterienoberfläche und spezifische Rezeptoren auf der Wirtszelle notwendig. Im Falle der Gruppe A Streptokokken handelt es sich um einen besonders interessanten Anheftungsmechanismus. Die Anheftung geschieht nicht direkt über die Bindungsadhäsine an die Zellwand der Wirtszelle, sondern wird über ein weiteres Wirtsprotein, das Fibronektin, vermittelt. Fibronektin ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das in löslicher Form in Plasma und verschiedenen anderen Körperflüssigkeiten und in nichtlöslicher Form in der extrazellulären Matrix vorkommt. Es ist ein multifunktionales Protein, das eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung von Zellen mit extrazellulären Bestandteilen spielt. Aufgrund seiner Fähigkeit, an Epithelzellen des Wirtes und auch an Streptokokken zu binden, wird es als wichtiges Bindeglied bei der Anheftung von Streptokokken angesehen.

Course of group A streptococcal infections

The infection begins with the contact, either in the oral cavity, or to a skin wound. This is followed by adherence and colonization of bacteria in the oral mucosa or at the fibrin clots of the wound. The further progression of the disease depends on the antiphagocytic capability of the isolates. The form of the disease which develops is determined by the invasive capabilities of the isolates and the genetic susceptibility of the host. Three to six months after the primary infection, post infection complications such as rheumatic fever or glomeronephritis are induced in predisposed individuals. The course of group A streptococcal infections is illustrated in Fig. 3.

M protein of group A streptococci

M protein is a major surface protein of streptococci, which enables the organism to resist phagocytosis. M protein is capable of binding to fibrinogen and complement factor H leading to the activation of alternate complement pathway. Because of antigen variation, M protein exists as approximately 100 different serotypes. With a few exceptions, one strain expresses only one type of protein. Anti M protein antibodies provide a type-specific protection against infection in animal models. Because of these properties, M protein has been regarded as a choice protective antigen. M protein, therefore, has been a focus of interest for the last two decades. These studies led to the structure and function elucidation of M protein. The complete sequence of various M serotypes is known, and B and T cell epitopes have been identified. The structural features of M protein include repetitive sequences and a conserved anchor. The four repeat blocks of M protein, A, B, C and D, differ from each other in their size and sequence. A comparative sequence analysis between M protein and different human proteins showed a significant homology with myosin and tropomyosin. These similarities can have immunological consequences, although the exact role of M protein in the induction of rheumatic heart disease has not yet been elucidated.

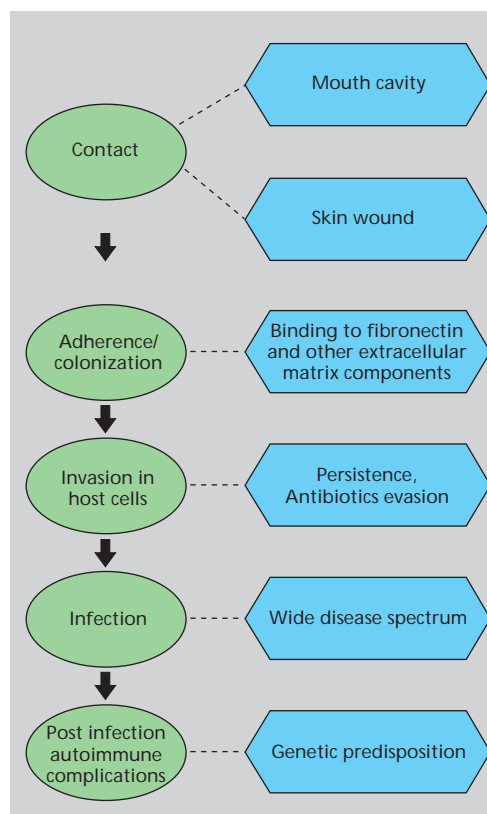


Abb. 3. Schematische Darstellung des Verlaufs von Gruppe A Streptokokken-Infektionen

Fig. 3. Course of group A streptococcal infections

Adherence of streptococci to host cells

The adherence of streptococci to host cells is an essential step for the initiation of an infection. The adhesins on the bacterial surface and the specific receptor in the host cells are involved in the adherence. In the case of group A streptococci, the adherence mechanism is interesting in the sense that the adherence does not take place directly with adhesins and host cell, but is mediated through a host protein, fibronectin. Fibronectin is a high molecular glycoprotein, which is present in soluble form in plasma and other body fluids, and in insoluble form in the extracellular matrix. It is a multifunctional protein and plays an important role in the interactions of cells with extracellular matrix. Because of its capability of binding to both host cells and streptococci it is considered as an essential bridging molecule in streptococcal adherence.

Sfbl-Protein als Hauptadhäsion der Gruppe A Streptokokken

Die Fibronectinbindungsstelle wurde erstmals in der GBF als ein Oberflächenprotein identifiziert und als Sfbl-Protein bezeichnet. Durch Sequenzanalyse wurde die Fibronectinbindungsdomäne bis auf ein 37 Aminosäuren umfassendes Epitop eingeschränkt, das als repetitiver Bereich auf dem Sfbl-Protein vorliegt. Proteinstrukturanalysen erlaubten die Zuordnung weiterer funktioneller Bereiche, wie z.B. der Signalsequenz des Membranankers sowie Membran- und Zellwand-assoziiertes Epitope. Sfbl-Protein spielt eine wichtige Rolle bei Pathogenität und hemmt kompetitiv die Bindung der Streptokokken an Fibronectin und deren Adhärenz an kultivierte menschliche Epithelzellen. Poly- und monoklonale Antikörper gegen das gereinigte Sfbl-Protein blockieren die Fibronectin-Bindung der Streptokokken und reagieren mit Oberflächenkomponenten verschiedener Gruppe A Streptokokken. Das Auftreten des Sfbl-Protein-Gens korreliert sehr gut mit dem Fibronectin-Bindungsvermögen und der Epithelzell-Adhärenz der Streptokokken.

Sfbl-Protein besitzt eine zusätzliche Bindungsdomäne, die strukturell andersartig ist als die bisher charakterisierten Fibronectinbindungsrepeats. Die zweite Bindungsdomäne, Spacer genannt, kann funktionell auf 30 Aminosäuren eingeschränkt werden. Diese beiden Domänen interagieren mit drei verschiedenen Bereichen des Fibronectins. Die Sfbl Repeat Region zeigt eine hoch affine Bindung zu

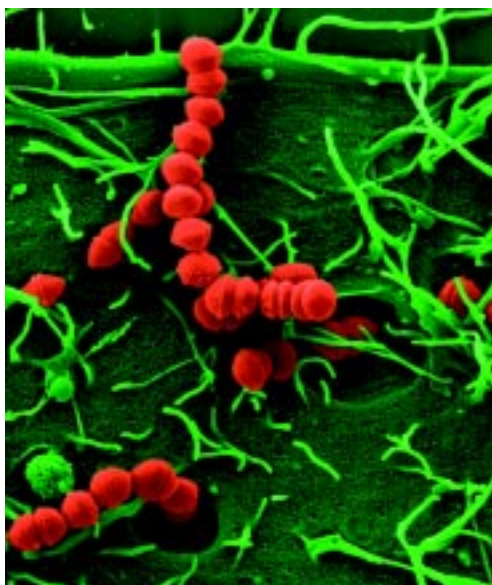
dem 30 kD N-terminalen Fibronectinfragment und eine niedrig affine Bindung zu dem 120 kD C-terminalen Fibronectinfragment. Darüber hinaus kann die Bindungsregion der Sfbl Spacer Region auf einem 45 kD Fibronectinfragment lokalisiert werden, welches sich zwischen dem 30 kD und 120 kD Fragment des Fibronectins befindet. Die Bindung der Spacer Region ist ebenfalls hoch affin.

Gruppe A Streptokokken-Invasion

Gruppe A Streptokokken werden traditionell als extrazelluläre Pathogene eingestuft. Sie sind in der Lage, verschiedene Wirtsgewebe zu kolonisieren und extrazelluläre Infektionen zu verursachen. Da sie auch invasive Infektionen verursachen können, liegt die Vermutung nahe, dass Streptokokken auch als intrazelluläre Pathogene fungieren können. Diese Eigenschaften kommen in einer Großzahl von Gruppe A Streptokokken-Isolaten vor (Abb. 4). Es gibt einen Zusammenhang zwischen Invasion und Herkunft des Isolates. Die Isolate aus Hals- und Hautinfektionen sind nicht nur sehr invasiv, sondern sind auch in der Lage, intrazellulär zu überleben. Eine Vielzahl invasiver Streptokokkenisolate zeigen eine starke, durch Sfbl vermittelte Fibronectinbindung. Sfbl spielt nicht nur in der Anheftung, sondern auch bei der Invasion eine entscheidende Rolle. Latexkugeln, die mit Sfbl-Protein ummantelt sind, können sehr schnell von HEP2-Zellen aufgenommen werden, so daß Sfbl die Internalisierung von Streptokokken allein auslösen kann. Die Fibronectin bindende Spacerdomäne spielt eine entscheidende Rolle bei der Invasion. Dies geschieht durch kooperative Bindung von Fibronectin an beide bindende Domänen des Sfbl-Proteins. Die Bindung des 30 kDa Fibronectinfragments an die Repeatregion des Sfbl-Proteins aktiviert die Bindung von 45 kDa an die Spacerregion. Diese Aktivierung führt dann zur Invasion der Streptokokken in eukaryontische Zellen. Die Mechanismen der Sfbl-vermittelten Anheftung und Invasion sind in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Streptokokkenanheftung und -invasion in Epithelzellen

Fig. 4. Scanning electron microscopic image of streptococcal adherence and invasion in epithelial cells

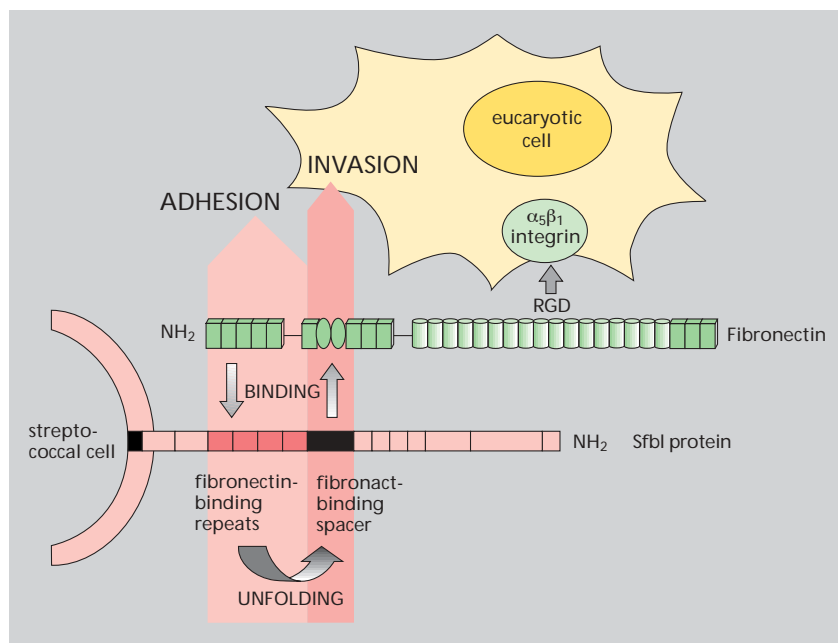


SfbI protein, a major adhesin of group A streptococci

The fibronectin binding site of streptococci was identified as a surface protein for the first time in the GBF and was designated SfbI protein. The sequence analysis shows that the fibronectin binding domain consists of 37 amino acids, which occurs as repetitive domain in SfbI protein. Other functional epitopes, such as signal sequence, membrane anchor, etc., were similar to many other Gram positive surface proteins. SfbI proteins plays an important role in the pathogenesis and is capable of competitively inhibiting the binding of streptococci to fibronectin and their adherence to human epithelial cells. Anti SfbI antibodies can also block the fibronectin binding to streptococci and react with many different group A streptococcal strains. The presence of SfbI gene correlates very well with the fibronectin binding capacity and the epithelial cell adherence of streptococci. SfbI protein also has an additional binding domain for fibronectin, which is structurally different from the fibronectin binding repeats. This binding domain, designated spacer domain, consists of 30 amino acids. Both binding domains of SfbI protein interact with three different domains of fibronectin. The repeat region has a high affinity for 30 kD N-terminal fibronectin fragment, and a low affinity for 120 kD C-terminal fragment. The spacer region binds to 45 kD fibronectin fragment, which is located between 30 kD and 120 kD fragment. The binding of spacer region to fibronectin is also a high affinity binding.

Group A streptococcal invasion

Group A streptococci are traditionally considered as extracellular pathogens. They can colonize different tissues to cause extracellular infections. Because group A streptococci can also cause invasive infections, it is assumed that they might also act as intracellular pathogens. These properties have now been described for a large number of group A streptococcal isolates (Fig. 4). The invasion of streptococci is correlated to the source of the isolate. The isolates from throat and skin infections are not only very invasive but are also capable of surviving intracellularly. A number of invasive streptococcal isolates show a strong SfbI mediated fibronectin binding. SfbI therefore plays not only a role in the adherence, but also in the



invasion of streptococci. Latex beads, coated with purified SfbI proteins, are rapidly internalized by epithelial cells, indicating that SfbI per se is sufficient for the invasion. In this process the fibronectin binding spacer domain plays a decisive role. This happens through a cooperative binding of both binding domains of SfbI protein to fibronectin. The binding of 30 kD fibronectin domain to the repeat region of SfbI protein activates the binding of 45 kD to spacer region. This activation is a prerequisite for the invasion of streptococci in eucaryotic cells. The mechanisms of SfbI mediated adherence and invasion are depicted in Fig. 5.

Sequelae of streptococcal infections

Rheumatic fever and glomerulonephritis are important sequelae of group A streptococcal infections. Although the exact mechanisms of rheumatic fever are not yet elucidated it is assumed that this disease results from an abnormal immune response to an untreated or not fully treated streptococcal pharyngitis. The manifestations of rheumatic fever, such as arthritis, chorea and carditis, are observed in all parts of the world, although in some countries the incidence rate is quite high. Approximately half of all children with heart disease suffer from rheumatic fever and rheumatic heart disease. A unique epidemiological observation is the high incidence of rheumatic heart disease in Aboriginal population in Australia and in Maoris in New Zealand. The reasons for this are not yet known, but it seems that the

Abb. 5. Mechanismen der SfbI-vermittelten Anheftung und Invasion der Gruppe A Streptokokken

Fig. 5. Mechanism of SfbI mediated adherence and invasion of group A streptococci

Nachfolgerkrankungen der Streptokokkeninfektionen

Rheumatisches Fieber und Glomerulonephritis sind die wichtigsten Nachfolgerkrankungen der Streptokokkeninfektionen. Obwohl die genauen Mechanismen des rheumatischen Fiebers noch nicht aufgeklärt sind, ist es anzunehmen, dass rheumatisches Fieber eine abnormale Immunantwort als Folge einer Streptokokkenpharyngitis darstellt. Die Manifestierung des rheumatischen Fiebers, u.a. in Arthritis, Chorea und Karditis, kommt in allen Teilen der Welt vor, obwohl in einigen Ländern eine sehr hohe Rate dieser Krankheit festzustellen ist. Über die Hälfte aller Kinder mit Herzkrankheiten leiden an rheumatischem Fieber und rheumatischer Herzkrankheit (RHD). Eine einzigartige epidemiologische Beobachtung ist die sehr hohe Rate an rheumatischem Fieber bei den Aborigines in Australien und Maoris in Neuseeland. Die Gründe hierfür sind immer noch nicht bekannt. Wahrscheinlich spielt hier die genetische Suszeptibilität eine wichtige Rolle.

Obwohl seit langem bekannt ist, dass eine enge Beziehung zwischen Gruppe A Streptokokken und akutem rheumatischem Fieber (ARF) besteht, blieb die genaue Pathogenese von ARF und RHD trotz intensiver Studien bisher unbekannt. Es wird angenommen, dass die Wirtsfaktoren, Bakterienfaktoren und eine nicht normale Immunantwort bei der Entstehung von ARF beteiligt sind. Die familiäre Prädisposition für ARF wird seit mehreren Jahrzehnten diskutiert. Obwohl dieses Thema zur Zeit auch sehr kontrovers diskutiert wird, weisen viele Studien auf eine genetische Anfälligkeit für ARF hin. Personen mit ARF und deren Familienmitglieder exprimieren bestimmte Antigene an der Oberfläche einiger Immunzellen. Der Zusammenhang zwischen ARF und HLA-Antigenen ist häufig beschrieben worden, wobei HLA-DR-Locus beteiligt ist. Einige B-Zell-Antigene sind auch mit ARF in Verbindung gebracht worden. Monoklonale Antikörper, die durch Immunisierung von Mäusen mit B-Zellen eines ARF-Patienten gewonnen wurden, haben mit B-Zellen von 100 % der Patienten mit ARF und nur mit 10 % der Kontrollgruppe reagiert. Die Proportion der Bevölkerung, die für ARF anfällig ist, ist nicht bekannt.

Die mutmaßlichen genetischen Marker kommen häufig in 15-20 % der Kontrollgruppe vor, aber ein Ausbrechen von Pharyngitis führt nur in 2-3 % der Fälle in einer heterologen Bevölkerung zu ARF. Die Inzidenzrate von ARF nach sporadischer Gruppe A Streptokokken Pharyngitis ist viel niedriger als nach verbreitetem Auftreten. In Bevölkerungsgruppen, die häufig Gruppe A Streptokokkeninfektionen ausgesetzt sind, liegt das Vorkommen von RHD zwischen 2 und 5 %.

Im Gegensatz zu Wirtsfaktoren ist die Beteiligung von Bakterienfaktoren bei der Entstehung von ARF wenig kontrovers. Das Konzept der Rheumatogenität, dass nur einige bestimmte Stämme in der Lage sind, ARF zu verursachen, existiert seit den 30er Jahren. Seit dem haben viele Studien auf einen Zusammenhang zwischen ARF und bestimmten M-Typen der Gruppe A Streptokokken hingewiesen. Die M-Typen 1, 3, 5, 6, 14, 18, 19, 24, 27 und 29 sind häufig mit ARF assoziiert. Die Vermutung der Beteiligung von M-Protein wurde durch die Beobachtung verstärkt, dass ARF-assoziierte Stämme M-Protein mit bestimmten Epitopen exprimieren, starke M-Protein-spezifische Immunantwort induzieren und Homologie zwischen M-Epitopen und Wirtsproteinen zeigen. Es wurde auch berichtet, dass ARF-assoziierte Stämme stark gekapselt sind und keinen Opazitätsfaktor exprimieren. Trotz dieser Studien wird die Assoziation von ARF und M-Serotyp sehr kontrovers diskutiert. In vielen Endemie-Gebieten mit höherer Rate von ARF sind die Stämme entweder nicht typisierbar oder exprimieren M-Typen, die traditionell mit Hautkrankheit assoziiert sind. In den letzten Jahren neigt man mehr und mehr zu der Auffassung, dass Rheumatogenität eher stammspezifisch ist und nicht M-Typ-spezifisch. Gruppe A Streptokokken sind in der Lage, genetisches Material horizontal zu transferieren. Dadurch können die Rheumatogenfaktoren zwischen verschiedenen Stämmen transferieren, so dass fast jeder M-Serotyp mit ARF assoziieren kann. Außer M-Protein wurden auch andere Streptokokkenkomponenten mit ARF in Verbindung gebracht. Dazu zählen Kapsel, zellwandassoziierte Kohlenhydrate, und Zellmembran. Diese Komponenten zeigten Kreuzreaktivität mit Wirtsgewebe

environmental factors and genetic susceptibility might be responsible for the high incidence.

The relationship between group A streptococci and rheumatic fever has been established for many decades, but the exact pathogenesis, in spite of intensive studies, remains unknown. The host factors, the bacterial factors and an abnormal immune response may all contribute towards induction of rheumatic fever. The family predisposition has been a topic of discussion since long. In spite of controversies there is an evidence that genetic predisposition plays an important role. Individuals with rheumatic fever and their family members express certain antigens on the surface of the immune cells. A correlation between rheumatic fever and HLA-antigens has often been reported, where HLA-DR locus is involved. Some B-cell antigens have also been implicated in rheumatic fever. Monoclonal antibodies which were raised in mice against B-cells from rheumatic fever patients react with B-cells of 100 % of the patients, but only with 10 % of the control group. The proportion of the population which is predisposed to rheumatic fever is not yet known. Putative genetic markers are often found in 15 to 20 % of control, but the outbreaks of pharyngitis result in approximately 3 % of the cases in a heterogenous population. The incidence rate of rheumatic fever following sporadic group A streptococcal pharyngitis is generally much lower than the outbreaks. In populations which are exposed to group A streptococcal infection the prevalence of rheumatic heart disease is between 2 and 5 %.

In contrast to the host factors, the involvement of bacterial factors in the induction of rheumatic fever is less controversial. The concept of rheumatogenicity that only some definite strains are capable of causing rheumatic fever has existed for many decades. Many studies have shown the association of certain M types, such as 1,3,5, 6,14,18,19,24,27 and 29 with rheumatic fever. The involvement of M protein was underlined by the fact that the strains associated with rheumatic fever express definite epitopes, induce a strong M protein-specific immune response and show homologies between M epitopes and the host proteins. The strains associated with rheumatic fever have a thick capsule and generally do not express opacity factor. In spite

of these studies the role of M serotypes remains a matter of controversy. In many endemic areas with high incidence of rheumatic fever, the strains are either non-typable or express M types which are traditionally associated with skin infections. In the last few years, there is a growing belief that rheumatogenicity is rather strain-specific than M type-specific. Group A streptococci are very efficient in transferring their genetic material horizontally, so that theoretically every strain can be associated with rheumatic fever. Besides M protein also other streptococcal components have been associated with rheumatic fever including capsule, cell wall associated carbohydrates and cell membrane. These components show cross reactivity with host proteins such as cardiac myosin, heart valve glycoproteins and sarcolemmal membrane.

Besides host and bacterial factors an abnormal immune response plays an important role in the induction of rheumatic fever. Immunological cross-reactivity between certain streptococcal antigens and the host tissue leads to the damage of heart, joint and brain. The cross-reactive antibodies are often found in the sera of rheumatic fever patients. Although humoral immunity is presumed to be an important component of immune response in rheumatic fever there is an increasing evidence that the primary damage is caused by cellular immunity. The cell infiltrates from the heart tissue of rheumatic fever patients show a predominance of T lymphocytes. Furthermore, very often macrophages are found in the myocardial lesions. Both cell types are components of cellular immunity. Moreover, in rheumatic fever lots of markers are observed that activate the cellular immune system. Increased numbers of circulating CD4 lymphocytes, interleukins such as IL-1 and IL-2, IL-2 receptor positive T cells, TNF- α receptors etc. are observed in rheumatic fever. Most probably the normal mechanism for suppressing the cellular immunity is not functioning in rheumatic fever patients, which leads to an uncontrolled activation and tissue damage. The induction of rheumatic fever and rheumatic heart disease is illustrated as a simple schematic diagram in Fig. 6.

Other immune mechanisms have also been implicated in the pathogenesis of rheumatic fever. Some streptococcal antigens, such as exotoxins, act as super antigens and can

wie z.B. mit Herzmyosin, Herzklappen-glykoproteinen, und Sarkolemmembran.

Neben Wirts- und Bakterienfaktoren spielt die Immunantwort auch eine wichtige Rolle bei ARF. Immunologische Kreuzreaktivität zwischen bestimmten Streptokokkenantigenen und Wirtsgewebe führt zu Schäden bei Herz, Gelenk und Hirn. Die kreuzreaktiven Antikörper kommen sehr häufig in Seren von ARF-Patienten vor. Obwohl humorale Immunität eine wichtige Komponente der ARF-Immunantwort zu sein scheint, gibt es zunehmend Hinweise, dass primäre Schäden durch zelluläre Immunität zustandekommen. Das Zellulärinfiltrat von Herzgewebe der ARF-Patienten zeigte prädominante T-Lymphozyten. Darüber hinaus beinhalten die Myokardlesionen häufig Makrophagen. Beide Zelltypen sind an der Zellulärimmunantwort beteiligt. Außerdem kommen viele Marker, die das Zellulärimmunsystem aktivieren, in ARF vor. Erhöhte Werte von zirkulierenden CD4 Lymphozyten, Interleukinen IL-1

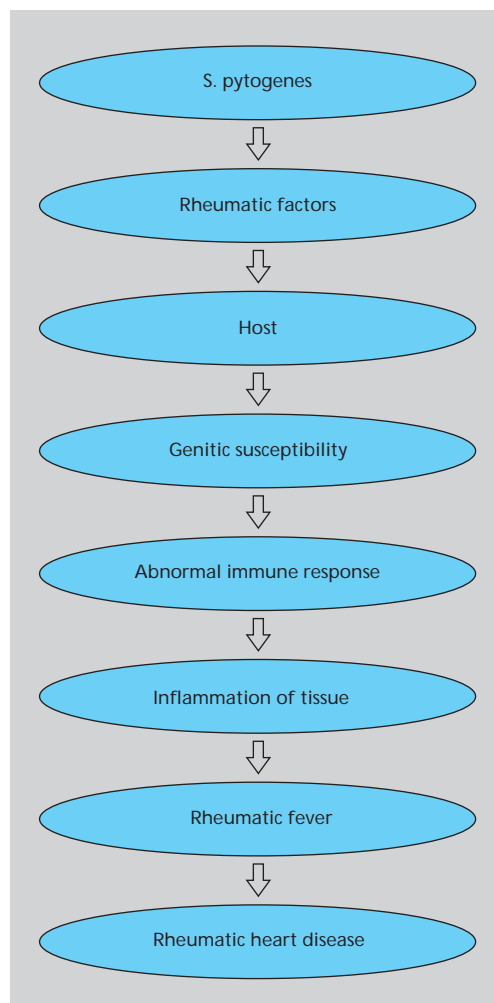
und IL-2, IL-2-rezeptorpositiven T-Zellen, TNF-alpha-Rezeptoren etc. sind bei ARF zu verzeichnen. Wahrscheinlich sind die normalen Mechanismen der Unterdrückung von zellulärer Immunität in ARF nicht funktionsfähig, was zu einer unkontrollierten Aktivierung und Gewebeschädigung führt. Die Entstehung der rheumatischen Herzkrankheit ist als einfaches Schema in Abb. 6 dargestellt.

Andere Immunmechanismen sind auch in der ARF-Pathogenese impliziert. Viele Streptokokkenkomponenten, wie z.B. pyogene Exotoxine, verhalten sich als Superantigene und können die ARF-Pathogenese beeinflussen. Es ist auch möglich, dass Gruppe A Streptokokken nicht die einzigen Verursacher von ARF sind. Co-Pathogene, wie z.B. der Coxsackie-Virus, können mit Streptokokken zusammenwirken, um ARF zu induzieren.

Glomerulonephritis ist eine andere Nachfolgeerkrankung der Streptokokkeninfektion, die aber im Vergleich zu rheumatischem Fieber nicht sehr häufig vorkommt. Obwohl die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, ist es klar, dass nur bestimmte Streptokokkenstämme nephretogen sind und wie bei rheumatischem Fieber nur die genetisch anfälligen Personen hieran erkranken. Eine Hypothese ist, dass die nephretogenen Streptokokken Pathogenitätsfaktoren exprimieren, die eine große Affinität zu Nierenzellen besitzen und durch Bildung von Immunkomplexen Nierenentzündungen verursachen.

Abb. 6. Stufen für die Entstehung des rheumatischen Fiebers und der rheumatischen Herzkrankheit.

Fig. 6. Steps involved in the induction of rheumatic heart disease



Lebensbedrohliche Streptokokkeninfektionen

Gruppe A Streptokokken sind in der Lage, lebensbedrohliche Infektionen wie z.B. nekrotisierende Fasziiitis, Septikämie und Streptokokken Toxic Shock-Syndrom auszulösen. Der Verlauf dieser Infektionen ist unheimlich schnell und kann mit keiner anderen Infektionskrankheit verglichen werden. Nekrotisierende Fasziiitis ist eine tiefsitzende Infektion subkutanen Gewebes, was zur Zerstörung der Faszies führt (Abb. 7). Nach Auftreten der initialen Infektzeichen entwickelt sich

influence the disease pathogenesis. It is also possible that some co-pathogens, e.g. coxsackie virus, may cause rheumatic fever together with the streptococci.

Glomerulonephritis is another sequelae of streptococcal infection, which has a much lower incidence than rheumatic fever.

Although for glomerulonephritis the exact mechanisms are not known, it is clear that some definite streptococcal strains are nephrogenic and, like in rheumatic fever, only the genetically predisposed people suffer from this disease. One hypothesis is that the nephrogenic streptococci express pathogenicity factors that have high affinity for kidney cells and can cause inflammation by forming immune complexes.

Life-threatening streptococcal infections

Group A streptococci are also capable of causing life-threatening infections such as necrotizing fasciitis, septicemia and streptococcal toxic shock syndrome. The progression of these diseases is extremely fast and cannot be compared with any other infectious diseases. Necrotizing fasciitis is a deep infection of the subcutaneous tissue which leads to the destruction of fascia (Fig. 7). After the initial indication of infection the disease develops at a very high speed. At this point of time in general the systemic infection also occurs, which leads to multiple organ failure and death. Even with aggressive therapy the mortality rate is about 50 %. Cellulitis and myositis can also be caused by invasive streptococci. These infections can lead to a serious complication, the streptococcal toxic shock syndrome, often found in young adults. Typical symptoms of this syndrome are extreme pain, high fever and finally the septic shock. The secreted components of streptococci, such as erythrogenic toxins, and super antigens, which influence the immune cells to secrete a large amount of IL-1 α/β , IL-8 and TNF α , are mainly involved in the development of toxic shock. As with the streptococcal sequelae, also in invasive infection the host genetic susceptibility plays an important role.

Genetic susceptibility of invasive streptococcal infections

As with rheumatic fever, the genetic susceptibility is also an important factor in invasive infections. This susceptibility can also be observed in mice. Different inbred strains



Abb. 7. Nekrotisierende Faszitis durch Gruppe A Streptokokken im Halsbereich (Bild Dr. Werkmeister, Uniklinikum Münster) und des Beines (Bild Dr. Currie, Royal Darwin Hospital, Australien)

Fig. 7. Group A streptococcal necrotizing fasciitis of neck (photo: Dr. Werkmeister, University Hospital Münster) and of the leg (photo: Dr. Currie, Royal Darwin Hospital, Australia)

of mice show different sensitivity to group A streptococci. BALB/c, C57BL/c, DBA/2 mouse strains are highly resistant whereas C3H/HeN and CBA/j are highly susceptible. Innate immunity plays a major role in the susceptibility. The progression of disease in susceptible mice is quite similar to the invasive streptococcal disease in human beings, which underlines the importance of this mouse model. The identification of the genes responsible for resistance or susceptibility can contribute towards the development of strategies to fight and control invasive streptococcal diseases.

Therapy and prophylaxis

Penicillin has been mostly used to treat different streptococcal infections. It is not only used to treat streptococcal pharyngitis, but also in the secondary prophylaxis of acute rheumatic fever. In spite of the fact that group A streptococci have not yet developed resistance to penicillin this therapy has not been successful in controlling streptococcal infection and the sequelae. Development of a vaccine against group A streptococci is urgently needed and is a great challenge in streptococcal research. In the last few years, many potential vaccine candidates have been identified. Because of the protective action of anti M protein antibodies many groups have tried to develop M protein based vaccines.

sehr rasch das Vollbild der Erkrankung. Zu diesem Zeitpunkt bestehen in der Regel auch systemische Infektzeichen, was zu einem multiplen Organversagen und Tod führen kann. Selbst bei aggressiver Therapie liegen die Mortalitätsraten um die 50 Prozent. Zellulitis und Myositis können auch durch invasive Streptokokken entstehen. Diese Infektionen können zu einer schwerwiegenden Komplikation, dem Streptokokken Toxic Shock-Syndrom, führen, was bei jungen Erwachsenen vorkommt. Typische Symptome dieses Syndroms sind starke Schmerzen, hohes Fieber und schließlich der septische Schock. Für die Entstehung des Toxic Shock sind hauptsächlich die sezernierten Faktoren der Streptokokken verantwortlich, wie z.B. erythrogene Toxine und Superantigen, deren Einfluß auf Immunzellen eine massiv verstärkte IL-1 α / β -, IL-8- und TNF α -Ausschüttung bewirkt. Wie bei Nachfolgeerkrankungen spielt auch bei invasiven Faktoren die Wirtssuszeptibilität eine große Rolle.

Genetische Suszeptibilität bei invasiven Streptokokkeninfektionen

Wie bei ARF ist die genetische Suszeptibilität auch bei invasiven Infektionen ein wichtiger Faktor. Die genetische Suszeptibilität kann man auch bei Mäusen beobachten. Verschiedene Inzuchtmausstämme zeigen unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Gruppe A Streptokokken. BALB/c, C57BL/10, DBA/2-Mausstämme sind sehr resistent, wogegen C3H/HeN und CBA/J sehr anfällig sind. Angeborene Immunität spielt bei Suszeptibilität eine wichtige Rolle. Der Verlauf der Krankheit bei anfälligen Mäusen ist sehr ähnlich wie bei invasiven Streptokokkenkrankheiten beim Menschen, was die Bedeutung dieses Tiermodells unterstreicht. Die Identifizierung der Gene, die für Resistenz oder Suszeptibilität verantwortlich sind, wird zur Entwicklung von Bekämpfungsstrategien für invasive Streptokokkeninfektionen beitragen.

Therapie und Vorbeugung

Die häufigste Strategie zur Bekämpfung der Streptokokkeninfektionen und der Nachfolgeerkrankungen ist die Verwendung von Penicillin. Penicillin wird nicht nur für die Behandlung von Streptokokkenpharyngitis, sondern auch als Sekundärprophylaxe für ARF angewandt. Trotz der Tatsache, dass bis jetzt keine Resistenzen gegen Penicillin bei Gruppe A Streptokokken zu beobachten sind, konnte diese Therapie u.a. aufgrund unzureichender Befolgung nicht zur Bekämpfung der Streptokokkenkrankheiten beitragen. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Gruppe A Streptokokken ist dringend notwendig und stellt eine große Herausforderung dar. In den letzten Jahren sind viele potentielle Impfstoffkandidaten identifiziert worden. Da die Antikörper gegen M-Protein Schutzwirkung zeigen, haben viele Gruppen M-Protein als Impfstoffkandidaten untersucht. Trotz der Schutzwirkung der M-Protein-Antikörper wurden die Versuche, einen effektiven Impfstoff auf Grundlage des M-Proteins zu entwickeln, durch zwei grundlegende Probleme behindert. Zum einen scheint das M-Protein, wenigstens zum Teil, an Folgeerkrankungen, die eine Streptokokkenerkrankung nach sich ziehen kann, beteiligt zu sein. M-Protein besitzt kreuzreaktive Epitope für einige Wirtsproteine, die für die Entstehung der Nachfolgeerkrankungen verantwortlich sein können. Das zweite Problem liegt darin, daß es eine große Anzahl von Serotypen des M-Proteins gibt und die Immunität durch die Antikörper in der Regel M-Serotyp-spezifisch ist. Einige Fortschritte zur Lösung dieser Probleme sind in den letzten Jahren erzielt worden. Vakzinprototypen, die C-Repeat-Peptide beinhalten, zeigten Schutzwirkung in einem Mausmodell. Multivalente M-Protein-Vakzinprototypen, die Peptide verschiedener M-Serotypen beinhalten, haben auch ermutigende Ergebnisse im Mausmodell geliefert. Die auf M-Protein basierenden Impfstoffprototypen befinden sich zur Zeit in der Optimierungsphase.

Eine alternative Strategie ist die Verwendung von Streptokokkenadhäsinen als Impfstoffkandidaten. SfbI-Protein, das Hauptadhäsin der Gruppe A Streptokok-

These efforts have not been very successful because of two basic problems. Firstly, M protein, or at least a part of it, has been associated with the sequelae, because it possesses cross-reactive epitope for certain host proteins, and secondly, M protein occurs in a large number of serotypes, and the protection is generally M serotyp specific. Some progress has been made to solve these problems. Vaccine prototypes containing C-repeat peptides have shown protectivity in mouse models. Multi-valent M protein vaccine consisting of the peptides from variable regions of M serotypes have also yielded promising results. M protein based vaccine prototypes are still in the optimization phase.

An alternative strategy for the development of streptococcal vaccine is the use of streptococcal adhesins as candidates. SfbI protein, the major adhesin of group A streptococci, is capable of inducing protective immune response against different streptococcal strains in a mouse lethality model. The fibronectin binding domains of SfbI proteins represent important protective antigens. There are many other advantages of SfbI protein based vaccines, a) SfbI protein is expressed by more than 70 % of the clinical isolates belonging to different serotypes from different geographical areas, b) the fibronectin binding domains of SfbI protein are highly conserved, c) antibodies against SfbI protein do not show any cross reactivity with cardiac proteins and d) SfbI protein acts as a strong mucosal adjuvant. Therefore, SfbI protein seems to be a promising vaccine candidate that should soon go to phase I trials. Beside M protein and SfbI protein, other vaccine prototypes based on FBP54 protein and C5a peptidase are also in a developing phase.

Group B streptococci

Group B streptococci, with the only species *Streptococcus agalactiae*, were described for the first time in 1887 when they were isolated from a case of bovine mastitis. Till 1937, they were not regarded as human pathogens, but were then identified as a causative for sepsis in the new-born. In the last couple of decades, they have become a serious health problem and a major cause of bacterial meningitis in new-borns. The infection of new-borns with group B streptococci is not only characterized by high mortality rates, but also a large percent of survivors suffer from subsequent neuronal damage. The infection of the new-

borns starts during delivery, when they swallow the vaginal fluid of the mother, in which group B streptococci occur as symptomless flora. Because of the reduced number of alveolar macrophages and incomplete immunity in the new-borns these streptococci can easily colonize the lungs. From here they invade the blood and form a systemic infection. The precise mechanisms how group B streptococci reach circulation from lung are not yet known. The infection of the new-born is divided into two different types of disease. In "early-onset disease" the symptoms appear between 24 and 72 hours after birth, the mortality in these cases is 89 % with sepsis, and 62 % with meningitis. Early-onset disease is also characterised by a high rate of neurological damage in the survivors. In "late-onset disease" the symptoms appear many weeks after birth, and meningitis is the major manifestation. The mortality with 10 to 20 % is much lower than with early-onset disease. Group B streptococcal infections are also observed in adults, but the incidence is not as high as in the new-borns.

Group B streptococci are divided into nine different serotypes, out of which serotype Ia, Ib, II and III are most common. Approximately 40 % isolates from invasive diseases are Ia type, and 27 % type III. The major problem with group B streptococcal infections is the fast and dramatic progression of the disease, which cannot be sufficiently treated with antibiotics. As many women of childbearing age have been colonized with group B streptococci in vaginal area, every pregnant woman is tested for this organism. In case of positive results, they are normally treated with antibiotics before delivery to reduce the risk of transferring the bacteria to the new-born. Because of increasing resistance of antibiotics against these bacteria and the risk of allergic reaction to the mother and the new-born it is desirable to develop an alternative to antibiotic therapy. Clinical studies have shown that the infants whose mothers have a high titer of anti group B streptococcal antibodies are rarely infected. Therefore, vaccination of women in childbearing age to passively protect the new-born seems to be a promising strategy. Because the capsule of group B streptococci is an important virulence factor, efforts have been made to use it as a vaccine candidate. These efforts were unsuccessful because of the antigen variation and the low immunogenicity

ken, ist in der Lage, eine Schutzimmunantwort gegen verschiedene Streptokokkenstämme in einem Mausmodell zu erzeugen. Die Fibronektinbindungsdomänen spielen bei der Schutzwirkung eine entscheidende Rolle. Weitere Vorteile von auf SfbI basierendem Impfstoff sind a) SfbI-Protein wird von mehr als 70 % der klinischen Isolate verschiedener Serotypen exprimiert, b) die Fibronektinbindungsdomänen des SfbI-Proteins sind hochkonserviert, c) Antikörper gegen SfbI-Protein zeigen keine Kreuzreaktivität mit Herzproteinen und d) SfbI-Protein wirkt als mukosales Adjuvans. Daher ist SfbI-Protein ein vielversprechender Impfstoffkandidat, der bald in Phase I gehen wird. Außer M-Protein und SfbI-Protein befinden sich auch FBP54 und C5A-Peptidase basierte Impfstoffprototypen in der Entwicklungsphase.

Gruppe B Streptokokken

Die Gruppe B Streptokokken (GBS) mit der Einzelart *Streptococcus agalactiae* fanden erstmals 1887 als pathogene Erreger Beachtung, als sie in Verbindung mit einer Rindermastitis isoliert wurden. Bis 1937 galten Gruppe B Streptokokken nicht als humanpathogen. Danach erfolgte erstmals die Identifizierung von Gruppe B Streptokokken als Verursacher einer Sepsis bei Neugeborenen. Inzwischen sind diese Streptokokken als Erreger von Lungen- und Hirnhautentzündungen in Neugeborenen von großer medizinischer Bedeutung. Sie gelten mittlerweile als Hauptverursacher (>30 %) tödlich verlaufender bakterieller Hirnhautentzündungen bei Neugeborenen mit Sterblichkeitsraten von ca. 6 % und neuronalen Folgeerscheinungen bei über 50 % der Überlebenden. Die Infektion des Neugeborenen erfolgt meist während der Geburt durch Verschlucken von mütterlichem Vaginalschleim, in dem GBS als symptomlose Besiedler vorkommt. Da bei Neugeborenen die Anzahl an alveolären Makrophagen reduziert und zudem ihre antibakterielle Aktivität noch nicht vollends ausgebildet ist, wird durch GBS zunächst die Lunge des Neugeborenen besiedelt. Anschließend erfolgt das Eindringen der Bakterien in den Blutkreislauf und die Ausbildung einer systemischen Infektion. Die genauen Mechanismen, wie die Gruppe B Strepto-

kokken von der Lunge in den Blutkreislauf gelangen, sind noch nicht aufgeklärt. Die Infektionen von Neugeborenen sind in zwei getrennt voneinander vorkommende Krankheitsbilder unterteilt. Im „early-onset-disease“ treten die Krankheitssymptome innerhalb von 24 bis 72 Stunden nach der Geburt auf. Die Mortalitätsrate bei early-onset Fällen beläuft sich auf 89 % bei auftretender Sepsis und 62 % bei auftretender Meningitis. Weiterhin treten bei vielen überlebenden Neugeborenen neurologische Folgeschäden auf. In „late-onset“ Fällen treten die Krankheitssymptome bei Neugeborenen erst nach mehreren Wochen auf. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Meningitis, wobei die Mortalitätsrate mit 10 bis 20 % deutlich geringer als bei early-onset Fällen liegt. Gruppe B Streptokokkeninfektionen können auch bei Erwachsenen auftreten. Die Inzidenzrate aber ist viel niedriger als bei Neugeborenen.

Die Gruppe B Streptokokken sind in neun Serotypen unterteilt. Davon kommen Serotypen Ia, Ib, II und III sehr häufig vor. Ca. 40 % der Isolate von invasiven Krankheiten haben Ia Polysaccharide, und 27 % Typ III Polysaccharide. Die besondere Problematik von GBS-Infektionen liegt insbesondere in dem sehr schnellen und dramatischen Krankheitsverlauf, dem nur ungenügend mit einer Antibiotikatherapie begegnet werden kann. Da zahlreiche Frauen im gebärfähigen Alter durch GBS im Vaginalbereich kolonisiert sind, werden daher schwangere Frauen auf eine Besiedlung durch GBS getestet. Bei Nachweis dieser Bakterien wird derzeit kurz vor der Niederkunft eine Antibiotika-Therapie durchgeführt, um das Risiko einer Infektion durch GBS während der Geburt zu reduzieren. Aufgrund der zunehmenden Resistenz dieser Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika und der Gefahren einer allergischen Reaktion von Mutter und Neugeborenen auf die verabreichten Antibiotika ist es wünschenswert, Alternativen zur Antibiotikatherapie zu entwickeln. Klinische Studien haben gezeigt, dass Kinder, deren Mütter einen hohen Antikörpertiter gegen GBS besitzen, nur selten durch diese Bakterien infiziert werden. Eine attraktive Alternative zur herkömmlichen Antibiotikatherapie

of capsule polysaccharides. The interest has therefore shifted towards the surface protein as vaccine candidate. Major surface proteins of group B streptococci are α and β antigen of C protein complex and different R proteins. In animal model some of these proteins have induced protective immune response. Also the secreted components of group B streptococci have recently gained importance. A secreted protein designated SibB is capable of binding immunoglobulins and can therefore play a role in pathogenicity. In spite of the urgent need of a group B streptococcal vaccine the development is still in an early phase. Promising prototypes seem to be conjugate vaccines consisting of polysaccharides and protein antigens.

Group C and group G streptococci

Group C and group G streptococci belong to heterogenous streptococcal species which include commensals as well as serious disease causing bacteria. Group C streptococci can be divided into two morphological groups, the large and the small colony variants. The small colony variants, which include *Streptococcus milleri* group, form the normal flora in mouth cavity, gastro-intestinal and urinary tract of human beings, but are also capable of causing serious infections. The large colony variants, which include species like *Streptococcus equi* and *Streptococcus dysgalactiae* are traditionally considered as animal pathogens, although they can cause bacteremia, cellulitis, peritonitis, septic arthritis, pneumonia and endocarditis in human beings. Although the incidence rate of human infections by group C streptococci is much lower than those by group A and group B streptococci, the mortality of approximately 25 % is very high. Group G streptococci were also initially not considered as human pathogens and were regarded as normal flora of human skin, throat and gastro-intestinal tract. In the last few years, however, the incidence of life-threatening human infections by group G streptococci have substantially increased.

As with group A streptococci, the adherence and invasion also plays an important role in the pathogenesis of group C and group G streptococci. They, too, are capable of binding to many host proteins. Fibronectin binding proteins, M-like proteins, as well as different enzymes and toxins are the major pathogenicity factors. The precise pathogenic mechanisms of these organisms have not yet

been fully understood.

Group C and group G streptococci have recently been associated with acute rheumatic fever. The Aboriginal population of Australia, where streptococcal pharyngitis is extremely rare, shows the highest incidence worldwide of rheumatic heart disease. The antibodies against group C and group G streptococci, isolated from this population, show a strong cross-reactivity to cardiac myosin. This association between group C and G streptococci and rheumatic fever might explain a large number of rheumatic fever cases without a known history of group A streptococcal infections. If the studies in other endemic areas also confirm the involvement of group C and group G streptococci in rheumatic fever, it would then be essential to test for their presence in the throat cultures and to treat accordingly.

Streptococcus pneumoniae

Another important species of genus *Streptococcus* is *S. pneumoniae*. These organisms are exclusively human pathogens and form the normal flora in 10 % adults and about 40 % healthy children. The pneumococci can also cause life-threatening diseases such as bacteremia, pneumonia and meningitis. In the USA alone, 7 million cases of otitis media and more than half a million cases of pneumonia are registered every year, with about 5 to 10 % mortality. Worldwide, more than 20 million cases of pneumonia with about 1 million deaths are registered every year.

Pneumococci are divided into 90 different serotypes, depending on the composition of their capsules. The distribution of the serotypes is different in different geographical areas. The capsule polysaccharide is an antiphagocytic factor and plays an important role in pathogenesis. Other pathogenicity factors are hyaluronatylase, neurominidases, pneumolysin, autolysins, pneumococcal surface antigen A and a family of choline binding proteins. Pneumolysin, a cytotoxic protein, is present in cytoplasm and is secreted after the action of autolysins. The cytotoxic activity damages the bronchial epithelial cells and can directly inhibit the phagocytosis and the function of immune cells. The proteins which are anchored on a pneumococcal surface through a choline mediated mechanism also play a role in pathogenesis. Nine such proteins have so far been identified,

ist daher die Impfung von Frauen im gebärfähigen Alter, um damit passiv den Neugeborenen vor einer Infektion durch GBS zu schützen. Da die Kapsel von GBS wichtig für deren Virulenz ist, wurden bereits Versuche unternommen, Kapselpolysaccharide als Vakzin zu verwenden. Dies scheiterte jedoch an der Antigenvariabilität und der geringen Immunogenität der Kapselpolysaccharide. In den letzten Jahren haben daher die Oberflächenproteine der Gruppe B Streptokokken als Impfstoffkandidaten an Bedeutung gewonnen. Wichtige Oberflächenproteine sind α - und β -Antigen des C-Protein-Komplexes und verschiedene R-Proteine. In Tiermodellen können einige dieser Proteine Schutzwirkung zeigen. Auch die sekretierten Komponenten der Gruppe B Streptokokken gewinnen zunehmend an Bedeutung. Ein sekretiertes Protein, genannt SibB, ist in der Lage, Immunglobulin zu binden und dadurch eine Rolle in der Pathogenität zu spielen. Trotz großen Bedarfs an Gruppe B Streptokokkenimpfstoff befindet sich die Entwicklung immer noch in der Frühphase. Vielversprechend scheint ein Konjugatimpfstoff aus Polysacchariden und Proteinantigenen zu sein.

Gruppe C und Gruppe G Streptokokken

Gruppe C und Gruppe G Streptokokken gehören zur heterogenen Streptokokkenspezies, die sowohl als Kommensale als auch als ernst zu nehmende Krankheitserreger bei Mensch und Tier vorkommen. Die C Streptokokken kann man in zwei morphologische Gruppen, Groß- und Kleinkolonie-Varianten, unterteilen. Die Kleinkolonievarianten, zu denen auch die *Streptococcus milleri*-Gruppe gehört, bilden normale Flora in Mundhöhle, Darm und Harntrakt des Menschen, sind aber auch in der Lage, ernsthafte Infektionen zu verursachen. Die Großkolonie-Varianten mit Spezies wie *Streptococcus equi* und *Streptococcus dysgalactiae* sind traditionell als tierpathogen bekannt, obwohl sich beim Menschen Bakteriämie, Zellulitis, Peritonitis, septische Arthritis, Pneumoniae und Endokarditis verursachen können. Wenn auch die Inzidenzrate der menschlichen Infektionen durch Gruppe C Streptokokken viel niedriger liegt als bei Gruppe A und Gruppe B Streptokokken,

ist die Mortalitätsrate von ca. 25 % sehr hoch. Gruppe G Streptokokken wurden am Anfang ebenfalls als nichtpathogen bezeichnet und galten als normale Flora von menschlicher Haut, Hals und Darmtrakt. In den letzten Jahren hat die Inzidenz von lebensbedrohlichen menschlichen Infektionen durch Gruppe G Streptokokken erheblich zugenommen.

Wie bei Gruppe A Streptokokken spielt die Anheftung und Invasions bei C und G Streptokokken eine wesentliche Rolle. Gruppe C und G Streptokokken sind in der Lage, mit Wirtsproteinen zu interagieren. Fibronectinbindungsproteine, M-ähnliche Proteine sowie verschiedene Enzyme und Toxine sind wichtige Pathogenitätsfaktoren der Gruppe C und Gruppe G Streptokokken. Die genauen Mechanismen sowie Beteiligung dieser Faktoren in der Virulenz sind weitgehend ungeklärt.

Streptokokken der Gruppe C und G sind kürzlich auch mit ARF in Verbindung gebracht worden. Die Aborigines in Australien, die kaum an Gruppe A Streptokokken-Pharyngitis erkranken, dagegen aber hohe Raten an Gruppe C und G Streptokokken aufweisen, zeigen weltweit die höchste Rate an ARF. Die Antikörper gegen C und G Streptokokken-Isolate von Aborigines sind in der Lage, mit menschlichem Herzmyosin zu reagieren. Dieser Zusammenhang zwischen Gruppe C und G Streptokokken und ARF liefert einen möglichen Beweis dafür, dass manche ungeklärten Fälle von ARF durch Nicht-Gruppe A-Streptokokken verursacht werden. Falls die weiteren Untersuchungen in endemischen Gebieten dies bestätigen, werden als Konsequenz auch Gruppe C und G Streptokokken in Rachenuntersuchungen erfasst werden.

Streptococcus pneumoniae

Eine andere wichtige Spezies der Gattung *Streptococcus* ist *S. pneumoniae*. Die Pneumokokken sind ausschließlich humanpathogene Bakterien, die den Atemtrakt in 10 % der gesunden Erwachsenen und in mindestens 40 % der gesunden Kinder asymptomatisch als Normalflora besiedeln. Auf der anderen Seite sind sie in der Lage, lebensgefährliche Erkrankungen wie Lungenentzündun-

including pneumococcal surface protein A (PspA) and secretory IgA binding protein SpsA. PspA is a strongly immunogenic protein which specifically binds human lactoferrin. PspA has been shown to be a protective antigen in animal models. SpsA, with a conserved functional domain for binding to secretory IgA and secretory component, seems to be a promising vaccine candidate, also because it is expressed by all serotypes.

Beside proteins, with a membrane anchor mechanism, pneumococci express and secrete proteins without such an anchor. One of these proteins is Eno, an α -enolase of pneumococci, which is an important enzyme of glycolytic pathway. After secretion, Eno is capable of re-association to bacterial surface. An important property of Eno is its binding to plasmin and plasminogen, which might allow the bacteria to invade into the tissues by the degradation of extracellular matrix. This is a first example of a metabolic enzyme which also acts as a possible pathogenicity factor.

The high mortality rate of the *S. pneumoniae* infection has remained constant in the last 30 years, in spite of the availability of antibiotics. One of the reasons is the dramatic spread of penicillin resistant pneumococci in the last few years. The increase in the antibiotic resistance in countries like Spain and South Africa, where 60 % of the isolates are resistant, is a matter of serious concern. To stop the further spread of resistant pneumococci, it is essential to understand the molecular events leading to the development of resistance and the identification of the factors that allow the fast spread of these strains.

Another problem to control *S. pneumoniae* infection is the sub-optimal efficacy of the current vaccine, which consists of 23 polysaccharides. Although these 23 polysaccharide types are present in 90 % of the isolates from Europe and USA, it does not offer an effective protection in children and elderly persons, which are the main risk groups. The immunogenicity of the capsule antigens can be increased by their conjugation with immunogenic proteins. One problem is the high antigen variability of pneumococcal proteins. Therefore, the proteins or the peptides which are conserved in all serotypes will be required for conjugation. PspA and SpsA, whose functional groups are highly conserved, are promising candidates for use as conjugate vaccine prototype.

Perspectives

Streptococcal infections remain a serious health problem worldwide. Since antibiotics alone have not been able to control these infections, the development of an effective vaccine and other control strategies will be the focus of the future research. A prerequisite is the precise understanding of the pathogenesis of streptococcal infections. An important starting point is the understanding of the pathogenesis of rheumatic fever, the mechanisms of the association of group C and group G streptococci in rheumatic heart disease and the understanding of the process by which pneumococci convert themselves from harmless commensals to highly virulent pathogens. These results can contribute towards the development of a suitable streptococcal vaccine and an improved pneumococcal vaccine. In the last few years, alternative therapeutic strategies, which target the critical infections mechanisms, are gaining interest. To control the streptococcal infections, it will also be essential to study the genetic susceptibility and identify the genetic markers. The sequencing of human and streptococcal genomes will make it easier to identify the genes involved in pathogenesis and susceptibility as well as to study their regulation. A bottleneck will be the lack of suitable animal models. The use of susceptible mouse strains may solve the problem of invasive infections models, but the development of a model for rheumatic heart diseases remains a challenge. For this, transgenic and knock-out mice may be helpful. In spite of great expectations, a lot more research efforts will be required to develop effective vaccines and alternative control strategies and to bring them into the clinical phases.

Acknowledgement

I am grateful to Dr. Sven Hammerschmidt, Dr. Eva Medina, Dr. Manfred Rohde, Dr. Susanne Talay, Mrs. Helga Brink and other members of the Streptococcal team for their help in the preparation of this article.

References | Literatur

In diesem Aufsatz sind die Arbeiten der GBF Gruppen und sehr vieler anderer Arbeitsgruppen zitiert, so dass es nicht möglich ist, alle Zitate zu erwähnen. Im folgenden sind ein paar wichtige Werke für weitere Lektüre und einige Arbeiten der GBF Streptokokken-Gruppe zusammengestellt.

gen, Hirnhautentzündungen und Bakteriämien zu verursachen. Allein in den USA werden 7 Millionen Fälle von Mittelohrentzündung und mehr als eine halbe Million Lungenentzündungen pro Jahr registriert, von denen 5 % bis 7 % einen tödlichen Ausgang haben. Weltweit gesehen, sterben an den Folgen einer Pneumokokken-Pneumonie bei 20 Millionen Fällen pro Jahr ungefähr eine Million Erkrankte und des weiteren sterben ungefähr 75000 pro Jahr an den Folgen einer Pneumokokken-Meningitis.

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Kapsel wurden bereits 1932 die Pneumokokken in 32 verschiedene Serotypen eingeteilt. Heute werden die Pneumokokken in über 90 Serotypen unterteilt, deren Vorkommen bei Erkrankungen durch Pneumokokken unterschiedlich häufig ist. Das Kapselpolysaccharid schützt den Erreger vor dem Immunsystem, indem es einen Schutz gegenüber der Phagozytose durch Makrophagen, Abwehrzellen des Immunsystems, darstellt. Weitere bakterielle Faktoren, die im Infektionsprozess eine wichtige Funktion haben, sind eine Hyaluronatlyase, das Pneumolysin, zwei Neuraminidasen (NanA und NanB), Autolysine, PsaA (pneumococcal surface antigen A) und die Familie der Cholin-bindenden Proteine. Pneumolysin, ein zytotoxisches Protein, kommt im Zytoplasma vor und wird durch Autolysine freigesetzt. Die zytotoxische Aktivität zerstört die bronchialen Epithelien und kann auch direkt die Phagozytose und Funktion der Immunzellen inhibieren. Die Proteine, die durch eine Cholin vermittelte Interaktion mit den Lipoteichonsäuren auf der Bakterienoberfläche lokalisiert sind, bilden bei Pneumokokken die Familie der Cholin-bindenden Proteine. Neun Cholin-bindende Proteine sind identifiziert, darunter das Pneumococcal Surface Protein A (PspA) und das sekretorische IgA bindende Protein SpsA. PspA ist ein stark immunogenes Oberflächenprotein, das humanes Laktoterrin, ein Eisentransportprotein des Wirtes, bindet. In Immunisierungsstudien mit PspA konnte das Protein als ein geeigneter Kandidat für einen Protein-basierten Impfstoff aufgezeigt werden. Ein anderer wichtiger Pathogenitätsfaktor ist

das sekretorische IgA bindende Protein SpsA. Funktionelle Studien bewiesen, dass die Interaktion der Pneumokokken mit SIgA über die Bindung der sekretorischen Komponente an SpsA erfolgt. Die funktionelle Domäne des SpsA Proteins stellt somit einen vielversprechenden Bestandteil eines neuen konjugaten Impfstoffkandidaten dar, da eine der wichtigsten Voraussetzungen, die Konserviertheit der Peptidsequenz in allen Serotypen der Pneumokokken, erfüllt ist.

Neben Proteinen mit Motiven für eine Verankerung in der Zellwand, sind auch Proteine vorhanden, die keine derartigen Motive besitzen. Eines dieser Proteine ist Eno, eine α -Enolase der Pneumokokken. Dieses Protein ist ein wichtiges Enzym der Glykolyse und vor allem auch im Zytoplasma der Bakterien zu finden. Nach Sekretion ist Eno in der Lage, wieder an Oberflächen der Bakterien zu binden. Eine wichtige Eigenschaft der Eno ist die Bindung an Plasminogen und Plasmin. Die biologische Funktion dieser Interaktion könnte die Förderung der Wanderung der Pneumokokken durch das Epithel durch eine Plasmin-vermittelte Degradation der extrazellulären Matrix sein. Dies ist ein erstes Beispiel, wo ein Stoffwechsellzym der Bakterien auch eine Beteiligung an der Pathogenität zeigt.

Die hohe Sterblichkeitsrate infolge einer Infektion mit *S. pneumoniae* ist trotz der zur Verfügung stehenden Antibiotika und eines Impfstoffes in den letzten 30 Jahren konstant geblieben. Einer der Gründe ist die dramatische Ausbreitung der Penicillin-resistenten Pneumokokken in den letzten Jahrzehnten. Die Ausbreitung und der Anstieg der resistenten Isolate, der in Ländern wie Spanien und Südafrika heutzutage einen Anteil von bis zu 60 % ausmacht, ist besorgniserregend. Um die weitere Ausbreitung der resistenten Pneumokokken zu verhindern, ist daher ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge, die zur Entwicklung der Antibiotikaresistenz beitragen, sowie die Identifikation der Faktoren notwendig, die diese schnelle Ausbreitung ermöglichen.

Ein weiteres Problem bei der Bekämpfung von Infektionen durch *S. pneumoniae* ist die geringe Wirksamkeit des zur Verfügung stehenden Impfstoffes. Der 23-

In this article, lot of publications of the GBF and external groups have been used, and it is not possible to cite all of them. The following list includes some important books for further reading and some selected publication of the GBF streptococcal group.

Stevens DL, EL Kaplan (2000) *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology and molecular pathogenesis*. Oxford University Press, New York.

Fischetti VA, RP Novick, JJ Ferretti, DA Portnoy, JI Rood (2000) *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington, DC.

Hoeprich PD, MC Jordan, AR Ronald (1994) *Infectious diseases. A treatise of infectious processes*. J.B. Lippincott, Philadelphia.

Cossart P, P Boquet, S Normark, R Rappuoli (2000) *Cellular microbiology*. ASM Press, Washington, DC.

Ausgewählte Veröffentlichungen der GBF über Streptokokken

Selected publications from the GBF about streptococci

Bergmann S, M Rohde, GS Chhatwal, S Hammerschmidt (2001) α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40:1273-1287.

Chhatwal GS (1995) *Infektionsmechanismen bei Streptococcus pyogenes („Killer Bakterien“)*. *Bioscope* 2:14-19.

Chhatwal GS, KT Preissner (1999) *Extracellular matrix interaction with Gram positive bacteria*. In: *Gram Positive Pathogens*, ed. V.A. Fischetti et al., ASM Press, Washington DC, pp. 78-86.

Chhatwal GS, S Hammerschmidt (1998) *Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential*. *Trends Microbiol (Letter)* 6:85-88.

Chhatwal GS, SR Talay (1999) *Pathogenicity factors in group C and G streptococci*. In: *Gram Positive Pathogens*, ed. V.A. Fischetti et al., ASM Press, Washington DC, pp. 177-183.

Fagan PK, D Reinscheid, B Gottschalk, GS Chhatwal (2001) *Identification and characterization of a novel secreted immunoglobulin binding protein from group A streptococcus*. *Infect Immun* 69:4851-4857.

Goodfellow AM, M Hibble, SR Talay, B Kreikemeyer, BJ Currie, KS Sriprakash, G.S. Chhatwal (2000) *Distribution and antigenicity of fibronectin binding proteins (SfbI and SfbII) of Streptococcus pyogenes clinical isolates from the Northern Territory, Australia*. *J Clin Microbiol* 38:389-392.

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

Haidan A, SR Talay, M Rohde, KS Sriprakash, BJ Currie, GS Chhatwal (2000) *Pharyngeal carriage of group C and G streptococci might be associated with acute rheumatic fever in the Aboriginal population of the Northern Territory of Australia*. *The Lancet* 356:1167-1169.

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

Hammerschmidt S, MP Tillig, S Wolff, J-P Vaerman, GS Chhatwal (2000) *Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif*. *Mol Microbiol* 36:726-736.

Hammerschmidt S, RS Talay, P Brandtzaeg, GS Chhatwal (1997) *SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunoglobulin A and secretory component*. *Mol Microbiol* 25(6):113-1124.

Jerlström PG, SR Talay, P Valentin-Weigand, KN Timmis, GS Chhatwal (1996) *Identification of an immunoglobulin A binding motif located in the β -antigen of the c protein complex of group B streptococci*. *Infect Immun* 64:2787-2793.

valente Pneumokokkenimpfstoff Pneumovax®, der aus den aufgereinigten und konjugierten Polysacchariden der 23 Serotypen besteht, die in Europa und den USA mehr als 90 % der Infektionen verursachen, vermittelt bei den Hauptrisikogruppen keinen ausreichenden Schutz. Eine Strategie, die geringe Immunogenität der Kapselantigene zu steigern, ist die Konjugation mit einem immunogenen Protein. Ein Problem bei der Nutzung von immunogenen Proteinen von *S. pneumoniae* ist die antigene Variabilität der Primärstrukturen. Daher können als Träger nur Peptide dieser Proteine verwendet werden, die in allen Serotypen hochkonserviert sind. Dies können wie bei PspA und SpsA funktionelle Gruppen sein, deren Konserviertheit in epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte.

Perspektiven

Streptokokken-Infektionen sind ein großes Gesundheitsproblem weltweit. Da die Antibiotika allein zur Bekämpfung dieser Infektionen nicht ausreichend waren, steht die Entwicklung von Impfstoffen und anderen Bekämpfungsstrategien im Vordergrund. Eine Voraussetzung ist die genaue Aufklärung der Pathogenese von Streptokokken-Infektio-

nen. Wichtige Ansatzpunkte sind Verständnis über Entstehung des rheumatischen Fiebers, die Mechanismen der Beteiligung von Gruppe C und G Streptokokken an der rheumatischen Herzkrankheit, die Aufklärung der Prozesse wie Pneumokokken sich vom harmlosen Kommensal zum hochvirulenten Erreger verwandeln. Diese Ergebnisse können zur Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Streptokokken und eines besseren Impfstoffes gegen Pneumokokken führen. Darüber hinaus gewinnen zunehmend alternative therapeutische Strategien, die gezielt in verschiedene Infektionsprozesse eingreifen, an Bedeutung. Zur Bekämpfung der Streptokokkeninfektion wird auch das Verständnis über genetische Suszeptibilität des Wirtes eine große Rolle spielen. Die Entschlüsselung des menschlichen sowie des Streptokokken-Genoms wird sicherlich zur Identifizierung der beteiligten Gene, ihrer Regulation und zur Aufklärung der pathogenen Mechanismen beitragen. Ein Engpaß hierbei ist auch der Mangel an geeigneten Tiermodellen. Die Verwendung von suszeptiblen Mausstämmen hat wahrscheinlich das Problem invasiver Infektionsmodelle gelöst, aber die Entwicklung eines Modells für rheumatische Herzkrankheit bleibt eine Herausforderung. Hierfür werden transgene und knock-out-Mäuse eine Anwendung finden. Trotz großer Erwartungen bedarf es noch großer Forschungsanstrengungen, um effektive Impfstoffe und alternative Bekämpfungsstrategien in die klinische Phase zu bringen.

Acknowledgement

Ich danke Dr. Sven Hammerschmidt, Dr. Eva Medina, Dr. Manfred Rohde, Dr. Susanne Talay, Helga Brink und anderen Mitarbeitern des Streptokokken-Teams für ihre Hilfe bei der Anfertigung dieses Aufsatzes.

Abb. 8. Das Streptokokken-Team der GBF

Fig. 8. The streptococci-team of the GBF



- Kreikemeyer B, SR Talay, GS Chhatwal (1995) Characterization of a novel fibronectin-binding surface protein among group A streptococci. *Mol Microbiol* 17:137-145.
- Liang OD, KT Preissner, S Rosenblatt, GS Chhatwal (1997) Identification of novel heparin-binding domains of vitronectin. *FEBS Lett* 407:169-172.
- Medina E, O Goldmann, M Rohde, A Lengeling, GS Chhatwal (2001) Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis*, 184:846-852.
- Medina E, G Molinari, M Rohde, B Haase, GS Chhatwal, CA Guzmán (1999) Fc-mediated nonspecific binding between fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* and human immunoglobulins. *J Immunol* 163:3369-3402.
- Medina E, SR Talay, GS Chhatwal, CA Guzman (1998) Fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* is a promising adjuvant for antigens delivered by mucosal route. *Eur J Immunol* 28:1069-1077.
- Medina E, K Schulze, GS Chhatwal, CA Guzmán (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')₂ fragment. *Infect Immun* 68:4786-4788.
- Molinari G, GS Chhatwal (1998) Invasion and survival of *Streptococcus pyogenes* in Eukaryotic cells correlates with the source of the clinical isolates. *J Infect Dis* 177:1600-1607.
- Molinari G, GS Chhatwal (1999) Streptococcal invasion. *Curr Opin Microbiol* 2:56-61.
- Molinari G, SR Talay, P Valentin-Weigand, M Rohde, GS Chhatwal (1997) The fibronectin-binding proteon of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun* 65:1357-1363.
- Molinari G, GS Chhatwal (1999) Role played by the fibronectin-binding protein SfbI (Protein F1) of *Streptococcus pyogenes* in bacterial internalization by epithelial cells. *J Infect Dis* 179: 1049-1050.
- Molinari G, M Rohde, CA Guzmán, GS Chhatwal (2000) Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol* 2:145-154.
- Molinari G, M Rohde, SR Talay, GS Chhatwal, S Beckert, A Podbielski (2001) The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells. *Mol Microbiol* 40:99-114.
- Preissner KT, GS Chhatwal (1999) Extracellular matrix (ECM) and Host Cell Surfaces: Potential sites of pathogen interaction. In: *Cellular Microbiology*, ed. P. Cossart et al., ASM Press, Washington DC, pp. 49-65.
- Reinscheid DJ, B Gottschalk, A Schubert, BJ Eikmanns, GS Chhatwal (2001) Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J Bacteriol* 183:1175-1183.
- Talay SR, P Valentin-Weigand, GS Chhatwal, KN Timmis (1994) Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein the adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 13: 531-539.
- Talay SR, A Zock, M Rohde, G Molinari, M Oggioni, G Pozzi, CA Guzmán, GS Chhatwal (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol*, 2:521-535.
- Talay, SR, M Grammel, GS Chhatwal (1996) Structure of a group C streptococcal protein that binds to fibrinogen, immunoglobulin G and albumin via overlapping modules. *Biochem J* 315: 577-582.
- Valentin-Weigand P, P Benkel, M Rohde, GS Chhatwal (1996) Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 Macrophages. *Infect Immun* 64:2467-2473.



Das Portrait – Prof. Gursharan S. Chhatwal

Studium am G. S. Medical College in Bombay und Doktorarbeit am Haffkine Institute (genannt nach dem russischen Impfstoffforscher). Danach verschiedene Forschungsaufenthalte in Japan, Kanada und Indien. 1980 Humboldt-Stipendiat an der Universität Gießen, dann Wissenschaftler an der Uni Gießen und der GBF. Seit 1994 Leiter der Abteilung Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung an der GBF. Gewinner der BND Goldmedaille, Lotus Foundation Prize und Whitehall Fund Prize. Habilitation in Mikrobiologie, TU Braunschweig. International Advisor to Lancefield Society for Streptococci and Streptococcal Diseases. 7 Sprachen (Englisch, Deutsch, Japanisch, Hindi, Punjabi, Urdu, Marathi). Hobby: Magie (wenn neben der Wissenschaft etwas Zeit übrig bleibt).

Was steht zurzeit im Focus Ihrer Forschungsarbeit?

Streptokokken und Pneumokokken. Beide stellen ein großes Gesundheitsproblem dar. Infektionen mit Streptokokken können rheumatische Herzkrankheiten zur Folge haben, wovon 15 Millionen Kinder auf der Welt betroffen sind. Bisher gibt es auch keinen Impfstoff. Unser Schwerpunkt ist die Grundlagenforschung. Wir wollen die Mechanismen dieser Krankheiten verstehen, um neue Bekämpfungsstrategien zu entwickeln.

