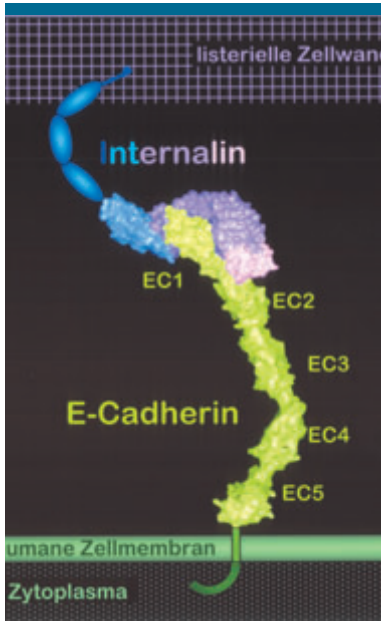




ERGEBNISBERICHT 2002/2003



Gesellschaft für
Biotechnologische Forschung
German Research Centre
for Biotechnology



Proteinkomplex zwischen Internalin und E-Cadherin

Die Listeriose, eine Krankheit mit potenziell tödlichem Ausgang, wird durch das Bakterium *Listeria monocytogenes* verursacht. Das Bakterium trägt auf seiner Oberfläche unter anderem eine große Anzahl des Proteins Internalin. Das Internalin hat die Aufgabe, das menschliche E-Cadherin, ein Oberflächenprotein der Darmzellen, zu erkennen und quasi in den „Würgegriff“ zu nehmen. Auf diese Weise heftet sich das Bakterium an eine Darmzelle und zwingt diese, das Bakterium aufzunehmen. Im Inneren der Darmzelle findet das Bakterium günstige Bedingungen vor, so dass es sich schnell vermehren, benachbarte Zellen befallen und sich nachfolgend im ganzen Körper ausbreiten kann. Forschern der Abteilung Strukturbiologie ist es gelungen, die detaillierte Raumstruktur des Komplexes aus Internalin und E-Cadherin zu erklären. Dadurch kann erstmalig der Infektionsprozess eines Bakteriums im atomaren Detail verstanden werden.



Das GBF-Gelände von Süden. Links bis zur Mitte das FORUM. Dahinter das höhere Gebäude „D“, in dem u.a. die Arbeitsgruppen, die über Pathogenität und Vakzinentwicklung forschen, untergebracht sind. Rechts ist das neue Mäusehaus zu sehen. Links außen im Hintergrund kann man das Gebäude der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) erkennen.

Foto: Radde, ebenfalls Rückseite Ergebnisbericht

- Weitere Bilder des Titels, von links nach rechts: Die Strukturanalyse von Proteinen mittels Röntgenkristallographie erfordert große Mengen an hochreinem Material. Ein einziges Protein (blaue Bande, rechte Spalte) wird aus einem anfänglichen Gemisch aller bakteriellen Proteine (viele Banden in der linken Spalte) isoliert. | Proteinproduktion im Großmaßstab wird mittels rekombinanter Hefen im Fermenter erreicht. | Kristalle des Internalins. | Einzelne Kristalle werden unter dem Mikroskop ausgewählt und für ein Röntgenexperiment präpariert. Fotos (von links nach rechts): GBF, Bierstedt, GBF, Bierstedt

ERGEBNISBERICHT 2002/2003

GESELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FORSCHUNG



Gesellschaft für
Biotechnologische Forschung
German Research Centre
for Biotechnology



VORWORT

04 Prof. Dr. Rudi Balling

FOKUS

08 Die GBF: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
14 Die Höhepunkte des Jahres 2002

BERICHTE AUS DER FORSCHUNG

22 Wechselwirkungen zwischen Mensch und Bakterien genauer betrachtet
31 Neue verbesserte Impfstoffe zum Schutz vor Krankheiten

WISSENSCHAFTLICHER ERGEBNISBERICHT

40 PROGRAMM „INFEKTION UND IMMUNITÄT“
42 **Topic 01 – Mikroorganismen**
43 Genetische Variabilität bei Streptokokken
44 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*
45 Identifizierung und Charakterisierung bakterieller Virulenzfaktoren
46 Streptokokkengenome und -proteome
47 Analyse bakterieller Wirkstoffproduzenten
48 Strukturanalyse von Virulenzfaktoren

49 **Topic 02 – Pathogenese**
50 Molekulare Mechanismen der Pathogen-Wirtszell-Interaktionen
51 Molekulare Mechanismen der Streptokokken-Wirtszell-Interaktionen
52 Signalübertragung zum Aktinzytoskelett
53 Wirtsreaktionen nach Infektion mit intrazellulären Bakterien
54 Pathogenese der Streptokokken im Tiermodell

55 **Topic 03 – Immunbiologie**
56 Signaltransduktion und Genregulation
57 Epigenetische Grundlagen der Genregulation
58 Posttranslationale Proteinmodifikation
59 Zellmodelle für die Infektionsbiologie
60 Genetische Mechanismen der angeborenen Immunantwort
61 T-Zell-Entwicklung und -Funktion
62 B-Zell-Subpopulationen
63 Biologie der Immunabwehr
64 Visualisierung der zellulären Dynamik immunologischer Prozesse

65 **Topic 04 – Prävention und Therapie**
66 Synthetische kombinatorische Molekülrepertoires
67 Biologie mikrobieller Wirkstoffe
68 Chemie mikrobieller Wirkstoffe
69 Antigen-Liefersysteme und Impfstoffe
70 Therapeutische zelluläre Vakzine



WISSENSCHAFTLICHER ERGEBNISBERICHT

- 71 PROGRAMM „VERGLEICHENDE GENOMFORSCHUNG“
- 72 Sequenzierung und Funktionsanalyse von genomischer DNA und cDNA
- 73 Modellierung regulatorischer Netzwerke
- 74 Ligand-basierte Entdeckung biologischer Zielmoleküle
- 75 Konformationelle Protein-Ligand-Interaktionen
- 76 Vergleichende Strukturanalyse metaboler Stoffwechselwege
- 77 Modellierung und Analyse metabolischer Netzwerke

- 78 PRGOGRAMM „NACHHALTIGE NUTZUNG VON LANDSCHAFTEN“
- 79 Funktionelle Genomik und Nischenspezifität
- 80 Biofilmgemeinschaften in Umwelt und Gesundheit
- 81 Metabolische Diversität
- 82 Naturstoffe

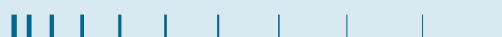
- 83 TECHNOLOGIE-PLATTFORMEN
- 84 Tierexperimentelle Einheit
- 85 Expressionsarrays
- 86 Instrumentelle Analytik
- 87 Peptid- und chemische Synthese

- 88 PROGRAMM „BIOVERFAHRENSTECHNIK“
- 89 Mikrobielle Expressions- und Produktionssysteme
- 90 Biologische Systemanalyse
- 91 Zellkulturtechnik

- 92 VERÖFFENTLICHUNGEN
- 92 Veröffentlichungen 2002
- 101 Veröffentlichungen 2003

INNOVATIONSBERICHT

- 112 INNOVATIONSBERICHT



VORWORT



• Prof. Dr. Rudi Balling,
Wissenschaftlicher
Geschäftsführer

- Zweieinhalb Jahre ist es inzwischen her, dass an der GBF die Entscheidung fiel, sich als „Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung“ zu positionieren. Zweieinhalb Jahre, in denen wir auf diesem Weg ein beachtliches Stück vorangekommen sind und viel bewegt haben:

Die GBF beteiligt sich heute an einer großen Zahl von nationalen und internationalen Forschungsprogrammen und ist ein begehrter Partner für renommierte Forscher aus dem In- und Ausland. Allein mit der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) kooperieren wir in drei Sonderforschungsbereichen. Im Nationalen Genomforschungsnetz spielen wir eine ebenso entscheidende Rolle wie im EU-Projekt „Eumorphia“, bei dem wir die Federführung für das Themenfeld „Infections and Allergic Diseases“ übernommen haben. Unsere Neuausrichtung fand in Wissenschaft, Wirtschaft, Medien und Politik eine positive Resonanz und trug wesentlich dazu bei, die Vakzine Projekt Management GmbH in Braunschweig zu etablieren, die im Auftrag der Bundesregierung neuen Schwung in die Impfstoff-Entwicklung am Standort Deutschland bringen soll.

Die Entwicklung ist sehr erfreulich, darf aber kein Grund sein, uns auf dem Erreichten auszuruhen. Was sind die Aufgaben, die die GBF in naher Zukunft vor sich hat?



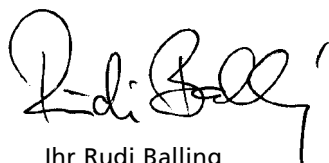
1. Das Pathogen-Spektrum, mit dem sich GBF-Wissenschaftler in ihren Forschungsarbeiten auseinandersetzen, muss erweitert werden. Diskutiert wird zurzeit ein Einstieg in die Analyse humanpathogener Pilze wie Aspergillus oder Candida oder viraler Infektionserkrankungen, etwa Hepatitis.

2. Die Kooperation mit universitären und klinischen Partnern muss ausgebaut werden. Durch die Gründung des „Zentrums für Therapieforschung“ auf dem GBF-Campus wurden hierfür die Voraussetzungen geschaffen. Diese Anbindung der Grundlagenforschung an die Klinik realisieren wir gemeinsam mit der MHH, dem Städtischen Klinikum Braunschweig und der TU Braunschweig.

3. Die Maus als Tiermodell für menschliche Infektionserkrankungen wird an der GBF eine zentrale Rolle einnehmen. Neue Strategien in der Diagnose und Therapie von Infektionserkrankungen können nur am Gesamtorganismus entwickelt werden – Zellkulturen reichen dafür nicht aus.

4. Zukünftige Forschung muss interdisziplinär sein. Die entscheidenden Erkenntnisse in den Biowissenschaften werden an den Schnittstellen von Biologie, Chemie, Medizin, Physik und Mathematik zu erwarten sein. An diesen Schnittstellen werden wir verstärkt arbeiten und zum Beispiel die Bioinformatik ausbauen.

Diese Kernaufgaben wollen wir gemeinsam anpacken und in den kommenden Jahren entschlossen daran arbeiten. Ich bin sicher, dass wir so auf unserem Weg weiterhin zügig vorankommen, selbst wenn finanzielle Engpässe manchmal für rauen Gegenwind sorgen. Ich freue mich darauf, zusammen mit den Mitarbeitern der GBF, auch in den nächsten Jahren noch manchen wissenschaftlichen Meilenstein zu erreichen und gemeinsam viele Erfolge feiern zu können.



Ihr Rudi Balling

ERGEBNISBERICHT

FOKUS BERICHTE AUS DER FORSCHUNG



links: Den Streptokokken auf der Spur | Mitte: BioS-Labor: Schülerinnen und Schüler laden DNA-Fragmente auf ein Agarose-Gel. | rechts: Neu gegründet: Das Zentrum für Therapieforschung Braunschweig. Prof. Dr. Bernhard Wörmann, Chefarzt der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie am Städtischen Klinikum Braunschweig (li) Prof. Dr. Dieter Jahn, Leiter des Instituts für Mikrobiologie an der TU Braunschweig (mi) und Prof. Dr. Rudi Balling (GBF). Fotos: Bierstedt (li), Ammerpohl



08 DIE GBF: HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR
INFEKTIONSFORSCHUNG

14 HÖHEPUNKTE DES JAHRES 2002



Die GBF: Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung

AUTOR | Priv.-Doz. Dr. Klaus Schughart | Leiter Planung, Forschung und Entwicklung und des Bereichs Wissenschaftlich-Technische Dienste

- Die GBF strebt an, sich in den nächsten Jahren zu einem international anerkannten Zentrum für Infektionsforschung zu entwickeln und damit einen nachhaltigen Beitrag in der Gesundheitsforschung zu leisten. Sie hat im Jahr 2002 das Forschungsprogramm „Infektion und Immunität“ im Rahmen der programmorientierten Förderung etabliert und positioniert sich damit innerhalb der Helmholtz-Gemeinschaft als Zentrum für Infektionsforschung. Um diese Entwicklung in den kommenden Jahren konsequent fortzuführen und auszubauen, werden genetische, immunologische und umweltbedingte Faktoren untersucht, die für Entstehung und Verlauf von Infektionen verantwortlich sind. Auf dieser Grundlage werden neue Strategien für die Prävention, Diagnose und Therapie von Infektionen entwickelt. Schwerpunkt ist die Suche nach neuen Antibiotika und Impfstoffen.

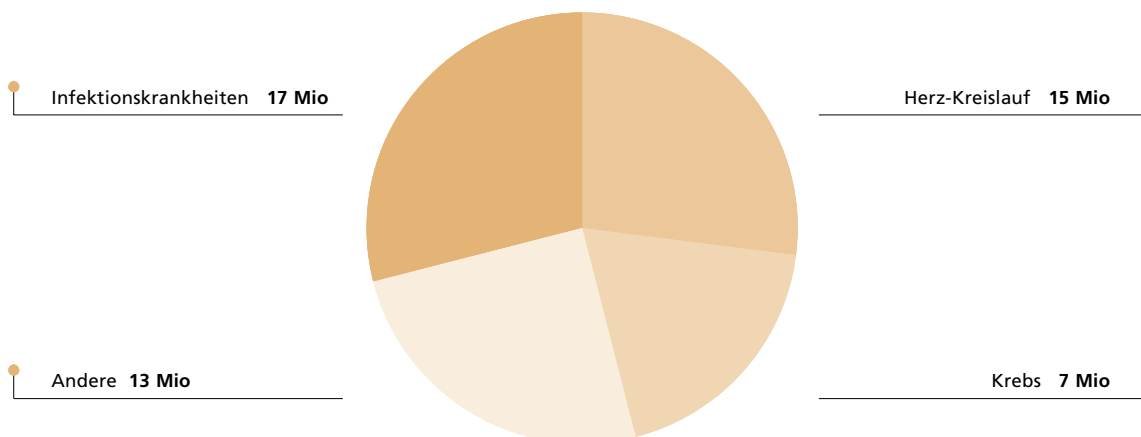
Die wesentlichen Ziele der Infektionsforschung an der GBF:

- Verständnis der grundlegenden Mechanismen von Infektion und Immunität
- Entwicklung neuer Strategien für die Diagnose, Prävention und Therapie von Infektionen

Bedeutung der Infektionsforschung Die Erforschung von Infektionen und Immunität ist eine der großen gesundheitspolitischen Herausforderungen des 21. Jahrhunderts. Bakterielle Infektionskrankheiten galten in den 60er Jahren als nahezu besiegt. Antibiotika waren die universellen Medikamente, mit denen solche Krankheiten

bekämpft werden konnten. Diese Einschätzung hat sich in der Zwischenzeit grundlegend geändert. Infektionskrankheiten sind wieder auf dem Vormarsch und verursachen weltweit rund ein Drittel aller Todesfälle, etwa 17 Millionen pro Jahr.

Todesfälle weltweit pro Jahr



Eine der Hauptursachen für das vermehrte Auftreten von bakteriellen Infektionskrankheiten ist die zunehmende Resistenz von Mikroben gegenüber Antibiotika. Das 1928 entdeckte Penicillin hat, nachdem es viele Jahre erfolgreich eingesetzt werden konnte, in der Zwischenzeit seine antibakterielle Wirkung fast völlig verloren. Vor allem in Osteuropa breiten sich multi-resistente Stämme des Tuberkulose-Erregers immer weiter aus. Kürzlich wurde in den USA eine Variante des Bakteriums *Staphylococcus aureus* isoliert, die gegen alle bisher bekannten Antibiotika resistent ist. Diese Bakterien sind für Wundinfektionen nach Operationen verantwortlich und gehören zu den bedeutenden Krankenhauskeimen. Es ist deshalb notwendig, immer neue Varianten von Antibiotika und anderen anti-bakteriellen Substanzen zu entwickeln, um auch künftig gegen Mikroben gewappnet zu sein.

Die durchschnittliche Lebenserwartung ist in den entwickelten Ländern stark gestiegen. Allerdings lässt mit zunehmendem Alter die Leistungsfähigkeit des Immunsystems nach, wodurch die Anfälligkeit und damit das Risiko steigt, an schwereren Infektionen zu erkranken. Aus diesem Grund ist in den nächsten Jahren in den Industrienationen mit einem Anstieg der Infektionserkrankungen und den daraus resultierenden Krankheits- und Todesfällen zu rechnen.

Viele Therapien, die bei schweren Erkrankungen erforderlich sind, schwächen die körpereigenen Abwehrkräfte. So wird das Immunsystem durch den Einsatz einer Chemotherapie bei der Behandlung von Tumorerkrankungen entscheidend geschwächt. Nach Organtransplantationen muss die körpereigene Immunreaktion durch Medikamente unterdrückt werden, um eine Abstoßung zu verhindern. In diesen Fällen haben bakterielle und virale Erreger die Möglichkeit, sich ungebrems zu vermehren.

Die gestiegene weltweite Mobilität hat eine Ausbreitung von Krankheiten in Regionen zur Folge, in denen die entsprechenden Erreger bisher unbekannt waren. Dies wird vor allem durch die globale Ausbreitung der Immunschwäche AIDS, der Lungenkrankheit SARS und der Tuberkulose deutlich.

Auch werden immer mehr Zusammenhänge zwischen Infektionen und der Entstehung von Tumoren gefunden. So wird eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus in direkten Zusammenhang mit dem Auftreten von Gebärmutterhalskrebs gebracht. Infektionen mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* stellen wahrscheinlich eine wesentliche Ursache für die Ausbildung von Magenkrebs

Bedeutung von Infektionskrankheiten

- Zunehmende Resistenz von Krankheitserregern
- Schwächung der Immunantwort im Alter
- Größere globale Mobilität
- Schwächung des Immunsystems nach Krebstherapien und Organtransplantationen
- Zusammenhang von Infektion, Immunerkrankungen und Krebs

dar. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass Zusammenhänge zwischen Infektionen und immunologischen Krankheiten bestehen. Beispiele sind Asthma, rheumatoide Arthritis, bestimmte Formen des Diabetes, Multiple Sklerose oder Allergien. Auch können bakterielle und virale Infektionen Krebs- oder Herzerkrankungen auslösen.

Auf nationaler und internationaler Ebene wurde mittlerweile erkannt, dass Infektionskrankheiten ein globales Problem sind. Aus diesem Grund wird von der WHO und im 6. Rahmenprogramm der EU empfohlen, die Erforschung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten besonders zu fördern. Im Rahmen der deutschen Genominitiative NGFN (Nationales Genomforschungsnetz) widmet sich das Netzwerk „Infektion und Entzündung“ der Genetik von Infektionskrankheiten. Eine der größten privaten Stiftungen, die Bill und Melinda Gates Stiftung, stellt die Entwicklung von Impfstoffen als eine der dringlichsten Notwendigkeiten heraus. Auch aus wirtschaftlicher Sicht sind Infektionskrankheiten von hoher Relevanz. In jüngster Zeit entwickelt sich in der Biotech-Industrie ein verstärktes Interesse an Anti-Infektiva und Impfstoffen. Die Gründung einer Vakzine Projekt Management GmbH, die von der GBF und dem BMBF initiiert wurde, ist ein wichtiger Schritt, um die klinische Entwicklung von Impfstoffkandidaten zu beschleunigen und Deutschland als Standort für die Impfstoffentwicklung zu stärken.



- Epidemien und Seuchen forderten Tausende von Todesopfern in der Vergangenheit

Quelle: <http://mla-hhss.org/gifs/disease.jpg>

Infektionsforschung als Aufgabe der Helmholtz-Gemeinschaft Die Entstehung, der Verlauf und die potenziellen Interventionsmöglichkeiten von Infektionen sind sehr komplexe Vorgänge. Genetische Faktoren beeinflussen sowohl auf der Seite des Infektionserregers als auch auf der Seite des infizierten Wirts den Verlauf von Infektionen. In hohem Maße spielen aber auch Umweltbedingungen – wie Ernährung, Medikamente und Lebensweise – eine wichtige Rolle. Deshalb ist es erforderlich, Forschungsstrategien interdisziplinär anzulegen und verschiedene Fachgebiete wie naturwissenschaftliche Grundlagenforschung, angewandte Impfstoffentwicklung und klinische Forschung miteinander zu vernetzen. Genomforschung, Strukturforschung, Proteomanalyse, tierexperimentelle Studien und biotechnologische Produktion benötigen zunehmend komplexe Infrastrukturen mit entsprechendem Knowhow. All dies kann von einzelnen Forschungsinstituten nur bedingt geleistet werden. Hingegen sind die Forschungszentren der Helmholtz-Gemeinschaft in der Lage, eine derartige Konzentration von Fachgebieten und Infrastrukturen bereitzustellen. Durch die Fokussierung eines Helmholtz-Zentrums wie der GBF auf die Infektionsforschung, kann die erforderliche kritische Masse geschaffen werden, um eine solche Aufgabe international voranzubringen und die Vernetzung von nationalen und internationalen Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet zu fördern.