Wissenschaftlich gesehen sind die Streptokokken hochinteressant: Es gibt über hundert verschiedene Serotypen, und sie haben geniale Mechanismen zur Umgehung der menschlichen Immunabwehr entwickelt. An Pneumokokken sterben alleine 40 000 Menschen pro Jahr in den USA. Der Impfstoff ist nicht sehr effektiv, und Antibiotika wirken oft nicht mehr.

Was sind die Ziele Ihrer Arbeit?

Ein Fernziel ist die Entwicklung eines Streptokokkenvakzins für das WHO-Kinderimpfprogramm. Ein Problem ist die Diversität der Streptokokken. Durch die Entzifferung des menschlichen und des Streptokokken-Genoms sind wir in der Lage zu klären, ob die Unterschiede im Krankheitsbild durch die Bakterien, den Wirt oder ihre Interaktionen verursacht werden.

Kleine Kinder sind durch den vorhandenen Impfstoff gegen Pneumokokken bisher nicht geschützt. Hier suchen wir nach neuen Strategien. Zum Beispiel brauchen die Pneumokokken zur Vermehrung im Körper Eisen, das sie sich von körpereigenen Proteinen stehlen. Wenn wir das verhindern könnten, würde die Krankheit nicht ausbrechen.

Wie wird sich die Infektionsbiologie in den nächsten Jahren entwickeln?

Bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten wurden bisher vor allem Antibiotika und klassische Impfstoffe eingesetzt. Die Entwicklung geht zu gezielten prophylaktischen und therapeutischen Maßnahmen. Durch die Identifizierung von Genen von Wirt und Bakterien kann man die genetisch anfällige Population und damit die Zielgruppe für die neuen Impfstoffe identifizieren. Zunehmend gewinnen auch alternative therapeutische Strategien, die gezielt in verschiedene Infektionsprozesse eingreifen, an Bedeutung. Dies sind auch einige unserer Schwerpunkte.

The portrait – Prof. Gursharan S. Chhatwal

University studies at G. S. Medical College in Bombay and PhD thesis at Haffkine Institute (named after the Russian vaccine researcher). Subsequently, various research stays in Japan, Canada and India. In 1980, Humboldt fellow at the University of Gießen, then scientist at Gießen University and GBF. Since 1994 head of the Department of Microbial Pathogenesis and Vaccine Research at GBF. Winner of the BND gold medal, Lotus Foundation Prize and Whitehall Fund Prize. Habilitation in Microbiology at TU Braunschweig. International Advisor to Lancefield Society for Streptococci and Streptococcal Diseases. Seven languages (English, German, Japanese, Hindi, Punjabi, Urdu, Marathi). Hobby: conjuring (if there is time besides science).

What is currently in the focus of your research activities?

Streptococci and pneumococci. Both represent a great health problem. Infections with streptococci can lead to rheumatic diseases of the heart affecting 15 million children all over the world. Up to the present, there is no vaccine. Our priority is basic research. We want to understand the mechanisms of this disease to develop new combating strategies.

From the scientific perspective, streptococci are highly interesting. There are over one hundred different serotypes, and they have developed ingenious mechanisms to circumvent human immune defence. About 40,000 people die annually of pneumococci in the USA alone. The vaccine is not very effective and antibiotics often do not act any more.

What are the goals of your work?

A long-term goal is the development of a streptococcal vaccine for the WHO children's vaccine programme. One problem is the diversity of streptococci. Due to the deciphering of the human and of the streptococcal genome we are in a position to clarify whether the differences in the clinical picture are caused by the bacteria, the host or their interactions.

Small children are so far not protected against pneumococci by the existing vaccine. We are searching for new strategies here. For example, pneumococci need iron for their multiplication in the body, which they steal from the body's own proteins. If we were able to prevent this, the disease would not break out.

How will infection biology develop in the next few years?

In combating infectious diseases, above all antibiotics and classic vaccines have hitherto been used. Development tends towards selective prophylactic and therapeutic measures. By the identification of genes of host and bacteria it will be possible to identify the genetically susceptible population and thus the target group for new vaccines. Alternative therapeutic strategies which selectively intervene in various infection processes are also increasingly gaining significance. These are also some of our priorities.



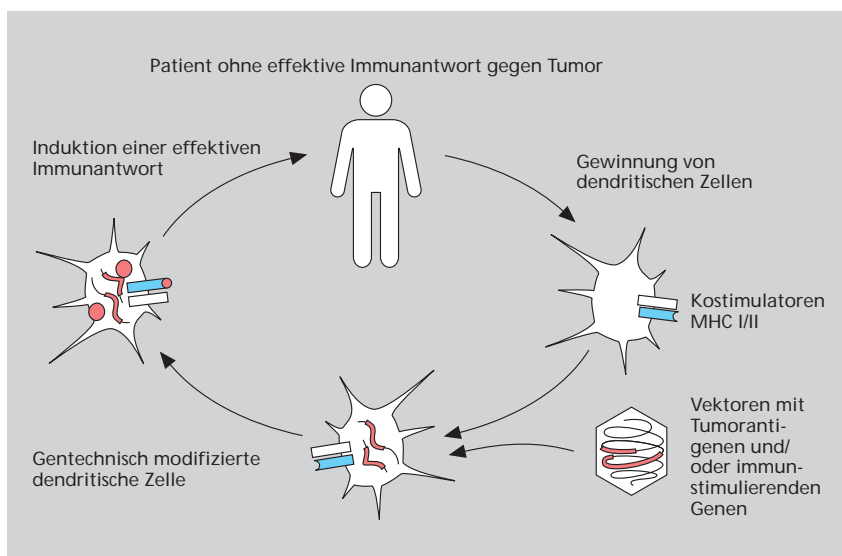
Cytomics - Molekulare Analyse und Engineering von Zellen (SP 1)

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

Ein zentrales Thema des seit 1999 laufenden Cytomics-Programms betrifft Arbeiten zur Kultivierung und Charakterisierung von primären Zellen und ihre gezielte genetische Veränderung, u.a. für therapeutische Anwendungen. Eine dieser Entwicklungen führte zu einem spezifischen Immuntherapieansatz von malignen Tumoren. Mit Hilfe von Adenovirusvektoren werden definierte Tumorantigene in primären dendritischen Zellen von Tumorpatienten exprimiert. Die so modifizierten Zellen sollten nach Rückgabe in die Patienten eine immunstimulierende

Wirkung ausüben und durch Aktivierung von T-Zellen die Tumorzellen angreifen und eliminieren (vgl. Abb.). Unterstützt durch die bestehende GMP-Einheit wurde ein Labor für die Herstellung von viralen Vektoren aufgebaut (GMPIII) und darin die Herstellung der tumorantigen-tragenden Adenoviren unter GMP-Bedingungen etabliert. In Zusammenarbeit mit externen Partnern, insbesondere dem Klinikum Braunschweig (Prof. Wörmann), wurden die Voraussetzungen für Phase I/II Untersuchungen an Malignompatienten geschaffen.

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



Genimmuntherapie maligner Erkrankungen mit Hilfe von genetisch veränderten dendritischen Zellen.

Gene immunotherapy of malignant tumors through the help of genetically modified dendritic cells.

Initiated in 1999, the Cytomics programme is dedicated to studies concerning the culture and characterization of primary cells with the final goal of their application in therapy protocols. One of our activities concerns the development of an immunotherapy of malignant tumors. The concept is based on genetically modified dendritic cells. Adenoviral vectors have been developed to express defined tumor antigens in primary dendritic cells recovered from tumor patients. Cells thus modified exert immunostimulatory actions subsequent to their re-introduction into the donor patient. Thereby tumor-specific T-cells become activated to eliminate the tumor cells (s. Fig.). With the support of the existing GMP unit we established a laboratory for the production of viral vectors (GMPIII). Tumorantigen-expressing adenoviral vectors are produced in this facility. These are the prerequisites for phase I/II studies on melanoma patients (together with Prof. Wörmann, Klinikum Braunschweig).

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, H. Bertram, T. Böldicke, M. Brokelmann, H.S. Conradt, SZ. Czichos, E. Grabenhorst, K. Greger, G. Gross, E. Heil, A. Hoffmann, I. Hollatz-Rangosch, H. Mayer, M. Nimtz, B. A. Ojalvo, B. Pawletta, S. Pohl, D. Stellfeld, H. A. Weich, W. Westphal, A. Winkel

Innerhalb dieses Projektes werden zelluläre Systeme untersucht, wobei zum Einen die Rolle von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sowie ihr Einfluß auf die Rezeptorsignalwege zum Anderen 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 sowie von genetisch veränderten Zellen für die Human-Therapie führen; dies geschieht in enger Anbindung an klinische Einrichtungen.

Osteogenese

Die Regeneration von Bindegewebe, insbesondere von Knochen, Knorpeln und Bändern/Ligamenten werden durch G. Gross, H. Mayer und ihre Mitarbeiter untersucht. Ziel ist hierbei die Aufklärung und gezielte Veränderung von Signalkaskaden (Liganden, Rezeptoren, Signalmediatoren, Transkriptionsfaktoren) in humanen und murinen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* und *in vivo* in Maus- und Rattenmodellen. Mit klinischen Partnern arbeitet man an einer zellvermittelten Therapie von degenerativen Bindegewebserkrankungen wie z.B. Osteoporose, rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis.

Angiogenese

Innerhalb dieses Projektes wird die Wechselwirkung angiogener Faktoren und deren korrespondierenden Rezeptoren untersucht (H. A. Weich). Die Wechselwirkung rekombinanter und natürlich vorkommender löslicher Wachstumsfaktor-Rezeptoren wird in zellulären Systemen und in einem transgenen Mausmodell untersucht. Dabei wird von der Arbeitshypothese ausgegangen, dass natürlich vorkommende lösliche Rezeptoren an der Feinregulation der VEGF-A Bioverfügbarkeit beteiligt sind. Weiterhin werden lösliche rekombinante Rezeptormoleküle aus der VEGF- und FGF-Rezeptorfamilie verwendet, um neue rekombinante Antikörper-Repertoires mittels Phage-Display Technologie zu erzeugen. Sie werden zur Erkennung und

Blockierung spezifischer Zelloberflächenrezeptoren eingesetzt. (T. Böldicke).

Posttranslationale Modifikation von Polypeptiden im Golgi und in zellulären Membranprotein-Transportkompartimenten:

Die Arbeiten dieses Teilprojektes konzentrieren sich auf die Aufklärung der Regulation der komplexen posttranslationalen Modifikationen von Proteinen im Sekretionsweg und Membranprotein-Transportweg tierischer Zellen (H.S.Conradt/M.Nimtz). Unter Einbeziehung neu entwickelter Mikroisolierungsverfahren sowie MS-Techniken werden posttranslationalen Veränderungen von Polypeptiden in definierten Differenzierungsstadien von Zellen und bei Erkrankungen identifiziert. Wir haben gezeigt, dass der Turnover der in den verschiedenen Subkompartimenten des Golgi lokalisierten Glycosyltransferasen durch spezifische Proteolyse im Bereich der „stem region“ reguliert wird. Die Charakterisierung der Glycosylierung, Acylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung von Proteinen im sub pMol Probenbereich erlaubt eine Verfeinerung der Zellkompartimentierungsmodelle und ermöglicht das Studium der Veränderungen von Polypeptiden in Zellen und Geweben in pathophysiologischen Situationen sowie der Krankheits-Diagnostik in Körperflüssigkeiten.

Cellsystems for Therapy and Diagnostics (SP 1.1)

The molecular understanding of cells 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 sufficiently detailed know-how 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. Within this project cellular models are being explored where the role of growth and differentiation factors and their receptors, signalling cascades of cells and the organization of intracellular transport compartments are investigated. 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, therefore, is performed together with collaborators from clinical institutions. New micro analysis techniques for the identification of malformed polypeptides in diseases and ex vivo propagated cells are implemented which are being used for the monitoring of alterations in differentiation and in pathophysiological situations of cells and tissues.

Osteogenesis

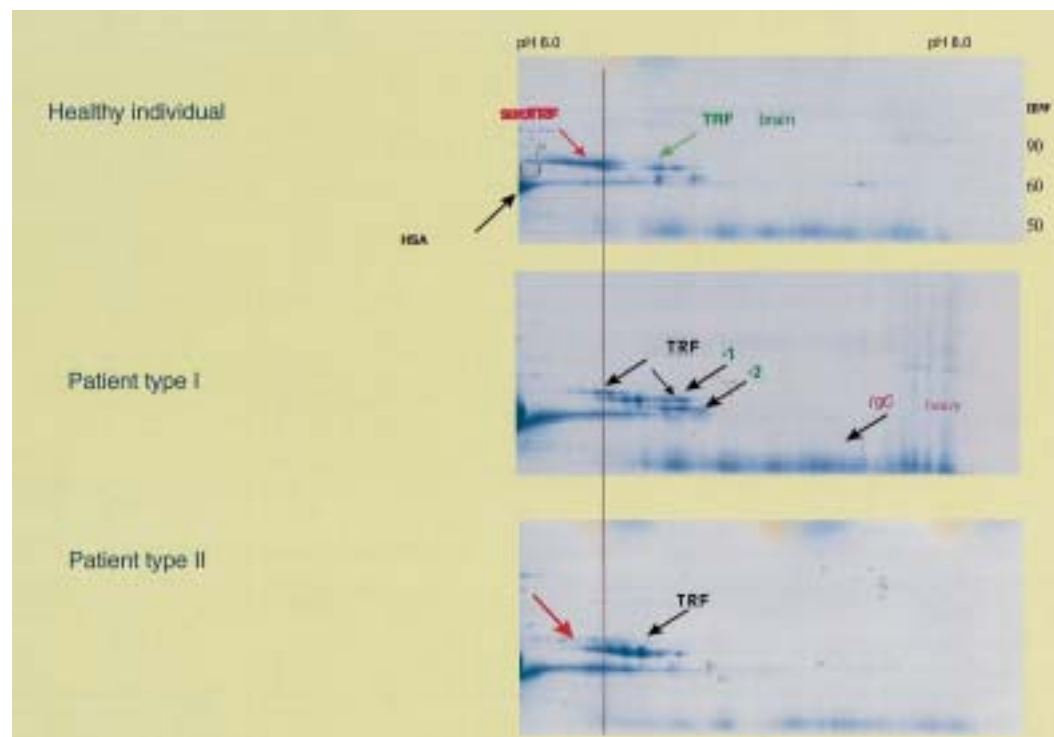
The regeneration of bone, cartilage and tendon/ligaments is investigated in this project (G. Gross, H. Mayer and coworkers). The aim is the elucidation and the intentional modification of signalling cascades (ligands, receptors, signalling mediators, transcription factors) in human and murine mesenchymal stem cells in vitro and in vivo in animal, mouse, and rat models. Possibilities for a cell-mediated therapy of degenerative skeletal diseases such as osteoporosis, rheumatoid- and osteoarthritis are assessed in collaboration with clinical partners.

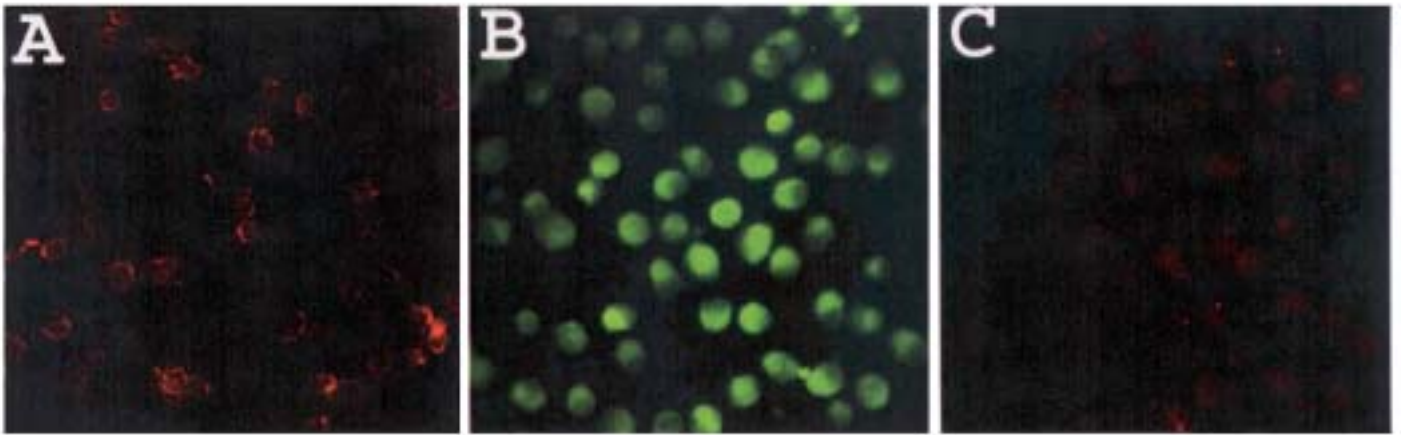
Angiogenesis

In this project the interaction of angiogenic factors and their receptors is investigated (H. Weich). Thereby, the recombinant and naturally occurring soluble growth factor receptors with their ligand family is analyzed in cellular systems and 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.

Abb.1. Ausschnitt aus einer 2-D-PAGE Auftrennung von Proteinen aus Cerebrospinal-Flüssigkeit eines Gesunden und von 2 Patienten mit angeborenen Defekten der Glycosylierung (CDGS-Syndrom). Die Veränderungen der MW und der IEP des Transferrins in Proben aus Patienten sind durch Pfeile gekennzeichnet (Trf).

Fig. 1. Section of a 2D-PAGE separation of proteins from human cerebrospinal fluid obtained from a healthy individual and from 2 patients with congenital disease of glycosylation (CDG). The different MW's and IEP's of the patients transferrin-forms (arrows: Trf) is shown.





Posttranslational modifications of polypeptides in the Golgi and in cellular membran protein transport compartments:

This project aims at the detailed understanding of the regulation of the complex posttranslational polypeptide modification within the transport pathway of animal cells. HS. Conradt and M. Nimtz describe qualitatively and quantitatively the enzyme and accessory protein machinery involved. Technologies are generated allowing for the identification of changed modification patterns in secretory and cell membrane proteins in diseases and defined differentiation states by microisolation techniques and modern MS/MS-MS technology.

Combined with micro-array technology this should enable us to identify further (membrane) protein components and their modification involved in maintaining the proper regulation/control of the posttranslational enzyme machinery. Additionally these techniques allow for large scale screening of defects of the modification pathways in pathological situations employing samples at the sub pmol level.

Publications | Veröffentlichungen

Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne HJ, Waltenberger J, Kollet O, Lapidot T, Yayon A, Weich HA (2001) Single chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34⁺ cells from cord blood. *Stem Cells* 19: 24-36.

Ju W, Hoffmann A, Verschueren K, Tylzanowski P, Kaps C, Gross G, Huylebroeck D (2000) The BMP2 Signaling Mediator Smad1 Participates Predominantly in Osteogenic and not in Chondrogenic Differentiation in Mesenchymal Progenitors C3H10T1/2. *J Bone Min Res* 15: 1889-1899

Boehme C, Conradt HS, Nimtz M, Eckert R, Ragg H, Strathmann A (2001) Glycosylation pattern of human cofactor II from plasma and from recombinant CHO cells. *Eur J Biochem* (in press)

Abb. 2. Immunfluoreszenz Darstellung KDR/VEGFR-2 positiver Zellen in Suspension nach Dekorierung mit dem single chain Antikörper scFvA7. Die Immunfluoreszenz wurde mit einem Axiovert 135TV Mikroskop (Zeiss) dokumentiert. In dem Ausschnitt A werden positive KDR/PAE Zellen inkubiert mit dem Antikörper scFvA7 dargestellt. Doppel-Immunfluoreszenz Färbung von KDR-negativen Zellen mit dem Mitosefarbstoff Mitotracker dye (B) und and Markierung mit dem Antikörper scFvA7 (C).

Fig. 2. Immunofluorescence images with human KDR/VEGFR-2 positive porcine endothelial cells in suspension incubated with single chain antibody scFvA7. Immunofluorescences were analyzed with an Axiovert 135TV (Zeiss). Figure A shows the positive PAE/KDR cells labeled with scFvA7. Double immunofluorescence staining of KDR negative cells with FITC-labeled Mitotracker dye (B) and and scFvA7 (C).

Vektoren für die Gentherapie (SP 1.2)

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

Neuartige genbasierte Therapien erfordern ein vertieftes molekulares Verständnis regulatorischer Prinzipien und der entsprechenden Interventionsmöglichkeiten. Unsere Arbeiten tragen zur Identifikation der beteiligten Faktoren bei, insbesondere solcher, die an endogenen Abwehrmechanismen des Wirtes beteiligt sind. Wir entwickeln geeignete Vektorsysteme, die auf die Bedürfnisse des Zelltyps zugeschnitten und für die Expression der relevanten Faktoren geeignet sind. Außerdem gilt unser Interesse dem Kerntransports und der Zellkern-Kompartimentalisierung.

Adenovirale Vektoren für die Genimmuntherapie

W. Lindenmaier, K. E. J. Dittmar, L. Macke, C. Wiethe, D. Wirth, J. Unsinger, A. Kröger

Maßgebender Ausgangspunkt war die Herstellung therapeutischer DC-Vakzine. In diesem Rahmen wurden Vektoren und Zellkulturbedingungen weiterentwickelt. Zur Immuntherapie des malignen Melanoms wurde ein tricistronischer adenoviraler Vektor geschaffen. Zur Übertragung dieses Ansatzes auf die individualspezifische Therapie von Lymphomen haben wir eine Klonierungsstrategie etabliert, die eine schnelle Herstellung patientenspezifischer Adenovirusvektoren ermöglicht. Für sechs Lymphompatienten wurden die Gene für Fab-Fragmente des tumorspezifischen idiotypischen Immunglobulins in Adenoviren kloniert. Darüberhinaus wurden

Vektoren für den zusätzlichen Transfer von immunmodulierenden Genen der TNF/TNF-Rezeptor-Familie mit der Aussicht etabliert, eine gezielte Verbesserung der immunstimulatorischen Eigenschaften von dendritischen Zellen (Überwindung von Toleranz/Anergie) zu erreichen.

In vielen Situationen erscheint eine steuerbare Veränderung von zellulären Funktionen wünschenswert. Aus diesem Grunde wurden Tetrazyklin-abhängige Systeme für adenovirale Vektoren entwickelt, die eine regulierte Expression in den Zielzellen und damit auch die Expression cytotoxischer Gene erlauben. Nach Einbau von flankierenden, retroviralen LTRs (long terminal repeats) wird nicht nur eine homogene Regulierbarkeit der retro/adenoviralen Hybridvektoren erreicht. Die LTRs bewirken zusätzlich eine effektive stabile Integration der Transgene. Damit

Abb. 1. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Tetrazyklin-gesteuerten Genexpression in einer humanen Zelllinie. Retro/adenovirale Hybridvektoren mit einer autoregulierten Tet-Transaktivator-abhängigen Expressionskassette wurden benutzt, um 293-Zellen zu infizieren.

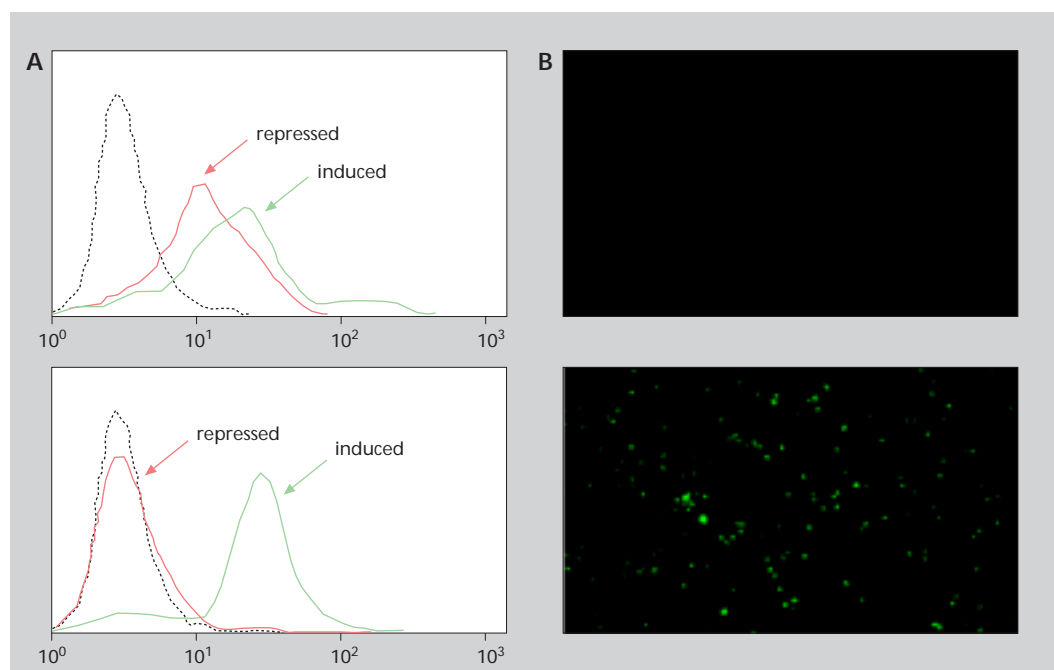
A: Regulation der Genexpression im retro/adenoviralen Transgen (unten) und in einer LTR-freien Kontrolle (oben); nur das retro/adenovirale Konstrukt ermöglicht eine gute Regulation.

B: Im induzierten Zustand (oben) ist eine deutliche grüne Fluoreszenz zu erkennen. In Anwesenheit von Tetrazyklin wird die Expression des GFP-Fusionsproteins reprimiert. Gezeigt sind Zellen, die mit dem retro/adenoviralen Konstrukt infiziert wurden.

Fig. 1. Fluorescence microscopic analysis of tetracycline dependent gene expression in a human cell line. Retro/adenoviral hybrid vectors containing an autoregulatory Tet-dependent expression cassette were used for transfecting 293 cells.

A: Regulation of gene expression within the retro/adenoviral transgene (bottom) and in an LTR-free control (top); only the retro/adenoviral construct is seen to switch on expression from base level (broken and violet traces, resp.) to full activity (green trace).

B: The induced state (top) is marked by a strong green fluorescence. In the presence of tetracycline expression of the GFP-fusion protein is suppressed. Shown are cells which had been infected with the LTR-flanked retro/adenoviral construct.



läßt sich dieser neuartige Vektortyp auch für die dauerhafte Modifikation von Zellen einsetzen.

Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen

M. Wirth, C. Beer

Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen wurden an einem einfachen Modellbeispiel, dem Mausretrovirus (MLV-A)/Maus-System untersucht. MLV-A Infektion führt zur Induktion zahlreicher Reaktionswege in Maus-NIH3T3-Zellen und betrifft die Transkription von ca 5% der Gene in einem 1.2 k Mausarray. Zelluläre Antworten auf die Virusattacke umfassen sowohl bekannte Faktoren des angeborenen Immunsystems, als auch weitere Gene, die als Kandidaten in der Abwehr einer viralen Invasion gelten können.

Dieser Respons und der retrovirale Phänotyp zeigten sich in hohem Grade abhängig vom Zelltyp und den Zellkultivierungsbedingungen. So änderte ein Senken der Kultivierungstemperatur von 37° C auf 32° C die Expression von etwa 10% der Gene in einem 1.2 k Mausarrays. Dabei sind insbesondere Mitglieder des Lipid-Biosynthesewegs, sowie entwicklungs- und tumorspezifische Gene betroffen. Gene des Cholesterintransport- und Biosynthesewegs werden signifikant aktiviert, was zu einem erhöhten Cholesterineinbau in die zelluläre Plasmamembran und damit in die Membranhülle des daraus knospenden Virus führt. Entfernen von Cholesterin aus der Membranhülle nach Produktion ergab Viren mit verbesserter Thermostabilität und besserer Eignung für Aufreinigungs- und Transport/Lagerungsprozesse.

Mechanismen der Signalweiterleitung durch STAT-Proteine

M. Köster

Interferone spielen nicht nur als Signalmoleküle bei der Virus-Abwehr eine wichtige Rolle. Sie sind auch an der Aktivierung des adaptiven Immunsystems und an der Abwehr von Infektionen durch Bakterien und Parasiten beteiligt. In Zielzellen wirken sie über die Aktivierung spezifischer Gene. Verantwortlich hierfür sind latent im Zytoplasma vorliegende Transkriptionsfaktoren, die aufgrund ihrer dualen Funktion als „Signal Transducer and Activator of Transcription“ (STAT) bezeichnet werden. Nach ihrer Aktivierung werden homo- oder heterodimere STAT-Komplexe in den Zellkern transportiert, wo sie die Transkription ihrer Zielgene induzieren.

Ausgangspunkt unserer Arbeiten war die Frage nach der Regulation des intrazellulären Transports von STAT-Proteinen und nach dessen Auswirkungen für die spezifische Geninduktion. Wir konnten zeigen, dass der Aufenthalt der STAT-Proteine im Zellkern durch Deaktivierung und anschließenden Export ins Zytoplasma reguliert wird. Änderungen dieses Gleichgewichts von Import und Export können zu einer geänderten Genaktivierung führen. Um die Regulation des intrazellulären Transports besser zu verstehen, wurden die für den Export verantwortlichen Domänen innerhalb von STAT1 und STAT2 charakterisiert. Ziel laufender Arbeiten ist ein besseres Verständnis des Zusammenhanges zwischen intrazellulärem Transport und molekularen Interaktionen.

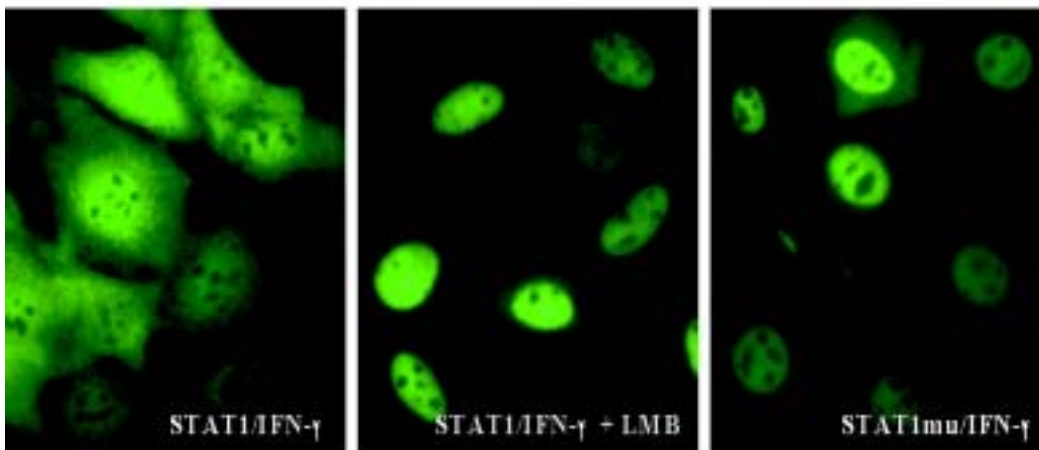


Abb. 2. NIH3T3-Zellen, die ein Fusionsprotein aus STAT1 und eGFP exprimieren, wurden mit IFN- γ bzw. IFN- γ + Leptomycin B (LMB) behandelt. Während nach 24-stündiger IFN- γ -Stimulation STAT1-EGFP wieder im Zytoplasma der Zellen lokalisiert ist, verhindert LMB den Rücktransport des Proteins. Den gleichen Effekt einer anhaltenden Kernakkumulation zeigte eine Mutante von STAT1 (STAT1mu), ohne daß jedoch LMB verwendet wurde.

Fig. 2. NIH3T3 cells expressing a fusion protein from STAT1 and EGFP were treated with IFN- γ or IFN- γ + Leptomycin B (LMB), respectively. Whereas STAT1-EGFP is present in the cytoplasm following a 24 h IFN- γ treatment, LMB prevents the back-transport of the protein. The same effect of an extended nuclear accumulation is reflected by a STAT1 mutant (STAT1mu) even in the absence of added LMB.

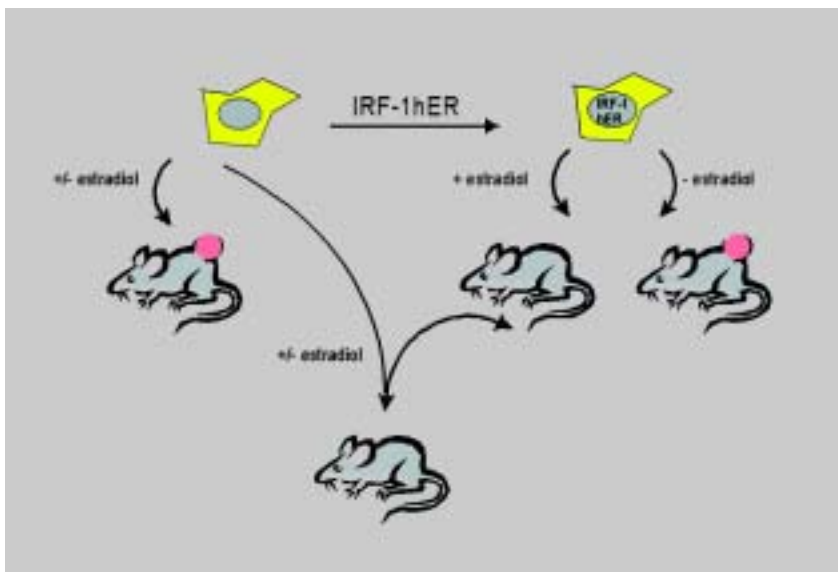
IRF-1 zum Einsatz zur Tumorzellinjektion

A. Kröger

Tumorartig veränderte Zellen werden im Organismus durch das Immunsystem eliminiert. Zellen, die durch bestimmte Mutationen dieser Kontrolle entkommen, können zur Entstehung von Krebs führen. Der Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1), ist ein Faktor, der sowohl tumorsupprimierende als auch immunmodulierende Eigenschaften aufweist. Wir konnten zeigen, dass durch die Integration von IRF-1 in Zellen einer Leberzellkarzinomlinie die Tumorbildung in Mäusen verhindert werden kann. Die Experimente wurden mit einem Fusionsprotein durchgeführt, das es erlaubt, die Wirkung von IRF-1 differentiell durch Östradiol zu aktivieren. In Abwesenheit von Östradiol führt die Injektion von Leberkarzinomzellen in syngenene Mäuse zur Tumorbildung. Im Gegensatz dazu verhindert die initiale Behandlung mit Östrogen die Tumorbildung vollständig bzw. stoppt das Wachstum bereits etablierter Tumore. Werden in so vorbehandelte Mäuse erneut Leberkarzinomzellen injiziert, so führen diese nicht mehr zur Ausbildung von Tumoren. IRF-1 beeinflusst also das Tumorstadium auf verschiedenen Ebenen, zum einen durch einen direkten wachstumshemmenden Effekt auf die Tumorzellen und zum anderen durch die Stimulation des Immunsystems.

Abb 3. Injektion von Tumorzellen führt in syngenene Mäusen zur Tumorbildung. Im Gegensatz dazu kann die Tumorbildung in Anwesenheit von Östradiol verhindert werden, wenn Zellen injiziert werden, die das Östradiol-aktivierbare Fusionsprotein IRF-1hER exprimieren. Die so immunisierte Maus wehrt erfolgreich die erneute Injektion von Tumorzellen ab.

Fig. 3. In syngene mice, the injection of tumor cells leads to tumor formation. If cells express the estradiol-activateable IRF-1hER fusion protein, tumor formation is prevented. A mouse immunized by these modified cells successfully resists tumor formation after yet another injection of non-IRF-expressing tumor cells.



Carcinogene Deletionen

J. Bode, A. Knopp, S. Götze, K. Nehlsen, A. Baer, E. Ernst

Der humane Typ 1 Interferon-Gencluster überdeckt 400 kb auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9. Wie auch der homologe Bereich auf dem Maus-Chromosom 4 kennzeichnet dieser Cluster eine der instabilsten genetischen Regionen des jeweiligen Genoms. Hier ansetzende Deletionen, die Tumorsuppressoren (Prototypen: p16/ARF) einbeziehen, sind eine der häufigsten Ursachen für die Immortalisierung von Zelllinien und die Entwicklung bestimmter Krebsarten (Leukämien, Gliome). Die Aufklärung der Chromatinstruktur in dieser Region des humanen Clusters (9p22), unterstützt durch Sequenzanalysen und -interpretationen, ermöglichte den Nachweis, dass Bruchpunkte auf gesetzmäßige Weise mit Domänengrenzen (scaffold/matrix-attached regions, S/MARs) zusammenfallen. Sie werden somit durch die innere Struktur des Zellkerns determiniert. In Zusammenarbeiten wurden diese Untersuchungen auf die 'breakpoint cluster region' (BCR) des MLL (All-1) Gens und seiner Partnergene (AF4 und AF9) ausgedehnt, wobei sich eine enge Korrelation mit DNA-Übergangstrukturen, wie sie zwischen B-DNA und S/MAR-DNA auftreten, bestätigte. Ausgedehnte S/MAR-freie Regionen enthalten keine 'hotspots of recombination'.

Einige sekundäre Leukämien (tAML) entstehen offenbar als Folge von Therapien mit Topoisomerase II Inhibitoren. Die entsprechenden Bruchpunkte korrelieren wie oben beschrieben mit S/MARs. Da TopoII eine Komponente der Kernmatrix darstellt, scheinen diese Behandlungen die angesprochenen Mechanismen zu verstärken. Es wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem ein schneller Test auf 'drug-related deletions' durchgeführt werden kann.

Vectors for Gene Therapy (SP 1.2)

Novel gene-based therapies require an indepth understanding of the molecular principles of gene regulation and its intervention. We contribute to the identification of the central players which govern gene expression, in particular those which are involved in the endogenous defense mechanisms of the host. Appropriate vector systems were developed for the delivery of the relevant factors and tailored to meet the requirements of the respective cell system. Further interest is on the role of nuclear transport and nuclear structure.

Adenoviral vectors for gene immunotherapy

Initiated by the aim to develop a therapeutic DC-based vaccination a tricistronic adenoviral vector for immunotherapy of malignant melanoma was developed. In order to apply such a concept to the individual-specific therapy of lymphomas, we have established a cloning strategy enabling the fast generation of patient-specific adenoviral vectors. Along these lines we have cloned Fab fragments of tumor specific idiotypic immunoglobulins for six lymphoma patients. We have also established vectors permitting the additional transfer of immunomodulatory genes, belonging to the TNF/TNF-R family, in order to specifically improve the immunoregulatory properties of dendritic cells.

For many applications it is desirable to regulate vector-driven expression. It is for this reason that we developed tetracycline dependent expression units for adenoviral vectors which permit the expression of cytotoxic gene products. Upon addition of retroviral LTRs (long terminal repeats), a homogenous regulation of retro/adenoviral hybrid vectors could be achieved (Fig. 1). The LTRs further enhance the stable integration of adenoviral transgenes. Thus, this novel vector type is well suited for the permanent modification of target cells.

Host-pathogen interactions

were analyzed, by expression profiling using the infection of mouse 3T3c cells by murine leukemia virus (MLV-A) as a model: on a 1.2 k mouse microarray, MLV-A was shown to induce several pathways affecting the transcription of about 5% of genes. Cellular responses involved factors of the innate immune system as well as new candidate genes with a possible role in pathogen defense.

These responses and the phenotype of liberated retroviruses depended, to a large extent, on cell type and cell cultivation conditions. A temperature shift from 37° C to

32° C affected 10 % of the genes in comparative mouse 1.2 k arrays. Among these were members of lipid biosynthetic, developmental and tumor induction pathways, involving central factors of the respective signal transduction routes. Notably, genes involved in cholesterol transport and biosynthesis were activated leading to increased cholesterol incorporation into cellular plasma membranes as well as into the outer shell of released MLV

Signal transduction pathways mediated by STAT proteins

Interferons are signalling molecules which are found to be involved in viral defense. In addition, they play a role in activating the adaptive immune system and in the defense of infections caused by all types of pathogens. Within the target cell, interferons activate particular sets of genes via 'signal transducer and activator of transcription' (STAT-) factors. STAT factors associate to form a variety of homo- and heterodimeric complexes which are subsequently transported to the nucleus where they induce a specific set of genes.

Our work was centered around the intracellular regulation of STAT transport and the subsequent gene activation mechanisms. We could demonstrate that nuclear turnover of STATs is mediated by dephosphorylation and subsequent export into the cytoplasm. Alterations of this intracellular equilibrium between import and export leads to altered gene expression levels. We characterized the export domains of STAT1 and STAT2. Our goal is an indepth understanding of the interplay between molecular interactions and intracellular transport.

IRF-1 for tumor vaccination

Tumorigenic cells are usually eliminated by the immune system. Cells escaping these control mechanisms can lead to tumor formation. The Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1) is a factor which mediates both tumor

suppressing and immune modulatory activities. We could show that the integration of IRF-1 into a hepatocellular carcinoma cell line prevents tumor formation in mice. The respective experiments were performed on an estradiol reactive fusion protein, which is differentially activatable by estradiol: While in the absence of estradiol the injection of hepatocellular carcinoma cells containing the IRF-1hER fusion protein mice leads to tumor formation in syngenic mice, an initial treatment with estradiol prevents tumor formation or stops tumor growth of established tumors. If previously treated mice are injected a second time with hepatocellular carcinoma cells they are protected against tumor formation. This suggests that IRF-1 activity is mediated by different mechanisms: on the one hand by an antiproliferative effect directed toward the tumor cells and on the other by stimulating the immune system.

Genomic instability: Carcinogenic deletions

The human type 1 interferon gene cluster covers 400 kb on the short arm of chromosome 9. Like the syntenic region on mouse chromosome 4, this cluster represents one of the most unstable genomic regions within the respective genome. Deletions which originate here and which involve tumor suppressor genes (prototype: p16/ARF) give rise to immortalization and are the molecular reason for certain forms of cancer (leukemias, gliomas). Sequence analyses together with in vitro assays strongly suggest that the chromatin structure in this region is determined by the presence of domain borders

(scaffold/matrix attached regions, S/MARs). Therefore, genome fragility is governed by the internal organization of the cell nucleus. In various cooperations these studies were extended to the breakpoint cluster region (BCR) of the MLL (All-1) gene and its partner genes (AF4 and AF9) confirming a tight correlation with DNA-transition structures as they arise between B-type and S/MAR-DNA. Extended S/MAR-free regions are devoid of hotspots of recombination.

Certain secondary leukemias (tAML) arise subsequent to therapies which are based on topoisomerase II inhibitors. As above, breakpoints coincide with S/MARs. Since TOPO II is an established component of the nuclear matrix, these treatments appear to fortify the mentioned reaction pathways. We have developed a protocol permitting the facile determination of 'drug-related deletions'.

Publications | Veröffentlichungen

Baer A, Schübeler D, Bode J (2000) Transcriptional Properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* 39:7041-7049.

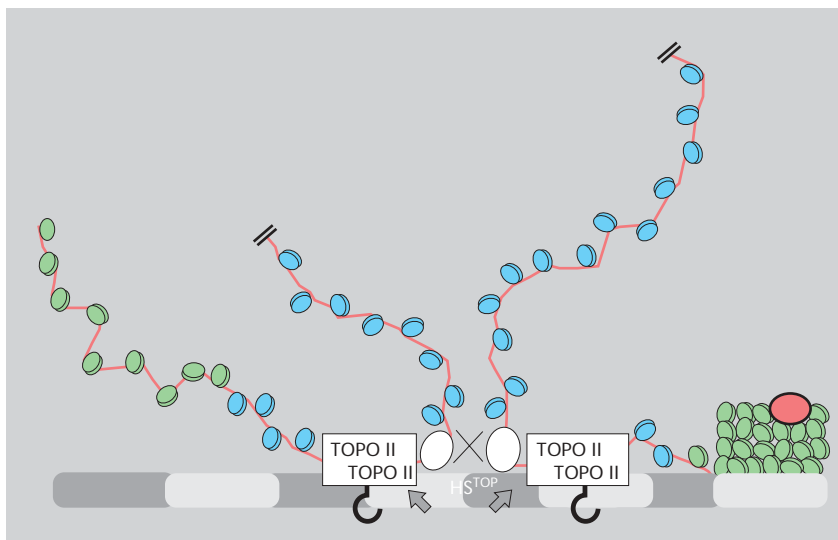
Bode J, Benham C, Ernst E, Knopp A, Marschalek R, Strick R, Strissel P (2001) Fatal Connections: When DNA Ends Meet on the Nuclear Matrix. *J Cell Biochem Suppl* 35:3-22.

Kröger A, Ortmann D, Krohne TU, Mohr L, Blum HE, Hauser H, Geissler M (2001) Growth suppression of the hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6 by an activatable IRF-1 in mice. *Cancer Res.* 61:2609-2617.

Lillemeier BF, Köster M, Kerr IM (2001) STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J* 20:2508-2517.

Fig. 4. The transition between nuclear matrix attachment sites and normal nucleosomally organized chromatin is marked by topoisomerase II-sensitive DNA structures. An error-prone Topo II mechanism can lead to the deletion of tumor suppressor genes under the influence of certain established therapeutic drugs and thereby cause secondary forms of cancer.

Abb. 4. Am Übergang von Kernmatrix-Haftstellen zu Chromatin normaler nucleosomaler Organisation entstehen Topoisomerase II-sensitive DNA-Strukturen. Eine Fehlleitung des normalen TOPO II Mechanismus kann, begünstigt durch in der Krebstherapie etablierte Therapeutika, zur Deletion von Tumorsuppressorgenen und damit zur Entstehung sekundärer Krebsarten führen.



Zell-, Gewebe- und Organkulturtechnik (SP 1.3)

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

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

Das Projekt befasst sich seit 1999 mit der *in vitro* Rekonstitution von organotypischen Geweben aus Einzelzellen oder Zellverbänden. Der *ex vivo*-regenerierte bioartifizielle Gewebeersatz soll zum therapeutischen Einsatz bei der Behandlung eines Organversagens sowie zur Reimplantation eingesetzt werden. Darüber hinaus dienen die Arbeiten einer Erweiterung des grundlegenden Verständnisses vom Zusammenspiel komplexer Zellsysteme zur Generierung neuer Konzepte bei der Entwicklung von organotypischen Gewebemodellen. Die Hauptaktivitäten fokussieren auf die folgenden Organsysteme: Leber (Organversagen, Pharmatests), Knochen (Reimplantation), Herz (Herzklappen) und Nervensystem (Reimplantation, Behandlung der Parkinson-Krankheit).

Kultivierung und Differenzierung von Stammzellen

Ziel des Projektes ist das Verständnis des Mechanismus der Proliferation und Gewebe-spezifischen Differenzierung in fötalen Stammzellen bei Leber, ZNS und Herz ausgehend von Progenitor- oder Stammzellen aus Nagern. Zur Identifizierung der Expressions- und Differenzierungsmarker wurden entsprechende Genexpressions-Microarrays entwickelt. Die Herstellungsprotokolle sowohl für neuronale und hepatische Progenitoren aus fötalem Gewebe als auch ihre Expansion wurden etabliert. Der Einfluss verschiedener Matrices und Kulturmedien wurde untersucht, wobei die Viabilität und die Anheftung an die Substratoberfläche nach der Isolation und Zellaussaat als der kritischste Schritt im Hinblick auf die Proliferationskapazität identifiziert wurden. Die Zellen konnten unter definierten Kulturbedingungen nach 7 Tagen bis zum 13-fachen expandiert werden. Darüberhinaus wurde ein Membran-Bioreaktor-Modell zur Standardisierung der Kulturbedingungen untersucht, das die Matrixgeometrie und die physiologischen Sauerstoffgradienten rekonstruieren kann. Dieses Konzept wird derzeit auf verschiedene Zelltypen adaptiert. Die Differenzierungsparameter expandierter Zellen werden durch verschiedene zellbiologische und molekulare Methoden untersucht. Weiterhin wurde ein Leber- und ein Nerven-spezifischer DNA-Chip zur Verbesserung der Evaluierung von Leber- und Nerven-Progenitor-Zellen entwickelt.

Züchtung von Knochengewebe

Die Isolierung, Vermehrung und Differenzierung primärer osteogener Zellen für die Generierung hochvitaler Knochenimplantate *in vitro* ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Ein wichtiger Teilaspekt besteht in der Anheftung und Ausspreitung der Zellen auf geeigneten Gerüstmaterialien sowie der Zellvermehrung und gerichteten Differenzierung unter besser definierten Medienbedingungen um somit den Einsatz von autologen Seren oder FKS zu minimieren. Verschiedene serumfreie oder Serum-reduzierte Kulturmedien wurden entwickelt um die spezifischen Bedürfnisse der Zellen während der verschiedenen Phasen der Osteogenese *in vitro* zu decken. Diese Strategie erwies sich überlegen gegenüber der Verwendung nur eines einzigen Mediums während Anheftung, Vermehrung und Differenzierung. Die initiale

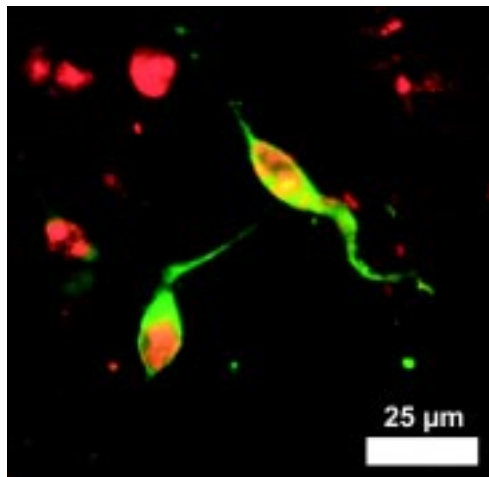


Abb.1. BrdU-markierte dopaminerge Neurone

Fig.1. BrdU-labelled dopaminergic neurones

Anheftung osteogener Zellen auf dreidimensionalen Trägergerüsten wurde durch die Entwicklung eines neuartigen Halterahmens substantiell verbessert.

EU-Demonstrationsprojekt „Protein-free Medium“

Im Berichtszeitraum konnte das EU-Demonstrationsprojekt (BIO4-CT97-2140) erfolgreich abgeschlossen werden. Ziel dieses Projektes war es, die prinzipielle Anwendbarkeit proteinfreier und chemisch definierter Zellkulturmedien für die Herstellung biopharmazeutischer Produkte zu zeigen. Im Rahmen dieser Arbeiten gelang es an der GBF in einem Modellprozess die Kultivierung von BHK-Zellen zur Produktion von Interleukin-2 im Pilot- (20 L) und Produktionsmaßstab (1000 L) in Airliftreaktoren zu etablieren. Weiterhin wurden im Rahmen des Projektes Untersuchungen zur Auswirkung von proteinfreien Kultivierungsbedingungen auf die Produktqualität durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Glykosylierungsmuster der mit proteinfreien Medien hergestellten Produkte eines Projektpartners analysiert und mit den Mustern verglichen, die von den selben Produkten erhalten wurden, wenn sie unter Einsatz serumhaltiger Kulturmedien produziert wurden. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Anwendung proteinfreier Medien in der Regel nicht zu veränderten Glykosylierungsmustern führt. Manche Zellklone verhalten sich unter diesen Bedingungen jedoch anders als in serumhaltigen Kulturmedien, was dann zu unterschiedlichen Glykosylierungen der erzeugten Proteine führt.

EU-Projekt „BioNose“

Die Mehrzahl von Produktionsprozessen, die tierische Zellkulturen anwenden, werden zur Herstellung von biopharmazeutischen Produkten eingesetzt. Entsprechend hoch sind die Anforderungen an Sicherheit und Qualität, was eine extrem leistungsfähige Prozesskontrolle erfordert. Auch heute sind die meisten dieser Prozesse noch nicht voll optimiert, da es zur Zeit keine Möglichkeit gibt, alle notwendigen Prozessparameter online zu erfassen. Die Anwendung von „Elektronischen Nasen“, d.h. miniaturisierten Arrays relativ unspezifischer Sensoren, die charakteristische Signalmuster erzeugen, wenn sie mit gasförmigen Emissionen in Kontakt gebracht werden, kann ein Konzept zur Etablierung einer modernen Prozesskontrolle sein, das den Anforderungen an biopharmazeutische Herstellungsprozesse entspricht. Im Rahmen eines EU-Projektes untersucht die ZKT zur Zeit zusammen mit anderen europäischen Forschungsinstituten und Industriepartnern, in wieweit „Elektronische Nasen“ zur Erfassung charakteristischer und reproduzierbarer Signalmuster aus Fermentationen von Säugerzellen eingesetzt werden können. Im Mittelpunkt der hier durchgeführten Arbeiten steht dabei die Optimierung transienter Transfektionssysteme auf der Basis der HEK 293 Zelllinie sowie die frühzeitige Detektion von Kontaminationen mit Mycoplasmen.

Metabolische Netzwerke

In Zusammenarbeit mit Dr. M. Wirth (SP1.2) wurde ein auf dem „immediate early gene“ *c-fos* basierendes GFP-Reportersystem zur dynamischen Untersuchung von Stress-Reaktionen tierischer Zellen in Kultur konstruiert und charakterisiert. Die destabilisierte GFP-Variante pd2EGFP erwies sich aufgrund ihres hohen Expressionsniveaus und einer schnellen Antwort auf die Veränderungen von Milieubedingungen als Modellsystem besonderes gut geeignet.

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

The project was initiated in 1999 and focuses on the reconstitution of organ-like tissues from single cells or cell compositions. The *ex vivo* regenerated bioartificial tissue substitute shall be used for the treatment of organ failure as well as for reimplantation. Moreover, the activities serve to increase the basic knowledge of the cooperation of complex cell systems to generate new concepts for the development of organ-like tissue models. The main activities focus on following organ systems: liver (organ failure, pharmatests), bone (reimplantation), heart (heart valves) and nervous system (reimplantion, treatment of Parkinson's disease).

Cultivation and Differentiation of Stem Cells

Our aim is to understand the mechanisms of proliferation and tissue specific differentiation in fetal stem cells including liver, CNS and heart originating from rodent progenitor or stem cells. In order to identify expression and differentiation marker gene expression microarrays for these tissues were developed. The preparation protocol of neural and hepatic progenitors from fetal tissue as well as their expansion are already established. We started by investigating the influence of different matrix and culture medium components on the proliferation of progenitor cells. The viability and attachment on the substrate surface of progenitors after isolation and cell seeding are a very critical step with respect to the proliferation capacity. With defined culture conditions cells could be proliferated up to 13 fold after seven days in culture. Furthermore, we investigated a membrane bioreactor model that reconstructs matrix geometry and physiologic oxygen gradients of cultured cells to standardise the culture conditions. This concept will be now adapted to different cell types. The differentiation parameters of expanded cells are monitored by different cell biological and molecular methods. In addition, a liver and neural specific DNA chip is being developed to improve the evaluation of liver and neural progenitor cells.



In vitro Generation of Bone Tissue

The isolation, proliferation, and differentiation of primary osteogenic cells for the generation of highly viable bone implants *in vitro* is a field of intensive investigation. An important issue within this topic is the attachment and spreading of cells onto suitable scaffold materials as well as cell expansion and directed differentiation under more defined medium conditions thus minimizing the use of autologous sera or FBS. Different serum-free or serum-reduced culture media have been developed to meet the specific cellular requirements for each of the different phases of osteogenesis *in vitro*. This strategy proved to be superior to the use of the same media during attachment, expansion and differentiation. The initial attachment of osteogenic cells on three-dimensional scaffolds has been substantially improved after development of a novel support screen.

During the last year the EU-Demonstration Project (BIO4-CT97-2140) was successfully completed. Main objective of this project was to demonstrate the applicability of protein-free and chemically defined cell culture media for the manufacturing of biopharmaceuticals in principle. During the work for the project it was possible to establish a model process at GBF for the cultivation of BHK cells for the production of Interleukin-2 on pilot (20 L) and production scale (1000 L) in airlift bioreactors. Furthermore, the effects of

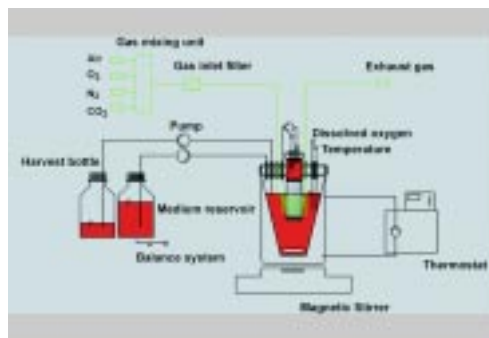


Abb.2. 3-Komponenten Mini-Festbett-Bioreaktor-Station für die Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Fig. 2. 3-Component mini-fixed-bed bioreactor system for the cultivation of mesenchymal stem cells.

protein-free cultivation conditions on product quality was investigated. For this purpose, the glycosylation patterns of the products of one project partner that were produced using protein-free cell culture media were analysed. These patterns were compared to those obtained from the same products when produced with serum-containing media. These investigations demonstrated that protein-free cultivation conditions normally do not alter the glycosylation patterns of the product. Nevertheless, some cell clones behave differently under these conditions than in serum-containing cell culture media leading to different glycosylation patterns of the proteins produced.

EU-Project "BioNose"

A majority of the animal cell culture processes is used for the production of biopharmaceutical products. Accordingly, the requirements on quality and safety are high, demanding an extremely efficient process control equipment. Even today most processes are sub-optimised since there currently exist no means to monitor all important process parameters on-line. The application of "Electronic Noses", i.e. miniaturised arrays of rather unspecific sensors that generate characteristic signal patterns when exposed to gaseous emissions, can provide a concept for the establishment of modern process control equipment that meets the requirements of manufacturing processes of biopharmaceuticals. In the course of an EU-project ZKT, together with other European research institutions and industrial partners, currently investigates the potential of "Electronic Noses" for the monitoring of characteristic and reproducible signal patterns from fermentations with mammalian cell lines. This work is focussed on the optimisation of transient transfection systems (based on the HEK 293 cell line) as well as the early detection of contaminations with mycoplasma. During the first year of the project the cultivation systems that are intended to be used were established successfully and the prototype of the "Electronic Nose" developed by other project partners was installed. Further work will first concentrate on the determination of cell line specific signal patterns and the influence of different bioreactor configurations on these patterns.

Metabolic Networks

A GFP reporter system based on the "immediate early gene" c-fos for dynamic investigations of stress reactions of animal cells in culture was constructed and characterized in a collaboration with Dr. M. Wirth (SP1.2). The destabilizing GFP variant pd2EGFP showed high expression rates and was selected as a suitable model responding to changes in culture conditions.

Publications | Veröffentlichungen

Hesse F, Wagner R (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics from mammalian cell cultures *Tibtech* 18:173-180.

Chico E, Jäger V (2000) Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: A method to restore cell-specific S-trace glycoprotein productivity at high cell density. *Biotechnol Bioeng* 70: 574-586.

Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne H-J, Waltenberger J, Kollet O, Lapidot T, Yavon A, Weich H (2001) Anti-VEGFR-2 scFvs for Cell Isolation. Single Chain Antibodies Recognizing the Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the Surface of Primary Endothelial Cells and preselected CD34⁺ Cells from Cord Blood. *Stem Cells* 19:24-36.

Wagner R (2001) Process-orientated metabolic engineering: Cell lines with new properties in nutrient exploitation and protein glycosylation. In: Cole, J., Mattanovich, D. (eds.) *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands

Zell- und Gewebekulturen (SP 1.4)

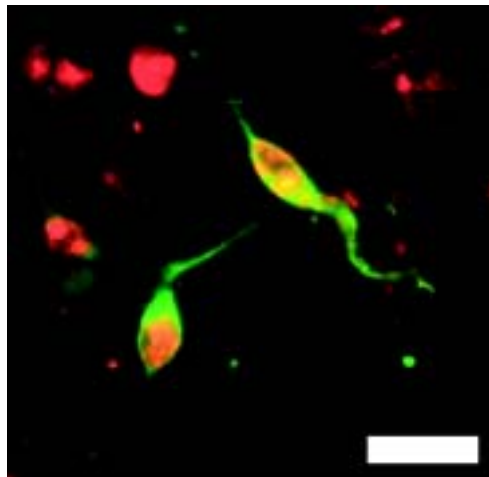
Projektleiter | *Project leader*: Dr. A. Bader | Nachwuchsforschergruppe Organ- und Gewebekulturen | *Junior Research Group Organ- and Tissue Culturing*

Projektmitarbeiter | *Project members*: L. Just, F. Stahl, C. Mauth, E. Schmelzer

Unser Ziel ist es, die Mechanismen zur Proliferation und gewebespezifischen Differenzierung von fötalen Vorläuferzellen und Stammzellen der Ratte aus der Leber und dem ZNS zu erforschen. Um die Expressions- und Differenzierungsmarker zu identifizieren, werden dazu gewebespezifische Microarrays entwickelt. So können Microarrays für Expressionsanalysen von neuronalen und leberspezifischen Proteinen wie Neurofilamente, Rezeptoren oder Enzyme des Cytochrom P450 und Phase II-Systems genutzt werden, um Wachstums- und Differenzierungsphasen von neuronalen Zellen und Hepatozyten in Abhängigkeit von ihrer Umgebung bestimmen zu können. Zur Optimierung der Zellkulturbedingungen und zur Analyse der physiologischen Kapazität des generierten Gewebes ist es daher von Vorteil, die traditionellen molekularen und zellbiologischen Methoden zusammen mit der Microarray-Technologie einzusetzen.

Expansion von neuronalen Vorläuferzellen aus dem ventralen Mesencephalon der Ratte und ihre Differenzierung zu dopaminergen Neuronen

Transplantationen von fötalen dopaminergen Neuronen werden mittlerweile als eine therapeutische Möglichkeit bei der Parkinson'schen Erkrankung angesehen. In diesem Projekt soll die *in vitro*-Expansion von neuronalen Vorläuferzellen der Ratte und ihre anschließende Differenzierung zu Dopaminneuronen optimiert werden. Weiterhin wollen wir die individuellen Faktoren, welche die Differenzierung der expandierten Vorläuferzellen induzieren können, analysieren. Zunächst haben wir begonnen, den Einfluß von verschiedenen Matrices und Zellkulturmedienkomponenten auf die Proliferation der Vorläuferzellen zu untersuchen. Die Überlebensrate und das Anheftungsverhalten der Zellen ist in Bezug auf die Proliferationskapazität äußerst wichtig. Unter definierten Kulturbedingungen konnten die Vorläuferzellen innerhalb einer Woche bis zum 13fachen vermehrt werden. Die Differenzierungsparameter der generierten Neurone wurden dabei mittels Immunzytochemie, *in situ*-Hybridisierung, RT-PCR, HPLC und Microarray-Technik bestimmt. Das physiologische Potential der *in vitro*-generierten dopaminergen Neuronen und ihre Fähigkeit, komplexe sensomotorische Verhaltenweisen wiederherzustellen,



Proliferierte Vorläuferzellen differenzieren sich zu dopaminergen Neuronen. Zellkerne der proliferierten Zellen: rot; Dopaminneurone: grün; Balken: 25 µm.

Proliferated precursors differentiate into dopaminergic neurones. Nuclei of proliferated cells: red; Dopamine neurones: green; bar: 25µm.

werden jetzt mittels Transplantationen im Parkinson Rattenmodell durch die Forschergruppe von Herrn Guido Nikkhah an der Medizinischen Hochschule Hannover untersucht.

Fötale Hepatozyten und embryonale Stammzellen – Optimierung der Proliferation und Differenzierung

Fötale Hepatozytenkulturen stellen ein optimales System für Anwendungen in drug screening Modellen, für bioartifizielle Leberorgansysteme und nicht zuletzt für die Grundlagenforschung der Embryonalentwicklung dar. Unser Ziel ist daher, fötale Hepatozyten am Modell der Ratte *in vitro* zu proliferieren und zu differenzieren, um einen Pool hoch differenzierter Hepatozyten zu generieren, welche die komplexen metabolischen Funktionen adulter Hepatozyten *in vivo*

exprimieren. Aus diesem Grund isolierten wir fötale Hepatozyten bestimmter Entwicklungsstadien und etablierten optimale Kulturbedingungen, wie zum Beispiel Kulturmatrix, Medien, Supplemente und Wachstumsfaktoren. Der Nachweis der komplexen metabolischen leberspezifischen Funktionen erfolgte durch Messung der Albuminproduktion, der Cytochrom-P450-Aktivität, des Glukosegehalts und des Laktatumsatzes, sowie durch *in situ* Hybridisierung und Immunzytochemie. Wir sind auf Grund der optimierten Kulturbedingungen in der Lage, große Zellmengen zu generieren, wobei die Hepatozyten die komplexen metabolischen Funktionen von Leberzellen *in vivo* exprimieren.

DNA Chiptechnologie

Sowohl durch Variationen in der Erbsubstanz als auch durch Umweltfaktoren ergeben sich die individuellen Unterschiede innerhalb einer Population. Diese Einflüsse können sowohl durch die Analyse von Sequenzvariationen (Mutationen und Polymorphismen) als auch durch die Analyse der Genexpression untersucht werden. Zur Analyse von biologischen Systemen mit 100.000 Genen muß die Genexpression quantitativ auf genomischer Ebene erfaßt werden. Bisher haben wir drei DNA Chips dafür entwickelt, einen humanen und einen Rattenleberchip sowie einen neuronalen Chip der Ratte. Diese Chips enthielten mehrere 100 Oligonukleotide und wurden mit fluoreszenzmarkierter cDNA hybridisiert. Die Vorteile der Chiptechnologie gegenüber den klassischen molekular-biologischen Methoden beruhen auf dem hohen Parallelisierungsgrad und dem miniaturisierten Format. Die DNA Chiptechnologie eignet sich besonders für schnelle und effiziente Analysen im Massenscreening.

Veröffentlichungen | Publications

Bader A, Hansen T, Kirchner G, Allmeling C, Haverich A, Borlak JT (2000) Primary porcine enterocyte spheroidal cultures to study drug oxidation. *Brit J Pharmacol* 129:331-342.

Bader A, DeBartolo L, Haverich A (2000) High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* 25:95-105.

DeBartolo L, Jarosch v Schweder, G, Haverich A, Bader A (2000) A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: Cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Progr* 16:102-108.

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

Stahl F, Just L, Bader A (2000) Development of a liverspecific microarray for the prediction of drug metabolising enzyme induction. *Biol Chem* 381:221.

Cell and Organ Tissue Culturing (SP 1.4)

This project aims to investigate the mechanisms of proliferation and tissue specific differentiation in progenitor or stem cells obtained from foetal liver and CNS of rat. In order to identify expression and differentiation marker we developed gene expression microarrays for these particular tissues. For example, microarrays for neural specific proteins, like neurofilaments, receptors, or neurotransmitter related enzymes as well as for cytochrome P450s and Phase II enzymes can be used to evaluate neural cells and hepatocytes in different growth and differentiation phases. In order to optimise cell culture conditions, and analyse the physiological capacity of engineered tissue it will be necessary to use traditional molecular and cell biological methods in combination with microarray technology.

Expansion of neuronal progenitors from ventral mesencephalon of rats and their differentiation into dopaminergic neurones

Transplantations of foetal dopaminergic neurones from ventral mesencephalon have become a therapeutic option for patients with severe Parkinson's disease. In this project we seek to optimise the *in vitro* expansion of neuronal progenitors and their differentiation into dopaminergic neurones in the rat animal model. Furthermore, we want to investigate the individual factors which induce specific differentiation of expanded progenitors. We started by investigating the influence of different matrix and culture medium components on the proliferation of progenitor cells. The viability and attachment on the substrate surface of progenitors after isolation and cell seeding was a very critical step with respect to the proliferation capacity. With defined culture conditions cells could be proliferated up to 13 fold after seven days in culture. The differentiation parameters of generated neurones were monitored by immunocytochemistry, *in situ* hybridisation, RT-PCR and HPLC analysis, and neural specific microarrays. The physiological potential of *in vitro* generated dopaminergic neurones and their ability to restore complex sensorimotor behaviours is going to be analysed in the rat Parkinson model by the research group of Guido Nikkhah at the Medical School Hannover.

Foetal hepatocytes and embryonic stem cells – optimisation of proliferation capacity and differentiation

Foetal hepatocytes provide an optimal tool for research in drug screening models, bioartificial liver support systems and in basic investigations of embryonic development. Our goal is to proliferate and differentiate foetal rat

hepatocytes as a model for human cells *in vitro* to generate a pool of highly differentiated hepatocytes with complex metabolic functions of adult hepatocytes *in vivo*. For this reason, we isolated stage specific foetal hepatocytes and established optimal culture conditions including extracellular matrix, culture media, supplements, and growth factors. Support of metabolic function was investigated by several liver specific functions: albumin production, cytochrome-P450-activity, glucose and lactic acid turnover, *in situ* hybridisation and immunocytochemistry. By using our optimised culture conditions and application of growth we could generate great amounts of hepatocytes which represent complex metabolic functions of liver cells *in vivo*.

DNA chip technology

Biological differences among individuals in a population are due to both genetic and environmental factors. These influences can be understood by studying variability in genomic sequence (mutations and polymorphisms) and in how much of each gene product is made in a given cell or tissue (gene expression). For the understanding of biological systems with 100,000 genes the measurement of RNA levels for a complete set of transcripts of an organism is necessary. We have developed three specific microarrays for human liver, rat liver and, rat neurons. These DNA chips, containing several hundred immobilised DNA samples, were hybridised with fluorescent labelled cDNA probes. The power of the microarrays comes from the highly parallel, addressable, miniaturised format that provides significant advantages over traditional molecular biological methods. Parallel gene analysis with DNA chips provides a rapid and efficient method for large-scale and high throughput applications.



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

Pathogenitätsforschung und Vakzinentwicklung (SP 2)

Infektionskrankheiten übertreffen sowohl an Häufigkeit als auch gemessen an der Sterblichkeit alle anderen Arten von Krankheiten. Weltweit finden pro Jahr über 17 Millionen Menschen durch Infektionskrankheiten den Tod. Trotz Verfügbarkeit einer großen Zahl verschiedener Antibiotika sind die Infektionskrankheiten weiter auf dem Vormarsch. Neben Antibiotikaresistenz zählten hierzu in den letzten Jahren auch viele andere Faktoren als Ursache. Der Mensch versucht, durch neue Antibiotika, Vakzine und verbesserte Hygiene die pathogenen Mikroben auszuschalten. Die Mikroben reagieren hierauf mit der Entwicklung neuer Stoffwechselwege, neuer Proteine und anderer Strategien, die nicht weniger genial sind als die, welche der Mensch zu ihrer Vernichtung entwickelt hat. Zieht man die Sterblichkeitszahlen in Betracht, sieht es so aus, als hätten die Mikroben in dieser Auseinandersetzung zur Zeit die Oberhand. Das Problem wird dadurch verschärft, dass die Menschen immer älter werden und durch Globalisierung die weltweite Mobilität erhöht wird. Zusätzlich gewinnen aufgrund der Veränderungen unseres heutigen Lebensstils, Soziallebens und kommerzieller Interessen vieler Lebensmittelproduzenten „neue“ Erreger und Epidemien, wie z.B. Prionen, HIV, MKS etc., an Bedeutung. Ein weiteres Problem sind körpereigene Reaktionen auf die Infektion, darunter Autoimmunerkrankungen, die als Folge vieler Infektionen bei bestimmten genetisch dazu veranlagten Personen vorkommen können. Die Probleme von Infektions- und Folgeerkrankungen sind also keineswegs gelöst. Daher gilt die Erforschung von Infektionskrankheiten und Immunität als eine der großen gesundheitspolitischen Herausforderungen dieses Jahrhunderts.