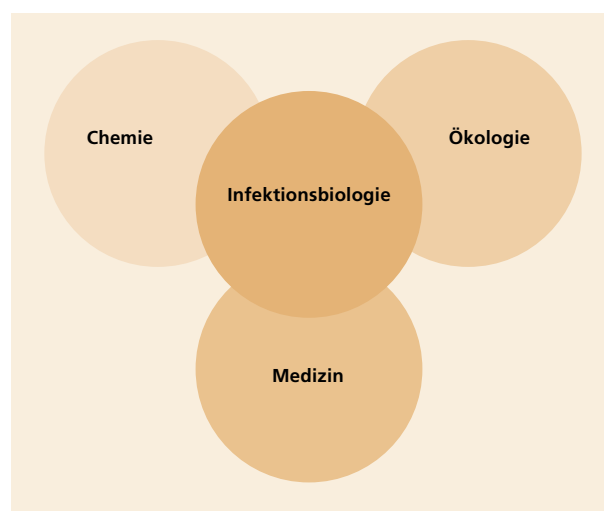
Infektionsforschung an der GBF Da die Therapie und Prävention von Infektionskrankheiten ein grundlegendes Verständnis der Mechanismen von Infektionsprozessen und der Reaktion des Immunsystems voraussetzt, ist die Grundlagenforschung ein wesentlicher Bestandteil des Forschungsprogramms der GBF. Den Schwerpunkt bilden bakterielle Infektionskrankheiten. Dies beinhaltet besonders die Analyse der komplexen Interaktionen zwischen den Genomen von Infektionserreger und Wirt sowie der äußeren Faktoren, die Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von Infektionskrankheiten nehmen können. Mit ihrer Grundlagenforschung wird die GBF zur Entwicklung neuer Strategien für die Diagnostik und Therapie von Infektionskrankheiten beitragen.

Impfstoffe werden auch in Zukunft zu den wichtigsten Präventivmaßnahmen gehören. Auch sind in jüngerer Zeit neue Verfahren entwickelt worden, Impfstoffe nicht nur für prophylaktische, sondern auch für therapeutische Zwecke zu nutzen. Die GBF wird sich deshalb in Zukunft stärker in der Impfstoffforschung und -entwicklung engagieren. Dazu gehören die Identifizierung und die vor-klinische Validierung von Impfstoffkandidaten sowie die Entwicklung und Optimierung von Vakzinierungsstrategien.

Die GBF beteiligt sich maßgeblich am deutschen Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN). Hier stellt sie im Kernbereich des NGFN Technologien und Erfahrungen für die verschiedenen Projekte zur Verfügung. Besonders relevant ist der Aufbau einer „Infection-Challenge-Plattform“. Die Plattform führt Infektionsexperimente an Mäusen durch und stellt verschiedene Mausstämme für diese Experimente im Netzwerk „Infektion und Entzündung“ zur Verfügung. Im Kontext des europäischen Netzwerkprojektes „Eumorphia“ übernimmt die GBF die Ausarbeitung von „Standard Operating Procedures“ (SOPs) für die Analyse von Mausmutanten im Rahmen von Infektionstests. Diese SOPs werden dazu dienen, Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboratorien auf internationaler Ebene besser vergleichen zu können.

Durch ihre Kompetenz in der Zell- und Immunbiologie, Chemie, Strukturbioogie, Genomforschung, Umweltforschung und Produktion von biotechnologisch hergestellten klinischen Prüfstoffen ist die GBF ideal positioniert, um Infektionskrankheiten zu erforschen. Gerade an den Schnittstellen der einzelnen Fachdisziplinen – der Infektionsbiologie mit der Chemie, Ökologie und Medizin – steckt ein besonderes Potenzial, neue Thesen zu formulieren und zu testen.

Infektion und Immunität



● Ein Programm an Schnittstellen von Disziplinen

Die infektionsbiologischen Gruppen identifizieren Proteine, die für die Interaktion des Pathogens mit dem Wirt essenziell sind. Moleküle, die solche Interaktionen hemmen können, sind die Basis für die Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten. Dabei können die zuvor identifizierten Proteine als Zielmoleküle – Targets – für antimikrobielle Wirkstoffe oder als Antigene zur Entwicklung von Impfstoffen dienen. Durch die Fokussierung der strukturbioologischen Arbeiten an der GBF auf infektionsrelevante Zielmoleküle entsteht eine Schnittstelle zur Chemie, die die Entwicklung neuartiger anti-bakterieller Wirkstoffe erlaubt. Mit Hilfe von chemisch hergestellten kombinatorischen Substanzbibliotheken werden dann Moleküle gesucht, die die Aktivität der Proteine im Infektionsprozess selektiv verändern können. Der Verlauf von bakteriellen Infektionen wird häufig nicht nur durch ein einzelnes Pathogen bestimmt, sondern von der Zusammensetzung bakterieller Gemeinschaften. Infektionen sind deshalb auch ökologische Prozesse, in denen das Gleichgewicht zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Mikroorganismen einen kritischen Parameter darstellt. An der GBF liegt eine breite Erfahrung in der Analyse mikrobieller Gemeinschaften vor. Ein Schwerpunkt im künftigen Forschungsprogramm der GBF wird daher das Studium von medizinisch relevanten Biofilmen sein, wie sie zum Beispiel in Kathetern oder Röhrenimplantaten beobachtet werden. Ziel ist die Aufklärung der Mechanismen, die an der Entstehung und Erhaltung von Biofilmen beteiligt sind. Das schafft die Grundlage für potenzielle

Interventionsstrategien. Langfristig soll auch der Einfluss der Ernährung auf mikrobielle Gemeinschaften des Darms und der darin vorkommenden Pathogene untersucht werden. Die Etablierung des Zentrums für Therapieforschung, das in Zusammenarbeit der Technischen Universität Braunschweig, der Medizinischen Hochschule Hannover und des Städtischen Klinikums Braunschweig auf dem Gelände der GBF entsteht, wird den Transfer von Ergebnissen aus der Grundlagenforschung in die Klinik wesentlich beschleunigen.



• DNA-Chips, ein Ergebnis der Arbeiten der Technologischen Plattformen

Foto: Bierstedt

Technologische Plattformen an der GBF

- Tierexperimentelle Einrichtungen (SPF-Zucht, Knock-out-Technologie, Infektionseinheit)
- Analytische Instrumente (NMR-Analyse, Röntgenstrukturanalyse, Massenspektrometrie, Elektronenmikroskopie)
- Expressionsarrays
- Peptidsynthese und -sequenzierung

Weitere Details hierzu sind in den folgenden Kapiteln dieses Jahresberichts beschrieben.

- Zur Unterstützung interner Forschungsprojekte sowie für die Zusammenarbeit mit externen Forschungseinrichtungen und Universitäten steht an der GBF eine Vielzahl von technologischen Plattformen zur Verfügung.

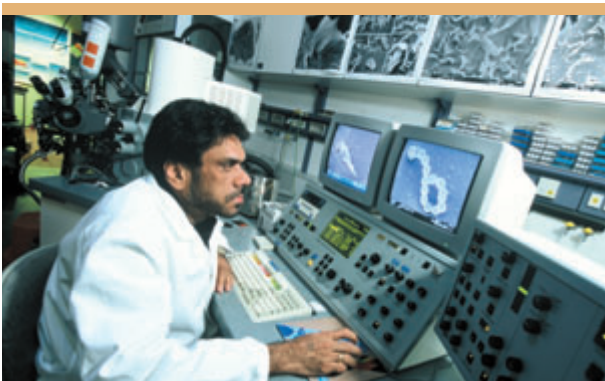
Das Forschungsprogramm Infektion und Immunität

Das Ziel des Forschungsprogramms „Infektion und Immunität“ in der GBF ist, die Mechanismen zu verstehen, die der Ausbildung einer Infektionskrankheit zu Grunde liegen. Dies beinhaltet Grundlagenforschung sowohl an Modellorganismen als auch an medizinisch relevanten Krankheitserregern. Die Untersuchungen werden erlauben zu verstehen, weshalb nur bestimmte Mikroorganismen Krankheiten verursachen, andere nahe verwandte aber nicht. Gleichzeitig sollen die Mechanismen des Wirtes entschlüsselt werden, die zur Kontrolle oder der Abwehr einer Infektion führen. Das wird die Basis für die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten und der Behandlung anderer chronischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Autoimmun- und Krebserkrankungen. Die GBF hat dieses Forschungsprogramm federführend in Zusammenarbeit mit dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München entwickelt. Die GSF bearbeitet dabei komplementäre Gebiete, wie Infektionskrankheiten, die durch virale Erreger verursacht werden. Das Forschungsprogramm „Infektion und Immunität“ beinhaltet die Themen „Mikroorganismen“, „Pathogenese“, „Immunbiologie“, „Prävention und Therapie“ sowie den Aufbau einer nationalen und internationalen Plattform, die biotechnologisch hergestellte Produkte für klinische Studien und für die Grundlagenforschung zur Verfügung stellt.

Infektion und Immunität

- Mikroorganismen
- Pathogenese
- Immunbiologie
- Prävention und Therapie
- Bioverfahrenstechnik

- Weitere Details zu den Forschungsaktivitäten sind in den folgenden Kapiteln dieses Jahresberichts beschrieben.



• Den Streptokokken auf der Spur

Foto: Bierstedt



• Untersuchungen an Modellen: der Fadenwurm *C. elegans*

Foto: Bierstedt

Mikroorganismen Ziel dieses Themengebietes ist es, Virulenzfaktoren in Bakterien und Viren zu identifizieren und zu charakterisieren sowie die Mechanismen der Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen zu verstehen. Zudem wird die dreidimensionale Struktur von Virulenzfaktoren und den hiermit interagierenden Wirtspoteinen auf atomarer Ebene aufgeklärt.

Ein Beispiel aus dem Forschungsprogramm der GBF sind Streptokokken-Bakterien, mit denen sich jedes Jahr schätzungsweise 40 Millionen Kinder zwischen 5 und 15 Jahren infizieren. Die Bakterien verursachen Krankheiten wie Scharlach oder Mandelentzündungen. Nicht richtig behandelt, können lebensbedrohliche Spätfolgen auftreten: Als Folge einer Infektion leiden rund 15 Millionen Kinder an rheumatischen Herzerkrankungen, von denen jedes Jahr eine halbe Million sterben. Neben der Aufklärung der Infektionsmechanismen ist die Entwicklung eines dringend benötigten Impfstoffes ein Ziel der Forschungsarbeiten in der GBF.

Pathogenese Ein detailliertes Verständnis der Abläufe von Infektionsprozessen bildet die Grundlage für das Design neuer Diagnose- und Therapiestrategien. Deshalb werden im Teilprogramm „Pathogenese“ die vielfältigen Interaktionen zwischen Pathogen und Wirt auf zellulärer Ebene untersucht. Insbesondere bakterielle Pathogene, die über mukosale Oberflächen des Verdauungstraktes und der Atemwege eindringen.

Immunbiologie Im Themengebiet „Immunbiologie“ werden die grundlegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Immunantwort untersucht. Mit dem Ziel zu verstehen, wie eine effektive Immunantwort induziert und aufrecht erhalten wird, welche Entscheidungsprozesse kritisch für die Entstehung einer Immunaktivierung oder der Ausbildung einer Toleranz sind und wie bestimmte pathogene Erreger das Immunsystem umgehen.

Prävention und Therapie Im ProgrammtHEMA „Prävention und Therapie“ werden neue Strategien entwickelt, um menschliche Erkrankungen zu behandeln oder zu verhindern. Hierzu werden neue Anti-Infektiva gesucht sowie geeignete Antigenliefersysteme und Adjuvantien für die Immunisierung entwickelt und neuartige Therapiemöglichkeiten, die auf der Modulation des Immunsystems basieren, vorangetrieben. Vakzin-Prototypen werden entwickelt und in klinischen Studien getestet.

Bioverfahrenstechnik als nationale Plattform

Die Bioverfahrenstechnik der GBF dient als wichtige Technologie- und Ressourcenplattform der nationalen und internationalen Wissenschaftsinfrastruktur. Sie stellt Verfahren und Technologien der biotechnologischen

Produktion für die Industrie und für wissenschaftliche Einrichtungen zur Verfügung. Hier werden Substanzen für klinische Prüfungen nach dem Standard „Good Manufacturing Practice“ (GMP) und unter dem Geltungsbereich des Arzneimittelgesetzes hergestellt. Darüber hinaus wird die GBF künftig als Produzent von kommerziell nicht erhältlichen Biomolekülen für die Grundlagenforschung verstärkt aktiv sein.



● GMP ist Voraussetzung für die Herstellung von Impfstoffen

Foto: Bierstedt



● Untersuchungen an Mäusen spielen für immunbiologische Antworten eine wichtige Rolle

Foto: Bierstedt

Klaus Schughart geboren 1956, Studium der Biologie, Universität Köln, 1986 Promotion (Dr. rer.nat.) am Institut für Genetik, Universität Köln, Postdoktorand bei F.H. Ruddle, Yale University, New Haven, USA (1987-1989), Leiter einer Nachwuchsgruppe am MPI für Immunbiologie, Freiburg (1990-1994), 1994 Habilitation im Fach Genetik, Universität Freiburg, Forschungsgruppenleiter an der GSF, München (1995-1996), 1995 Ernennung zum Privatdozent im Fach Genetik an der Universität Freiburg, Leiter der Forschungsabteilung für Molekular- und Zellbiologie, Transgene S.A., Strasbourg, Frankreich (1997-2001), seit 2002 Leiter Planung, Forschung und Entwicklung und des Bereichs Wissenschaftlich-Technische Dienste der GBF

DANKSAGUNG Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die an der Erstellung des Pof-Antrages „Infektion und Immunität“, des Strategiepapiers 2002 und des F&E Programms 2003 mitgewirkt und damit die Grundlagen zu diesem Artikel gelegt haben. Besonderer Dank gilt Thomas Gazlig, Prof. Dr. Rainer Jonas und Dr. Christopher Schippers für wertvolle Anregungen und Verbesserungsvorschläge.



Höhepunkte des Jahres 2002

AUTOR | Dipl.-Journ. Dipl.-Biol. Thomas Gazlig | Leiter der Presse- und Öffentlichkeitsarbeit

PROJEKTMITARBEITER | Rebecca Barthel-Kahe | Manfred Braun | Anne Feldmann | Andrea Koch |
Stephanie Libor | Richard Radloff

Forschung an Keimen in Darm und Lunge Mit der Wechselwirkung zwischen mikrobiellen Erregern und menschlichen Schleimhäuten befassen sich zwei neue Sonderforschungsbereiche (SFB), die die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) künftig fördern wird. Der SFB 1922 – Pathobiologie der intestinalen Mukosa – untersucht krankhafte Vorgänge an der Darmschleimhaut, aber auch die Wirkungsweise von Probiotika – Bakterien, die Gesundheit und Abwehrbereitschaft der Darmschleimhaut stärken. Im Sonderforschungsbereich 1921 – Immunreaktionen der Lunge bei Infektion und Allergie – untersuchen Wissenschaftler aus Braunschweig und Hannover den Haftmechanismus von Bakterien, Viren und Pilzen an der Bronchienschleimhaut und wie Abwehrzellen im Atemtrakt gesteuert werden. An den Projekten beteiligen sich neben der GBF die Medizinische Hochschule Hannover (MHH), die Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), die Universität Hannover und die Fraunhofer Gesellschaft.

Impfstoff-Offensive der Bundesregierung Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) will die Entwicklung neuer Impfstoffe in Deutschland beschleunigen – und hat die GBF damit betraut, die „Vakzine-Initiative“ in die Tat umzusetzen. Forschungsministerin Edelgard Bulmahn präsentierte das Projekt im Dezember 2002 in Hannover. Für die kommenden fünf Jahre stellt das BMBF 25 Millionen Euro zur Verfügung, mit denen die Entwicklung von Impfstoffkandidaten beschleunigt und Deutschland als Forschungs- und Entwicklungsstandort von Impfstoffen gestärkt werden soll. Dazu arbeitet die gemeinnützige Deutsche Stiftung Impfstoff-Forschung zusammen mit der markt-orientierten Vakzine Projekt Management GmbH, deren Hauptgesellschafter die Stiftung und der Förderverein der GBF sind.



**Vakzine Projekt
Management GmbH**

● Vakzine Projekt Management GmbH



- Neu gegründet: Das Zentrum für Therapieforschung Braunschweig. Prof. Dr. Bernhard Wörmann, Chefarzt der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie am Städtischen Klinikum Braunschweig (li) Prof. Dr. Dieter Jahn, Leiter des Instituts für Mikrobiologie an der TU Braunschweig (mi) und Prof. Dr. Rudi Balling (GBF).

Foto: Ammerpohl

Forscher-Know-how für die Krankenhäuser Konzepte für die Diagnose, Prophylaxe und Therapie von akuten und chronischen Infektionskrankheiten entwickeln: Das ist das Ziel des Zentrums für Therapieforschung, das die GBF gemeinsam mit dem Städtischen Klinikum Braunschweig und der Technischen Universität Braunschweig gegründet hat. Ein weiterer Kooperationspartner ist die Medizinische Hochschule Hannover. Durch die regionale Kooperation sollen Ergebnisse aus der Grundlagenforschung schneller in die klinische Entwicklung von Medikamenten umgesetzt werden. Forschungsschwerpunkt werden Untersuchungen zum besseren Verständnis und der Therapie von Infektionen in immun-supprimierten Patienten und zur Rolle von Krankheitserregern bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten sein.

Mausgenetik für die Gesundheitsforschung

Die GBF nimmt am neuen europäischen Forschungsprogramm „EUMORPHIA“ teil. Die EU stellt dafür in den kommenden drei Jahren insgesamt 12,3 Millionen Euro bereit, davon fließen 730 000 Euro nach Braunschweig. In dem Programm kooperieren Forschungslaboratorien aus acht Ländern mit dem Ziel, genetisch veränderte Mäuse zu charakterisieren, die für die Gesundheitsforschung relevant sind. Die GBF wird sich auf infektionsbiologische Fragestellungen konzentrieren: Hier werden Mäuse gezüchtet und untersucht, die besonders empfindlich gegenüber bakteriellen Infektionen sind oder die Autoimmun- beziehungsweise allergische Reaktionen zeigen. Die GBF wird dabei eng mit dem GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München zusammenarbeiten, der zweiten deutschen Einrichtung, die an EUMORPHIA beteiligt ist.



- *Im Dienst des Menschen: Auch für die GBF-Wissenschaftler ist die Maus ein wertvoller Modellorganismus, um infektionsbiologische Fragestellungen zu lösen. Nur in lebenden Organismen lassen sich komplexe Krankheitsbilder erforschen.*

Foto: Bierstedt

Suche nach Arzneien aus dem Ozean

Biologisch aktive Verbindungen aus Meeres-Organismen zu gewinnen war das wichtigste Ziel des niedersächsischen Forschungsschwerpunkts „Marine Biotechnologie“. Dieses von der Volkswagen-Stiftung geförderte Verbundprojekt, an dem 19 Arbeitsgruppen von verschiedenen Universitäten und Forschungseinrichtungen teilnahmen, lief über fünf Jahre – Abschluss: 2002. Von der GBF hatte sich das Team von Dr. Irene Wagner-Döbler beteiligt und dabei zahlreiche neue Bakterien isoliert und mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert. Ihr besonderes Augenmerk richteten die GBF-Forscher auf Proteobakterien von der *Roseobacter*-Gruppe, die als Toxinbildner bei Algenblüten berüchtigt sind. Wagner-Döbler und ihre Kollegen gewannen aus Meeresbakterien eine Reihe von viel versprechenden Wirkstoff-Kandidaten mit teilweise medizinisch interessanten Eigenschaften, die weiter untersucht werden.

Orientierung im Sequenzen-Dschungel

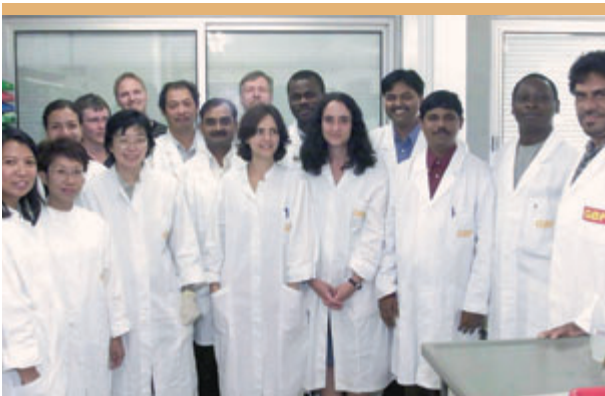
Die Gen-Suchmaschine „NGFN-BLAST“ erleichtert Wissenschaftlern seit 2002 herauszufinden, welche Informationen sich hinter ermittelten genetischen Sequenzen verbergen. Als erster öffentlicher Server dieser Art in Deutschland erlaubt der Dienst Sequenzvergleiche zwischen Genen verschiedener Säugetierarten, etwa zwischen Mensch, Maus und Ratte. Der BLAST-Server (BLAST = Basic Local Alignment Search Tool) ist Teil der Forschungsarbeiten der GBF im Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN). Mitglieder des NGFN erhalten einen bevorzugten Zugriff zu den Daten und können sich nutzerspezifische Untergruppen der Datenbank zusammenstellen. Dadurch wird die Suche erheblich beschleunigt, und der Nutzer erhält nur Ergebnisse, die für seine Anwendung relevant sind.

Ärzte-Seminar: Genetik in der Notfallmedizin

Die GBF und die Medizinische Hochschule Hannover haben für junge Ärzte einen Intensivkurs in molekularer Medizin und Genomforschung organisiert. Das Angebot soll die Arztausbildung ergänzen. Bislang gibt es nur wenige Ärzte, die die Methoden der Genomforschung im Klinikalltag beherrschen. Im Vordergrund des Kurses stand daher Genetik in der Praxis: Die Nutzung von Gen-Chips oder PCR für eine Schnelldiagnostik in der Notfallmedizin, etwa für den Nachweis pathogener *E. coli*-Bakterien bei lebensbedrohlichen Durchfallerkrankungen von Kindern.

Trainingsprogramm „Vom Gen zum Impfstoff“

Das Ziel des Internationalen Trainingsprogramms (ITP) an der GBF war, Wissenschaftler aus Entwicklungsländern mit Spezialwissen auszustatten, damit sie die Infektions- und Impfstoffforschung in ihren Heimatländern vorantreiben können. Zwölf promovierte Teilnehmer bildeten sich vom 5. August bis zum 13. September 2002 in Braunschweig weiter. In ihrer Heimat sollen sie als Multiplikatoren fungieren und ihr Wissen in ähnlichen Fortbildungsprogrammen weitergeben.



- Internationale Experimente im Labor: Teilnehmer des ITP-Kurses arbeiten an der Entwicklung von Impfstoffen.

Foto: Ammerpohl

Biotech-Kurs für Wissenschaftler aus Südostasien

Bereits zum vierten Mal organisierte die GBF ein Trainingsprogramm für junge Wissenschaftler aus Südostasien gemeinsam mit dem Weiterbildungsträger Carl Duisberg Gesellschaft (CDG) – heute: InWEnt –, der BioRegion und der Zentralstelle für Arbeitsvermittlung (ZAV). An dem Kurs „Industrielle Biotechnologie“ nahmen 20 Forscher von Universitäten und Industrieunternehmen der vier ASEAN-Länder Thailand, Indonesien, Philippinen und Vietnam teil. Nach einem zweieinhalbmonatigen Deutsch- und Kulturkurs erhielten sie vom 27. Mai bis zum 28. Juni 2002 an der GBF eine Einführung in die moderne Biotechnologie. Anschließend gingen die Wissenschaftler zu einem mehrmonatigen Weiterbildungsaufenthalt in Betriebe oder Forschungslaboratorien in der Region.

Infektions-Kongress der Biomediziner Der Einfluss von Infektionen auf die Entstehung chronischer Krankheiten stand im Mittelpunkt eines Symposiums am 22. und 23. Oktober in der GBF. Zu der internationalen Tagung des Verbundes Klinisch-Biomedizinischer Forschung (KBF) kamen führende Wissenschaftler, die sich mit grundlegender vorklinischer und klinischer Forschung beschäftigen. Sie diskutierten unter anderem den Zusammenhang zwischen Infektionen und Krebs, chronische Lebererkrankungen, chronische Entzündungen sowie Kreislauf- und neurologische Erkrankungen.

Weltkongress der Streptokokken-Forscher Erstmals richtete die GBF gemeinsam mit dem All India Institute of Medical Science das alle drei Jahre stattfindende internationale Lancefield-Symposium aus. Zu der Tagung im indischen Goa trafen sich Streptokokkenforscher aus der ganzen Welt. Die rund 300 Teilnehmer widmeten sich dem Thema „Fight against Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease“. Streptokokken sind trotz verfügbarer Antibiotika-Behandlung weltweit ein ernstes Gesundheitsproblem und stellen für viele Länder eine enorme soziale und wirtschaftliche Belastung dar. Gefährlich sind insbesondere Folgeerkrankungen wie rheumatische Herzerkrankungen, an denen allein in Indien rund sechs Millionen Kinder leiden.



- Unter Palmen: Die Ankündigung des Lancefield-Symposiums in Goa.

Foto: Gazlig

GBF koordiniert Kristallographen-Treffen

Das jährliche „Heart of Europe BioCrystallography Meeting“ fand diesmal unter fachlicher Leitung der GBF statt: Dr. Dirk Heinz, Abteilungsleiter Strukturbioogie, lud Forscher aus Deutschland, Polen und Tschechien nach Goslar ein. Das BioCrystallography Meeting bietet vor allem Doktoranden und Nachwuchsforschern eine Plattform für ihre Arbeiten. Das Team von Dirk Heinz stellte dabei unter anderem seine Ergebnisse bei der Strukturaufklärung des Internalins vor, eines Proteins, mit dem Listerien die Oberfläche menschlicher Darm-schleimhaut-Zellen erkennen.

Messe für Laborbedarf Erstmals gab es im vergange-nen Jahr eine Messe im GBF-Forum zu besichtigen: Das Laborbedarfs-Unternehmen Omnilab, Mieter im Grün-derzentrum auf dem GBF-Campus, organisierte eine bio-technologische Geräte- und Produktausstellung. An rund 60 Ständen stellten internationale Anbieter Laborausstat-tungen vom Mikrofilter über Chromatographen bis hin zu Labormöbeln aus. Etwa 500 Besucher, vom Instituts-leiter bis zum Laboranten, besuchten die Labormesse.



● Reges Interesse: An den Messeständen im Forum konnten sich die Besucher ausgiebig informieren.

Foto: Omnilab

Bundesweit am Genomtelefon Unter dem Motto „The Genome and Behind“ diskutierten die Projektleiter des Deutschen Humangenomprojektes (DHGP) im Forum der GBF über aktuelle Entwicklungen in der Genomforschung. Ein Höhepunkt der Veranstaltung war das so genannte Genomtelefon: Unter einer gebührenfrei- en Rufnummer standen an zwei Tagen führende deutsche Genomforscher den Bürgern Rede und Antwort. Organi- siert wurde das Genomtelefon von DHGP, GBF, dem Ver- ein zur Förderung der Humangenomforschung und der Braunschweiger Niederlassung der Deutschen Telekom.



● GBF-Genomtelefon: Prof. Dr. Jens Reich.

Foto: Gazlig

Raus aus der Schublade, rein in die Anwendung

Patenterte Erfindungen wurden im wissenschaftlichen Betrieb bisher selten effektiv verwertet und verursachen Kosten, statt Geld zu verdienen. Deshalb vermarktet die Ascenion GmbH seit Mai 2002 im Auftrag der GBF deren Patentportfolio. Sie ist die 100 prozentige Tochter einer von den vier Helmholtz-Zentren GBF, MDC, GSF und DKFZ gegründeten Life-Science-Stiftung. Ihr Hauptsitz ist München, Außenstellen gibt es in Braunschweig und Berlin. Die Gewinne fließen über die Stiftung an die Zentren zurück.

Gründerzentrum für Biotech-Start-ups

Nach einer Bauzeit von nur einem Jahr wurde das auf Initiative der Stadt Braunschweig geplante Gründerzentrum errichtet. Die Investitionskosten tragen die Stadt sowie das Land Niedersachsen. Das Labor- und Bürogebäude auf dem GBF-Campus weist eine Fläche von 4000 Quadratmetern auf, davon 1400 Quadratmeter Labor- und 2600 Qua- dratmeter Büroräume für Firmengründer.



● Vorderansicht des BioTec Gründerzentrums

Foto: Stadt Braunschweig

Fördergelder für Biotech-Firmen Das „BioProfil Funktionelle Genomanalyse“, eine Initiative niedersächsischer Biotech-Unternehmen und Forschungseinrichtungen, hat seine Förderaktivität aufgenommen. Ziel des Vereins ist es, die praktische Anwendung von Erkenntnissen aus der Humangenomforschung in der Infektions-, Stammzell- und Neurobiologie zu fördern. Dafür stehen Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung BMBF zur Verfügung. Im Gutachtergremium des Vereins ist neben anderen Fachleuten aus ganz Deutschland auch GBF-Geschäftsführer Prof. Dr. Rudi Balling vertreten. Die ersten beiden Projekte, die Gutachter und Vorstand dem Ministerium zur Förderung empfohlen haben, sind ein Früherkennungs-System für Diabetes (Firma Mosaïques diagnostics, Hannover) und eine Knock-out-Methode für Maus-Gene (Firma DeveloGen aus Göttingen). Die beiden Biotech-Unternehmen sollen mit insgesamt einer Million Euro unterstützt werden.

Biotechnologie-Tage im GBF-Forum Die 4. Biotechnologie-Tage des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) fanden am 13. und 14. Mai 2002 in der GBF statt. Über 400 Besucher – vorwiegend Entscheider aus Wirtschaft, Finanzen, Politik, Behörden und Wissenschaft – trafen sich im GBF-Forum. Im Rahmen der Veranstaltung wurde auch der Deutsche Biotechnologie-Report 2002 der Unternehmensberatung Ernst & Young vorgestellt.

Ausgezeichnete Forscher Auch im Jahr 2002 errangen wieder mehrere GBF-Wissenschaftler fachliche Preise und Auszeichnungen: Dr. Hansjörg Hauser wurde mit dem Boltzmann Award for Cytokine Research geehrt; Dr. Rolf Müller erhielt den Dechema-Nachwuchswissenschaftlerpreis für Naturstoffforschung.

Inhoffen-Medaille für Peptid-Design Professor Dr. Horst Kessler von der TU München wurde im Mai für seine Arbeiten zum Peptid-Design mit Hilfe der NMR-Spektroskopie mit der Hans Herloff Inhoffen-Medaille ausgezeichnet. Die von der Technischen Universität (TU) Braunschweig und dem Förderverein der GBF gestiftete und mit 2500 Euro dotierte Auszeichnung würdigte besonders Kesslers fächerübergreifendes Denken. Die Arbeitsgebiete von Prof. Horst Kessler umfassen das rationale Moleküldesign, die Synthese und Struktur von Peptiden und peptidähnlichen Verbindungen.

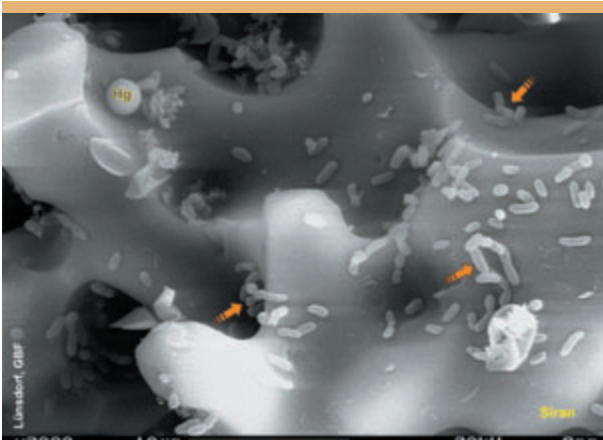


- 4. BMBF-Biotechnologie-Tage bei der GBF: Prof. Rudi Balling, Bundesforschungsministerin Edelgard Bulmahn und der ehemalige niedersächsische Ministerpräsident Sigmar Gabriel bei der Eröffnung.

Foto: Gramann

Den wissenschaftlichen Nachwuchs fördern Der Förderverein der GBF zeichnete herausragende Doktorarbeiten aus: Preisträgerin Nicole Glaser beschäftigte sich mit Epothilonen. Im Mittelpunkt ihrer Untersuchungen an der GBF standen die natürlichen Varianten, die von verschiedenen Bakterienarten produziert werden. Edelweiß Markworth und Andreas Toman erhielten den Preis gemeinsam für ihre Dissertationen über die Struktur und Wirkung ATP-sensitiver Kalium-Ionenkanäle in der Zellwand. Diese Kanäle koordinieren die Reizweiterleitung, sind an Muskelkontraktion oder Sekretionsprozessen beteiligt. Krankheitsbilder wie Diabetes Typ 2 sind auf defekte Ionenkanäle zurückzuführen. Neben den Förderpreisen wurde auch der Fritz-Wagner-Preis zur Förderung der Biotechnologie vergeben. Preisträgerin 2002 war Dr.-Ing. Christina Mundhenke vom Institut für Mechanische Verfahrenstechnik der TU. In ihrer Doktorarbeit hat sie untersucht, welchen Einfluss das Zerkleinern organischer Materialien, wie Äpfel oder Avocado, auf deren Abbau in Kläranlagen hat.

Quecksilber-Abbau: Verfahren marktreif Drei GBF-Wissenschaftler haben Ende 2001 den Erwin-Schrödinger-Preis für interdisziplinäre Forschung erhalten: Dr. Irene Wagner-Döbler, Prof. Dr. Wolf-Dieter Deckwer und Prof. Dr. Kenneth Timmis. Sie haben ihre Idee, mit Bakterien quecksilberbelastete Industrieabwässer zu reinigen, bis zu einem marktreifen Verfahren entwickelt. Dazu war die Zusammenarbeit von Ökologen, Bioverfahrenstechnikern und Mikrobiologen erforderlich. Der Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft zeichnet solche interdisziplinären Forschungsarbeiten jedes Jahr mit dem Erwin-Schrödinger-Preis aus, der mit 50 000 Euro dotiert ist.



- *Mikrobielle Entgiftungs-Trupps: Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt stäbchenförmige Bakterien der Art Pseudomonas putida auf Siran, einer keramikartigen Trägerschicht.*

Foto: GBF

GBF-Mitarbeiter im Hochwasser-Einsatz Solidarisch zeigte sich die GBF mit den Opfern der Hochwasserkatastrophen: 50 Mitarbeiter füllten in Magdeburg Sandsäcke und verstärkten Dämme. GBF-Mikrobiologen rückten mit dem mobilen Umweltlabor in die Überflutungsgebiete bei Hitzacker aus: Dr. Wolf-Rainer Abraham und Dr. Dirk Wenderoth untersuchten Schlamm- und Wasserproben auf krankheitserregende Bakterien wie Salmonellen und pathogene *E. coli*-Stämme. Neben der praktischen Hilfe sammelten die GBF-Mitarbeiter durch unbezahlte Überstunden auch Geld: Ein Scheck über 10 000 Euro ging an das Diakonische Werk Braunschweig für die Unterstützung der Sozial- und Diakoniestation Raguhn (Sachsen-Anhalt).



- *Einsatz: Viele Helfer reichen bei hochsommerlichen Temperaturen Sandsäcke weiter.*

Foto: Gazlig

Biotech-Labor für Schüler Um Schülerinnen und Schüler frühzeitig für Wissenschaft und Forschung zu interessieren, hat die GBF zusammen mit der TU Braunschweig und der Bezirksregierung Braunschweig das biotechnologische Schülerlabor BioS gegründet. Das Vorhaben wird unterstützt von der niedersächsischen Landesregierung und der Helmholtz-Gemeinschaft. Die Stiftung Nord/LB-Öffentliche konnte als Förderpartner gewonnen werden. Das Biotechnologische Schülerlabor steht seit Frühjahr 2002 Schülerinnen und Schülern der Jahrgangsstufen 10 bis 13 offen. Es bietet die Möglichkeit, durch eigenes Experimentieren grundlegende biotechnologische Methoden kennen zu lernen, die in der Schule nicht gelehrt werden. Das BioS wird von zwei Gymnasiallehrerinnen geleitet, die Experimentalkurse für Lerngruppen bis zu 24 Schülern betreuen.



- *BioS-Labor: Die Schülerinnen und Schüler laden DNA-Fragmente auf ein Agarose-Gel.*

Foto: Ammerpohl

Thomas Gazlig geboren 1966, Studium der Biologie (Dipl.-Biol.) mit Schwerpunkt Biochemie, Biotechnologie und Genetik (1987-1993, Technische Universität Braunschweig) und Ergänzungsstudium der Journalistik (Dipl.-Journ., 1993-1996, Institut für Journalistik und Kommunikationsforschung an der Hochschule für Musik und Theater Hannover). Berufliche Stationen: PR-Referent beim Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur (1994-1995) und bei der Öffentlichen Versicherung Braunschweig (1995-1998). Seit September 1998 Pressesprecher und Leiter der Presse- und Öffentlichkeitsarbeit der GBF.

ERGEBNISBERICHT

FOKUS BERICHTE AUS DER FORSCHUNG



*Analyse der Strukturen des Komplexes zwischen Internalin A aus *Listeria monocytogenes* und humanem E-Cadherin (li); Dr. Wolf-Dieter Schubert bei der Montage eines Proteinkristalls auf einem Röntgenmessplatz (mi); Das Arbeiten unter einer sterilen Werkbank ist Vorbedingung für viele Arbeitsschritte, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten* Fotos: Bierstedt



- 22 WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN
MENSCH UND BAKTERIEN GENAUER
BETRACHTET

- 31 NEUE VERBESSERTE IMPFSTOFFE ZUM
SCHUTZ VOR KRANKHEITEN



Wechselwirkungen zwischen Mensch und Bakterien genauer betrachtet

AUTOR | Prof. Dr. Dirk Heinz | Abteilung Strukturbiologie

- Gefürchtete bakterielle Infektionskrankheiten wie Tuberkulose, Keuchhusten und Ruhr sind durch das verstärkte Auftreten antibiotikaresistenter Keime, den weltweiten Tourismus sowie eine zunehmende Impfmüdigkeit – auch in den Industrienationen – erneut ins Visier der Gesundheitsforschung gerückt. Gleichzeitig eröffnen die immensen Fortschritte in der Genom- und Proteomanalyse pathogener Bakterien und des Menschen neue Möglichkeiten für eine zielgerichtete Infektionsforschung. Um gezielt und frühzeitig in den Infektionsprozess eingreifen zu können, ist es besonders wichtig, die komplexen Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Mensch auf molekularer Ebene zu verstehen. Ein möglicher Angriffspunkt in den Prozess ist die Eigenschaft zahlreicher pathogener Bakterien in die Wirtszelle einzudringen und hier, geschützt vor der Immunabwehr des Wirts, den Infektionsprozess fortzusetzen. Ziel unserer strukturellen Untersuchungen ist es, die Wechselwirkungen der am Infektionsprozess beteiligten bakteriellen und humanen Proteine bis auf die atomare Ebene aufzuschlüsseln. Die auf diese Weise erhaltenen Strukturen der Makromoleküle können als Grundlage für die Entwicklung neuer Wirk- und Impfstoffe zur Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten dienen.

Das humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* *Listeria monocytogenes* ist ein human- und tierpathogenes Bakterium, das in der Regel über die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in den Wirt gelangt. Die Infektion betrifft vor allem Menschen mit geschwächtem Immunsystem und Schwangere und kann dort zur schweren Erkrankung Listeriose führen. Im akuten Stadium tritt eine häufig tödlich verlaufende Hirn- bzw. Hirnhautentzündung auf. Das Gram-positive Bakterium ist in der Lage, drei essenzielle Barrieren im menschlichen Körper zu überwinden: Darmwand, Plazenta- und Blut-Hirn-Schranke. In der Zell- und Infektionsbiologie ist *L. monocytogenes* in den vergangenen Jahren zu einem wichtigen Modellsystem für fakultativ intrazelluläre Bakterien geworden.



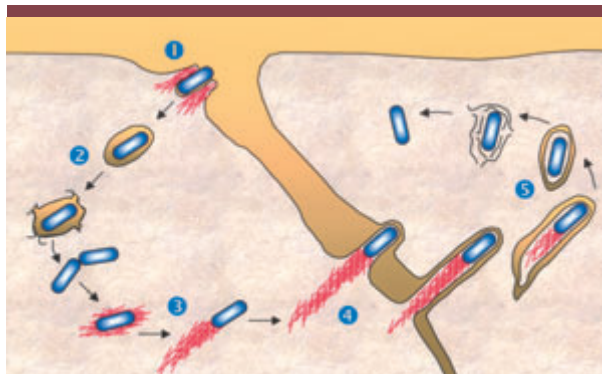
- Elektronenmikroskopische Aufnahme von Listerien, die an humane Darmzellen anheften.