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 Wirtes.

Das Ziel des Schwerpunktes ist es, Pathogenitätsmechanismen und Wirtsabwehrreaktionen besser zu verstehen. Schwerpunktmäßig werden pathogene Keime der Schleimhäute in Verbindung mit dem Schleimhautimmunsystem bearbeitet. Sechs Arbeitsgruppen und zwei Nachwuchsgruppen der GBF arbeiten in diesem Schwerpunkt zusammen, um verschiedene Aspekte der Pathogenität und Immunabwehr zu untersuchen. Die aus dieser Forschung gewonnenen Ergebnisse sollen dem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirt im Verlauf eines Infektionsprozesses dienen. Unter anderem dienen diese Erkenntnisse der Entwicklung und Herstellung neuer effektiver Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten. 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, responsible for over 17 Million deaths per year worldwide. In spite of the availability of different antibiotics, infectious diseases remain to be a serious health problem. Beside antibiotic resistance, many other factors make it difficult to control the infections. Man tries to combat pathogens through new antibiotics, vaccines and better hygiene and sanitation. The microbes react to this by developing new metabolic pathways, new pathogenicity factors and other strategies, which are as sophisticated as those which Man has developed to destroy the microbes. Considering the mortality rates it seems that the microbes have an advantage in this conflict. Another problem is the increase in life expectancy and increased mobility due to globalization. Furthermore, due to changes in our life style, social life and the commercial interests of food producers, new infectious agents and epidemics, e.g. prions, HIV, foot and mouth disease, etc. are emerging. Another problem are autoimmune diseases, which are caused by certain pathogenic bacteria and which affect especially people who are genetically predisposed to these diseases. Therefore, infectious diseases and their sequelae remain a serious problem and a big burden for health systems worldwide. The research on infectious diseases and immunity is considered as a big challenge for this century.

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. Six research groups and two young investigator groups working on different aspects of pathogenicity and immune defence are contributing to this research area. 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*: S. Bergmann, K. Dinkla, P. Fagan, A. Haidan, S. Hammerschmidt, W. Jansen, E. Medina, G. Molinari, M. Rohde, S. Talay, R. Towers

Infektionen sind weltweit die Ursache für die meisten Todesfälle. Trotz Verfügbarkeit verschiedener Antibiotika bleiben die Infektionen durch Streptokokken und Pneumokokken ein ernstes Gesundheitsproblem. Rheumatisches Fieber, an dem Millionen von Kindern leiden, stellt eine wichtige Nachfolgeerkrankung der Streptokokkeninfektionen dar. Die genauen Mechanismen dieser Krankheit sind noch nicht bekannt. Eine Voraussetzung zur Bekämpfung der Infektion ist die Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen und Etablierung geeigneter Tiermodelle. Ziel dieses Projekts ist, die Infektionsmechanismen der Krankheitserreger durch Struktur:Funktions-Analyse von Pathogenitätsfaktoren und durch Untersuchungen der Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen zu studieren und ein Mausmodell zu etablieren. Es wird auch angestrebt, den Fadenwurm *C. elegans* als Streptokokkeninfektionsmodell einzusetzen.

Gruppe C und G Streptokokken als mögliche Auslöser des rheumatischen Fiebers

Das akute rheumatische Fieber (ARF) ist eine Folgeerkrankung der unbehandelten Gruppe A Streptokokken-Pharyngitis bei Kindern zwischen 5 und 15 Jahren. Mit Millionen von neuen Fällen pro Jahr stellt ARF auch heute noch ein großes Gesundheitsproblem dar. Die Pathogenese des ARF ist nicht geklärt, es ist aber anzunehmen, daß es sich hierbei um eine abnormale Immunantwort des Wirts handelt. Streptokokken der Gruppe C und G, die hauptsächlich bei Tierinfektionen vorkommen, wurden bisher nicht mit ARF in Verbindung gebracht. Wir haben gezeigt, daß Gruppe C und G Streptokokken auch ein Auslöser des rheumatischen Fiebers sein könnten. Bei den Aborigines in Australien, die kaum an Gruppe A Streptokokken-Pharyngitis erkranken, dagegen aber hohe Raten an Gruppe C und G Streptokokken aufweisen, zeigen weltweit die höchste Rate an ARF. Wir konnten zeigen, daß die Antikörper gegen C und G Streptokokken in der Lage waren, mit menschlichem Herzmyosin zu reagieren. Die Antikörper gegen Gruppe A Streptokokken-Hautisolate waren dagegen negativ. Die Ergebnisse liefern einen möglichen Beweis dafür, daß manche ungeklärten Fälle von ARF durch C und G

Streptokokken verursacht werden. Falls die weiteren Untersuchungen in endemischen Gebieten dies bestätigen, ist als Konsequenz auch auf Gruppe C und G Streptokokken im Rachenraum zu untersuchen.

Genetische Suszeptibilität der Gruppe A Streptokokken-Infektion

Gruppe A Streptokokken verursachen ein breites Spektrum an Krankheiten. Wegen genetischer Heterogenität der menschlichen Bevölkerung ist es notwendig, Tiermodelle zu etablieren, um die Suszeptibilitätsmechanismen genauer zu untersuchen. Wir haben gezeigt, daß unterschiedliche Mausstämmen auch unterschiedliche Suszeptibilität gegenüber Gruppe A Infektionen zeigen. Den resistenten Mausstämmen gelang es, die Streptokokken schnell zu beseitigen, wohingegen die anfälligen Mäuse nicht in der Lage waren, das Wachstum der Bakterien zu bekämpfen und die Infektion zu überleben. Die resistenten Mäuse, die B- und T-Zellmangel aufwiesen, waren genauso resistent wie immunkompetente Mäuse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es sich bei der Suszeptibilität hauptsächlich um angeborene Immunität handelt. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß die männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen viel empfindlicher waren. Die Ergebnisse zeigten erstmals den Einfluß des genetischen

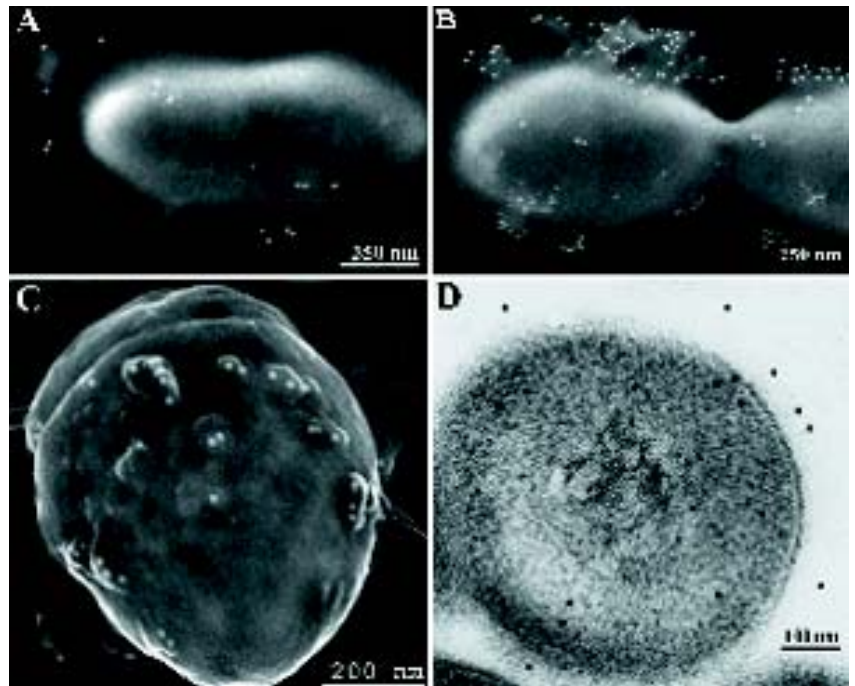
Hintergrunds auf Suszeptibilität gegenüber *S. pyogenes*-Infektion in der Maus.

Molekulare Mechanismen der Streptokokkeninvasion in eukaryontischen Zellen

Pathogene Streptokokken adhären an humane Epithelzellen und dringen in sie ein. Mit Hilfe eines eleganten heterologen Expressionssystems gelang es, den molekularen Mechanismus des bislang wichtigsten Adhäsins und Invasins, dem SfbI Protein, zu analysieren. Eines der Schlüsselemente dieses Proteins, der sogenannte „Spacer“, wurde durch Ligandeninteraktion als kooperativ aktivierbar identifiziert und ist für die Invasion essentiell. Immunologisch gesehen, spielt diese Eigenschaft eine wichtige Rolle: die geschlossene Konformation verhindert sowohl die Generierung spezifischer Antikörper, als auch die Erkennung durch künstlich erzeugte spezifische Antikörper. Neben dem Spacer wurde eine weitere Domäne des SfbI Proteins identifiziert, die als „Enhancer“ die Spacer-vermittelte Invasion unterstützt. Diese Domäne wirkt als direkter Effektor auf die Organisation des Wirtszytoskelettes und bewirkt lokalisierte Veränderungen der Wirtszellmembran (Lamelliopodia Formation). Dies zeigt, dass die Wirtszelle selbst den bakteriellen Aufnahmeprozess aktiv unterstützt.

Ein neuartiges Immunglobulinbindungsprotein von Gruppe A Streptokokken und dessen mögliche Bedeutung bei rheumatischem Fieber

Immunglobulin bindende Proteine kommen bei Streptokokken häufig vor und sind mit invasiven Krankheiten assoziiert. Ein neuartiges sekretiertes Immunglobulinbindungsprotein, genannt SibA, wurde von uns identifiziert und charakterisiert. SibA ist in der Lage, alle IgG Subklassen, Fc- und Fab-Fragmente als auch IgA und IgM zu binden. Diese Eigenschaften machen SibA einzigartig unter den Immunglobulinbindungsproteinen. SibA besitzt Regionen, die Ähnlichkeit zu Myosin schweren Ketten aufweisen. Da diese Regionen möglicherweise an der Entstehung des rheumatischen Fiebers beteiligt sind, ist zu erwarten, dass SibA eine Rolle bei dieser autoimmunen Nachfolgerkrankung spielt.



Eno, ein Plasminogenbindungsprotein von *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae verursacht ernsthafte invasive Infektionen wie Sepsis oder Meningitis. Eine Wechselwirkung zwischen Pneumokokken-Proteinen und Wirtspoteinen führt zu einer Transmigration der Bakterien durch Epithelzellbarrieren. Kürzlich wurde berichtet, dass die Bindung von Plasminogen an Pneumokokken an dieser Transmigration maßgeblich beteiligt ist. Wir haben einen bakteriellen Faktor, genannt Eno, identifiziert, der in der Lage ist, Plasminogen zu binden. Eno-Protein ist ein Enzym (α -Enolase), das für den Metabolismus von Bakterien notwendig ist. Dieses Protein wird von Bakterien sekretiert, ist aber in der Lage, gleichzeitig Bakterien und Plasminogen zu binden. Die Bindung von Plasminogen an Eno und die nachfolgende Aktivierung stellt einen Virulenzmechanismus dar, der eine Rolle bei invasiven Infektionen spielen könnte. Dies ist ein erstes Beispiel bei Pneumokokken, dass ein „housekeeping protein“ als Virulenzfaktor identifiziert wurde. Immunelektronenmikroskopische Analyse zeigte, dass Eno-Protein im Zytoplasma und an Bakterienoberflächen bei bekapselten und unbekapselten Pneumokokken ubiquitär vorkommt.

Immunelektronenmikroskopische Lokalisierung des Eno-Proteins in Pneumokokken mit Hilfe spezifischer polyklonaler Antikörper und kolloidalen Goldpartikeln A-C: Lokalisierung des Eno-Proteins auf der Zelloberfläche mit Hilfe der Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (weiße Partikel). In B wurden die Pneumokokken mit isoliertem Eno-Protein vorinkubiert und man erkennt die Bindung an die Pneumokokken Zelloberfläche, da im Vergleich zu vorher nicht mit Eno inkubierten Pneumokokken (A und C) wesentlich mehr Eno-Protein nachweisbar ist. D: Lokalisierung des Eno-Proteins am Ultradünnschnitt; Eno-Protein ist sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma nachweisbar.

Electron microscopic localization of Eno protein in pneumococci with specific polyclonal antibodies and colloidal gold particles A-C: Localization of eno proteins on the cell surface by field emission electron microscopy (white particles). In panel B, the pneumococci were pre-incubated with isolated eno protein where a much higher binding was observed compared to the pneumococci which were not incubated with eno protein (panel A and C). In panel D, ultra thin sections show the localization of eno protein in both cell surface and in cytoplasm.

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 a serious health problem. Millions of children worldwide are suffering from rheumatic fever and rheumatic heart disease, the sequelae of streptococcal infections. The exact mechanism for induction of rheumatic fever is not yet known. A prerequisite for control of streptococcal infections is the elucidation of pathogenicity mechanisms and the development of suitable animal models. 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 and to develop a mouse model. The nematode *C. elegans* will also be included as an additional model for streptococcal infections.*

The association of Group C and Group G streptococcal carriage with rheumatic fever

Acute rheumatic fever (ARF) is a sequelae of an untreated group A pharyngitis. It mostly affects children between 5 and 15 years of age and with millions of new cases registered every year it represents a big health problem. Although the pathogenesis of ARF is not yet fully known, there are evidences that an abnormal immune response of the host plays a major role. Group C and group G streptococci most of which are animal pathogens have not been associated with ARF. We have now shown for the first time a correlation between the carriage of group C and group G streptococci and ARF. The Australian Aboriginal population has the highest rate of ARF although the group A streptococcal pharyngitis is uncommon. The throat carriage of group C and group G streptococci among Aboriginal population, however, is widespread. We showed that antibodies against group C and group G streptococcal isolated from an Aboriginal community cross-react with human cardiac myosin. Antibodies against group A streptococcal skin isolates from the same population were negative. These results provide for the first time an explanation for the cases of ARF with no history of group A pharyngitis. If further studies in other endemic areas confirm the role of group C and group G streptococci in the induction of ARF, it could have a consequence that throat swabs from pharyngitis patients should also be tested for group C and group G streptococci and appropriate steps be taken for their eradication.

Influence of genetic background on susceptibility to streptococcal infections

*Clinical manifestation of infection caused by group A streptococci can take the form of a self-limiting pharyngitis or superficial impetigo to more serious invasive diseases. It has been suggested that factors associated with intrinsic properties of the host are critical for the severity of streptococcal infections. The main focus of our studies is to investigate the influence of host genetic factors on severity of infection caused by *S. pyogenes*. To achieve this we undertook the development of a suitable mouse model of streptococcal infection using genetically well-defined inbred strains. With this infection model, we have shown that different strains of mice exhibited different capacities to control infection with *S. pyogenes*. Resistant mouse strains were able to clear and survive the infection. In contrast, susceptible mice were totally unable to control bacterial growth resulting in progressive bacterial multiplication and death. In order to determine mechanisms involved in bacterial clearance in the resistant mouse strains, we have performed a set of experiments using B and T cells-deficient mice from the resistant background and found that immune-deficient mice were as resistant to infection as immune-competent mice. These results suggest that the effector mechanisms against *S. pyogenes* present on the resistant mouse strains are independent of adaptive immunity. Resistance was also influenced by sex with males being much more susceptible than females. These results demonstrate for the first time the influence of genetic background on susceptibility to infection with *S. pyogenes* in mice.*

Molecular mechanisms of streptococcal invasion in eukaryotic cells.

Group A streptococci adhere and invade epithelial cells. A fibronectin binding surface protein, SfbI protein, has been identified as an important adhesin and invasin of group A streptococci. We analysed the molecular mechanisms of SfbI protein by using an elegant heterologous expression system. A key element of SfbI protein, the so called "spacer" that is activated by a cooperative binding mechanism plays an essential role in the invasion process. This feature has an important immunologic role since the hidden conformation prevents not only the generation of specific antibodies but also the recognition by antibodies generated in rabbits. Besides "spacer" another SfbI domain was identified that supports the spacer-mediated invasion. This domain has direct effect on the organisation of host cytoskeleton leading to localized changes in host cell membrane. These results underline the role of host cells in uptake of pathogenic bacteria.

A novel immunoglobulin binding protein from group A streptococci and its possible involvement in rheumatic fever

Immunoglobulin binding proteins are well characterized pathogenicity factors which have been associated with streptococcal invasive disease. We have now identified and characterized a novel secreted immunoglobulin binding protein, designated, SibA. This streptococcal protein binds all IgG subclasses, the Fc and Fab fragments but also IgA and IgM making it unique among other immunoglobulin binding proteins. SibA has regions of local similarity with other coiled proteins such as human myosin heavy chain which are of potential significance in the development of the autoimmune sequelae of streptococcal disease.

Eno, a plasminogen binding protein from *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae belongs to the normal flora of the human respiratory tract but is also able to cause serious invasive infections such as sepsis and meningitis. The interaction of pneumococcal proteins with human host proteins leads to transmigration through the epithelial cell barrier. Recent studies indicate that binding of human plasminogen to the surface of pneumococci and its subsequent activation to plasmin

promote the penetration through reconstituted basement membranes. We have identified a pneumococcal factor, designated Eno protein, which is capable of binding plasminogen. Eno protein is an enzyme (α -enolase) required for viability and metabolism. Eno is secreted by the bacteria but is capable of reassociation to the bacterial surface. The binding of Eno to plasminogen and its subsequent activation to plasmin represents a virulence mechanism that might play a role in invasive infections. This is a first example of a pneumococcal house keeping protein that also acts as a virulence factor. Immunoelectron microscopy indicated the presence of Eno protein in the cytoplasm as well as on the bacterial surface of both encapsulated and unencapsulated pneumococci. Eno protein is ubiquitously distributed among pneumococcal serotypes.

Publications | Veröffentlichungen

Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS (2000)

Pharyngeal carriage of group C and G streptococci might be associated with acute rheumatic fever in the Aboriginal population of the Northern Territory of Australia. *The Lancet* 356:1167-1169.

Talay SR, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, Guzmán CA, Chhatwal GS (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2:521-535.

Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2001) α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40:1273-1287.

Fagan PK, Reinscheid D, Gottschalk B, Chhatwal GS (2001) Identification and characterization of a novel secreted immunoglobulin binding protein from group A streptococcus. *Infect Immun* 69:4851-4857.

Medina E, Goldmann O, Rohde M, Lengeling A, Chhatwal GS (2001) Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis* 184:846-852.

Pathogen/Wirtszell-Interaktionen

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: B. Behrendt, S. Benesch, M. Geese, D. Monner, S. Pust, K. Rottner, A. Sechi, T. Stradal

Die Abteilung Zellbiologie befasst sich schwerpunktmäßig mit Pathogen/Wirtszell-Interaktionen und bearbeitet primär folgende Teilgebiete: die Invasionsmechanismen bakterieller Erreger, die von ihnen ausgelösten bzw. modifizierten Signalprozesse innerhalb der Wirtszelle, und das Aktinzytoskelett als eine zentrale Zielstruktur von Pathogenen. Bisher haben wir uns auf *Listeria monocytogenes* konzentriert, ein ubiquitär verbreitetes, Gram-positives Bakterium, das aufgrund seines intrazellulären Wachstums bei Mensch und Tier ernsthafte Infektionen hervorrufen kann (s. auch QF2). Mit der Aufklärung der bakteriellen Pathogenitätsmechanismen beabsichtigen wir längerfristig, spezifisch in den Infektionsverlauf eingreifen zu können. Andererseits ermöglichen die Befunde detaillierte Einblicke in die Physiologie der Wirtszelle.

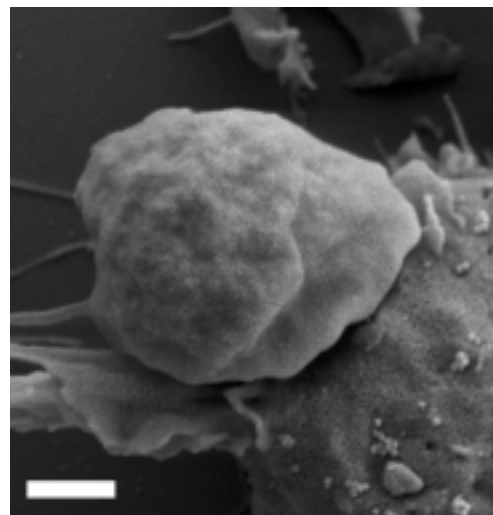
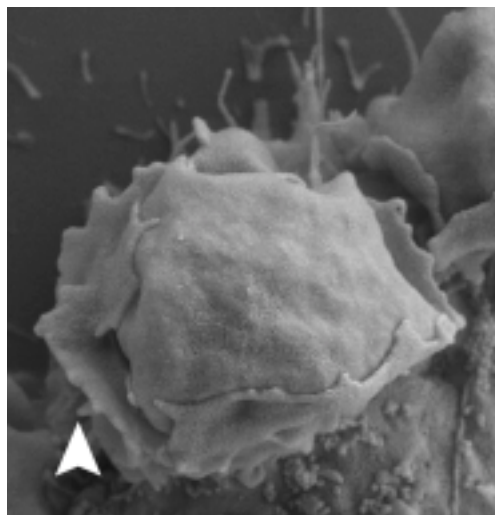
Reorganisation des Aktinzytoskeletts durch *Listeria monocytogenes*

Pathogene Listerien dringen in das Cytoplasma der Wirtszelle ein und rekrutieren dort Aktinfilamente in Form eines Schweifes an einem Bakterienpol, was den Erregern eine beachtliche Motilität verleiht. Das auf der Bakterienoberfläche exponierte listerielle ActA Protein ist hierfür allein verantwortlich, und diese Aktivität konnte auf zwei essentielle Domänen im ActA eingegrenzt werden: ein vierfaches E/DFPPPPXDEE Motiv (ActA-„Repeats“) und eine N-terminal gelegene positiv geladene Region. Die ActA-„Repeats“ binden mit hoher Affinität Proteine der Ena/VASP Familie, die für die effiziente Listerienbewegung innerhalb der infizierten Wirtszelle ausschlaggebend sind. VASP ist in Zellen auch an der Vorderfront sich ausbreitender

Lamellipodien lokalisierbar, Ena/VASP Proteine sind darüber hinaus Liganden von Profilin, einem Aktinmonomerbindenden Protein, das die Polymerisation von Aktin, d.h. die Bildung von Aktinfilamenten, stimulieren kann, und dessen Rekrutierung an die Listerienoberfläche direkt mit der intrazellulären Bewegung der Bakterien korrelierbar ist (Geese et al. 2000). Der Arp2/3 Komplex, der an die positiv geladene Region im ActA bindet, ist der zweite bisher identifizierte ActA-Ligand. Dieser Proteinkomplex (7 Untereinheiten), der in Lamellipodien kultivierter Zellen und im von Listerien induzierten Aktinschweif lokalisierbar ist, ist für die aktinvermittelte Bewegung von Listerien essentiell. Der Arp2/3 Komplex initiiert die Nukleation von Aktinfilamenten, ein Prozess, der durch die Bindung an ActA gefördert wird

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen frühe Phasen der Phagozytose von opsonierten Erythrozyten durch Makrophagen. (a) nicht transfizierter Makrophage, in (b) wurden die Zellen mit einem Konstrukt transfiziert, das für die prolinreichen ActA-„Repeats“ kodiert und die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen „neutralisiert“. Wurde die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen unterbunden (b), konnten die Makrophagen zwar noch opsonierte Erythrozyten binden, aber keine lamellipodialen Ausläufer (Pfeilspitzen in a) mehr bilden, womit die Phagozytose blockiert war.

Scanning electron microscopy analysis of early stages of phagocytosis of opsonized erythrocytes by macrophages. (a) untransfected macrophages, in (b) cells were previously transfected with a construct coding for the proline-rich ActA repeats that "neutralize" targeting of Ena/VASP proteins. Upon interfering with recruitment, e.g. the targeting of Ena/VASP proteins in (b), macrophages were still able to bind to opsonized erythrocytes but did not form lamellipodia-like extensions (arrow heads in a). As a result the phagocytic process is blocked.



(Pistor et al., 2000). Diese Ergebnisse belegen, dass die Ena/VASP Proteine und der Arp 2/3 Komplex Schlüsselfunktionen in aktinvermittelten Prozessen einnehmen.

Mit einem breitangelegten Screen nach Wirtszellproteinen, die ActA-Funktionen simulieren, identifizierten wir das Fyb/SLAP Protein, das nur in hämatopoetischen Zellen vorkommt. Fyb/SLAP ist ein neuer Ena/VASP Ligand und akkumuliert mit T-Zell-Rezeptoren an der Kontaktstelle zwischen T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen. Weiterhin zeigten wir, dass Ena/VASP Proteine und der Arp 2/3 Komplex in Form eines Proteinkomplexes, der auch SLP-76, Nck und das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) enthält, an diese Kontaktstelle rekrutiert werden, wodurch die Vorgänge initiiert werden, die essentiell für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts während der T-Zellaktivierung sind (Krause et al., 2000). Wir vermuten daher, dass Fyb/SLAP und die Ena/VASP Proteine auch in den aktinvermittelten Prozess der Phagozytose in Makrophagen involviert

sind, da die räumlich und zeitlich limitierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts für die Partikelaufnahme verantwortlich ist. Unsere Versuche ergaben, dass Ena/VASP Proteine nicht nur in primären und immortalisierten Makrophagen an entstehenden Phagosomen rekrutiert werden, sondern dass ihre experimentell induzierte "Neutralisation" auch den Phagozytoseprozess blockiert (s. Abb. 1). Die Induktion der Phagozytose führt zur Bildung eines größeren Proteinkomplexes, der neben Ena/VASP Proteinen und Fyb/SLAP auch SLP-76, Nck und WASP enthält. Unsere Befunde deuten darauf hin, dass die Aktivierung des Fcγ-Rezeptors während der Phagozytose zwei Signalwege involviert: einen, der über Fyb/SLAP zur Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen und Profilin führt, während der andere über Nck die Rekrutierung von WASP fördert, wodurch wiederum der Arp 2/3 Komplex aktiviert wird. Beide Signalwege kontrollieren die für den Phagozytoseprozess essentielle Dynamik von Aktinfilamenten.

Crosstalk Between Bacterial Pathogens and Host Cells

The Department of Cell Biology is focussing on the interactions between bacterial pathogens and host cells, primarily concentrating on the following aspects: invasion mechanisms, signalling processes within host cells that are triggered and /or modified by pathogens, and the actin cytoskeleton as a central target of pathogens. Until now we have mainly been working with Listeria monocytogenes, a ubiquitous Gram-positive bacterium, that due to its intracellular lifestyle can cause serious infections in both man and animal (see also QF2). By deciphering bacterial pathogenicity mechanisms we intend not only to specifically interfere with the infection processes, but also to gain detailed insights into the host cells' physiology.

Subversion of the actin cytoskeleton by Listeria monocytogenes: lessons from the bacterial world.

L. monocytogenes invades mammalian cells and enters their cytosol where it propels itself by developing a comet-like actin-rich tail. Generation of the actin tail by Listeria is exclusively due to the expression of the ActA protein on their surface. Two major domains of ActA are essential for its function: a four-fold E/DFPPPPXDEE motif (ActA repeats) and an amino-terminal stretch of positively-charged amino acids. The ActA repeats bind with high affinity to proteins of the Ena/VASP family, which are necessary for efficient

Listeria motility in infected cells. VASP also localizes at the front of spreading lamellipodia. Moreover, Ena/VASP proteins are ligands for profilin, an actin monomer binding protein that can stimulate the polymerisation of actin and whose recruitment to the Listeria surface directly correlates with the motility state of this bacterium (Geese et al., 2000). Another cellular ligand of ActA is the Arp2/3 complex that binds to the positively charged cluster. This seven-protein complex localizes to lamellipodia of cultured cells and to the actin comet tails of Listeria monocytogenes and is essential for the actin-based motility of this bacterium. The Arp2/3

complex promotes the nucleation of actin filaments that is enhanced upon interaction with ActA (Pistor et al., 2000). These findings clearly indicate that Ena/VASP proteins and the Arp 2/3 complex are key players in the actin-based processes.

By screening for host cell proteins mimicking the functions of ActA, we identified the Fyb/SLAP protein that is restricted to hematopoietic cells. We could demonstrate that Fyb/SLAP is a new ligand for Ena/VASP proteins and that it localizes to the sites of T-cell receptor (TCR) clustering when T cells interact with antigen-presenting cells (APC). Based on these studies we proposed a model in which Ena/VASP proteins and the Arp 2/3 complex are linked to the T cell-APC interface via a molecular complex formed by SLP76, Nck and the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). The formation of this molecular complex was proposed to be essential for the targeting of Ena/VASP proteins and the Arp2/3 complex and thus for the initiation of early events that are essential for the remodelling of the actin cytoskeleton in T-cell activation (Krause et al., 2000).

Therefore, we anticipated that Fyb/SLAP and Ena/VASP proteins might also participate in the actin assembly process triggered by Fc γ -receptor cross-linking during phagocytosis in macrophages. Phagocytosis involves the spatial and temporal reorganisation of the actin-based cytoskeleton at sites of the particle ingestion. The local polymerisation of actin filaments supports the protrusion of pseudopodia that eventually engulf the particle. We found that Ena/VASP proteins are recruited to phagosomes forming around opsonised particles in both primary and immortalised macrophages. Not only did the localisation of Ena/VASP proteins coincide, spatially and temporally, with the phagocytosis-induced reorganisation of actin filaments, but their recruitment to the phagocytic cup was required for the remodelling of the actin cytoskeleton, extension of pseudopodia and efficient particle internalisation (Fig. 1). Upon induction of phagocytosis, a large molecular complex consisting in part of Ena/VASP proteins, Fyb/SLAP, Nck, and WASP is formed. Our findings suggest that activation of Fc γ -receptors triggers two signalling events during phagocytosis: one through Fyb/SLAP that leads to recruitment of VASP and profilin, and another one through Nck that promotes the

recruitment of WASP and the Arp2/3 complex. These converge to regulate actin polymerisation, controlling the assembly of actin structures that are essential for the process of phagocytosis.

Publications | Veröffentlichungen

Geese M, Schlüter K, Rothkegel M, Jockusch BM, Wehland J, Sechi AS (2000) Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci*, 113:1415-1426.

Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J (2000) 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*, 149:181-194.

Pistor S, Grobe L, Sechi AS, Domann E, Gerstel B, Machesky LM, Chakraborty T, Wehland J (2000) Mutations of arginine residues within the 146-KKRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the recruitment of the Arp2/3 complex. *J Cell Sci* 113:3277-3287.

Pathogenitätsfaktoren aus Mykoplasmen

Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. P. F. Mühradt | Arb. Gr. Immunbiologie | *Res. Group Immun Biology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: U. Deiters, K. Grote

Mykoplasmen sind kleine, mit einem minimalen Genom ausgestattete Bakterien, die keine Zellwand besitzen und parasitär Epithelzellen besiedeln. Sie sind nicht nur ein bekannter Störfaktor bei der Haltung von Zellkulturen, sondern oft übersehene Erreger verschiedener Krankheiten, wie z. B. Entzündungen des Urogenitalsystems, der Lunge sowie der Gelenke. Diese Entzündungen sind primär auf Aktivierung von Makrophagen zurückzuführen, wobei die Identität des aktivierenden Stoffes bisher unbekannt war. Die Struktur des Makrophagen aktivierenden Mykoplasma Wirkstoffs, des "Endotoxins" der Mykoplasmen, wurde von uns aufgeklärt. Das Wirkprinzip sind Lipoproteine und Lipopeptide, die am N-Terminus mit zwei Fettsäuren modifiziert sind (Mühradt et al., 1997, J. Exp. Med. 185:1951). Eines dieser Lipopeptide, das MALP-2, wurde synthetisch hergestellt und diente der Identifizierung der Rezeptoren und des Signalweges (Takeuchi et al., 2000). Die Arbeitsgruppe Immunbiologie beschäftigt sich mit der von Mykoplasmen ausgelösten Makrophagenaktivierung und ihrer Bedeutung für Mykoplasmen-induzierte Entzündungen und Krankheiten sowie mit der Anwendung von MALP-2 in der Wundheilung, bei der Prophylaxe von Peritonitis, als Adjuvans, zur Prävention von Endotoxinschock und als Tumorthapeutikum.

Die Entstehung von trunkierten Lipoproteinen bei *Mykoplasma fermentans*

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Kim Wise konnte gezeigt werden, dass das Makrophagen-aktivierende Lipopeptid MALP-2 aus *M. fermentans* ebenso wie das 41 kDa Lipoprotein MALP-404 Produkte eines Gens malp sind (Calcutt et al., 1999, Infect. Immun. 67:760).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe S. Akira wurde nachgewiesen, daß für die Signaltransduktion von MALP-2 das Zusammenwirken der zwei Toll-Rezeptoren TLR-2 und TLR-6 notwendig ist. (Takeuchi et al., 2001, Int Immunol 13:933)

In vitro und *in vivo* Aktivitäten von MALP-2

Das aktive Stereoisomer von MALP-2 wurde an der GBF synthetisiert und gereinigt. MALP-2 zeigte in verschiedenen experimentellen Modellen starke *in vivo* Aktivität: sowohl nach intraperitonealer und intracutaner als auch nach intranasaler Applikation zeigten sich, ähnlich wie bei natürlichen Mykoplasma-Infektionen, Ansammlungen von Leukozyten. Dies ist auf die Freisetzung verschiedener leukotaktisch wirkender Chemokine zurückzuführen (Deiters & Mühradt, 1999, Infect. Immun. 67: 3390).

MALP-2 Wirkung auf Knochenmetabolismus

In der klinischen Forschergruppe von R. Felix wurde vor dem Hintergrund der arthritogenen Eigenschaften der Mykoplasmen getestet, ob MALP-2 die Knochenresorption beeinflusst. In einem *in vitro* System, das die Freisetzung von Kalzium aus Kalvarienhälften bestimmt, wurde gezeigt, dass MALP-2 in geringen Konzentrationen die Kalziumfreisetzung stimuliert. Dies ist wahrscheinlich auf eine Stimulation von Osteoklasten zurückzuführen. (Piec et al., 1999, Infec Immun 67:6281)

MALP-2 induziert Kreuztoleranz gegenüber TNF und Endotoxin

Nach entscheidenden Vorarbeiten von U. Deiters wurde in Zusammenarbeit mit Akira *in vitro* Kreuztoleranz gegenüber Endotoxin gezeigt (Sato et al., 2000). Mit Galanos et al. (2001) wurde bewiesen, dass MALP-2 Mäuse vor TNF und z. T. auch vor Endotoxinschock schützen kann.

MALP-2 in der Wundheilung

Der Prozeß der Wundheilung lässt sich in fünf Stadien unterteilen:
1. Blutgerinnung, 2. Infiltration von Granulozyten und Makrophagen,

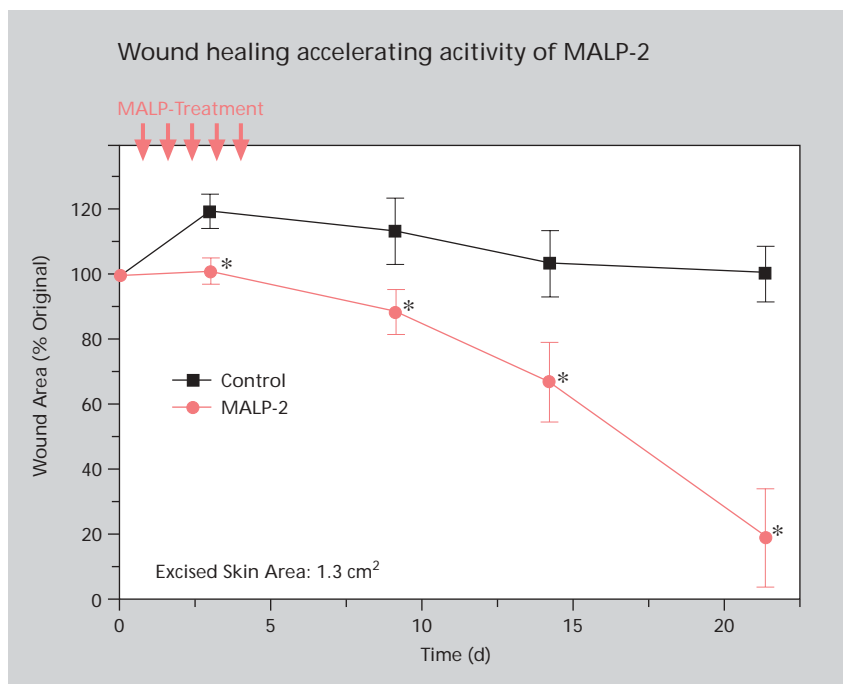
3. Angiogenese, 4. Wundkontraktion und Epithelialisierung, 5. Umwandlung des Narbengewebes.

In vielen Fällen (wie z. B. bei Diabetikern) ist die normale Wundheilung gestört, so dass eine beschleunigte Wundbehandlung von großer medizinischer und auch finanzieller Bedeutung ist. Nach unserer Hypothese kann das zweite und dritte Stadium des Wundheilungsprozesses mit dem Makrophagenstimulierenden Lipopeptid MALP-2 beeinflusst und die Wundheilung beschleunigt werden, da MALP-2 Makrophagen und Hautfibroblasten aktiviert und diese zur Freisetzung von Mediatoren, u. a. von Chemokinen, stimuliert (s. o.). Die Chemokine induzieren dann das Einwandern weiterer Makrophagen sowie Granulozyten, die beide im Fall einer Wunde für deren schnelle und effiziente Reinigung sorgen. Makrophagen sind darüber hinaus vor allem eine wichtige Quelle von Wundheilungsfaktoren und somit für den Prozess der Wundheilung von essentieller Bedeutung. Tatsächlich

konnte sowohl histologisch als auch durch die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts nachgewiesen werden, dass MALP-2 nach intracutaner Injektion in Mäuse eine Infiltration von Zellen am Injektionsort induziert. Bei diesen Zellen handelte es sich drei bzw. sechs Tage nach Applikation in erster Linie um Makrophagen. Eine entsprechende Einwanderung von Zellen wurde auch in zirkulären, MALP-behandelten Wunden (0,8 cm im Durchmesser) diabetischer Mäuse mittels Bestimmung des Nukleinsäure- und des Hydroxyprolinegehalts (letzteres als Maß für die Kollagenbildung durch Fibroblasten) ermittelt. Dass MALP-2 darüber hinaus tatsächlich die Fähigkeit besitzt, die Wundheilung diabetischer und Wundheilungs-gestörter Mäuse zu beschleunigen, ist in Abb. 1 dargestellt.

Abb. 1. Kreisrunde Wunden wurden auf dem Rücken von C57BLKS/J-m+/+Lepr^{db} Mäusen erzeugt. Diese wurden mit einem durchsichtigen Pflaster bedeckt, durch das an fünf aufeinanderfolgenden Tagen MALP-2 (5 µg pro Behandlung) bzw. Methylzellulose (Kontrollen) appliziert wurde. Die Daten sind Mittelwerte ± SD aus Gruppen von jeweils 9-10 Tieren.

Fig. 1. Full excision wounds were applied to the dorsal skin of C57BLKS/J-m+/+Lepr^{db} mice. Wounds were covered with transparent dressing and 5 µg doses of MALP-2 or control vehicles (methyl cellulose) were administered at the times indicate by the arrows. Data are means of determination from groups of 9-10 mice.



Kooperationen

M. Kieß, M. Morr, W. Tegge, GBF; R. Felix, Forschungsgruppe Knochenbiologie, Dept. Klinische Forschung der Universität Bern; M. Calcutt, K. Wise, University of Missouri-Columbia, USA, T. Tschernig, Anatomie der Med. Hochschule Hannover; B. Holzmann, Klinikum rechts der Isar, München; C. Galanos und M. Freudenberg, MPI für Immunbiologie in Freiburg; S. Akira, Osaka University, Japan.

Pathogenicity Factors from Mycoplasmas

Mycoplasmas are small wall-less bacteria which reside on epithelial cells of the respiratory or urogenital tract possessing a minimal genome. They are not only a nuisance in cell culture work but often overlooked pathogens causing inflammatory reactions of the urogenital tract, the lung or in the joints. These inflammations are primarily caused by activation of macrophages, the identity of the macrophage activating agent being unknown until recently. The structure of the mycoplasma-derived macrophage activator, the "endotoxin" of mycoplasmas was elucidated at the GBF. The active agent are lipoproteins and -peptides which are N-terminally substituted by two ester-linked fatty acids (Mühlradt et al., 1997, *J. Exp. Med.* 185:1951). One of these lipopeptides, MALP-2, has now been synthesized and served to identify its receptors and signal pathways (Takeuchi et al., 2000). The Research Group Immunobiology studies the mycoplasma-mediated macrophage activation and its role in mycoplasma-related inflammations and diseases, as well as possibilities to use MALP-2 in wound healing, prophylaxis of peritonitis, as adjuvans, and for preventing endotoxin shock and as an anti tumor agent.

Truncation of lipoproteins in *Mycoplasma fermentans*

It was shown in collaboration with the group of Kim Wise that the macrophage activating lipopeptide MALP-2 from *M. fermentans* as well as the 41 kDa lipoprotein MALP-404 are products of one and the same gene *malp* (Calcutt et al. 1999, *Infect. Immun.* 67:760).

In collaboration with S. Akira it was shown that cooperation of the two toll-like receptors 2 and 6 are required for signaling.

In vitro and in vivo activities of MALP-2

The active stereoisomer of MALP-2 was synthesized and purified at the GBF. MALP-2 shows high in vivo activity in various experimental systems: leukocyte infiltrations, similar to those observed in natural mycoplasma infections, were seen after intraperitoneal, intracutaneous and intranasal administration of MALP-2. This was due to liberation of leukotactically active chemokines (Deiters & Mühlradt, 1999, *Infect. Immun.* 67:3390).

MALP-2 effects on bone metabolism

In the context of the known arthritogenic properties of mycoplasmas *R. Felix* and his R&D group tested whether MALP-2 has an influence on bone resorption. It was shown in an in vitro system, where liberation of calcium from calvaria is determined, that MALP-2 stimulates calcium release at very low concentrations. This is likely due to stimulation of osteoclasts.

MALP-2 induces cross-tolerance to TNF and endotoxin

Following pilot experiments by U. Deiters it was shown in collaboration with Akira that MALP-2 induces in vitro cross tolerance to endotoxin (Sato et al., 2000). These data were extended with C. Galanos et al. (2001) to in vivo experiments which indicated that MALP-2 protects mice from lethal doses of TNF or endotoxin.

MALP-2 in wound healing

Wound healing proceeds in 5 stages: 1. blood coagulation, 2. infiltration of leukocytes, 3. angiogenesis, 4. wound contraction and epithelialization, 5. restructuring of the scarring tissue. In many cases wound healing is impaired, as e. g. in diabetic patients. It is thus of great medical and economic importance to find means of accelerating wound healing. According to our hypothesis the second and third stage of wound healing may be favorably influenced by the lipopeptide MALP-2, because it activates macrophages and fibroblasts of the skin to liberate chemokines and other mediators. These chemokines lead to increased influx of macrophages and neutrophils. The leukocytes provide rapid and effective cleaning of the wound. Moreover, macrophages are an important source of growth factors essential for the process of wound healing. It could be shown in experiments with mice by histology and determination of nucleic acid content that MALP-2 induces after 3 to 6 days an infiltration of cells at the site of injection. These cells were identified as macrophages. A corresponding cellular influx was also observed when MALP-2 was applied to

circular wounds in diabetic mice. In this model there was also a significant increase of hydroxyproline in the MALP-treated wounds, indicating an increase in collagen synthesis by wound fibroblasts. That MALP-2 actually causes an acceleration of wound closure in healing-impaired diabetic mice is shown in Fig. 1.

Publications | Veröffentlichungen

Sato S, Nomura F, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, Akira S (2000) Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated signaling pathways. J Immunol 165:7096-7101.

*Takeuchi A, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S (2000) Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide MALP-2 activates immune cells through a TLR2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol 164:554-557. **Erratum** in Nov. Issue: It should read S-stereoisomer as the active isomer!*

Galanos C, Gumenscheimer M, Mühlradt PF, Jirillo E, Freudenberg M (2001) MALP-2, a mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? J Endotoxin Res. 6:471-476.

Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of microbial lipoproteins by Toll-like receptor (TLR) 6. Int Immunol 13:933-940.

Impfstoffforschung (SP 2.2)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: S. Borsutzky, T. Ebensen, C. Link, F. Rharbaoui, K. Schulze, U. Winckler; in
Zusammenarbeit mit P. Paglia, Instituto Nazionale Tumori Milan, F. Ebel, MPI München

Die Vakzinierung stellt eine äußerst kosteneffektive Strategie als Prophylaxe gegen eine Vielzahl von Infektionskrankheiten dar. Dabei können Impfstoffe als wirkungsvolles Hilfsmittel bei der Prävention bzw. bei der Behandlung gegen verschiedene Krankheiten sinnvoll eingesetzt werden. Die Haupttätigkeit der Vakzin-Forschungsgruppe ist auf die Entwicklung und die Validierung von Technologieplattformen für Antigen-Liefersysteme und Vakzin-Prototypen fokussiert.

Identifikation der minimalen Domäne des Fibronectin-Bindungsprotein I (Sfb I) von *Streptococcus pyogenes* die benötigt wird, um eine schützende Immunantwort auszulösen

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe erlaubten die Feststellung, dass SfbI ein sehr lohnendes Zielantigen für die Impfstoffherstellung gegen *S. pyogenes* ist. Die Instabilität des nativen Proteins nahm bisher einen negativen Einfluss auf den weiterführenden Prozess der Vakzinherstellung. Verkürzte Formen des SfbI-Proteins weisen dagegen eine verstärkte Stabilität auf, folglich wurden Experimente durchgeführt, die den minimalsten Anteil des SfbI-Proteins identifizieren sollten, der in der Lage ist, eine schützende Immunität gegen *S. pyogenes* aufzubauen. Die erhaltenen Resultate zeigten, dass die intranasale Immunisierung mit einem 157 Aminosäuren großen SfbI-Fragment, welches die Wiederholungen der Fibronectin-Bindungsstelle umfasste, einen mit den Wildtyp-Bakterien vergleichbaren Schutz gewährte (80% Überleben versus 0% der Kontrollgruppe). Weitere Studien belegten darüber hinaus, dass die Vakzinierung mit diesem SfbI-Fragment zu einer effizienten Ausbildung einer „Memory“-Immunantwort führte. Die zusätzliche Nutzung verstärkender mukosaler Adjuvantien war bei Einsatz des SfbI-Fragments überflüssig, da dessen spezifische Wirkung als Adjuvans völlig ausreichte, um eine schützende Immunität zu gewähren.

Rolle von SepL während der Pathogenese von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC)

Das sepL Gen wird vom Lokus der Enterozyten-Auslöschung von EHEC kodiert. Daher ist dieses Gen sehr wahrscheinlich an den Prozessen der Anheftung und der Auslöschung beteiligt. Untersuchungen bezüglich der Lokalisierung des SepL-Proteins zeigten ein Auftreten im Zytoplasma und darüber hinaus eine Assoziation mit bakteriellen Membranen. SepL wird dabei in Antwort auf Stimuli, die charakteristisch für die intestinale Nische sind, monocistronisch transkribiert. Die Charakterisierung einer in-frame Deletion (Δ sepL Mutante von EHEC) zeigte, dass SepL essentiell für die bakterielle Anheftung an epitheliale Zellen und für die Rekrutierung und Reorganisation der zytoskeletalen Proteine in der Zielzelle ist. Die Δ sepL Mutante zeigte zudem eine gestörte Sekretion der Esp-Proteine. Allerdings wurde die Biosynthese dieser Proteine nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zeigen, dass SepL eine äußerst wichtige Rolle im biologischen Zyklus von EHEC spielt.

In vivo Korrektur genetischer Defekte von Makrophagen mit Hilfe attenuierter Salmonellen als orale Vektoren

Makrophagen sind normale Zielzellen für *Salmonella* während einer natürlichen Infektion. Unsere Arbeitsgruppe zeigte kürzlich, dass attenuierte Bakterien zur Anlieferung von Vakzinen (Nukleinsäurekonstrukte) an Makrophagen benutzt werden können. Daher untersuchte unsere Arbeitsgruppe die Möglichkeit, mit Hilfe

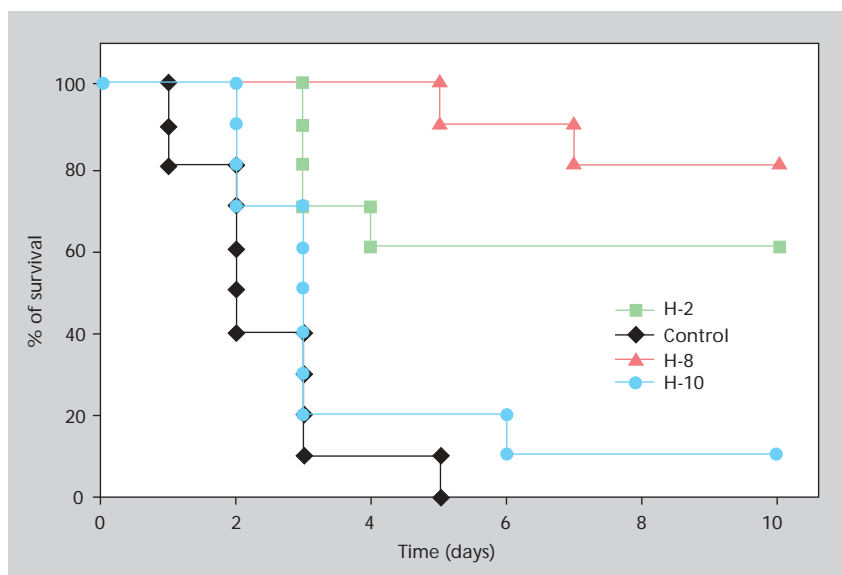
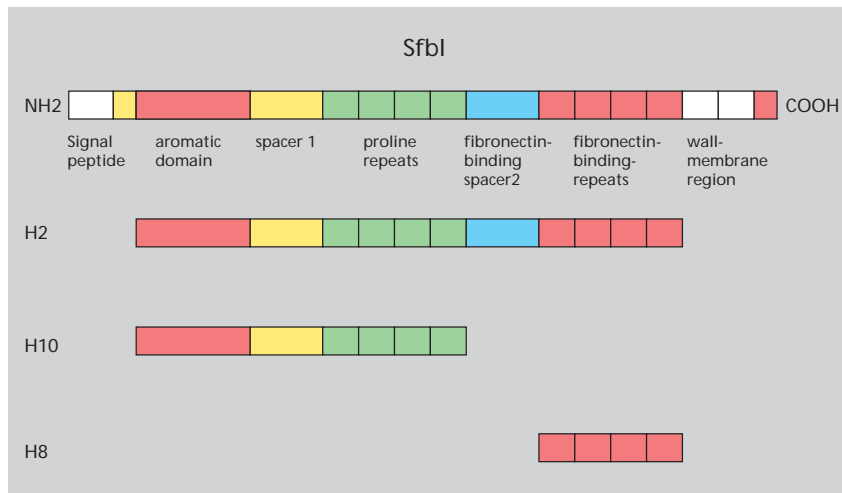


Abb. 1. Überleben von intranasal mit Sfb I-Derivaten immunisierten Mäusen nach Infektion mit einem heterologen *S. pyogenes* Stamm.

Fig. 1. Survival of mice intranasally immunized with SfbI derivatives after challenge with a heterologous *S. pyogenes* strain.

von attenuierten *Salmonella* als Überträger von Transgenen genetische Defekte zu korrigieren, die mit Makrophagen assoziiert sind. Als Nachweisverfahren wurden IFN γ -defiziente Mäuse (GKO) eingesetzt, die hoch empfänglich gegenüber bakteriellen Infektionen sind (d.h. sogar attenuierte Mutanten von *Salmonella* können für diese Mäuse letal sein). Attenuierte *Salmonella aroA* wurden dabei als Träger eines eukaryotischen Expressionsvektor benutzt, der das murine IFN γ -Gen trug. Die Produktion dieses Zytokins in GKO Mäusen wurde nach Infektion mit *Salmonella in vitro* oder *in vivo* wiederhergestellt. Die orale Gabe der rekombinanten Bakterien an GKO Mäuse stellte zudem eine natürliche Resistenz gegenüber Infektionen in den immun-geschwächten Tieren

wieder her (100 % gegenüber 0 % Überleben). Diese Ergebnisse zeigten erstmalig, dass attenuierte *Salmonella* erfolgreich als DNA Antigen-Liefersystem für die Korrektur eines genetischen Defekts, der mit Makrophagen assoziiert ist, eingesetzt werden können.

Veröffentlichungen | Publications

Kresse AU, Beltrametti F, Ebel F, Guzmán CA (2000) Characterization of the SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:6490-6498.

Paglia P, Terrazini N, Schulze K, Guzman CA., Colombo MP (2000) In vivo correction of genetic defects of monocytes/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Therapy* 7:1725-1730.

Medina E, Schulze K, Chhatwal GS, Guzmán CA (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')₂ fragment. *Infect Immun* 68:4786-4788.

Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzmán CA (2000) 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* 30:768-777.

Schulze K, Medina E, Talay SR, Towers RJ, Chhatwal GS, Guzmán CA (2001) Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for the elicitation of a protective immune response. *Infect Immun* 69:622-625.

Vaccine Research (SP 2.2)

Vaccination is the most cost-effective strategy for the prophylaxis of infectious diseases and it is also becoming a powerful tool to prevent or treat a broader range of diseases. The main activities of the Vaccine Research Group focus on the development and validation of technology platforms for antigen delivery and vaccine prototypes.

Identification of the minimal domain of the fibronectin-binding protein I (SfbI) of *Streptococcus pyogenes* required for the elicitation of a protective response

Previous studies from our group allowed to establish that SfbI represents a promising antigen for vaccine formulations against *S. pyogenes*. However, the instability of the protein may constitute a problem for the scale-up process. Truncated forms of SfbI exhibit improved stability, thus, experiments were carried out to identify the minimal portion of SfbI able to confer protective immunity. The obtained results demonstrated that intranasal immunisation with a fragment of only 157 amino acids, which encompasses the fibronectin-binding repeats, confers efficient protection against challenge with wild type bacteria (80% survival versus 0% in the control group). Further studies proved that vaccination with this fragment stimulates efficient memory and that the use of additional mucosal adjuvants is rendered unnecessary due to the intrinsic adjuvanticity of this SfbI domain.


Role played by SepL in the pathogenesis process of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

The *sepL* gene is coded by the locus of enterocyte effacement of EHEC. Thus, it is likely to be implicated in the attaching and effacing process. Protein localization studies showed that SepL was present in the cytoplasm and associated with bacterial membranes. SepL is monocistronically transcribed in response to stimuli that are characteristic for the intestinal niche. The characterization of an in-frame deletion mutant (Δ sepL) showed that SepL is essential for bacterial attachment to epithelial cells and for the recruitment and reorganization of cytoskeletal proteins on target cells. The Δ sepL mutant also exhibited an impaired secretion but not biosynthesis of Esp proteins. These results demonstrate the crucial role played by SepL in the biological cycle of EHEC.

In vivo correction of genetic defects of macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vector

Macrophages are normal targets for *Salmonella* during natural infections. In addition, we have previously demonstrated that attenuated bacteria can be used to deliver nucleic acid vaccine constructs to them. Thus, we assessed if attenuated *Salmonella* can be used to deliver transgenes to correct genetic defects associated with macrophages. The proof-of-principle for this strategy was provided using IFN- γ -deficient mice (GKO), which are highly susceptible to bacterial infections (i.e. even attenuated mutants can be lethal). Attenuated *Salmonella aroA* was used as carrier for an eukaryotic expression vector encoding the murine IFN- γ gene. The production of this cytokine was restored in peritoneal macrophages from GKO mice, which were infected with *Salmonella* either in vitro or in vivo. Oral administration of recombinant bacteria to GKO mice also reestablished the natural resistance to infections in these immunocompromised animals (100% versus 0% survival). These results demonstrate, for the first time, that attenuated *Salmonella* can be successfully used as a DNA delivery system for the correction of genetic defects associated to macrophages.

Immunantwort und Antigenpräsentation (SP 2.3)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. S. Weiß | 
Molecular Immunology

| Res. Group

Projektmitarbeiter | *Project members*: H. Bauer, S. Düber, H. Engel, A. Garbe, H. Herrmann, J. Jablonska, A. Jungebloud, T. Kleinke, K. Kretschmer, S. Krusch, S. zur Lage, R. Lesch, M. Probst-Kepper, J. Stopkopwicz, A. Zelmer

Die Zellen des Immunsystems, die Antigen-spezifische Reaktionen ausführen, lassen sich in B- und T-Zellen unterteilen. Dabei sind B-Zellen für die Produktion von Immunoglobulin (Ig) verantwortlich, während T-Zellen, die sich in zytotoxische CD8 und regulatorische CD4 T-Zellen unterteilen lassen, ihre Funktion über Zell-Zellinteraktion oder Zytokinsekretion ausüben. Auch bei B-Zellen kann man verschiedene Populationen unterscheiden, hauptsächlich B1- und B2-Zellen. Die B2-Zell Population ist für die hohe Spezifität von Antikörpern verantwortlich, da sie die Fähigkeit zur Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation ihrer Ig variablen Regionen und zum Ig-Klassenwechsel (Switch) besitzt. Diese Differenzierung nimmt jedoch Zeit in Anspruch, deshalb gewinnen sie bei einer erstmalig auftretenden Infektion erst relativ spät an Bedeutung. Dagegen scheinen B1-Zellen bzw. das von ihnen produzierte Ig (B1-Zellen produzieren >50% des Serum IgM) eine erste Antikörper-Barriere gegen Infektionen darzustellen. Welche Selektionskräfte auf das Antikörperrepertoire von B1-Zellen wirkt, damit diese Barriere entsteht, ist jedoch noch unklar.

Im Gegensatz zu B-Zellen können T-Zellen mit ihrem Rezeptor Antigen nicht direkt erkennen. Es muss zunächst prozessiert (proteolytisch gespalten) und anschließend gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf der Oberfläche von Zielzellen präsentiert werden. Dieser Vorgang ist essentiell für die T-Zellreaktion. Folgerichtig haben Pathogene Mechanismen entwickelt, die damit interferieren. So induziert *Listeria monocytogenes* einen antagonistischen MHCII/Peptid Komplex, der zur zeitweiligen partiellen Inaktivierung von Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen führt. Inwieweit sich diese Inhibition *in vivo* auswirkt wird derzeit untersucht.

Ein transgenes B1-Zellmodell

Kürzlich konnten wir mehrere Mauslinien etablieren, die eine $\lambda 2$ leichte (L) Ig-Kette als Transgen besitzen. In einer dieser Linien wurde von den B-Zellen nur die transgene und keine der endogenen L-Ketten exprimiert. Ferner waren in diesen Mäusen die B-Zellen fast ausschließlich vom B1-Typ. Da durch die Vorgabe der transgenen L-Kette das Repertoire der variablen Regionen der schweren Ketten (VH) eingeschränkt ist, war es möglich, sinnvolle Sequenzvergleiche von VHs von B1-Zellen verschiedenen Ursprungs durchzuführen. Diese Analysen ergaben, dass im Peritoneum der transgenen Mäuse einige wenige VH-Sequenzen dominieren, d.h. identische Sequenzen wurden wiederholt aufgefunden, auch wenn unterschiedliche individuelle Tiere analysiert wurden. Bei der Analyse von B-Zellen aus der fötalen Leber, dem Organ in dem B1-Zellen entstehen, wurden ebenfalls Sequenzen wiederholt aufgefunden. Sie

unterschieden sich aber von denen aus dem Peritoneum. Um auszuschließen, dass diese dominierenden Sequenzen auf Grund von präferentieller Paarung mit der transgenen L-Kette selektioniert waren, wurden pre-B-Zellen *in vitro* ausdifferenziert und ihre VHs analysiert. Hier wurden keine wiederholten VH-Sequenzen aufgefunden, so dass ein Paarungseffekt durch die transgene L-Kette als Erklärung ausscheidet. Wir interpretieren diese Befunde so, dass in der fötalen Leber durch Selbst-Antigene und im Peritoneum durch Selbst-Antigene möglicherweise zusammen mit Antigenen von Mikroorganismen aus dem Darm das Antikörperrepertoire von B1-Zellen stark beeinflusst wird. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass auch in der Milz, einem Organ in dem normalerweise nur wenige B1-Zellen vorkommen, die aber in unseren transgenen Mäusen die größte B-Zellpopulation darstellen, ebenfalls ein stark selektioniertes VH-Repertoire vorliegt. Überraschenderweise war die Archi-

tektur dieses lymphoiden Organs weitgehend normal, obwohl die B-Zellzonen der primären Follikel sonst mit B2-Zellen bevölkert sind. Offensichtlich besitzen diese B1-Zellen die Kapazität die entsprechenden Strukturen zu organisieren.

Listerien-Wirt Interaktion

Antigen präsentierende Zellen (APC), die mit *L. monocytogenes* infiziert oder mit Listeriolysin, dem Hämolysin von *L. monocytogenes*, behandelt wurden, induzieren bei Antigen-spezifischen CD4 T-Zellen partielle Anergie. Diese T-Zellen können nicht mehr proliferieren und IL-2 produzieren, sekretieren aber weiterhin noch IFN γ und IL-3. Die partielle Anergie verschwindet nach etwa fünf Tagen und die T-Zellen werden wieder voll reaktiv. Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen auch *in vivo* Relevanz besitzt, wurden Mäuse mit einer niedrigen Dosis *L. monocytogenes* infiziert. Anschließend wurde ihnen an verschiedenen Tagen Antigen verabreicht. Die Analyse der APC aus der Milz dieser Mäuse ergab, dass schon am ersten Tag die Präsentation durch phagozytische Zellen beeinflusst war, während nicht aufgetrennte Milzzellen, in denen auch B-Zellen als APC fungieren können, erst am vierten Tag ihre stimulatorische Kapazität verloren. An diesem Tag wandern die Listerien-spezifischen Killer-T-Zellen in die Milz ein und beginnen infizierte Zellen zu lysieren. Dadurch wird vermutlich Listeriolysin von infizierten phagozytischen Zellen freigesetzt, so dass dann alle Milzzellen mit Listeriolysin in Kontakt kommen. Histologische und zytologische Analyse lieferte eine Erklärung, dafür warum phagozytische Zellen bereits am ersten Tag betroffen sind. Listerien infizieren zunächst vornehmlich phagozytische Zellen in der Marginalzone der lymphoiden Follikel (Abb. 1). Diese Zellen sind vermutlich auch diejenigen, die als erste mit Antigenen aus dem Blut in Berührung kommen, so dass auch ihre Präsentationskapazität am stärksten betroffen sein sollte.

Listerien-vermittelte DNA-Übertragung

Listerien sind geeignet eukaryontische Expressionsplasmide auf Wirtszellen zu übertragen. Sie können somit potentiell als Vektoren für die Gentherapie benutzt werden. Da sie auf Grund ihres Infektionszyklus Möglichkeiten aufweisen, die nicht-replizierenden Vektoren (z.B. Retroviren) verschlossen bleiben (z.B. Zell zu Zell-Ausbreitung), stellen sie eine ernstzunehmende Alternative zu diesen Vektoren dar.

Zunächst wurden DNA Übertragungen mit Reportergenen durchgeführt. Diese Übertragungen wurden dann optimiert und mit der Übertragung einer cDNA für CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) erweitert. Funktionalität des übertragenen CFTR konnte nach biochemischer Analyse elektrophysiologisch sichergestellt werden. Um diese Transfers auf ein *in vivo* Modell übertragen zu können, wurde ein Fusionsprotein zwischen CFTR und GFP hergestellt, damit die CFTR Expression *in vivo* anhand der Fluoreszenz nachweisbar ist. Abb. 2 zeigt CHO Zellen, in die mit Hilfe von Listerien CFTR-GFP übertragen wurde.

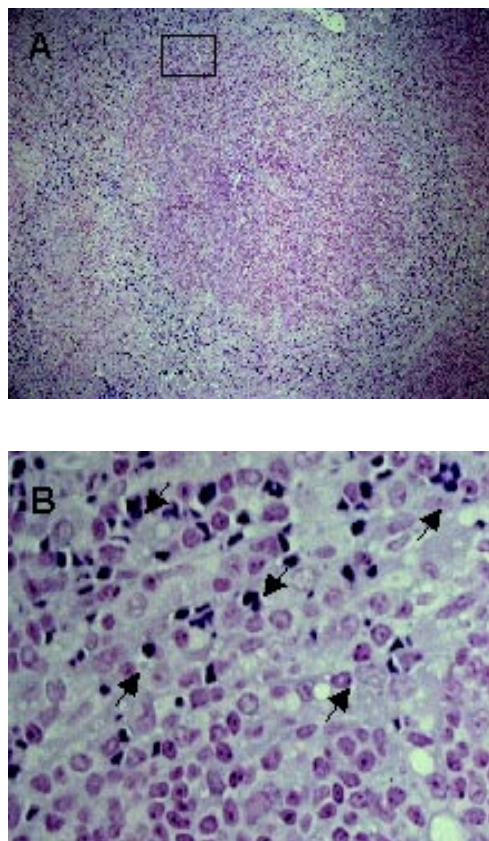


Abb.1. Histologische Analyse einer Milz von einer mit *L. monocytogenes* infizierten Maus am dritten Tag der Infektion. Paraffin-Schnitte wurden einer Gram-Färbung unterzogen. Zur besseren Übersicht wurde mit Kernechtrot gegengefärbt. Abb. A zeigt einen primären lymphoiden Follikel in dessen Marginalzone infizierte Zellen zu finden sind. Die mit Pfeilen markierten Zellen repräsentieren Zellen, die mehrere Bakterien enthalten und durch die Gram-Färbung detektiert werden können (B). Bei höherer Auflösung und weniger intensiver Färbung, lassen sich dabei einzelne gefärbte Stäbchen unterscheiden (nicht gezeigt).

Fig. 1. Histological analysis of a spleen derived from a mouse infected with *L. monocytogenes* for 3 days. Nuclear fast red and Gram staining was carried out on paraffin sections. A primary lymphoid follicle is shown (A) in the marginal zone of which infected cells are found. Arrows mark cells that contain several bacteria detected by the Gram staining (B). Using a larger magnification and a less intensive staining singular rods would become detectable (not shown).

Immune Response and Antigen Presentation (SP 2.3)

The cells of the immune system that are able to react antigen specifically can be divided into B- and T-cells. B-cells are responsible for the production of immunoglobulin (Ig). T-cells which can be further subdivided into cytotoxic CD8 and regulatory CD4 cells exhibit their function via cell-cell interaction or cytokine secretion. Also B-cells can be subdivided into different subpopulations, mainly into B1- and B2-cells. B2-cells are responsible for the exquisite specificity of antibodies since they are capable of affinity maturation by somatic hypermutation of their Ig variable regions and to switch their Ig classes. Since this differentiation requires some time such antibodies can play no role during the initial phase of a primary infection. In contrast, B1-cells or the Ig produced by them (B1-cells produce >50% of serum IgM) are considered a first antibody barrier against infections. The selective forces that act on the antibody repertoire of B1-cells to assure a functioning barrier, however, are still unclear.

*In contrast to B-cells, T-cells can not recognize antigen directly with their T-cell receptor. Antigen needs to be processed (proteolytic digested) and subsequently presented bound to a molecule of the major histocompatibility complex (MHC) on the surface of an antigen presenting cell (APC). This process is essential for the T-cell reaction. Consequently, pathogens have developed mechanisms that interfere with these processes. E.g. *Listeria monocytogenes* induces an antagonistic MHCII/peptide complex that results in transient partial inactivation of antigen specific CD4 T-cells. Whether or not this inactivation is relevant during a *Listeria* infection in vivo is presently under study.*

A transgenic B1-cell model

Recently we established several mouse strains that contain a $\lambda 2$ light immunoglobulin (Ig) chain as transgene. In one of these lines B-cells expressed the transgenic light chain only. Hardly any of the endogenous light chains could be found. In addition, most of the B-cells in such mice were of the B1 type. Since the presence of the transgenic light chain restricts the repertoire of the variable regions of the heavy chains (VH) to a large extent, a sensible comparison of sequences of VH's derived from B1-cells was possible. These analyses revealed that in the peritoneum of the transgenic mice a few VH-sequences dominated, i.e. identical sequences were found repeatedly even when different individual animals were analyzed. The analysis of VH's of B-cells from fetal liver, the organ where B1-cells originate from, also revealed several identical sequences. However, they were distinct from the ones identified in peritoneum. To exclude that this finding was due to a preferential pairing of the transgenic light chain with a restricted set of heavy chains we differentiated fetal liver derived preB-cells in vitro and analyzed their VH repertoire. Here we could not find identical sequences. Thus a pairing effect is excluded as explanation. We interpret our findings in such a way that self-antigens in fetal liver and self-antigens together with exogenous antigens possibly derived from microorganisms of the

gut in the peritoneum are strongly influencing the antibody repertoire of B1-cells.

Preliminary data suggest that a similar mechanism also acts on B1-cells in spleen, an organ in which B1-cells normally represent only a minor percentage, while in our transgenic mice they constitute the major B-cell population. Interestingly, the architecture of this organ was quite normal, although the B-cell zones of the primary follicles normally contain B2-cells. Obviously, B1-cells have the capacity to organize such structures.

Listeria-host interaction

*Antigen presenting cells (APC) that are infected with *L. monocytogenes* or APC that are treated with listeriolysin, the hemolysin of *L. monocytogenes*, induce partial anergy in antigen specific CD4 T-cells, i.e. such T-cells do not longer proliferate and produce IL-2 but are still able to secrete IFN γ and IL-3. Anergy resolves after 5 days and the T-cells become fully responsive. To find out whether this phenomenon has also relevance in vivo we infected mice with a low dose of *L. monocytogenes*. Subsequently antigen was injected at different days and antigen presenting capacity of cells from spleen was revealed. Already at the first day isolated phagocytic cells were affected while total spleen cells in which B-cells also can act as APC still could present antigen. These cells only lost their stimulatory capacity after 4*

days. At this time listeria specific cytotoxic cells are known to migrate into the spleen and lyse infected cells. During this period most likely listeriolysin is liberated and all spleen cells are exposed to it. Histological and cytological analysis suggested also an explanation for the early effect on phagocytic cells. Listeria mainly infects phagocytic cells of the marginal zone of the lymphoid follicles (Fig. 1). Such cells are most likely also exposed first to antigens that are transported via the blood stream. Therefore, their presenting capacity should be affected first.

Listeria mediated DNA transfer

Listeria are also capable of transferring eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells and can, therefore, potentially be used as vectors for gene therapy. Due to their particular infection cycle they possess features (like cell to cell spreading) that are not available to non-replicating vectors such as replication defective retroviruses. Thus, they represent a serious alternative to such vectors.

Initially DNA transfers were carried out with reporter genes. An optimized system then was used to transfer a cDNA encoding CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Functionality of the transferred CFTR was analyzed biochemically and by electrophysiology. To be able to use this transfer system also in vivo, we established a fusionprotein between CFTR and GFP which should allow the detection of a transferred and expressed CFTR in vivo by its fluorescence. Fig. 2 shows CHO cells that were transfected with CFTR-GFP using *L. monocytogenes*.

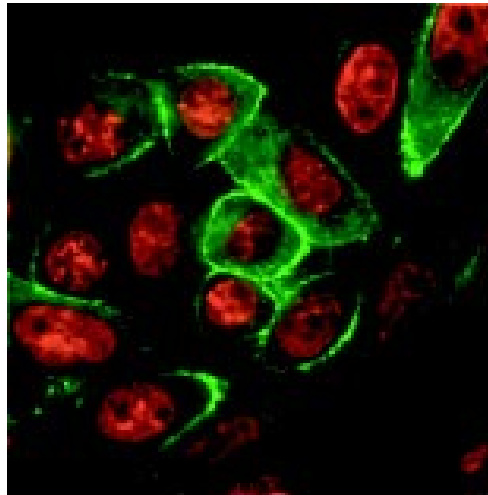


Abb.2. Expression eines GFP-CFTR Fusionproteins in CHO Zellen nach Listerien-vermittelter Transfektion. Die Zellkerne der Transfektanten wurden mit DAPI detektiert, das hier mit roter Falschfarbe dargestellt ist.

Fig. 2. Expression of a GFP-CFTR fusion protein in CHO cells after listeria-mediated DNA transfer. Nuclei were revealed using DAPI which here is indicated in a red false color.

Publications | Veröffentlichungen

Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1190:341-349.

Paschen A, Dittmar KEJ, Grenningloh R, Rohde M, Schadendorf D, Domann E, Chakraborty T, Weiss S (2000) Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *Eur J Immunol* 30:3447-3456.

Engel H, Rühl H, Benham CJ, Bode J, Weiss S (2001) Germ-line transcripts of the immunoglobulin λ J-C clusters in the mouse: Characterization of the initiation sites and regulatory elements. *Mol Immunol* 38:289-302.

Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KEJ, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S (2001) Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microbiol* 3:599-609.

Weiss S, Krusch S (2001) Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells. *Biol Chem* 382:533-541.

Experimentelle Immunologie (SP 2.4)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. W. Müller | Abt. Experimentelle Immunologie | *Dept. of Experimental Immunology*

Projektmitarbeiter | *Project members*: S. Beisert, M. Hafner, A. Hollnagel, R. Hühne, C. Neffgen, A. Samuels, G. Wessel

Die neu gegründete Abteilung für experimentelle Immunologie nahm ihre Aktivitäten im November 2000 auf. Thematisch befasst sich die Abteilung mit grundlegenden Mechanismen des Immunsystems, die einerseits für eine Abwehr von Erregern notwendig sind, andererseits aber bei Fehlfunktionen zu Erkrankungen des Körpers in Form von Allergien, chronisch-entzündlichen Prozessen und Autoimmunität führen können. Die Mechanismen werden in der Maus als Modellsystem analysiert. Durch gezielte Veränderung von genetischer Information in der Maus, in sogenannten Mausmutanten, wird eine ursachenorientierte Betrachtung von Krankheitsprozessen möglich.

Die Funktion von Zytokinnetzwerken in der Maus

Zytokine sind Botenstoffe des Immunsystems, die die Funktion und den Aktivierungszustand des Immunsystems sowohl lokal als auch im ganzen Körper regulieren. Kontinuierliche Ausschüttung bestimmter Zytokine führt zu chronischen Entzündungen mit zum Teil erheblichen Einbußen der Lebensqualität. Wir beschäftigen uns mit zwei Klassen von Zytokinen: Zytokinen, die eine anti-entzündliche Wirkung haben, die also in der Lage sind, Entzündungen zu hemmen, und solchen, die eine entzündungsfördernde Wirkung haben, also einen Entzündungsprozess beginnen und aufrecht erhalten können. Zytokine, die Entzündungen auslösen, haben Nebenwirkungen, z.B. Fieber oder Gelenkschmerzen. Warum schaltet man diese Zytokine nicht einfach aus und braucht Entzündungen nicht mehr zu fürchten? Fehlen nämlich diese Zytokine, so wird der Körper anfällig gegenüber Erregern und kann selbst einfache bakterielle und virale Infekte nicht mehr abwehren.

Wanderung von Lymphozyten

Das Immunsystem ist gegliedert in einzelne abgeschlossene funktionelle Einheiten (Kompartimente), die durch Gefäßsysteme miteinander verbunden sind. Lymphozyten wandern durch die verschiedensten Gefäßsysteme im Körper und gelangen so an fast jeden Ort. Die Wanderung der Lymphozyten wird kontrolliert durch eine Gruppe von Molekülen, die auf der Oberfläche der Lymphozyten ausgeprägt werden und die für die Einwanderung in die verschiedensten Kompartimente verantwortlich sind. Die Funktion dieser Moleküle unter-

suchen wir in Mausmutanten. Fehlen diese Moleküle, so verändern sich die verschiedenen Kompartimente in der Größe und in der Zusammensetzung der unterschiedlichsten Zellarten. Die Kompartimente, wie die am Darm gelegenen lymphatischen Strukturen, haben eine besondere Bedeutung für die Abwehr von Bakterien. So ist das Darmsystem von einer Vielzahl von Bakterien und Hefen besiedelt, die bei der Verdauung mithelfen. Das Immunsystem muss verhindern, dass diese Bakterien und Hefen eine Infektion im Körper auslösen. Andererseits werden ständig Nahrungsmittelbestandteile aus dem Darm in den Körper aufgenommen, und das Immunsystem muss dafür sorgen, dass gegen diese Nahrungsmittelbestandteile keine Immunantworten erfolgen.

Gene des Immunsystems

Die Methode der DNA-Sequenzierung von Genen erlaubt es uns, die Abfolge der einzelnen DNA-Basen der Gene zu bestimmen. Gene, die für die Funktion des Immunsystems wichtig sind, können wir in ihrer Struktur und Funktion beschreiben. Durch bioinformatische Methoden können wir analysieren, wie während der Evolution einzelne Genfamilien entstanden und wie sich diese Genfamilien weiter entwickelt haben. Die ständige Auseinandersetzung mit Krankheitserregern hat in der Vergangenheit zu einer sehr hohen Sterblichkeit geführt, und nur die Personen, deren Immunsystem die Krankheitserreger bekämpfen konnten, pflanzten sich fort. Wir sehen also in den Genen das Ergebnis einer sehr langen Auseinandersetzung zwischen Erreger und Wirt.

Experimental Immunology (SP 2.4)

The newly installed Department of Experimental Immunology started its activities in November 2000. The Department studies fundamental mechanisms of the immune system, which on the one hand are necessary for the elimination of pathogens, but on the other hand, when not functioning accordingly, can lead to diseases in the form of allergies, chronic inflammatory processes and autoimmunity. The mechanisms are analysed in mice which are used as a model system. The cause and the process of a disease can be examined by specifically modifying the genes in mice and generating so called mouse mutants.

The function of cytokine networks in mice

Cytokines are messengers of the immune system that regulate the function and the performance of the immune system in the entire body and not just certain parts. Continuous production of a certain cytokine may lead to chronic inflammation which results in a considerable loss in the quality of life. We study two classes of cytokines: cytokines that have an anti-inflammatory effect, i.e. are capable of slowing down the inflammation, and those that aid the inflammatory effect, i.e. can trigger off and maintain an inflammatory process. Cytokine that cause inflammation have side effects, e.g. fever or pain in the joints. Why doesn't one just eliminate these cytokines and need not worry about inflammation? If these cytokines are inactive then the metabolism becomes susceptible to pathogens and is unable to fend off bacterial and virus infections.

The migration of lymphocytes

The immune system is divided into small functional units (compartments), which are connected by vascular systems. Lymphocytes pass through the different vascular systems and by doing this they reach almost every part of the body. The migration of lymphocytes is controlled by a group of molecules, which are present on the surface of the lymphocyte and are responsible for the immigration into the different compartments. We study the function of these molecules in the mouse mutants. If the molecules are missing the different compartments change in size and in the make up of the cellular composition. For example, the compartment containing the lymphatic structures in the intestine are very important for fending off bacteria. A large number of bacteria and yeasts are present in the intestinal system. The immune system has to prevent these bacteria and yeasts from causing an infection in the body. On the other hand, food ingredients in the intestines are constantly being absorbed by the body and the

immune system has to ensure that these food ingredients do not cause an immune reaction.

Genes of the immune system

The DNA-sequencing methods of genes allow us to determine the sequence of the individual DNA bases of the gene. We can describe the function and structure of genes which are important for the functioning of the immune system. With the help of bioinformatical methods we can analyse how in the process of evolution single gene families originated, and how they have continued to develop to the current state. The constant fight of the pathogens responsible for infections led to a high mortality rate in the past and only individuals capable of fighting off these pathogens could reproduce. So in the genes today we see the result of very long fights between pathogen and hosts.

Publications | Veröffentlichungen

Leuker CE, Labow M, Müller W, Wagner N (2001) Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med* 193:755-768.

Kanwar JR, Harrison JE, Wang D, Leung E, W. Müller, N. Wagner, Krissansen GW (2000) Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 103:146-152.

Vosshenrich CA, Sharara LI, Guy-Grand D, Rajewsky K, Müller W, Di Santo JP (2000) Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-deficient B cells persist in T cell-deficient gammac-mice and respond to a T-independent antigen. *Eur J Immunol* 30:1614-22.

Dr. W. Müller organisierte den EMBO-Kurs (s. S. 96)

Dr. W. Müller organized the EMBO course (see p. 96).

Mucosale Immunität (SP 2.5)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: S. Bayrak, D. Bruder, P. Gatzlaff, W. Hansen, J. Lauber, O. Lechner, A. Matussek, A. Schrader, B. Störmann, T. Töpfer, M. Templin, G. Tettweiler, A. Westendorf, Dr. rer. nat. U. Walter (Hôpital Necker Enfants Malades, Paris)

Die Forschungsaktivitäten unserer Nachwuchsforschergruppe gliedern sich in die beiden Teilgebiete T-Zell-Toleranz und Mucosale Immunität. Im Mittelpunkt steht dabei 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

Wir konnten vor kurzem differenzielle Expressionsprofile von „anergen“ CD4+ T-Zellen erstellen und hierbei eine Reihe von Genen identifizieren, die für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wesentlich sind (siehe auch F.A.Z. 20. Juni 2001, Nr. 140/Seite N2). 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.

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* Systeme an der GBF etabliert werden, und erste Ergebnisse zur prä-T-Zell-Rezeptor (prä-TCR) Signaltransduktion liegen vor.

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

Aktuelle Ergebnisse zur Mucosalen Immunität: Es 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 Antigenpräsentationssystem wird ein AIDA Typ I Autotransporter 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. Die Etablierung des Modellsystems konnte inzwischen von Frau Dr. Bruder weitgehend abgeschlossen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt beschäftigt sich mit der molekularen Charakterisierung der komplexen Wechselwirkung von *Chlamydia trachomatis* mit Wirtszellen („Cross-Talk“). In Kooperation mit Andreas Klos vom Institut für Medizinische Mikrobiologie der MHH wurde untersucht, wie Chlamydien Host-Zellen „umprogrammieren“.

Funktionelle Expressionsanalyse

Unter der Projektleitung von Jörg Lauber wird von unserer Nachwuchsforscherguppe zur Zeit eine Einheit zur funktionellen Expressionsanalyse für Infektionsbiologie etabliert und bereits von vielen verschiedenen Arbeitsgruppen an der GBF und in der Region erfolgreich genutzt.

Mucosal Immunity (SP 2.5)

The research activities of our “Junior Research Group” are divided into two main areas, T-cell tolerance and mucosal immunity. The emphasis 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. The aim, with animal models and patients, is to develop completely new and highly effective therapies for diseases involving disturbance of the mucosal immune function.

T-cell tolerance

We have recently been able to produce differential expression profiles of “anergic” CD4+ T-cells, and thereby could identify a number of genes essential for maintaining peripheral tolerance (see also F.A.Z 20 June 2001, No. 140/Page N2). 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.

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 analysis 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.

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 the 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 they are the object of intensive current research, whereby an important focus of attention involves "therapeutic manipulation of the intestinal flora".

Current results of mucosal immunity research: using *E. coli* bacteria (strain NISSLE 1917), it has been 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 use 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, 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. Dr. Bruder has finished to establish the model system and is now focusing on its cellular and molecular characterisation.

Another focus of our research is the molecular characterisation of the complex interactions between *Chlamydia trachomatis* and the host ("cross talk"). In co-operation with Andreas Klos from the institute for Medical Microbiology from the Medical University of Hannover we have studied how *Chlamydia* reprograms the host.

Functional Expressionprofiling

Under the project leadership of Joerg Lauber our group aims to established a unit for functional expressionprofiling for the biology of infections. Several groups at the GBF and in the area are already successfully applying this system for the study of host-pathogen interaction.

Publications | Veröffentlichungen

Oevermann K, Buer J, Hoffmann R, Franzke A, Schrader A, Patzelt T, Kirchner H, Atzpodien J (2000) Capecitabine in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 83:583-587.

Schrader AJ, Probst-Kepper M, Große J, Kunter U, Schenk F, Franzke A, Atzpodien J, Buer J (2000) Molecular and prognostic classification of advanced melanoma: a multi-marker microcontamination assay of peripheral blood stem cells. *Melanoma Res* 10:355-362.

Schrader AJ, Probst-Kepper M, Große J, Kunter U, Franzke A., Sel S., Atzpodien J., and Buer, J. (2000). Tumour microdissemination and survival in metastatic melanoma. *Anticancer Res* 20:3619-3624.

Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J (2001) Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 11:587-595.

Identifizierung von Zellulose als einer extrazellulären Matrixkomponente von Biofilm bildenden Salmonellen (SP 2.6)

Projektleiter | *Project leader*: Dr. U. Römling | Nachwuchsforschergruppe Klonale Variabilität | *Junior Research Group Clonal Variability*

Projektmitarbeiter | *Project members*: W. Bokranz, D. Dinesh, J. Floßdorf, U. Gerstel, A. Kresse, X. Zogaj
Kooperationen mit: M. Nimtz, M. Rohde

Besiedelung von Oberflächen durch Biofilm bildende Bakterien verursacht im medizinischen Bereich schwer zu bekämpfende Infektionen sowie Kontamination von Produkten in industriellen Anlagen. Die Familie der *Enterobacteriaceae* gehört zu den häufigsten Verursachern nosokomialer Infektionen (Krankenhaus-Infektionen), die in vielen Fällen, wie bei der durch Katheter verursachten Zystitis, durch Biofilm bildende Bakterien ausgelöst werden. Eine Analyse der Biofilmbildung auf regulatorischer und struktureller Ebene schafft die Voraussetzung für rationale Strategien zur Bekämpfung von Biofilm bildenden Bakterien. Ein Ziel der Nachwuchsforschergruppe ist es, die Strukturkomponenten von Biofilm bildenden *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* aufzuklären.

Bakterien in Biofilmen sind in einer selbstproduzierten extrazellulären Matrix eingebettet, durch die sie an der Oberfläche anheften sowie ihre eigene multi-zelluläre Gemeinschaft aufbauen. Die Bildung von Matrixkomponenten von Biofilm bildenden *S. typhimurium* kann man durch das Wachstum der Zellen auf einer mit dem Farbstoff Kongorot versehenen Agarplatte über die Koloniemorphologie kombiniert mit der unterschiedlichen Farbgebung durch die Absorption von Kongorot leicht detektieren. Genetische und phänotypische Analysen hatten gezeigt, dass es mindestens zwei extrazelluläre Matrixkomponenten gibt, von denen die eine, die dünnen, aggregativen Fimbrien, schon bekannt war. Über Transposonmutagenese wurden die Gene des *bcsABZC* (*b*acterial *c*ellulose *s*ynthesis) Operons als notwendig für die Bildung der bislang unbekannt extrazellulären Matrixkomponente identifiziert. Ausgehend von der Homologie mit dem Zelluloseoperon

in *Acetobacter xylinus* konnte mit genetischen und chemischen Analysen gezeigt werden, dass Zellulose der zweite Bestandteil der extrazellulären Matrix von Biofilm bildenden *S. typhimurium* ist (Abb. 1). Zelluloseproduktion konnte neben *S. typhimurium* auch für Biofilm bildende *Salmonella enteritidis*, *E. coli* Stämme sowie *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen werden.

Bisher war man der Meinung, dass Zellulose nur von wenigen Bodenbakterien wie z.B. *Agrobacterium tumefaciens* und Rhizobien synthetisiert wird. Mit unserer Arbeit konnten wir zum ersten Mal Zelluloseproduktion in pathogenen und kommensalen Mikroorganismen nachweisen, die eine bedeutende Rolle in der Humanökologie spielen.

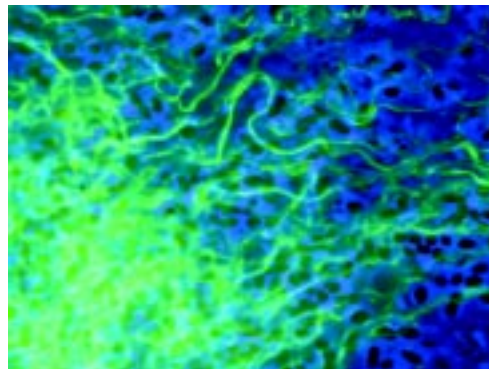


Abb.1. *Salmonella typhimurium* MAE97 exprimiert Zellulose. Im Gegensatz zum Ausgangsstamm MAE52 wurde in MAE97 die Biosynthese der dünnen, aggregativen Fimbrien durch Inaktivierung der Strukturgene ausgeschaltet. Der Farbstoff Calcofluor bindet selektiv an die Zellulosefibern. Vergrößerung x 600.

Fig.1. *Salmonella typhimurium* MAE97 expresses cellulose. In contrast to the wild type MAE52 the biosynthesis of thin aggregative fimbriae had been inactivated in MAE97. The dye Calcofluor binds selectively to cellulose fibers. Magnification x 600(ht).

Identification of cellulose as an extracellular matrix component of biofilm-forming *Salmonella typhimurium*

*Surface colonization by biofilm producing bacteria causes hard to fight infections in medical settings as well as contamination of products from industrial fermenters. Members of the Enterobacteriaceae belong to the microorganisms that frequently cause nosocomial infections. In many cases nosocomial infections are caused by biofilm producing bacteria, for example, in catheter-related cystitis. The analysis of biofilm formation with respect to regulation and structural components is a prerequisite to develop rational strategies against biofilm-forming bacteria. It is one of our goals to elucidate the structural components of biofilm-forming *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.*

*Bacteria in biofilms are embedded in a self produced extracellular matrix. The matrix is used by the bacteria for adherence on surfaces as well as a structural component in the own multicellular community. Production of matrix components by biofilm-forming *S. typhimurium* can be followed by the growth of the cells on agar plates containing the dye Congo red. Colony morphology and differential absorption of Congo red detects different matrix components. Genetic and phenotypic analyses had already shown that there are at least two extracellular matrix components, thin aggregative fimbriae being one of them. Using transposon mutagenesis genes of the *bcsABZC* (bacterial cellulose synthesis) operon were identified to be necessary for the biogenesis of the so far unknown second extracellular matrix component. Based on the homology with the cellulose biosynthesis operon in *Acetobacter xylinus* we could show by genetic and chemical analysis that cellulose is the second component of the extracellular matrix of biofilm-forming *S. typhimurium* (Fig. 1). Besides *S. typhimurium* we could show that also *Salmonella enteritidis*, *E. coli* as well as *Klebsiella pneumoniae* produce cellulose. According to common knowledge, cellulose was considered to be produced only by few soil bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens* and rhizobia. We could show for the first time that cellulose is also produced by pathogenic and commensal microorganisms playing an important role in the ecology of human beings.*

Publications | Veröffentlichungen

*Römbling U, Tümmler B (2000) Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 38:464-465.*

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

*Römbling U (2001) Genetic and phenotypic analysis of multicellular behaviour in *Salmonella typhimurium*. In: Methods Enzymol 336:48-59.*

*Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römbling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol Microbiol 39:1452-1463.*



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, Derivate von Naturstoffen oder synthetische Analoga. 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 Industriepartner 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.

Durch die Verknüpfung genetischer und biochemischer Ansätze soll der Zugang zu Naturstoffen bzw. „Quasi-Naturstoffen“ ermöglicht werden. So sollen z. B. sogenannte stille myxobakterielle Biosyntheseluster aktiviert werden, indem Bakterienstämme genetisch verändert werden. Alternativ können komplette Stoffwechselwege in andere Wirtsorganismen übertragen werden. Eine als Biokombinatorik bezeichnete Strategie soll ebenfalls zur Bildung einer Vielzahl von neuartigen, möglicherweise biologisch aktiven Substanzen führen.

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 from these chemically synthesised derivatives. 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.

The employment of a combination of genetic and biochemical approaches raises the hope to increase the availability of new natural products and/or their derivatives. One possibility is to activate silent biosynthetic gene clusters of myxobacterial origin, either by genetically engineering producer strains or by expressing biosynthetic pathways in foreign hosts. Another strategy, known as combinatorial biosynthesis, should lead to the formation of a variety of new substances with modified structures and possibly novel biological activity.

Complementary to this classical approach, the project Combinatorial Molecular Repertoires is taking different paths to arrive at 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 plenty of (around 10^9) 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, H. Irschik, B. Kunze, H. Reichenbach, F. Sasse

Im Berichtszeitraum wurden 600 Stämme von Myxobakterien für unser Screening neu isoliert. Außer Tests mit verschiedenen Bakterien, Pilzen und tierischen Zellen wurden auch Enzym- und Rezeptortests durchgeführt. Die Tests mit lebenden Zellen haben den Vorteil, dass sie die Wechselwirkungen mit tausenden von Enzymen und Zellstrukturen anzeigen. Außerdem wurden Kulturextrakte durch HPLC-Analysen charakterisiert und solche Verbindungen isoliert, die durch neuartige Peaks auffielen. Alle neu gefundenen Verbindungen wurden in ausreichender Quantität isoliert und gingen in Sekundärscreenings bei Industriepartnern. In einigen Fällen führten positive Resultate zu einer weiteren Bearbeitung.

Neue Verbindungen

Wir konnten wieder eine Reihe neuer Substanzen isolieren. Produzenten waren hauptsächlich *Sorangium*-, *Cystobacter*- und *Archangium*-Stämme, aber auch bei *Polyangium* und neuerdings bei *Nannocystis*- und *Coralloccoccus*-Stämmen treten interessante Verbindungen auf. Die letzten beiden Gattungen waren bisher nicht sehr ergiebig, was insofern bedauerlich war, als wir von beiden um 1500 Stämme besitzen. Durch ein direktes Screening auf Apoptose-Inhibitoren wurden bei diesen Organismen einige neue Aktivitäten gefunden, die aber noch genauer charakterisiert werden müssen. Fertige Strukturen liegen vor von Chlotozil, einer extrem lipophilen chlorierten Verbindung aus einem *Sorangium*; den Cyrmeninen aus einer neuen *Cystobacter*-Art, die Hefen und Hyphenpilze hemmen sowie die Zellatmung blockieren; der Ferruginsäure aus einem anderen *Cystobacter*. Tichunal aus einem *Sorangium* ist bemerkenswert durch seinen Aufbau aus Isopren-Einheiten, was bei Bakterien selten vorkommt. Die Aurofurone kommen bei *Archangium* und *Stigmatella* vor. Aus der neuen Myxobakterienart *Byssophaga cruenta* wurde nach Cruentaren und Fulmenon noch eine dritte Verbindung, ein Peptolid isoliert. Aus *Nannocystis* wurden zwei Substanzen mit

ungewöhnlichen Strukturelementen erhalten, aus *Sorangium* ein neues Disorazol (Z), ein Pyrazin-Derivat und eine Myxalamid-Variante. Letztes ist insofern bemerkenswert, als Myxalamide bisher nur bei Stämmen der Unterordnung Cystobacterineae gefunden wurden, und wir mit Ausnahme von Pyrrolnitrin nie eine Überlappung der Sekundärstoffmuster der beiden Unterordnungen beobachtet haben. Bei einem *Cystobacter* wurde ein neues Rhizopodin entdeckt. In Bearbeitung ist unter anderem eine hochaktive antibakterielle Substanz aus einem neuen *Cystobacter*, eine Aktivität gegen Mycobacterium aus einem *Sorangium*, zwei Komplex I Inhibitoren aus *Polyangium*.

Wirkmechanismen

Für einige Myxobaktériensubstanzen konnten sehr interessante Wirkmechanismen nachgewiesen werden. Apicularen hemmt spezifisch die Wirbeltier-V-ATPase, ebenso Archazolid; beide Verbindungen zeigen in Zellkulturen ein identisches Schadbild, so dass man diesen Wirkmechanismus anscheinend daran erkennen kann (Abb. 1, A, B, C). Ratjadon blockiert wie das Leptomycin selektiv den CRM1-Proteintransporter, der für den Export aus dem Zellkern in das Cytoplasma verantwortlich ist. Die Substanz ist extrem toxisch: Der IC₅₀-Wert

in Zellkulturen liegt um 40 bis 100 pg/ml. Ratjadon führt in Zellkulturen zu einer starken Vergrößerung der Zellkerne, ein Effekt, der möglicherweise für diesen Wirkmechanismus typisch ist und erlauben würde, weitere solche Substanzen zu entdecken (Abb. 2). Disorazol erwies sich als Hemmstoff der Tubulin-Polymerisation und führt auch zu einer Depolymerisation existierender Mikrotubuli.

Weitere Aktivitäten

Die Biosynthese von Epothilon wurde mit biochemischen Methoden untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass das in anderen Labors aus Sequenzanalysen abgeleitete Syntheschema in die Irre führt. Details finden sich in zwei Publikationen (Gerth et al., 2000, 2001).

An Chemikalienfirmen wurden für wissenschaftliche Zwecke Stigmatellin und Myxothiazol abgegeben. Wir sind die einzige Quelle für diese wichtigen Forschungskemikalien. Hilfreich für die Produktion von Myxobaktériensubstanzen erwies sich die Beobachtung, dass viele Stämme bei 25° besser produzieren als bei 30°.

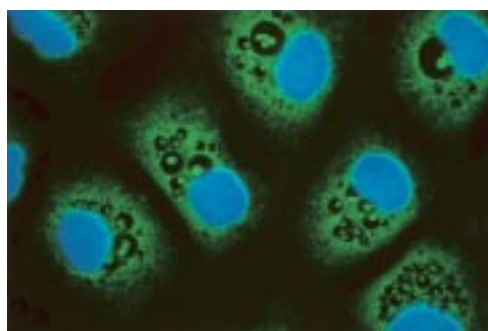
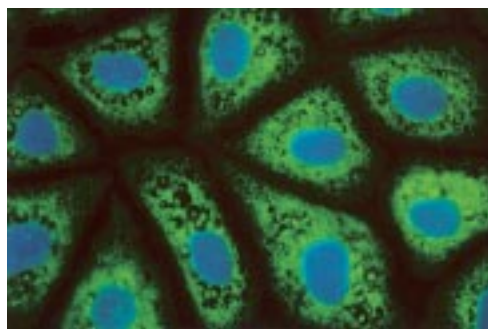
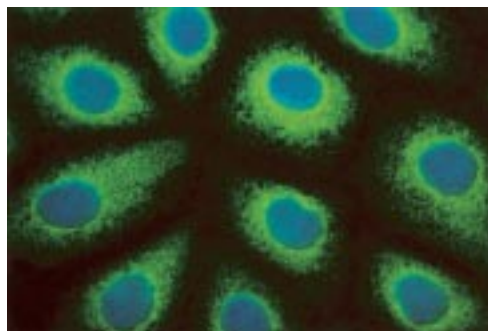


Abb. 1. A, B, C. Archazolid, eine Verbindung, die aus Myxobakterien isoliert wurde, führt bei Säugerzellen zu den gleichen Veränderungen wie Concanamycin, einem bekannten Inhibitor der V-ATPase. Nach Immunfluoreszenzfärbung von GRP-94, einem Markerprotein des Endoplasmatischen Reticulums, erkennt man in den behandelten Beuterrattenzellen Vesikel, die teilweise runde Schollen dieses Proteins enthalten. Die Zellkerne wurden mit einem DNA-Farbstoff blau gefärbt. Abb. 1, A: Kontrolle; Abb. 1, B: Archazolid; Abb. 1, C: Concanamycin

Fig. 1. A, B, C. The myxobacterial compound archazolid causes the same structural changes in mammalian cells as concanamycin known as an inhibitor of V-ATPase. In potaroo cells the marker protein of the endoplasmatic reticulum, GRP-94, was immunofluorescence stained. Vesicles, which sometimes contain clods of that protein, can be seen in treated cells but not in the control. The cell nuclei are stained blue with a DNA stain. Fig. 1, A: control; Fig. 1, B: archazolid treated; Fig. 1, C: concanamycin treated cells.

Biology and Chemistry of Microbial Bioactive Compounds (SP 3.1)

Biology of Bioactive Compounds

Over the past 12 months 600 strains of myxobacteria have been isolated for our screening. Beside tests using various types of bacteria, fungi and animal cell lines, enzyme and receptor tests were performed. The use of living cells has the advantage that interactions with thousands of enzymes and cell components can be seen at the same time. Culture extracts were further characterized by HPLC analyses allowing to isolate compounds that produced new peaks. All new compounds discovered by us were produced in sufficient quantities to be included in secondary screenings with industry partners. In several cases positive results led to further research

New compounds

Again we were able to isolate a series of new substances. The producers were mainly Sorangium, Cystobacter and Archangium strains, but also Polyangium and, since

recently, Nannocystis and Coralloccoccus strains yielded interesting compounds. The latter two genera were not particularly productive so far, which was regrettable because we have 1500 strains of each. In a

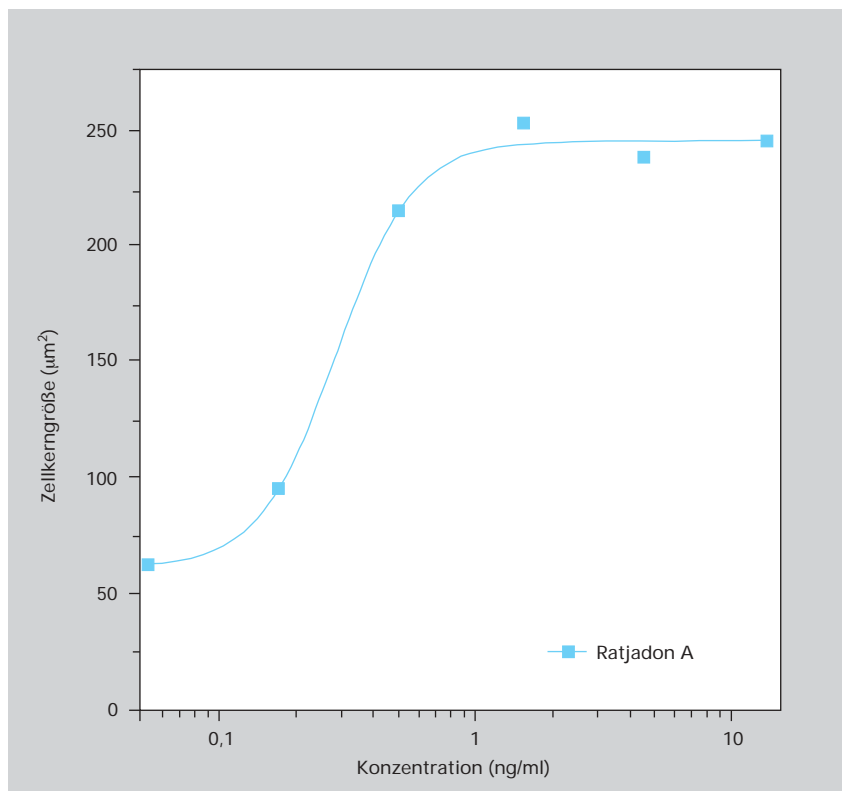


Abb. 2. Ratjadon induziert bei Säugerzellen eine Vergrößerung der Zellkerne. Mausfibroblasten (L929) wurden mit steigenden Konzentrationen von Ratjadon A inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und über eine digitale Bildauswertung vermessen.

Fig. 2. *Ratjadon* induces in mammalian cells an enlargement of the cell nuclei. Mouse fibroblast-like cells (L929) were incubated with increasing concentrations of *ratjadon* A. After fixation of the cells the nuclei were stained with DAPI and their size was determined by digital image analysis.

direct screening for inducers of apoptosis we found several new activities with those organisms, which, however, are still to be characterized. Established structures are available of chlotonil, an extremely lipophilic, chlorinated compound from a Sorangium strain; of the cyrmenins isolated from a new Cystobacter: they inhibit yeasts and hyphal fungi and interfere with cellular respiration; ferruginic acid from another Cystobacter strain. Tichunal, obtained from a Sorangium, is unusual by its composition of isoprene units, which is rare among bacteria. The aurofurons are found in Archangium and Stigmatella. In addition to cruentaren and holmenon, a third new compound, a peptolide, was isolated from one strain of the new myxobacterial species, Byssophaga cruenta. Two new substances with unusual structural elements were obtained from Nannocystis; a new disorazol (Z) from a Sorangium; a pyrazine compound and a new myxalamid, again from Sorangium. The latter case is of interest because myxalamids up to now were always found only in strains of the suborder Cystobacterineae and, with the exception of pyrrolnitrin, we never observed an overlap of the patterns of secondary metabolites between the suborders of myxobacteria. A new rhizopodin was discovered in a Cystobacter. Presently we work on a highly active anti-

bacterial substance from a new Cystobacter, an activity against Mycobacterium from a Sorangium, and two complex I inhibitors from a Polyangium.

Mechanisms of action

Very interesting mechanisms of action have been demonstrated for several myxobacterial compounds. *Apicularen* blocks specifically V-ATPase of vertebrates, as does *archazolid*. Both compounds lead in cell cultures to an identical damage (see Fig. 1, A, B, C), so that this mechanism of action appears to be reliably recognizable by this phenotype. *Ratjadon*, like *leptomycin*, blocks selectively the CRM1 transporter, which is responsible for the export of proteins from the nuclear space into the cytoplasm. The substance is extremely toxic, with IC_{50} values in cell cultures between 40 and 100 pg/ml. *Ratjadon* results in cell cultures in a substantial increase in size of the cell nucleus (Fig. 2), which effect is possibly typical for that mechanism of action and could allow to discover more compounds of that type. *Disorazol* is a new inhibitor of tubulin polymerisation and also results in depolymerisation of microtubuli.

Other activities

The biosynthesis of *epothilone* was investigated by biochemical methods. It was found that the scheme of synthesis derived by other people from sequence analyses of the gene was erroneous. Details can be found in two publications (Gerth et al., 2000, 2001).

Stigmatellin and *myxothiazol* were produced for scientific purposes and supplied to drug companies. We are the only source for those important research tools. The observation that many myxobacterial strains synthesize secondary metabolites better at 25° C than at 30° may be helpful for production processes.

Publications | Veröffentlichungen

Gerth K, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H (2000) Studies on the biosynthesis of *epothilones*. The biosynthetic origin of the carbon skeleton. *J Antibiot* 53:1373-1377.

Gerth K, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H (2001) Studies on the biosynthesis of *epothilones*. The PKS and *epothilone* C/D monooxygenase. *J Antibiot* 54:144-148.

Chemie mikrobieller Wirkstoffe

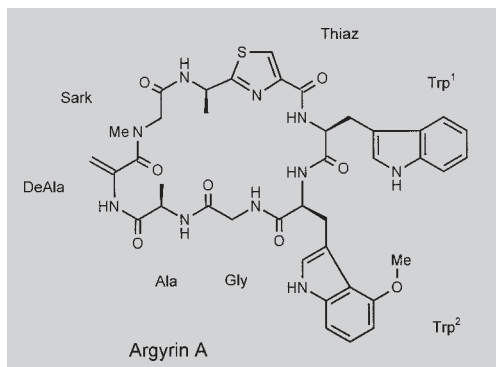
Projektleiter | *Project leader*: Prof. Dr. G. Höfle | Abt. Naturstoffbiologie | *Dept. of Natural Product Biology*

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

Die chemische Bearbeitung mikrobieller Wirkstoffe konzentrierte sich im Berichtsjahr 2000/2001 auf die Tubulinhemmstoffe, Epothilon und Tubulysin, die Fungizide vom Melithiazoltyp und die immunsuppressiv wirkenden Argyrine. Von den aus Myxobakterien neu isolierten Substanzen konnten sieben in der Struktur aufgeklärt werden. Cyrmenin, Haprolid, Pyrronazol und Salidien stellen neue Grundstrukturen dar, die Pyrazinone aus So ce1052, die Aurafurone und Cyferinsäure neue Strukturvarianten bereits bekannter Naturstoffe.

Argyrine

Die im GBF-Jahresbericht 1996 erstmals beschriebenen Argyrine wurden kürzlich als Immunmodulatoren erkannt. Dies veranlaßte uns, Struktur, Stereochemie und chemische Reaktivität dieser cyclischen Heptapeptide eingehender zu untersuchen. Hochaufgelöste C,H-korrelierte NMR-Spektren, sowie Partialhydrolyse und MS/MS-Sequenzierung ergaben übereinstimmend, daß Methoxytryptophan in der Sequenz der Aminosäuren bisher falsch angeordnet war. Bei

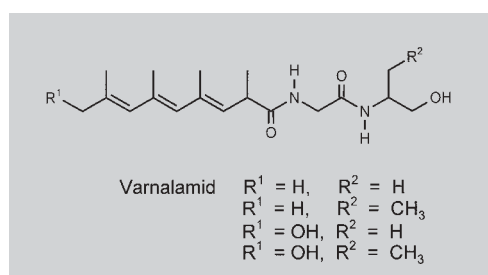


der Ozonolyse der Argyrine und anschließenden Totalhydrolyse wurden die beiden Tryptophanbausteine und die Aminoethylthiazolcarbonsäure zu Asparaginsäure bzw. Alanin abgebaut, so daß ihre Konfiguration durch GC-Analyse leicht ermittelt werden konnte. Nach NMR-Untersuchungen nimmt Argyrin A eine bevorzugte Lösungskonformation ein, in der die NH-Protonen von Ala, Trp und Thiaz stabil in Wasserstoffbrücken eingebunden und die beiden Indolreste gestapelt angeordnet sind. Neben den

bereits früher isolierten Hauptkomponenten Argyrin A und B wurden in größeren Fermenteransätzen auch Strukturvarianten gefunden, die an C-6 des Thiazolbausteins statt einer Methylgruppe Wasserstoff oder eine Hydroxymethylgruppe tragen, denen die Methoxygruppe im Tryptophan fehlt oder die eine zusätzliche Methylgruppe im angrenzenden Pyrrolring tragen. Die Derivatisierung der Argyrine mit nukleophilen und elektrophilen Reagenzien greift erwartungsgemäß am Dehydroalanin bzw. Methoxytryptophan an.

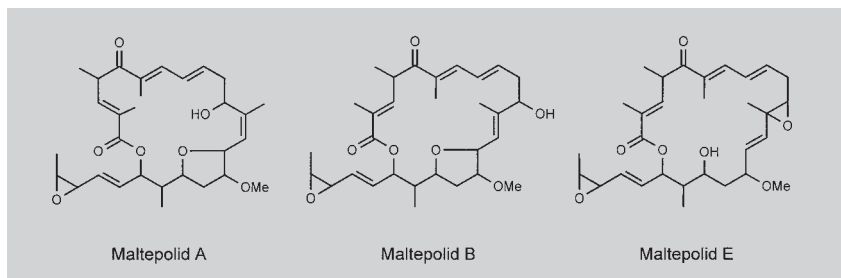
Varnalamide

Aus dem Archangium Stamm Ar 3468 wurden zwei Haupt- und zwei Nebenmetabolite isoliert, die aus biogenetischer Sicht aus einem N-Acyldipeptid hervorgehen. Während die Hauptkomponenten A und B Alaninol bzw. 2-Aminobutanol am Carboxyterminus tragen, ist bei C und D in einer offenbar nachgeschalteten Reaktion die endständige Methylgruppe hydroxyliert worden. Totalhydrolyse und GC-Analyse ergab für beide Aminoalkoholbausteine (*S*)-Konfiguration.



Maltepolide

Die Maltepolide A - E bilden eine aus dem *Sorangium cellulosum* Stamm So ce1485 isolierte Gruppe von 20-gliedrigen Makroliden. Sie werden abhängig von den Kulturbedingungen in unterschiedlichen Verhältnissen gebildet. Biogenetischer



Vorläufer für alle Maltepolide scheint das Bisepoxid E zu sein, das zum Hauptprodukt wird, wenn bei der Kultivierung und Isolierung schwach basische Bedingungen eingehalten werden. Bei der Kultivierung des Organismus bei pH 6,5 wird das C-11,C-12 Epoxid durch eine intramolekulare vinyloge Addition der 17-OH Gruppe geöffnet, wobei als Hauptprodukte Maltepolid A und B entstehen.

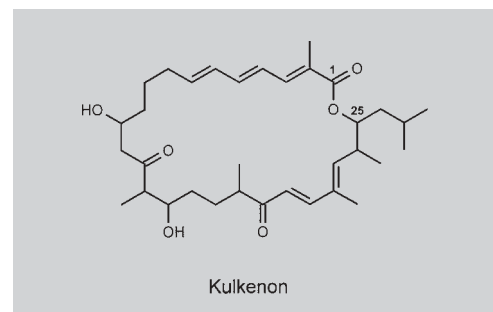
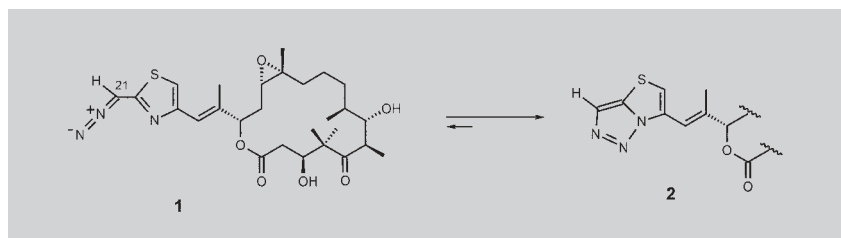
Epothilonderivate

Bei der semisynthetischen Abwandlung der Epothilone haben wir uns in den vergangenen Jahren zunehmend auf die Thiazolseitenkette konzentriert, in der eine Vielzahl von funktionellen Gruppen ohne Aktivitätsverlust toleriert wird. Neben einer Verbesserung der pharma-

kologischen Eigenschaften, strebten wir auch Derivate als Sonden für biochemische Untersuchungen, z. B. zur Photoaffinitätsmarkierung der Tubulinbindestelle an. Da die üblichen photoreaktiven Gruppen einen zu hohen Raumanpruch haben, mußten wir den bereits vorhandenen Thiazolring zum Aufbau eines geeigneten Chromophors heranziehen. Ausgehend von Epothilon B konnten wir in fünf Stufen über Epothilon F das 21-Aldehydhydrazon erhalten. Dieses ergibt bei der Oxidation mit Nickelperoxid 21-Diazoepothilon B (**1**), das zum Teil zum tautomereren Triazolothiazol **2** cyclisiert. Das Gleichgewichtsgemisch der beiden Verbindungen besitzt eine hohe cytotoxische Aktivität, mit λ_{\max} 285 nm einen ausreichend langwelligen UV-Chromophor und zerfällt beim Belichten vermutlich über das C-21 Carben.

Kulkenon

Aus dem *Sorangium cellulosum* Stamm So ce1426 wurde eine mäßig toxische, Kulkenon genannte Substanz isoliert und als neuartiges 26-gliedriges Makrolid identifiziert. Nach Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -angereicherten Vorläufern wird das Polyketid aus 7-Acetat- und 5-Propionateinheiten und einem vermutlich aus dem Leucinabbau stammenden 3-Methylbutyrat-Starter aufgebaut. Bemerkenswert ist, daß C-25 in diesem Starter auch signifikant durch $[1,2-^{13}\text{C}]_2$ Acetat angereichert wird.



Chemistry of Bioactive Compounds from Microorganisms

In the research period 2000/2001, work focused on the chemistry of the tubulin inhibitors, epothilone and tubulysin, the fungicides of the melithiazol type and the immunosuppressively acting argyrins. In addition, we isolated and elucidated the structure of seven groups of secondary metabolites from new strains of myxobacteria. Cyrmenin, haprolid, pyrroazol and salidien represent new basic structures, whereas the pyrazinones from *So ce1052*, the aurafurones and cyferinic acids are new structural variations of already known natural products.

Argyrins

The argyrins described for the first time in the GBF Annual Report 1996 have recently been identified as immunomodulators. This induced us to investigate the structure, stereochemistry and chemical reactivity of these cyclic heptapeptides more thoroughly. High-resolution C,H-correlated NMR spectra as well as partial hydrolysis and MS/MS sequencing unanimously showed that methoxytryptophane has been wrongly arranged in the sequence of the amino acids in the past. In the ozonolysis of the argyrins and subsequent total hydrolysis, the two tryptophane building blocks and the aminoethyl thiazole carboxylic acid are degraded to aspartic acid and alanine, so that their configuration was easily determined by GC analysis. According to NMR investigations, argyrimin A prefers a solution conformation in which the NH protons of Ala, Trp and Thiaz are stably incorporated into hydrogen bonds and the two indole residues are stacked. In addition to the major components, argyrimin A and B, already isolated earlier, structural variations were also found in larger fermenter batches, which carry hydrogen or a hydroxymethyl group instead of a methyl group at C-6 of the thiazole building block. Others lack the methoxy group in the tryptophane or carry an additional methyl group in the pyrrole ring of tryptophane. As expected, the derivatization of the argyrins with nucleophilic and electrophilic reagents attacks preferentially the dehydroaniline and methoxytryptophane residues.

Varnalamides

From the *Archangium* strain 3468 two major and two minor metabolites were isolated which, from biogenetic considerations, originate from an N-acyl dipeptide. Whereas the major components A and B carry alaninol and 2-aminobutanol at the carboxy terminus, respectively, the terminal methyl group has been hydroxylated in C and D in an obviously

subsequent step. Total hydrolysis and GC analysis proved (S) configuration for both amino alcohol building blocks.

Maltepolides

The maltepolides A-E form a group of 20-membered macrolides isolated from the *Sorangium cellulosum* strain *So ce1485*. They are formed in different proportions depending on the culture conditions. The biogenetic precursor of all maltepolides seems to be bisepoxide E, which is predominantly found when weakly basic conditions are maintained during cultivation and isolation. Cultivating the organism at pH 6.5, induced ring opening of the C-11, C-12 epoxide by an intramolecular vinylogous addition of the 17-OH group producing maltepolide A and B as the main product.

Epothilone Derivatives

In the semi-synthetic modification of the epothilones, we have increasingly concentrated on the thiazole side chain in the past few years, in which a large number of functional groups are tolerated without loss of activity. Apart from an improvement of the pharmacological properties we also aimed at derivatives as probes for biochemical investigations, e.g. for photoaffinity labelling of the tubulin binding site. Since the usual photoreactive groups require too much space, we had to use the already existing thiazole ring for construction of a suitable chromophore. Starting from epothilone B, we obtained the 21-aldehyde hydrazone in five steps via epothilone F. Oxidation of the hydrazone with nickel peroxide, produced 21-diazoepothilone B (1), which cyclizes into tautomeric triazolothiazol (2). The equilibrium mixture of the two compounds shows high cytotoxic activity, a sufficiently long-wave UV chromophore of λ_{\max} 285 nm, and is degraded on irradiation presumably through the C-21 carbene.

Kulkenon

From the Sorangium cellulosum strain So ce1426 a moderately toxic substance named kulkenon was isolated and identified as a novel 26-membered macrolide. After feeding experiments with ¹³C-enriched precursors, the polyketide is constructed of 7 acetate and 5 propionate units and an isobutyrate starter presumably originating from leucine degradation. It is also remarkable to note that C-25 in this starter unit is significantly enriched by [1,2-¹³C₂]acetate.

Publications | Veröffentlichungen

Jansen R, Kunze B, Reichenbach H, Höfle G (2000) Antibiotics from Gliding Bacteria LXXXVI, Apicularen A and B, Cytotoxic 10-membered Lactones with a Novel Mechanism of Action from Chondromyces Species (Myxobacteria): Isolation, Structure Elucidation, and Biosynthesis. Eur J Org Chem 6:913-919.

Hardt IH, Steinmetz H, Gerth K, Sasse F, Reichenbach H, Höfle G (2001) New Natural Epothilones from Sorangium cellulosum, Strains So ce90/B2 and So ce90/D13: Isolation, Structure Elucidation, SAR-Studies. J Nat Prod 64:847-856.

Kombinatorische Molekülrepertoires (SP 3.2)

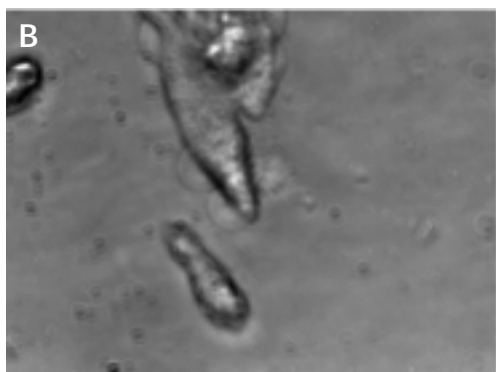
Projektleiter | *Project leader*: Dr. R. Frank | Arb.Gr. Molekulare Erkennung | *Res. Group Molecular Recognition*

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



Ein neuentwickelter hochspezifischer Inhibitor für das Enzym cGPK ist aktiv *in vivo*

Der in der letzten Ausgabe vorgestellte peptidische membrangängige Inhibitor für die cyclo-GMP-abhängige Proteinkinase I^α (cGPK) wurde jetzt für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung dieses wichtigen Enzyms eingesetzt. Das inhibitorische Peptid unterdrückt zum Beispiel die durch cGPK bewirkte Relaxation von glatten Muskelzellen, die aus der Harnblasenwand einer Ratte präpariert wurden.



Entwicklung neuer Hochdurchsatz-Methoden zur Bestimmung genomischer Methylierungsmuster

Die AG Molekulare Erkennung ist Partner in einem mit 5,3 Mio. DM vom BMBF geförderten Verbundprojekt mit der Firma Epigenomics AG. In diesem Projekt soll eine neue diagnostische Methode

entwickelt werden, mit der das individuell spezifische Muster von Methylcytosinen (der „fünften DNA-Base“) kompletter humaner Genome erfasst, dokumentiert und interpretiert werden kann. Ein internationales Konsortium, the Human Epigenome Consortium, hat bereits begonnen die Methylierungsmuster von DNA aus gesunden Gewebeproben zu bestimmen. Wir werden unsere Erfahrungen in der miniaturisierten parallelen chemischen Synthese einbringen. Insbesondere wird ein neuentwickeltes, das CompactDisc-Format nutzendes Synthesegerät (s. Abb. 2) eingesetzt werden. Damit sollen systematische Anordnungen (Arrays) von so genannten Fänger-molekülen auf Basis von PNA (Polyamid-Nucleinsäure) für den Analyseprozess zur Verfügung gestellt werden.

Neue Nachwuchsgruppe „Konformationelle Protein-Ligand-Interaktionen“

Protein-Ligand-Interaktionen sind die molekulare Grundlage praktisch aller biologischen Prozesse. Das Design und die Herstellung synthetischer Moleküle, die aufgrund ihrer molekularen Architektur in der Lage sind, konformationell definierte Proteinbindungsstellen nachzuahmen, ist eine aussichtsreiche Strategie für die Erforschung von Proteinstruktur und -funktion. Mit diesem Projektkonzept hat Frau Dr. Jutta Eichler den Zuschlag für eine der begehrten Biofutur-Förderungen erhalten. Seit 1. Juli 2001 wird dieses Projekt im Rahmen einer eigenständigen Nachwuchsgruppe an der GBF durchgeführt.

Neben der grundlegenden Bedeutung für das Verständnis von Protein-Ligand-Interaktionen sind die konzipierten synthetischen Proteinmimetika auch Kandidaten für neue therapeutische und diagnostische Strategien und andere biomedizinische Anwendungen.

Abb.1. Peptid-induzierte Kontraktion einer glatten Muskelzelle: vor (A) und 30 sec nach (B) Zugabe des Peptids.

Fig.1. Peptide-induced contraction of a smooth muscle cell: prior to (A) and 30 sec after (B) addition of the peptide

Combinatorial Molecular Repertoires (SP 3.2)

A novel highly specific peptidic inhibitor for the enzyme cGPK is active in vivo

The last report presented a newly developed membrane-permeable peptide which inhibits highly specifically the cyclo-GMP dependant protein kinase I" (cGPK). This inhibitory peptide was now utilized for the investigation of the physiological role of this important enzyme. As shown in Figure 1, the peptide can suppress the relaxation effect mediated by the cGPK in smooth muscle cells from rat urinary bladder, resulting in a rapid cell contraction.

Development of a new high-throughput technology for mapping genomic methylation patterns

GBF's research group for Molecular Recognition is a partner in a new joint project together with the company Epigenomics AG, funded with about 5.3 Mio. DM by the German ministry for science and education (BMBF). The project's aim is to develop a novel medical diagnostic method which will enable to detect, document and interpret the individual patterns of methylated cytosines („DNA's fifth base“) of complete human genomes. An international consortium of high-ranking scientists, the Human Epigenome Consortium, has already started to reveal the methylation patterns of DNA from healthy tissues. To this project we will contribute our expertise in the miniaturized parallel chemical synthesis. In particular, a newly developed synthesizer will be utilized to provide CompactDisc-formatted arrays of so called capture molecules based on PNA (polyamide nucleic acids) (Fig. 2.).

Abb. 2. CD-Scheibe mit 2500 kleinen Reaktionstropfen für die parallele chemische Synthese.

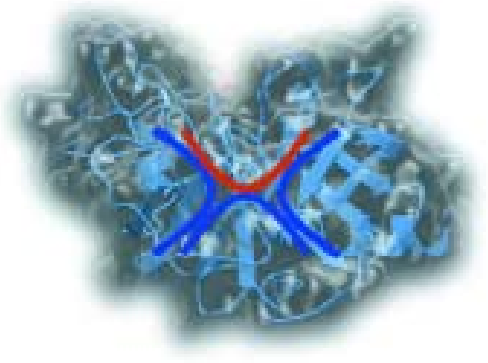
Fig. 2. CD-body with 2500 small droplets for the parallel chemical synthesis.



New junior research group for „Conformationally defined Protein-Ligand-Interactions“

Protein-ligand interactions are the molecular basis for almost all biological processes in living cells and organisms. Many of these interactions involve binding sites that are defined by the three dimensional structure of the folded protein chain. The design and preparation of synthetic molecules that are able to mimic such conformationally defined protein binding sites through their special architecture is a promising strategy for the investigation of protein structure and function. For this project concept, Dr. Jutta Eichler recently received one of the very prestigious and well funded Biofuture awards. Since 1st of July 2001, this project is the topic of an independent junior research group.

Besides the importance for the basic understanding of protein-ligand interactions, the conceptual synthetic protein mimics are valuable candidates for the development of new diagnostic and therapeutic principles as well as for other biomedical applications.



Publications | Veröffentlichungen

Dostmann WRG, Taylor MS, Nickl CK, Brayden JE, Frank R, Tegge WJ (2000)

Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP- dependent protein kinase I alpha inhibit NO-induced cerebral dilation. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14772-14777.

Hawlich H, Müller M, Frank R, Bautsch W, Klos A, Köhl J ((2001) Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. Anal Biochem 293:142-145.

Molekularbiologie der Sekundärstoffbildung in Myxobakterien (SP 3.3)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: H. Blöcker, N. Gaitatzis, A. Hans, J. Knauber, B. Kunze, G. Nordsiek, A. Sandmann, B. Silakowski, S. Weinig

Myxobakterien wurden an der GBF bereits über Jahre als effiziente Quelle für Naturstoffe mit biologischer Aktivität etabliert. Darüber hinaus weist diese Bakteriengruppe einen komplexen Lebenszyklus auf und besitzt eine Reihe von Eigenschaften, die sonst nur vielzelligen Organismen zugeschrieben werden. Wir befassen uns mit der Molekularbiologie der Naturstoffbiosynthese sowie deren Regulation. Ferner stellt sich die Frage der Funktion solcher Sekundärstoffe innerhalb des Lebenszyklus von Myxobakterien. Diese Substanzen spielen wahrscheinlich nicht nur als „biologische Abwehrstoffe“, sondern auch bei der Aufnahme von Spurenelementen und wahrscheinlich auch bei Kommunikationsprozessen eine Rolle. Durch ein Genomprojekt soll die Grundlage gelegt werden, um diese komplexen Netzwerke untersuchen zu können. Als Modellorganismus wurde dafür der Stamm *Sorangium cellulosum* So ce56 ausgewählt.

Werkzeuge für die Untersuchung des Sekundärstoffwechsels

Mittlerweile konnten 8 potenzielle Biosyntheseengcluster für Sekundärstoffe in dem Genom von *S. cellulosum* So ce90 identifiziert werden. Offensichtlich schöpft dieser Stamm nicht sein komplettes Potenzial zur Bildung von Sekundärstoffen aus, denn bisher sind nur zwei Substanzgruppen, die Epothilone und die Spirangiene, beschrieben worden. Um die nicht exprimierten Sekundärstoffbiosyntheseengcluster aus diesem Stamm sowie aus anderen Myxobakterien auf ihre Funktionalität hin überprüfen zu können, werden zur Zeit heterologe Systeme für die Expression von Stoffwechselwegen in verschiedenen Wirtsstämmen entwickelt. Zum Beispiel lassen sich mit Hilfe einer von uns aus *Stigmatella aurantiaca* klonierten Phosphopantetheinyltransferase (MtaA) typische Sekundärstoffwechselenzyme wie Polyketidsynthasen (PKS) und Polypeptidsynthetasen (NRPS) posttranslational in ihre entsprechenden Holo-Formen überführen. Auf diese Weise können PKSs und NRPSs verschiedenen Ursprungs auch in *E. coli* in enzymatisch aktiver Form exprimiert werden. Darüber hinaus wurde *St. aurantiaca* DW4/3-1 genetisch so verändert, dass das Einkreuzen von Fremdgenen mit Hilfe gängiger Plasmidvektoren einfacher vonstatten

geht. Dieser Stamm wird nun u. a. für Promotorstudien und für die Überprüfung neuer Resistenzgenkassetten für Myxobakterien eingesetzt.

Molekulare Grundlagen des Eisentransports in Myxobakterien

Die Verfügbarkeit von Eisen ist für verschiedene Stoffwechselprozesse in Mikroorganismen essentiell. Deshalb produzieren sie sogenannte Eisenchelatoren, die als niedermolekulare Substanzen ausgeschieden werden, hochspezifisch extrazelluläres Eisen (Fe^{3+}) binden und dann als Komplex aktiv wieder in die Zelle aufgenommen werden. Die Biogenesen von Eisenchelatoren werden häufig von typischen Sekundärstoffenzymen (PKS und/oder NRPS) bewerkstelligt. Während unseres genetischen Screenings auf solche Enzyme in *St. aurantiaca* fanden wir ein hypothetisches Eisentransport-Regulon. Anhand des Aufbaus der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Enzyme konnte ein Strukturvorschlag für das dazugehörige Biosyntheseprodukt vorgenommen werden. So wurde angenommen, dass dieses Regulon für die Synthese eines Siderophors vom Catecholtyp, wie z. B. Myxochelin, verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde nachfolgend in Kooperation mit der AG Höfle bestätigt. Mutanten des zugehörigen

Biosynthese-Regulons verlieren die Fähigkeit, Myxochelin zu produzieren und müssen mit Eisen supplementiert werden. Von besonderem Interesse bei der Biosynthese dieser Substanz ist hier ein neuer, reduktiver Mechanismus zur Abtrennung des Syntheseprodukts vom Enzym MxcG. Zur biochemischen Charakterisierung der dafür verantwortlichen Enzymdomäne wurde der aus insgesamt sieben Modulen bestehende Myxochelin-Synthetase-Multienzymkomplex zusammen mit MtaA heterolog in *E. coli* exprimiert. Aktivitätstests zeigten, dass die drei Proteine MxcEFG ausreichend sind, um auch *in vitro* diese aufwendige Mehrstufensynthese auszuführen.

Biosynthese des Elektronentransport-Inhibitors Myxalamid

Eine ähnliche Reduktionsdomäne wie in MxcG fanden wir in der Hybrid-PKS/NRPS, die für die Biosynthese der Myxalamide verantwortlich ist. Dieses System repräsentiert eine der wenigen bislang charakterisierten Biogenesen, bei denen PKS und NRPS eng miteinander wechselwirken müssen. Es stellt damit einen idealen Kandidaten zum Studium der Interaktion zwischen diesen beiden Proteintypen dar. Zudem werden für den Start der Biosynthese ungewöhnliche Bausteine verwendet. Die dafür verantwortlichen Enzymdomänen bzw. Gene werden nun für kombinatorische Ansätze mit Genen aus Actinomyceten verwendet.

Molecular Biology of Secondary Metabolites in Myxobacteria (SP 3.3)

Myxobacteria have been established as a valuable source for natural products with biological activity at the GBF. In addition, these bacteria are characterised by a very complex life cycle and resemble multicellular organisms. We are working on the molecular biology of natural product biosynthesis and its regulation. In many cases, the function of secondary metabolites in their natural context remains obscure. Some are obviously used as „biological protecting agents“, others are needed for the uptake of essential nutrients. They might even play a role in communication processes. A genome project has been started in the middle of 2001 in order to lay the groundwork to study such complex regulatory networks, which connect the various cellular processes in myxobacteria. Sorangium cellulosum So ce56 is used as model organism.

Development of tools for the study of secondary metabolism

*Eight different biosynthetic gene clusters potentially encoding machineries for secondary metabolite formation have been found in the genome of *S. cellulosum* So ce90. Obviously, this strain does not use its complete potential to produce natural products, because only two substance groups (spirangiens and ephthilons) have been described from *S. cellulosum* So ce90 so far. In order to test the functionality of non-expressed gene clusters, heterologous expression systems for different host strains are currently being developed. For example, the enzyme MtaA can be used to activate secondary metabolic enzymes like polyketide synthases (PKS) and non ribosomal polypeptide synthetases (NRPS) via phosphopantetheinyl transfer in *E. coli*. The corresponding gene *mtaA* was originally*

*cloned from *Stigmatella aurantiaca*. Additionally, *St. aurantiaca* DW4/3-1 was genetically altered in a way that facilitates the introduction of foreign genes via cross-over using standard cloning plasmids. The generated strain is now being used for promoter activity studies and to test new resistance markers for myxobacteria.*

Molecular basis of iron transport in Myxobacteria

The availability of iron is essential for a number of biochemical processes in microorganisms. The need to secure a constant iron supply makes the cells produce so called iron chelators. These are low molecular mass substances, which are secreted and specifically bind extracellular iron. The chelator-Fe³⁺ complex is then actively transported back into the cell. The biosynthesis of iron chelators is

often achieved by proteins typical for secondary metabolism (PKS; NRPS). During our genetic screening for such systems in *St. aurantiaca*, we isolated a hypothetical iron transport regulon, which was analysed bioinformatically resulting in a molecule structure prediction for the chelator.

Subsequently, the predicted myxochelin-type iron chelator was identified from this strain in a collaboration with Drs. Kunze (NBI) and Höfle (NCH). Mutants of the gene cluster cannot produce myxochelins and have to be fed with iron or myxochelin in order to grow under iron limiting conditions. A new type of reductive chain release from the NRPS involved is of special interest, because it seems to be a general mechanism used in PKS and NRPS. In order to biochemically characterise the responsible domain within the myxochelin-megasynthetase, the complete complex, comprising seven active domains, was heterologously co-expressed with MtaA in *E. coli* (see above). Activity assays show that the three proteins MxcEFG alone are sufficient to produce myxochelin in vitro.

Biosynthesis of the electron transport inhibitor myxalamid

A comparable chain release mechanism is performed during the biogenesis of the myxalamids. A reduction domain similar to the one in MxcG was identified in the hybrid PKS/NRPS responsible for myxalamid biosynthesis. The system is one of the few examples known to date, in which PKS and NRPS interact to form a natural product, which makes it an ideal candidate to study communication between both protein types. In addition, unusual starter units are used for myxalamid biosynthesis, which are currently under investigation for combinatorial biosynthesis with genes from actinomycetes.

Publications | Veröffentlichungen

Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G, Müller R (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem* 267:6476-6485.

Gaitatzis N, Hans A, Müller R, Beyer S. (2001) The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem* 129:119-124.

Silakowski B, Nordsiek G, Kunze B, Blöcker H, Müller R (2001) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Chem Biol* 8:59-69.



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 Habitaten 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. Biodegradation | *Res. Group of Biodegradation*

Projektmitarbeiter | *Project members*: H.-A. Arfmann, H. Görres, I. Hinner, B. Hofer, P. Nikodem, K. Pollmann, P. Rapp, P. Rosenbrock, C. Strömpl,

Ziel des Projektes ist die Aufklärung metabolischer Wege und Netzwerke und somit der mikrobiellen Diversität zum Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe. Das Verständnis mikrobieller Fähigkeiten auf molekularer Ebene erlaubt die Identifizierung und experimentelle Überwindung von Engpässen des Abbaus und die Entwicklung molekularer Werkzeuge zur Bestimmung von metabolischem Potential und Aktivität *in situ* (Pieper und Reineke, 2000).

Abbau von polychlorierten Biphenylen (PCBs)

Biphenyldioxygenasen (BDOs) sind Schlüsselenzyme des aeroben PCB-Abbaus. Wir konnten zeigen, dass die BDO aus *Burkholderia* sp. LB400 verschiedene 2,2'-substituierte Biphenyle (Fluor-, Chlor-, Brom-, Nitro-, Hydroxy-) bevorzugt in den Positionen 2 und 3 angreift, welches zur Eliminierung jeweils eines dieser Substituenten führt (Seeger et al., 2001). Der elektronenziehende Effekt dieser Substituenten scheint die Dioxygenierung zu begünstigen, was für einen nucleophilen Charakter des Angriffs spricht. Die Ergebnisse stützen ferner die Ansicht, dass die Oxidationen von Phenolen durch aromatische Ringe hydroxylierende Dioxygenasen nicht das Resultat einer Mono-, sondern einer Dioxygenierung sind. Ein von 2,2'-Dihydroxybiphenyl ableitbares Derivat stellt Dibenzofuran dar. Die anguläre Dioxygenierung von Dibenzofuran, die zum weiteren Abbau dieses Schadstoffes führt, entspräche dem bei 2,2'-Dihydroxybiphenyl gefundenen 2,3-Angriff. Tatsächlich werden Dibenzofuran sowie auch Dibenzodioxin von dieser BDO analog angegriffen. Dies zeigt, dass auch einige Biphenyl Dioxygenasen zur angulären Dioxygenierung fähig sind.

Abbau geringer Schadstoffkonzentrationen

Schadstoffe sind in der Umwelt oft in geringen aber ökologisch relevanten Konzentrationen vorhanden, und es wurde beschrieben, dass sogenannte Grenzkonzentrationen vorhanden sind, unterhalb derer oft kein mikrobieller Abbau erfolgt. Wir charakterisierten nun detailliert den Abbau geringer Konzentrationen an 1,2,4-Trichlorbenzol durch *Burkholderia* sp. PS14, ein Stamm, der sogar nanomolare Konzentrationen dieses Stoffes ohne signifikante Restkonzentration verstoffwechseln kann. Bei so geringen Konzentrationen an 1,2,4-Trichlorbenzol wurde eine Beziehung 1. Ordnung zwischen der Umsatzrate und der Substratkonzentration mit einer spezifischen Affinität von 0,32 l pro mg bakterieller Trockenmasse und Stunde beobachtet. Bei höheren Substratkonzentrationen wurde eine Beziehung erster Ordnung mit höherer Affinität ermittelt. Dieses lässt vermuten, dass *Burkholderia* sp. PS14 zwei unterschiedliche Aufnahme- oder Transformationsysteme für Chlorbenzole besitzt (Rapp, im Druck).

Metabolische Netzwerke in Chloraromaten abbauenden Mikroorganismen

Es wird generell angenommen, dass der mikrobielle Abbau von Chloraromaten durch lineare Abbauwege erfolgt und nur wenige speziell angepasste katabolische Operons für das Einschleusen dieser Verbindungen in zentrale Stoffwechselwege verantwortlich sind. Neue Untersuchungen des pJP4-Plasmides des Chloraromaten verstoffwechselnden Stammes *Ralstonia eutropha* JMP134 zeigten, dass neben den dokumentierten Genen zum Abbau zentraler Chlorbrenzcatechine (*tfd* Modul I), auf diesem Plasmid ein zweites Set entsprechender Gene lokalisiert ist (*tfd* Modul II). Die von uns entwickelten Derivate von JMP 134, die sich in der vorhandenen Anzahl an Modulen unterscheiden, wiesen deutlich verschiedene Phänotypen auf und differierten sogar im Spektrum an mineralisierbaren Substraten (Perez-Pantoja et al., 2000). Dieses verdeutlicht, dass für unterschiedlich substituierte Chloraromaten verschiedene „Gendosierungen“ notwendig sind. Bei Lokalisierung auf einem multi-copy Plasmid führte sowohl die Übertragung des Moduls I als auch des Moduls II in geeigneten Empfängerstämmen zu 3-Chlorbenzoat mineralisierenden Derivaten. Allerdings unterschieden sich, aufgrund der verschiedenen kinetischen Parameter der kodierten Schlüsselenzyme, die Derivate signifikant hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit und Ausbeute. Die Akkumulation von Zwischenprodukten bewirkt die zusätzliche Induktion chromosomal lokalisierter Gene des Aromatenstoffwechsels, so dass die Mineralisierung eines Teils des Substrates durch ein Wechselspiel zwischen plasmid- und chromosomal kodierten Enzymen erfolgt. Dieses zeigt, dass ein komplexes metabolisches Netzwerk für die Mineralisierung von Chloraromaten in *R. eutropha* JMP 134 verantwortlich ist.

Biofilme in Abwässerkanälen der Kaffeeproduktion

In Zusammenarbeit mit dem Colegio de la Frontera Sur, Mexico, untersuchten wir die am *in situ* Abbau des Abwassers der Kaffeeproduktion beteiligte mikrobielle Gemeinschaft. Hierzu wurden Proben des sich in den Abwässerkanälen entwickelnden Biofilms entnommen und Mikroorganismen, die zentrale Komponenten des Abwasser abbauen können, isoliert. Repräsentative Abbauer, von denen einige bisher unbeschriebene katabolische Fähigkeiten aufweisen, wurden durch Sequenzierung der 16S rRNA Gene und „fingerprinting“ (T-RFLP) charakterisiert. Nahezu alle Chlorogenat abbauenden Organismen gehörten zum Genus *Acinetobacter*, und die meisten Protocatechuat- und Gallat-Abbauer zum Genus *Klebsiella*. Von beiden Genera ist bekannt, dass sie pathogene Organismen beinhalten. T-RFLP-Analyse der direkt aus dem Biofilm extrahierten 16S-rDNA zeigte, dass mit Klebsiellen verwandte Stämme generell in Biofilmen, die von verschiedenen mit Abfall der Kaffeeproduktion belasteten Standorten gewonnen wurden, dominant sind. Die unkontrollierte Entwicklung solcher Biofilme kann somit als Quelle potentiell pathogener Mikroorganismen betrachtet werden.



Abb. 1. Abwasserkanal, der sowohl das Abwasser aus der Separation der Kaffeebohnen von der Schale als auch Fermentationsabwasser erhält. Ein mehrere Zentimeter dicker Biofilm, der Hefen und Bakterien enthält, ist zu erkennen.

Fig. 1. Wastewater channel receiving both depulping and fermentation waste water during processing of coffee beans. A biofilm, a few centimeters thick and consisting of yeasts and bacteria, is visible.