Foto: GBF

Das Bakterium dringt während der Infektion vollständig in die Wirtszelle ein und ist so für das humorale Immunsystem mit seinen Antikörpern „unsichtbar“. In der Wirtszelle kann es sich ungehindert fortbewegen, vermehren und nachfolgend benachbarte Zellen befallen. Zu diesem Zweck verfügt das Bakterium über ein überschaubares Arsenal von Proteinen, die sogenannten Virulenzfaktoren, die eine für das Bakterium vorteilhafte „Umprogrammierung“ verschiedener Wirtszellprozesse hervorrufen. So sind zum Beispiel die Proteine der Internalinfamilie für die wirtszellspezifische Anheftung und Aufnahme der Bakterien in die menschliche Zelle verantwortlich und nutzen für den Prozess verschiedene wirtseigene Signaltransduktionswege. Weitere wichtige Virulenzfaktoren sind das Listeriolysin und zwei Phospholipasen, mit Hilfe derer sich die Bakterien nach der Invasion aus Membrankompartimenten befreien, sowie ActA, welches das Aktin cytoskelett der Wirtszelle umorganisiert und damit die Motilität der geißellosen Bakterien innerhalb der Wirtszelle sicherstellt.

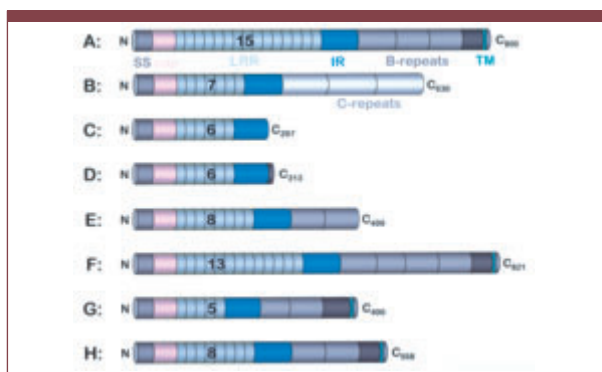
Die Internaline als Schlüssel der Bakterien

Listerien sind auf ihrer Oberfläche mit einer Vielzahl von Proteinen bestückt, zu denen auch die so genannten Internaline gehören. Durch den spezifischen Kontakt mit Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche vermitteln diese Proteine die vollständige Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle. Da der Prozess der Aufnahme einer Phagozytose ähnelt, die größere Restrukturierungen des Wirtszellzytoskeletts erfordert, spricht man auch von einer durch die Bakterien induzierten Phagozytose. Internalin A (InlA), das für die Aufnahme der Listerien über das Epithel der Darmzellen verantwortlich ist, wurde im Jahre 1991 entdeckt. Wenig später wurde mit InlB ein dem InlA verwandtes Protein identifiziert, das für die Invasion weiterer Wirtszellen wie Leberzellen und Makrophagen benötigt wird. In der Folge wurden weitere Internalin-ähnliche Proteine identifiziert, die sich zum Großteil ebenfalls auf der Oberfläche der Bakterien befinden, wie das Internalin InlH, dessen genaue Funktion allerdings noch nicht bekannt ist. Obwohl die meisten dieser Proteine nur in pathogenen *Listeria*-Spezies zu finden sind, konnte ihnen noch keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Beim Betrachten der Aminosäuresequenz wird deutlich, dass Proteine der Internalinfamilie durch einen modularen Aufbau homologer Sequenzabschnitte, so genannter Domänen, gekennzeichnet sind. InlA ist mit



● Infektionszyklus von *L. monocytogenes* (blau). Gezeigt ist die Ausbreitung der Bakterien in der Wirtszelle (beigefarben).

800 Aminosäuren der größte Vertreter der Internalinfamilie. N-terminal besitzt es eine kurze Signalsequenz, die den Export der Proteine aus der Zelle ermöglicht. Daran schließen sich zwei Bereiche mit sich wiederholenden Sequenzelementen an, die durch eine „Interrepeat“ (IR)-Sequenz voneinander getrennt sind. Am C-Terminus befindet sich ein kurzes Sequenzmotiv (LPxTG), das für die kovalente Verankerung des Proteins an der Bakterienoberfläche verantwortlich ist, gefolgt von einer hydrophoben, transmembranen α -Helix und einem geladenen cytoplasmatischen Ende. Im reifen Protein fehlen die beiden letzten Abschnitte.



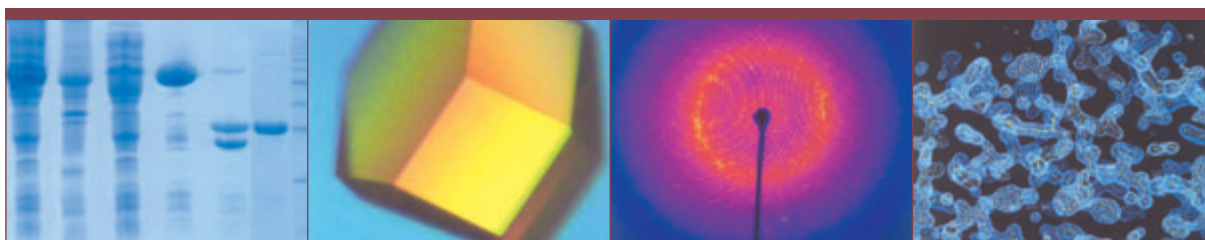
● Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen verschiedener Internaline. Die einzelnen Domänen sind farblich abgegrenzt.

Charakteristischstes Merkmal aller Internaline ist das erste repetitive Sequenzelement, das beim InIA aus 15 Wiederholungseinheiten von exakt 22 Aminosäuren besteht. Die periodische Anhäufung von Leucinen bzw. Leucin-ähnlichen Aminosäuren gibt diesen Wiederholungseinheiten den Namen „Leucine-rich Repeat“ (LRR). Die Konsensus-Sequenz des LRR innerhalb der Internaline lautet xxLxLxxNxLxxLxxLxxLxxL, wobei L und N das Leucin oder andere aliphatische Aminosäuren sowie Asparagin kennzeichnen, x steht für beliebige Aminosäuren. LRR-Domänen findet man sehr häufig bei Proteinen eukaryontischen Ursprungs – durch ihre besonderen strukturellen Eigenschaften sind sie für spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen prädestiniert. In allen Internalinen ist die LRR-Domäne von einer Cap-Sequenz und der IR-Sequenz flankiert, die beide stark konserviert sind. Auch InIB, das aus 630 Aminosäuren besteht, ist an die Bakterienoberfläche assoziiert. Im Gegensatz zum InIA, das mit einem Peptidoglykan-Anker bindet, umfasst die Bindungsdomäne des InIB sämtliche 232 C-terminalen Aminosäuren des Proteins. Und auch N-terminal enthält InIB eine LRR-Sequenz, die aus sieben Wiederholungseinheiten besteht. Invasionsstudien mit verkürzten InIA- und InIB-Proteinen zeigen, dass der Bereich aus Cap-, LRR- und IR-Domänen für die Invasion der Bakterien ausreicht. Sogar Latexkugeln, die mit diesen verkürzten Proteinen beschichtet wurden, werden von Wirtszellen aufgenommen. Diese experimentellen Befunde belegen, dass die Wechselwirkung der Internaline mit Wirtszellrezeptoren über die LRR-Domänen erfolgt.

Humane Internalin-Rezeptoren Im Jahre 1996 wurde das humane E-Cadherin als Rezeptor von InIA identifiziert. Es ist ein Oberflächenprotein des Darmepithels, das für den Zusammenhalt der Darmzellen mit verantwortlich ist. E-Cadherin gehört zur Superfamilie der Cadherine, die sich gegenseitig über homophile Wechselwirkungen auf Nachbarzellen erkennen und damit unter anderem für den Zellzusammenhalt in verschiedenen Geweben mit verantwortlich sind. InIB wechselwirkt spezifisch mit Glycosaminoglycanen und bindet an zwei unterschiedliche Rezeptoren: gC1q-R, ein Protein des Komplementsystems und Met, eine transmembrale Rezeptor-Tyrosinkinase. Gleichzeitig ist Met der Rezeptor für den Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF), der für eine Vielzahl bedeutender physiologischer Vorgänge wie Zellwachstum, Wundheilung und Tumormetastasierung verantwortlich gemacht wird. Met-gesteuerte Signaltransduktionsprozesse betreffen vor allem Reorganisationen des Aktinzytoskeletts. Eine Reihe von Effekten, die HGF verursacht, wie etwa das Loslösen von Zellen aus dem Zellverband, das so genannte „Cell Scattering“, werden ebenfalls durch InIB ausgelöst.

Um die Funktionsweise der Internaline und damit des listeriellen Invasionsprozesses auf atomarer Ebene besser zu verstehen, haben wir uns in den vergangenen vier Jahren in Kooperation mit Trinad Chakraborty (Universität Gießen) und Jürgen Wehland (GBF) mit der 3D-Strukturanalyse der Listerienproteine befasst. Neben den Strukturen der rezeptorbindenden LRR-Domänen von InIA, InIB und dem InIH, dessen Funktion noch nicht bekannt ist, konnten wir kürzlich auch die Struktur des Komplexes zwischen der LRR-Domäne von InIA und der infektionsrelevanten Domäne des humanen Rezeptors E-Cadherin aufklären. Die isoliert betrachteten LRR-Domänen werden im Gegensatz zu den vollständigen Proteinen im Folgenden als InIA', InIB' und InIH' bezeichnet.

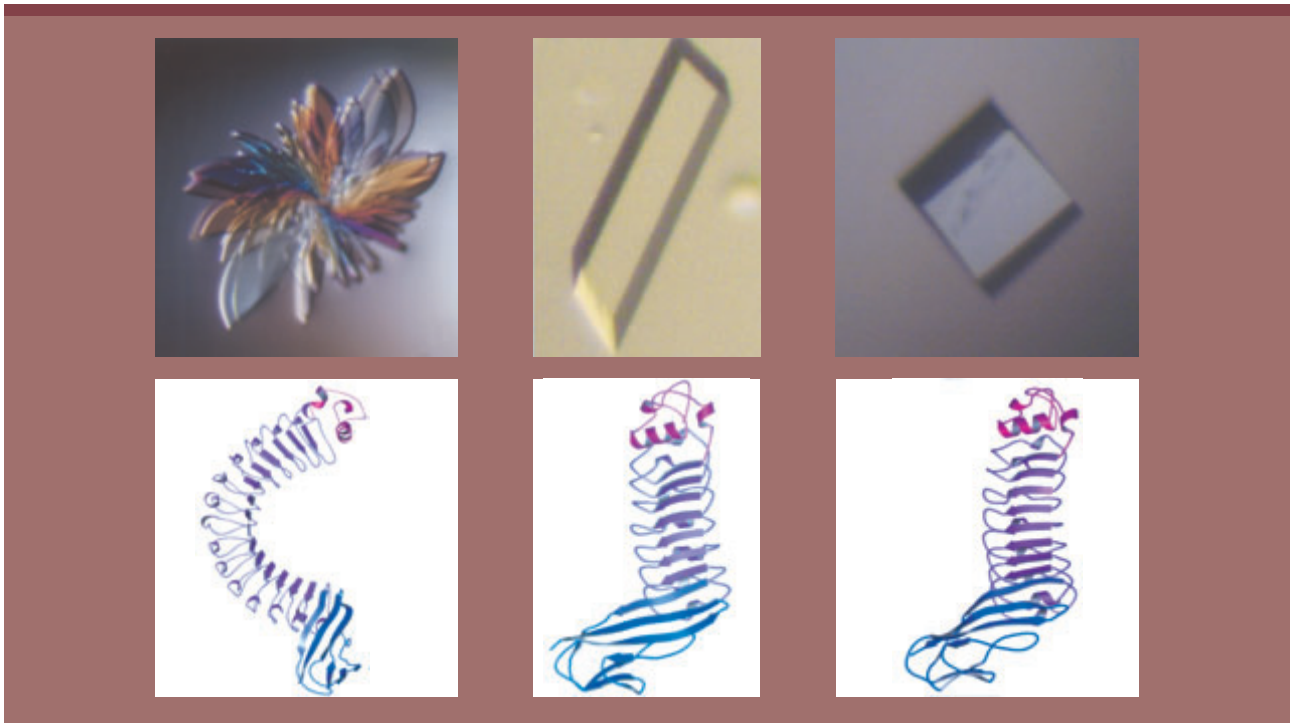
Strukturanalyse von Proteinen Proteine spielen bei nahezu allen Lebensprozessen eine bedeutende Rolle. Dabei ist jedes Protein durch seine charakteristische und räumlich definierte dreidimensionale Struktur für seine physiologische Funktion optimiert. Die Aufklärung der Raumstruktur, also die präzise Lokalisierung der zigtausend Atome im Makromolekül, stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Als Methode der Wahl bei Proteinen mit einer molekularen Masse von über 30 kDa dient die Röntgenstrukturanalyse: Aus besonders reinen und homogenen Proteinlösungen wird zunächst versucht, Kristalle zu erzeugen, in denen die Proteinmoleküle mit hoher Regelmäßigkeit angeordnet sind. Da der Erfolg einer Proteinkristallisation nicht vorhersagbar ist, gestaltet sich dieser Prozess häufig schwierig und zeitaufwändig. Gelingt es, einen Proteinkristall zu erhalten, wird der Kristall unter Drehung gebündelten Röntgenstrahlen ausgesetzt. Von gut geordneten Kristallen entstehen so Röntgenbeugungsbilder mit häufig komplexen Geometrien, aus denen mehr oder weniger schnell die Information zur Berechnung der Atomkoordinaten gewonnen werden kann – je nach Qualität und Größe des Kristalls.



● Vom gereinigten Protein zur Kristallstruktur

Foto: GBF

Kristallstrukturen der Internaline Es ist uns in den vergangenen Jahren gelungen, gut beugende Kristalle von InIA', InIB' und InIH' zu erhalten und ihre Strukturen aufzuklären. Der auf Aminosäuresequenzebene beobachtete modulare Charakter der Internaline setzt sich auch auf der Ebene der 3D-Strukturen der Proteine fort. Die Strukturen von InIB' und InIH' zeigen eine zentrale LRR-Domäne, die von einer kleinen aminoterminalen Cap-Domäne und einer carboxyterminalen Immunoglobulin-ähnlichen Domäne, einer IR-Region, flankiert ist.



- Kristalle und daraus erhaltenen Strukturen von InlA', InlB' und InlH'. Die Strukturen bestehen aus der Cap-Domäne (rosa), LRR-Domäne (violett) und der IR-Domäne (blau) und sind als Bänderdiagramm mit den entsprechenden Sekundärstrukturelementen (Helices, Loops und β -Stränge) dargestellt.

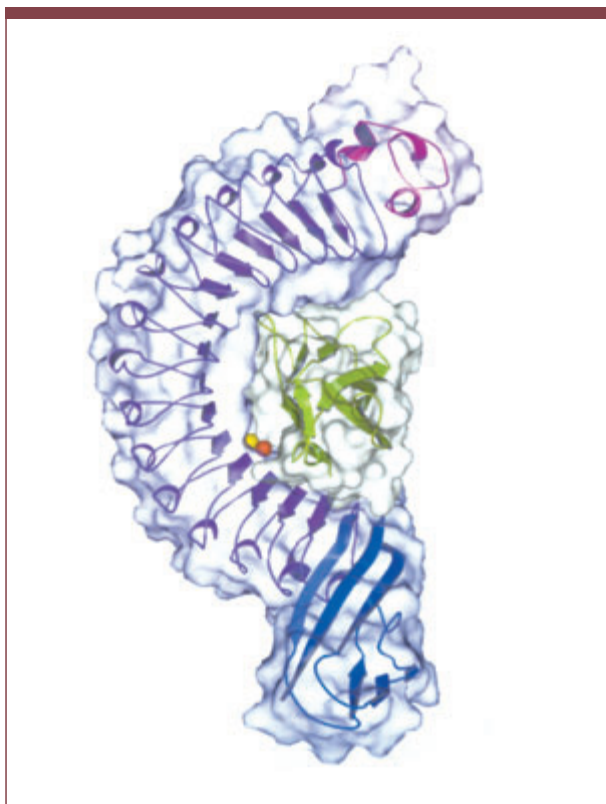
Foto: GBF

Im Fall von InlB' besteht die LRR-Domäne aus sieben Wiederholungseinheiten, diese jeweils aus einem β -Strang und einer eng gewundenen 3_{10} -Helix, die über Schleifen verbunden sind. In der leicht gebogenen Struktur sind die spiralförmig angeordneten Wiederholungseinheiten gestapelt, so dass das parallele β -Faltblatt die innere, konkave Seite des Moleküls definiert und die aufeinanderliegenden Helices die äußere, konvexe Seite. Die Leucine und Leucin-ähnlichen Aminosäuren der LRRs zeigen ins Innere der Spirale und bilden den elongierten hydro-

phoben Kern der Domäne. Sie sind somit für ihre Stabilität verantwortlich. Die benachbarten Cap- und IR-Domänen schirmen diesen hydrophoben Kern gegen die Umgebung ab und tragen damit zur zusätzlichen Stabilisierung der LRR-Domäne bei. Während InlH' mit acht LRRs dem InlB' sehr ähnlich ist, weist InlA' mit 15 LRRs eine weitaus stärker gekrümmte Struktur auf. Die IR-Domäne, die sich an den C-Terminus anschließt, lässt InlA' wie eine Sichel aussehen.

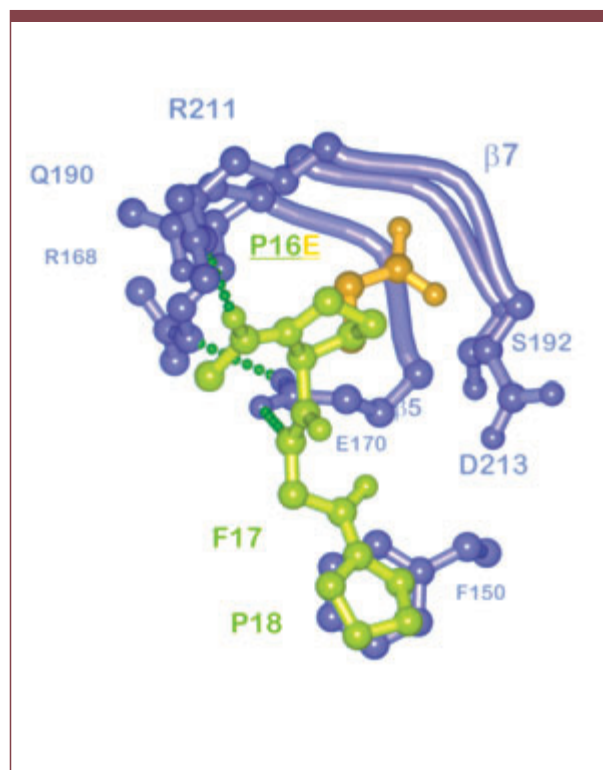
Struktur eines Internalin/Rezeptor-Komplexes

Das Aufklären der Struktur des Komplexes zwischen InlA' und der N-terminalen Domäne des E-Cadherin Rezeptors (hEC1) hat uns kürzlich ermöglicht, den ersten Schritt der Listerieninfektion bei atomarer Auflösung zu beobachten: Die Adhäsion der Bakterien an die menschliche Darmwand.



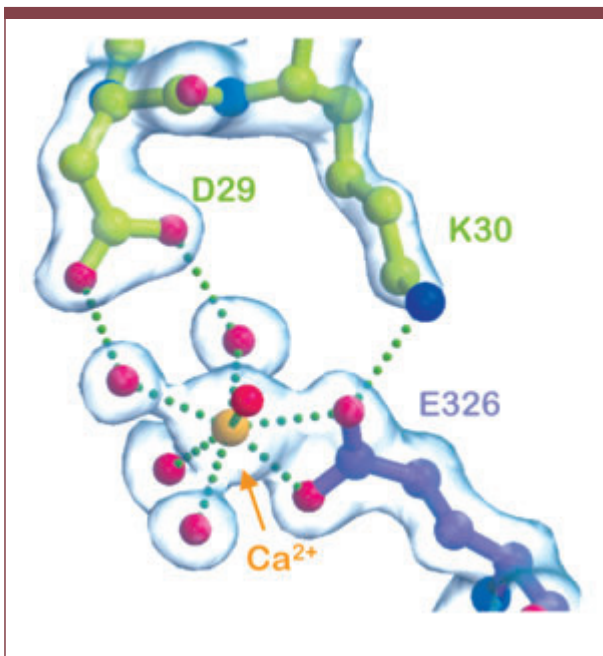
- Struktur des Komplexes aus InlA' und hEC1 (grün). Die Bänderdiagramme sind durch die Oberflächendarstellungen (grau) beider Moleküle unterlegt. Calcium- und Chlorid-Ionen im „Interface“ zwischen beiden Proteinen sind durch Kugeln dargestellt.