Biodegradation of organic pollutants (SP 4.1)

The goal of the project is to elucidate metabolic pathways and networks and thus the microbial diversity for the degradation of aromatic hydrocarbons. Understanding microbial capabilities at the molecular level allows identification and experimental alleviation of bottlenecks and the development of molecular tools to assess metabolic activities and potential in situ (Pieper and Reineke, 2000).

Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs)

Biphenyl dioxygenases (BDOs) are key enzymes of the aerobic degradation of PCBs. We have shown that the BDO of Burkholderia sp. LB400 attacks various 2,2'-substituted biphenyls (fluoro-, chloro-, bromo-, nitro-, hydroxy-) preferentially at C-2 and C-3 (Seeger et al., 2001). This unusual attack results in unstable intermediates, which spontaneously rearomatize with concomitant elimination of the substituent. Obviously, the electron withdrawing effect of the substituents favours this kind of dioxygenation, supporting the notion of a nucleophilic dioxygenation mechanism. The results further indicate that the oxidation of phenols by dioxygenases is actually the result of a di- rather than a monooxygenation. The angular dioxygenation of dibenzofuran can be regarded to be similar to the dioxygenolytic attack at an unsubstituted and a hydroxysubstituted neighbored carbon atom. Indeed, we could prove angular attack at dibenzofuran and dibenzo-p-dioxin by LB400 BDO, showing that members of the biphenyl dioxygenases can perform such a reaction.

Degradation of low concentrations of pollutants

Pollutants in the environment are often present in low but ecologically relevant concentrations and often threshold concentrations, i.e. concentrations below which no degradation occurs, have been described. We analyzed in detail the kinetics of degradation of low concentrations of 1,2,4-trichlorobenzene by Burkholderia sp. PS14, a strain capable to transform even nanomolar concentrations of this pollutant. We could observe a first order relationship between transformation rate and the substrate concentration with a specific affinity of 0.32 l / mg (bacterial dry weight)/h at substrate concentrations in the nanomolar range. At higher substrate concentrations we observed a first order relationship with a higher specific affinity.

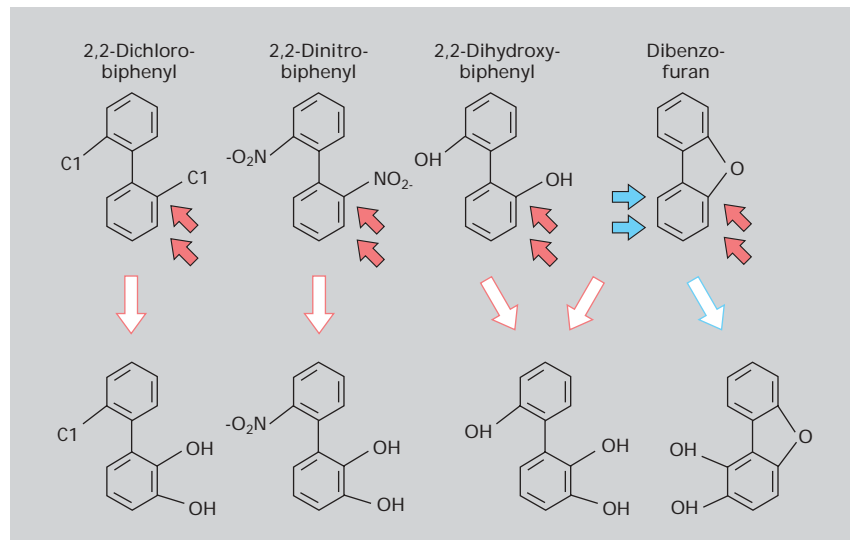
This indicates the presence of two different substrate uptake and/or transformation systems in Burkholderia sp. PS12 (Rapp, in press).

Metabolic networks in pure cultures of chloroaromatic degraders

Bacterial mineralization of chloroaromatics is usually assumed to be achieved by linear pathways where just a few adapted catabolic operons are responsible for channeling the substrate into the central Krebs cycle. Recent analysis of plasmid pJP4 of the chloroaromatic degrading Ralstonia eutropha JMP134 revealed, beside well described chlorocatechol genes (tfd module I), the presence of a second set of chlorocatechol genes (tfd module II). Derivatives of JMP 134 could be obtained, which differed in the amount of "modules" present and exhibited clearly distinct phenotypes, even in the range of substrates that can be mineralized, evidencing that different "gene dosages" were necessary to degrade differently chlorosubstituted aromatics (Perez-Pantoja et al., 2000). Like module I, module II was capable to equip recipient organisms with a 3-chlorobenzoate mineralizing phenotype when supplied in multi-copy. However, growth yield and rate varied significantly, which can be explained by the different kinetic parameters of the key enzymes encoded on the modules. Significant accumulation of pathway intermediates, is assumed to trigger the induction of chromosomal genes involved in aromatic degradation. Mineralization of part of the substrate is then achieved by interplay between chromosomal and plasmid encoded enzymes. Those results evidence that a complex metabolic network is responsible for chloroaromatic degradation in R. eutropha JMP 134.

Biofilms in channels receiving coffee-processing waste water

In collaboration with Colegio de la Frontera Sur, Mexico, we analyzed the microbial community involved in degradation of coffee waste in situ. Samples of biofilms were taken from a waste channel and microorganisms capable to degrade central components of the wastewater were isolated by direct plating to avoid enrichment artifacts. Typical representatives, some of them exhibiting not yet described catabolic properties, were characterized by sequencing of the 16S rRNA genes and fingerprinting (T-RFLP) based on analysis of the intergenic 16S-23S-spacer region. Nearly all chlorogenate degraders could be shown to belong to the genus *Acinetobacter*, whereas most protocatechuate and gallate degraders belong to subgroups of the genus *Klebsiella*. Both genera are known to comprise pathogenic organisms. T-RFLP-analysis of 16S-rDNA directly isolated from the biofilm showed, that *Klebsiella* related organisms were generally dominant in biofilms sampled from different coffee waste locations. The uncontrolled development of such biofilms could be thus a source of potentially pathogenic organisms.



Publications | Veröffentlichungen

Perez-Pantoja D, Guzman L, Manzano M, Pieper DH, Gonzalez B (2000) Role of $tfdC_{11}D_{11}E_{11}F_{11}$ and $tfdD_{11}C_{11}E_{11}F_{11}$ gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *Appl Environ Microbiol* 66:1602-1608

Pieper DH, Reineke, W (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 11:262-270

Seeger M, Cámara B, Hofer B (2001) Dehalogenation, denitration, dehydroxylation and angular attack of substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase. *J Bacteriol* 183:3548-3555

Rapp P (2001) Multiphasic kinetics of transformation of 1,2,4-trichlorobenzene at nano- and micromolar concentrations by *Burkholderia* sp. strain PS14. *Appl Environ Microbiol*, in press

Abb. 2. Produkte des Umsatzes von 2,2'-disubstituierten Biphenylen und von Dibenzofuran durch die Biphenyl Dioxygenase aus *Burkholderia* sp. LB400.

Fig. 2. Products formed during transformation of 2,2'-disubstituted biphenyls and of dibenzofuran by *Burkholderia* sp. LB400 biphenyl dioxygenase.

Mikrobielle Entsorgungsverfahren (SP 4.2)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: E. Belal, H. Biebl, L. Bischoff, T. Gäbel, R.-J. Müller, J. Nothnagel, S. Rühle, A. Samuels, H. Schrader, M. Shalaby, K. Welzel

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung von Verfahrensstrategien für effektive biologische Abbauprozesse. Dies beinhaltet auch die Entwicklung neuer bioabbaubarer Materialien und die Verwertung von Reststoffen. Im Schwerpunkt des Interesses stehen grundlegende Aspekte wie die Aufklärung von Abbaumechanismen, die Untersuchung der Substratstruktur/Mikroorganismus-Wechselwirkung (bei Polymeren) sowie die Erkennung limitierender Teilschritte des Gesamtabbaus.

Abbau von Schadstoffen

Der Abbau aromatischer Verbindungen erfolgt oft über ein komplexes metabolisches Netzwerk, in dem Parallelreaktionen, Transportlimitierungen und verschiedene Inhibitionen (*feed forward*, *feed back*) auftreten können. Die Entwicklung effizienter Abbaustrategien für einzelne Komponenten erfordert nicht nur die Kenntnis des genauen Abbauweges, sondern auch der Dynamik aller die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion bestimmenden Schritte. Neben experimentellen Techniken kommt der dynamischen Modellierung besondere Bedeutung zu, um das komplexe Systemverhalten beschreiben und vorhersagen zu können. Für den Chinolinabbau (Cumarin-Weg) durch *Comamonas acidovorans* konnten wir ein mathematisches Modell entwickeln, das den Abbau unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und -techniken einschließlich der unter bestimmten Bedingungen temporär auftretenden Abbauwegintermediate gut beschreiben kann. Da hierzu eine Vielzahl von möglichen Modellstrukturen zu prüfen waren, wurde auf der Basis genetischer Programmierung ein spezieller Algorithmus zur Strukturerkennung und Datenanpassung entwickelt.

Weitere laufende Projekte umfassen Untersuchungen zum Einfluß leichtverwertbarer Substrate auf die Effizienz und Vollständigkeit des Schadstoffabbaus. Als Modellsystem dient hier der simultane Abbau von Phenol, Benzoat und Azetat. In Zusammenarbeit mit dem Bereich Mikrobiologie wird der Abbau von 4-Chlorsalicylsäure durch ein Konsortium von 4 Bakterienstämmen untersucht. Ziel ist die Erstellung eines mathematischen Reaktionsmodells, um synergistische Wechsel-

wirkungen der beteiligten Stämme und die Dynamik dieses Abbaus aufzuklären.

1,3-Propandiol

Als Rohstoff für die 1,3-Propandiolgewinnung wird zunehmend das bei der Alkoholgärung als Nebenprodukt anfallende Glycerin diskutiert. In Zusammenarbeit mit einem Industriepartner konnten wir verschiedene, z. T. stark verunreinigte Rohglycerine aus der Ethanolproduktion mit hoher Ausbeute mikrobiell zu Propandiol umsetzen.

Bioabbau von Kunststoffen

Grundlagenuntersuchungen zum Mechanismus des biologischen Abbaus von Kunststoffen standen im Mittelpunkt der Untersuchungen. Systematische Abbaustudien verschiedenster definierter Modell-Polyester mit Lipasen zeigten, dass noch vor strukturspezifischen Aspekten der Esterbindungen selber die Mobilität und Flexibilität der Polymerketten eine ausschlaggebende Rolle hinsichtlich der Abbaubarkeit der Materialien spielt.

Mit der Zielrichtung einer Optimierung von Abbauuntersuchungen speziell für langsame Abbauprozesse war es möglich durch Einsatz von Nanopartikeln (Durchmesser 100-200nm) den Abbau von Polyestern mittels Lipasen im Bereich von Minuten und Sekunden zu bestimmen. Im Bereich anaerober Mikroorganismen konnte eine Reihe polyesterabbauender Stämme isoliert und identifiziert sowie in optimierten Abbautestverfahren eingesetzt werden. Weiterhin war es erstmals möglich, ein anaerobes, polyesterspaltendes Enzymsystem zu lokalisieren und in den Grundlagen zu charakterisieren.

Microbial Degradation Processes (SP 4.2)

The research activities of this project intend to recognize design strategies for efficient microbial degradation processes. This includes the development of new biodegradable materials as well as the conversion of residues to valuable products. The work is mainly focused on basic research topics such as elucidation of degradation mechanisms, the investigation of substrate surface / microorganism relationships (polymers) and the identification of rate limiting steps.

Degradation of toxic compounds

Microbial conversion of aromatic compounds is often embedded in a complex metabolic network, involving parallel reactions, transport limitations, and different kinds of inhibition (feed back, feed forward). Design of efficient degradation strategies requires knowledge of the routing of substrates and pathway intermediates as well as the dynamic of each single rate limiting step. Kinetic modeling in addition to experimental techniques is a powerful tool to describe and predict the complex system behaviour. We investigated quinoline degradation (coumarin pathway) by *Comamonas acidovorans* and developed a dynamic reaction model. This model is able to describe quinoline conversion under various culture conditions and different cultivation techniques including the temporary accumulation of pathway intermediates under certain culture conditions. To cope with the large number of possible model structures, which had to be tested, an algorithm for structure elucidation and data fitting was developed which is based on genetic programming.

Other projects include investigating the influence of easy degradable compounds on the mineralization of toxic compounds.

This work is carried out using the simultaneous degradation of phenol, benzoate and acetate as a model system. In close cooperation with the division of Microbiology, the degradation of 4-chlorosalicylate (4CS) by a community of 4 strains is investigated. The goal is to develop a mathematical reaction model to elucidate the synergistic interactions of the different strains and to predict the dynamics of 4CS degradation.

1,3-Propanediol

As a feedstock for microbial production of 1,3-propanediol by-product glycerol from ethanol fermentation processes is presently discussed. In cooperation with an industry partner we were able to convert several crude glycerols originating from alcohol distilleries successfully to propanediol.

Biodegradation of polymers

The main goal of the research on biodegradable plastics was to gain more basic information about the degradation mechanism of polyesters. Systematic degradation studies on different, well defined model polyesters with lipases showed, that beside the ester structure, the mobility and flexibility of the polymer chain itself plays a dominant role in controlling biodegradation. Degradation testing could be speeded up in a range of time of some seconds by using polyester nano-particles in enzymatic degradation.

Under anaerobic conditions it was possible to isolate and identify a number of polyester degrading strains and, for the first time, to identify an anaerobic, polyester-cleaving enzyme.

Publications | Veröffentlichungen

Biebl H, Schwab-Hanisich H, Sprör C, Lünsdorf H (2000) *Propionispira vibrioides*, nov. gen. sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols. *Arch Microbiol* 174:239-247

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

Müller R-J, Kleeberg I, Witt U, Deckwer W-D (2001) Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J Biotechnol* 86:87-95

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*: M. Abang, W.-R. Abraham, I. Buchholz, S. Hermann, R. Huppmann, T. Jeschke, E. Surges, P. Wolff, all Research Group Chemical Microbiology; D. Bludau, J. Bötzel, I. Brettar, T. Chernikova, S. Eichler, W. Fehr, A. Felske, L. Frese, P. Golyshin, O. Golyshina, E. Haase, S. Heim, V. Heindl, H. Heuer, C. Hoch, M. Höfle, C. Höltje, B. Jung, H. Jungnitz, F. Kaminski, A. Krüger, M. Labrenz, J. Leonhäuser, H. Lünsdorf, M. Martinez, G. Molinari, K. Münch, B. Pauling, V. Pires Martins dos Santos, I. Pöhler, I. Pubantz, D. Regenhardt, I. Sabirova, D. A. Santosa, M. Strocchi, C. Strömpl, M. Sylla, S. Y. Um, I. Wagner-Döbler, A. Wasliczek, R. Weller, D. Wenderoth, K. Wilken, M. Yakimov, all Research Group Microbial Ecology

Die wenigsten Bakterien in der Umwelt lassen sich als Reinkulturen im Labor kultivieren und können daher mit den Methoden der klassischen Mikrobiologie untersucht werden. Zudem leben Mikroben in der Natur in komplexen Gemeinschaften und ihre Aktivität resultiert aus vielfältigen Interaktionen zwischen deren einzelnen Mitgliedern. Die **Mikrobielle Ökologie** befaßt sich mit dem Studium natürlicher, mikrobieller Gemeinschaften. Sie identifiziert die Mitglieder der Gemeinschaft, bestimmt deren Aktivitäten und untersucht deren physiologische Rollen. Zusammen werden diese Informationen ein Verständnis ergeben, wie komplexe mikrobielle Gemeinschaften in natürlichen Habitaten funktionieren, und welche Parameter die Aktivitäten der Gemeinschaften regulieren.

Die Verwertung hydrophober Substrate stellt für Mikroorganismen eine besondere Schwierigkeit dar, da diese Verbindungen wegen ihrer Unlöslichkeit in Wasser nicht bioverfügbar sind. Einige Bakterien produzieren daher Lösungsvermittler (Biotenside), welche wie Waschmittel die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen. Mit dem Lichenysin A, einem zyklischen Lipoheptapeptid, haben wir den bisher wirksamsten Vertreter dieser Naturstoffklasse entdeckt. Die Verbindung wird nicht-ribosomal synthetisiert und das dafür verantwortliche Enzym enthält Domänen, welche die einzelnen Aminosäuren des Lichenysin A zusammenfügen. Durch den Austausch einiger dieser Domänen und der Expression des so neukombinierten Gens in *Bacillus subtilis* gelang es uns, neue Biotenside zu produzieren, welche veränderte Tensidaktivitäten und Toxizitäten aufweisen.

Bakterien verstoffwechseln nicht nur die unterschiedlichsten Substrate, sondern unterliegen ihrerseits wiederum dem Fraßdruck durch andere Mikroben. Wir haben in einem Modellsystem untersucht, welche unterschiedlichen Mechanismen Umweltbakterien entwickeln, um sich vor dem Fraß durch Protozoen zu schützen. Einige Stämme verändern ihre Zellform und wachsen zu langen Fäden aus, welche von den Protozoen nicht geschluckt werden können, andere wiederum schließen sich zu Verbänden zusammen, welche dann zu groß sind, um von den Protozoen gefressen zu werden.

Die Bildung von größeren Zellaggregaten dient aber nicht nur dem Schutz vor Fressfeinden, sondern hat viele Vorteile für die Mikroben. Daher lebt der weit überwiegende Teil der Mikroorganismen in Aggregaten, sogenannten „Biofilmen“, zusammen. Zu Biofilmen organisiert weisen Bakterien in der Regel völlig andere Eigenschaften auf als in der planktonischen Form. Hier akkumulieren und tauschen sie Nährstoffe aus, weisen Resistenz gegenüber Fressfeinden, Schwermetallen oder Antibiotika auf, um nur einige Beispiele zu nennen. Die Struktur und Funktion solcher interagierender Systeme zu verstehen, erfordert den Einsatz verschiedener, auf einander abgestimmter Techniken, die zusammen ein Bild des komplexen Systems Biofilm ergeben. Wir haben einen integrierten, multidisziplinären Ansatz zur Untersuchung von Biofilmen entwickelt, welche hydrophobe Verbindungen verstoffwechseln. Aus Boden- oder Sedimentproben werden auf hydrophoben Substraten (z. B. PCB) autochthone Biofilme angezogen und elektronenoptisch charakterisiert. Hier lassen sich die räumliche Struktur der Biofilme sowie die



In einem sauren Tagebaurestsee, dessen Wasser durch den hohen Eisengehalt rot gefärbt ist, wird ein Schwimmkörper ausgebracht. Nach ein paar Monaten hat sich ein Biofilm auf den Objektträgern gebildet (kleines Bild unten rechts). Die elektronenmikroskopische Untersuchung an Ultradünnschnitten zeigt Gruppen verschiedener Bakterien und dazwischen feine Nadeln von Mineralaggregaten, welchen von den Bakterien des Biofilms gebildet wurden (Bild oben rechts).

A device to grow biofilms is set into an acidic mining lake which is red colored by high concentrations of iron ions. After several months a biofilm was formed on the substrata (small insert, lower right). Electron microscopy of ultra-thin sections revealed groups of different bacteria interspersed with fine needles of mineral aggregates formed by bacteria of the biofilm (insert, upper right).

Elementverteilungen in ihnen untersuchen. Darüber hinaus wird die organismische Struktur der bakteriellen Gemeinschaft des gleichen Biofilms mittels der 16S rDNA Gensequenzen ermittelt, welche über SSCP aufgetrennt und deren Hauptbanden sequenziert werden, um eine eindeutige Artzuordnung zu erreichen. Von den Biofilmen werden Isolate unter selektiven Bedingungen gewonnen, die dann wiederum zur Untersuchung von Ergebnissen aus der Biofilm-Analyse herangezogen werden. Schließlich wird der Grad und die Geschwindigkeit des Substratabbaus mittels organisch-chemischer Analyse bestimmt. Die so erhaltenen Informationen über die Struktur, die Biodiversität und die metabolische Aktivität des Biofilms ergibt ein völlig neues Bild der Interaktion von Bakterien mit hydrophoben Substraten.

In einer Anwendung dieses polyphasischen Ansatzes wurden in Feldversuchen in sauren Tagebaurestseen (pH 2,7) Aufwuchskörper eingebracht und während mehrerer Monate im Wasser zur Ausbildung autochthoner Biofilme exponiert (Abbildung). Unsere Untersuchungen ergaben, dass die entstandenen Biofilme eine hohe Biodiversität aufweisen und sich im wesentlichen aus Bakterien der Gattungen *Acidocella*, *Acidiphilium*, *Paenibacillus*, *Mycobacterium* und einigen weiteren Stämmen zusammensetzen, die zu bislang unbekanntem Bakterien-gattungen gehören. Die Bakterien reagieren mit den Ionen des Seewassers, denn in den Biofilmen wurden von uns Mineralaggregate gefunden, welche sich morphologisch von denen im Seesediment unterscheiden und die durch Elementanalyse im Elektronenmikroskop als Schwertmannit identifiziert wurden. Wir konnten damit erstmals nachweisen, dass die Bakterien im Biofilm zur Mineralienneubildung in sauren Tagebaurestseen beitragen.

Molecular Microbial Ecology (SP 4.3)

Most bacteria from the environment cannot be grown as pure cultures in the laboratory. Therefore, the methods of classical microbiology to study them cannot be applied. Furthermore, in nature microbes live in complex communities and their activities result from a multitude of interactions between the different members. Microbial ecology deals with the investigation of natural microbial communities. The different members of the communities are identified, their activities determined and their physiological roles elucidated. Together, these information will give an understanding of how complex microbial communities function in the environment and which parameters control the activities of the communities.

*The utilization of hydrophobic substrates offers a special problem for microbes because the insolubility of these compounds in water prevents their bioavailability. Some bacteria react to this challenge by producing biosurfactants which like washing powder reduce the surface tension of water. We discovered Lichenysin A, the currently most active member of this class of natural compounds, a cyclic lipopeptide. It has a non-ribosomal biosynthesis and the responsible enzyme contains domains which add the individual amino acids to the growing peptide chain. Exchanging some of these domains and expressing the newly combined gene in *Bacillus subtilis* we successfully produced the new biosurfactants which possess different tenside activities and altered toxicities.*

Bacteria do not only metabolize very different substrates but are themselves subject to grazing by other microbes. We investigated what types of mechanism bacteria from the environment developed to protect themselves from grazing by protozoa in a model system. Some strains changed their cell forms and grew to large filaments which cannot be swallowed by protozoa, others aggregated to groups which are as well too large to be fed by other microbes.

The formation of larger cell aggregates does not only protect the bacteria from grazers but has many more advantages for the microbes. Therefore, most microbes live in aggregates, so called biofilms. Organized to biofilms bacteria usually display a completely different behavior than the planktonic form. Here they accumulate and exchange nutrients, escape

grazers, or are resistant against heavy metals or antibiotics, only to mention some aspects. To understand structure and function of such interacting systems requires the application of different and well matched techniques which combined give a picture of the complex biofilm system. We developed an integrated and multidisciplinary approach to study biofilms metabolizing hydrophobic substrates. Soil and sediment samples were used to grow autochthonous biofilms on hydrophobic substrates (e. g. PCB) which were then analysed by electron microscopy. Here, the spatial structure of the biofilm and the distribution of chemical elements can be analysed. With the same biofilm the taxonomic composition of its microbial community is determined using 16S rDNA gene sequences which are separated on SSCP gels with subsequent sequencing of the important bands to achieve an unambiguous identification of the bacterial species. Strains are isolated under selective conditions from the biofilm which are used to analyse results obtained from the investigations of the biofilm. Finally, the extent and rate of substrate degradation is determined applying organo-chemical analysis. The combined informations concerning the structure, the biodiversity and the metabolic activity of the biofilm revealed a completely new picture of the interaction of bacteria with hydrophobic substrates and the composition of the microbial community could be correlated with the three-dimensional structure of the biofilm and the degradation of the substrate.

*This polyphasic approach was applied in field studies in acidic mining lakes (pH 2,7) where autochthonous biofilms formed on substrata exposed in the water column for several months (Figure). Our analysis revealed that the biofilms formed possessed a high biodiversity and were mainly composed of bacteria of the genera *Acidocella*, *Acidiphilium*, *Paenibacillus*, *Mycobacterium* and some other strains belonging to hitherto unknown genera. The bacteria react with ions from the lake water because mineral aggregates were found in the biofilm and identified as schwertmannite applying elemental analysis in the electron microscope. With this result we could demonstrate for the first time that bacteria in biofilms contribute to the de novo formation of minerals in acidic mining lakes.*

Publications | Veröffentlichungen

Hahn M, Moore ERB, Höfle MG (2000) Role of microcolony formation in the protistan grazing defense of the aquatic bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1. *Microb Ecol* 39:175-185.

Yakimov MM, Giuliano L, Timmis KN, Golyshin PN (2000) Recombinant acylheptapeptide lychenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells. *J Mol Microbiol Biotech* 2:217-224.

Abraham W-R, Hesse C, Pelz O, Hermann S, Tesar M, Moore E R B, Timmis K N (2001) Sharing of nutritional resources in bacterial communities determined by isotopic ratio mass spectrometry of biomarkers. In: *Focus on Biotechnology. Applied Microbiology* (Eds. Hofman M & Anné J). Vol. 2: (Eds. Durieux A & Simon J-P), Kluwer, Dordrecht, pp. 143-154.

Lünsdorf H, Strömpl C, Osborn A M, Moore E R B, Abraham W-R, Timmis K N (2001) Approach to analyse interactions of microorganisms, hydrophobic substrates and soil colloids leading to formation of composite biofilms, and to study initial events in microbiogeological processes. *Methods Enzymol* 336:317-331.

Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-Mora, R Amann R, Timmis KN (2001) Combined use of 16S rDNA and 16S rRNA to study the bacterial community in a PCB polluted soil. *Appl Environm Microbiol* 67:1874-1884.

Lünsdorf H, Wenderoth D F, Abraham, W.-R. (2001) Microbial consortia in composite biofilms from acidic mining lakes. *Water, Soil, and Air Pollution (Focus)*, in press.



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

Bioprozessentwicklung und -validierung (QF 1)

Zu den Aufgaben dieser Querschnittsfunktion, die die GBF als nationales Forschungszentrum überregional wahrnimmt, gehört die Durchführung biotechnologischer Prozesse bis in den Kubikmetermaßstab sowie die Abtrennung und Bereitstellung biologisch aktiver Substanzen. Dies kann gegebenenfalls auch unter GMP-Bedingungen erfolgen. Neben der Abwicklung von Aufträgen und praxisnahen Prozessentwicklungen durch die Abteilung Produktionstechnik konzentrieren sich die Aktivitäten auf die Weiterentwicklung des verfahrenstechnischen Methodenspektrums, insbesondere in Bezug auf verbesserte Kultivierungsmethoden und Produktreinigungsverfahren auf Basis eines quantitativen Verständnisses der Zellmaschinerie. Dazu werden in zunehmendem Maße auch die Methoden

des Metabolic Engineering verwendet. Als biologische Systeme werden die bekannten Säuger-Produktionszelllinien (CHO, BHK), Insektenzellen sowie bakterielle Systeme wie *E. coli* und eukaryontische Expressionssysteme (Hefen, Pilze) eingesetzt. Damit soll eine Basis geschaffen werden, um die genetischen und metabolischen Netzwerke sowie deren Regulation und Interaktion in ihren wesentlichen Grundzügen zu verstehen und für die Produktion von Genprodukten, Antikörpern und anderen biologischen Metaboliten unter verfahrenstechnischen Gesichtspunkten zu nutzen. Letztlich ist es Ziel, validierbare Modelle für Herstellverfahren technisch und medizinisch einsetzbarer Bioprodukte zu schaffen und effektive Prozessführungs- und Regelungsstrategien bereitzustellen.

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 on the development of improved product purification methods, quantitative cell physiology and metabolic engineering. Mammalian

production cell lines, insect cells as well as microbial strains were applied for these purposes. A major objective is to improve the understanding of the genetic and metabolic networks as well as their regulation and interaction. 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*: PD Dr. U. Rinas | Arb. Gr. Mikrobielle Systeme | *Res. Group*
Microbial Systems

Projektmitarbeiter | *Project members*: U. Bilitewski, J. Cabrera-Crespo, C. Fortmann, M. Ganzlin, B. Henze, F. Hoffmann, S. Marten, H. Schillig, J. Schumacher, L.F. Vallejo, J. van den Heuvel, J. Weber, U. Widow

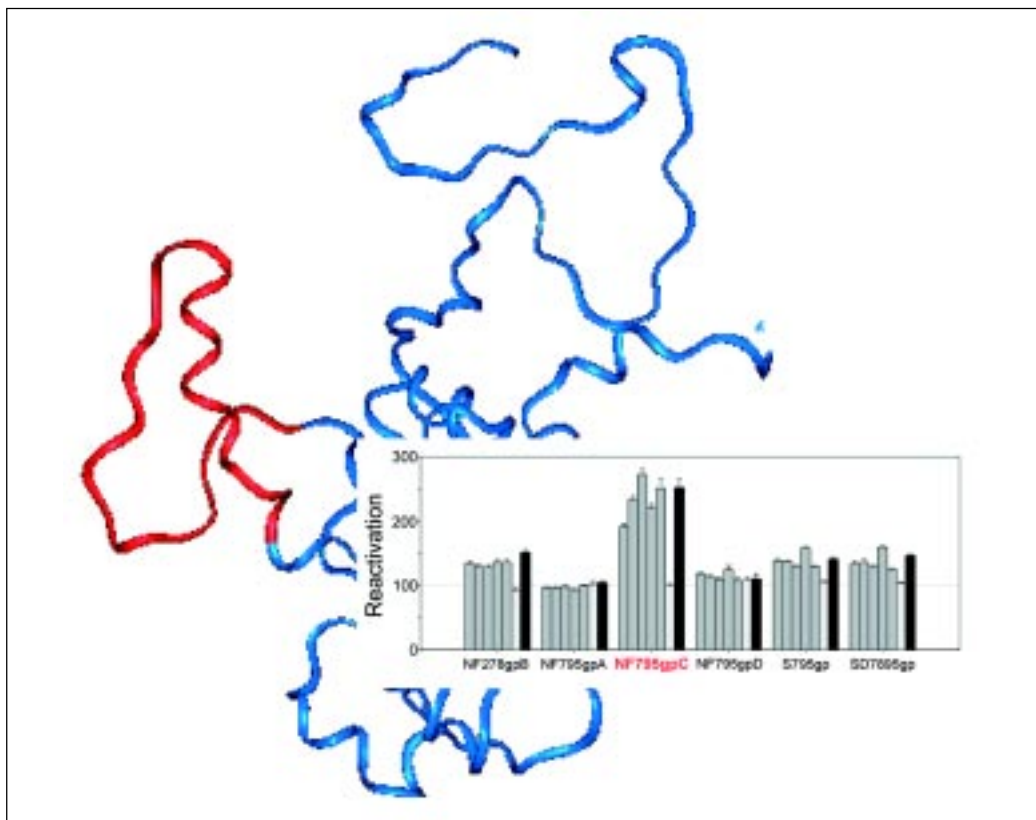
Proteine aus rekombinanten Mikroorganismen

Erkennung und Überwindung von Engpässen in der Erzeugung von biologisch aktiven Proteinen mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen: Die Arbeiten umfassten zellphysiologische Untersuchungen an proteinproduzierenden Zellen, die mathematische Beschreibung und modellmäßige Vorhersage der zellulären Vorgänge in Reaktion auf die erzwungene Fremdproteinsynthese (z.B. Proteom- und Stoffflussanalysen) sowie die Entwicklung von Prozessführungsstrategien zur effizienten Synthese, gegebenenfalls Renaturierung, und Reinigung biologisch aktiver (Pharma)proteine von mikrobiellen Expressionssystemen.

β -Galaktosidase als Biosensor für die Detektion von anti-HIV Antikörpern in humanen Seren

Im Rahmen eines von der GBF koordinierten und von der Europäischen Union geförderten Projekts wurde ein auf Basis des bakteriellen Enzyms β -Galaktosidase basierendes chimeres Protein (Insertion des antigenen Peptids P1 des gp41-Proteins des HIV Virus in β -Galaktosidase) entwickelt, dass erfolgreich für die Detektion von anti-HIV-Antikörpern in HIV-infizierten Patienten in einem homogenen Assay eingesetzt werden konnte (Abb. 1). Das Detektionsprinzip beruht auf einer partiellen Inaktivierung der enzymatischen Aktivität der β -Galaktosidase durch die Insertion des antigenen Peptids und einer partiellen Rückgewinnung der Enzymaktivität durch Bindung von Antikörpern an das chimäre Protein.

Abb. 1. Modulation der β -Galaktosidaseaktivität der chimären rekombinanten Proteine mit HIV-Epitop-Insertionen in verdünnten Seren (1:40) von fünf verschiedenen HIV-1 (graue Balken) und einem HIV-2 infizierten Patienten (gestreifte Balken) im Vergleich zur Modulation in Anwesenheit von Anti-P1 monoklonalen Antikörpern, 25 ng/ μ l (schwarze Balken). Eines der chimären Proteine mit einer Insertion des antigenen Peptids P1 mit einer Länge von 35 Aminosäuren an der Position 795 der nativen β -Galaktosidase aus *E. coli* konnte für die selektive Detektion von Antikörpern in den Seren von HIV-1 infizierten Patienten genutzt werden. Der Hintergrund der Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem 3D Modell der chimären β -Galaktosidase mit einer Insertion eines antigenen Peptids (in rot) an der Position 795 der nativen β -Galaktosidase aus *E. coli*.



*Fig. 1. Modulation of the β -galactosidase activity in the chimeric recombinant proteins containing HIV epitopes using diluted sera (1:40) from five different HIV-1 (gray bars) and one HIV-2 infected patient (hatched bars) in comparison to the modulation in the presence of anti-P1 monoclonal antibody at 25 ng/ μ l (black bars). One of the chimeric proteins containing an insertion of the antigenic peptide P1 with the length of 35 amino acids at position 795 of the native *E. coli* β -galactosidase was proven to selectively detect antibodies in the sera of HIV-1 infected patients. The background of the figure represents a part of a 3D model of the chimeric β -galactosidase with an antigenic peptide insertion (in red) at amino acid position 795 of the native *E. coli* β -galactosidase.*

Stabilisierung von Proteinen

Am Beispiel der Peroxidase aus Meerrettich wurde im Rahmen eines von der EU geförderten Projektes die Stabilisierung von Proteinen sowie die Verbesserung der elektrischen Kommunikation zwischen Protein und Elektrode durch den Zusatz von Polymeren untersucht. Die beim Einsatz des Enzyms in Enzymelektroden und Enzymaktivitätsassays gewonnenen experimentellen Daten wurden durch Untersuchungen zu Veränderungen der Proteinstruktur und durch Modellierung der Wechselwirkung zwischen Protein und Polymeruntereinheiten bzw. Elektrodenoberfläche (Zusammenarbeit mit Abt. SE, Dr. Hecht, Dr. Reichelt, Dr. Schmidt) ergänzt. Bei einigen Polymeren, wie zum Beispiel Polyethylenimin, ergaben die Modellrechnungen Wechselwirkungen mit einzelnen Proteinregionen, die wahrscheinlich vor allem auf Coulomb-Kräften beruhen, während andere Polymere, wie zum Beispiel DEAE-Dextran oder die eingesetzten Methacrylate, eher unspezifische Wechselwirkungen mit dem gesamten Protein zeigten (Abb. 2). Damit könnten diese Polymere in der Art einer Paketschnur die Proteinstruktur bewahren und somit das Protein stabilisieren. Eine Enzymstabilisierung wird experimentell tatsächlich vor allem durch die beiden letzteren Polymere beobachtet, wobei insbesondere das eingesetzte Acrylat auch vor der Inaktivierung des Enzyms durch

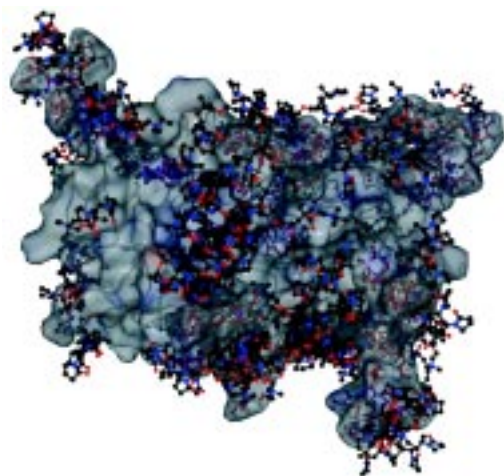
sein Substrat Wasserstoffperoxid schützte. Da der Zusatz des Substrates erst bei sehr hohen Konzentrationen zu Veränderungen der Proteinstruktur führt, ist die Stabilisierung hier möglicherweise auf einen eher chemischen Schutz durch das Polymer zurückzuführen.

Expressionsdiagnostik rekombinanter Produktionsstämme mit DNA-Chips

Die heterologe Proteinproduktion mit rekombinanten Mikroorganismen (*Escherichia coli*) führt zu veränderten Stoffwechselprozessen der Zellen, die sich zum Beispiel auch in einer erhöhten Produktion von Stressproteinen äußern. Bislang wurde die veränderte Zellphysiologie ausschließlich über Proteinuntersuchungen analysiert. Da DNA-Chips zunehmend verfügbar werden, sollten als Ergänzung die Methoden für zukünftige quantitative Expressionsanalysen etabliert werden. Dazu wurde ein *E. coli*-Produzentenstamm für hbFGF (humaner basischer Fibroblastenwachstumsfaktor) ausgewählt. Vorgesehen ist die Analyse der Expression insbesondere des heterologen Proteins zusammen mit der der Stressproteine. Daher mußten zunächst geeignete Oligonukleotide für den Nachweis der Ziel-mRNAs von z.B. hbFGF, Heat-shock-Proteinen, und einer geeigneten Kontrol-mRNA gefunden bzw. bestätigt und ihre Immobilisierung etabliert werden (Abb. 3). Der Einsatz eines kommerziellen *E. coli*-Chips erlaubt prinzipiell die Analyse der Expression etlicher Stressproteine. Allerdings werden quantitative Aussagen und damit auch Aussagen zur Kinetik der Expression erst mit der Integration von internen Standards möglich.

Abb. 2. Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Untereinheiten des Polyacrylats (Gafquat; in ballstick-Darstellungen) mit der Peroxidase aus Meerrettich (semitransparente Oberfläche mit C_{α} -Kette und Kohlehydratresten und Häm-Gruppe). Die Stickstoffatome des Polymers sind blau, Sauerstoffatome rot und Kohlenstoffatome schwarz. Der Blick ist auf das aktive Zentrum in der Mitte des Moleküls.

Fig. 2. Superposition of subunits of the acrylate-polymer Gafquat (ball and stick representation) on horseradish peroxidase (semitransparent surface with C_{α} trace and ball stick representation for carbohydrate and heme group). Nitrogen atoms are coloured blue, oxygen atoms red and carbon atoms black (Gafquat). The view is to the active site in the middle of the molecule.



Expression and Production Systems (QF 1.1)

Proteins from recombinant microorganisms

Identification and overcoming of bottlenecks associated with the production of biologically active proteins with recombinant microorganisms: The work included investigations of the cell physiology of protein producing cells, the mathematical description and prediction of the cellular reactions caused by the forced synthesis of the foreign protein (e.g. proteom and metabolic flux analysis) as well as the development of process strategies for efficient synthesis, if necessary renaturation, and purification of biologically active (pharma) proteins from microbial expression systems.

β -Galactosidase as biosensor for anti-HIV antibody detection in human sera

In the framework of a project coordinated by the GBF and financed by the European Union, a molecular biosensor based on the *E. coli* enzyme β -galactosidase (carrying an insertion of the antigenic peptide P1 of the gp41 protein of the HIV virus) has been generated that can be used for the detection of anti-HIV antibodies in the sera of HIV infected humans using a homogeneous assay system (Fig. 1). The principle of detection is based on the partial deactivation of the β -galactosidase activity through the insertion of the antigenic peptide followed by a partial recovery of the enzyme activity upon antibody binding to the chimeric protein.

Stabilization of proteins

Within the framework of an EU-project the influence of polymers on the stability of proteins and their electrical communication to electrodes was investigated using the example of horseradish peroxidase. In addition to experimental data obtained with enzyme electrodes and enzyme activity assays changes of the protein structure were investigated and the interaction of polymer subunits with the protein was modeled (cooperation with Dept. SF, Dr. Hecht, Dr. Reichelt, Dr. Schmidt). Modeling showed that some polymers, such as polyethyleneimine, have distinct binding sites for the polymers, whereas others, such as DEAE-dextran or the used poly-acrylate, offer more unspecific binding sites. As mainly the latter showed stabilizing effects for the

enzyme, this general stabilizing effect could be explained by wrapping the polymer round the polymer like a string. Hydrogen peroxide acts as a suicide substrate for horseradish peroxidase, these inactivating effects were also minimized by the addition of the poly-acrylate (Fig. 2). However, the addition of hydrogen peroxide lead to structural effects only at high substrate concentrations and thus maintainance of the protein structure cannot be used as an explanation for the observed protection. Probably chemical effects from side chains of the poly-methacrylate are more important.

Expression analysis of recombinant production strains with DNA-Chips

The production of heterologous proteins in recombinant microorganisms, e.g. *Escherichia coli*, changes the cell physiology leading for example to an increased production of stress proteins. Up to now mainly changes in the pattern of cellular proteins were analysed. The increased availability of DNA-chips is to be utilized to complement these investigations with the transcriptional analysis. The kinetics of the stress response can only be elucidated if quantitative analysis of the mRNAs is possible. An *E. coli*-strain for the production of the human basic fibroblast growth factor (hbFGF) was chosen to establish suitable methods. As the hbFGF gene expression was followed in comparison to the heat shock response, probes suitable for the detection of the hbFGF - mRNA together with a control-mRNA had to be defined and a suitable immobilization procedure was established (Fig.3). The application of a commercially

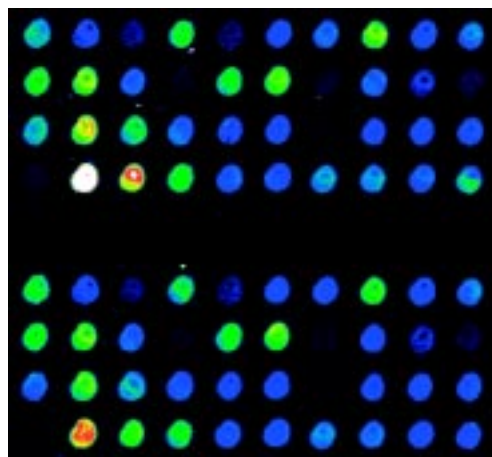


Abb. 3. Der von uns verwendete kommerziell verfügbare *E. coli*-Chip enthält Oligonukleotide, die für die Gene vor allem von Stressproteinen spezifisch sind. Bereits 5 Min. nach der Induktion der Proteinproduktion (hier: hbFGF-Produktion) ist eine deutliche Erhöhung der Expression einzelner Stressproteine zu sehen. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse dargestellt, die mit mRNA-Proben 10 Min. nach der Induktion erhalten wurden. Jeder der gezeigten Spots ist für ein Gen spezifisch, wobei die Fluoreszenz-Intensität hier in Falschfarben wiedergegeben ist und nach Standardisierung quantitative Aussagen zulässt. Die gesamte Gruppe der untersuchten Gene ist im Duplikat dargestellt.

The used commercially available *E. coli*-chip contained oligonucleotides which are specific mainly for genes of heat shock proteins, each gene being represented by one oligonucleotide. Already 5 min. after the induction of the heterologous protein production (here: hbFGF-production) a significant increase in the expression of some of the heat shock proteins was observed. The picture shows the results obtained from samples 10 min. after the induction. Each of the spots represented the expression of one specific gene, the fluorescence intensity is represented by colouring (yellow to white is highest intensity) and allows quantitative analysis when standards are considered. The whole group of investigated genes is shown in duplicate.

available E. coli-DNA-chip for some of the heat shock protein genes showed that quantification of the response, and thus the analysis of the kinetics will only be possible, if standards are integrated in the analysis.

Publications | Veröffentlichungen

Babu KR, Swaminathan S, Marten S, Khanna N, Rinas U (2000) Production of interferon- α in high-cell density cultures of recombinant Escherichia coli and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53:655-660.

Hoffmann F, Rinas U (2000) Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell density cultures of recombinant Escherichia coli. *Biotechnol Prog*, 16:1000-1007.

Modak J, Deckwer W-D, Zeng A-P (2000) System Dynamic Behavior of Eucaryotic Multienzyme Pyruvate Dehydrogenase Complex under In Vivo Conditions. *Proceedings of the First International Conference of Systems Biology*, 14-16 November 2000, Tokyo.

Sabra W, Zeng A-P, Lünsdorf H, Deckwer W-D (2000) Effect of Oxygen on the Formation and Structure of Azotobacter vinelandii Alginate and its Role in Protecting Nitrogenase. *Appl Environ Microbiol* 66(9): 4037-4044.

Schuderer J, Akkoyun A, Brandenburg A, Bilitewski U, Wagner E (2000) Development of a sensitive multi-channel fluorescence affinity sensor system. *Anal Chem* 72:3942-3948.

Hoffmann F, Posten C, Rinas U (2001) Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli. *Biotechnol Bioeng*, 72:315-322.

Ferrer-Miralles N, Feliu JX, Vandevuer S, Müller A, Cabrera-Crespo J, Ortmans I, Hoffmann F, Cazorla D, Rinas U, Prévost M, Villaverde A (2001) Engineering regulable Escherichia coli β -galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *J Biol Chem* 276:40087-40095.

Schumacher JT, Hecht H-J, Dengler U, Reichelt J, Bilitewski U (2001) Direct Electron Transfer Observed for Peroxidase to Screen-Printed Graphite Electrodes. *Electroanalysis* 13:779-785.

Akkoyun A, Bilitewski U (2001) Optimisation of Glass Surfaces for Optical Immunosensors. *Biosens Bioelectr*, accepted

Richter T, Shultz-Lockyear LL, Oleschuk RD, Bilitewski U, Harrison DJ (2001) New approaches for xanthine determination by using integrated microfluidic devices, *Sens Actuat B*, in press

Sabra W, Zeng A-P, Deckwer W-D (2001) Microbial alginates: physiology, quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press

Zeng A-P, Biebl H (2001) Bulk-Chemicals from Biotechnology: the case of microbial production of 1,3-propanediol and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, (74), in press

Zeng A-P, Schügerl K (Volume editor) (2001) Tools and Applications of Biochemical Engineering Science, Volume 74, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, in press

Metabolic Engineering der mikrobiellen Produktion von 1,3-Propanediol

Projektleiter | *Project leader*: PD Dr. A.-P. Zeng | Arb.Gr. Mikrobielle Systeme | *Res. Group*
Microbial Systems

Projektmitarbeiter | *Project members*: B. Fang, M. Hartlep, W. Hußmann, N. Prayitno, W. Sabra, J. Sun, C. Ulmer, J. van den Heuvel, A. Walter

Im Rahmen eines von der GBF koordinierten EU-Projekt „1,3-Propanediol – A versatile bulk chemical from renewable resources by novel biocatalysts and process strategies“ wurde für die beiden Produktionsstämme *Klebsiella pneumoniae* und *Clostridium butyricum* ein neues Fedbatch-Verfahren entwickelt, das zu einer signifikanten Erhöhung sowohl der Endproduktkonzentration (>86 g/l) als auch der Produktivität führte. Weiterhin wurde die Produktion von 1,3-Propanediol aus Glucose untersucht, sowie die Möglichkeit einer

direkten enzymatischen Umwandlung des Glycerins. Für das Metabolic Engineering des Prozesses haben wir anhand von kürzlich veröffentlichten genomischen Daten das komplette *dha* Regulon von *K. pneumoniae* rekonstruiert und mit den *dha*-Regulon von 3 anderen Organismen verglichen. Mehrere regulatorische und sensorische Proteine sowie wichtige Interaktionsdomänen wurden identifiziert (Abb. 1), die Targets für eine globale, genetische Optimierung des Prozesses darstellen.

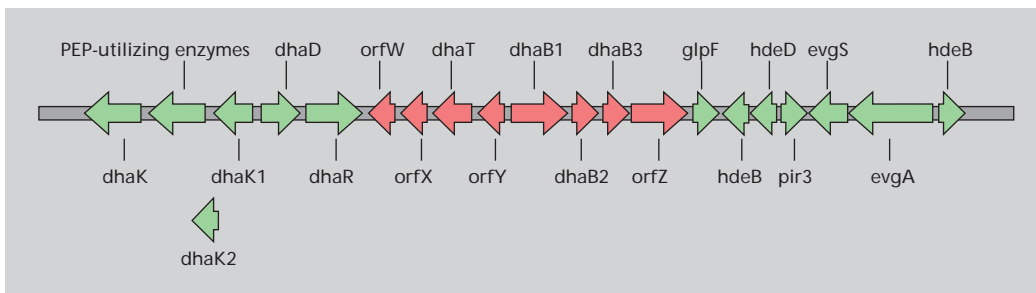


Abb. 1. Anhand von genomischen Daten rekonstruiertes und erweitertes *dha*-Regulon mit zusätzlichen regulatorischen Genen von *K. pneumoniae*.

Fig. 1. On the basis of genomic data the *dha*-regulon of *K. pneumoniae* has been reconstructed and extended with additional regulatory genes.

Metabolic Engineering of the Microbial Production of 1,3-propanediol

Within the GBF-coordinated EU project “1,3-Propanediol – A versatile bulk chemical from renewable resources by novel biocatalysts and process strategies” a new fed-batch process was developed for both *Klebsiella pneumoniae* and *Clostridium butyricum* that achieved a significant increase of both the final production concentration (>86 g/l) and volumetric productivity. We also studied the conversion of glucose to 1,3-propanediol and

the possibility of a direct enzymatic conversion of glycerol. For metabolic engineering of the process we reconstructed and expanded the *dha* regulon of *K. pneumoniae* from recently published genomic data and compared it with the *dha* regulon of other production strains. Several regulatory and sensory proteins and interaction domains were identified which should be the targets for a global genetic optimisation of the process.

Verfahrensentwicklung (QF 1.2)

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

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

Zentrales Thema dieses Projektes ist angewandte Prozessentwicklung auf den Gebieten Kultivierung von Mikroorganismen und Zellkulturen sowie Aufkonzentrierung und Reinigung biotechnologischer Produkte. 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
- Reaktoren für den Batch- und Perforationsbetrieb zur Züchtung von Zellkulturen bis zu 100 l Arbeitsvolumen
- Aufarbeitungsgeräte, wie z.B. Zentrifugen, Zellaufschlußgeräte, Filtrationsanlagen, Verdampfer und Gefriertrocknung, die sowohl klassische Aufarbeitungsrouten für niedermolekulare Produkte ermöglichen wie auch moderne Prozesstrategien für die Reinigung rekombinanter Proteine.

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 2000/2001 wurden solche Arbeiten für Forschungsgruppen der Universitäten Aachen, Braunschweig, Frankfurt, Lübeck, Düsseldorf und Stuttgart sowie das EMBL in Heidelberg durchgeführt. Etwa 25 % der Projekte wurden mit Industriepartnern durchgeführt.

Einige im Berichtszeitraum bearbeitete Themen seien hier exemplarisch genannt:

- Herstellung von Carotenoiden als Futtermittelzusatz
- Herstellung rekombinanter Proteine mit *P. pastoris*, insbesondere eine Scale-up-Studie zur Herstellung von Insulin
- Rekombinante Proteine in *E. coli* für die Ganzzellbiotransformation zur Herstellung chiraler Substanzen.

Ausbildung von Studenten und Wissenschaftlern auf dem Gebiet Bioverfahrenstechnik ist ein wichtiger Aspekt der Projektaktivitäten (Durchführung von Kursen im Rahmen des ITP-Programms, Praktika, experimentelle Arbeiten für Diplom- und Doktorarbeiten).

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 Airliftreaktor
3.1	Kultivierung von Myxobakterien zur Herstellung niedermolekularer Produkte
4.3	EU- Demonstrationsprojekt zur Hg- Entfernung aus Abwässern

Process Development (QF 1.2)

The focus of this project is applied process development for cultivation of microorganisms and cell cultures and isolation of biotechnological products. 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
- 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.

Any 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 support of GBF research groups by provision of equipment, consulting and experimental research for many different topics:

Support of research groups from universities and public research institutes have always been an original networking task of GBF. In 2000 / 2001 those projects have been done with partners at the universities Aachen, Braunschweig, Frankfurt, Lübeck, Düsseldorf and Stuttgart and the EMBL in Heidelberg. About 25 % of the projects are performed with industrial partners.

Some of the projects in the report period will be mentioned as example:

- Production of carotenoids for animal nutrition use
- Recombinant proteins from *P. pastoris*, especially a scale up study for production of insulin
- Recombinant enzymes in *E. coli* to be used in whole cell biotransformation for chiral compounds.

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

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, M. Bittner, B. Börner, F. Bünstorf, S. Duvar, M. Homeier, H. Hustedt, S. Kluger, K. Körner, R. Kraume-Flügel, K. H. Kroner, C. Mollenschott, N. Papamichael, J. Paulsen, B. Randel, I. Schuma, W. Stach. U. Willig

Aufgabe der Arbeitsgruppe GMP-Technikum ist es, auf der 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-Technikum der GBF – die einzige HGF-GMP-Pilotanlage in Betrieb

Seit mehreren Jahren verfügt die GBF über eine Erlaubnis gem. § 13 des Arzneimittelgesetzes zur gentechnischen Herstellung von Wirkstoffen. Damit war und ist sie als einziges HGF Forschungszentrum in der Lage, Herstellungsverfahren für neue Wirkstoffe vom Labor bis zur wirklichen Anwendungsreife zu entwickeln. Dies bedeutet, dass die dabei anfallenden Wirkstoffsubstanzen anschließend in Form von klinischen Prüfungen am Menschen zum Einsatz kommen.

Seit 1998 verfügt die Arbeitsgruppe über eine hochkompartimentierte Mehrzweckbiotechnikumsanlage (GMP I), die aus diversen lufttechnisch von einander getrennten und separat zugänglichen Reinräumen besteht. Die Arbeitsbereiche sind nach aktuellem Stand der Technik für die Bearbeitung komplexer biopharmazeutischer Prozesse ausgestattet. Die lufttechnische Trennung der Arbeitsräume ermöglicht ein zeitparalleles Arbeiten an verschiedenen Prozessen ohne die potenzielle Gefahr von Kreuzkontaminationen.

Im Berichtszeitraum wurde eine neue GMP-Biotechnikumsanlage (GMP II) geplant (und wird gegenwärtig in Betrieb genommen), die eine Kultivierung in größeren Volumina (bis 400 l) ermöglicht und zudem nach dem neuesten Qualitätsstandard der europäischen- und US-amerikanischen Arzneimittelbehörden (EMA und FDA) ausgelegt ist.

Zudem wurde im Berichtszeitraum eine GMP-Kleinanlage, basierend auf Isolatortechnologie (GMP III) konzipiert,

die gemeinsam mit SP 1.2 für die GMP-gerechte Herstellung von viralen Wirkstoffen für die Gentherapie und die Abfüllung vorgesehen ist.

Für mehrere pharmazeutische Unternehmen wurden F&E-Projekte bearbeitet. Dabei wurde insbesondere die wichtige Querschnittsfunktion für junge Biotechnologieunternehmen offenbar, die in der Regel weder über eigene Erfahrung in GMP-gerechtem Arbeiten, geschweige denn über eigene GMP-Anlagen verfügen und ohne die Zugriffsmöglichkeit auf die GMP-Optionen der GBF in der vorgegebenen Fristigkeit gesetzte Projekt-Meilensteine nicht hätten erreichen können.

Erfolgreiche Kooperationsvorhaben

Gemeinsam mit der Unilever-Tochter BAC b.V. (Bussum, Niederlande) wurden großtechnische (präparative) Chromatographieverfahren zur Isolation von technischen Enzymen und Antikörperfragmenten entwickelt und anschließend routinemäßig durchgeführt.

Für das Biotech-Unternehmen MediGene AG (Martinsried) wurde eine komplette Verfahrensentwicklung auf Basis von Baculovirusinfektionen und Insektenzellkultur zur Herstellung eines Wirkstoffes gegen Papillomviren durchgeführt und abgeschlossen. Der dabei hergestellte Wirkstoff befindet sich gegenwärtig in der klinischen Prüfung.

Für die hessischen Biotech Firmen BRAIN AG und Viscum AG (Zwingenberg) wurden Verfahrensentwicklungs- und Validierungsstudien für den Herstellungsprozess eines rekombinanten Pharma-

proteins durchgeführt. Für das Gemeinschaftsunternehmen von der GBF und dem Göttinger Institut für Bioanalytik der Fa. IBA Biologics wurden diverse Verfahrensentwicklungsstudien bearbeitet.

Für das Merckle Ratiopharm-Tochterunternehmen Biogenerix AG, Mannheim, wurde eine Prozessentwicklungsstudie für einen rekombinanten Pharmawirkstoff durchgeführt.

GMP Process Development (QF 1.3)

*The task of the GMP Pilot Plant group is to develop biotechnological processes for novel active substances from laboratory to pilot scale in cooperation with third parties, so as to produce adequate volumes of material for preclinical and clinical trials. This entails considerable process development and validation studies carried out – when required – under **Good Manufacturing Practice** rules, the quality assurance system of the pharmaceutical industry.*

The GMP Pilot Plant at GBF – the only such plant in operation within the HGF

GBF was licensed according to § 13 of the German Drug Act for the production of genetically engineered substances. As such GBF is the only HGF research centre which can develop production processes for novel active substances from laboratory to maturity. The active substances thus produced can then be applied on clinical testing.

Since 1998 the group has had a highly compartmented multipurpose pilot plant (GMP I) at its disposal, comprising diverse rooms served by separate HVAC systems and accessed separately. They are built to provide a suitable environment for handling complex biopharmaceutical systems. The separate HVAC systems allows concurrent work on different processes without the potential danger of cross-contamination.

During the last year work on a new GMP pilot plant (GMP II) was carried out and is currently being commissioned. It will enable us to perform cultivation at larger scale (400 L) according to current European and US authority regulations.

In addition a small GMP plant based on isolator technology was planned (GMP III) to be used for production of viral substances for gene therapy and final filling under GMP rules.

Several R&D projects were carried out for clients in the pharmaceutical industry, revealing the important linking function for young biotech companies which neither have know-how in GMP nor their own GMP plant. Without the utilisation of the GMP facilities at GBF the project milestones would not have been achieved within the time schedule set.

Successful Cooperations

Scaled-up (preparative scale) chromatography processes for the isolation of industrial enzymes and antibody fragments were developed and subsequently executed routinely for BAC b.v. (Bussum, The Netherlands), a Unilever subsidiary.

A complete process development based on Baculovirus infection of insect cells for the production of a substance against Papilloma virus was carried out for MediGene AG (Martinsried), a biotechnology-based company. The substance produced in the project is currently in clinical trials.

Process development and validation studies for production of a recombinant pharma protein was carried out for BRAIN AG and Viscum AG (Zwingenberg). A number of development studies were realized for IBA Biologics, a subsidiary of GBF and the "Institut für Bioanalytik" in Göttingen.

Process development studies on a recombinant pharmaceutical active substance were carried out for Biogenerix AG (Mannheim), a subsidiary of Merckle Ratiopharm.



Koordinator | *Coordinator:*
Dr. H. Blöcker | Abt. Genom-
 analyse | *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 Potenziale 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 über 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, multidimensionale 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 very much dependent on a deeper insight into biology. The most efficient way of achieving this is by applying global strategies. This enables researchers to discover new classes of biological compounds or to study them in greater detail. In the current major research and development areas of the GBF this is being achieved by concerted activities in the fields of genome and proteome research, bioinformatics as well as structural analysis. We contribute to the complete description of all synthesis, regulation and communication potentials of the biological cell.

Genome sequence analysis is the classical example for global strategies. With modern genome centres (such as the GBF), 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 the efficient sequence analysis, mainly by extended automation and parallelisation. The infrastructure stretches from the generation of all clone libraries to the functional analysis by bioinformatic tools. The current annual capacity is above 10 megabases of interpreted sequence. Such large amounts of genomic sequence information has now drawn more of our attention towards the investigation of protein function and interaction.

The global strategy of **proteome analysis** lays the basis for the detailed biochemical-structural investigation of the functioning of individual proteins and is essential for attempts to unravel regulatory links within 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 proteome coverage. Recent methodological progress in **3D-structural analysis** (structural genomics) has led to a much broader application of this general technology. This applies particularly to MAD and cryo techniques during the use of 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 competent data handling infrastructure and procedures for molecular **bioinformatics**.

Useful information must be gained from the large quantities of data and made accessible in an intelligent fashion. Therefore, the GBF also has ongoing research and development activities in bioinformatics. Until recently this was related to database and algorithm development for the sequence interpretation of regulatory potentials. In the framework 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 importance.

Genomics und Proteomics (QF 2.1)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: **Genomics**: M. Böcher, M. Czubayko, K. Hornischer, M. Kalisz, G. Kauer, B. Neelen, G. Nordsiek, M. Scharfe, O. Schön, M. Yang; **Proteomics**: M. Baumgärtner, O. Diekmann, L. Jänsch, U. Kärst, C. Krantz, R. Munder, J. Schaumburg, J. Wehland

In den letzten Jahren hat sich die Sequenzanalyse von sehr großen Bereichen genomischer DNA oder gar von kompletten Genomen als Startpunkt und lohnender Ansatz für biotechnologische Forschung und Anwendung durchgesetzt. In einem Wechselspiel von methodischen Entwicklungen und der Generierung großer Datenmengen stellen wir die spezifischen Chancen der Globalstrategien Genomsequenzanalyse und Proteomanalyse sowie der zugehörigen Bioinformatik in den Dienst einer biologischen Wissensvermehrung.

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. 4.000 Klone pro Tag analysiert werden. Die Jahreskapazität liegt bei über 10 Megabasen bioinformatisch detailliert untersuchter Sequenz. Ferner werden aus den von uns analysierten neuen Genen einige ausgewählte Gene zellfrei oder in *E. coli* exprimiert und der weiteren Funktionsanalyse durch Laborexperimente zugeführt.

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 wurden von uns fast 2.0 Mb an neuer humaner cDNA aus organ- oder stadienspezifischen Banken analysiert (deutsches Konsorti-

um). Kürzlich wurde damit begonnen, die gesamten Genome mehrerer Bakterien (z.B. pathogener *E. coli*-Stamm) zu analysieren. Im Rahmen des BMBF-Projektes „Krankheitsbekämpfung durch Genomforschung“ wurde zudem begonnen, ausgewählte Bereiche des Rattengenoms und das Chromosom 22 des Schimpansen (entspricht dem von uns bereits analysierten menschlichen Chromosom 21) zu untersuchen.

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

Ziel unserer Arbeit ist die Analyse der Expressionsmuster verschiedener Proteine von *Listeria monocytogenes* – einem humanpathogenen Bakterium – mittels hochauflösender 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) und schneller Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie anhand der vollständig bekannten Genomsequenz. Als erster Schritt werden Proteine der wichtigen

Subproteome (sekretorische, Zellwandgebundene und Membranproteine) des Wildtyps nach Anzucht unter Standardbedingungen kartiert und identifiziert, weil die Interaktion mit Wirtszellen während der Infektion durch externe Proteine vermittelt wird. Auf dieser Basis wird die differentielle Genexpression unter verschiedenen Umweltbedingungen untersucht, wobei das besondere Interesse den anhand der *in silico*-Analyse des Gesamtgenoms als wahrscheinlich Virulenz-assoziierten Proteinen gilt. Die so erhaltenen Daten werden dann mit denen klinischer Isolate des Serovars 4b und der Spezies *L. innocua* und *L. ivanovii* verglichen.

Besondere Aufmerksamkeit gilt den Oberflächenproteinen von *L. monocytogenes* nicht nur, weil die meisten bekannten und vermuteten Virulenzproteine hier auftreten, sondern auch deshalb, weil dieses Bakterium nach den Ergebnissen der Genomanalyse über einen ungewöhnlich großen Satz – etwa 11% – an Proteinen mit Transportfunktionen verfügt.

Parallel zur Proteinidentifizierung werden Methoden zur Isolierung von Subproteomen, zur quantitativen Analyse von Proteinmustern, zur Extraktion und Auftrennung von hydrophoben Membranproteinen und zur Erhöhung der Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Identifizierung weiter und neu entwickelt.

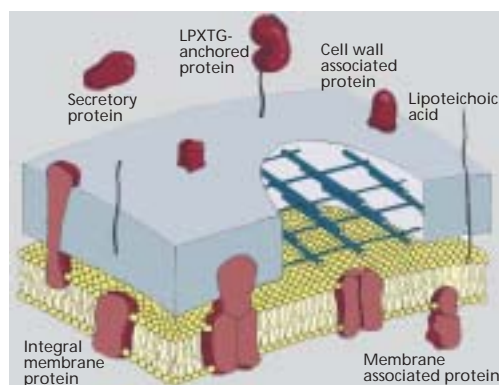
Die mit verschiedenen Verfahren extrahierten Proteine wurden durch denaturierende 2D-PAGE - für Membranproteine oder native Proeinkomplexe durch Blue Native-PAGE - aufgetrennt. Ausgeschnittene Proteinflecken aus 2D-Gelen wurden durch MALDI-MS anhand der Massen tryptischer Peptide oder durch ESI-MS/MS anhand kurzer Sequenzabschnitte identifiziert, Banden aus 1D-Gelen durch N-terminale Sequenzierung.

Das **sekretorische Subproteom** von *L. monocytogenes* EGD weist nach Fluoreszenzfärbung 160 Proteinflecken auf; von denen bisher 39 – entsprechend 28 verschiedener Proteine, die teilweise in mehr als einem Flecken auftreten – identifiziert wurden; darunter befinden sich neben einer Reihe von Proteinen unbekannter Funktion auch die Virulenzproteine Internalin A, B und C, mpl und

Listeriolysin O. Es ist beabsichtigt, das sekretorische Proteom möglichst vollständig zu kartieren, um damit eine Vergleichsbasis für die Analyse unterschiedlicher Umweltbedingungen und zur Charakterisierung von Mutanten zu erhalten; darüberhinaus werden auch die zum mehrfachen Auftreten einzelner Proteine führenden Modifikationen identifiziert.

Zellwandgebundene Proteine wurden entweder durch serielle Extraktion (mit Puffern, Salzen und Detergentien) oder nach Herstellung von Protoplasten aus dem Überstand isoliert. Bisher wurden hier 82 Flecken oder Banden (aus 1D-Gelen) identifiziert, die 74 unterschiedlichen Proteinen entsprechen. Neben fast allen in diesem Subproteom zu erwartenden Virulenzproteinen und einer Reihe von Proteinen unbekannter Funktion wurden auch ein neues, wahrscheinlich Virulenz-assoziiertes Protein - vermutlich ein an Transportprozessen beteiligtes Lipoprotein – und eine neue Muramidase identifiziert.

Membran- und Membran-assoziierte Proteine wurden mit 1D-, 2D- und Blue Native PAGE analysiert. 50 Proteine, die meisten davon Membran-assoziiert, wurden bisher identifiziert. Wegen der besonderen Schwierigkeit, sehr hydrophobe integrale Membranproteine reproduzierbar aufzutrennen sind hier weitere Entwicklungsarbeiten notwendig, wobei weitere Verfahren wie z. B. die Free Flow-Elektrophorese getestet und eingesetzt werden sollen, um die Limitierungen der derzeit verfügbaren Trenntechniken zu überwinden.



Schema der Oberfläche Gram-positiver Bakterien (© M. Baumgärtner)

Scheme of the surface of Gram-positive bacteria (© M. Baumgärtner)

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 up to 4,000 clones per day. The annual capacity is above 10 megabases (Mb), including detailed analysis with bioinformatics tools. Selected genes (from the pool of new genes analysed here) are submitted to gene expression experiments, either in cell-free systems or in E. coli. Isolated proteins are then further analysed for various functional aspects.

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 almost 2 Mb of new human cDNAs from various organ- and development-specific libraries (as part of a German consortium). Recently, we started the analysis of the complete genomes of a few bacterial genomes (for example a non-pathogenic strain of E. coli). Moreover, in the frame of a national programme ("Fighting disease by genome research") we have recently begun to analyze selected regions of the rat genome and the chimp chromosome 22 (equivalent to the human chromosome 21 which was analysed by us).

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

The objective of this work is to analyse the protein expression patterns of the different genes of the human pathogen Listeria monocytogenes using high resolution 2D-gel electrophoresis and rapid protein identification by mass spectrometry based on the completed genome sequence. The first step is to map and identify proteins from the major subproteomes, secretory, cell wall-associated, and membrane from the wild type strain grown under standard conditions because the interactions with host cells are mediated through external proteins of the pathogen. Building on this firm

Titelbild der Zeitschrift Nature vom 15. Februar 2001 anlässlich der Veröffentlichung der ersten Arbeitsversion des menschlichen Genoms. Das Bild symbolisiert, worum es den Wissenschaftlern des internationalen Konsortiums geht: Einerseits die Chemikalie DNA, andererseits um die Menschen aller Kontinente, aller Hautfarben und jeglicher ethnischen Gruppen. Alle Ergebnisse des Internationalen Sequenzanalyse-Konsortiums sind frei verfügbar für jeden Interessenten. Mit freundlicher Genehmigung von Nature und Macmillan Magazine Ltd.

Cover picture of the 15 February 2001 issue of Nature on the occasion of the publication of the first „working draft“ of the human genome. The picture symbolizes what the work of the scientists of the international consortium is related to: On the one hand it is the chemical DNA, on the other hand it is mankind, no matter from which continent, of which colour or from which ethnicity. All results of the International Sequence Analysis Consortium are freely available to anybody. Permission kindly granted by Nature and Macmillan Magazine Ltd.



basis differential gene expression related to environmental conditions is being addressed; based on the in silico analysis of the *L. monocytogenes* genome new proteins under *prfA* control are being identified. Information gathered with the EGDe strain will be compared to clinical isolates of serovar 4b and *L. innocua* and *L. ivanovii*.

Particular attention is paid to the surface proteins of *L. monocytogenes* not only because most of the known and putative virulence factors are expected to be found in these fractions but also because, based on the genome analysis, this organism harbours an unusually large set of proteins – about 11% – with putative transport functions.

In parallel method development for improved subproteome isolation protocols, quantitative analyses of 2D gels based on fluorescent dyes, extraction and separation of hydrophobic membrane proteins, and increasing the sensitivity the peptide identification by peptide mass fingerprinting and sequence tag generation is being addressed.

Extracted proteins were separated by standard denaturing two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) and - for the isolation of membrane proteins and protein complexes - Blue Native PAGE. 2D gels were evaluated, spots selected, cut out, digested, and subjected to MALDI-TOF-MS for identification by peptide mass fingerprinting and/or ESI-MS/MS (Q-TOF) for identification through sequence tags from fragments. Proteins separated by 1D SDS-PAGE were identified mainly by Edman protein sequencing.

The **secretory subproteome** of the *L. monocytogenes* EGDe strain shows 160 spots upon fluorescent dye staining. Of these, 39 (corresponding to 28 proteins) have been identified, including the virulence factors Internalin A, B, and C, *mpl*, and Listeriolysin O, and several proteins of unknown function. Our intention is to identify as many spots as possible, then use this known pattern to analyse the differences seen under different growth conditions or with mutants, and identify the types of posttranslational modifications that cause several proteins to produce more than one spot on 2D gels.

Cell wall associated proteins were isolated by two approaches, (i) serial extraction with buffer, salts, and detergents, and (ii) preparing defined cell fractions by making

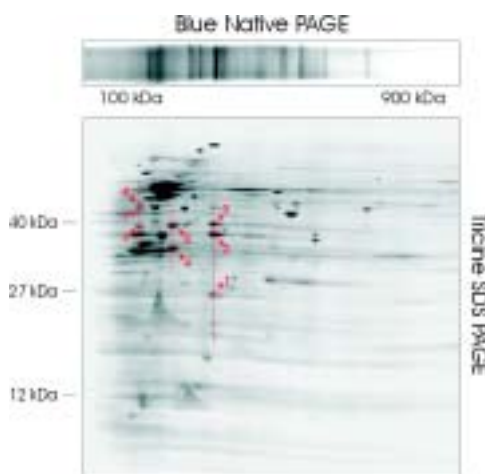
protoplasts to isolate cell wall proteins from the supernatant. So far, 82 spots or bands (from 1D SDS-PAGE) were identified corresponding to 74 proteins. Among these a new *PrfA*-regulated protein – a putative transport-associated lipoprotein - was detected which is a candidate for mutagenesis, as well as a new putative muramidase and most of the known virulence-associated proteins expected in this fraction, e.g., Internalin B, *hly*, ActA, and PlcA.

Membrane and membrane-associated proteins were analysed by 1D, 2D, and Blue Native PAGE electrophoresis to develop procedures for reproducible separations. 50 peptides that are mainly membrane associated have been identified so far but further method development is necessary. New techniques such as Free Flow Electrophoresis are being tried to improve on the current methodological limits.

Publications | Veröffentlichungen

European Union Chromosome 3 Arabidopsis Sequencing Consortium, The Institute for Genomic Research & Kazusa DNA Research Institute (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:820-823.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* 409:860-921.



Protein complexes separated by Blue Native PAGE and identified by MALDI-MS and ESI-MS/MS

- 1) ATP binding protein, probably ABC transporter
- 2) Citroporphite transport ATP-binding protein CypB
- 3) Citroporphite transport ATP-binding protein CypC
- 4) Pyruvate dehydrogenase E3 component, beta subunit
- 5) Pyruvate dehydrogenase E3 component, alpha subunit
- 6) Thiamin Bio-synthesis Lipoprotein AtpE
- 7) Anion channel
- 8) Conserved hypothetical protein

Zweidimensionale Auftrennung von Membranproteinen durch Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2D separation of membrane proteins by Blue Native PAGE

Bioinformatik (QF 2.2)

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

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

Regulatorische Netzwerke: Die Genotyp-/Phänotyp-Plattform

K. Seidl

Viele erworbene oder angeborene Krankheiten können auf Fehlfunktionen von Genen zurückgeführt werden, die schon während der Embryonalentwicklung potentiell gestörte Regelkreise manifestieren. Mit der Zielsetzung, den Einfluss genetischer Variationen sowohl auf zellspezifische als auch auf systemische Netzwerke zu modellieren, wurde eine Genotyp-/Phänotyp-Plattform etabliert, die pathologisch relevante Daten erfasst, bewertet und schließlich in Beziehung mit den entsprechenden Regelkreisen setzen kann.

Mit dem Einbringen von pathologisch relevanten Daten und ihren Effekten in die virtuelle Abbildung der Signaltransduktion wird eine neue Qualität für die Bewertung der Reaktionsmuster innerhalb

regulatorischer Netzwerke geschaffen und die Bedeutung einzelner Netzwerkbausteine für die Genesis und Aufrechterhaltung des jeweiligen Phänotyps näher beleuchtet. In der immensen Anhäufung von Informationen bezüglich Genotyp-/Phänotyp-Beziehungen soll die computergestützte Simulation von regulatorischen Netzwerken innerhalb der Grundlagenforschung neue Impulse liefern sowie bei der Herstellung von neuen Medikamenten ein effektives Werkzeug sein.

Regulatorische Netzwerke: Modellierung

A. Potapov, V. Drewes

Zur Modellierung der Architektur regulatorischer Netzwerke und ihrer Module wurde ein neuer Ansatz vorgeschlagen. Es wurde ein auf Boolescher Logik basierender Formalismus entwickelt, der Prozesse unterschiedlicher Komplexität als mehrfach konditionale Ereignisse behandelt. Mit diesem Formalismus können regulatorische Kaskaden und ihre Netzwerke in einer algebraischen Form ausgedrückt werden, die für ihre Speicherung sowie computergestützte Analyse geeignet ist.

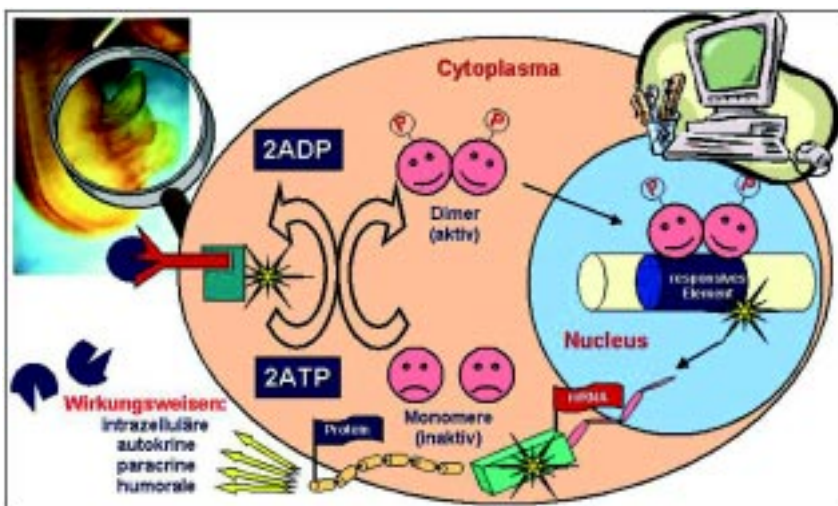
HNB: Datenbanken

M. Christensen, I. Liebich

Im Berichtszeitraum wurde eine neue Ausgabe der „S/MAR transaction database“ (S/MARt DB), die in Kooperation mit Prof. Bode (AG Epigenomics) entwickelt wurde, veröffentlicht. Dabei wurde die Datenbankpräsentation um zwei Formulare zur direkten Eingabe relevanter Daten durch den wissenschaftlichen Benutzer ergänzt. Während S/MARt DB Informationen zu DNA-Abschnitten bereitstellt, die das Genom in funktionelle Bereiche unterteilen, sammelt die gerade im Aufbau befindliche Datenbank TRANSsplice Daten zu reguliertem Spleißen.

Vom experimentellen zum bioinformatischen Ansatz

From the bench to bioinformatics



HNB: Zentrale WWW-Koordination

T. Crass, R. Gohla

Als technische Voraussetzung für die angestrebte Vernetzung der heterogenen HNB-Bioinformatik-Ressourcen wurden zunächst ein zentraler HNB-Server mit Nutzer-authentifizierung installiert. Weiterhin wurden abstrakte Beschreibungen der verfügbaren Software in einer Datenbank gesammelt, um – darauf aufbauend – komplexere Arbeitsabläufe (Tasks) zu definieren. Derzeit wird an den für die Task-Automatisierung nötigen Ablaufsteuerungs- und Datenaustausch-mechanismen gearbeitet. Als erstes HNB-Web-Interface für Nicht-Fachleute wurde der „Question Based Navigator“ entwickelt (<http://www.hnbioinfo.de>).

CYGD: Comprehensive Yeast Genome Database

H. Michael

Im Februar 2000 wurde mit einer groß-angelegten Aktualisierung der Hefedaten der TRANSFAC Datenbank begonnen. TRANSFAC enthält Daten über Transkriptionsregulatoren und ihre Bindungsstellen. Die gesammelte Information wird als separates Datenbankmodul Teil der Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD) werden. CYGD ist ein multidisziplinäres europäisches Projekt zur Erstellung einer umfassenden Datenressource für das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Veröffentlichungen | Publications

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

Kel AE, Kel-Margoulis O V, Farnham PJ, Bartley SM, Wingender E, Zhang, MQ (2001) Computer-assisted Identification of Cell Cycle-related Genes: New Targets for E2F Transcription Factors. J Mol Biol 309:99-120.

Hehl R, Wingender E (2001) Database - assisted promoter analysis. Trends Plant Sci 6:251:254.

Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I, Krull M, Matys V, Michael H, Ohnhäuser R, Prüß M, Schacherer F, Thiele S, Urbach S (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. Nucl. Acids Res. 29:281-283.

Dr. Edgar Wingender in der Diskussion mit Mitarbeitern

Dr. Edgar Wingender discussing problems with colleagues



Bioinformatics (QF 2.2)

Regulatory Networks: The Genotype-Phenotype Platform

Many of the acquired or innate diseases can be traced back to malfunctions of particular genes and the subsequent disarrangement of biological circuits during embryonic development. In order to model the effects of genetic variations on cell specific as well as systemic networks, a genotype-phenotype platform was generated, which enables recording and evaluation of pathologically relevant data and finally to allocate of the aberrant genes and gene products within the network of corresponding regulatory components.

The inclusion of pathologically relevant data and their downstream effects into the virtual representation of signal transduction creates a new quality for the evaluation of reaction patterns within regulatory networks. It will light up the meaning of individual network components for genesis and maintenance of particular phenotypes. Within the huge accumulation of information concerning genotype-phenotype correlations the computational simulation of regulatory networks will give new stimuli for basic sciences. Moreover, the genotype-phenotype platform will serve as a useful tool for the design of new medical and therapeutic drugs.

Regulatory Networks: Modelling

To model the architecture of regulatory networks and their modules, a new approach has been suggested. The necessary formalism has been developed which treats processes of different complexity as a multiple conditional event and is based on a variant of Boolean logic. By using this formalism, regulatory pathways and their networks could be expressed in an algebraic form suitable for their storage and computer-assisted analysis.

HNB: Databases

A new release of the S/MAR transaction database (S/MARt DB), which was developed in cooperation with Prof. Bode (Research Group EPI), has been made available. Thereby, S/MARt DB has been complemented by two forms that allow direct submission of relevant data by the researcher. While S/MARt DB provides information about elements of the DNA that subdivide the

genome into functional regions, our newly developed database TRANSsplice collects data on regulated splicing.

HNB: Central WWW-Coordination

As a technical prerequisite for the intended integration of the HNB's heterogeneous bioinformatics resources, a central HNB server (including user authentication) was installed. Furthermore, abstract descriptions of the available software tools were collected within a database, in order to allow for the definition of more complex work flows (tasks). Currently, the flow control and data exchange mechanisms required for task automation are under development. Finally, a "question based navigator" has been developed as a first HNB web interface suitable for non-expert users.

CYGD

In February 2000 we have started a massive update of the TRANSFAC database on transcriptional regulators and their respective binding sites with data on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This information will form a separate database module intended as an integral part of the Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD). The CYGD project is a multidisciplinary European effort to build a comprehensive data resource for information on the yeast genome.

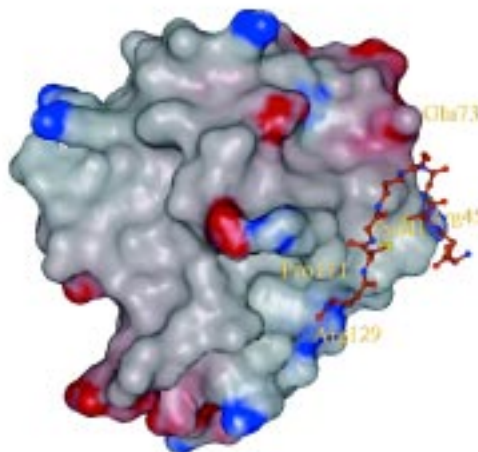
Strukturanalyse (QF 2.3)

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

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

3D Strukturen der Tryparedoxine aus *Crithidia fasciculata*

Als Beitrag zur Entwicklung von Wirkstoffen gegen pathogene Trypanosomatide wurden die 3D Strukturen zweier Tryparedoxine aus *Crithidia fasciculata* in Zusammenarbeit mit der Abteilung von Prof. Dr. L. Flohé (TU BS) untersucht. Die Thioredoxin-ähnlichen Tryparedoxine sind Teil des erst kürzlich aufgeklärten speziellen Peroxidstoffwechsels in Trypanosomatiden und gelten als indirekt validierte Zielmoleküle für Wirkstoffe. Die Wechselwirkung mit dem für Trypanosomatide spezifischen Redoxmetaboliten, Trypanothion, wurde anhand von Strukturvergleichen modelliert. An diesem Modell wurde die enzymatische Aktivität von Tryparedoxinvarianten, die an einzelnen Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums gezielt verändert waren, untersucht. Die Strukturanalyse eines kovalenten Reaktionsintermediats der Cys44Ser Tryparedoxin II-Variante mit dem Teilsubstrat Glutathionylspermidin bei 1.4 Å Auflösung bestätigt die in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums modellierten Enzym-Substratwechselwirkungen. Zusammen mit den Strukturen des oxydierten und reduzierten Tryparedoxins ermöglicht dies eine detaillierte Beschreibung der molekularen Vorgänge während der Reaktion. Die strukturellen Unterschiede zwischen Tryparedoxin und Thioredoxin, dem homologen Enzym beim Menschen, lassen die Entwicklung Tryparedoxin-spezifischer Inhibitoren als möglich erscheinen, die zur Bekämpfung der Chagas Krankheit und Schlafkrankheit verursachenden Parasiten beitragen können.



Modell der Wechselwirkung von Trypanothion mit der Oberfläche von Tryparedoxin vor Abschluss der Reaktion durch Knüpfung der intramolekularen Trypanothion-Disulfidbrücke

Model of the interaction of trypanothione with the surface of tryparedoxin before the completion of the reaction through coupling of the intramolecular trypanothione disulphide bridge

Struktur von extrazellulären Glutathion-S-Transferasen

Etwa 20 Millionen Menschen, überwiegend in Afrika, leiden unter der durch den Befall von Wurm-Parasiten ausgelösten Krankheit Onchozerkose, die bei einem Teil der Infizierten zur vollständigen Erblindung führt. In Zusammenarbeit mit dem Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg wurde die Struktur von zwei extrazellulären Glutathion-S-Transferasen mit 4 oder 5 N-Glycosylierungsstellen aus dem humanpathogenen Wurm-Parasiten *Onchocerca volvulus* aufgeklärt. Die Glykosylierungsmuster dieser sekretorischen Enzyme, die eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Parasiten gegen die Immunantwort des Wirts spielen, konnten mittels HPLC-MS, MALDI-MS and ESI-MS/MS für jede einzelne Glykosylierungsstelle bestimmt werden. Die hohe Relevanz der Glykane für die Antigen-Erkennung durch das menschliche Immunsystem wurde durch Vergleich der Immunantwort auf natürlich glykosyliertes und rekombinantes unglykosyliertes Protein nachgewiesen. Dieses Ergebnis belegt die große Bedeutung der korrekten posttranslationalen Modifikation von Proteinen, die als Ziele für Impfstoffe in Frage kommen.

Structure Analysis (QF 2.3)

3D Structure of Tryparedoxins from *Crithidia fasciculata*

The structure of two tryparedoxins from *Crithidia fasciculata* have been investigated as a contribution to the development of drugs against pathogenic trypanosomatids in collaboration with the Department of Physiological Chemistry, TU Braunschweig. The thioredoxin-like tryparedoxins are an indispensable component of the recently elucidated peroxide metabolism in these organisms and may be considered as indirect validated drug targets. Their interaction with the trypanosomatid specific redox metabolite, trypanothione, was modelled through structure comparisons. This model was verified through investigation of the enzymatic activity of tryparedoxin mutants that had single amino acid exchanges in the vicinity of the active site. The structural analysis of a covalent reaction intermediate of the Cys44Ser tryparedoxin-II-mutant containing the partial substrate glutathionylspermidine at a resolution of 1.4Å confirmed the structural characteristics of the active site of the modelled enzyme-substrate interaction. In combination with the structure of the oxidized and reduced tryparedoxins it was possible to formulate a detailed molecular description of the reaction process. It seems likely that the structural differences between tryparedoxin and thioredoxin, the homologous human enzyme, will allow the development of tryparedoxin-specific inhibitors that could combat Chagas disease and sleeping sickness originated through parasitic infection.

Structure of extracellular Glutathion-S-Transferases

Some 20 million people, predominantly living in subsaharan Africa are infected by the filarial parasite *Onchocerca volvulus*, the causative agent of onchocerciasis, which may lead to irreversible blindness. In cooperation with the Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine in Hamburg, the structure of two extracellular glutathion-S-transferases from the parasite with 4 or 5 N-glycosylation sites have been elucidated. The glycosylation pattern of these secretory proteins was characterized for each individual glycosylation site using HPLC/MS, MALDI/TOF-MS and ESI-MS/MS. The high relevance of the

glycans for the antigen recognition of the human immune system was demonstrated by comparison of the immune response for natural glycosylated and recombinant non-glycosylated proteins. The results show the importance of the correct posttranslational modification of proteins with are candidates for the development of vaccines.

Publications | Veröffentlichungen

Hofmann B, Budde H, Bruns K, Guerrero S A, Kalisz H M, Menge U, Montemartini M, Nogoceke E, Steinert P, Wissing JW, Flohé L, Hecht HJ (2001) Structures of tryparedoxins revealing interaction with trypanothione, *Biol Chem* 382:459-471.

Strukturelle Charakterisierung mikrobieller Pathogenitätsfaktoren (QF 2.4)

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

Projektmitarbeiter | *Project members*: I. Astner, M. Barzik, V. Beier, S. Ehinger, S. Frese, M. Machner, K. Schober, W.-D. Schubert, J. Moser (Gastwissenschaftler – TU Braunschweig)

Die Nachwuchsforschergruppe „Strukturelle Charakterisierung mikrobieller Pathogenitätsfaktoren“ beschäftigt sich mit der Aufklärung der Raumstruktur von Biomakromolekülen mittels Röntgenstrukturanalyse. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt auf Virulenzfaktoren aus humanpathogenen Bakterien sowie ihrer Interaktionspartner in der Wirtszelle. Darüberhinaus beschäftigen wir uns mit der Strukturaufklärung von Enzymen der bakteriellen Tetrapyrrolobiosynthese und Proteinen des eukaryontischen Zytoskeletts. Die Strukturen sollten unsere Erkenntnisse über bakterielle Infektionen auf molekularer und atomarer Ebene entscheidend vergrößern sowie eine Grundlage für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zur gezielten Bekämpfung pathogener Keime schaffen.

Virulenzfaktoren aus *Listeria 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 (Listeriose) führen. Das Bakterium verfügt über eine begrenzte Anzahl von Proteinen, sogenannter Virulenzfaktoren, die das Eindringen und die Fortbewegung der Bakterien in der Wirtszelle ermöglichen. Ziel einer Kooperation mit J. Wehland (GBF) und T. Chakraborty (Univ. Giessen) ist die Strukturbestimmung listerieller Virulenzfaktoren.

Wir konnten kürzlich die Kristallstrukturen der funktionellen Domänen mehrerer Internaline (InlB, InlE und InlH) bei hoher Auflösung aufklären (Abb. 1). Internaline vermitteln das Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle. Charakteristisches Strukturmerkmal aller Internaline ist eine einzigartige „Internalin-Superdomäne“, die eine neuartig fusionierte Immunoglobulin-Domäne enthält. Die

Internalin-Strukturen erlauben die Identifikation von Oberflächenbereichen, welche wahrscheinlich für die zellspezifische Invasion verantwortlich sind. Durch gezielten Aminosäureaustausch mittels gerichteter Mutagenese und Verwendung von Invasionsassays sind wir nun erstmals in der Lage, die Rolle einzelner Aminosäuren für die Invasion und Stabilität der Proteine zu ermitteln.



Abb. 1. Struktur der Rezeptor-Bindungsdomäne von Internalin B aus *L. monocytogenes*.

Fig. 1. Structure of the receptor-binding domain of internalin B from *L. monocytogenes*.

Das Protein ActA ist ein weiterer wichtiger listerieller Virulenzfaktor. Es ermöglicht die Bewegung der geißellosen Bakterien innerhalb der Wirtszelle durch spezifische Rekrutierung von Aktin aus dem Zytoskelett der Wirtszelle. Die zentrale Domäne des Proteins enthält vier repetitive prolinreiche Regionen (Konsensussequenz FPPPP), die spezifisch mit den EVH1-Domänen der eukaryontischen Ena/VASP-Proteinfamilie interagieren. Diese Wechselwirkungen führen zu einem signifikanten Anstieg der Aktinrekrutierung. Im Rahmen einer Kooperation mit C. Urbanke (MHH Hannover) konnte erstmals eine 1:4-Stöchiometrie für den ActA-EVH1-Komplex experimentell unter Verwendung einer analytischen Ultrazentrifuge ermittelt werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass ActA, im Gegensatz zu früher publizierten Berichten, als monomeres Protein aktiv ist.

Es gelang uns außerdem einen weiteren listeriellen Virulenzfaktor, Listeriolysin, der für das Entkommen der Bakterien aus dem Phagosom unmittelbar nach der Invasion verantwortlich ist, zu produzieren und zu reinigen. Erste Kristallisationsversuche sind im Gange. PrfA ist der zentrale transkriptionelle Aktivator des listeriellen Virulenzgenclusters. Das Protein wurde ebenfalls gereinigt und für Kristallisationsversuche eingesetzt.

Enzyme der bakteriellen Tetrapyrrolbiosynthese

Die Tetrapyrrolbiosynthese ist ein ubiquitärer und zentraler anaboler Stoffwechselweg, der zur Bildung wichtiger Tetrapyrrole, wie z. B. Häm, Sirohäm, Chlorophyll und Vitamin B₁₂ aus einfachen Vorläufermolekülen führt. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von D. Jahn (TU Braunschweig) interessieren wir uns für die Strukturanalyse von Enzymen dieses wichtigen Stoffwechselweges. Kürzlich gelang es uns die erste Kristallstruktur einer Glutaryl-tRNA-Reduktase (GluTR) aufzuklären. Das Enzym katalysiert den ersten Schritt der Tetrapyrrolbiosynthese in Pflanzen und den meisten Bakterien, die Reduktion von tRNA-aktiviertem Glutamat zu Glutamat-Semialdehyd. Der Aldehyd wird anschließend durch eine Aminomutase (GSAM) transaminiert, was

zur Bildung des ersten gemeinsamen Vorläufermoleküls aller Tetrapyrrole, Aminolävulinsäure (ALA), führt. Die dimere GluTR weist eine ungewöhnliche V-förmige Struktur auf, in der eine lange α -Helix jedes Monomer durchläuft (Abb. 2). Das aktive Zentrum konnte durch Kokristallisation des Enzyms mit dem kompetitiven Inhibitor Glutaminsäure lokalisiert werden, was uns in die Lage versetzte, den katalytischen Mechanismus des Enzyms bei atomarer Auflösung abzuleiten. Die Modellierung des Substrats Glutaryl-tRNA auf das Enzym zeigt eine hohe strukturelle Komplementarität zwischen Substrat und Enzym, welche auch die Anticodon-Region der tRNA mit einschließt. Die Struktur der GluTR legt außerdem nahe, dass vermutlich ein ternärer Komplex aus GluTR, GSAM und Glutaryl-tRNA für die effiziente Bildung von ALA verantwortlich ist.

Da sowohl GluTR als auch GSAM in Mensch und Tier nicht vorkommen, besteht ein beträchtliches Interesse an beiden Proteinen für die Entwicklung neuer Antibiotika und Herbizide.

Weitere Projekte

Das Enzym Tubulin-Tyrosin-Ligase (TTL) katalysiert die ribosomenunabhängige Tyrosinierung des C-Terminus des zytoskelettalen Proteins α -Tubulin. Da diese Tyrosinierung die Entwicklung eukaryontischer Zellen in kritischer Weise beeinflusst, ist die Strukturaufklärung des Enzyms von großem Interesse. TTL aus Schwein wurde rekombinant in *E. coli* produziert, gereinigt und kristallisiert. Eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist im Gange.

Structural Characterization of Bacterial Virulence Factors (QF 2.4)

The junior research group “Structural characterization of bacterial virulence factors” aims to determine the three-dimensional structure of biomacromolecules using X-ray crystallography. In particular we focus on virulence factors from human pathogenic bacteria as well as their interacting partners in the host cell. In addition we are interested in enzymes involved in the bacterial tetrapyrrole biosynthesis and selected eukaryotic cytoskeletal proteins. The three-dimensional structures should broaden our knowledge about bacterial infections at the atomic level and lay the foundation for the development of novel drugs against pathogenic bacteria.

Virulence factors of *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes is a human pathogen, and an established model system to study facultative intracellular bacteria.

Infection through food contamination can lead to listeriosis, an often fatal disease. The bacteria produce a limited number of proteins, so-called virulence factors, that are responsible for the penetration of the host cell and movement within the host. In collaboration with the groups of J. Wehland (GBF) and T. Chakraborty (Univ. Giessen) we aim to elucidate the structures of these proteins. We were able to determine the high resolution crystal structures of the functional domains of several internalins (InlB, InlE and InlH) (Fig. 1). Internalins mediate the invasion of the host cell by the bacteria. Common to all internalins is a structurally unique “internalin superdomain” that contains a novel domain fusion involving an immunoglobulin domain. We also identified regions at the surface of internalins that may be responsible for host-cell specific invasion. The use of site-directed mutagenesis and invasion assays will allow us to determine the role of individual amino acids in the invasion process and the stability of the proteins.

ActA is another critical virulence factor of *L. monocytogenes*. It allows for the movement of the otherwise immobile bacteria in the host cell by recruiting the host’s cytoskeletal actin. 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 (MHH Hannover) a 1:4 stoichiometry of the ActA-EVH1-complex was experimentally determined using analytical ultracentrifugation. Furthermore we were able to show that ActA is a monomeric protein in contrast to previously published reports.

We were also able to produce and purify another listerial virulence factor, listeriolysin, responsible for the escape of the bacteria from the phagosome after invasion. Crystallization trials are in progress. PrfA is the central transcriptional regulator of the listerial virulence gene cluster. The protein was purified and subjected to first crystallization trials.

Enzymes of the bacterial tetrapyrrole biosynthesis

The tetrapyrrole biosynthesis is a ubiquitous and central anabolic pathway leading to the formation of essential tetrapyrroles such as heme, siroheme, chlorophyll and vitamin B₁₂ from simple precursors. In collaborating with the group of D. Jahn (TU Braunschweig) we focus on the elucidation of the 3D-structures of enzymes belonging to this pathway. Recently, we have solved the first crystal structure of a glutamyl-tRNA-reductase (GluTR). This enzyme catalyzes the first step of tetrapyrrole biosynthesis in plants and most bacteria, the reduction of a tRNA-activated glutamate to glutamate-semialdehyde. The aldehyde is subsequently transaminated by an aminomutase (GSAM) to yield the common precursor of all tetrapyrroles, aminolevulinic acid. The dimeric GluTR has an unusual V-like shape dominated by a long curved α -helix running through each monomer (Fig. 2). The active site was located by cocrystallizing the enzyme with the competitive inhibitor glutamycin. We were thus able to derive the

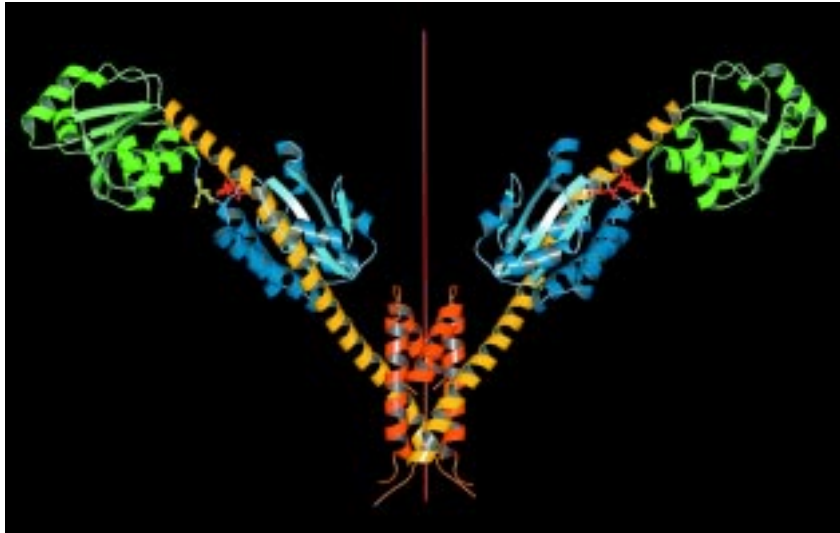


Abb. 2. Struktur der Glutamyl-tRNA-Reduktase aus *Methanopyrus kandleri*.

Fig. 2. Structure of glutamyl-tRNA-reductase from *Methanopyrus kandleri*.

catalytic mechanism at atomic resolution. Modeling of the substrate glutamyl-tRNA showed a striking structural complementarity between the large substrate and the enzyme that also includes the anticodon region of the tRNA. Based solely on the structure of GluTR, we also hypothesize that GluTR, GSAM and glutamyl-tRNA form a ternary complex to efficiently catalyze the first two steps of tetrapyrrole biosynthesis. As humans and animals do not have GluTR and GSAM, these proteins are of considerable interest as targets for the development of novel antibiotics and herbicides.

Other projects

The enzyme tubulin-tyrosine ligase (TTL) catalyzes the non-ribosomal tyrosination of the C-terminus of cytoskeletal α -tubulin. Because of the critical correlation between tubulin tyrosination and cell development, structure-function studies on this unusual enzyme are of great interest. Porcine TTL was recombinantly produced from *E. coli* and purified. We are presently optimizing crystallization conditions to produce larger crystals of the protein.

Publications | Veröffentlichungen

Barzik M, Schubert W-D, Carl UD, Wehland J, Heinz DW (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of Vesl-2b. *Acta Crystallogr Section D* 56:930-932.

Barzik M, Carl UD, Schubert W-D, Frank R, Wehland J, Heinz DW (2001) The N-terminal domain of Homer/Vesl is a new class II EVH1 domain. *J Mol Biol* 309:155-169.

Schubert W-D, Göbel G, Diepholz M, Darji A, Kloer D, Hain T, Chakraborty T, Wehland J, Domann E, Heinz DW (2001) Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* contain a fused superdomain structure. *J Mol Biol* 312:783-793.

Schubert W-D, Göbel G, Kloer D, Chakraborty T, Wehland J, Domann E, Heinz DW (2001) Crystal structure of the conserved core of internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Nova Acta Leopold Supp* 16:29-31.

Machner MP, Urbanke C, Barzik M, Otten S, Sechi A S, Wehland J, Heinz DW (2001) ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology domains simultaneously. *J Biol Chem*, in press

Moser J, Schubert W-D, Beier V, Bringemeier I, Jahn D, Heinz DW (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA-reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J*, in press

Co-operations | Kooperationen

Prof. Dr. G. S. Chhatwal, Dr. S. Hammerschmidt, Dr. M. Probst-Kepper, Prof. Dr. J. Wehland, Dr. S. Weiss (GBF); Prof. Dr. D. Jahn, Prof. Dr. B. Jockusch (TU Braunschweig); Prof. Dr. T. Chakraborty (Univ. Giessen); Prof. Dr. C. Urbanke (MHH Hannover); Prof. Dr. R. Seckler (Univ. Potsdam).



TU Lehrstuhl für Physiologische Chemie in der GBF

Mitarbeiter | *Members*: M. Bittner, H. Budde, M. Comini, B. Hofmann, T. Jäger, H. Kollmus, U. Menge, S. Pilawa, K. Plank-Schumacher, M. Singh, H. Sztajer, S. Tschurz, J. Wissing, C. Wylegalla

Die Abteilung Biochemie der Technischen Universität Braunschweig, die von der GBF beherbergt und teilfinanziert wird, beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Identifizierung, Herstellung, Charakterisierung und Validierung molekularer Targets für die Wirkstoffsuche. Konkret werden Enzymsysteme untersucht, die der Utilisation oder Detoxifikation von Peroxiden dienen. Die Zielfelder umfassen die Steuerung der männlichen Fertilität und die Therapie von Infektionskrankheiten.

Leiter | *Leader*: Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé | Arb. Gr. Chemische Mikrobiologie | *Res. Group of Chemical Microbiology*

Selenbiochemie: Sex und Selen Projektleiter

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Im vorangegangenen Band berichteten wir über unsere überraschende Entdeckung, dass die Mitochondrienkapsel im Mittelstück von Spermatozoen bis zu 50 % aus dem Selenprotein Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PHGPx) besteht. Während der letzten Schritte der Spermienreifung wird PHGPx aus einer löslichen aktiven Peroxidase in ein enzymatisch inaktives Strukturprotein umgewandelt (Ursini F et al. (1999) *Science* 285:1393-96). Der Mechanismus dieser Metamorphose konnte zwischenzeitlich zum Teil aufgeklärt werden: In der Endphase der Spermatogenese oxidiert PHGPx mit Hilfe von Peroxiden Proteinthiole anstatt Glutathion und bildet so ein dreidimensionales Netz oxidierter Proteine. Die

Relevanz der PHGPx für die männliche Fertilität wurde erhärtet durch inverse Genetik bei Mäusen (berichtet von M. Brielmeier, GSF, anlässlich „Selenium 2000“ in Venedig) und Studien zur Korrelation von PHGPx-Gehalt und Fertilitätskapazität menschlicher Spermien [Kooperation mit F. Ursini, Universität Padua]. (Abb. 1)

Oxidationsschutz in pathogenen Protozoen Projektleiter

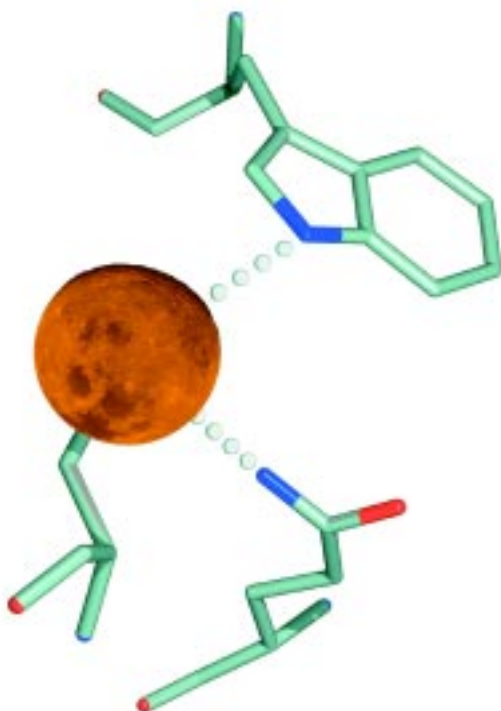
Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

Das Trypanothion-vermittelte Oxidationsschutzsystem, das wir 1997 in dem Insektenpathogen *Crithidia fasciculata* entdeckten, wurde in human- und tierpathogenen Trypanosomatiden wie *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani*, *L. major* und *L. infantum* nachgewiesen. Der Stoffwechselweg wurde anderenorts als essentiell für die Vitalität und Virulenz von *T. brucei* belegt.

Eine repräsentative Auswahl beteiligter Enzyme, z. B. Tryparedoxine und Tryparedoxin-Peroxidasen, wurde gentechnisch für funktionelle und strukturelle Studien hergestellt, um rationales Inhibitor-Design vorzubereiten. Die molekulare Interaktion von Tryparedoxinen mit Trypanothion wurde durch gezielte molekulare Mutagenese, Modellierung und Röntgen-Strukturanalyse aufgeklärt. Mit ähnlichen Vorgehensweisen wurde die katalytische Triade der Tryparedoxin-Peroxidasen, in der ein Cystein durch ein Arginin und

Abb. 1. Selen, das Element des Mondes, im Zentrum der katalytischen Triade der Glutathion-Peroxidasen [nach L. Flohé: *Biospektrum* (2) 2000, 112]

Fig. 1. Selenium, the element of the moon, in the center of the catalytic triad of glutathione peroxidases [adapted from L. Flohé: *Biospektrum* (2) 2000, 112]



Wasserstoffbrücken-Bindung mit der Hydroxylfunktion eines Threonins oder Serins aktiviert wird, aufgeklärt [Kooperation mit H. J. Hecht, GBF, A. Tomas, Universität Porto, und W. Colli, Universität São Paulo]. (Abb. 2)

Ein Gen des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum*, das nach Sequenzhomologie für eine typische Glutathion-Peroxidase kodieren sollte, wurde in *E. coli* exprimiert. Die Untersuchung von Effizienz und Spezifität des Enzyms ergab ein weiteres Beispiel funktioneller Diversifikation in der molekularen Evolution: Das vermeintliche Glutathion-Peroxidase-Gen kodierte für ein Thioredoxin-Peroxidase [Kooperation mit Ch. Slomianny, Institute Pasteur, Lille].

Antigene und Virulenzfaktoren pathogener Mykobakterien

Projektleiter

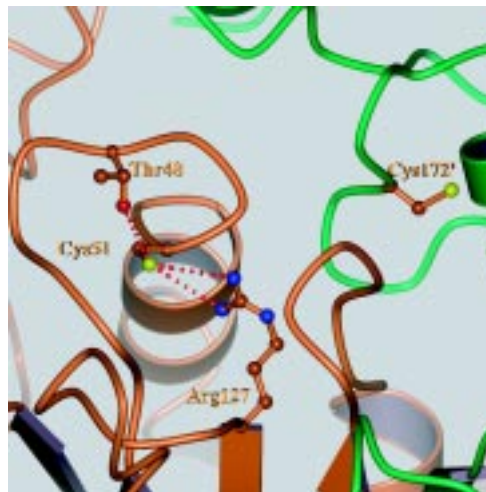
Prof. Dr. M. Singh

Putative Komponenten des Antioxidationsystems von Mykobakterien wie AhpC und Mykothiol-Reduktase wurden kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung von Mykothiol und der Mykothiol-Reduktase wird zur Zeit durchgeführt (DFG-Projekt). In einem EU-Projekt (TB-Vakzinentwicklung) wurden drei Protein- und zwei DNA-Vakzin-Kandidaten aufgereinigt und als Endotoxinfreie Präparate hergestellt. Diese Vakzinkandidaten werden zur Zeit von unseren Partnern in Mäusen getestet.

Veröffentlichungen | Publications

da Fonseca DP, Frerichs J, Singh M, Snippe H, Verheul AF (2000) Induction of antibody and T-cell responses by immunization with ISCOMS containing the 38-kilodalton protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 19:122-131.

Flohé L, Andreesen J R, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Ursini F (2000) Selenium, the Element of the Moon, in Life on Earth. *IUBMB Life* 49:411-420.



Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJM, Flohé L (2000) His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:410-414.

Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohé L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz HM, Nogoceke E, Singh M, Alves MJM, Colli W (2000) Evidence for a Trypanothione-dependent Peroxidase System in *Trypanosoma cruzi*. *Free Rad Biol Med* 28:767-772.

Hofmann B, Budde H, Bruns K, Guerrero SA, Kalisz HM, Menge U, Montemartini M, Nogoceke E, Steinert P, Wissing JB, Flohé L, Hecht H-J (2001) Structures of Tryparedoxins Revealing Interaction with Trypanothione. *Biol Chem* 382:459-471.

Jepson A, Fowler A, Banya W, Singh M, Bennett S, Whittle H, Hill AV (2001) Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: a study of twins in West Africa. *Infect Immun* 69:3989-3994.

Sztajer H, Gamain B, Aumann K-D, Slomianny C, Becker K, Brigelius-Flohé R, Flohé L (2001) The Putative Glutathione Peroxidase Gene of *Plasmodium falciparum* Codes for a Thioredoxin Peroxidase. *J Biol Chem* 276:7397-7402.

Abb. 2. Die neuartige katalytische Triade von Peroxiredoxinartigen Peroxidasen. In der N-terminalen Domäne der Tryparedoxin-Peroxidase von *L. donovani* bildet Cys 52 eine Wasserstoffbrücke mit Thr 48 und wird elektrostatisch durch Arg 128 aktiviert. In dieser Triade wird Cys 52 durch H_2O_2 zu einem Derivat der unterschwefligen Säure oxidiert, das dann mit Cys 172 einer zweiten Untereinheit zur oxidierten Peroxidase reagiert [unveröffentlicht].

Fig. 2. A novel catalytic triad as is typical of peroxiredoxin-type peroxidases: In the N-terminal domain of tryparedoxin peroxidase of *L. donovani* Cys 52 is hydrogen-bonded to Thr 48 and electrostatically activated by Arg 128. In this triad the Cys 52 is oxidized by H_2O_2 to a sulfenic acid derivative which then reacts with Cys 172 of a second subunit to form the oxidized peroxidase [unpublished].

GBF Hosted Department of Physiological Chemistry of TU Braunschweig

The Department of Biochemistry of the Technical University of Braunschweig, which is hosted and partially financed by the GBF, is essentially engaged in identification, production, characterisation and validation of molecular targets for drug discovery. More precisely, enzymatic systems in charge of utilisation and detoxification of peroxides, are investigated. The fields of potential applications comprise the manipulation of male fertility and the therapy of infection diseases.

Selenium Biochemistry: Sex and Selenium

Project leader

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

In the 1999/2000 issue we had reported on our surprising finding that the mitochondrial capsule in the midpiece of spermatozoa consists up to 50 % of the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). During the final steps of sperm maturation PHGPx is transformed from a soluble active peroxidase into an enzymatically inactive structural protein. (Ursini F et al. (1999) Science 285:1393-1396). The mechanism of this "moon-lighting" process could meanwhile be partially elucidated: During late spermatogenesis PHGPx oxidizes protein thiols instead of glutathione at the expense of hydroperoxides to generate a threedimensional network of oxidatively cross-linked proteins. The relevance of PHGPx to male fertility could be supported by inverse genetics in mice (reported by M. Brielmeier, GSF, at Selenium 2000 in Venice) and studies on the correlation of PHGPx content and fertilisation capacity of human sperm [cooperation with F. Ursini, Università di Padova]. (Fig. 1)

techniques for functional and structural studies to pave the road for rational inhibitor design. The molecular interaction of trypanothione with trypanothione was elucidated by combination of site-directed mutagenesis, molecular modelling and x-ray crystallography. By related techniques the catalytic triad of trypanothione peroxidases was shown to be built up by a cysteine residue activated by a neighbouring arginine and by hydrogen bonding of the hydroxyl function of a threonine or serine residue [cooperation with H. J. Hecht, GBF, A. Tomas, University of Porto, and W. Colli, University of São Paulo]. (Fig. 2)

A gene of the malaria parasite Plasmodium falciparum gene presumed, according to sequence homology, to encode a typical glutathione peroxidase was expressed in E. coli: Investigation of efficiency and specificity of the enzyme revealed another example of functional diversification in molecular evolution: The putative glutathione peroxidase gene encoded a thioredoxin peroxidase [cooperation with Ch. Slomianny, Inst. Pasteur, Lille]

Antioxidant defense in pathogenic protozoa

Project leader

Prof. Dr. Dr. h.c. L. Flohé

The trypanothione – mediated antioxidant defense system that had been discovered by us in 1997 in the insect-pathogen Crithidia fasciculata was demonstrated to be operative in trypanosomatids pathogenic to man and life stock such as Trypanosoma cruzi, T. brucei brucei, T. brucei rhodesiense, Leishmania donovani, L. major and L. infantum. The pathway has elsewhere been validated as to be pivotal for vitality and virulence of T. brucei brucei.

A representative set of involved enzymes, in particular trypanothione and trypanothione peroxidases, were prepared by recombinant

Antigens and virulence factors of pathogenic mycobacteria

Project leader

Prof. Dr. M. Singh

Several putative components of mycobacterial anti-oxidative defense system have been cloned and expressed in E.coli. Prominent among these are AhpC and mycothiol reductase. Purification of mycothiol and mycothiol reductase is in progress (DFG-funded). In an EU-funded project, several vaccine candidates have been identified for nasal vaccination against tuberculosis. DNA and proteins of the vaccine candidates have been purified as highly homogeneous, endotoxin-free preparations which are currently being tested in mice by our partners.

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.

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 stucture 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 microorganism 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 weitestgehend im Unterauftrag für Klienten aus der pharmazeutisch-chemischen- und Biotech-Industrie F&E-Projekte durch. Dabei handelt es sich um die Bearbeitung vornehmlich bioverfahrenstechnischer- und arzneimittelrechtlicher Fragestellungen, die im Rahmen der Herstellung neuer zumeist rekombinanter Pharmawirkstoffe auftreten. Es gilt dabei die arzneimittelrechtlichen Anforderungen, insbesondere aber das Qualitätssicherungssystem „Gute Herstellungspraxis“ (GMP) auf Herstellungsprozesse abzubilden. Das Leistungsspektrum beinhaltet

- die Optimierung und Maßstabsvergrößerung von Kultivierungsverfahren mit Mikroorganismen und tierischen Zellen,
- die Entwicklung präparativer Reinigungsverfahren für rekombinante Proteine und Nukleinsäuren,
- die Entwicklung und Validierung von

analytischen Verfahren für InProzesskontrollen sowie Produktfreigabe,

- die Validierung von einzelnen Prozessschritten innerhalb von Biotech-Herstellungsverfahren sowie
- die entsprechende Validierung des Gesamtprozesses (Konsistenz).

Soweit erforderlich erfolgen die Arbeiten unter der Berücksichtigung des GMP-Reglements mit einer Herstellungserlaubnis gem. § 13 des Arzneimittelgesetzes (AMG). So hergestellte Wirkstoffe können anschließend damit zu klinischen Prüfmustern weiterverarbeitet werden.

Mit dem Institut für pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig besteht eine enge Zusammenarbeit, über die es möglich ist, auch Fragestellungen der Stabilitätstestung, Formulierung und galenischen Entwicklung zu bearbeiten. Kleinstmengen von Darreichungsformen (Klinikprüfmuster) können hergestellt werden.

GMP Unit

The GMP pilot plant group (s. a. QF 1.3) carries out R&D projects predominantly for clients in the pharmaceutical and biotech industries. Generally, these projects focus on biochemical engineering and regulatory questions encountered in the production of novel, usually recombinant pharmaceutical substances. Such projects are carried out within the legal requirements for pharmaceutical development, especially with respect to “Good Manufacturing Practice” (GMP). The service spectrum includes

- *optimisation and scale up of cultivation steps with microbial and animal cells,*
- *development of preparative purification schemes for recombinant proteins and nucleic acids,*
- *development and validation of analytical methods for in-process and final product controls,*

- *validation of single steps within the production process, and*
- *validation of the whole process (consistency).*

The work is done unter GMP rules when required. The substances produced can subsequently be formulated and used within clinical studies.

Strong contacts exist between the group and the “Institut für pharmazeutische Technologie“ at the Technical University of Braunschweig which enable questions on stability, formulation and galenic development to be addressed. Small volumes of substances for clinical trials can be produced.

Instrumentelle Analytik

Leiter | *Leader*: **Dr. V. Wray** | Abt. Strukturforschung | *Dept. of Structure Research*

Mitarbeiter | *Members*: U. Beutling, R. Christ, H.-J. Hecht, H. Kalisz, M. Nimtz

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.

Ein Schwerpunkt der makromolekularen Forschung liegt auch 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. Derzeit wird an der Miniaturisierung der genannten Techniken gearbeitet, um selbst mit dem aus 2D Gelen isolierten Glykoproteinmaterial noch strukturelle Daten des Oligosaccharid-Anteils zu erhalten. Als weiterer Schwerpunkt wurde im vergangenen Jahr die massenspektrometrische Mikrotechnik zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen aus 2 D Gelen („Proteomics“) anhand des Molekulargewichts ihrer proteolytischen Fragmente mittels MALDI/TOF-MS weiter intensiv genutzt und die Automatisierung der Arbeitsabläufe vorangetrieben. Falls durch diese Technik keine eindeutige Identifizierung von Gel-Spots möglich war, wurde die massenspektrometrische (Partial)-Sequenzierung dieser Peptidfragmente aus der ungereinigten proteolytischen Mischung mittels ESI-MS/MS routinemäßig eingesetzt (Qtof 2), was insbesondere für nicht homogene Protein-Spots bzw. modifizierte Proteine die beste Möglichkeit zur Charakterisierung darstellt.

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 (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 Aminosäu-

ren. Proteine, die N-terminal blockiert sind bzw. von denen zusätzliche interne Sequenzen benötigt werden, werden 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 aus der Peptidsynthese, die Identifizierung von Peptiden aus proteolytischen Maps anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung, und der Nachweis N-terminaler Blockierungen.

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 Daltons, 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 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 mono-saccharide units (methylation analysis). The miniaturisation of the above techniques to allow the extraction of information about the oligosaccharide moiety of glycoproteins even with the minute amounts of material extracted from 2D gels was a major target in 2000. Furthermore, a pronounced effort for the automatisisation of MS micro-techniques 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 has been initiated. In those cases where unambiguous identification of the gel-spots was not possible, partial MS-sequencing of these from unpurified proteolytic mixtures has been routinely performed using ESI-MS/MS (Qtof 2). This is the best way for the identification and characterisation of heterogenous or modified protein spots.

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 section 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-Institutes/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.

Protein Sequencing:

N-terminal protein sequencing is performed by automated Edman degradation on PE-Applied Biosystems sequencers (Procise 494A and 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 which 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 2000

2000	NMR	MS	SEQ
Untersuchte Proben <i>No. of samples analysed</i>	3267	6480	646 ^a
% Auslastung durch GBF <i>% Internal GBF useage</i>	71,1	99,4	98,6
% Auslastung durch Kunden <i>% External useage</i>	28,9	0,6	1,4
Anzahl der GBF-Kunden <i>No. of GBF customers</i>	41	75	61
Anzahl externer Institute <i>No. of External Institutes^b</i>	12	5	2
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

^a Proteinsequenzierung 461 Proben mit 7627 Abbauschritten, sowie 185 Proben mit 1106 Aminosäureanalysen. | *Protein sequencing of 461 samples with 7627 cleavages, as well as 185 samples with 1106 amino acid analyses.*

^b Proben folgender Institute wurden 1999 untersucht: | *Samples from the following institutes were investigated in 2000:* Berlin Technische Hochschule, Humboldt-U. Institut für Biochemie, Institut für Pharmazie; Braunschweig TU-Institut für Anorganische Chemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Institut für Botanik, Institut für Lebensmittelchemie, Institut für Organische Chemie, Institut für Pharmazeutische Biologie, Lehrstuhl für Physiologische Chemie, DSM, Zucker Institut; Dresden U-Klinikum-Institut für Immunobiologie; Düsseldorf U-Institut für Pharmazeutische Biologie; Giessen U-Veterinär-Institut für Biochemie/Endokrinologie; Greifswald U-Institut für Pharmazie; Halle Institut für Pflanzenbiochemie; Hamburg Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Heinrich-Pette-Institut; Hannover MHH, Tierärztliche Hochschule; Münster Institut für Pharmazeutische Biologie u. Phytochemie; Paderborn U-Gesamthochschule; Würzburg U-Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie.

Rechenzentrum

Leiter | *Head*: Dr. N. Bedorf

Mitarbeiter | *Members*: K.-D. Aumann, R. Christ, W. Lehnberg, U. Leuner, D. N. Lincoln, J. Reichelt, E. Zimmermann

Internetzugang

Anfang Juli 2000 wurde das neue deutsche Forschungsnetz (Gigabit-Wissenschaftsnetz; kurz G-Win) in Betrieb genommen. Der Anschluss der GBF an diese dem amerikanischen Internet-2 vergleichbare Infrastruktur erfolgte im August 2000.

Zur Zeit nutzt die GBF eine Übertragungsrates von 34 Mbit/sec bei einem maximalen Volumen von 330 Gigabyte/Monat.

Zur Realisierung des Anschlusses wurden sämtliche Komponenten der Internet-Anbindung, Wanrouter, Firewall, Mailserver, externer und interner Webserver und Modemserver, schrittweise durch aktuelle Hard- und Software ersetzt. Als Betriebssystem dieser Server setzen wir Suse Linux ein. Die Webserver-, die Proxyserver- und die Mailserver-Software sind 'open Source' Produkte.

Die Netzwerkanbindung der beteiligten Systeme untereinander erfolgt per Fast-Ethernet mit einem FDDI-Uplink zum Backbone der GBF.

Zentralserver

Die zentralen Fileserver (Neon) 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 möglich.

Datenbankserver

Zwei der Terminalserver für die PC Datenbanken - Current Contents, Medline, Römpf, Duden u.a. - wurden gegen Doppelprozessor PCs PIII 500 512MB Arbeitsspeicher ausgewechselt, bei zwei weiteren Terminalservern wurde der Pentium Pro Prozessor 200 MHz gegen Celeron 500 getauscht. Gleichzeitig wurde die Plattenkapazität aller Terminalserver vergrößert, so dass fast alle Datenbanken jetzt von schnellen Festplatten und nicht mehr von CDs betrieben werden.

Das Antwortverhalten dieser Server, insbesondere unter der Last simultaner Zugriffe, konnte hiermit deutlich verbessert werden.

Schulungsraum

Im letzten Jahr konnten wir einen neuen Raum für das hausinterne (Computer)-Schulungsprogramm beziehen. Der Raum ist mit 13 Pentium III PCs, LCD-Monitoren, einem Beamer und einem interaktiven Lernsystem (Schüler-Lehrer Display Steuerung) ausgestattet.

Computing Centre

Internet access

The new German Research Network (Gigabit-Wissenschaftsnetz, abbrev. G-Win) was put in operation in July 2000. This network is similar to the American internet-2. The connection of the GBF followed in August 2000.

Currently the GBF uses a transfer rate of 34 Mbit/sec with a maximum volume of 330 Gigabyte/month.

To implement the connection, various internet components - the wan router, firewall, mail server, external and internal web servers, and modem server were replaced stepwise. Suse Linux was installed as the operating system in these servers. The web server, the proxy server, and the mail server are open-source products. These components are interconnected by fast-ethernet with a FDDI uplink to the GBF backbone.

File Server

After 6 years of operation the central file server (Neon) was unable to meet the increasing demand. As a replacement, a double-processor Alpha computer was acquired - a Compaq ES40 - with 2 Gbyte main-memory and 500 Gbyte disk capacity in a RAID-subsystem. The operating system is currently VMS 7.2 with the PC server Pathworks installed. On this hardware it is also possible to change the operating system to Tru64 Unix or to Linux.

Database Server

Two of the terminal servers for the PC databases – Current Contents, Medline, Römpf, Duden, etc. – were upgraded to double-processor Pentium III PCs with 512 Mbyte memory. On two other terminal servers, the 200 MHz Pentium Pro processors were upgraded to 500 MHz Celeron processors. At the same time the disk capacity of all the terminal servers was increased so that almost all databases are now accessed from fast disks rather than from CDs. The response time of these servers, especially with simultaneous access load, was thereby significantly improved.

In-house Training

In the last year we were able to obtain a new room for the in-house (computer) training programme. The room is equipped with 13 Pentium III PCs, LCD monitors, a beamer, and an interactive study system (student-teacher display control).

Herr Aumann bei der Überprüfung des Zentralrechners.

Mr Aumann controlling the Computer Systems.



Wissenschaftliche Information und Bibliothek

Leiter | *Head*: Prof. Dr. Jonas

Mitarbeiter | *Member*: K. Eckhoff, M. Hermes, M. Kirchner, A. Plähn, J. Scriven, H. Steinke

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 Jahres 2000 13.160 Monographien, 21.950 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 598 und bei den Zeitschriften 895 Bände.

Fernleihe

Durch die Nutzung elektronischer Dokumentenliefersysteme wie Subito oder GBV-direkt wurden die Lieferzeiten für die über die Fernleihe zu beschaffende Literatur drastisch verkürzt. In deutschen Lieferbibliotheken nicht vorhandene Literatur wird von der Bibliothek über den Dokumentenlieferdienst der British Library beschafft. Von den insgesamt ca. 5.000 Fernleihbestellungen wurden ca. 60% über die Bibliothek aufgegeben. In der aktiven Fernleihe wurden 240 kopierte Artikel an andere Bibliotheken versandt.

Bibliotheksinformationssystem

Das integrierte Bibliotheksinformationssystem Bibliotheca2000 wurde im Berichtszeitraum vollständig etabliert, so dass heute alle Module, also Katalog, Erwerbung, Verbuchung und Periodikaverwaltung, für die Bibliotheksverwaltung eingesetzt werden.

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 hat die GBF somit auch Zugriff auf zahlreiche nicht abonnierte Zeitschriften, so dass die Online-Zeitschriftenliste der Bibliothek im Intranet ca. 600 fachlich relevante Zeitschriften verzeichnet.

Die Nutzung der Online-Zeitschriften ist sehr intensiv. Auf dem Server von Academic Press war die GBF im Berichtszeitraum bei der Anzahl der heruntergeladenen Artikel führend unter allen HGF-Einrichtungen.

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 13,160 monographs, 21,950 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 2000 598 monographs were acquired and 900 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 nearly 5,000 interloan orders in 2000. About 60 % were processed by the library staff. 240 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 600 subject relevant journals.

The online journals are heavily used by the GBF staff. By the number of article downloads the GBF was on top of HGF institutes on the Academic Press IDEALibrary server.

Die Bibliothek als Informationsquelle für wissenschaftliche Neuigkeiten.

The library as source for latest scientific information.



GBF-FORUM

Ende August 2000 wurde das GBF-FORUM nach knapp zehn Monaten Bauzeit eröffnet. Damit wurde einem seit langem bestehenden Bedarf der GBF Rechnung getragen, ein multiflexibles Konferenzzentrum, das auch für Ausstellungen geeignet ist, Rechnung zu tragen. Das GBF-FORUM wurde seitens der verschiedenen Arbeitsgruppen der GBF sehr gut

angenommen. Außerdem fanden bereits etliche internationale Tagungen und Veranstaltungen von Wirtschaftsunternehmen der Biotech-Branche statt. Das GBF-FORUM kann für Vorträge, Tagungen, Ausstellungen von Wissenschaft und Wirtschaft, Präsentationen, etc. genutzt werden (Frau Claudia Krone, eMail: ckr@gbf.de).

GBF-FORUM

The GBF-FORUM was inaugurated after nearly 10 months construction time at the end of August 2000. This was an important step as the GBF hadn't possessed such an infrastructure. Now it has become possible to use this multiflexible conference centre for meetings, presentations as well as exhibitions. The various groups at the GBF immediately

started to use the FORUM. But also international meetings and events from biotech-industries took place since its inauguration. The GBF-FORUM can be used for lectures, meetings, exhibitions, presentations, events, etc. (Mrs. C. Krone, eMail: ckr@gbf.de).

Nutzung des GBF-FORUMS | Use of GBF-FORUM

Zeitraum <i>Period</i>	IX –XII 2000	I-VI 2001
Arbeitstage <i>Working days</i>	82	123
Tage der Nutzung <i>Days of use</i>	72 (87,8%)	119 (96,7%)
Veranstaltungen <i>Events</i>	163 (2,26/d)	298 (2,5/d)

Seite 167/168
Vortrag im GBF-FORUM
während des Symposiums
„Bioconversion von
Nachwachsenden
Rohstoffen“, Sept. 2000

*Page 167/168
Lecture in the GBF-FORUM
during the Symposium
"Bioconversion of Raw
Materials", Sept. 2000*

Tagungen, Kurse und Lehrveranstaltungen | *Meetings, Courses and Lectures*

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 2000/2001 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.

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 2000/2001 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.

Kurse | *Courses*

ITP | *ITP*

International Training Programme in Biotechnology (ITP): Der 14. Kurs des "International Training Programme in Biotechnology" fand vom 23. Oktober 2000 bis 6.12.2000 in der GBF statt. Schwerpunkt des Kurses, der unter der Leitung von Dr. Ross mit Unterstützung seiner Kollegen aus der Bioverfahrenstechnik und anderen Bereichen der GBF durchgeführt wurde, war eine Einführung in die industrielle Biotechnologie. Teilnehmer waren 15 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.

International Training Programme in Biotechnology (ITP): The fourteenth ITP course "Introduction to Industrial Biotechnology" took place in the GBF from 23 October - 6 December 2000 under the directorship of Dr. Ross. He was supported by scientists from the biochemical engineering division and by leading scientists of the GBF.

There were 15 participants from Asia, Africa and Latin America. One of the purposes of the course is to enable participants to become acquainted with biotechnological research in Germany. The course also acts as a starting point for scientific collaboration in both basic and applied research.

CDG-Kurs für junge Wissenschaftler aus ASEAN-Ländern | *CDG-Programme: Training for Biotechnologists from ASEAN Countries*

Im Jahr 2000 fand zum zweiten Mal im Rahmen eines gemeinsamen Förderprogramms der Carl Duisberg Gesellschaft (CDG), der GBF, der BioRegion, und der Zentralstelle für Arbeitsvermittlung (ZAV) ein Trainingsprogramm für Biotechnologen aus den ASEAN Ländern (Thailand, Malaysia, Indonesien, Philippinen, Vietnam) an der GBF statt. 19 junge Wissenschaftler von Universitäten und aus der Industrie erhielten nach einem intensiv-Deutschkurs eine „Einführung in Moderne Methoden in der Biotechnologie“. Der Kurs dazu wurde vom 19. Juni-14. Juli 2000 an der GBF gehalten. Anschließend gingen die Wissenschaftler zu einem mehrmonatigen Weiterbildungsaufenthalt in Biotech-Industrien und Forschungslaboratorien im Raum der BioRegion. Im Herbst 2000 erhielten sie

dann noch einen 14-tägigen Intensivkurs in Technologietransfer an der GBF sowie eine Einführung in Biotech Management an der CDG. Ein Besuch auf der EXPO im Rahmen der Konferenz – Bioconversion of Renewable Raw Materials – fand auch statt.

Im Jahr 2001 startete der 3. Kurs im Rahmen dieses Förderprogramms. Vom 2. Mai bis 1. Juni 2001 fand hierzu der Kurs „Einführung in die Moderne Biotechnologie“ an der GBF statt.

This training programme is a joint venture with the Carl Duisberg Gesellschaft (CDG), the GBF, BioRegion and the Central Placement Office (ZAV); it was held for the second time in 2000. 19 young scientists from universities and from industry in Thailand, Malaysia, Indonesia, the Philippines and Vietnam took part. A course entitled "Modern Methods in Biotechnology" was held at the GBF as a theoretical introduction to industrial biotechnology from 19 June-14 July 2000. There were lectures, seminars, demonstrations and excursions. After the course the participants undertook practical training in firms in the BioRegion or in research institutes. In September 2000 the participants had the opportunity to take part in the conference "The Bioconversion of Renewable Raw Materials" which was held jointly at EXPO and in the GBF. The participants also underwent a 2-week training course in technology transfer at the GBF and the training programme ended with a management workshop dealing with aspects of management competence at the CDG in Cologne.

The third programme in the series started in March 2001 with a 6-week intensive German course and this was followed by an Introduction to Modern Biotechnology Course at the GBF from 2 May-1 June 2001.

Fortbildung | Internal Training Programmes

Das interne Fortbildungsprogramm erscheint in zwei Ausgaben pro Jahr. Eingebunden in das Fortbildungsprogramm der GBF sind zahlreiche Schulungen aus dem IT-Bereich. Neben der Vielzahl von IT-Seminaren werden u.a. Kurse aus den Bereichen Kommunikation, Sprachen und GBF-Spezifisches angeboten. Alle Seminare finden ausschließlich in den Räumlichkeiten der GBF statt. Für die IT-Schulungen steht ein eigener fest eingerichteter Schulungsraum mit 12 Arbeitsplätzen zur Verfügung. Für die Schulungen im Umgang mit Standard-Software sowie vertiefende Kurse wird überwiegend eigenes Personal eingesetzt, für speziellere Themen meist externe Dozenten verpflichtet. Das Seminarangebot orientiert sich z. T. an der Nachfrage der Mitarbeiter und z.T. an der Notwendigkeit der Durchführung bestimmter Schulungen.

Grundsätzlich dient das Schulungskonzept dazu, die Lernfähigkeit und Motivation der Mitarbeiter zu verbessern sowie die Flexibilität und Mobilität der Mitarbeiter zu erhöhen.

The internal training programme is published twice a year. Incorporated into the GBF's training programme are numerous activities from the IT domain. In addition to a large number of IT workshops, courses in the fields of communication, languages and specific GBF activities are also offered. All workshops take place exclusively on the premises of GBF. For the IT training courses, a specially equipped room is available with 12 workstations. The training courses in handling standard software as well as in-depth courses are mainly held by GBF staff, whereas external instructors are generally engaged for more specific topics. The workshops offered are in part oriented to the demand by staff members and in part to the necessity of organizing certain training courses.

The training concept basically serves to improve the learning ability and motivation of staff members and to increase their flexibility and mobility.

Lehrveranstaltungen von GBF-Mitarbeitern | *Teaching Engagements by GBF Employees*

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.

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.

Tagungen und Kolloquien | *Meetings and Lectures*

Mit der Inbetriebnahme des neuen GBF-FORUMs im September 2000 wurden Tagungen, Kolloquien und Bereichsseminare in verstärktem Maße wieder durchgeführt.

From September 2000 after the inauguration of the GBF-FORUM meetings, lectures and internal seminars were held more regularly.