Das sichelförmige InlA' umgreift die kleinere hEC1-Domäne nahezu vollständig. Physiologisch sinnvoll ist, dass die C-Termini beider Domänen in entgegengesetzte Richtungen weisen, da nur so der erforderliche enge Kontakt zwischen Wirts- und Bakterienzellen gewährleistet ist. Zahlreiche, vor allem hydrophobe Aminosäuren tragen zur komplementären Erkennung der beiden Proteine bei und die Aminosäuren aus nahezu allen LRRs des InlA' sind an der Wechselwirkung beteiligt. Von besonderem zellbiologischen Interesse ist ein Prolin an Position 16 in hEC1, das passgenau in eine hydrophobe Tasche auf der InlA'-Oberfläche bindet.



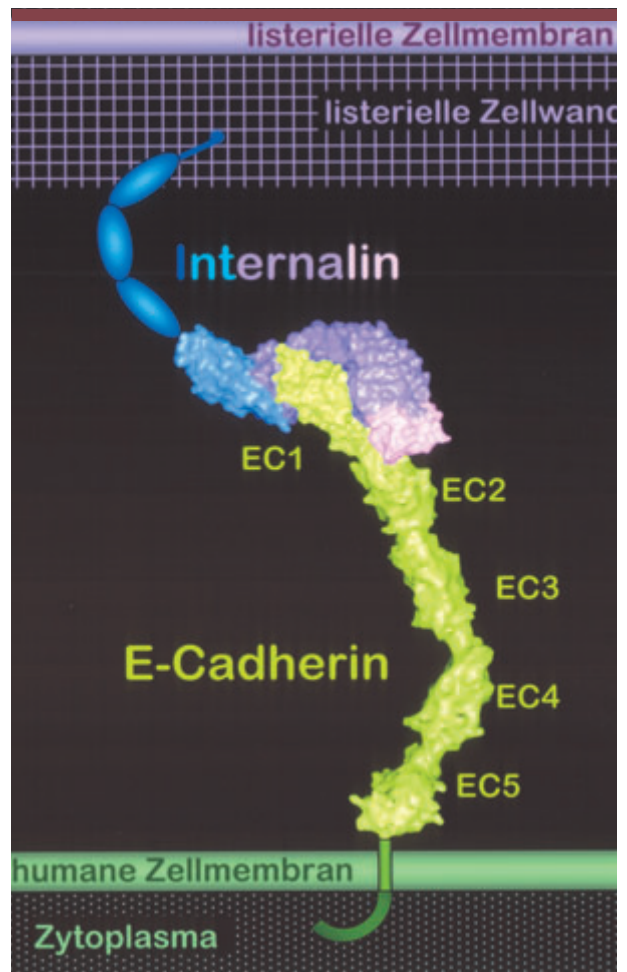
- Wechselwirkung zwischen Prolin 16 von hEC1 (grün) mit InlA' (violett). Gezeigt ist die in silico-Mutation der Aminosäure zu einem Glutamat (entsprechend dem murinen E-Cadherin, gelb), das nicht mehr in die InlA'-Bindetasche passen würde.

In murinem E-Cadherin befindet sich an dieser Stelle ein Glutamat, welches durch seine negative Ladung und Größe nicht mit InlA wechselwirken kann. Die Struktur des Komplexes liefert damit eine eindrucksvolle Erklärung für die Beobachtung, dass Mäuse gegenüber oral verabreichten Listerien unempfindlich sind. Allerdings ist der Komplex aus den beiden Proteinen auffallend schwach. Bindungsstudien mit analytischer Ultrazentrifugation – in Kooperation mit Claus Urbanke, MHH, – zeigen eine Dissoziationskonstante im mikromolaren Bereich. Im Falle von starken Protein-Protein-Komplexen liegen diese Werte meist um Größenordnungen niedriger. Dennoch heften die Bakterien sich an die Wirtszelle. Sie bilden während der Adhäsion nach und nach mehrere Komplexe aus, die sich vermutlich – ähnlich wie bei einem Reißverschluss – in ihrer Bindung unterstützen. Zusätzlich moduliert ein regulatorisches Calciumion an der Kontaktfläche die Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen.



- Die Ca²⁺-Bindestelle im Interface zwischen InlA' (violett) und hEC1 (grün).

Nach der Invasion erleichtert die Dissoziation des Metallions im Cytoplasma der Wirtszelle vermutlich das rasche Ablösen der Bakterien von der Wirtszellmembran, so dass die Bakterien den Infektionsprozess ungehindert fortsetzen können.



- Modell der InlA-vermittelten Adhäsion von *L. monocytogenes* (violett) an das humane Darmepithel (grün). Gezeigt sind die Oberflächendarstellungen der Strukturen von InlA' und der extrazellulären Domänen von E-Cadherin.

Wechselwirkung zwischen InlB und Met Obwohl die Struktur des Komplexes zwischen InlB und Met derzeit noch unbekannt ist, konnten wir kürzlich mit Hilfe von Mutagenese-Studien zeigen, dass die Wechselwirkung zwischen beiden Proteinen über die konkave Oberfläche der LRR-Domäne erfolgt – ähnlich wie beim InlA/E-Cadherin-Komplex. Über die gesamte LRR-Domäne des InlB' erstreckt sich eine Reihe von aromatischen Aminosäuren. Der gezielte Austausch dieser Aromaten gegen polare Aminosäuren hat gezeigt, dass genau diese Aminosäuren für die Invasion von Wirtszellen verantwortlich sind. Das Wissen um die Struktur der Internaline erlaubt daher, die Invasion von Listerien auf einzelne für den Infektionsprozess kritische Aminosäuren zu reduzieren.

Schlussfolgerungen und Perspektiven Wie am Beispiel der Internaline gezeigt, erlaubt die moderne Strukturbio- logie, Angriffstellen für ein gezieltes Eingreifen in Infektionsprozesse zu finden und damit neue Möglichkeiten zur Bekämpfung oder Prävention bakterieller Infektionskrankheiten zu eröffnen. Da die bakteriellen Virulenzfaktoren häufig wirtseigene Prozesse nachahmen oder ausnutzen, können sie auch als Werkzeuge eingesetzt werden, um diese Prozesse genauer zu untersuchen. So ist geplant, auf Basis der Struktur des InlA'/hEC1-Komplexes, InlA'-Varianten mit einer wesentlich höheren Affinität zu E-Cadherin herzustellen. Diese Mutanten könnten anschließend dazu genutzt werden, die Signalkaskade in der Wirtszelle zu untersuchen, die E-Cadherin auslöst. Ein weiterer Ansatz wäre, eine InlA'-Mutante zu entwickeln, die murines E-Cadherin erkennt und damit ein Analysewerkzeug für die intestinale Listerieninfektion im Mausmodell liefert. Da mit Internalinen beschichtete Latexkugeln effizient von Wirtszellen aufgenommen werden, könnten über diesen Ansatz Wirkstoffe gezielt in Zellen, wie etwa Krebszellen, eingeschleust werden.



- *Obere Reihe, von links nach rechts: Joop van den Heuvel, Guido Dieterich, Hartmut Niemann, Wolf-Dieter Schubert, Karsten Bruns, Joachim Reichelt, Ilse Padrock (verdeckt), Detlef Hanisch, Hans-Jürgen Hecht und Dirk Krumme*
Untere Reihe, von links nach rechts: Victor Wray, Rita Getzlaff, Steffi Ehinger, Beate Jaschok-Kentner, Marina Lindemann, Sabine Weißflog, Christel Kakoschke, Daniela Gebauer, Andrea Abrahamik, Susanne Frese, Claudia Hanko, Manfred Nitz und Dirk Heinz.

Foto: Bierstedt

Dirk W. Heinz geboren 1960, Chemiestudium an der Universität Freiburg (1980-1986), Promotion am Biozentrum der Universität Basel (1986-1990), Postdoktorand an der University of Oregon, Eugene, U.S.A. (1990-1993), Habilitand an der Universität Freiburg (1993-1998), Habilitation im Fach Biochemie (1998), Leiter einer selbstständigen Nachwuchsforschergruppe an der GBF (1998-2002), seit 2002 Leiter der Abteilung Strukturbio- logie an der GBF, seit 2003 apl. Professor an der Techni- schen Universität Braunschweig.

DANKSAGUNG *Ich bin allen Mitgliedern meiner Arbeits- gruppe, insbesondere Dr. Wolf-Dieter Schubert, Dr. Matthias Machner, Viola Beier, Thilo Ziehm, Dr. Melanie Barzik und Dr. Hartmut Niemann für ihr unermüdliches Engagement in den vergangenen Jahren zu großem Dank verpflichtet. Darüber hinaus möchte ich meinen langjährigen Kooperationspartnern Prof. Dr. Jürgen Wehland (GBF), Prof. Dr. Trinad Chakraborty und PD Dr. Eugen Domann (Universität Gießen) und Prof. Dr. Claus Urbanke (MHH Hannover) für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.*

LITERATUR Aufgelistet sind neben unseren eigenen Arbeiten zum Thema Listerieninfektion auch ausgewählte weiterführende Publikationen anderer Arbeitsgruppen.

- Moser, J., Gerstel, B., Meyer, J. E. W., Chakraborty, T., Wehland, J. & Heinz, D. W. (1997). Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Mol. Biol.* 273, 269-282.
- Heinz, D. W., Essen, L.-O. & Williams, R. L. (1998). Structural and mechanistic comparison of prokaryotic and eukaryotic phosphoinositide-specific phospholipases C. *J. Mol. Biol.* 275, 635-650.
- Schubert, W.-D., Göbel, G., Diepholz, M., Darji, A., Kloer, D., Hain, T., Chakraborty, T., Wehland, J., Domann, E., Heinz, D.W. (2001) Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J. Mol. Biol.* 312, 783-794.
- Machner, M. P., Urbanke, C., Barzik, M., Otten, S., Sechi, A. S., Wehland, J. & Heinz, D. W. (2001). ActA from the human pathogen *Listeria monocytogenes* is a monomer simultaneously interacting with four Ena/VASP homology 1 domains. *J. Biol. Chem.* 276, 40096-40103.
- Heinz, D. W. (2002). Modellsystem für Infektionen – Pathogene Bakterien auf ihrem unheilvollen Weg verfolgt. *Jahresheft der Helmholtz-Gesellschaft*. pp. 10-11.
- Schubert, W.-D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. & Heinz, D. W. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 111, 825-836.
- Machner, P., Frese, S., Schubert, W.-D., Orian-Rousseau, V., Niemann, H., Wehland, J. & Heinz, D. W. (2003). Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 48, 1525-1536.
- Schubert, W.-D. & Heinz, D.W. (2003). Structural aspects of adhesion and invasion of host cells by the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *ChemBioChem*, im Druck
- Bierne, H., and Cossart, P. (2002) InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci* 115: 3357-3367.
- Boggon, T.J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B.M. and Shapiro, L. (2002). C-Cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanism. *Science* 296, 1308-1313.
- Braun, L., and Cossart, P. (2000) Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* 2: 803-811.
- Cossart, P. and Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17, 3797-3806.
- Daniels, J.J.D., Autenrieth, I.B. and Goebel, W. (2000). Interaction of *Listeria monocytogenes* with the intestinal epithelium. *FEMS Microbiol. Lett.* 190, 323-328.
- Finlay, B.B., and Cossart, P. (1997) Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276: 718-725.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65, 1127-1141.
- Galan, J.E. (2000). Alternative strategies for becoming an insider: Lessons from the bacterial world. *Cell* 103, 363-366.
- Garandeau, C., Réglier-Poupet, H., Dubail, I., Berezzi, J.-L., The European *Listeria* Genome Consortium, Berche, P., Charbit, A., (2002) The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence., *Infect. Immun.* 70, 1382-1390.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., et al. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849-852.
- Glomski, I.J., Gedde, M.M., Tsang, A.W., Swanson, J.A. and Portnoy, D.A. (2002) The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell Biol.* 156, 1029-1038.
- Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725-732.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaikin, M., Gumbiner, B. and Cossart, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J.* 18, 3956-3963.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. and Cossart, P. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292, 1722-1725.
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquieres, R., Cossart, P. and Ghosh, P. (2002). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *EMBO J.* 21, 5623-5634.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M. and Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84, 923-932.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., et al. (1998) Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 28: 81-93.
- Schlech, W. F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31, 770-775.
- Shapiro, L., Fannon, A.M., Kwong, P.D., Thompson, A., Lehmann, M.S., Grubel, G., Legrand, J.F., Als-Nielsen, J., Colman, D.R., Hendrickson, W.A. (1995). Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374, 327-337.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103: 501-510.



Neue verbesserte Impfstoffe zum Schutz vor Krankheiten

AUTOR | Priv.-Doz. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Arbeitsgruppe Impfstoffforschung

● Bedeutung von Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten stellen eine der größten Bedrohungen für die menschliche Gesundheit dar. Etwa ein Drittel aller Todesfälle weltweit sind darauf zurückzuführen. Mikroorganismen sind für mindestens 15 Prozent aller neuen Krebserkrankungen, wie Magen-, Leber- und Gebärmutterhalskrebs verantwortlich. Zudem scheinen sie an der Entstehung vieler chronischer Erkrankungen beteiligt zu sein, wie neurologische und entzündliche Beschwerden sowie Herz- und Gefäßkrankheiten. Außerdem ist bei vielen nicht durch Infektionen ausgelösten Primärerkrankungen wie Traumata und chronischen Lungenleiden die Todesursache letztlich doch eine Infektion. Noch schwieriger wird die Situation durch das Auftauchen neuer Krankheitserreger wie HIV, *Helicobacter pylori*, Hanta-Virus und dem Hepatitis-C-Virus sowie durch das Wiederaufleben von Krankheiten wie Diphtherie und Tuberkulose, welche man bereits zu kontrollieren glaubte. Globale Klimaerwärmung und zunehmende Mobilität sorgen zusätzlich für die Verbreitung tropischer Krankheiten in gemäßigte Klimagebiete hinein. Schließlich sind ältere Menschen und Patienten mit geschwächtem Immunsystem besonders anfällig für opportunistische Erreger.

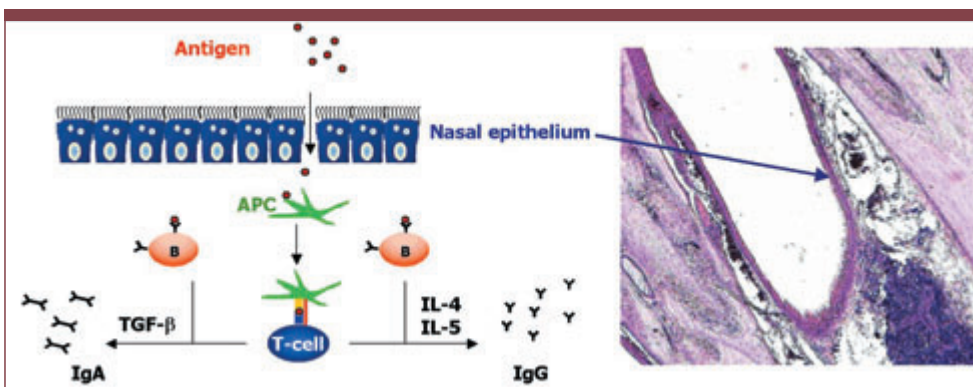
Vorbeugung und Therapie Krankheitsvorsorge und Therapie sind zwei sich ergänzende Ansätze, um Infektionskrankheiten zu bekämpfen. Die Therapie infizierter Patienten wird allerdings erschwert durch sich immer weiter ausbreitende, antibiotikaresistente Erreger. Auf der anderen Seite impliziert ein übermäßiges Vertrauen in die Therapie, dass menschliches Leiden und potenzielle Folgeschäden auf Grund von Krankheiten akzeptiert werden müssen. Dazu kommen die mit der Behandlung verbundenen hohen direkten und indirekten Kosten. Es ist deshalb unumgänglich, die Suche nach prophylaktischen Maßnahmen zur Prävention von Infektionskrankheiten zu verstärken. Die Hauptstrategie bei der Krankheitsprävention ist der Schutz anfälliger Personen und die Verhinderung der Ausbreitung von Erregern: zum einen durch hygienische Maßnahmen, wie die Verbesserung der Wasserqualität, das Vermindern von Reservoirs, in denen sich die Krankheitserreger vermehren können, und die Isolierung infizierter Patienten sowie durch Impfung, die kostengünstigste Möglichkeit.

Obwohl Impfstoffe normalerweise genutzt werden, um das Entstehen von Infektionskrankheiten zu verhindern, nimmt seit kurzem auch das Interesse an therapeutisch wirksamen Impfstoffen zu. Die Stimulation des Immunsystems infizierter Personen durch eine aktive Immunisierung allein oder in Kombination mit konventioneller Therapie kann zu verbesserten Heilungschancen beziehungsweise verkürzten Behandlungszeiten führen. Zudem können Impfstoffe zur Immuntherapie und zur Immunprophylaxe von Krebs und zur Behandlung einer Reihe von nicht-infektiösen chronischen Erkrankungen dienen sowie zur Geburtenkontrolle bei Mensch und Tier eingesetzt werden. Nach wie vor gibt es für viele Krankheiten noch keine Impfstoffe oder sie sind in Bezug auf Wirksamkeit, Stabilität oder Kosten noch nicht ausreichend entwickelt. Deshalb besteht nach wie vor ein dringender Bedarf an neuen und verbesserten Impfstoffen.

Mukosale Impfstoffe Die meisten Krankheitserreger infizieren die Schleimhäute entweder direkt oder müssen sie während der ersten Infektionsschritte durchdringen. Daher ist das Hervorrufen einer lokalen, effizienten Immunantwort als erste Verteidigungslinie notwendig.

Vorteile der mukosalen Vakzinierung

- hohe Akzeptanz
- geringe Nebenwirkungen
- Stimulation sowohl der systemischen als auch der mukosalen Immunantworten
- Verstärkte Blockierung der mikrobiellen Besiedlung
- Verminderung der mikrobiellen Übertragung zu empfindlichen Wirten
- einfache und kostengünstige Applikation



- Mukosale Aktivierung von B-Zellen. Das Antigen wurde von APC aufgenommen, prozessiert und auf MHC-II-Molekülen den T-Zellen präsentiert. Aktivierte T-Zellen unterstützen antigenspezifische B-Zellen und modulieren die induzierte Immunantwort. Die Sekretion von IL-4 und IL-5 führt hierbei zur IgG1-Produktion, wohingegen die Sekretion von TGF- β den Isotypwechsel zu IgA and IgG2b stimuliert. Sekretorische IgA-Proteine spielen durch ihre neutralisierende Wirkung direkt am Penetrationsort des Pathogens eine bedeutende Rolle.

Die Stimulation einer spezifischen Antwort gegen den Krankheitserreger am Ort des Eindringens wird die Besiedlung verhindern und damit auch das Risiko einer weiteren Übertragung auf andere empfängliche Wirte verringern. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Impfstoffe, die über die Schleimhäute appliziert werden, eine natürliche Infektion nachahmen und daher eine effiziente mukosale und systemische Immunabwehr hervorrufen. Impfstoffe, die parenteral verabreicht werden, stimulieren dagegen hauptsächlich eine systemische Immunantwort. Mukosale Impfungen können auch Immunantworten an entfernten Schleimhäuten hervorrufen. Auf der anderen Seite sind Antigene, die über diese Route verabreicht werden, leider meist wenig immunogen. Dies beruht unter anderem auf einer schnellen Degradation durch lokale Enzyme und schlechter Penetration; das lokale Milieu vermittelt zudem Immuntoleranz.

Daher wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Immunogenität von mukosal applizierten Antigenen zu erhöhen: durch ihre Expression in lebenden, attenuierten Bakterien oder viralen Trägern; ihre Inkorporation in physikalische oder biologische Partikel, Liposome, Viro-some oder immunstimulatorische Komplexe, so genannte ISCOMs; ihre Expression in transgenen Pflanzen und ihre Koadministration mit mukosalen Adjuvantien. Jedoch reicht die Antigenverabreichung alleine nicht aus, eine schützende Immunantwort zu erzeugen.

Eine erfolgreiche Immunisierung setzt die Auslösung einer adäquaten Art der Immunantwort voraus, wie etwa Antikörper im Vergleich zu Zell-vermittelter Immunität. Eine erfolgreiche Impfung erfordert daher die Auswahl des geeigneten Antigens wie eine zweckentsprechende Formulierung und Verabreichungsmethode. In diesem Zusammenhang haben neue Studien gezeigt, dass es möglich ist, eine gewünschte Immunantwort auf systemischer und mukosaler Ebene durch die Kombination verschiedener Strategien und Technologieplattformen zu erzeugen, beispielsweise mit dem Verabreichen von Antigenen in so genannten „Prime-Boost“-Impfungsprotokollen.

Lebendimpfstoffe als Antigen-Liefersystem

Sowohl attenuierte als auch kommensale Mikroorganismen wurden bisher als Lebendimpfstoffe und Träger für Vakzinantigene eingesetzt. Für die Nutzung von kommensalen Mikroorganismen spricht ihr ausgezeichnetes Sicherheitsprofil und die Möglichkeit einer langanhaltenden, lokalen Expression des gewünschten Antigens. Auf der anderen Seite sind attenuierte Pathogene sehr attraktiv, da diese gleichzeitig sowohl einen Schutz gegen das Pathogen selbst einführen als auch eine spezifische Immunantwort gegen das heterologe Antigen. Indem Deletionen in Gene eingeführt werden, welche entweder essenziell für den Virulenzprozess oder den bakteriellen Stoffwechsel sind, können Bakterien attenuiert werden.

Durch das Einbringen von unterschiedlichen attenuierenden Deletionen wird das Risiko einer Umkehrung zum virulenten Typ vernachlässigbar gering. Darüber hinaus wurden Mutationen identifiziert, die sogar für immungeschwächte Wirte sicher und verträglich sind. Der Einsatz dieser Bakterien als Antigen-Liefersystem ist mit allen generellen Vorteilen einer mukosalen Immunisierung verbunden. Zusätzliche Vorteile ergeben sich aus den geringen Herstellungskosten, der einfachen Lagerung und Aufrechterhaltung der Kühlkette sowie bei den niedrigen Lieferkosten. All diese Eigenschaften erlauben dieser Immunisierungsstrategie einen effektiveren Einsatz bei Massenimmunisierungen. Dies gilt im besonderen für Entwicklungsländer.

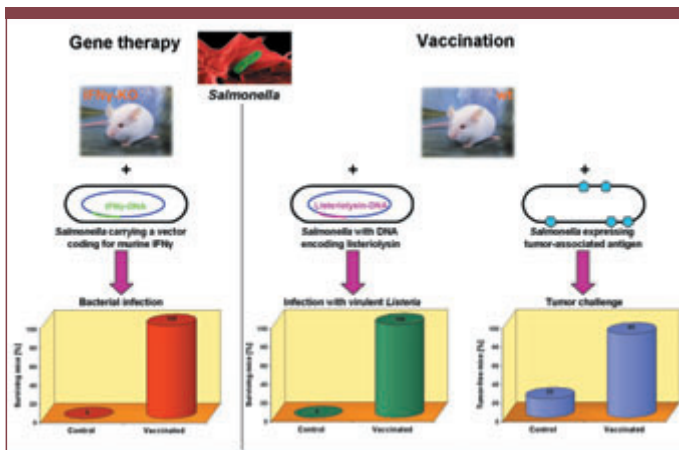
Neueste Studien haben gezeigt, dass diese bakteriellen Vektoren auch für die Lieferung von so genannten DNA-Vakzinen eingesetzt werden können. Statt aufgereinigten Antigenen werden eukaryotische Expressionsvektoren als gereinigte DNA appliziert, die für die ausgewählten Antigene kodieren. Die Zielzellen produzieren dann selbst die Antigene durch ihre Biosynthese. Die bisherige DNA-Immunisierungsstrategie ist jedoch sehr ineffizient, da mehrmalige Gaben und hohe Dosen benötigt werden.

Eigenschaften von Lebendimpfstoffen

- Replikation im Wirt
- limitierte Anzahl von Impfdosen benötigt
- keine Adjuvantien notwendig
- Präsentation über die natürliche Infektionsroute
- Übertragbarkeit auf nicht immunisierte Individuen
- variable Sicherheit bei immungeschwächten Wirten
- einfache Produktion, Transport und Lagerung

Der Einsatz von bakteriellen Vektoren als Antigen-Liefersysteme benötigt keine DNA-Aufreinigungsschritte und erlaubt zusätzlich eine gezielte Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (APC). Darüber hinaus besitzen sie eine Eigenschaft als natürliches Adjuvans. Hierbei spielen die verschiedenen bakteriellen Komponenten wie Zellwand-Degradationsprodukte und unmethylierte DNA eine wichtige Rolle, da diese Komponenten eine unterstützende Wirkung auf die angeborene Immunität und die Reifung der APC durch die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren besitzen. Auf diese Weise wird im lokalen Umfeld die Antigenpräsentation gefördert. Zahlreiche Studien belegen, dass der Einsatz von Bakterien sowohl als Träger von konventionellen Protein-Impfstoffen als auch von DNA-Vakzinen einen effizienten Schutz gegen Infektions- oder Tumorerkrankungen auslöst.

Zusätzlich wurde durch den bakteriell vermittelten Transfer von Genen gezeigt, dass dies eine attraktive Alternative für die Therapie von Erkrankungen ist, da Makrophagen, dendritische Zellen oder Hepatozyten die natürlichen Ziele der bakteriellen Vektoren sind.



- *Attenuierte Salmonella-Stämme als Träger von Protein- oder DNA-basierten Impfstoffen. Nach der oralen Immunisierung von IFN γ -KO-Mäusen mit Salmonella, die ein Plasmid tragen, welches für das murine IFN γ kodiert, waren diese gegen bakterielle Infektionen geschützt. Diese Salmonella-vermittelte DNA-Vakzinierung war darüber hinaus in der Lage einen Schutz gegen eine letale Dosis von Listeria monocytogenes zu stimulieren. Ferner verhinderte die Immunisierung mit Salmonella, die ein Tumor-assoziiertes Antigen exprimierten, nach Gabe eines aggressiven murinen Fibrosarcomas die Tumorentwicklung.*

Physikalische und biologische Partikel Antigene können in physikalischen Partikeln wie Mikrosphären, virusähnlichen Partikeln und bakteriellen „Ghosts“, verpackt werden. Nach der Inkorporation der Antigene, durch Adsorption oder chemischer Bindung zu diesen physikalischen Partikeln, können stärkere Immunantworten induziert werden, indem die Antigene vor Degradation geschützt werden. Dieser Vorgang wird durch die Aufnahme der Partikel durch APC unterstützt.

Rekombinante virusähnliche Teilchen bilden einen neuen Ansatzpunkt der Impfstoffentwicklung. Rekombinante DNA-Methoden erlauben die Anbindung von fremden Epitopen in Proteine mit Multimerisierungskapazität – wie virale Kapside oder Hüllproteine. Diese fördern durch ihre hohen symmetrischen Strukturen und immunologischen Wirkungen die Stimulation von humoralen und zellulären Immunantworten gegen die fremden Epitope.

Einen besonderen Typ von Partikeln stellen die sogenannten „bakteriellen Ghosts“ dar. Diese werden durch die kontrollierte Expression des PhiX174-Gens E in Gram-negativen Bakterien erzeugt. Das Protein bildet Trans-Membran-Tunnel durch die Zellhülle. Bakterielle Ghosts besitzen zwar intakte Hüllstrukturen, zeigen aber einen kompletten Verlust des Zytoplasmas. Die Ghostpartikel werden spezifisch von APC erkannt und aufgenommen. Strukturelle Komponenten – der Ghostpartikel als potente Gefahrensignale – lassen die APC reifen. Ghosts können nicht nur als Impfstoffe, sondern darüber hinaus auch als Antigen-Liefersysteme eingesetzt werden, da sie direkt mit Antigenen beladen oder rekombinante Antigene vor der Lyse exprimiert werden können.

Liposome, ISCOMs und Virosome Liposome sind bereits vielfach als Antigen-Liefersysteme verwendet worden. Liposome sind Mizellen, die sich bilden, wenn man Phospholipide mit Wasser mischt. Dabei schließen die Mizellen das in der wässrigen Phase gelöste Antigen ein und schützen es gegen Degradation. Somit wirken Liposome auch als Adjuvantien. ISCOMs bestehen aus Cholesterol, Lipiden, Immunogenen und Saponinen. Sie übernehmen die gleichen Funktionen wie Liposome sowohl bei parenteraler als auch mukosaler Vakzinierung. Virosome sind unilamellare Vesikel aus leeren Influenza-Virushüllen ohne virales Erbgut. Sie besitzen die funktionalen viralen Glykoproteine, die sowohl MHC-I- als auch MHC-II-Immunantworten stimulieren. Nach Phagozytose der Virosomen verändert sich in den Endosomen durch Ansäuerung die Konformation des Hämagglutinins. Dies löst die Membranfusion und Freisetzung der Virosome ins Zytoplasma aus. Antigene, die an virosomalen Oberflächen sitzen, werden in den APC-Endosomen teilweise verdaut, so dass die Antigene auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Die Antigene von Virosomen, die durch Membranfusion aus den Phagosomen in das Zytoplasma gelangt sind, werden auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Virosome schützen Antigene vor verfrühter Degradation, bilden einen Depot-Effekt und besitzen eine hochrepetitive virusähnliche Struktur, die selbst stimulierend auf das Immunsystem wirkt.

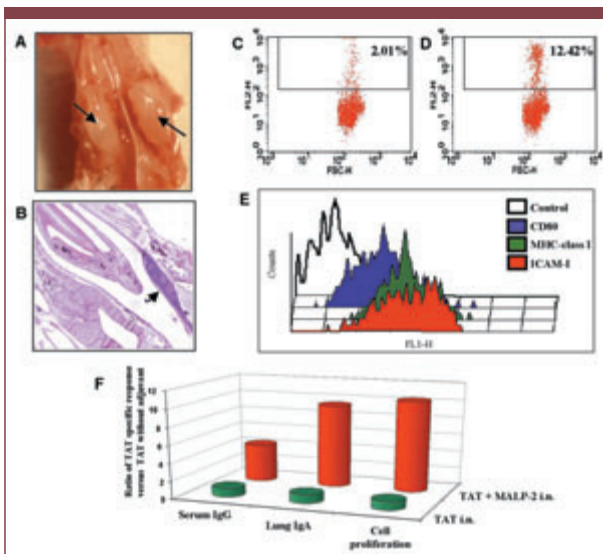
Transgene Pflanzen Die Gentechnologie hat das Einbringen einer Vielzahl unterschiedlicher Gene in Pflanzen ermöglicht. Impfantigene in Nahrungsmitteln wie Bananen und Kartoffeln ermöglichen die Aufnahme durch den Verzehr rekombinanter Pflanzen. In Getreide exprimierte Vakzinantigene erweitern die Anwendung auf die Veterinärmedizin und erleichtern die Lagerung und Konservierung. Interessanterweise kann diese Strategie zur Entwicklung immun-kontrazeptiver Impfstoffe für Pflanzenfresser verwendet werden.



Mukosale Adjuvantien Eine andere Methode, um eine effiziente Schleimhautimmunantwort zu stimulieren, basiert auf dem Einsatz mukosaler Adjuvantien. Zum einen können Antigene einfach mit Adjuvantien gemischt und dann verabreicht werden. Alternativ kann das Adjuvans auch kovalent mit dem Antigen verbunden werden. In diesem Fall agiert das Adjuvans als Träger und stabilisierender Anteil. Mukosale Adjuvantien können darüber hinaus mit anderen mukosalen Liefersystemen wie Lebend-Vektoren, physikalischen Partikeln oder Liposomen kombiniert werden. Einen aufregenden Forschungsansatz stellt die Entwicklung von chimären Molekülen dar, bei dem Anteile verschiedener Adjuvans- und Zielstrukturen kombiniert werden. Diese Vorgehensweise steigert dramatisch die Kapazität verschiedener Antigen-Liefersysteme, auf die Immunantwort modulierend einzuwirken. Bakterielle Toxine wie das Cholera-Toxin oder *Escherichia coli* hitze-labiles Toxin und ihre Derivate waren die ersten Moleküle, die zu diesem Zweck eingesetzt wurden – allerdings durch ihre Toxizität stark eingeschränkt. Daher wurden ungiftige Derivate entwickelt, die dennoch die Eigenschaften eines Adjuvans aufweisen. Auch mehrere Komponenten von Gram-positiven und -negativen Bakterien wurden als Adjuvantien verwendet.

Unter ihnen das nichttoxische Lipopolysaccharid-Derivat Monophosphoryl Lipid A, welches sehr starke immunstimulatorische Eigenschaften besitzt sowie die Muramyl-dipeptid-Derivate MDP-Lys¹⁸ und N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl-Dipeptid, die eine verbesserte Bioverfügbarkeit und verminderte Toxizität aufweisen.

Wir haben kürzlich gezeigt, dass das von *Mycoplasma fermentans* abstammende synthetische Makrophagen aktivierende Lipopeptid 2 (MALP-2) zelluläre und humorale Immunantworten gegen Antigene sehr effizient verstärken kann – wenn diese entweder über die parenterale oder die Schleimhautroute zusammen mit MALP-2 verabreicht werden. Wenn MALP-2 intranasal verabreicht wird, führt es zu einer Rekrutierung und Reifung von APC auf der Ebene des nasal assoziierten lymphatischen Gewebes.



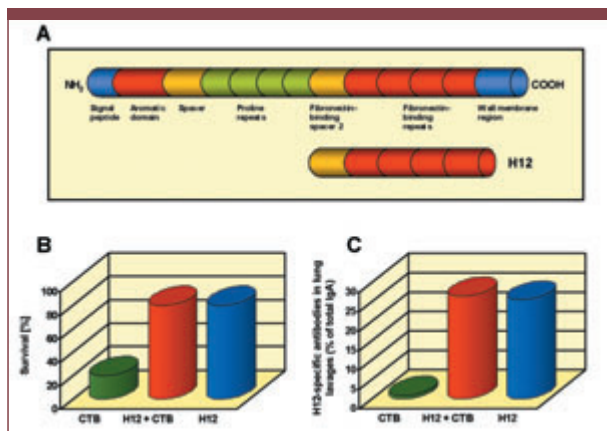
- Effiziente Stimulierung des nasal-assoziierten lymphoiden Gewebes (NALT) durch den Einsatz von MALP-2 als mukosales Adjuvans. (A) Freigelegtes NALT-Gewebe (Pfeile) in der Nasenhöhle und (B) Haematoxylin-Eosin-Färbung von NALT-Gefrierschnitten bei einer Vergrößerung von 2,5x. (D) Durchflusszytometrische Analyse von Makrophagen 16 h nach intranasaler Administration mit MALP-2 zeigt eine Rekrutierung von 12,42% MAC-1-positiven Zellen im Vergleich zu 2,01% bei den Kontrollen (C). (E) Dabei weisen die Makrophagen eine Hochregulation der Expression von MHC-I-, kostimulatorischen- (CD80) und Adhäsions-Molekülen (CD54) auf. (F) Die lokale Rekrutierung und Aktivierung von APC resultiert in einer verbesserten Immunantwort gegen gleichzeitig verabreichte Impfstoffantigene. Signifikant verbesserte zelluläre und humorale (sowohl systemisch und mukosal) Immunantworten gegen das HIV-1-Tat-Protein wurden nach der intranasalen Immunisierung mit MALP-2 nachgewiesen. Die Resultate sind hierbei als Verhältnis der Messwerte von mit TAT + MALP-2 gegen TAT immunisierte Mäuse dargestellt.

Nasale Impfungen mit dem HIV-1-Tat-Protein – zusammen mit MALP-2 verabreicht – konnten eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort auf systemischer Ebene auslösen. Zudem wurden sehr effektiv Tat-spezifische Schleimhautimmunantworten sowohl an der Impfstelle als auch in entfernteren Schleimhautregionen wie dem Urogenitaltrakt ausgelöst. Dies zeugt von einer effizienten Wanderung und Ansiedlung aktivierter B-Zellen.

Unmethylierte CpG-Motive, die normalerweise nicht in Säugetier-DNA vorkommen, haben auch direkte immunstimulatorische Effekte auf Immunzellen. Viele Basenkombinationen mit stimulatorischer Aktivität verbessern die Immunantwort durch Impfung über die Schleimhäute oder die parenterale Route. Auch einige antivirale Wirkstoffe wie Imidazoquinoline sind in der Lage, die Immunantwort zu verstärken. Ein Molekül, das durch die Vernetzung des L-alanine-D-isoglutamin-Restes von Muramyl-dipeptid mit Adamantylamid-dipeptid entsteht, stellt ein weiteres effizientes mukosales Adjuvans mit einem angemessenen Sicherheitsprofil für den Gebrauch beim Menschen dar.

Wir haben kürzlich gezeigt, dass das Fibronectin-bindende Protein SfbI von *Streptococcus pyogenes* ein effizientes Schleimhautadjuvans ist. Es ist in der Lage, die zellulären und humoralen sowie Schleimhaut-Immunantworten erheblich zu verbessern, wenn es zusammen mit einem Antigen verabreicht oder an dieses gebunden wird. Obwohl der Gebrauch dieses Moleküls eine dominante Th2-Antwort fördert, wurden auch zytotoxische T-Lymphozyten stimuliert. Funktionsstudien zeigen, dass SfbI die antigenpräsentierenden Zellen aktiviert und reifen lässt. Damit erfolgt die Adjuvanswirkung über die Fibronectin-bindenden Domänen von SfbI. Dieses interessante Molekül ist auch ein viel versprechender Kandidat für ein Impfstoffantigen, denn immunisierte Mäuse sind gegen eine letale Dosis von virulenten *S. pyogenes* Bakterien geschützt. Die Koadministration eines mukosalen Adjuvans ist nicht nötig.

Deshalb ist dieser Impfstoffkandidat mit gleichzeitiger Adjuvans-eigenschaft ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung von Multikomponentenimpfstoffen gegen *S. pyogenes*.



- *Fibronektin-bindendes Protein I (SfbI): Viel versprechender Impfstoffkandidat mit Adjuvans-Wirkung gegen S. pyogenes. (A) Schematische Struktur des SfbI-Proteins und dem rekombinanten H12-Derivat. (B) Die intranasale Immunisierung von Mäusen mit dem H12-Fragment in der An- oder Abwesenheit von CTB zeigten einen Schutz gegen eine letale Dosis mit einem virulenten S. pyogenes-Stamm. (C) Stimulation einer effizienten SfbI-spezifischen mukosalen IgA Immunantwort bei Mäusen, die mit dem SfbI-H12-Fragment, allein oder mit CTB als mukosales Adjuvans immunisiert wurden.*



- *Faiza Rharbaoui, Thomas Ebensen, Claudia Link, Karina Watzke, Elena Reinhard, Urte Jäger, Kai Schulze, Carola de Domenico, Pablo Becker, Carlos A. Guzmán, Lothar H. Staendner, Axel Fey, Stefan Borsutzky und Karin-Heide Planck-Schumacher. (von links nach rechts)*

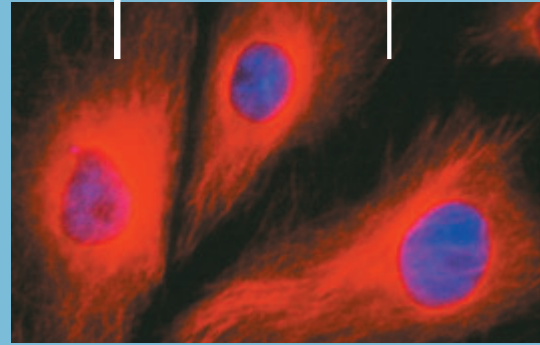
Foto: Schulze, GBF

Ausblick Die Entwicklung und Anwendung von Impfstoffen ermöglicht es, humane Erkrankungen effizient zu bekämpfen und damit zu kontrollieren. Trotz ihrer Effektivität wurde die erste Impfstoff-Generation durch empirische Basisdaten entwickelt. Die in den letzten Jahren gewonnenen wissenschaftlichen Erkenntnisse in der mikrobiellen Pathogenese, Immunologie und Vakzino-logie haben die Entwicklung einer neuen Generation eindeutig definierter und damit verbesserter Impfstoffe erleichtert. Diese neuen Impfstoffe haben ein optimiertes Sicherheitsprofil und höhere Effektivität. Neue Antigen-Liefersysteme, Adjuvantien und Impfstoffstrategien ermöglichen zudem eine Feineinstellung der Immunantworten. Das Verabreichen von Impfstoffen über die Schleimhäute wird die Akzeptanz in der Bevölkerung verbessern. Die Stimulation der mukosalen Immunantworten blockiert zusätzlich sehr früh den Infektionsvorgang, da der mikrobielle Übertragungszyklus zum Wirt unterbrochen wird. Diese Entwicklungen werden eine Schlüsselrolle für eine effiziente Krankheitsprävention beim Menschen spielen.

Carlos A. Guzman geboren 1959, Studium der Medizin (1976-1981, National University Rosario, Argentinien), Facharzt für Bakteriologie (1982-1986), Promotion in Medizin und Chirurgie (Universität Genua, Italien), Staatsexamen (1989, School of Medicine and Surgery, Universität Genua, Italien), Promotion in Mikrobiologie (1990-1993, Universität Genua, Italien), seit 1994 Leiter der Arbeitsgruppe Impfstoffforschung an der GBF, 2000 Habilitation für das Fach Medizinische Mikrobiologie an der Medizinischen Hochschule Hannover.