- | | |
|--------------|--|
| 23.-25.05.00 | 1 st International Symposium on Synthesis, Screening and Sequencing, Special Event at the AICHEMA 2000 in Frankfurt. DECHEMA, R. Frank, member of international scientific committee |
| 09.-12.07.00 | 2 nd International Symposium: Biotechnology for Conservation of the Environment (Registered Project of the World Exposition, Germany), Munster (D. Blohm, W.-R. Abraham, R. Dierstein) |
| 18./20.09.00 | BMBF-ICMR Joint Project: Indo-German Workshop on Tuberculosis (Prof. Dr. G. S. Chhatwal, GBF) |
| 25.-28.09.00 | Internationales Symposium „Biokonversion von Nachwachsenden Rohstoffen/Bio-conversion of Renewable Natural Resources“, 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 (Prof. Jonas, GBF) |
| 29.09.00 | Workshop INCO Projekt „PHA production from sugar cane derivatives“, gefördert durch EU (Profs. Steinbüchel, Universität Münster; Jonas, GBF) |
| 06.-08.00 | Fortbildungsveranstaltung „Gentechnik-Sicherheitsverordnung“ (GenTSV), (Dr. E.Grund) |
| 10.01.01 | Workshop: Microarray, Bioinformatics and Lab-on-a-Chip Technology, Agilent Technologies Europe and R. Frank |
| 19.-21.03.01 | Workshop: Submit 3 – The Annotation software used by TIGR (The Institute of Genome Research), Braunschweig, Germany (S. Heim, GBF) |
| 13.06.01 | Workshop: Microarrays und Bioinformatik bei MWG-Biotech |
| 13.08.01 | Workshop: National Health and Medical Research Council Australia und GBF: NHMRC-GBF Workshop on Streptococci (Prof. Dr. G. S. Chhatwal) |

GBF-Kolloquien und Seminare | *GBF Colloquia and Seminars*

- | | |
|----------|--|
| 18.01.00 | Dr. Wolfram Gronwald, Universität Regensburg: „Auf dem Weg zur automatischen Zuordnung von NMR-Spektren, das Programm AUREMOL“ |
| 10.02.00 | Dr. H. Wolfgang Höffken, BASF Aktiengesellschaft: „Structure based drug design in pharma research“ |
| 16.02.00 | Arno Müller, Institut für Genetik, Düsseldorf: „Dying early: analysis of cell death in the fly embryo“ |
| 14.03.00 | Andreas Lengeling, GSF, München: „Functional genomics on mouse chromosome 5“ |

- 06.04.00 Uwe Knippschild, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg: „Characterisation of functions of the protein kinase casein kinase 1 delta, an important regulator of the tumour suppressor p53“
- 10.04.00 Dr. Yvonne Genzel, Univ. Marseille: Epoxide Hydrolases: „Enantioselective biohydrolysis of pyridyloxiranes“
- 10.04.00 Mary Beckerle, University of Utah, „Signaling at sites of cell adhesion: A role for zyxin“
- 22.05.00 Marius Sudol, Mt. Sinai School of Medicine: „Role of the WW Domain in Signaling and Disease“
- 29.05.00 Gareth Griffiths, EMBL, Heidelberg: „Latex bead phagosomes and the links between actin nucleation, fusion and membrane signaling“
- 31.05.00 Dr. Michal Lebl, Illumina Inc. San Diego: „Fibre-optic-based DNA-giga-arrays as next generation tools for the large-scale analysis of genetic variation and function“
- 22.06.00 Dr. Klaus Maskos, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried: „Metalloproteases: Structure, function and inhibition“
- 17.07.00 Yu-Li Wang, University of Massachusetts: „How fibroblast propel and guide their movements“
- 21.08.00 Stefan Ehlers, Borstel: „Mechanismen der Granulomnektrose in mykobakterien-infizierten Mäusen“
- 24.08.00 Dr. Jakob Pernthaler, Max-Planck-Inst. für Marine Mikrobiologie, Bremen: „Culturability and growth strategies of pelagic bacteria from the German Bight“
- 01.09.00 Dr. Francis Mulaa, Univ. of Nairobi: „Cell cycle regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*“
- 04.09.00 Prof. Dr. Anil Grover, Postgraduate Institute for Medical Education and Research, Chandigarh, Indien: „Rheumatic fever and rheumatic heart disease in children of North India“
- 06.09.00 Silvia Lommel, Institut für Genetik, Köln: „Generation of conditional N-WASP und Arp2/3“
- 15.09.00 Stefan Lindner, Institut für Kreislaufkrankheiten, München: „Regulation podosomaler Adhäsionsstrukturen durch WASP und Arp2/3“
- 15.09.00 Prof. Solomon Victor, Director of The Heart Institute, Madras/Indien: „Genes and God“
- 17.10.00 Dr. Holger Heuer, BBA: „Reservoirs of gentamicin resistance genes in the environment“
- 17.10.00 Dr. Holger Rheims, DSM: „Mikrobiologische Untersuchungen zur Charakterisierung bisher nicht kultivierbarer Aktinobakterien aus Bodenproben“
- 19.10.00 Prof. Dr. Wolfram Bode, MPI Martinsried: „Crystal structures of blood clotting factors: interesting targets for the design of antithrombotics“
- 28.11.00 Prof. Dr. Robert Seckler, Universität Potsdam: „The parallel β -helix in P22 tailspike protein: Structure, function, stability and folding“
- 19.12.00 Dr. Wulf Blankenfeld, University of St. Andrews, UK: „Ein interessantes Drug-target in bakteriellen Infektionen“
- 18.01.01 Dr. Oliver Ohlenschläger, Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena: „Structural studies of proteins affecting haemostasis“
- 22.01.01 Harald Mischak, MHH: „Protein Kinase C: mehr als nur eine Familie von Kinasen“
- 23.01.01 Dr. Ulrich Wendt, Abt. Strukturbiologie, Aventis Pharma, Frankfurt: „The structure of squalen-hopene cyclase: Unraveling the complexity of cholesterol and triterpene formation“
- 26.01.01 Charles Parkins, Mount Vernon Hospital Northwood: „Tumour endothelium as a target for chemotherapy-progress with the tubulin-binding agent Combretastatin A4“

- 02.02.01 Dr. Michael Geissler, Univ. Hospital, Freiburg: „Immuntherapeutische Ansätze gegen das hepatozelluläre Karzinom“
- 05.02.01 Monique Arpin, Institut Curie: „Role of ezrin in epithelial cell morphogenesis and signaling“
- 20.02.01 Prof. Dr. Edward L. Kaplan, University of Minnesota Medical School, Minneapolis/USA: „Rheumatic fever and rheumatic heart disease“
- 22.02.01 Prof. Dr. Udo Heinemann, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin: „High throughput structure analysis, structural genomics and protein structure factory“
- 05.03.01 Dr. Michael Weyand, MPI Dortmund: „The alpha-active site of tryptophan synthase: One end of the allosteric communication“
- 22.03.01 Helmut Ponta, Institut für Toxikologie und Genetik: „CD44, a key regulator of cellular growth“
- 23.03.01 Dr. Andreas Ehlich, Universität Köln: „How does recombination of immunoglobulin genes regulate B lymphocyte development“
- 29.03.01 Prof. Dr. A. Wittinghofer, MPI Dortmund: „Studies of Ras, a molecular switch involved in signal transduction, and their implications for drug development“
- 02.04.01 Dr. Rhodri Ceredig, Laboratoire d'Immunochemie INSERM, Grenoble: „B cell development in young mice: *in vivo* und *in vitro* studies“
- 02.04.01 Dr. Alex Steinkasserer, Universitätsklinikum Erlangen: „Dendritic Cells - from bench to bedside“
- 03.04.01 Dr. Heinz Jacobs, Basel Institute for Immunology: „Secondary Diversification of Immunoglobulin Genes“
- 09.04.01 Prof. Dr. Brigitte Schlegelberger, Inst. für Molekulare Pathologie, MHH: „Genetic classification and risk stratification in non-Hodgkin's lymphomas“
- 02.05.01 Prof. Dr. Georgii Georgiev, Inst. of Gene Biology, Moscow: „The upper level: transcription tuning meCpG binding, insulators and long-range interactions“
- 14.05.01 Dr. Rolf Apweiler, EMBL-EBI, Hixton Hall, Cambridge/UK: „Databases for functional genomics and proteomics: New developments around SWISS-PROT/TrEMBL/InterPro“
- 15.05.01 Prof. Dr. R. Amann, Max-Planck-Inst. für Marine Mikrobiologie, Bremen: „Genomics of Marine Biogeochemical Cycles“
- 16.05.01 Prof. Francis T. F. Tsai, Dept. of Biochemistry & Molecular Biology, Baylor College of Medicine, Houston/Texas/USA: „Form follows function - What do crystal structures tell us about protein function“
- 28.05.01 Prof. Dr. Heidrun Herrmann, Universität Greifswald: „Regulation des Phenolabbaus bei *Pseudomonas putida*“
- 18.06.01 Giorgio Scita, The European Institute of Oncology, Mailand: „Integration coordination of signaling through Eps8“
- 26.06.01 Prof. Dr. Bernhard Ryffel, Institut Transgenose, Orleans/France: „Role of TNF and Lymphotoxin in host resistance to mycobacterial infection“
- 02.07.01 Guy Cornelis, Universite Catholique de Louvain, Brussels: „Molecular and cell biology of the *Yersinia* infection“
- 02.07.01 Prof. Dr. D. Söll, Yale University Connecticut: „Aminoacyl-tRNA synthesis in the postgenomic era“
- 05.07.01 Dr. Christian Mielke, Universität Würzburg: „Dynamics of Human DNA Topoisomerases IIa and B in Living Cells“
- 23.07.01 Dr. Rolf Hühne, Institut für Genetik, Universität zu Köln: „AraC operator network at the araBAD promoter of *E. coli*“
- 26.07.01 Dr. Ingo Autenrieth, Universität Tübingen: „*Yersinia enterocolitica*: mucosal invasion strategy and host responses“
- 27.07.01 Dr. Ilya N. Shindyalov, San Diego Supercomputer Center, La Jolla/USA: „Combinatorial Extension (CE) Structure Alignment Algorithm“

- 30.07.01 Dr. Stefan Rose-John, Christian-Albrechts-Universität Kiel: „Coordination of Cytokine Biology by Membrane Bound and Soluble Receptors“
- 01.08.01 Dr. Benjamin Callen, Adelaide University/Australia: „Topic: Interference between face-to-face promoters of bacteriophage: the mechanism of a moving repressor“
- 09.08.01 Prof. Dr. Hans R. Schöler, University of Pennsylvania: „Gene Function and Regulation in Pluripotent Stem Cells of Mammals“
- 15.08.01 Dr. Barbara Bertram, DKFZ Heidelberg: „Frauenforschung-Frauengesundheit. Forschen Frauen anders?“
- 16.08.01 Dr. Stefan Beissert, Universitätsklinikum Münster: „Über die Bedeutung von Langerhanszellen bei der Entwicklung von Autoimmunität“
- 16.08.01 Dr. Thorsten Buch, Institut für medizinische Mikrobiologie, TU München: „Secondary Rearrangements in a TCRalpha Insertion Model“
- 20.08.01 Dr. Ramnath Maniduth, Royal Vet. & Agric. University of Copenhagen/Denmark: „The use of two dimensional SDS PAGE to monitor gene expression of class IIa bacteriocin *Listeria monocytogenes*“

Technologietransfer, Lizenzen und Patente | *Technology Transfer, Licences and Patents*

Prof. Dr. R. Jonas (seit | *from* 2001), Dr. D. Lobas, C. Schrader (bis | *until* 2000) (Technologietransfer | *Technology Transfer*); Dr. C. Kügler-Walkemeyer (Recht und Lizenzen | *Legal Affairs and Licences*); D. Meseke (Patente | *Patents*)

Aufgaben | *Tasks*

In der GBF besteht ein großes Interesse an der Entwicklung innovativer Produkte, Verfahren und Dienstleistungen, insbesondere in Kooperation mit industriellen Partnern. Ein wichtiges Ziel der GBF ist es, die im Rahmen der Forschung erbrachten Ergebnisse durch Technologietransfer zur Anwendung zu bringen. Deshalb sind für die GBF

- Ausgründung von Firmen
- Lizenzvergabe
- Service und Dienstleistungen im

Rahmen von Industriekooperationen wichtige Parameter für die Umsetzbarkeit ihrer FuE-Ergebnisse. Allen Ansätzen liegt eine Sicherung des Know-how's zugrunde. Diese erfolgt in der Regel im Rahmen von Patenten, die dann im Zuge des Technologietransfers lizenziert werden. Aus diesem Grund ist die GBF Mitglied in Vereinigungen wie BioRegion und dem Transferkolleg Biotechnologie e.V..

The GBF is increasingly interested in the development of innovative products, processes and services, especially 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. For this reason the GBF is member of BioRegion and Transferkolleg Biotechnologie e.V..

Wirtschaftserlöse und Drittmittel aus Forschungsförderung | *Proceeds from industries and Third Parties*

Die Gesamterlöse waren in 2000 um 1451 TDM (6%) niedriger als im Vorjahr. Grund dafür waren geringere Einnahmen (-1114 TDM) aus F&E Tätigkeiten mit der Wirtschaft und aus sonstigen Erlösen (-1161 TDM). Mehreinnahmen gab es dagegen bei Lizenzerlösen (+386 TDM), nationaler (+357 TDM) und internationaler (+81 TDM) Forschungsförderung.

The proceeds were less (-1451 TDM) in 2000 than in 1999. Reasons for this were less receipts from R&D projects with industry (-1114 TDM) and further proceeds (-1161 TDM). Additional receipts were obtained from licenses (+386 TDM) and projects grants (+438 TDM).

Erlöse aus F&E Vorhaben und Drittmittel Forschungsförderung <i>Receipts from R&D activities with industries and third parties</i>	Deutschland <i>Germany (TDM)</i>	Ausland <i>Exterior (TDM)</i>	Gesamtsumme <i>total sum (TDM)</i>
F&E-Aufträge aus der Wirtschaft <i>R&D projects with industry</i>	2.044	1.561	3.605
F&E-Aufträge staatl. Stellen <i>R&D projects with public institutions</i>	37	0	37
Lizenzverträge <i>licence contracts</i>	362	1.652	2.014
Weitere Erlöse <i>further receipts</i>	234	0	234
Zwischensumme <i>subtotal</i>	2.677	3.213	5.890
Drittmittel Forschungsförderung <i>Project grants from third parties</i>			
BMBF und EU <i>BMBF and EU</i>	6.061	3.877	9.938
Sonstige <i>others</i>	3.298	24	3.322
Zwischensumme Drittmittel <i>subtotal third parties</i>	9.359	3.901	13.260
Erlöse und Drittmittel insgesamt <i>total receipts</i>	12.036	7.114	19.150

Von den Erlösen aus F&E Tätigkeiten wurden 88 TDM in der Umweltforschung und 5569 TDM in der Gesundheitsforschung erzielt. Bei der Forschungsförderung erhielt der Bereich Umwelt Zuwendungen in Höhe von 3675 TDM, während die Gesundheitsforschung mit 9585 TDM unterstützt wurde.

The proceeds from R&D projects were gained nearly exclusively by the sector of health research (5569 TDM), the environmental research received 88 TDM. Grants from third parties supported the environmental research with 3675 TDM and the health research with 9585 TDM.

Drittmittelerträge 1998-2000 | *Proceeds from Third-Party Funds 1998-2000*

	1998 (in TDM)	1999 (in TDM)	2000 (in TDM)
F&W-Tätigkeiten <i>R&D Activities</i>			
F&E-Vorhaben/F&E-Aufträge <i>R&D Projects, R&D Contracts</i>	3.784	4.756	3.642
Lizenzverträge <i>License Contracts</i>	1.050	1.275	2.014
Summe <i>Sum</i>	4.834	6.031	5.656
Erlöse aus dem Infrastrukturbereich <i>Proceeds from the Infrastructure</i>	1.168	1.395	0.234
Erlöse aus nationaler Quelle <i>Proceeds from National Sources</i>	8.174	9.003	9.358
Erlöse aus dem Ausland/Supranationalen Einrichtungen <i>Proceeds from Exterior/Supranational Organisations</i>	3.106	3.820	3.901
Drittmittel insgesamt <i>Total Proceeds from Third-Party Funds</i>	17.282	20.249	19.150

HGF-Strategiefonds | *Fonds for strategic research within the Helmholtz Centres (HGF)*

Die GBF war im Jahr 2000 an den folgenden HGF-Strategiefonds Projekten

beteiligt. Mit den Projekten werden mehr als 5,2 Mio DM eingeworben.

In 2000 the GBF received support for the following HGF-strategic research projects. The overall gain is more than 5.2 mio DM.

Leiter <i>Coordinator</i>	Laufzeit <i>term von-bis from-until</i>	Thema <i>Title</i>	Summe <i>sum (TDM)</i>
Dr. H. Hauser	1.7.98-30.6.01	GMP Virus Produktion <i>GMP virus production</i>	597,5
Prof. Dr. J. Wehland	1.7.98-30.6.01	Listerien Expression HPV-Antigene <i>Listerial expression HPV-antigenes</i>	168,6
PD Dr. C. Guzman	1.7.98-30.6.01	Salmonellen HPV-Antigene <i>salmonella HPV-antigenes</i>	168,6
Dr. S. Weiß	1.7.98-30.6.01	DANN-Immunisierung gegen HPV <i>DANN immunization against HPV</i>	168,6
Dr. W. Lindenmaier, Dr. K. Dittrich	1.7.98-30.6.01	HPV-induzierte Tumore <i>HPV induced tumours</i>	168,6
Dr. H-J. Hauser	1.7.98-30.6.01	HPV-Vakzinierung <i>HPV vaccination</i>	168,6
PD Dr. M. Höfle	1.7.98-30.6.01	Systemintegr. Umweltbiologie <i>integrated environmental biotechnology</i>	1.546,0
PD Dr. J. Buer	1.7.00-30.6.03	Immuntherapie II <i>immune therapy II</i>	
Dr. S. Weiß	1.7.00-30.6.03	Krebs Immuntherapie <i>cancer immune therapy</i>	500,0
Dr. W. Abraham	1.7.00-30.6.03	Bodenfunktion <i>soil functions</i>	1.500,0

Patente und Lizenzen | *Patents and licenses*

Um zu einer klareren Übersicht zu gelangen wurden in der folgenden Tabelle nur die Erstanmeldungen von Patenten berücksichtigt. Die Zahl der der Erstanmeldungen folgenden Anmeldungen, vor allem im Ausland, lag für das Jahr 2000

bei über 100 Anmeldungen und die Gesamtzahl der gehaltenen Patente bei einigen Hunderten.

To get a clearer overview the following table only considers the first application of patents. The number of follow-ups of a first patent application was more than 100 in 2000, and the total number of holdings several hundreds.

Patente

Patents 1998-2000

	Zahl der Erfindungsmeldungen und Patentanmeldungen <i>First submission of patents</i>	Zahl der gehaltenen Patentfamilien <i>Holdings of patent families</i>	Erteilte Patente <i>Patent granted</i>	Zahl der validen erteilten Patente <i>Holdings of patents granted</i>
1998	15	120	8	90
1999	13	133	5	94
2000	11	144	3	96

	1998	1999	2000
Einnahmen <i>Proceeds</i>	1.050 TDM	1.275 TDM	2.014 TDM
Aufwendungen <i>Expenditure</i>	710 TDM	1.293 TDM	1.140 TDM

Die Einnahmen erreichten im Jahr 2000 einen Höchststand mit 2014 TDM. Durch leicht rückläufige Aufwendungen konnte hier ein Überschuss von fast 900 TDM erzielt werden.

In 2000 the proceeds reached the highest value up to now. As the expenditures were slightly below the 1999 value, a surplus of nearly 900 TDM could be achieved.

Ausgründungen und Existenzgründerzentrum | *Spin-out Companies and Firms on the GBF Biotec Campus*

In 2000/2001 gab es erneut Ausgründungen aus der GBF: Bionethos GmbH (PD Dr. A. Bader), Eugene GbR (Dr. W. Müller) und der Verein Forum Funktionelle Genomanalyse e.V. (H. Schlender). Da die Voxna BioMed in 2000 sowie BioBase und SciNet in 2001 das GBF-Existenzgründerzentrum verlassen haben, sind es weiterhin 16 Biotech Vereine und Firmen auf dem GBF-Campus und im DSMZ-Gebäude.

Am 5. Dezember 2000 wurde das GBF-Existenzgründerzentrum offiziell eingeweiht. Der Ausbau der 3. und 4. Etage des Y-Gebäudes der GBF wurde im wesentlichen abgeschlossen. Es stehen rund 800 qm Laborfläche und ca. 1050 qm Büro- und Lagerfläche zur Verfügung. Durch die Anschaffung von Geräten über die Förderung durch das Niedersächsische Wirtschaftsministerium konnten die Infrastrukturräume fast fertig gestellt werden. Es steht zu erwarten, dass es in 2001/02 zu Engpässen beim Raumbedarf der bereits existierenden Firmen kommen wird, da die Stadt Braunschweig erst in der 2. Jahreshälfte 2002 mit dem Bau des neuen BioTec-Zentrums fertig werden wird. Andererseits wird damit der schon vor langer Zeit geplante BioTech-Park neben dem GBF-Gelände Realität. Die Anzahl der neu geschaffenen Arbeitsplätze durch das Existenzgründerzentrum betrug Ende 2000 rund 130. Diese Zahl dürfte erst ab

2002 zunehmen, da dann genügend weitere Nutzfläche durch das neue BioTec-Zentrum zur Verfügung stehen wird.

The following spin-out companies were established in 2000/2001: Bionethos GmbH (PD Dr. A. Bader), Eugene GbR (Dr. W. Müller), and Verein Forum Funktionelle Genomanalyse e.V. (H. Schlender). As the following companies VoxnaBioMed, BioBase, and SciNet left the GBF Bio Tec Campus in 2000/2001, 16 companies continue their activities at the GBF Bio Tec Campus and in the DSMZ-building.

The GBF Bio Tec Campus was officially inaugurated at 5 December 2000. The completion of the 3rd and 4th floor of the Y-building of the GBF was nearly finished. There are about 800 sqm of laboratories and some 1050 sqm of offices. Various laboratory equipment were acquired with a support from the Ministry of Economics of the State of Lower Saxony to fit out several rooms as infrastructure labs for common use. It is expected that there will be a bottle neck with regard to the space required by the firms in 2001/2002, because the new BioTec building of the City of Braunschweig which is under construction will be only ready in the 2nd half of 2002. On the other hand this new building is the first step in the direction of a Bio Tec Park that has become necessary for the region. The number of new jobs created through the new spin-out companies reached 130 at the end of 2000. It should considerably increase after the new Bio Tec building will be ready.

Lizenz- und Know-how-Verträge

Licences and Know-how-contracts 1998-2000

**Liste der auf dem GBF-Gelände
ansässigen Firmen | *List of the firms on
the GBF Bio Tec Campus***

Firma <i>Company</i>	Geschäftsführer/Ansprechpartner <i>Person for contact</i>	Telefon/Fax <i>Phone/Fax</i>	e-Mail	Internet
OMNILAB Laborzentrum GmbH & Co. KG	M. Kling/U. Kurzina	Tel. 05108-91 67 0 Tel. 61 40-900 Fax 05108-91 67 67	Webmaster@cms-online.de mkling@omnilab.de	www.omnilab.de
TRACE Biotec AG	Dr. Wolfgang Künnecke	Tel. 26 13 30	info@trace-ag.de	www.trace-ag.de
ASA Spezialenzyme	Dr. Arno Cordes	Tel. 26 13 10	cordes@asa-enzyme.de	www.asa-enzyme.de
Hartmann Analytic	Dr. Ursula Hartmann	Tel. 2 60 28 0	hartmann@hartmann-analytic.de	www.hartmann-analytic.de
Bioinformation	Dr. Edgar Wingender	Tel. 6 18 14 27		
Cosmix molecular biologicals GmbH	Prof. Dr. J. Collins/ Dr. Szardenings	Tel. 12 08 60 Fax 2 60 12 99	msz@cosmix.de jco@cosmix.de	www.cosmix.de
AIMS Scientific Products GmbH	Dr. Norbert Zander	Tel. 2 60 28 65 Tel. 0177-7 63 72 99 Fax 2 60 28 66	nza@aims-scientific-products.de	www.aims-scientific-products.de
RELIATech GmbH	Dr. Bernhard Barleon	Tel. 2 60 18 32 Fax 2 60 18 33	info@reliatech.de	www.reliatech.de
Lionex GmbH	Prof. Dr. Mahavier Singh	Tel. 2 60 12 66 Tel. 0175-5 94 22 91 Fax 2 60 11 59	msi@lionex.de	www.lionex.de
Affymetrix	Dr. Bernd Haase	Tel. 61 81-570 Tel. 05181-82 66 10 Tel. 0172-8 16 22 00 Tel. 08847-69 75 75	Bernd_Haase@affimex.com	www.affymetrix.com
IBA Biologics GmbH	Dr. J. Bertram/ Dr. Garke	Tel. 0551-50 67 21 18 Tel. 61 81-170 GF: Rudolf-Wissell-Str. 28, 37079 Göttingen	Joachim.Bertram@iba-go.de garke.iba_biologics@gbf.de	
AMODIA Biosciences GmbH	Dr. Ulrich Krause/ Dr. Sabine Peters	Tel. 2 60 17 64 Fax 2 60 17 66	sabine-peters@amodia.de ulrich.krause@amodia.de	www.amodia.com
Glyco Thera GbR	Dr. Harald Conradt	Tel. 7 07 28 01 Fax 7 07 28 03 Büro: Okerstr. 11, 38100 Braunschweig	glycothera.hsco@t-online.de	
Bionethos GmbH	Dr. Augustinus Bader	Tel. 61 81-122	abd@gbf.de	www.bionitor.de
Eugene GbR	Dr. Werner Müller	Tel. 61 81-687/-487	wmu@gbf.de	
Forum Funktionelle Genomanalyse e.V.	H. Schlender	Tel. 61 81-738	has@gbf.de	www.lifegen.de
GBF Ausgründer in der Region: BIOBASE Biologische Datenbanken GmbH	Dipl.-Chem. Holger Karas/ Dr. Edgar Wingender/ Peter Lotz	Tel. 05331-85 84 0 Fax 05331-85 84 70 Halchtersche Str. 33, 38304 Wolfenbüttel	webmaster@biobase.de plo@biobase.de	www.biobase.de

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 1998 tabellarisch aufgeführt: Veröffentlichungen, erfolgreich durchgeführte Diplom- und Doktorarbeiten.

Various results from R&D of the GBF are presented here as a scientific balance for the years 1998-2000/2001.

Veröffentlichungen | *Publications 1998-2000*

Jahr Year	Index. Zeitschriften Index journals	Nicht index. Zeitschriften Non Index journals	Bücher, Proceedings Books, proceedings	Sonstige Ver- öffentlichungen Other publications	Veröffentlichungen insgesamt Total number of publications
1998	188	14	38	8	248
1999	226	7	41	-	274
2000	197	8	24	3	228
1998/2000	611	29	103	11	750

Diplomarbeiten, Dissertationen, Habilitationen | *Master thesis, PhD thesis, Habilitations 1998-2001*

Diplomarbeiten Master thesis	mit Aus- zeichnung with distinction	sehr gut very good	gut good	befriedigend satisfactory	ohne Notenangabe Result not available	Summe Total Number
1998		18	3		3	24
1999/2000		24	4		-	28
2000/2001		27	3	1	4	35
insgesamt total		69	10	1	7	87
Dissertationen Dissertations						
1998	3	12	3		3	21
1999/2000	8	20	3	1	-	32
2000/2001	2	19	2	1	4	28
insgesamt total	13	51	8	2	7	81

*Neun Wissenschaftler/innen der GBF habilitierten sich seit 1998: zwei 1998, einer 1999, je drei in 2000 und 2001.

**Nine GBF scientists concluded their habilitations since 1998: two in 1998, one in 1999, three in both years 2000 and 2001.*

Übersicht über an der GBF angefertigte Diplomarbeiten, Dissertationen und Habilitationen*

*Overview of Master thesis, PhD thesis and habilitations that were elaborated at the GBF**

Presse- und Öffentlichkeitsarbeit

Leiter | *Leader*: Th. Gazlig

Mitarbeiter | *Members*: R. Barthel, A. Koch, R. Radloff

Die Presse- und Öffentlichkeitsarbeit beruht auf den Säulen Presse- und Medienarbeit, interne Kommunikation, Internet und allgemeine Öffentlichkeitsarbeit mit den Teilbereichen Ausstellungen, Veranstaltungen, Messen und Besucherwesen. Alle vier Bereiche wurden im vergangenen Jahr weiterentwickelt und ausgebaut. Ziel der Kommunikationsarbeit ist es, die GBF mit ihrer neuen Ausrichtung als Forschungszentrum für Infektionskrankheiten zu positionieren sowie für die Akzeptanz der Forschungsarbeiten zu werben. So konnte die hohe Medienpräsenz regional auf dem hohen Niveau gehalten werden und überregional sowie in der Fachpresse ausgebaut werden. Auch die Internet-Präsenz wurde in einem ersten Schritt überarbeitet. Dabei wurde auf die Bedürfnisse der Nutzer geachtet: 1. zielgruppenspezifische Ansprache, 2. Orientierung und Navigation und 3. Aktualität und Funktionalität. Angesichts der enormen Bedeutung des Internets wird der Auftritt der GBF konsequent weiterentwickelt.



Pressekonferenz anlässlich der Tagung des Niedersächsischen Landeskabinetts im GBF-FORUM.

Press conference on the occasion of the Cabinet's meeting of Lower Saxony in the GBF-FORUM.

(Prof. Dr. Rudi Balling (2.v. l.), Sigmar Gabriel (2.v.r.))

Präsentation der GBF auf der Science Street im Leipziger Hauptbahnhof anlässlich des Jahres der Lebenswissenschaften 2001.

Presentation of the GBF on the Science Street at Leipzig Mainstation on the occasion of the year of the Life Sciences 2001.

Wissenschaft im Dialog

Kontinuierlich engagiert sich die GBF für den unmittelbaren Dialog mit einer breiten Öffentlichkeit. Beispielhaft standen hierfür in der zweiten Jahreshälfte 2000 die Ausstellungen Fut[o]ur, eine Initiative der regionalen Forschungseinrichtungen im Braunschweiger Landesmuseum, und „Lebendige Wissenschaft“ der Helmholtz-Gemeinschaft im Deutschen Museum München.



Eine besondere Bedeutung für die Öffentlichkeitsarbeit der GBF hat die Teilnahme am Jahr der Lebenswissenschaften, das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung für 2001 ausgerufen wurde. Die GBF engagierte sich bei der Auftaktveranstaltung in Berlin und präsentierte sich auf der Science Street im Leipziger Hauptbahnhof (19. bis 28. April 2001) unter anderem mit einer millionenfachen Vergrößerung eines Tuberkel-Bakteriums im Sitzkissenformat und einer Reinigungsanlage für quecksilberverseuchtes Abwasser. Zudem beteiligte sich die GBF im besonderen Maße als Mitorganisator am Wissenschaftstag auf dem Opernplatz in Hannover am 15. Juni 2001. Zahlreiche Aussteller der Biotech-Szene präsentierten in anschaulicher Weise neueste Forschung aus der grünen und roten Biotechnologie. Diskussionen zu aktuellen Themen mit Politik und Wissenschaft rundeten das Programm ab.

Die rund 51 Besuchergruppen im Jahr 2000 dokumentieren das Bedürfnis vieler regionaler und überregionaler Interessengruppen, sich vor Ort über die GBF zu informieren. Auch in der ersten Hälfte 2001 haben bereits über 279 Besucher die GBF besucht: Das Spektrum reichte von 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 Braunschweiger an. Prominenteste Gäste waren in diesem Jahr die Bundesministerin für Bildung und Forschung Edelgard Bulmahn, aus Niedersachsen Ministerpräsident Sigmar Gabriel, Wissenschaftsminister Thomas Oppermann sowie der russische Forschungsminister Professor Michail Petrowitsch Kirpitschnikow.

Anwendungen präsentieren

Auf der Hannover Messe 2001 präsentierte sich die GBF zusammen mit anderen Hochschulen und Unternehmen auf dem niedersächsischen Gemeinschaftsstand. Die GBF stellte den BioDisk-Synthesizer aus, ein Testverfahren zur Suche nach Molekülen für Diagnostik und Therapie. Auf der „BIOTECHNOLOGY 2000“ in



Edelgard Bulmahn, Bundesministerin für Bildung und Forschung (BMBF) zu Besuch in der GBF.

Edelgard Bulmahn, Federal Minister of Education and Research, visits the GBF.

Berlin zeigte die GBF vom 3. bis 8. September 2000 ein Testverfahren zur Suche nach biologisch aktiven Molekülen für Diagnostik und Therapie und aktuelle Forschungsergebnisse aus der Umweltbiotechnologie.

Press and Public Relations

Press and public relations activities rest on the pillars of press and media activities, internal communications, Internet and general public relations work with subactivities relating to exhibitions, events, trade fairs and visitors. All four domains were further developed and expanded in the past year. The aim of communication activities is to establish the GBF with its new orientation as a research institution for infectious diseases and to gain acceptance for its research work. It has been possible to regionally maintain the high level of media coverage and to expand this coverage nationwide and in the trade press. Presence on the Internet was also revised in a first step, complying with user needs by: 1) addressing target groups, 2) orientation and navigation and 3) up-to-dateness and functionality. In view of the enormous significance of the Internet, GBF's appearance is being consistently further developed.

Science in Dialogue

GBF continuously commits itself to conducting a direct dialogue with the public at large. Examples in the second half of 2000 were the exhibitions "Fut[o]ur", an initiative by the regional research institutions in the Braunschweig state museum, and "Lebendige Wissenschaft" by the Helmholtz Association in the German Museum, Munich.

Of particular significance for GBF's public relations work is its participation in the Year of the Life Sciences proclaimed by the Federal Ministry of Education and Research for 2001. GBF took part in the opening event in Berlin and presented itself on the Science Street at

Leipzig main station (19 to 28 April 2001) inter alia with the million-fold enlargement of a cushion sized tubercle bacterium and a clean-up system for mercury-contaminated waste water. Moreover, GBF was particularly involved as a co-organizer in the Science Day at Opernplatz in Hanover on 15 June 2001. Numerous exhibitors from the biotech scene gave a lively presentation of their latest research in green and red biotechnology. Discussions on current topics with politicians and scientists rounded off the programme.

Roughly 51 groups of visitors in the year 2000 document the need of many regional and supraregional interest groups to inform

Der Wurm im Visier. GBF-Wissenschaftler Dr. Wounter Jansen erklärt dem russischen Forschungsminister Prof. Michail Petrowitsch Kirpitschnikow Infektionsversuche mit Streptokokken am Fadenwurm *C. elegans*.

*The worm in focus. GBF-Scientist Dr. Wounter Jansen explains Prof. Michail Petrowitsch Kirpitschnikow, Russia's research minister, experiments concerning *C. elegans* nematodes "infected" by streptococci.*



themselves on the spot about GBF. Also in the first half of 2001 more than 279 visitors have already visited GBF, ranging from representatives of scientific institutions at home and abroad, through local, federal state and government politicians up to clubs, associations, school classes and advanced level courses, and university students. Furthermore, the traditional "Open Day" attracted roughly 1,500 inhabitants of the region. The most prominent guests this year were Edelgard Bulmahn, Federal Minister of Education and Research, Sigmar Gabriel, Governor of Lower Saxony, Thomas Oppermann, Lower Saxony's science minister, and Professor Mikhail Petrovich Kirpichnikov, Russia's research minister.

Presenting Applications

At Hanover Trade Fair 2001 the GBF presented itself together with other universities and companies at Lower Saxony's joint stand. GBF exhibited the BioDisk synthesizer, a test system used in searching for molecules for diagnosis and treatment. At "BIOTECHNOLOGY 2000" in Berlin, from 3 to 8 September 2000 GBF presented a test system used in searching for biologically active molecules for diagnosis and treatment as well as current research results from environmental biotechnology.



Niedersachsens Wirtschaftsministerin Dr. Susanne Knorre am GBF-Stand auf der Hannover Messe.

Dr. Susanne Knorre, Lower Saxony's Minister of Economics, visited GBF at the Hannover fair.

Auszeichnungen

Gewinn des BioProfile-Wettbewerbs 2001

Im BioProfile-Wettbewerb des Bundesministeriums für Bildung und Forschung ist die Region Braunschweig, Göttingen, Hannover mit ihrem Beitrag „Funktionelle Genomanalyse – Plattform für Diagnostik und Therapie“ zu einem der drei Sieger gekürt worden. Das von der GBF koordinierte Konzept ist Bestandteil der Landesinitiative BioRegion. Damit wird in den kommenden fünf Jahren die Umsetzung Erfolg versprechender Ideen aus der medizinischen Biotechnologie in innovative Produkte, Verfahren und Dienstleistungen im Städtedreieck mit 15 Millionen Euro gefördert.

Die funktionelle Genomanalyse gewinnt zunehmend an Bedeutung: Mit ihr können Krankheiten ursächlich geheilt werden, bei denen heute nur die Behandlung von Symptomen möglich ist. Besonders in den Bereichen Infektions-, Stammzell- und Neurobiologie besitzen die Forschungseinrichtungen und Unternehmen in Südniedersachsen das Potenzial, in den kommenden Jahren Ansätze für neue Diagnoseverfahren und Medikamente zu erarbeiten. Zusammen mit den Universitätskliniken in Göttingen und Hannover sowie dem Städtischen Klinikum in Braunschweig verfügt Südniedersachsen zudem über die wissenschaftliche Expertise und technische Ausstattung, um sämtliche Aufgaben bei der Produktentwicklung bis zu klinischen Prüfungen zu erfüllen.

Zur Umsetzung ihres erfolgreichen BioProfile-Konzeptes haben Wissenschaftler und Unternehmer aus der Region bereits Anfang Mai den Verein „Forum Funktionelle Genomanalyse e.V.“ gegründet. Er wird regelmäßig Foren organisieren, in dem Forscher Projekte vor allem aus der medizinischen Genomforschung vorstellen. Ein Kuratorium aus namhaften Wissenschaftlern und Unternehmern identifiziert Vorhaben mit wirtschaftlichem Potenzial, um sie dann für eine weitere Förderung zum Beispiel mit Mitteln aus dem BioProfile-Wettbewerb vorzuschlagen. Eine gewinnorientierte Management GmbH wird anschließend



den Forschern helfen, ihre Erfolg versprechenden Ideen in Firmengründungen zu überführen. Sie soll den Prozess der Produktentwicklung begleiten, bis sich die Unternehmen am Markt durchgesetzt haben.

BioFuture-Preis für Dr. Jutta Eichler

Im Wettbewerb BioFuture des Bundesministeriums für Bildung und Forschung wurde im Mai 2001 GBF-Wissenschaftlerin Dr. Jutta Eichler für ihr Forschungsvorhaben „Synthetische Nachahmungen von Proteinbindungstaschen“ ausgezeichnet. Die Nachwuchsforscherin setzte sich in der Endrunde gegen mehr als 80 Mitbewerber aus dem gesamten Bundesgebiet durch. In dem Forschungsprojekt werden verschiedenste dreidimensionale Taschen künstlich aus Peptiden nachgebildet. Diese Peptide werden an Trägermoleküle



Die Gewinner im BioProfile-Wettbewerb des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

Winning the BioProfile-Conception of the Federal Ministry of Education and Research.

(Prof Dr. Rudi Balling (GBF), Parlam. Staatssekretär Dr. Thomas Catenhusen, Prof. Dr. Karl Mollitor (IPF PharmaCeuticals), Dr. Georg Forsmann (Vorsitzender der BioProfile Jury) (v. l. n. r.))

Dr. Jutta Eichler, Preisträgerin im BioFuture-Wettbewerb des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF).

Dr. Jutta Eichler, winner of the BioFuture competition of the Federal Ministry of Education and Research (BMBF).

(Scaffolds) gebunden, die Eichler ebenfalls entwickelt. Die nachgeahmten Taschen (Mimikry) ähneln dabei den natürlichen Proteinbindungsdomänen. Diese bestehen häufig aus Bausteinen, die an verschiedenen Orten der Aminosäurekette angeordnet sind, in der räumlichen Struktur des Moleküls jedoch nah beieinander liegen.

„OCC Science and Humanity Prize“ 2001 für Prof. Dr. Flohé

Den mit 30.000 US-Dollar dotierten „OCC Science and Humanity Prize“ 2001 teilen sich Leopold Flohé, Professor an der Technischen Universität in Braunschweig und Leiter der Gastforschergruppe an der GBF und Professor Lester Packer von der Universität von Kalifornien, Berkeley, USA. Die jährlich vom „Oxygen Club of California“ (OCC) vergebene Auszeichnung ehrt Persönlichkeiten, die sich durch bahnbrechende Innovationen in der biomedizinischen Forschung und ihr Engagement für die Wissenschaft verdient gemacht haben.

Bergey Medaille für Prof. Dr. Hans Reichenbach

Prof. Dr. Hans Reichenbach hat am 1. Februar 2001 die Bergey Medaille erhalten, die seit 1994 durch den Bergey's Manual Trust in Georgia, USA, an herausragende Forschungspersönlichkeiten vergeben wird. Geehrt wird Reichenbach für sein Lebenswerk „taxonomische Forschungsarbeiten an Myxobakterien“. Die gleichnamige Stiftung gibt auch das Standardwerk Bergey's Manual of

Systematic Bacteriology heraus, an dessen Neuausgabe Reichenbach zum wiederholten Male beteiligt sein wird.

Kooperationspreis des Landes Niedersachsen

Den Kooperationspreis des Landes Niedersachsen 2000 haben die GBF und die Biobase GmbH gewonnen. Gemeinsam haben sie Datenbanken und Programme etabliert, die zum Beispiel die Suche nach medizinisch relevanten Genen erleichtern und so die Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe unterstützen. Diese Aufgabe wird angesichts der Datenberge aus der Genomforschung immer wichtiger.

Inhoffen-Medaille und Förderpreise

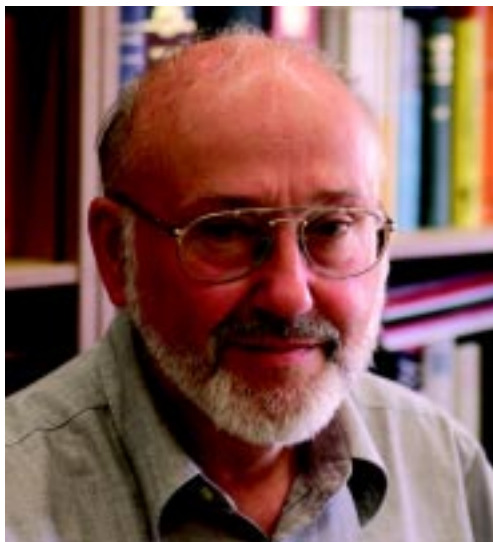
Der französische Wissenschaftler Professor Dr. Pierre Potier wurde 2001 für seine herausragenden Arbeiten zur Bekämpfung von Krebs mit der Inhoffen-Medaille der TU Braunschweig und der GBF ausgezeichnet. Auf seinen Forschungen basieren mehrere Medikamente gegen Tumore in Brust, Lunge oder Blase. So ist es dem Direktor des Institut de Chimie des Substances Naturelles in Gif sur Yvette bei Paris gelungen, den Wirkstoff Taxol auf umweltverträgliche Weise halbsynthetisch herzustellen.

Der Förderverein der GBF zeichnete zudem herausragende Doktorarbeiten aus: Preisträger 2001 waren Dr. Oliver Pabst und Dr. Stefan Hüttelmaier. Pabst hat sich mit Genen auseinandergesetzt, die in der Embryonalentwicklung wichtig sind. Im Mittelpunkt seiner Untersuchungen am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig stand ein Gen, das in der Maus an der Entstehung des Immunsystems und des Verdauungstraktes beteiligt ist. Hüttelmaier hat sich mit den molekularen Eigenschaften von Kontaktstellen tierischer und menschlicher Zellen beschäftigt. Seine Arbeit liefert wichtige neue Aspekte zu einem besseren Verständnis des Aufbaus und der Funktion normaler Zellkontakte und erweitert die bisherigen Kenntnisse über pathologische Vorgänge zum Beispiel bei der Tumorbildung und bei Muskelerkrankungen. Preisträger des Fritz-Wagner-Preises war in diesem Jahr Jan Henrik Enß vom Institut für Bioverfahrenstechnik der TU. Enß hat

Prof. Dr. Hans Reichenbach:

Träger der Bergey Medaille 2001

awarded with the Bergey Medal in 2001



in seiner Diplomarbeit Methoden untersucht, mit denen sich Biofilme auf metallischen Oberflächen analysieren und zerstören lassen.

Der Arbeitskreis für Zellbiologie und Biomedizinische Forschung e. V. der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) vergab die Förderpreise für die Jahre 2000 und 2001. Der Förderverein versteht seinen Preis als unbürokratische Motivationspritze für erstklassige Grundlagenforschung. Dr. Carsten Hornig hat seine Doktorarbeit über die Entstehung von Blutgefäßen an der TU Braunschweig angefertigt. Hornigs Untersuchungen beschäftigten sich mit einer Variante des VEGFR-1-Rezeptors. Der Rezeptor ist eine wichtige Schaltstelle im Wachstumsprozess neuer Blutgefäße. Karsten Kretschmer forscht im Rahmen seiner Doktorarbeit an der GBF an speziellen Zellen des Immunsystems, den antikörperproduzierenden B1-Zellen. Sie spielen offenbar bei der Krankheitsabwehr von Kindern (bis zum 8. Lebensjahr) eine wichtige Rolle.

Die Dr.-Wilhelm-Kempe-Stiftung des Blutspendedienstes des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) Niedersachsen, Sachsen-



Anhalt, Oldenburg, Bremen hat seine Stipendien 2001 für Forschungsprojekte über hämatopoetische Stammzellen vergeben. Das Projekt von Lars Macke, Doktorand an der GBF, beschäftigt sich mit der „Qualitätskontrolle von dendritischen Zellen für die Immuntherapie“.

Förderpreis des „Arbeitskreises für Zellbiologie und Biomedizinische Forschung“ als unbürokratische Motivation für erstklassige Forschung.

Promotion prize of the „Arbeitskreis für Zellbiologie und Biomedizinische Forschung“ as an unbureaucratic motivation for first class basic research.

(Prof. Dr. Jürgen Bode, Preisträger Karsten Kretschmer, Dr. Carsten Hornig (v. l. n. r.))

Awards

Winning the BioProfile Competition 2001

In the BioProfile competition of the Federal Ministry of Education and Research, the Braunschweig-Göttingen-Hanover region was one of the three winners with its presentation „Funktionelle Genomanalyse – Plattform für Diagnostik und Therapie“ (functional genome analysis – a platform for diagnosis and treatment). The concept coordinated by GBF is part of the BioRegioN federal state initiative. In the next five years it will serve to promote the conversion of promising ideas from medical biotechnology into innovative products, processes and services in the above triangle of cities with funds amounting to Euro 15 million.

Functional genome analysis is increasingly gaining significance. It may serve to cure diseases for which today only the treatment of symptoms is possible. Especially in the fields of infections, stem cells and neurobiology, the

research laboratories and companies in southern Lower Saxony have the potential for evolving approaches for new diagnostic methods and drugs in the coming years. Together with the university hospitals in Göttingen and Hanover as well as the clinical centre of the town of Braunschweig, Lower Saxony moreover has the scientific expertise and technical equipment to fulfil all tasks from product development up to clinical testing.

For the implementation of their successful BioProfile concept, scientists and entrepreneurs from the region founded the association „Forum Funktionelle Genomanalyse e.V.“ (functional genome analysis forum) in early May. This association will regularly organize platforms at which researchers will present projects above all from medical genome research. A supervisory board composed of established scientists and

entrepreneurs will identify projects with a scientific potential and propose them for further support, for example, from funds of the BioProfile competition. A profit-oriented Management GmbH will then help the researchers to turn their promising ideas into start-up companies. Its function is to accompany the process of product development until the companies have gained acceptance in the market.

BioFuture Award for Dr Jutta Eichler

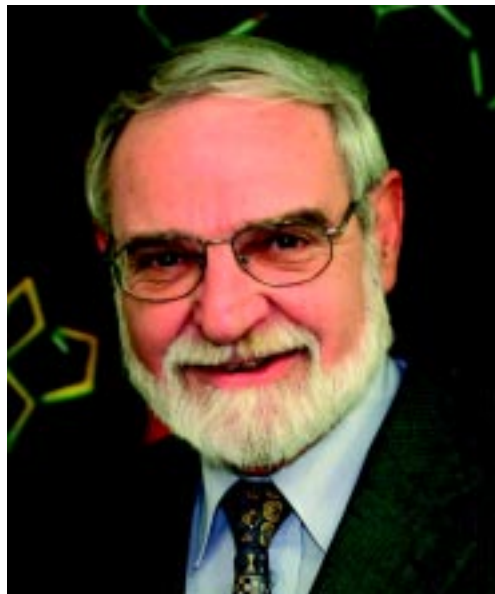
In the BioFuture competition of the Federal Ministry of Education and Research, Dr Jutta Eichler, a GBF scientist, was awarded a prize in May 2001 for her research project "Synthetische Nachahmungen von Proteinbindungstaschen" (synthetic imitations of protein binding pockets). The young scientist was successful in the final round against more than 80 competitors from all over Germany. In the research project, a variety of three-dimensional pockets are artificially reproduced from peptides. These peptides are bound to carrier molecules (scaffolds) also developed by Eichler. The imitated pockets (mimicry) resemble the natural protein binding domains which frequently consist of building blocks arranged in different locations of the amino acid chain, which are, however, close to each other in the spatial structure of the molecule.

"OCC Science and Humanity Prize" 2001 for Prof. Dr Flohé

The "OCC Science and Humanity Prize" 2001 endowed with US \$ 30,000 is shared by Leopold Flohé, professor at the Technical

Prof. Dr. Leopold Flohé erhielt für bahnbrechende Innovationen in der biomedizinischen Forschung den "OCC SET Science and Humanity Prize" 2001.

For his groundbreaking innovations in biomedical research Prof. Dr. Leopold Flohé was awarded the "OCC Science and Humanity Prize" 2001.



University in Braunschweig and head of the guest scientists group at GBF, and Professor Lester Packer from the University of California, Berkeley, USA. The prize awarded annually by the "Oxygen Club of California" (OCC) honours personalities of outstanding merit due to groundbreaking innovations in biomedical research and their commitment to science.

Bergey Medal for Prof. Dr. Hans Reichenbach

Professor Reichenbach was awarded the Bergey Medal on 1 February 2001. This award has been given to outstanding scientists by the Bergey Manual Trust in Georgia, USA, since 1994. Professor Reichenbach was honoured as a result of his lifelong contribution to "taxonomic research work on myxobacteria". The Bergey's Foundation also publishes the standard work "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"; Professor Reichenbach was once again involved with the latest version of this publication.

Cooperation Prize of the Federal State of Lower Saxony

The Cooperation Prize 2000 of the federal state of Lower Saxony was won by GBF and Biobase GmbH. They jointly established databases and programmes which, for example, facilitate the search for medically relevant genes and thus enhance the development of active pharmaceutical ingredients. This task is becoming more and more important in view of the mountains of data from genome research.

Inhoffen Medal and Promotion Prize

Professor Dr Pierre Potier, a French scientist, was awarded the Inhoffen Medal of TU Braunschweig and GBF in 2001 for his outstanding work on combatting cancer. Several medical drugs for tumours of the breast, lung or bladder are based on his research. Thus, for example, the director of the Institut de Chimie des Substances Naturelles

in Gif-sur-Yvette near Paris succeeded in producing the active ingredient taxol semi-synthetically in an environmentally compatible manner.

The GBF "Förderverein" (promotion association) moreover awarded prizes for outstanding PhD theses. The 2001 prize winners were Dr Oliver Pabst and Dr Stefan Hüttelmaier. Pabst worked on genes of importance in embryo development. His investigations at the Institute of Biochemistry and Biotechnology of TU Braunschweig focused on a gene which in mice is involved in the development of the immune system and the digestive tract. Hüttelmaier concerned himself with the molecular properties of contact sites of animal and human cells. His work provides important new aspects for a better understanding of the structure and function of normal cell contacts and extends previous knowledge on pathological processes, for example, in tumour formation and muscular diseases. The winner of the Fritz Wagner prize this year was Jan Henrik Enß from the Institute of Biochemical Engineering of the Technical University. In his diploma dissertation, Enß investigated methods with which biofilms on metallic surfaces can be analysed and destroyed.

The "Arbeitskreis für Zellbiologie und Biomedizinische Forschung e. V." (working group for cell biology and biomedical research) of the German Research Centre for Biotechnology (GBF) awarded the "Förderpreise" (promotion prizes) for the years 2000 and 2001. The "Förderverein" regards its prize as an unbureaucratic motivation for first-class basic research. Dr Carsten Hornig made his PhD thesis on the formation of blood vessels at TU Braunschweig. Hornig's studies were concerned with a variation of the VEGFR-1 receptor. The receptor is an important switching point in the growth process of new blood vessels. Within the framework of his PhD thesis, Karsten Kretschmer is conducting research at GBF on special cells of the immune system, the antibody-producing B1 cells. They apparently play an important role in children's defence against diseases (up to the age of 8).

The Dr Wilhelm Kempe Foundation of the blood transfusion service of the German Red Cross (DRK) in Lower Saxony, Saxony-Anhalt, Oldenburg, Bremen has awarded its 2001 scholarships for research projects on haematopoietic stem cells. The project of Lars Macke, doctoral student at GBF, relates to the quality control of dendritic cells for immunotherapy.

Veröffentlichungen | *Publications*

SP 1.1/*Cell Systems for Therapy and Diagnostics*

Gambert U, Conradt HS, Nimtz M, Thiem M (2000) Galactosidase-assisted synthesis en route to type I and type II structures of chitoooligomeres. *J Carbohydr Chem* 19:621-629.

Gross G, Czichos S, Ju W, Kaps C, Häupl T, Sittinger M, Burmester G, Hoffmann A (2000) Signal-kaskaden bei der Knorpel- und Knochenbildung. *Z Rheumatol* 59:406-407.

Häupl T, Kaps C, Bramlage C, Ungethüm U, Gross G, Sittinger M, Burmester G (2000) Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration und Protektion für Gelenkknorpel. *Z Rheumatol* 59:414-415.

Hoffmann A, Pethig K, Heublein B, Timke A, Gross G, Haverich A (2000) Polymorphism of transforming growth factor- β (codon 25) and progression of cardiac allograft vascular disease. *J Heart Lung Transpl* 19:1175-82.

Ju W, Hoffmann A, Verschuere K, Tylzanowski P, Kaps C, Gross G, Huylebroeck D (2000) The BMP2 signaling mediator Smad1 participates predominantly in osteogenic and not in chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors C3H10T1/2. *J Bone Min Res* 15:1889-1899.

Pethig K, Hoffmann A, Heublein B, Timke A, Gross G, Haverich A (2000) Cardiac allograft vascular disease after orthotopic heart transplantation: methylentetrahydrofolate reductase gene polymorphism C677T does not account for rapidly progressive forms. *Transplantation* 69:442-445.

Sittinger M, Perka C, Schultz O, Wilke I, Mensing M, Gross G, Häupl T, Burmester G (2000) Neue Ansätze zur Knorpelregeneration durch Tissue Engineering bei chronischen Gelenkerkrankungen. *Z Rheumatol* 59:410-411.

Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne HJ, Waltenberger J, Kollet O, Lapidot T, Yayon A, Weich HA (2001) Single chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD344⁺ cells from cord blood. *Stem Cells* 19:24-36.

Hecht HJ, Adar R, Bogin O, Weich HA, Yayon A (2001) Structure of Fibroblast Growth Factor-9 predicts a symmetric dimer with unique receptor and heparin binding interfaces. *Acta Crystallographica D* 57:378-384.

Boehme C, Conradt HS, Nimtz M, Eckert R, Ragg H, Strathmann A (2001) Glycosylation pattern of human cofactor II from plasma and from recombinant CHO cells. *Eur J Biochem*, in press

Böldicke T, Struck F, Schaper F, Tegge W, Sobek H, Villbrandt B, Lankenau P, Böcher M (2001) A new peptide-affinity tag for the detection and affinity purification of recombinant proteins with a monoclonal antibody. *J Immunol Methods*, in press

Cruz HJ, Conradt HS, Dunker R, Peixoto CM, Cunha AE, Thomaz M, Burger C, Dias HM, Clemente J, Moreira JL, Rieke E, Carrondo MJT (2001) Process development of a recombinant antibody-cytokine fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. *J Biotechnol*, in press

Grabenhorst E, Nimtz M, Conradt HS (2001) Protein glycosylation in the presence of Brefeldin A :complex-type glycosylation occurs but terminal sialylation and fucosylation is abolished. *FEBS Lett*, in press

Grabenhorst E, Nimtz M, Conradt HS (2001) Type I and type II membrane anchors confer targeting of glycosyltransferase to the late in-vivo functional Golgi compartment (TGN). *Protein Expression*, in press

Hoffmann A, Gross G (2001) BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, in press

Hoffmann A, Weich HE, Gross G, Hillmann G (2001) Perspectives in the biological function, the technical and therapeutic application of bone morphogenetic proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press

Jorgensen C, Gross G (2001) Rheumatoid arthritis, the consequence of foetal gene expression in joints? *Annals Rheumatic Dis*, in press

Kemminer S, Conradt HS, Nimtz M, Müthing M (2001) Production and molecular characterisation of a clinical phase I anti-melanoma IgG3 monoclonal antibody R24. *Biotechnol Progr*, in press

Kim T-Y, Vargas V, Tegge W, Mayer H, Somjen D, Kaye AM (2001) Selective anabolic effects of muteins of mid-region PTH-fragments on rat skeletal cells and tissues of prepubertal rats. *Bone*, in press

Sommer A, Nimtz M, Brattig N, Conradt HS, Büttner D, Fischer P, Brophy P, Walter R, Liebau E (2001) Structural analysis and immunological relevance of the extracellular glutathione S-transferases from *Onchocerca volvulus*. *J. Infect Dis*, in press

SP 1.2/*Vectors for Gene Therapy*

Baer A, Schübeler D, Bode J (2000) Transcriptional Properties of genomic transgene integration sites marked by electroporation or retroviral infection. *Biochemistry* 39:7041-7049.

Baiker A, Maercker C, Piechaczek C, Schmidt SBA, Bode J, Benham C, Lipps HJ (2000) Mitotic stability of S/MAR containing episomal vectors is provided by nuclear matrix association. *Nat Cell Biol* 2:182-184.

Ben-Asouli Y, Banai Y, Hauser H, Kaempfer R (2000) Recognition of 5'-terminal TAR structure in human immunodeficiency virus-1 mRNA by eukaryotic translation initiation factor 2. *Nucleic Acids Res* 18:1011-1018.

Bode J, Benham C, Ernst E, Knopp A, Marschalek R, Strick R, Strissel P (2000) Fatal connections: when

- DNA ends meet on the nuclear matrix. *J Cell Biochem Suppl* 35:3-22. <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/issuetoc?ID=82002725>.
- Bode J, Benham C, Knopp A, Mielke C (2000) Transcriptional augmentation: modulation of gene expression by Scaffold/Matrix Attached Regions (S/MAR Elements). *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 10:73-90.
- Bode J, Schlake T, Iber M, Schübeler D, Seibler J, Snezhkov E, Nikolaev L (2000) The transgeneticist's toolbox - Novel methods for the targeted modification of eukaryotic genomes. *Biol Chem* 381:801-813.
- Carvalho AV, Moreira JL, Cruz H, Mueller PP, Hauser H, Carrondo MJT (2000) Manipulation of culture conditions for BHK cell growth inhibition by IRF-1 activation. *Cytotechnology* 32:135-145.
- Gambert U, Conradt HS, Nimitz M, Thiem M (2000) Galactosidase-assisted synthesis en route to type I and type II structures of chitooligomers. *J Carbohydr Chem* 19:621-629.
- Geserick C, Bonarius HPJ, Kongerslev L, Hauser H, Müller PP (2000) Enhanced productivity during controlled proliferation of BHK cells in continuously perfused bioreactors. *Bioeng Biotech* 69:266-274.
- Hauser H, Spitzer D, Verhoeyen E, Wirth D (2000) New approaches towards ex vivo and in vivo gene therapy. *Cells Tissues Organs* 167:75-80.
- Hornig C, Barleon B, Ahmad S, Vuorela P, Ahmed A, Weich HA (2000) Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab Invest* 80:443-454.
- Kirchhoff S, Oumard A, Nourbakhsh M, Levi B-Z, Hauser H (2000) Interplay between repressing and activating domains defines the transcriptional activity of IRF-1. *Eur J Biochem* 267:6753-6761.
- Kwissa M, Unsinger J, Schirmbeck R, Hauser H, Reimann J (2000) Polyvalent DNA vaccines with bidirectional promoters. *J Mol Med* 78:495-506.
- Mielke C, Tümmeler M, Schübeler D, von Hoegen I, Hauser H (2000) Stabilized, long-term expression of heteromeric proteins from tricistronic mRNA. *Gene* 254:1-8.
- Oumard A, Hennecke M, Hauser H, Nourbakhsh M (2000) Translation of NRF mRNA is mediated by a highly efficient internal ribosome entry site. *Mol Cell Biol* 20:2755-2759.
- Stoelcker B, Echtenacher B, Weich HA, Szather H, Hicklin DJ, Männel DN (2000) VEGF/Flk-1 interaction, a requirement of malignant ascites recurrence. *J Interfer Cytok Res* 20(5):511-517.
- Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich HA, Halmesmääki E (2000) Amniotic fluid soluble vascular endothelial growth factor receptor-1d in pre-eclampsia. *Obstetrics Gynecol* 95(3):353-357.
- Bode J, Fetzter CP, Nehlsen K, Scinteie M, Hinrich B, Baiker A, Piechazcek C, Benham C, Lipps HJ (2001) The Hitchhiking Principle: Optimizing episomal vectors for the use in gene therapy and biotechnology. *Int J Gene Ther Mol Biol* 6:33-46.
- Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne HJ, Waltenberger J, Kollet O, Lapidot T, Yayon A, Weich HA (2001) Single chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD344+ cells from cord blood. *Stem Cells* 19:24-36.
- Hecht HJ, Adar R, Bogin O, Weich HA, Yayon A (2001) Structure of Fibroblast Growth factor 9 predicts a symmetric dimer with unique receptor and heparin binding interfaces. *Acta Crystallogr D* 57:378-384.
- Helske S, Vuorela P, Carpen O, Hornig C, Weich H, Halmesmääki E (2001) Expression of VEGF receptors 1, 2 and 3 in placentas from normal and complicated pregnancies. *Mol Hum Reprod* 7:205-210.
- Kröger A, Ortmann D, Krohne TU, Blum H, Hauser H, Geissler M (2001) Growth Suppression of the Hepatocellular Carcinoma Cell Line Hepa1-6 by an Activatable Interferon Regulatory Factor-1 in Mice. *Cancer Res* 61:2609-2617.
- Lillemeier BF, Köster M, Kerr IM (2001) STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J* 20:2508-2517.
- Nourbakhsh M, Kälble S, Hauser H, Resch K, Kracht M (2001) The NF-kappaB repressor factor NRF is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappaB-flanking sequence element. *J Biol Chem* 276(6):4501-4508.
- Nourbakhsh M, Oumard A, Schwarzer M, Hauser H (2001) NRE, a nuclear inhibitor of NF-kB proteins silences the IFN- β promoter. *Europ Cytokine Network* 11.
- Verhoeyen E, Hauser H, Wirth D (2001) Conversion to expression stability by Flp-mediated cassette replacement. *Hum Gene Ther* 12:933-944.
- Baer A, Bode J (2001) Coping with kinetic and thermodynamic barriers: RMCE, an efficient strategy for the targeted integration of transgenes. *Curr Opin Biotech*, in press
- Boehme C, Conradt HS, Nimitz M, Eckert R, Ragg H, Strathmann A (2001) Glycosylation pattern of human cofactor II from plasma and from recombinant CHO cells. *Eur J Biochem*, in press
- Cruz HJ, Conradt HS, Dunker R, Peixoto CM, Cunha AE, Thomaz M, Burger C, Dias HM, Clemente J, Moreira JL, Rieke E, Carrondo MJT (2001) Process development of a recombinant antibody-cytokine fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. *J Biotechnol*, in press
- Engel H, Rühl H, Benham CJ, Bode J, Weiss J (2001) Germ-line transcripts of the immunoglobulin 8 J-C clusters in the mouse: Characterization of the

initiation sites and regulatory elements. *Eur J Immunol*, in press

Gautron J, Hinke MT, Panheleux M, Garcia-Ruiz JM, Böldicke T, Nys Y (2001) Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer. *Connective tissue international*, in press

Grabenhorst E, Nimtz M, Conrath HS (2001) Protein glycosylation in the presence of Brefeldin A: complex-type glycosylation occurs but terminal sialylation and fucosylation is abolished. *FEBS Lett*, in press

Grabenhorst E, Nimtz M, Conrath HS (2001) Type I and type II membrane anchors confer targeting of glycosyltransferase to the late in-vivo functional Golgi compartment (TGN). *Prot Expr*, in press

Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H (2001) Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucl Acids Res*, in press

Hoffmann A, Weich HA, Gross G, Hillmann G (2001) Perspectives in the biological function, the technical and therapeutical application of bone morphogenetic proteins. *Appl Microbiol Biotech*, in press

Kim T-Y, Vargas V, Tegge W, Mayer H, Somjen D, Kaye AM (2001) Selective anabolic effects of muteins of mid-region PTH-fragments on rat skeletal cells and tissues of prepubertal rats. *Bone*, in press

Koolwijk P, Peters E, Vecht B v d, Hornig C, Weich HA, Alitalo K, Hicklin DJ, Wu Y, Witte L, van Hinsbergh V (2001) Involvement of VEGFR-2 (KDR/FLK-1) but not VEGFR-1 (flt-1) in VEGF-A and VEGF-C induced tube formation by human microvascular endothelial cells in fibrin matrices in vitro. *Angiogenesis*, in press

Lipps HJ, Bode J (2001) Exploiting chromosomal and viral strategies: The design of safe and efficient nonviral gene transfer systems. *Curr Opin Mol Therapeut*, in press

Neulen J, Wenzel D, Wünsch E, Weissenborn U, Büttner R, Weich HA (2001) Poor responder- high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) in ovarian stimulation protocols. *Hum Reproduc*, in press

Niemann H, Verhoeyen E, Wonigeit K, Schwitzer R, Hauser H, Kues W, Halter R, Lemme E, Herrmann D, Wirth D, Paul D (2001) The CMV early promoter directs strong expression of hCD59 to porcine organs relevant for xenotransplantation. *Transplantation*, in press

SP 1.3/*Cell, Tissue and Organ Technology*

Chico E, Jäger V (2000) Perfusion culture of baculovirus-infected BTI-Tn-5B1-4 insect cells: A method to restore cell-specific β -trace glycoprotein productivity at high cell density. *Biotechnol Bioeng* 70:574-586.

Hesse F, Wagner R (2000) Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics from mammalian cell cultures. *Tibtech* 18:173-180.

Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne H-J, Waltenberger J, Kollet O, Lapidot T, Yavon A, Weich H (2001) Anti-VEGFR-2 scFvs for Cell Isolation. Single Chain Antibodies Recognizing the Human Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the Surface of Primary Endothelial Cells and preselected CD34⁺ Cells from Cord Blood. *Stem Cells* 19:24-36.

Wagner R (2001) Process-orientated metabolic engineering: Cell lines with new properties in nutrient exploitation and protein glycosylation. In: Cole, J., Mattanovich, D. (eds.) *Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. A Comparative View on Host Physiology*. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands, in press

SP 1.4/*Cell and Organ Tissue Culturing*

Bader A, DeBartolo L, Haverich A (2000) High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J Biotechnol* 25:95-105.

Bader A, Hansen T, Kirchner G, Allmeling C, Haverich A, Borlak JT (2000) Primary porcine enterocyte spheroidal cultures to study drug oxidation. *Brit J Pharmacol* 129:331-342.

Bader A, Steinhoff G, Strobl K, Schilling T, Brandes G, Mertsching H, Tsikas D, Froelich J, Haverich A (2000) Engineering of human aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix. *Transplantation* 70:7-14.

DeBartolo L, Jarosch von Schweder, G, Haverich A, Bader A (2000) A novel full-scale flat membrane bioreactor utilizing porcine hepatocytes: Cell viability and tissue-specific functions. *Biotechnol Progr* 16:102-108.

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

Högemann D, Baumann A, Rocker D, Bader A (2000) In vitro model of the human liver parenchyma to study hepatotoxic side effects of Dy-EOB-DTPA. *Invest Radiol* 25:373-379.

Just L, Mörl F, Barmann C, Olenik C, Meyer DK (2000) Evidence for cell specific regulation by PACAP38 of the proenkephalin gene expression in neocortical cells. *Glia* 30:242-52.

Karim N, Allmeling C, Hengstler J-G, Haverich A, Bader A (2000) Diazepam metabolism and albumin secretion of porcine hepatocytes in collagen-sandwich after cryopreservation. *Biotechnol Lett* 22:1647-1652.

Mertsching H, Karim N, Haverich A, Bader A (2000) Investigations on biological safety and immunologic aspects of chimeric bioartificial vessels in xenotransplantation. *Transplant Proc* 32:1165.

Shen Z-L, Lassner F, Bader A, Becker M, Walter GF, Berger A (2000) Cellular activity of resident macrophages during wallerian degeneration. *Microsurgery* 20:255-261.

Shen ZL, Lassner F, Becker M, Walter GF, Bader A, Berger A (2000) Viability of cultured nerve grafts: An assessment of proliferation of Schwann cells and fibroblasts. *Microsurgery* 19:356-363.

Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss R, Pethig K, Haverich A, Bader A (2000) Tissue Engineering of pulmonary heart valves on allogeneic acellular matrix conduits in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102:50-55.

Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A (2000) Tissue engineering of vascular grafts: Human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 19:381-386.

SP 2.1/Pathogenicity Factors of Streptococci and Pneumococci

Barzik M, Schubert WD, Carl U, Wehland J, Heinz DW (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of vesl-2b. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr* 56:930-932.

Basso H, Rohde M, Guzmán CA (2000) Vectors to achieve selective expression of vaccine antigens within eukaryotic cells using *Salmonella spp.* as carrier strains. *FEMS Microbiol Lett.* 182:219- 223.

Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fässler R, Wehland J, Gertler F (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101:717-728.

Böldicke T, Tesar M, Griesel C, Rohde M, Gröne H-J, Waltenberg J, Kollet O, Lapidot T, Yayon A, Weich H (2000) Single-chain antibodies recognizing the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/flk-1) on the surface of primary endothelial cells and preselected CD34⁺ cells from cord blood. *Stem Cells* 19:24-36.

Garcia-Del Portillo F, Jungnitz H, Rohde M, Guzmán CA (2000) Interaction of *Salmonella enterica* serotype typhimurium with dendritic cells Is defined by targeting to compartments lacking lysosomal membrane glycoproteins. *Infect Immun* 68:2985-2991.

Geese M, Schlüter K, Rothkegel M, Jockusch BM, Wehland J, Sechi AS (2000) Accumulation of porfilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci* 113:1415-1426.

Goodfellow AM, Hibble M, Talay SR, Kreikemeyer B, Currie BJ, Sriprakash KS, Chhatwal GS (2000) Distribution and antigenicity of fibronectin binding proteins (SfBI and SfbII) of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates from the Northern Territory, Australia. *J Clin Microbiol* 38:389-392.

Haidan A, Talay SR, Rohde M, Sriprakash KS, Currie BJ, Chhatwal GS (2000) Pharyngeal carriage of group C and G streptococci might be associated with acute rheumatic fever in the Aboriginal population of the Northern Territory of Australia. *The Lancet* 356:1167-1169.

Hammerschmidt S, Tillig MP, Wolff S, Vaerman J-P, Chhatwal GS (2000) Specie-specific binding of human secretory component to SpsA protein of

Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif. *Mol. Microbiol.* 36:726-736.

Hartleib J, Köhler N, Dickinson RB, Chhatwal GS, Sixma JJ, Hartford OM, Foster TJ, Peters G, Kehrel BE, Herrmann M (2000) Protein A is the Von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96:2149-2156.

Kalisz HM, Erck C, Plessmann U, Wehland J (2000) Incorporation of nitrotyrosine into by recombinant mammalian tubulin-tyrosine ligase. *Biochim Biophys Acta* 1481:131-138.

Krause M, Sechi AS, Konradt M, Monner D, Gertler FB, Wehland J (2000) 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) Singaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149:181-194.

Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzmán CA (2000) 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* 30:768-777.

Medina E, Schulze K, Chhatwal GS, Guzmán CA (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')₂ fragment. *Infect Immun* 68:4786-4788.

Molinari G, Rohde M, Guzmán CA, Chhatwal GS (2000) Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol* 2:145-154.

Paschen A, Dittmar KEJ, Grenningloh R, Rohde M, Schadendorf D, Domann E, Chakraborty T, Weiss S (2000) Maturation of human dendritic cells induced by *Listeria monocytogenes*, *Eur J Immunol* 30:3447-3456.

Pistor S, Grobe L, Sechi AS, Domann E, Gerstel B, Machesky LM, Chakraborty T, Wehland J (2000) Mutations of arginine residues within the 146-KKRRK-150 motif of the ActA protein of *Listeria monocytogenes* abolish intracellular motility by interfering with the α -tubulin recruitment of the Arp2/3 complex. *J Cell Sci* 113:3277-3287.

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

Sato S, Nomura F, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, Akira S (2000) Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 165:7096-7101.

Stender S, Friebe A, Linder S, Rohde M, Miold S, Hardt W-D (2000) Identification of SopE2 from *S. typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* 36:1206-1221.

- Takeuchi A, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S (2000) Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide MALP-2 activates immune cells through a TLR2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164:554-557. Erratum in Nov. Issue: It should read S-stereoisomer as the active isomer!
- Talay SR, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, Guzmán CA, Chhatwal GS (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2:521-535.
- Vaerman JP, Langendries A, Fiffroy D, Delmee M, Hammerschmidt S (2000) Human SigA shows apparently higher affinity than human free SC (FSC) for recombinant Pneumococcal surface Protein (SpsA). *Scand J Immunol* 52:454.
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2001) α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40:1273-1287.
- Fagan PK, Reinscheid D, Gottschalk B, Chhatwal GS (2001) Identification and characterization of a novel secreted immunoglobulin binding protein from group A streptococcus. *Infect Immun* 69:4851-4857.
- Galanos C, Gumenscheimer M, Mühlradt PF, Jirillo E, Freudenberg M (2001) MALP-2, a mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *J Endotoxin Res* 6:471-476.
- Hahne P, Sechi A, Benesch S, Small JV (2001) Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett* 492:215-220.
- Holmes AR, McNab R, Millsap KW, Rohde M, Hammerschmidt S, Mawdsley JL, Jenkinson HF (2001) The pvaA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* 41:1395-1408.
- Lüneberg E, Mayer B, Daryab N, Kooistra O, Zähringer U, Rohde M, Swanson J, Frosch M (2001) Chromosomal insertion and excision of a 30 kb instable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 39:1259-1271.
- Medina E, Goldmann O, Rohde M, Lengeling A, Chhatwal GS (2001) Genetic control of susceptibility to group A streptococcal infection in mice. *J Infect Dis* 184:846-852.
- Mialhe A, Lafanechère L, Treilleux I, Peloux N, Dumontet C, Brémond MH, Panh R, Payan J, Wehland J, Margolis RL, Job D (2001) Tubulin dephosphorylation is a frequent occurrence in breast cancer of poor prognosis. *Cancer Res* 61:5024-7.
- Molinari G, Rohde M, Talay SR, Chhatwal GS, Beckert S, Podbielski A (2001) The role played by the group A streptococcal negative regulator Nra on bacterial interactions with epithelial cells. *Mol Microbiol* 39:1-17.
- Reinscheid DJ, Gottschalk B, Schubert A, Eikmanns BJ, Chhatwal GS (2001) Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J Bacteriol* 183:1175-1183.
- Schulze K, Medina E, Talay SR, Towers RJ, Chhatwal GS, Guzmán CA (2001) Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for elicitation of a protective immune response. *Infect Immun* 69:622-625.
- Stradal TB, Courtney K, Rottner K, Hahne P, Small JV, Pendergast AM (2001) The Abl-interactor (Abi) proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol* 11:891-895.
- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S (2001) Discrimination of microbial lipoproteins by Toll-like receptor (TLR) 6. *Int Immunol* 13:933-940
- Veé S, Lafanechère L, Fisher D, Wehland J, Job D, Picard A (2001) Evidence for a role of the α -tubulin C-terminus in the regulation of cyclin B synthesis in developing oocytes. *J Cell Sci* 114:887-98.
- Wilde C, Chhatwal GS, Schmalzing G, Aktories K, Just I (2001) A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from *Staphylococcus aureus* modifying RhoE and Rnd3. *J Biol Chem* 276:9537-9542.
- Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452-1463.
- Bosc C, Frank R, Schweitzer A, Denarier E, Wehland J, Job D (2001) Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J Biol Chem*, in press
- Bruns A, Rohde M, Berthe-Corti L (2001) *Caudamuris ruestringiensis* gen.nov., sp.nov., a facultative anaerobe, appendaged species from German North Sea intertidal sediment *Int J System Evol Microbiol*, in press
- Kühnel MP, Goethe R, Habermann A, Müller E, Rohde M, Griffiths G, Valentin-Weigand P (2001) Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: Phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages as compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol*, in press.
- Rottner K, Krause M, Gimona M, Small JV, Wehland J (2001) Zyxin is not co-localised with VASP at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin and VASP in focal adhesions. *Mol Biol Cell*, in press
- von Wintzingerode F, Göbel UB, Siddiqui RA, Rösick U, Schumann P, Frühling A, Rohde M, Stackebrandt E (2001) *Saalia multivirans* gen.nov., sp.nov. Isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction. *Int J System Evol Microbiol*, in press

SP 2.2/Vaccine Research

Basso H, Rohde M, Guzmán CA (2000) Vectors to achieve selective expression of vaccine antigens within eukaryotic cells using *Salmonella* spp. as carrier strains. *FEMS Microbiol Lett* 82:219-223.