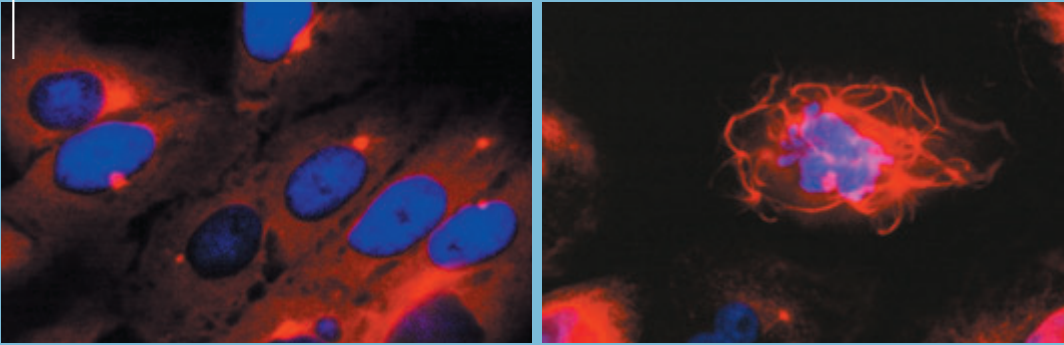
ERGEBNISBERICHT

FOKUS BERICHTE AUS DER FORSCHUNG



Mikrotubuli (rot) bilden einen Teil des Cytoskeletts der Zelle (li). Die in Myxobakterien gefundenen Tubulysine bewirken einen Abbau dieser Mikrotubuli (mi). Durch chemische Modifikation sollen solche Verbindungen gefunden werden, die gezielt die Mikrotubuli sich teilender Zellen treffen. Dies führt zur Ausbildung eines abnormalen Spindelapparats (re), wodurch eine Teilung von Krebszellen verhindert wird (Zellkerne und Chromosomen blau gefärbt).

Fotos: GBF



40	INFEKTION UND IMMUNITÄT
71	VERGLEICHENDE GENOMFORSCHUNG
78	NACHHALTIGE NUTZUNG VON LANDSCHAFTEN
83	PLATTFORMEN
88	BIOVERFAHRENSTECHNIK
92	VERÖFFENTLICHUNGEN



Programm „Infektion und Immunität“

PROGRAMMSPRECHER | Prof. Dr. Jürgen Wehland | Abteilung Zellbiologie

- „Der Kampf gegen Infektionskrankheiten ist gewonnen“. Diese Äußerung des amerikanischen obersten Sanitätsoffiziers General William H. Stewart spiegelte 1962 die Auffassung der Gesundheitsbehörden und der Öffentlichkeit über den medizinischen Stellenwert von Infektionskrankheiten nur zu gut wider. Man war der festen Überzeugung, dass Infektionskrankheiten keine Bedrohung mehr darstellten – anders als zu Beginn des Jahrhunderts. Mit der Entwicklung von Antibiotika und Impfstoffen errang die medizinische Forschung einen ihrer größten Erfolge. Das Beherrschen von Kinderlähmung, Masern und Pocken schuf eine Atmosphäre der Sicherheit. Das führte zwangsläufig dazu, dass die medizinische Forschung und ebenso die öffentliche Meinung diesem Gebiet kaum noch Beachtung schenkten. Zudem investierte die pharmazeutische Industrie kaum mehr in die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe und Impfstoffe. Deutschland, einst führend in der Impfstoffentwicklung, schränkte die industriellen Aktivitäten auf diesem Gebiet stark ein.

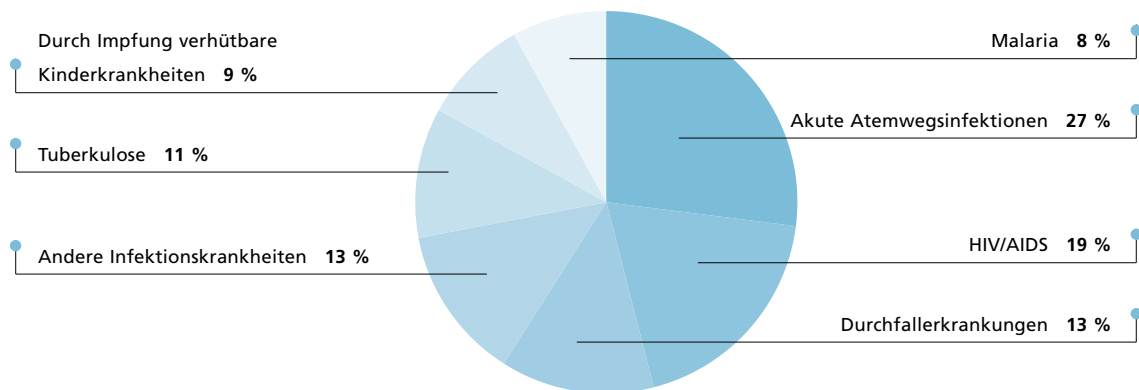


- Untersuchungen zu Infektionskrankheiten: Halsabstrich bei einem Mädchen aus Indien

Foto: Gazlig, GBF

Alarmierende Entwicklungen Inzwischen hat ein Paradigmenwechsel stattgefunden. Mehr als 17 Millionen Menschen sterben weltweit jedes Jahr als Folge von Infektionskrankheiten – ein Drittel aller krankheitsbedingten Todesfälle. Obwohl Entwicklungsländer am stärksten betroffen sind, stellen Infektionskrankheiten inzwischen auch ein zunehmendes Problem für die Industrienationen dar. Neu auftretende Infektionen wie HIV und SARS haben verheerende Folgen und werden durch den weltweiten Austausch von Blutprodukten und interkontinentale Reiseaktivitäten schnell verbreitet. Umweltbedingte Einflüsse oder Änderungen in der Verarbeitung von Nahrungsmitteln in den Industrienationen begünstigen das Auftreten neuer infektiöser Agenzien, wie das Beispiel BSE sehr deutlich zeigt. Zunehmende Antibiotikaresistenzen lassen viele Infektionskrankheiten wiederaufleben, die bislang als besiegt galten. Gegen alle verfügbaren Wirkstoffe können Erreger in der Regel Multiresistenzen entwickeln, wie im Fall von Tuberkulose und Malaria sehr deutlich wird.

Todesfälle durch infektiöse Krankheiten, 2001



Nach WHO-Report 2002

Darüber hinaus stellen opportunistische Infektionen ein erhebliches Problem für immunsupprimierte Personen und für die ältere Bevölkerungsschicht dar. Trotz dieser mehr als alarmierenden Entwicklungen sind die Möglichkeiten für die Etablierung neuer Diagnostika und effektiver therapeutischer Strategien besser als je zuvor. Die systematische Genomanalyse kann Informationen über potenzielle Wirkstoffziele bezüglich der Entwicklung neuer Antibiotika liefern. Ein detaillierteres Verständnis der Funktionen individueller Gene bildet die Grundlage für die gezielte Entwicklung chemotherapeutischer Ansätze – insbesondere die Interaktionen zwischen mikrobiellen und Wirtszellgenen. Die funktionelle Genomanalyse eröffnet auch die Möglichkeit, molekulare Mechanismen von Immunreaktionen und die genetische Suszeptibilität von Infektionskrankheiten besser zu verstehen. Unsere Kenntnis der molekularen und zellulären Bestandteile des Immunsystems ermöglicht es zudem, Immuntherapien einzusetzen, die weit über die Prophylaxe hinausgehen und therapeutische Interventionen einschließen.

Unser heutiges Verständnis des Immunsystems geht weit über dessen protektive Funktionen bei Infektionskrankheiten hinaus. So schützt es den Wirtsorganismus nicht nur gegen Mikroorganismen, sondern ist auch darauf spezialisiert, veränderte zelluläre Antigene zu detektieren. Wir verstehen hingegen kaum, wie bestimmte Mikroorganismen das Immunsystem unterwandern oder umgehen. Latente Infektionen sind die Folge.

Infektion und Immunität Im GBF-Forschungsprogramm „Infektion und Immunität“ liegt der Schwerpunkt der Grundlagenforschung auf Infektionsmechanismen und Immunität. Gerade die Schnittstelle dieser Arbeitsgebiete stellt ein sehr großes Potenzial für die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Strategien für die Prävention und Behandlung von Infektionskrankheiten dar.

Das Ziel des Programms ist, essenzielle Mechanismen der Entstehung und Entwicklung von Infektionskrankheiten zu verstehen. Dazu werden nicht nur Modell-Mikroorganismen und ihr Pathogenitätsverhalten untersucht, sondern auch detailliert immunologisch analysiert. Die individuellen molekularen und zellulären Schritte im Verlauf eines Infektionsprozesses sollen aufgeklärt werden, ebenso wie die Mechanismen, die bestimmte Mikroorganismen entwickeln, um Krankheiten zu verursachen. Ferner wollen wir detaillierte Einblicke in die grundlegenden Abwehrmechanismen gewinnen, die es dem Wirtsorganismus ermöglichen, Infektionen zu kontrollieren und zu eliminieren.

Die Themenbereiche des Forschungsprogramms

- Mikroorganismen
- Pathogenese
- Immunbiologie
- Prävention und Therapie





Topic 01 – Mikroorganismen

TOPICSPRECHER | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

- Mikrobielle Infektionen gehören zu den Hauptursachen menschlicher Krankheiten. In diesem Forschungsthema geht es um die molekulare Analyse von Mikroorganismen mit dem Ziel, bakterielle Virulenzfaktoren zu identifizieren und zu charakterisieren sowie ihre Struktur zu bestimmen. Der Hauptfokus liegt auf pathogenen Streptokokken sowie Listerien. Ebenfalls Thema dieses Topics: Die Genomanalyse des probiotischen *E.coli*-Stamms Nissle 1917 und Myxobakterien als bakterielle Wirkstoffproduzenten.

Streptokokken der Gruppe A verursachen ein breites Spektrum an Krankheiten. Dazu gehören Invasions- und Folgekrankheiten wie rheumatische Herzbeschwerden. Pneumokokken verursachen verhältnismäßig harmlose Krankheiten wie *Otitis media*, aber auch lebensbedrohliche wie Pneumonien und Meningitis. Vergleichende Genom/Proteom-Studien und Expressions-Profile werden genutzt, um Kandidatengene zu identifizieren, die für Virulenzfaktoren in pathogenen Streptokokken kodieren. Gene, die nur in bestimmten Subpopulationen vorhanden sind, können mit spezifischen klinischen Darstellungen assoziiert werden. Besonderes Augenmerk wird der Identifikation potenzieller Streptokokkenrheumatismusfaktoren sowie bakterieller Eiweiße gewidmet, die mit der extrazellulären Matrix interagieren oder die an der bakteriellen Adhäsion und Invasion sowie dem intrazellulären Überleben beteiligt sind. Zudem sollen die Proteine identifiziert werden, die eine wesentliche Rolle für das Überleben und die Beweglichkeit der pathogenen Bakterien in der Zelle spielen ebenso wie für ihre Verbreitung von Zelle zu Zelle. Anhand des Modellsystems *Listeria monocytogenes* sollen in einem ersten Schritt Änderungen im Expressionsmuster und post-translationale Modifikationen von Membranproteinen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen charakterisiert werden.

Ebenfalls Teil des Topics ist die vollständige Genomanalyse und anschließende Annotation des *E. coli*-Stamms Nissle 1917. Der Vergleich der Nissle-Genomsequenz mit veröffentlichten Sequenzen pathogener *E. coli*-Stämme wird zum Verständnis der molekularen Grundlagen der probiotischen Aktivität des Stamms beitragen.

Die räumliche Struktur von Kandidaten, die als Virulenzfaktoren oder als potenzielle Ziele für Wirkstoffe bestätigt werden, wird mittels Röntgen-Kristallographie und NMR genauer untersucht. Die Beschreibung der räumlichen Struktur dieser Proteine oder relevanter Wirt-Pathogen-Proteinkomplexe soll die Gestaltung von Molekülen ermöglichen, die die spezifische Funktion der Proteine oder Komplexe stören und damit die Basis für die klinische Entwicklung neuer Therapeutika bilden.





01.1 Genetische Variabilität bei Streptokokken

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. G. Singh Chhatwal | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Manfred Rohde | Dr. Rebecca Towers | Patricia Wegmeyer

Streptokokken zeigen eine große genetische Variabilität in den Genen, die für die Virulenzfaktoren kodieren. Gleichzeitig sind sie in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Krankheiten beim Menschen zu verursachen. Ziel dieses Projekts ist es, die genetische Variabilität bei Streptokokken zu untersuchen, um deren Bedeutung im Infektionsprozess und bei verschiedenen Nachfolgeerkrankungen wie dem rheumatischen Fieber festzustellen. Das Streptokokken-Fibronektin-Bindungsprotein SfbI – auch als Protein F1 bekannt – spielt eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung der Streptokokken im Wirt und ist ein wichtiger Virulenzfaktor. Dieses Protein ist auf der äußeren Bakterienmembran exponiert und essenziell für die Anheftung der Bakterien an die Wirtszelle. Vergleichende genetische Untersuchungen zeigen, dass dieser Genlokus viele „Rearrangements“ aufweist. Damit ist naheliegend, dass an dieser Stelle ein häufiger Genaustausch stattfindet.

Evolution des SfbI Um die Mechanismen in der Evolution von SfbI zu untersuchen, wurde das Gen aus 54 unterschiedlichen Streptokokken-Stämmen sequenziert. Dabei wurden insgesamt 35 unterschiedliche Allele identifiziert. Drei Hauptmechanismen scheinen in der Evolution von SfbI eine Rolle zu spielen: Die N-terminale aromatische Domäne ist die am stärksten variable Region. Sie ist durch die intergenische Rekombination von horizontal erworbener DNA zustande gekommen. Variationen in der prolinreichen Region sind durch Punktmutationen entstanden und zeigen zwei unterschiedliche Sequenztypen, die nur fünf Prozent Homologie aufweisen. Die beobachtete Variabilität am 3'-Ende des Gens ist das Ergebnis der Deletion oder Duplikation der repetitiven Einheiten. Die Antigen- und funktionelle Variabilität in SfbI deutet auf einen signifikanten selektiven *in vivo* Druck hin und hat damit direkte Konsequenzen für die Pathogenese von *Streptococcus pyogenes*.



- Kleine Streptokokken ganz groß - Dr. Manfred Rohde und Prof. Singh Chhatwal analysieren die Wechselwirkung zwischen Streptokokken und menschlichen Zellen mittels Elektronenmikroskopie

Foto: Bierstedt



01.2 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

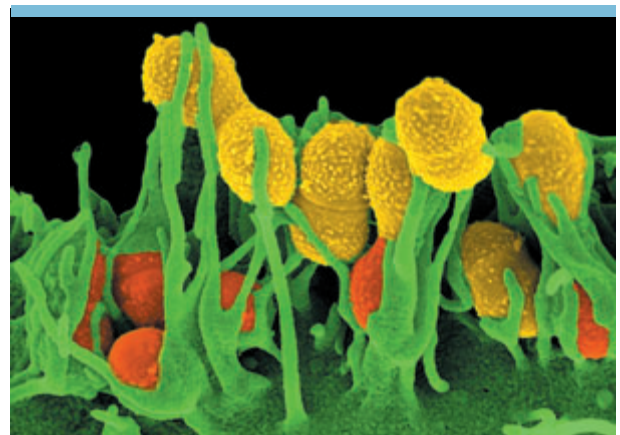
PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Sven Hammerschmidt* | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Simone Bergmann | Dagmar Bracht | Christine Elm

Das Anheften und die Invasion von *Streptococcus pneumoniae* sind wichtige Schritte im Infektionsprozess dieses pathogenen Bakteriums – und über diese Vorgänge ist bisher noch wenig bekannt. Mit der Identifizierung von Pneumokokken-Adhäsinen konnten wir wesentlich zum Verständnis der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung beitragen. Diese Adhäsine binden zelluläre Proteine wie den sezernierten poly-Immunglobulin Rezeptor pIgR, Laktoferrin, Plasminogen und Fibronektin. Dass Gram-positive Bakterien mit Proteinen der Wirtsmatrix interagieren ist typisch für den Vorgang des Anheftens und der anschließenden Invasion.

Der Weg in die Zelle Die Pneumokokken binden polymerische Immunglobulinrezeptoren (pIgR) in der Schleimhaut über das bakterielle Adhäsin SpsA. Diese Rezeptoren werden an der baso-lateralen Oberfläche von Zellen der Mukosa exprimiert. Dort binden sie polymere Immunglobulinkomplexe, die dann zur apikalen Seite des Epithels transportiert werden. Im Adhäsin SpsA wurde eine Hexapeptid-Struktur als Bindungsmotiv an den Rezeptor identifiziert. Dieses Motiv ist essenziell für die Wechselwirkung zwischen Pneumokokken und den receptorexprimierenden Zellen. Das konnte durch Experimente mit Bakterien bestätigt werden, die im SpsA-Protein mutiert sind.

Eine andere Strategie, mit der bakterielle Krankheitserreger die Schleimhaut- und die Blut-Hirn-Schranke überwinden, ist das Aktivieren proteolytischer Funktionen des Wirtes. Pneumokokken sind in der Lage, in das Gewebe einzudringen, indem sie Plasminogen binden und zu Plasmin aktivieren. Unsere Arbeiten konnten zeigen, dass die an der Oberfläche von Streptokokken liegende α -Enolase (Eno) ein solcher Rezeptor für Plasminogen ist. Weitere Bindungsanalysen zeigten ein neuartiges internes Bindungsmotiv in Eno für die Bindung an Plasminogen. *In vitro*- und *in vivo*-Versuche bestätigten die Bedeutung dieses Motivs für die Virulenz von Pneumokokken.



- Anheftung und Invasion der Streptokokken in menschliche Schleimhautzellen. Die angehefteten Streptokokken sind in gelb dargestellt, die roten Streptokokken sind gerade dabei, in die Zelle einzudringen. Die Anheftung und Invasion der Streptokokken spielt eine große Rolle bei Streptokokkeninfektionen.

Foto: Rohde, GBF

* neue Anschrift:
Zentrum für Infektionsforschung
Universität Würzburg
Röntgenring 11
97070 Würzburg



01.3 Identifizierung und Charakterisierung bakterieller Virulenzfaktoren

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jürgen Wehland | Abteilung Zellbiologie

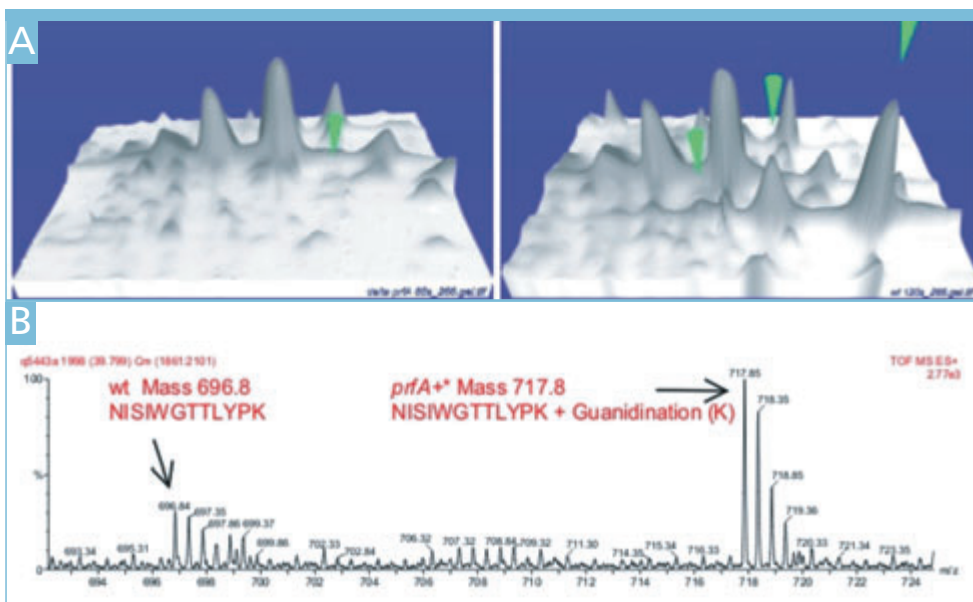
PROJEKTMITARBEITER | Maja Baumgärtner | Dr. Sabine Cornelsen | Dr. Oliver Diekmann | Dr. Lothar Jänsch

Dr. Uwe Kärst | Jessica Schaumburg | Kathrin Thedieck | Matthias Trost | Dr. Dirk Wehmhöhner

Der Gram-positive, fakultativ intrazelluläre bakterielle Erreger *Listeria monocytogenes* kann – besonders bei immunsupprimierten Personen – zu ernsthaften Infektionen wie Meningitis und Meningoenzephalitis führen. Sie werden durch kontaminierte Lebensmittel verursacht. Die Arbeitsgruppe befasst sich daher schwerpunktmäßig mit den listeriellen Virulenzfaktoren. Im Vordergrund steht die Analyse von Proteinexpressionsmustern verschiedener Gene von *Listeria monocytogenes* unter Verwendung hochauflösender 2D-Gelelektrophorese und schneller Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie. Die Basis für diese Analysen ist die vorliegende komplette Genomsequenz des Erregers.