Beltrametti F, Kresse AU, Guzmán CA (2000) Transcriptional regulation of the *pas* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 184:119-125.

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

Kresse AU, Beltrametti F, Ebel F, Guzmán CA (2000) Characterization of the SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:6490-6498.

Medina E, Guzmán CA (2000) Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27:305-311.

Medina E, Paglia P, Rohde M, Colombo MP, Guzmán CA (2000) 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* 30:768-777.

Medina E, Schulze K, Chhatwal GS, Guzmán CA (2000) Nonimmune interaction of the SfbI protein of *Streptococcus pyogenes* with the immunoglobulin G F(ab')₂ fragment. *Infect Immun* 68:4786-4788.

Molinari G, Rohde M, Guzmán CA, Chhatwal GS (2000) Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non phagocytic cells. *Cell Microbiol* 2:145-154.

Montosi G, Paglia P, Garuti C, Guzmán CA, Bastin JM, Colombo MP, Pietrangelo A (2000) Wild type HFE protein normalizes transferrin iron accumulation in macrophages from subjects with hereditary hemochromatosis. *Blood* 96:1125-1129.

Paglia P, Terrazini N, Schulze K, Guzmán CA, Colombo MP (2000) In vivo correction of genetic defects of monocytes/macrophages using attenuated *Salmonella* as oral vectors for targeted gene delivery. *Gene Ther* 7:1725-1730.

Talay SR, Zock A, Rohde M, Molinari G, Oggioni M, Pozzi G, Guzmán CA, Chhatwal GS (2000) Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell Microbiol* 2:521-535.

West NP, Jungnitz H, Fitter JT, McArthur JD, Guzmán CA, Walker MJ (2000) Role of phosphoglucomutase of *Bordetella bronchiseptica* in lipopolysaccharide biosynthesis and virulence. *Infect Immun* 68:4673-4680.

Drabner B, Guzmán CA (2001) Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. *Genetic Analysis: Biomol Eng* 17:74-82.

Medina E, Guzmán CA (2001) Use of live bacterial

vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 19:1573-1580.

Schulze K, Medina E, Talay SR, Towers RJ, Chhatwal GS, Guzmán CA (2001) Characterization of the domain of fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for the elicitation of a protective immune response. *Infect Immun* 69:622-625.

Smith AM, Guzmán CA, Walker MJ (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* 25:309-333.

Colombo MP, Guzmán CA, Pietrangelo A, Paglia P (2001) Attenuated *Salmonella* as vector for gene therapy and nucleic acid vaccination. *Gastroenterol*, in press

Kresse AU, Ebel F, Guzmán CA (2001) Functional modulation of pathogenic bacteria upon contact with host target cells. In: "Advances in molecular and cellular microbiology - Bacterial adhesion to host tissues: mechanisms and consequences", M. Wilson (ed). Cambridge University Press, in press

Zimna K, Medina E, Jungnitz H, Guzmán CA (2001) Role played by the response regulator Ris in *Bordetella bronchiseptica* resistance to macrophage killing. *FEMS Microbiol Lett*, in press

SP 2.3/Immune Response and Antigen Presentation

Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1190:341-349.

Heidecker L, Brasseur F, Probst-Kepper M, Guéguen M, Boon T, Van den Eynde BJ (2000) Cytolytic T lymphocytes raised against a human bladder carcinoma recognize an antigen encoded by gene *MAGE-A12*¹. *J Immunol* 164:6041-6045.

Pabst O, Förster R, Lipp M, Engel H, Arnold H-H (2000) NKX2.3 is required for MAdCAM-1 expression and homing of lymphocytes in spleen and mucosa-associated lymphoid tissue. *Embo J* 19:2015-2023.

Paschen A, Dittmar KEJ, Grenningloh R, Rohde M, Schadendorf D, Domann E, Chakraborty T, Weiss S (2000) Human dendritic cells infected by *Listeria monocytogenes*: induction of maturation, requirements for phagolysosomal escape and antigen presentation capacity. *Eur J Immunol* 30:3447-3456.

Engel H, Rühl H, Benham CJ, Bode J, Weiss S (2001) Germ-line transcripts of the immunoglobulin I J-C clusters in the mouse: Characterization of the initiation sites and regulatory elements. *Mol Immunol* 38:289-302.

Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KEJ, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S (2001) Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cell Microbiol* 3:599-609.

Probst-Kepper M, Stroobant V, Kridel R, Gaugler B, Landry C, Brasseur F, Cosyns J-P, Weynand B, Boon T,

Van den Eynde BJ (2001) An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J Exp Med* 193:1189-1198.

Weiss S, Chakraborty T (2001) Bacteria-mediated DNA transfer for gene therapy and genetic vaccination. *In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging Strategies*, Horizon Scientific Press, Wymondham, U. K.: 81-89.

Weiss S, Krusch S (2001) Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells. *Biol Chem* 382:533-541.

SP 2.4/Experimental Immunology

Artis D, Humphreys NE, Potten CS, Wagner N, Müller W, McDermott JR, Grecnis RK, Else KJ (2000) Beta7 integrin-deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small intestine during enteric helminth infection. *Eur J Immunol* 30:1656-1664.

Davidson NJ, Fort MM, Müller W, Leach MW, Rennick DM (2000) Chronic colitis in IL-10^{-/-} mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. *Int Rev Immunol* 19:91-121.

Kanwar JR, Harrison JE, Wang D, Leung E, Müller W, Wagner N, Krissansen GW (2000) Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 103:146-152.

Vosshenrich CA, Sharara LI, Guy-Grand D, Rajewsky K, Müller W, Di Santo JP (2000) Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-deficient B cells persist in T cell-deficient gammac-mice and respond to a T-independent antigen. *Eur J Immunol* 30:1614-1622.

Kuklin NA, Rott L, Feng N, Conner ME, Wagner N, Müller W, Greenberg HB (2001) Protective intestinal anti-rotavirus B cell immunity is dependent on alpha 4 beta 7 integrin expression but does not require IgA antibody production. *J Immunol* 166:1894-1902.

Leuker CE, Labow M, Müller W, Wagner N (2001) Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. *J Exp Med* 193:755-768.

SP 2.5/Mucosal Immunity

Oevermann K, Buer J, Hoffmann R, Franzke A, Schrader A, Patzelt T, Kirchner H, Atzpodien J (2000) Capecitabine in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 83:583-587.

Schrader AJ, Probst-Kepper M, Große J, Kunter U, Franzke A, Sel S, Atzpodien J, Buer J (2000) Tumour microdissemination and survival in metastatic melanoma. *Anticancer Res* 20:3619-3624.

Schrader AJ, Probst-Kepper M, Große J, Kunter U, Schenk F, Franzke A, Atzpodien J, Buer J (2000) Molecular and prognostic classification of advanced melanoma: a multi- marker microcontamination

assay of peripheral blood stem cells. *Melanoma Res* 10:355-362.

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

Felske A, Pauling BV, von Canstein HE, Li Y, Lauber J, Buer J, Wagner-Döbler I (2001) Detection of small sequence differences using competitive PCR: Molecular monitoring of genetically improved, mercury-reducing bacteria. *BioTechniques* 30:142-148.

Lechner O, Lauber J, Franzke A, Sarukhan A, von Boehmer H, Buer J (2001) Fingerprints of anergic T cells. *Curr Biol* 11:587-595.

Hess S, Rheinheimer C, Tidow F, Bartling G, Kaps C, Lauber J, Buer J, Klos A (2001) The reprogrammed host: Chlamydia trachomatis-induced up-regulation of gp130-cytokines, transcription-factors and anti-apoptotic genes. *Arthritis and Rheumatism*, in press

Lechner O, Bruder D, Lauber J, Buer J (2001) Anergie T-Zellen: Immunregulatoren mit Potential für die Klinik! Die gelben Hefte, in press

Walter U, Töpfer T, Lauber J, Buer J, Lechner O (2001) High efficient reverse transcription for single cell multiplex RT PCR. *Hybaid Technical Report*, in press

SP 2.6/Clonal Variability

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

Römling U, Tümmler B (2000) Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 38:464-465.

Römling U (2001) Genetic and phenotypic analysis of multicellular behaviour in *Salmonella typhimurium*. *In: Methods Enzymol* 336:48-59.

Zogaj X, Nimtj M, Rohde M, Bokranz W, Römling U (2001) The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39:1452-1463.

SP 3.1/Chemistry and Biology of Microbial Bioactive Compounds

Gerth K, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H (2000) Studies on the biosynthesis of epothilones. The biosynthetic origin of the carbon skeleton. *J Antibiot* 53:1373-1377.

Höfle G (2000) Epothilon – ein Naturstoff auf dem Weg zum Medikament/Epothilone – a natural product on the road to becoming a medicine. *In: Ergebnisbericht/Annual Report GBF 1999/2000*:21-34.

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

- Jansen R, Kunze B, Reichenbach H, Höfle G (2000) Antibiotics from Gliding Bacteria LXXXVI, Apicularen A and B, Cytotoxic 10-membered Lactones with a Novel Mechanism of Action from *Chondromyces* Species (Myxobacteria): Isolation, Structure Elucidation, and Biosynthesis. *Eur J Org Chem* 6:913-919.
- Knauth P, Reichenbach H (2000) On the mechanism of action of the myxobacterial fungicide ambruticin. *J Antibiot* 53:1182-1190.
- Sasse F, Steinmetz H, Heil J, Höfle G, Reichenbach H (2000) Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot* 53:879-885.
- Söker U, Sasse F, Kunze B, Höfle G (2000) Neighbouring-group Assisted Thiazole Ring-cleavage by DIBAL-H: An Expedient Synthesis of Melithiazol C from Myxothiazol A. *Eur J Org Chem* 11:2021-2026.
- Söker U, Sasse F, Kunze B, Höfle G (2000) Synthesis of Melithiazol B and Related Compounds via Oxidative Degradation of Myxothiazol A and Z. *Eur J Org Chem* 8:1497-1502.
- Steinmetz H, Forche E, Reichenbach H, Höfle G (2000) Biosynthesis of Myxothiazol Z, the Ester-analog of Myxothiazol A in *Myxococcus fulvus*, *Tetrahedron* 56:1681-1684.
- Gerth K, Steinmetz H, Höfle G, Reichenbach H (2001) Studies on the biosynthesis of epothilones. The PKS and epothilone C/D monooxygenase. *J Antibiot* 54:144-148.
- Hardt IH, Steinmetz H, Gerth K, Sasse F, Reichenbach H, Höfle G (2001) New Natural Epothilones from *Sorangium cellulosum*, Strains So ce90/B2 and So ce90/D13: Isolation, Structure Elucidation, SAR-Studies. *J Nat Prod* 64:847-856.
- Reichenbach H (2001) Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol* 27:149-156.
- SP 3.2/Combinatorial Molecular Repertoires**
- Böldicke T, Böcher M, Struck F, Schaper F, Tegge W, Lankenau P (2000) A new peptide-affinity tag for the detection and affinity purification of recombinant proteins with a monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 240:165-183.
- Dostmann WRG, Taylor MS, Nickl CK, Brayden JE, Frank R, Tegge WJ (2000) Highly specific, membrane-translocating cGMP-dependent protein kinase Ia inhibitors from peptide libraries inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proc Natl Acad Sci*, 97:14772-14777.
- Erck CH, Frank R, Wehland J (2000) Tubulin-Tyrosine Ligase, a long lasting Enigma. *Neurochem Res* 25:5-10.
- Himpel S, Tegge W, Frank R, Leder S, Joost H-G, Becker W (2000) Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J Biol Chem*, 275:2431-2438.
- Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S (2000) Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signalling pathway. *J Immunol* 164:554-557.
- Wiemann A, Frank R, Tegge W (2000) Synthesis of suitably protected 'hydroxy-methylene phosphonate'- and 'phosphate phosphonate'-analogues of phosphoserine and their incorporation into synthetic peptides. *Tetrahedron* 56:1331-1337.
- Wissing J, Heim S, Flohé L, Bilitewski U, Frank R (2000) Enrichment of hydrophobic proteins via Triton X-114 phase partitioning and hydroxyapatite column chromatography for mass spectrometry. *Electrophoresis* 13:2589-2593.
- Cervoni L, Lascu I, Xu Y, Gonin P, Morr M, Merouani M, Janin J, Giartosio A (2001) Binding of nucleotides to nucleoside diphosphate kinase: a calorimetric study. *Biochemistry* 40:4583-4589.
- Hawlich H, Müller M, Frank R, Bautsch W, Klos A, Köhl J (2001) Site-specific anti-C3a receptor single-chain antibodies selected by differential panning on cellulose sheets. *Anal Biochem* 293:142-145.
- Bosc C, Frank R, Schweitzer A, Denarier E, Wehland J, Job D (2001) Microtubule Stabilization by STOP Proteins Involves Two Classes of Modules with Distinct Structures and Functions. *J Biol Chem*, in press
- Frank R, Schneider-Mergener J (2001) SPOT-Synthesis - Scope of applications. In: Peptide arrays on membrane supports - synthesis and applications: A laboratory manual.. (Koch and Mahler, Eds.) Springer-Verlag, Berlin, in press
- von Minden HM, Morr M, Milkereit G, Vill V (2001) Synthesis and mesogenic properties of glycosyl diacylglycerols. *Chem Phys Lipids*, in press
- SP 3.3/Molecular Biology of Secondary Metabolites in Myxobacteria**
- Müller R (2000) Irseer Naturstofftage: Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoff-Forschung, *transcript* 6:32-34.
- Müller R, Gerth K, Brand P, Blöcker H, Beyer S (2000) Identification of an L-dopa decarboxylase gene from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Arch Microbiol* 173:303-306.
- Silakowski B, Kunze B, Müller R (2000) *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 contains genes encoding type I and type II 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases: involvement of a type II synthase in aurachin biosynthesis. *Arch Microbiol* 173:403-411.
- Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G, Müller R (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem* 267:6476-6485.
- Gaitatzis N, Hans A, Müller R, Beyer S (2001) The

mtaA gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 encodes a phosphopantetheinyl transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem* 129:119-124.

Silakowski B, Nordsiek G, Kunze B, Blöcker H, Müller R (2001) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Chem Biol* 8:59-69.

Yu T, Müller R, Müller M, Zhang X, Dräger G, Kim C-G, Leistner E, Floss HG (2001) Mutational analysis and reconstituted expression of the biosynthetic genes involved in the formation of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid, the starter unit of rifamycin biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* S699. *J Biol Chem* 276:12546-12555.

SP 4.1/Biodegradation of Organic Pollutants

Armengaud J, Gaillard J, Timmis KN (2000) A second [2Fe-2S] ferredoxin from *Sphingomonas* sp. Strain RW1 can function as an electron donor for the dioxin dioxygenase. *J Bacteriol* 182:2238-2244.

Hugo N, Meyer C, Armengaud J, Gaillard J, Timmis KN, Jouanneau Y (2000) Characterization of three XylT-like [2Fe-2S] ferredoxins associated with catabolism of cresols or naphthalene: evidence for their involvement in catechol dioxygenase reactivation. *J Bacteriol* 182:5580-5855.

Klemba M, Jakobs B, Wittich RM, Pieper DH (2000) Chromosomal integration of the *tcb* chlorocatechol degradation pathway genes as a means of expanding the growth substrate range of bacteria to include haloaromatics. *J Bacteriol* 182:3255-3261.

Perez-Pantoja D, Guzmán L, Manzano M, Pieper DH, Gonzalez B (2000) Role of *tfdC_ID_IE_IF_I* and *tfdD_{II}C_{II}E_{II}F_{II}* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl Environ Microbiol* 66:1602-1608.

Pieper DH, Reineke W (2000) Engineering bacteria for bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 11:262-270.

Bartels F, Fernandez S, Holtel A, Timmis KN, de Lorenzo V (2001) The essential HupB and HupN proteins of *Pseudomonas putida* provide redundant and nonspecific DNA-bending functions. *J Biol Chem* 276:16641-16648.

Potrawfke T, Armengaud J, Wittich RM (2001) Chlorocatechols substituted at positions 4 and 5 are substrates of the broad-spectrum chlorocatechol 1,2-dioxygenase of *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *J Bacteriol* 183:997-1011.

Rapp P (2001) Multiphasic kinetics of transformation of 1,2,4-trichlorobenzene at nano- and micromolar concentrations by *Burkholderia* sp. strain PS14. *Appl Environ Microbiol*, 67:3496-3500.

Vuilleumier S, Ucurum Z, Oelhafen S, Leisinger T, Armengaud J, Wittich RM, Timmis KN (2001). The glutathione S-transferase OrfE3 of the dioxin-

degrading bacterium *Sphingomonas* sp RW1 displays maleylpyruvate isomerase activity. *Chem Biol Interactions* 133:265-267.

Beltrametti F, Reniero D, Backhaus S, Hofer B (2001) Analysis of transcription of the *bph* locus of *Burkholderia* sp. strain LB400 and evidence that the *orf0* gene product acts as a regulator of the *bphA1* promoter. *Microbiology UK*, in press

Clement P, Pieper DH, Gonzalez B (2001) Molecular characterization of a deletion/duplication rearrangement in *tfd* genes from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4), which improves growth on 3-chlorobenzoic acid, but abolishes growth on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiology UK*, in press

Seeger M, Cámara B, Hofer B (2001) Dehalogenation, denitration, dehydroxylation and angular attack of substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase. *J Bacteriol*, in press

SP 4.2/Microbial Degradation Processes

Biebl H, Schwab-Hanisch H, Sprör C, Lünsdorf H (2000) *Propionispira vibrioides*, nov. gen. sp., a new gram-negative, spore-forming anaerobe that ferments sugar alcohols. *Arch Microbiol* 174:239-247.

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

Müller R-J (2000) Biologisch abbaubare Kunststoffe - Plastik lernt mit der Natur zu leben. *Biologie in unserer Zeit* 31(4):218-225.

Müller R-J, Deckwer WD (2000) Biologisch Abbaubare Polymere/Biologically degradable polymers. In: *Ergebnisbericht/Annual Report GBF 1999/2000*:35-54.

Abou-Zeid D-M, Müller R-J, Deckwer W-D (2001) Degradation of natural and synthetic polyesters under anaerobic conditions. *J Biotechnol* 86:113-126.

Müller R-J (2001) Ketten knacken leicht gemacht. *Spektrum der Wissenschaft*, Februar:78-80.

Müller R-J, Kleeberg I, Witt U, Deckwer W-D (2001) Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J Biotechnol* 86:87-95.

Pagga U, Schäfer A, Müller R-J, Pantke M (2001) Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in aqueous batch tests. *Chemosphere* 42:319-331.

Witt U, Einig T, Yamamoto M, Kleeberg I, Deckwer W-D, Müller R-J (2001) Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters: evaluation of the final biodegradability and ecotoxicological impact of degradation intermediates. *Chemosphere* 44:289-299.

SP 4.3/Molecular Microbial Ecology

Abraham W-R (2000) Microbial epoxidation: Application in Biotechnology. In: *Stereoselective biocatalysis* (R. Patel, ed.), Marcel Dekker, New York, 181-203.

Abraham W-R, Arfmann H-A, Kieslich K, Haufe G

- (2000) Regioselectivity of the microbial hydroxylation of trinorcyclanol and its derivatives. *Biocatalysis Biotrans* 18:283-290.
- Abraham W-R, Lünsdorf H, Nogales B, Moore ERB, Timmis KN (2000) Struktur und Funktion der mikrobiellen Gemeinschaft in einem PCB-belasteten Heideboden. In: *Biologische Sicherheit. Biomonitor, Molekulare Mikrobiökologie. Proceedings zum BMBF-Workshop 10./11.6.1999 Neuherberg*. A. Hartmann (Ed.), 167-178.
- Bennassar A, de Luna G, Cabrer B, Lalucat J (2000) Rapid identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. *Int Microbiol* 3:31-38
- Biebl H, Schwab-Hanisch H, Spröer C, Lünsdorf H (2000) *Propionispora vibrioides*, nov. gen., nov. sp., a new gram-negative spore-forming anaerobe which ferments sugar alcohols. *Arch Microbiol* 174:239-247.
- Bosch R, Lalucat J, Timmis KN, Moore ERB (2000) Complete nucleotide sequence and evolutionary significance of a chromosomally encoded naphthalene degradation lower pathway from *Pseudomonas stutzeri* AN 10. *Gene* 245:65-74.
- Bramkamp B, Heindl V, Timmis KN, Strätz M (2000) Nachweis von Plasmidtransferereignissen innerhalb der bakteriellen Gemeinschaft des Belebtschlammes einer Modellkläranlage. In: *Proceedings zum BMBF-Workshop 10-11. Juni 1999, GSF Neuherberg*.
- Brettar I, Sanchez-Perez JM, Trémolières M (2000) Auen und Polder als Stickstoffsinken: Redoxdynamik in Auenwäldern des Oberrheins. *Deutsche Gesellschaft für Limnologie, Tagungsberichte, Tutzing*: 439-443.
- Brümmer I, Fehr W, Timmis KN, Wagner-Döbler I (2000) Biofilm community structure in polluted rivers: Abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl Environ Microbiol* 66:3078-3082.
- Felske A, de Vos WM, Akkermans ADL (2000) Spatial Distribution of 16S rRNA Levels from Uncultured Acidobacteria in Soil. *Lett Appl Microbiol* 31:118-122.
- Felske A, Wolterink A, van Lis R, de Vos WM, Akkermans ADL (2000) Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Appl Environ Microbiol* 66:3998-4003.
- Fernández-Sierra ML, Garcia-Chaves MA, Martins dos Santos VAP, Bedmar JE (2000) Recombinant *Radyrhizobium japonicum* strains with improved efficiency in removal of nitrite under microaerobiosis. *Proceedings IV European Conference on Nitrogen Fixation*. 16-20 September, Seville, Spain.
- Garbayo I, Vigaraj A, Conchon V, Martins dos Santos VAP, Vilchez C (2000) Characterization of nitrate consumption of immobilized *Chlamydomonas* cells. *Proc Biochem* 36:459-466.
- Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondrat'eva TE, Moore ERB, Abraham W-R, Lünsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM, Golyshin PN (2000) *Ferroplasma acidophilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of Archaea. *Int J System Evol Microbiol* 50:997-1006.
- Guasp C, Moore ERB, Lalucat J, Bennassar A (2000) Utility of internally transcribed 16S-23S rRNA spacer regions for the definition of *Pseudomonas stutzeri* genomovars and other *Pseudomonas* species. *Int J System Evol Microbiol* 50:1629-1639.
- Höfle MG (2000) Einsatz mehrskaliger experimenteller Systeme zur Leistungssteigerung und Modellierung biotechnologischer in situ Sanierungsverfahren. In: *UFZ-Bericht 4/2000 des Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, ISSN 0948-9452*: 109-111.
- Höfle MG, Brettar I, Engelen B, Berry A, Wellington E, De la Broise D, Sjöholm C (2000) Marine bacterial genes and isolates as sources for novel biotechnological products. In: *EurOCEAN 2000 - Vol. 1 Marine processes, ecosystems and interactions*. Office for publications of the European Communities, Luxembourg: 153-158.
- Höfle MG, Ziemke F, Brettar I (2000) Niche differentiation of *Shewanella putrefaciens* populations from the Baltic as revealed by molecular and metabolic fingerprinting. In: *Bell, C.R., Brylinsky, M., and Johnson-Green, P. (eds.), Microbial Biosystems: New Frontiers, Proceedings of ISME8, Halifax, Canada*: 135-143.
- Jarvis GN, Strömpl C, Burges DM, Skillman LC, Moore ERB, Joblin KN (2000) Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Curr Microbiol* 40:327-332.
- Laiz L, Groth I, Schumann P, Zezza F, Felske A, Hermosin B, Saiz-Jimenez C (2000) Microbiology of the stalactites from Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Int Microbiol* 3:25-30.
- Lünsdorf H, Erb RW, Abraham W-R, Timmis KN (2000) "Clay hitches": a novel interaction between bacteria and clay minerals. *Environ Microbiol* 2:161-168.
- Lünsdorf H, Kniep E, Kniep B (2000) Immunocytochemical localisation of CDw60 antigens of human peripheral T-cells. *Carbohydr Res* 329:791-798.
- Lünsdorf H, Wenderoth DF, Abraham W-R (2000) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur *in situ*-Situation autochthoner Bakterien im Chlororganika-kontaminierten Aquifer. In: *HGF-Strategiefonds "Umwelt-Biotechnologie". 1. Statusbericht: Stottmeister (Eds.), UFZ-Bericht, Nr. 4/2000*:129-131.
- Örtel S, Wagner-Döbler I (2000) PCR Amplification of Chitin Deacetylase Genes. *Proceedings of the 3rd International Conference of the European Chitin Society, Potsdam, Germany, Aug. 31 - Sept. 3, 1999*. *Adv Chitin Science* 4:600-604.

- Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RELP) Analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2:39-50.
- Rosenbrock P, Langner S, Abraham W-R, Pieper D (2000) Vergleichende Untersuchungen des Chloraromatenabbaus im Bitterfelder Grundwasser durch Spezialkulturen und die autochthone Mikroflora. In: HGF-Strategiefonds "Umwelt-Biotechnologie". 1. Statusbericht: Stottmeister (Eds.), UFZ-Bericht, Nr. 4/2000:132-141.
- Sabra W, Zeng A-P, Lünsdorf H, Deckwer W-D (2000) Effect of Oxygen on the Formation and Structure of *Azotobacter avinelandii* Alginate and its Role in Protecting Nitrogenase. *Appl Environ Microbiol* 66:4037-4044.
- Siefert JL, Lario-Sanz M, Nakamura LK, Slepceky RA, Paul JH, Moore ERB, Fox GE, Jurtschuk P (2000) Phylogeny of Marine Bacillus isolates from the Gulf of Mexico. *Curr Microbiol* 41:84-88.
- Strömpl C, Tindall BJ, Lünsdorf H, Wong T-Y, Moore ERB, Hippe H (2000) Reclassification of *Cloridium quercicolum* as *Dendrospora quercicola* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 50:101-106.
- Wagner-Döbler I, von Canstein HF, Li Y (2000) Bioremediation of mercury contaminated industrial wastewater. *Bioworld* 1:2-8.
- Wagner-Döbler I, von Canstein HF, Li Y, Timmis KN, Deckwer W-D (2000) Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environm Sci Technol* 34:4628-4634.
- Wagner-Döbler I, von Canstein HF, Lünsdorf H, Li Y, Felske A, Pauling B (2000) Bioremediation of electrolysis wastewater by mercury resistant *Pseudomonas* strains. Proc. 4th Int. Symposium on Environmental Biotechnology (ISEB), April 10-12, Noordwijkerhout, The Netherlands: 197-200.
- Wagner-Döbler I, Lünsdorf H, Lübberhüsen T, von Canstein HF, Li, Y. (2000) Structure and species composition of mercury-reducing biofilms. *Appl Environm Microbiol* 66:4559-4663.
- Weller R, Glöckner FO, Amann R (2000) 16S rRNA-Targeted oligonucleotide probes for the *in situ* detection of members of the phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. *System Appl Microbiol* 23:107-114.
- Wenderoth DE, Pöhler I, Höfle MG (2000) Analyse der taxonomischen Diversität der bakteriellen Lebensgemeinschaften des Restloches 111 mit molekularbiologischen Methoden. In: UFZ-Bericht 4/2000 des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH, ISSN 0948-9452: 51-58.
- Werner A, Duvar S, Muthing J, Buntemeyer H, Kahmann U, Lünsdorf H, Lehmann J (2000) Cultivation of immortalized human hepatocytes HepZ on macroporous Cultispher G microcarriers. *Biotechnol Bioeng* 68:59-70.
- Wissing J, Heim S, Flohé L, Bilitewski U, Frank R (2000) Enrichment of hydrophobic proteins vi Triton-X-114 phase partitioning and hydroxyapatite column chromatography for mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:589-2593.
- Yakimov MM, Giuliano L, Timmis KN, Golyshin PN (2000) Recombinant acylheptapeptide lichenysin: high level of production by *Bacillus subtilis* cells. *J Mol Microbiol Biotech* 2:217-224.
- Abraham WR, Hesse C, Pelz O, Hermann S, Tesar M, Moore ERB, Timmis KN (2001) Sharing of nutritional resources in bacterial communities determined by isotopic ratio mass spectrometry of biomarkers. In: Focus on Biotechnology (Eds. Hofman M. & Anné J.), Vol. II: Applied Microbiology (Eds. Durieux, A. & Simon, J.-P.) Kluwer, Dodrecht: 143-154.
- Abraham W-R, Strömpl C, Vancanneyt M, Lünsdorf H, Moore ERB (2001) Determination of the systematic position of the genus *Asticcacaulis* Poindexter by a polyphasic analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:27-34.
- Abraham W-R (2001) Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Curr Med Chem* 8:583-606.
- Denner EBM, Paukner S, Kämpfer P, Moore ERB, Abraham W-R, Busse H-J, Wanner G, Lubitz W (2001) *Sphingomonas pituitosa* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium that secretes an unusual type of sphingane. *Int J System Evol Microbiol* 51:827-841.
- Felske A, Weller R (2001) Cloning 16S rRNA genes and utilization to type bacterial communities. In: Molecular Microbiol. Ecology Manual, Suppl. 5 (Eds. A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas and F.J. de Bruijn). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 3.3.3/1-3.3.3/16.
- Felske A, Pauling BV, von Canstein HF, Li Y, Lauber J, Buer J, Wagner-Döbler I (2001) Detection of small sequence differences using competitive PCR: Molecular monitoring of genetically improved, mercury reducing bacteria. *Biotechniques* 30:142-148.
- Golyshin PN, Timmis KN, Yakimov M (2001) Oil eating bacteria. *Bioworld* 2:4-6.
- Hahn MW, Höfle MG (2001) Grazing of protozoa and its effect on population of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 35:113-121.
- Lünsdorf H, Schairer H-U (2001) Frozen motion of gliding bacteria outlines inherent features of the motility apparatus. *Microbiology (UK)* 147:939-947.
- Lünsdorf H, Strömpl C, Osborn AM, Moore ERB, Abraham W-R, Timmis KN (2001) Approach to analyse interactions of microorganisms, hydrophobic substrates and soil colloids leading to formation of composite biofilms, and to study initial events in microbiogeological processes. *Meth Enzymol* 336:317-331.
- Nogales B, Moore ERB, Llobet-Brossa E, Rossello-

- Mora R, Amann R, Timmis KN (2001) Combined use of 16S rDNA and 16S rRNA to study the bacterial community in a PCB polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 67:1874-1884.
- Pelz O, Chatzinotas A, Andersen N, Bernasconi SM, Hesse C, Abraham W-R, Zeyer J (2001) Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations. *Archiv Microbiol* 175:270-281.
- Santosa DA (2001) Rapid Extraction and Purification of Environmental DNA for Molecular Cloning Applications and Molecular Diversity Studies. *Mol Biotechnol* 17:59-64.
- Uphoff H, Felske A, Wagner-Döbler I (2001) The microbial diversity in picoplankton enrichment cultures: A molecular screening of marine isolates. *FEMS Microbiol Ecol* 35:249-258.
- Wenderoth DF, Stackebrandt E, Reber HH (2001) Metal stress selects for bacterial ARDRA-types with reduced catabolic versatility. *Soil Biol Biochem* 33:667-670.
- Winkler J, Lünsdorf H (2001) Ultrastructure and composition of asteroid bodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:902-907.
- Abraham W-R (2001) Microbial Degradation of PCB in the Environment. In: "Progress in Industrial Biotechnology". Vol. XX: "Biotransformation: Bioremediation Technology for Health and Environmental Protection". (Eds.: Ved Pal and Raymond D. Stapleton), Elsevier, Netherlands, in press
- Brettar I, Moore ERB, Höfle MG (2001) Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria from the water column of the central Baltic sea. *Microbiol Ecol*, in press
- Brettar I, Sanchez-Perez JM, Trémolières M (2001) Nitrate elimination by denitrifiers in hardwood forest soils of the Upper Rhine floodplain - correlation with redox potential and organic matter. *Hydrobiologia*, in press
- Disqué-Kochem C, Battermann A, Strätz M, Dreiseikelmann B (2001) Screening for trbB- and traG-like sequences by PCR for the detection of conjugative plasmids in bacterial soil isolates. *Microbiol Res*, in press
- Jarvis GN, Moore ERB, Thiele J (2001) Isolation and characterisation of lipolytic bacteria from an anaerobic digester treating solid slaughterhouse waste. *Syst Appl Microbiol*, in press
- Martins dos Santos VAP, Verschuren P, van den Heuvel H, Tramper J, Wijffels R (2001) Substrate and product profiles across double-layer gel beads: modelling and experimental evaluation. *Biotechnol Bioeng*, in press
- Martins dos Santos VAP, Verschuren P, Smit M, van den Heuvel H, Tramper J, Wijffels R (2001) pH effects on coupled nitrification and denitrification measured by specific microelectrodes. *Biotechnol Bioeng*, in press
- von Canstein HF, Li Y, Wagner-Döbler I (2001) Bioremediation of mercury contaminated wastewater by a microbial community of mercury-resistant bacteria. Proceedings of ISEB 2000, Kyoto 9.-13.6.2000, Japan, in press
- von Canstein HF, Li Y, Wagner-Döbler I (2001) Longterm Performance of Bioreactors Cleaning Mercury Containment Wastewater and their Response to Temperature and Mercury Stress and Mechanical Perturbation. *Biotechnol Bioeng*, in press
- von Canstein HF, Li Y, Wagner-Döbler I (2001) Longterm stability of mercury reducing microbial biofilm communities analysed by 16S-23S rDNA interspacer region polymorphism. *Microb Ecol*, in press
- Wagner-Döbler I (2001) Microbial inoculants - snake oil or panacea. In: *Bioremediation - A Critical Review*. Ed. I. Singleton, M.G. Milner, I.M. Head, Horizon Press, in press
- Wagner-Döbler I, Beil W, Meiners M, Lang S, Laatsch H (2001) Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, in press

QF1.1/Expression and Production Systems

Akkoyun A, Bilitewski U (2000) Detection of Sulphamethazine with an Optical Biosensor and Anti-idiotypic Antibodies. *Sens Actuat B*, 70:12-18.

Babu KR, Swaminathan S, Marten S, Khanna N, Rinas U (2000) Production of interferon- α in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:655-660.

Hoffmann F, Rinas U (2000) Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 16:1000-1007.

Hoffmann F, Schmidt M, Rinas U (2000) Simple technique for simultaneous on-line estimation of biomass and acetate from base consumption and conductivity measurements in high-cell density cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 70:358-361.

Modak J, Deckwer W-D, Zeng A-P (2000) System Dynamic Behavior of Eucaryotic Multienzyme Pyruvate Dehydrogenase Complex under *In Vivo* Conditions. Proceedings of the First International Conference of Systems Biology, 14-16 November 2000, Tokyo.

Posten C, Rinas U (2000) Control strategies for high-cell density cultivation of *Escherichia coli*. In: Schügerl K and Bellgardt K-H (eds.) *Bioreaction Engineering. Modelling and Control*. Springer Verlag, Berlin:374-390.

Rinas U (2000) Bakterien produzieren Pharmaproteine im Hochleistungsbioreaktor. *Carolo-Wilhelmina Mitteilungen*, 35:48-51.

- Sabra W, Zeng A-P, Lünsdorf H, Deckwer W-D (2000) Effect of Oxygen on the Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and its Role in Protecting Nitrogenase. *Appl Environ Microbiol* 66:4037-4044.
- Schuderer J, Akkoyun A, Brandenburg A, Bilitewski U, Wagner E (2000) Development of a sensitive multi-channel fluorescence affinity sensor system. *Anal Chem* 72:3942-3948.
- Shumyantseva VV, Bulko TV, Bachmann TT, Bilitewski U, Schmid RD, Archakov AI (2000) Electrochemical reduction of flavocytochromes 2B4 and 1A2 and their catalytic activity. *Arch Biochem Biophys* 377:43-48.
- Wicke C, Hüners M, Wray V, Nimtz M, Bilitewski U, Lang S (2000) Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-associated Microbacterium Species. *J Nat Prod* 63:621-626.
- Wissing J, Heim S, Flohé L, Bilitewski U, Frank R (2000) Enrichment of hydrophobic proteins via Triton X-114 phase partitioning and hydroxyapatite column chromatography for mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:2589-2593.
- Zeng A-P, Linz M (2000) Programmed cell death (apoptosis) in animal cell culture: physiological and kinetic aspects. In: JJ Zhong (ed.): *Advances in Applied Biotechnology*. ECUST Press, Shanghai:64-77.
- El-Enshasy H, Hellmuth K, Rinas U (2001) *GpdA*-promoter controlled production of glucose oxidase by recombinant *Aspergillus niger* using non-glucose carbon sources. *Appl Biochem Biotechnol* 90:57-66.
- Ferrer-Miralles N, Feliu JX, Vandevuer S, Müller A, Cabrera-Crespo J, Ortman I, Hoffmann F, Cazorla D, Rinas U, Prévost M, Villaverde A (2001) Engineering regulable *Escherichia coli* β -galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *J Biol Chem* 276:40087-40095.
- Hoffmann F, Posten C, Rinas U (2001) Kinetic model of *in vivo* folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 72:315-322.
- Schumacher JT, Hecht H-J, Dengler U, Reichelt J, Bilitewski U (2001) Direct Electron Transfer Observed for Peroxidase to Screen-Printed Graphite Electrodes. *Electroanalysis* 13:779-785.
- Wallis GLF, Swift RJ, Atterbury R, Trappe S, Rinas U, Hemming FW, Wiebe MG, Trinci APJ, Peberdy JF (2001) The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and, chemostat-evolution of *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta* 1527:112-122.
- Weber J, Rinas U (2001) Alterations of metabolic flux distributions in recombinant *Escherichia coli* in response to heterologous protein production. In: Van Broekhoven, A., Shapiro, F. and Anné, J. (eds.) *Novel frontiers in the production of compounds for biomedical use*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 3313-337.
- Wiebe MG, Karandikar A, Robson GD, Trinci APJ, Flores Candia J-L, Trappe S, Wallis G, Rinas U, Derckx PMF, Madrid SM, Sisniega H, Faus I, Montijn R, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ (2001) Production of tissue plasminogen activator (t-PA) in *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* 76:164-174.
- Yuan Y-J, Ma ZY, Ge ZQ, Miao ZQ, Zeng A-P (2001) Apoptosis and taxol production in suspension cultures of *Taxus spp.* cells. *J Chem Ind Eng* 51:43-46.
- Akkoyun A, Bilitewski U (2001) Optimisation of Glass Surfaces for Optical Immunosensors. *Biosens Bioelectr*, in press
- Hoffmann F, Rinas U (2001) On-line estimation of the metabolic burden resulting from synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. *Biotechnol Bioeng*, in press
- Hoffmann F, Rinas U (2001) Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, in press
- Kuhlmeier D, Rodda E, Kolarik LO, Furlong DN, Bilitewski U (2001) Application of atomic force microscopy and grating coupler for the characterization of biosensor surfaces. *Biosens Bioelectr*, in press
- Richter T, Shultz-Lockyear LL, Oleschuk RD, Bilitewski U, Harrison DJ (2001) New approaches for xanthine determination by using integrated microfluidic devices, *Sens Actuat B*, in press
- Sabra W, Zeng A-P, Deckwer W-D (2001) Microbial alginates: physiology, quality and process aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, in press
- Schmidt A, Schumacher JT, Reichelt J, Hecht H-J, Bilitewski U (2001) Molecular and mechanistic investigations on the stabilization of horseradish peroxidase C. *Anal Chem*, in press
- Stiene M, Bilitewski U (2001) Electrochemical characterization of screen-printed carbonaceous electrodes for the determination of peroxidase activity in novel-screen-printed flow-through modules. *Fres J Anal Chem*, in press
- von Tiedemann B, Yayon A, Weich H, Bilitewski U (2001) Soluble receptor proteins: A functional approach for studying VEGF receptor ligand interaction. *Biol Chem*, in press
- Zeng A-P, Biebl H (2001) Bulk-Chemicals from Biotechnology: the case of microbial production of 1,3-propanediol and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, in press
- Zeng A-P, Schügerl K (2001) Tools and Applications of Biochemical Engineering (Editors). A Volume in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer-Verlag, Heidelberg, in press

QF2.1/Genomics and Proteomics

- Blöcker H (2000) Biologen lernen lesen - Anstöße aus der Genomforschung / Biologists learn to read -

impetus from genome research. In: Ergebnisbericht/ Annual Report GBF 1999/2000:9-20.

European Union Chromosome 3 Arabidopsis Sequencing Consortium, The Institute for Genomic Research & Kazusa DNA Research Institute (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:820-823.

Müller R, Gerth K, Brandt P, Blöcker H, Beyer S (2000) Identification of an L-dopa decarboxylase gene from *Sorangium cellulosum* So ce90. Arch Microbiol 173:303-306.

Hattori M *et al.* (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. Nature: 405:311-319.

Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G, Blöcker H, Höfle G, Müller R (2000) The myxocholin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. Eur J Biochem 267:6476-6485.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. Nature 409:860-921.

Wiemann St, Weil B, Wellenreuther R, Gassenhuber J, Glassl S, Ansorge W, Böcher M, Blöcker H, Bau ersachs St, Blum H, Lauber J, Düsterhöft A, Beyer A, Köhrer K, Strack N, Mewes H-W, Ottenwälder B, Obermaier B, Tampe J, Heubner D, Wambutt R, Korn B, Klein M, Poustka A (2001) Towards a catalog of human genes and proteins: Sequencing and analysis of 500 novel complete protein coding human cDNAs. Genome Res. 11:422-435.

Silakowski B, Nordsiek G, Kunze B, Blöcker H, Müller R (2001) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthase: the myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. Chem Biol 8:59-69

QF2.2/Bioinformatics

Kel-Margoulis OV, Romashchenko AG, Kolchanov NA, Wingender E, Kel AE (2000) COMPEL: a database on composite regulatory elements providing combinatorial transcriptional regulation. Nucl Acids Res 28:311-315.

Roulet E, Bucher P, Schneider R, Wingender E, Dusserre Y, Werner T, Mermod N (2000) Experimental analysis and computer prediction of CTF/NFI Transcription Factor DNA binding sites. J Mol Biol 297:833-848.

Wingender E (2000) The TRANSFAC System on Gene Regulation. Trends Glycosci Glycotechnol 12:255-264.

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

Hehl R, Wingender E (2001) Database - assisted promoter analysis. Trends Plant Sci 6:251-254.

Kel AE, Kel-Margoulis OV, Farnham PJ, Bartley SM, Wingender E, Zhang MQ (2001) Computer-assisted Identification of Cell Cycle-related Genes: New

Targets for E2F Transcription Factors. J Mol Biol 309:99-120.

Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I, Krull M, Matys V, Michael H, Ohnhäuser R, Prüß M, Schacherer F, Thiele S, Urbach S (2001) The TRANSFAC system on gene expression regulation. Nucl Acids Res 29:281-283.

Schacherer F, Choi C, Götze U, Krull M, Pistor S, Wingender E (2001) The TRANSPATH signal transduction database: a knowledge base on signal transduction networks. Bioinformatics, in press

QF2.3/Structure Analysis

Böldicke T, Struck F, Schaper F, Tegge W, Soback H, Villbrandt B, Lankenau P, Böcher M (2000) A new peptide-affinity tag for the detection and affinity purification of recombinant proteins with a monoclonal antibody. J Immunol Meth 240:165-183.

Brauers G, Edrada RA, Ebel R, Proksch P, Wray V, Berg A, Gräfe U, Schächtele C, Totzke F, Finkenzeller G, Marme D, Kraus J, Münchbach M, Michel M, Bringman G, Schaumann K (2000) Anthraquinones and bataenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis sp.*: Novel inhibitors of protein kinases. J Nat Prod 63:739-745.

Cruz HJ, Peixoto CM, Nimtz M, Alves PM, Dias EM, Moreira JL, Carrondo MJT (2000) Metabolic shifts do not influence the glycosylation patterns of a recombinant fusion protein expressed in BHK cells. Biotechnol Bioeng 69:129-139.

Edrada RA, Wray V, Berg A, Gräfe U, Sudarsono, Brauers G, Proksch P (2000) Novel spiciferone derivatives from the fungus *Drechslera hawaiiensis* isolated from the marine sponge *Calyspongia aerizusa*. Z Naturforsch 55c:218-221.

Edrada RA, Wray V, Handayani D, Schupp P, Balbin-Oliveros M, Prückosch P (2000) Novel spiciferone derivatives of bioactive metabolites from some Indo-Pacific marine invertebrates. In: Studies in Natural Product Chemistry, Vol. 21 (A. U. Rahmann, Ed.), Elsevier Science, Amsterdam (1999):251-292.

Edrada RA, Wray V, Witte L, van Ofwegen L, Proksch P (2000) Bioactive terpenes from the soft coral *Heteroxenia sp.* from Mindoro, Philippines. Z Naturforsch 55c:82-86.

Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alvez JM, Flohé L (2000) His-tagged trypanoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. Appl Microbiol Biotechnol 53:410-414.

Guerrero SA, Montemartini M, Spallek R, Hecht H-J, Steinert P, Flohé L, Singh M (2000) Cloning and expression of trypanoxin I from *Crithidia fasciculata*. BioFactors 11:67-69.

Hammen S, Heckmann R, Langer O, Wray V, Lang S, Rau U (2000) Veredlung pflanzlicher Öle durch enzymatische Modifizierung biotechnisch gewonnener Tenside. In: Biokonversion nachwachsender Rohstoffe 1999:99-107.

- Hattori M, *et al.* (including Reichelt J), (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405:311-319.
- Henklein P, Bruns K, Sherman MP, Tessmer U, Licha K, Kopp J, De Noronha CMC, Greene WC, Wray V, Schubert U (2000) 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* 275:32016-32026.
- Kalisz HM (2000) In search of novel targets for the development of specific typanocidal agents. *Medicina* 60:17-18.
- Kalisz HM, Erck C, Plessmann U, Wehland J (2000) Incorporation of nitrotyrosine into α -tubulin by recombinant mammalian tubulin-tyrosine ligase. *Biochim Biophys Acta* 1481:131-138.
- Kalisz HM, Hofmann B, Nogoceke E, Gommel DU, Flohé L, Hecht H-J (2000) Crystallisation of trypanedoxin I from *Crithidia fasciculata*. *BioFactors* 11:73-75.
- Kobayashi N, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Schliemann W (2000) Betalains from Christmas cactus. *Phytochemistry* 54:419-426.
- Lakenbrink C, Lam TML, Engelhardt UH, Wray V (2000) New flavonol triglycosides from tea (*Camellia sinensis*). *Nat Prod Lett* 14:233-238.
- Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohé L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz H.M, Nogoceke E, Singh M, Alvez MJM, Colli W (2000) Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Rad Biol Med* 28:767-772.
- Maier W, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Strack D (2000) Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry* 54:473-479.
- Mbark AN, Charouf Z, Wray V, Nimtz M, Schöpke T (2000) Monodesmosidic saponins from *Herniaria hirsuta*. *Pharmazie* 55:690-692.
- Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Bay S, Balter H, Robles A, Cantacuzene D, Nimtz M, Alzari PM, Osinaga E (2000) Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. *Eur J Biochem* 267:1434-1440.
- Montemartini M, Nogoceke E, Gommel DU, Singh M, Kalisz HM, Steinert P, Flohé L (2000) Trypanedoxin and trypanedoxin peroxidase. *BioFactors* 11:71-72.
- Montemartini M, Steinert P, Singh M, Flohé L, Kalisz HM (2000) Trypanedoxin II from *Crithidia fasciculata*. *BioFactors* 11:65-66.
- Nokihara K, Yasuhara T, Blahunka A, Kasama T, Wray V (2000) Systematic studies on modification of Met-residues during TFA cleavage. *Peptide Sci* 1999:101-104.
- Nokihara K, Yasuhara T, Nakata Y, Wray V, Lerner E (2000) Syntheses and binding studies of maxadilan, which is isolated from salivary gland of a sand fly, and its related peptides on PACAP type I receptors. *Peptide Sci* 1999:29-32.
- Salanoubat M *et al.* (including Reichelt J) (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:820-822.
- Schneider C, Bohnenstengel FI, Nugroho BW, Wray V, Witte L, Hung PD, Kiet LC, Proksch P (2000) Insecticidal rocaglamide derivatives from *Aglaia spectabilis* (Meliaceae). *Phytochemistry* 54:731-736.
- Schulz A, Bruns K, Henklein P, Krause G, Schubert M, Gundermann T, Wray V, Schultz G, Schöneberg T (2000) Requirement of specific intrahelical interactions for stabilizing the inactive conformation of glycoprotein hormone receptors. *J Biol Chem* 275:37860-37869.
- Steinert P, Plank-Schumacher K, Montemartini M, Hecht H-J, Flohé L (2000) Permutation of the active site motif of trypanedoxin 2. *Biol Chem* 381:211-219.
- Steinmetz I, Nimtz M, Wray V, Häußler S, Reganzeroski A, Brenneke B (2000) Exopolysaccharides of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Trop* 74:211-214.
- Stroop CJM, Weber W, Gerwig GJ, Nimtz M, Kamerling JP, Vliegthart JEG (2000) Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology* 10:901-917.
- Stroop CJM, Weber W, Nimtz M, Gallego RG, Kamerling JP, Vliegthart JFG (2000) Fucosylated hybrid-type N-glycans on the secreted human epidermal growth factor receptor from Swainsonine-treated A431 cells. *Arch Biochem Biophys* 374:42-51.
- Villbrandt B, Sobek H, Frey B, Schomburg D (2000) Domain exchange: chimeras of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, *Escherichia coli* DNA polymerase I and *Thermotoga neapolitana* DNA polymerase. *Protein Eng* 13:645-654.
- Wicke C, Hüners M, Wray V, Nimtz M, Bilitewski U, Lang S (2000) Production and structure elucidation of glycolipids from a marine sponge-associated *Microbacterium* species. *J Nat Prod* 63:621-626.
- Witt S, Wohlfahrt G, Schomburg D, Hecht H-J, Kalisz HM (2000) Conserved arginine 516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of β -D-glucose. *Biochem J* 347:553-559.
- Zayats M, Kharitonov AB, Katz E, Bückmann AF, Willner I (2000) An integrated NAD⁺-dependent enzyme-functionalized field-effect transistor (ENFET) system: development of a lactate biosensor. *Biosens Bioelectr* 15:671-680.
- Barzik M, Schubert W-D, Carl U, Frank R, Wehland J, Heinz DW (2001) The N-terminal domain of Homer/Ves1 is a new class II EVH1 domain. *J Mol Biol* 309:155-169.
- Brauers G, Ebel R, Wray V, Berg A, Gräfe U, Proksch P (2001) Hortein, a new natural product from the fungus *Hortaea wernneckii* associated with the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod* 64:651-652.

- Dreyer M, Nugroho BW, Bohnenstengel FI, Wray V, Witte L, Bringmann G, Mühlbacher J, Hung PD, Kiet LC, Prokosch P (2001) New insecticidal rocaglamide derivatives, aglain and aglaforbesin derivatives from twigs of *Aglaiia oligophylla* (Meliaceae). *J Nat Prod* 64:415-420.
- Hecht HJ, Adar R, Hofmann B, Bogin O, Weich H, Yayon A (2001) Structure of fibroblast growth factor 9 shows a symmetric dimer with unique receptor and heparin binding interfaces. *Acta Cryst D* 57:378-384.
- Hofmann B, Budde H, Bruns K, Guerrero SA, Kalisz HM, Menge U, Montemartini M, Nogoceke E, Steinert P, Wissing JW, Flohé L, Hecht HJ (2001) Structures of trypanothione revealing interaction with trypanothione. *Biol Chem* 382:459-471.
- Jadulco R, Proksch P, Wray V, Sudarsono, Berg A, Gräfe U (2001) New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*. *J Nat Prod* 64:527-530.
- Kobayashi N, Schmidt J, Wray V, Schliemann W (2001) Formation and occurrence of dopamine-derived betacyanins. *Phytochemistry* 56:429-436.
- Nowicki C, Reynoso Hunter G, Montemartini-Kalisz M, Blankenfeld W, Hecht H-J, Kalisz HM (2001) Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: Structural characterization and site directed mutagenesis of broad substrate specificity enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1546:268-281.
- Oettmeier W, Masson K, Hecht HJ (2001) Heterocyclic *ortho*-quinones, a novel type of photosystem II inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1504:346-351.
- Plock A, Beyer G, Hiller K, Gründemann E, Krause E, Nimtz M, Wray V (2001) Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: Exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. *Phytochemistry* 57:489-496.
- Rau U, Hammen S, Heckmann R, Wray V, Lang S (2001) Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind Crops Prod* 13:85-92.
- Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Roemling U (2001) The Multicellular Morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *E. coli* produce Cellulose as the second Component of the Extracellular Matrix. *Mol Microbiol* 39:1452-1463.
- Ruzgas T, Lindgren A, Gorton L, Hecht HJ, Reichelt J, Bilitewski U (2001) Electrochemistry of peroxidases. In: *Electroanalytical methods of biological materials* (eds. A. Bajter-Toth, J.Q. Chambers) Marcel Decker Inc., in press
- Homer/Vesl is a new class II EVH1 domain. *J Mol Biol* 309:155-169.
- Schubert W-D, Göbel G, Diepholz M, Darji A, Kloer D, Hain T, Chakraborty T, Wehland J, Domann E, Heinz DW (2001) Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* contain a fused superdomain structure. *J Mol Biol* 312:783-793.
- Schubert W-D, Göbel G, Kloer D, Chakraborty T, Wehland J, Domann E, Heinz DW (2001) Crystal structure of the conserved core of internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Nova Acta Leopold Supp* 16:29-31.
- Machner MP, Urbanke C, Barzik M, Otten S, Sechi AS, Wehland J, Heinz DW (2001) ActA from *Listeria monocytogenes* can interact with up to four Ena/VASP homology domains simultaneously. *J Biol Chem*, in press
- Moser J, Schubert W-D, Beier V, Bringemeier I, Jahn D, Heinz DW (2001) V-shaped structure of glutamyl-tRNA-reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *Science*, in press
- GBF hosted Depart. of Physiol. Chem., TU Braunschweig**
- Flohé L (2000) Die Metamorphosen des Selen. *Biospektrum* 2:112-115.
- Flohé L, Andreesen JR, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Ursini F (2000) Selenium, the Element of the Moon, in *Life on Earth*. *IUBMB Life* 49:411-420.
- Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJM, Flohé L (2000) His-tagged trypanothione peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:410-414.
- Guerrero SA, Montemartini M, Spallek R, Hecht H-J, Steinert P, Flohé L, Singh M (2000) Cloning and expression of trypanothione I from *Crithidia fasciculata*. *BioFactors* 11:67-69.
- Günzler WA, Flohé L (2000) Urinary-type Plasminogen Activator (uPA). In: *Fibrinolytics and Antifibrinolytics. Handbook of Experimental Pharmacology* (F. Bachmann, ed.) Springer Verlag, Heidelberg: 91-110.
- Köhrle J, Brigelius-Flohé R, Böck A, Gärtner R, Meyer O, Flohé L (2000) Selenium in Biology: Facts and Medical Perspectives. *Biol Chem* 381:849-864.
- Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohé L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz HM, Nogoceke E, Singh M, Alves MJM, Colli W (2000) Evidence for a Trypanothione-dependent Peroxidase System in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 28:767-772.
- Nasim MT, Jaenecke S, Belduz A, Kollmus H, Flohé L, Mc Carthy J (2000) Eukaryotic selenocysteine incorporation follows a nonprocessive mechanism that competes with translational termination. *J Biol Chem* 275:14846-14852.
- Steinert P, Plank-Schumacher K, Montemartini M, Hecht H-J, Flohé L (2000) Permutation of the Active

QF2.4/Structural Characterization of Bacterial Virulence Factors

Barzik M, Schubert W-D, Carl UD, Wehland J, Heinz DW (2000) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the EVH1 domain of Vesl-2b. *Acta Crystallogr Section D* 56:930-932.

Barzik M, Carl UD, Schubert W-D, Frank R, Wehland J, Heinz DW (2001) The N-terminal domain of

- Site Motif of Tryparedoxin 2. *Biol Chem* 381:211-219.
- Wissing J, Heim S, Flohé L, Bilitewski U, Frank R (2000) Enrichment of hydrophobic proteins via Triton X-114 phase partitioning and hydroxyapatite column chromatography for mass spectrometry. *Electrophoresis* 21:2589-2593.
- Flohé L, Brigelius-Flohé R (2001) Selenoproteins of the glutathione system. In: *Handbook - Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, edited by L Hatfield, Kluwer academic publishers:158-178.
- Flohé L, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Ursini F (2001) Selenium and male reproduction. In: *Handbook - Selenium, its Molecular Biology and Role in Human Health*, edited by L Hatfield, Kluwer academic publishers: 273-281.
- Hofmann B, Budde H, Bruns K, Guerrero SA, Kalisz HM, Menge U, Montemartini M, Nogoceke E, Steinert P, Wissing JB, Flohé L, Hecht H-J (2001) Structures of Tryparedoxins Revealing Interaction with Trypanothione. *Biol Chem* 382:459-471.
- Sztajer H, Gamain B, Aumann K-D, Slomianny C, Becker K, Brigelius-Flohé R, Flohé L (2001) The Putative Glutathione Peroxidase Gene of *Plasmodium falciparum* Codes for a Thioredoxin Peroxidase. *J Biol Chem* 276:7397-7403.
- Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Ursini F, Flohé L (2001) Selenium - an Antioxidant? In: *Handbook of Antioxidant*, 2nd Edition, (E Cadenas and L Packer, eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, in press
- Flohé L, Steinert P, Hecht H-J, Hofmann B (2001) Tryparedoxin and Tryparedoxin Peroxidase. *Meth Enzymol*, in press
- Roveri A, Flohé L, Maiorino M, Ursini F (2001) Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Sperm. *Meth Enzymol*, in press
- Roveri A, Ursini F, Flohé L, Maiorino M (2001) PHGPx and Spermatogenesis. *BioFactors*, in press
- Dieli F, Singh M, Spallek R, Romano A, Titone L, Sireci G, Friscia G, Di Sano C, Santini D, Salerno A, Ivanyi J (2000) Change of Th0 to Th1 cell-cytokine profile following tuberculosis chemotherapy. *Scand J Immunol* 52:96-102.
- da Fonseca DP, Frerichs J, Singh M, Snippe H, Verheul AF (2000) Induction of antibody and T-cell responses by immunization with ISCOMS containing the 38-kilodalton protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 19:122-131.
- Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJ, Flohé L (2000) His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:410-414.
- Guerrero SA, Montemartini M, Spallek R, Hecht HJ, Steinert P, Flohé L, Singh M (2000) Cloning and expression of tryparedoxin I from *Crithidia fasciculata*. *BioFactors* 11:67-69.
- Kramer J, Harcos P, Prohaszka Z, Horvath L, Karadi I, Singh M, Csaszar A, Romics L, Fust G (2000) Frequencies of certain complement protein alleles and serum levels of anti-heat-shock protein antibodies in cerebrovascular diseases. *Stroke* 31:2648-2652.
- Lehner T, Mitchell E, Bergmeier L, Singh M, Spallek R, Cranage M, Hall G, Dennis M, Villinger F, Wang Y (2000) The role of gammadelta T cells in generating antiviral factors and beta-chemokines in protection against mucosal simian immunodeficiency virus infection. *Eur J Immunol* 30:2245-2256.
- Lopez JA, Carvalho TU, de Souza W, Flohé L, Guerrero SA, Montemartini M, Kalisz HM, Nogoceke E, Singh M, Alves MJ, Colli W (2000) Evidence for a trypanothione-dependent peroxidase system in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radic Biol Med* 28:767-772.
- Montemartini M, Nogoceke E, Gommel DU, Singh M, Kalisz HM, Steinert P, Flohé L (2000) Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. *BioFactors* 11:71-72.
- Montemartini M, Steinert P, Singh M, Flohé L, Kalisz HM (2000) Tryparedoxin II from *Crithidia fasciculata*. *BioFactors*. 11:65-66.
- Rhodes SG, Gavier-Widen D, Buddle BM, Whelan AO, Singh M, Hewinson RC, Vordermeier HM (2000) Antigen specificity in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun* 68:2573-2578.
- Sfondrini L, Rodolfo M, Singh M, Colombo MP, Colnaghi MI, Menard S, Balsari A (2000) Cooperative effects of *Mycobacterium tuberculosis* Ag38 gene transduction and interleukin 12 in vaccination against spontaneous tumor development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res* 60:3777-3781.
- Wendling U, Paul L, van der Zee R, Prakken B, Singh M, van Eden W (2000) A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol* 164:2711-2717.
- Horvath L, Czirjak L, Fekete B, Jakab L, Prohaszka Z, Cervenak L, Romics L, Singh M, Daha MR, Fust G (2001) Levels of antibodies against C1q and 60 kDa family of heat shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. *Immunol Lett* 75:103-109.
- Jepson A, Fowler A, Banya W, Singh M, Bennett S, Whittle H, Hill AV (2001) Genetic regulation of acquired immune responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: a study of twins in West Africa. *Infect Immun* 69:3989-3994.
- Scientific Director, Prof. Dr. R. Balling**
 Balling R, Erben R (2000) From parathyroid to thymus, via glial cells (News and Views). *Nature Medicine* 6:860-861.
- Balling R (2000) Why we treasure the mutants. *Times Higher Educ. Suppl.* 445:28-29.
- Balling R, Hrabe de Angelis M (2000) From

developmental biology to developmental toxicology. *Ann NY Acad Sci* 919:239-245.

Faiella A, Wernig M, Consalez G, Hostick U, Hoffmann C, Hustert E, Boncinelli E, Balling R, Nadeau JH (2000) A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX gene expression. *J Mol Human Genetics* 9:227-236.

Fuchs H, Schughart K, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M (2000) Screening for dysmorphological abnormalities: a powerful tool to isolate new mouse mutants. *Mamm Genome* 11:528-530.

Hrabe' de Angelis M, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jacob T, Fuchs E, Kolb H, Kremmer E, Behrend H, Ring J, Zimmer A, Pfeffer K, Schughart K, Wolf E, Balling R (2000) Genome wide large scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genetics* 25:444-447.

Hrabé de Angelis M, Balling R (2000) Modelle für menschliche Erkrankungen: Der ENU-Maus-Mutagenese-Screen im Deutschen Humangenomprojekt. *Biospektrum* 6:108-110.

Rathkolb B, Decker T, Fuchs H, Soewarto D, Fella C, Heffner S, Pargent W, Wanke R, Balling R, Hrabé de Angelis M, Kolb H, Wolf E (2000) The Clinical-Chemical screen in the Munich ENU mouse mutagenesis project: Screening for clinically relevant phenotypes. *Mamm Genome* 11:543-546.

Rolinski B, Arnecke R, Dame T, Kreischer J, Olgemöller B, Wolf E, Balling R, Hrabé de Angelis M, Roscher A (2000) The biochemical metabolite screen in the Munich ENU mouse mutagenesis project: determination of amino acids and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *Mamm Genome* 11:547-551.

Soewarto D, Fuchs H, Fella C, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Wolf E, Balling R, Hrabé de Angelis M (2000) Identification of genes with clinically relevant functions-The Munich ENU-mutagenesis project. *Mamm Genome* 11:507-510.

Alessandrini F, Jacob T, Wolf A, Balling R, Hrabe de Angelis M, Ring J, Behrendt H (2001) ENU mouse mutagenesis: generation of mouse mutants with aberrant plasma IGE levels. *Int Arch Allergy Immunol* 124:25-28.

Graw J, Klopp N, Loster J, Soewarto D, Fuchs H, Becker-Follmann J, Reis A, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M (2001) Ethylnitrosurea-induced mutations in mice leads to the expression of a novel protein in the eye and to dominant cataracts. *Genetics* 157:1313-1320.

Kiernan AE, Ahituv N, Fuchs H, Balling R, Avraham KB, Steel KP, Hrabe de Angelis M (2001) The Notch ligand Jagged1 is required for inner ear sensory development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3873-3878.

Lengeling A, Pfeffer K, Balling R (2001) The battle of two genomes: genetics of bacterial host/pathogen interactions in mice. *Mamm Genome* 12:261-271.

Nadeau J, Balling R, Barsh G, Beier D, Brown SD, Bucan M, Camper S, Carlson G, Copeland N, Fletcher C, Frankel WN, Ganten D, Goldowitz D, Goodnow C, Guenet JL, Hicks G, Hrabe de Angelis M, Jackson I, Jacobs HJ, Jenkins N, Johnson D, Justice M, Kay S, Kingsley D, Lehrach H, Magnuson T, Meisler M, Poustka A, Rinchik EM, Rossant J, Russell LB, Schimenti J, Shiroishi T, Skarnes WC, Soriano P, Stanford W, Takahashi JS, Wurst W, Zimmer A (2001) Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences. *Science* 291:1251-1255.

Santagati F, Gerber JK, Blusch JH, Kokubu C, Peters H, Adamski J, Werner T, Balling R, Imai K (2001) Comparative analysis of the genomic organization of Pax9 and its conserved physical association with Nkx2-9 in the human, mouse and pufferfish genome. *Mamm Genome* 12:232-237.

Scientific Information

Furlan SA, Schneider ALS, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R (2000) Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol Lett* 22:589-593.

Jonas R (2000) Production of industrially important metabolites by microorganisms. In: Perspectives and Limitations of Biotechnology in Developing Countries, San José, Costa Rica, January 24-28, 2000 (Editors: R.M. Romero, A. Hernandez, G. Solano) ISBN 9977-12-428-0:51-55.

Furlan SA, Schneider ALS, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R (2001) Optimisation of pH, temperature and inoculum ratio for the production of β -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* using a lactose-free medium. *Acta Biotechnol* 21:57-64.

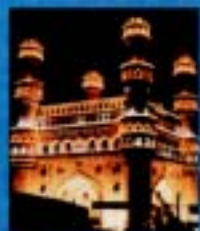
Gern RMM, Furlan SA, Ninow JL, Jonas R (2001) Screening for microorganisms that produce only endo-inulinase. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:632-635.

Schneider ALS, Merkle R, Carvalho-Jonas MF, Jonas R, Furlan SA (2001) Oxygen transfer on β -D-galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. *Biotechnol Lett* 23:547-550.

Silveira MM, Wisbeck E, Hoch I, Jonas R (2001) Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:442-445.

Seite 207/208
Luftbild Gelände der GBF,
Herbst 2000

Page 207/208
Aerial photo of GBF campus,
Autumn 2000



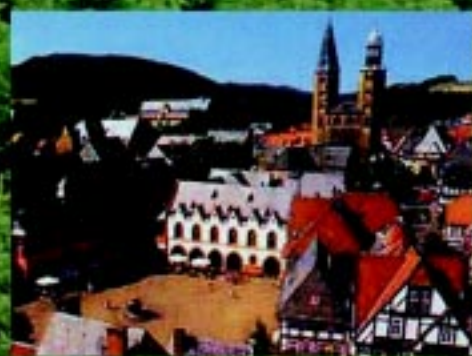
The XVth

**Lancefield
International
Symposium on
Streptococci and
Streptococcal
Diseases**

**Goa, India
7 - 11 October 2002**

**ORGANIZED BY
ALL INDIA INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCES,
NEW DELHI, INDIA
AND
GBF GERMAN RESEARCH CENTRE FOR
BIOTECHNOLOGY, BRAUNSCHWEIG, GERMANY**

Fifth Year of Europe Bio-Crystallography Meeting
September 25 - 27, 2002
Goslar, Germany



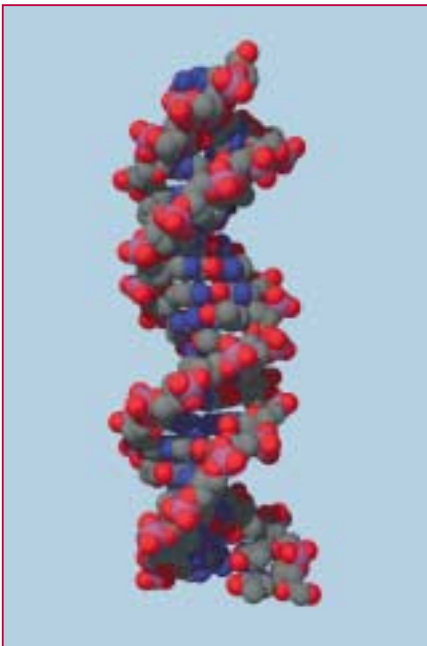
Participating groups:
Saenger, FU Berlin
Höhne, Charité Berlin
Heinemann, MDC Berlin-Buch
Heinz, GBF Braunschweig
Hilgenfeld, IMB Jena
Ficner, Univ. Göttingen
Weiss, EMBL Hamburg
Jaskólski, CBB Poznan
Hasek, IMC Prague
Sedláček, IMG Prague

Contact:
D. W. Heinz
Dept. of Structural Biology
GBF Braunschweig



Infection Biology

Topic of 15th Course:



From Gene to Vaccine



From 5 August to 13 September, 2002, the 15th Course will take place at the GBF.

Interested candidates from **Developing Countries** should contact

either
Mrs. Jeannie Scriven · MA (Univ. Dublin) Mphil (Univ. Bath) · Administrator – International Training
Programme in Biotechnology of the Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH · German Research Centre for Biotechnology
Mascheroder Weg 1 · 38124 Braunschweig/Germay · E-mail: jsc@gbf.de · Phone 00 49 531 61 81 272 · Fax 00 49 531 61 81 278

or
the GBF Website: www.gbf.de

Impressum

Ergebnisbericht | *Annual Report 2001*

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

© 2001 GBF Braunschweig-Stöckheim

Layout und Gestaltung | *Layout and Design*
Alwina Unruh, Büro für Grafik Design, Braunschweig
E-mail: unruh@artmax.de

Fotografien | *Photographs*
Frank Bierstedt, Umschlag Seite 1 oben rechts, Seite 2 rechts, Seite 4 |
Pictures Front Cover top right and Back Cover,
Seiten | *Pages:* 4, 37, 39, 40, 42, 46, 48, 49, 111, 123, 140, 153/154, 162, 165, 167/168
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 | *Printed on acid-free and chlorine-free paper*

ISSN 0935-0497

Seite 215: Titelbild der Zeitschrift *Environmental Microbiolog*, Vol. 2 (2), 2000, anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes "Clay hitches: a novel interaction between bacteria and clay minerals" von Lünsdorf H, Erb RW, Abraham W-R, Timmis KN, S. 161-168. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlages.

Page 215: Cover picture of the Environmental Microbiology, Vol. 2 (2), 2000, on the occasion of the publication of the article "Clay hitches: a novel interaction between bacteria and clay minerals" from Lünsdorf H, Erb RW, Abraham W-R, Timmis KN, pp. 161-168. The permission of Blackwell Publishing is gratefully acknowledged.