Neue Virulenzfaktoren Da für die Pathogen-Wirtszell-Interaktionen Proteine wichtig sind, die auf der Bakterienoberfläche exponiert sind, liegt der Fokus auf sekretierten zellwandassoziierten Proteinen und Membranproteinen. Neben der Analyse von Mutanten steht die Entwicklung von Methoden im Vordergrund, mit denen sich derartige Subproteom-Fractionen isolieren

und analysieren lassen. Das Ziel: Potenzielle neue Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes* zu identifizieren und zu charakterisieren. Dies beinhaltet auch Proteinkomplexe und die Suche nach potenziellen Wirtszellrezeptorproteinen, die in die Pathogen-Wirtszell-Interaktion involviert sind. Für die Isolierung sekretierter beziehungsweise zellwandgebundener Proteine wurden Methoden etabliert. Zum einen für die serielle Proteinextraktion durch Salz und zum anderen für die Protoplastenbildung durch endolytischen Verdau der Zellwand. Zusätzlich wurde eine Gel-lose Methode für die vergleichende massenspektrometrische Analyse etabliert. Sie ist besonders für die Identifizierung von Proteinen geeignet, die nur in geringen Mengen vorkommen. Dieses Verfahren wird inzwischen auch für quantitative Analysen eingesetzt. Nahezu 300 Proteine aus *L. monocytogenes* konnten identifiziert werden. Hierunter fallen alle schon bekannten Virulenzfaktoren und zusätzlich Proteine mit noch unbekannter Funktion, die mit der Zellwand, Transportsystemen beziehungsweise der Zelloberfläche assoziiert sind.



- Detektion bekannter und putativer Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*. A: Dreidimensionale Darstellung einer vergleichenden 2D-Gelelektrophorese (Ausschnitt). Detektion eines putativen Virulenzfaktors, kontrolliert durch den Hauptregulator für Virulenzgene PrfA (links: *prfA*-Deletionsstamm, rechts: Wildtyp) B: Massenspektrometrische Quantifizierung eines Peptides des bekannten Virulenzfaktors Listeriolysin. Die Markierung der Probe des konstitutiv *PrfA* exprimierenden Stamms erfolgte durch Guanidierung der Lysine (MCAT).



01.4 Streptokokkengenome und -proteome

PROJEKTLEITERIN | Dr. Dorothea Zähler | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

PROJEKTMITARBEITERIN | Inka Sastalla

Die Erkrankungen, die Streptokokken beim Menschen hervorrufen können, sind sehr vielfältig. Der Grund dafür sind vor allem genetische Unterschiede zwischen den beteiligten Stämmen. Dieses Projekt beschäftigt sich mit der Anwendung von genomischen Methoden zur Charakterisierung von Streptokokken-Isolaten und deren Assoziation mit den verschiedenen Krankheitsbildern. Hierzu werden Mikroarrays und Deletionsmutanten hergestellt. Gemeinsam mit unserem Kooperationspartner innerhalb des Kompetenznetzwerkes „Pathogenomik“ wurde ein Gesamtgenomarray von Streptokokken entwickelt. Die Genomsequenzen stammen von den Stämmen SF370 und MGAS8323. Stamm SF370 wurde aus einem Patienten mit einer invasiven Infektion isoliert. Stamm MGAS8323 stammt von einem Patienten, der an Streptokokken-Toxic-Shock-Syndrom erkrankt war. Ein dritter Streptokokken-Stamm wurde parziell für dieses Projekt im Auftrag einer Firma sequenziert.

Entdeckung neuer Virulenzgene Bis jetzt sind 80 Prozent der Sequenz aufgeklärt, und für alle identifizierten Gene wurden Oligonukleotide auf einem Mikroarray platziert. Zudem ist ein weiterer Array mit Oligonukleotiden bekannter oder potenzieller Virulenzgene in der Arbeitsgruppe entwickelt worden. Dieser ermöglicht den schnellen Nachweis von Virulenzgenen bei einer großen Zahl von Streptokokken, die aus unterschiedlichen geographischen Regionen und Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern isoliert wurden. Die ersten Hybridisierungsexperimente mit dem Virulenzgen- und dem Gesamtgenom-Array werden zur Zeit durchgeführt. Darüber hinaus hat die Arbeitsgruppe zahlreiche Mutanten konstruiert, die Defekte in regulatorischen Genen aufweisen. Sie sollen neue Erkenntnisse über das Anheften und die Invasion von Streptokokken in eukaryotische Zellen bringen. Im Mausmodell werden sie auf ihre Virulenz im Gesamtorganismus untersucht. Um neue Virulenzfaktoren identifizieren zu können, wird die RNA von interessanten Kandidaten anschließend für Expressionsstudien verwendet.



- *Moderne molekularbiologische Methoden werden zur Identifizierung neuer bakterieller Virulenzfaktoren eingesetzt.*

Foto: Bierstedt



01.5 Analyse bakterieller Wirkstoffproduzenten

PROJEKTLEITER | Dr. Rolf Müller | Arbeitsgruppe Molekularbiologie der Myxobakterien

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Stefan Beyer | Dr. Ursula Bilitewski | Dr. Helmut Blöcker | Bettina Frank | Nikolaos Gaitatzis | Dr. Klaus Gerth | Dr. Frank Gross | Julia Hovermann | Dr. Herbert Irschik | Dr. Carsten Kegler | Maren Kopp | Dr. Brigitte Kunze | Inga Müller | Olena Perlova | Silke Pradella | Dr. Shwan Rachid | Axel Sandmann | Dr. Florenz Sasse | Heinrich Steinmetz | Stefan Weinig | Silke Wenzel

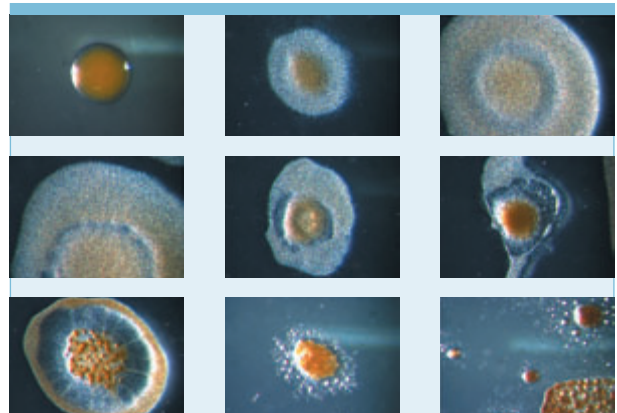
Naturstoffe mit biologischer Aktivität sind herausragende Quellen für Leitstrukturen in der Medizin, der Tiergesundheit und im Pflanzenschutz. Die Analyse mikrobieller Naturstoffproduzenten ermöglicht damit das Identifizieren neuer Substanzen und kann so zu alternativen Therapiestrategien für diverse Erkrankungen führen. Langfristig sollen verbesserte Methoden entwickelt werden, um das Biosynthesepotenzial bakterieller Naturstoffproduzenten besser auszuschöpfen.

Ungewöhnliche Hybride... Zum einen befasst sich das Projekt mit der funktionalen Analyse des Genoms von *Sorangium cellulosum* – einem Myxobakterium aus der Sorangiumgruppe. Diese Bakterien sind als hervorragende Naturstoffquelle etabliert. Das Genom von *S. cellulosum* wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Genomanalyse der GBF sequenziert – im Rahmen des Genomik-Netzwerks des BMBF. Daraus resultieren etwa 800 DNA-Abschnitte, so genannte „Contigs“, die das gesamte 12,2 Mbp große Chromosom repräsentieren. Die dazugehörige BAC-Genbank wurde auf Hochdichte-Koloniefilter aufgebracht und etwa 100 BACs endsequenziert.

Durch Geninaktivierungs-Experimente wurde ein Teil des Chivosazol-Biosynthese-Genclusters identifiziert. Zusätzlich hat die Gruppe einen Transposon-Mutagenesevektor hergestellt, um eine Transposon-Mutantenbank von *S. cellulosum* zu generieren. Da die modularen und makromolekularen Polyketidsynthasen und nichtribosomalen Peptidsynthetasen für die Biogenesen der meisten Naturstoffe aus Myxobakterien verantwortlich sind, wurden sie detailliert untersucht. Auffallend war, dass sie häufig in ungewöhnlichen Hybridformen vorkommen, die für die Biokombinatorik von hoher Bedeutung sind.

... und neue Stoffwechselwege Die Arbeitsgruppe hat die Biosynthesegene für die Tubulylinbildung in *Angiococcus disciformis* und für die Melithiazolbildung in *Melittangium gephyra* kloniert, sequenziert und analysiert. Die Transposonmutagenese hat gezeigt, welche der beteiligten Gene regulatorische Funktionen übernehmen. Im Melithiazol-Gencluster wurde ein neuer Typ von SAM-abhängigen Methyltransferasen identifiziert und funktional exprimiert. Der Stigmatellin-Gencluster wurde identifiziert und zur Herstellung neuer Stigmatellinderivate mit biologischer Aktivität herangezogen. Zudem wurde in *Stigmatella aurantiaca* ein neuartiger Primärstoffwechselweg entdeckt, der zur Bildung von verzweigten Carbonsäuren führt. Diese werden in der Naturstoffbiogenese und bei der Fettsäuresynthese verwendet. Dieser Stoffwechselweg ist ein neuer Zweig des Mevalonsäurewegs, der zurzeit molekularbiologisch charakterisiert wird.

Eine Studie zur Bildung von Steroiden in Myxobakterien ermöglicht das Identifizieren der ersten bakteriellen Gene, die an der Steroidbiosynthese beteiligt sind. Inhibitionsexperimente zeigten, dass die korrespondierenden bakteriellen Proteine andere Eigenschaften als solche aus eukaryontischen Organismen aufweisen. Daraus sind möglicherweise Resistenzentwicklungen gegen diverse Fungizide zu erklären – das soll durch biochemische Charakterisierung und Kristallisation der Proteine geklärt werden.



● Fruchtkörperbildung bei *S. cellulosum* So ce56

Foto: Gerth, GBF



01.6 Strukturanalyse von Virulenzfaktoren

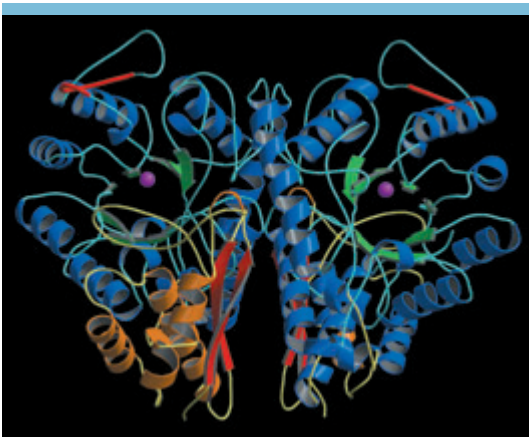
PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Dirk Heinz | Abteilung Strukturbioogie

PROJEKTMITARBEITER | Stefanie Ehinger | Susanne Frese | Dr. Hans-Jürgen Hecht | Dr. Joop van den Heuvel | Dr. Birgit Hofmann | Dr. Dirk Krumme | Marina Lindemann | Dr. Hartmut Niemann | Dr. Wolf-Dieter Schubert | Dr. Victor Wray

Die vielfältigen Kontakte von Mikroben zur Umwelt werden meist von einzelnen Molekülen vermittelt. Signale, die das Erkennen fremder Moleküle auslösen, erlauben es den Organismen, auf ihre Umwelt zu reagieren. Die Abteilung Strukturbioogie untersucht u. a. die molekulare Erkennung – insbesondere zwischen mikrobiellen Erregern und dem menschlichen Wirt – bei atomarer Auflösung. Dieser detaillierte Einblick trägt dazu bei, Schutzstrategien gegen einzelne Bakterien, Viren oder Parasiten zu entwickeln.

Adhäsion und Invasion von *Listeria monocytogenes*

Das Bakterium *Listeria monocytogenes* ist Verursacher der häufig tödlich verlaufenden Listeriose. Über die Nahrung aufgenommen, erkennt es im Darm spezifisch Zellen der Schleimhaut, dringt in sie ein und vermehrt sich darin. Ist das Immunsystem geschwächt, verbreitet es sich im gesamten Körper und kann zu Fehlgeburten, Gehirnhautentzündung und Sepsis führen. *L. monocytogenes* erkennt das E-Cadherin auf dem Darmepithel über das Protein Internalin A (InIA) auf seiner Oberfläche. E-Cadherin verschweißt benachbarte Epithelzellen, indem es seine N-terminale Kopfdomäne mit identischen Domänen auf benachbarten Zellen verbindet.



● Die Struktur eines Enolase-Dimers aus *S. pneumoniae*

Die Arbeitsgruppe hat kürzlich InIA' – den funktionellen Teil des Internalin A – sowohl allein als auch im Komplex mit der Kopfdomäne des humanen E-Cadherins (hEC1) kristallisiert und die entsprechenden Strukturen aufgeklärt. Zwei Berührungspunkte der beiden Proteindomänen sind von besonderer Bedeutung: Die aus der Oberfläche des hEC1 herausragende hydrophobe Aminosäure Pro16 wird in einer Tasche auf der Oberfläche von InIA' erkannt (violetter Kreis). In murinem E-Cadherin ist dieses Prolin durch ein Glutamat ersetzt, was die Maus unempfindlich gegenüber Listerien macht. Darüberhinaus bildet ein Calciumion (orange Kugel) eine Brücke zwischen zwei negativ geladenen Aminosäuren beider Proteine. Da die Ca^{2+} -Konzentration im Darmlumen etwa tausendfach höher ist als im Cytosol, wird die Anheftung der Bakterien begünstigt. Befindet sich das Bakterium innerhalb der Darmzelle in einer Vakuole, sinkt die Ca^{2+} -Konzentration dramatisch und der Komplex zerfällt. Neben InIA nutzt *L. monocytogenes* mit InIB ein zweites, verwandtes Protein, um die Aufnahme in weitere Zellen zu erzwingen. Die Struktur der Domäne InIB' fällt durch fünf auf der konkaven Oberfläche des Proteins präsentierten aromatischen Aminosäuren auf. Sie könnten mit dem identifizierten InIB-Rezeptor cMet wechselwirken. InIB-Varianten, in denen diese Aminosäuren durch kleinere polare Aminosäuren ersetzt wurden, zeigten, dass die Aromaten unmittelbar an der Bindung des dimeren cMet und damit an der Aufnahme der Bakterien in die Wirtszellen beteiligt sind.

Enolase aus *Streptococcus pneumoniae* Die α -Enolase aus *S. pneumoniae* ist ein intrazelluläres glykolytisches Enzym, das zudem extrazellulär als ein Virulenzfaktor auftritt, der humanes Plasminogen aktiviert. Dadurch wird die Invasion in nicht-phagozytierende Zellen eingeleitet. Die Kristallstruktur der α -Enolase zeigt Bereiche auf der Oberfläche des Proteins, die für die Wechselwirkung mit Plasminogen verantwortlich sind. Um dieses genauer zu untersuchen ist geplant, den Komplex beider Proteine röntgenkristallographisch zu untersuchen.

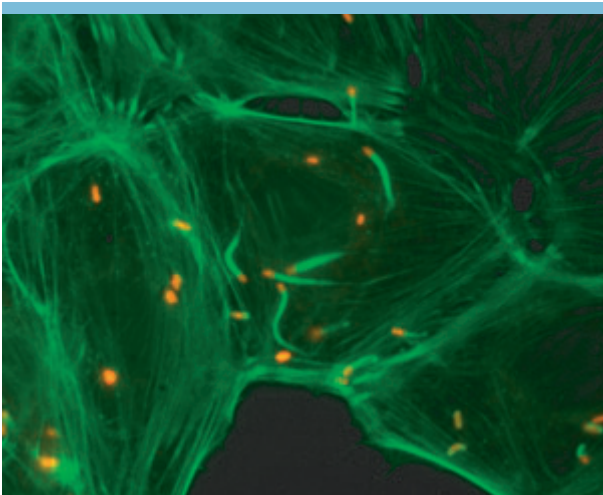


Topic 02 – Pathogenese

TOPICSPRECHER | Prof. Dr. Jürgen Wehland | Abteilung Zellbiologie

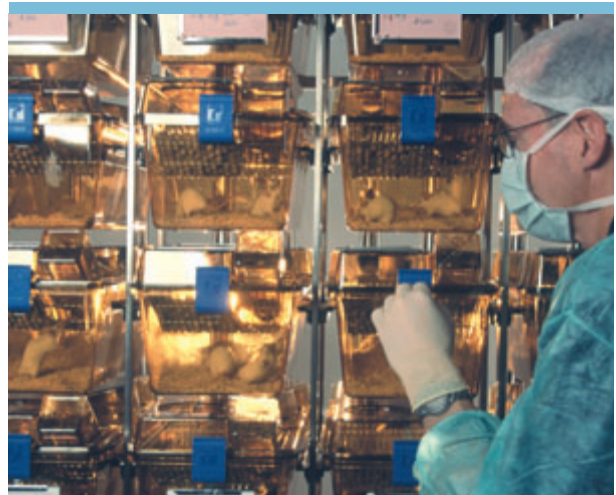


- Für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien sind detaillierte Kenntnisse der einzelnen Schritte im Infektionsprozess und in der Krankheitsentwicklung essenziell. Die Projekte dieses Themenbereichs sollen Pathogenitätsmechanismen analysieren und aufklären – sowohl von der Seite des Erregers als auch der des Wirtssystems. Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen stehen im Vordergrund der Forschungen, vor allem die Adhäsions- und Invasionsmechanismen von Streptokokken, Listerien und pathogenen *E. coli*. Eine ebenso wichtige Rolle für die Immunabwehr spielen die Wirtsreaktionen im Verlauf der Infektion, denn Pathogene haben raffinierte Virulenzmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen, das Abwehrsystem des Wirts zu umgehen. Ein weiteres wichtiges Werkzeug für die Analyse der Pathogenitätsmechanismen ist die Etablierung von Tierinfektionsmodellen.



- Von Listerien infizierte Zellen

Foto: Rohde, GBF



- Dr. David Monner bei der täglichen Routine-Überwachung der Mausekäfige

Foto: Bierstedt



02.1 Molekulare Mechanismen der Pathogen-Wirtszell-Interaktionen

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jürgen Wehland | Abteilung Zellbiologie

PROJEKTMITARBEITER | Stefanie Benesch | Dr. Silvia Lommel | Anke Mateus | Dr. Sascha Pust |

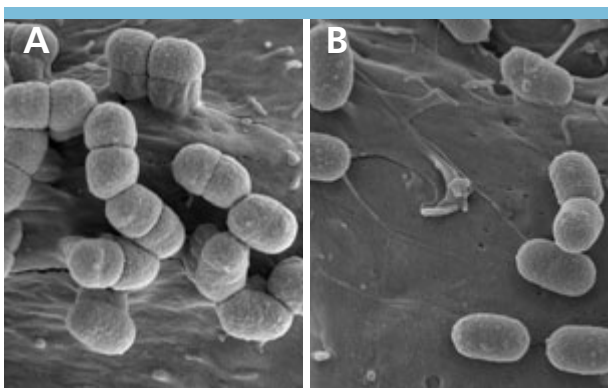
Dr. Klemens Rottner | Dr. Antonio Sechi

Schwerpunkt des Projektes ist die Etablierung und Charakterisierung von Zelllinien aus Mausstämmen, in denen ausgewählte Zytoskelett-Komponenten genetisch inaktiviert wurden. Derartige Zelllinien sind ein geeignetes Mittel, um die Interaktionen zwischen Pathogenen und Wirtszellen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Die Arbeitsgruppe hat auf diesem Weg die genaue Funktion der Ena/VASP-Proteine (Vasodilator Stimulated Phosphoprotein) bei der intrazellulären Motilität von *Listeria monocytogenes* sowie die Rolle von N-WASP (neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) für die Aktin-vermittelte Bewegung von *Shigella flexneri* untersucht. Die so erhaltenen Ergebnisse belegen, dass Ena/VASP-Proteine wesentlich zur Listerienbewegung beitragen. Sie stimulieren sowohl die Neubildung als auch die Verlängerung schon existierender Aktinfilamente auf der Bakterienoberfläche.

Im Unterschied dazu konnte durch Verwendung N-WASP-defekter Zellen eindeutig bewiesen werden, dass dieses Protein die Rekrutierung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und damit die Neubildung von Aktinfilamenten an der Shigellen-Oberfläche vermittelt.

Als Modell-Pathogene dienen inzwischen nicht nur *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri*, sondern auch enteropathogene und enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EPEC und EHEC).

Aktinschweife *Burkholderia pseudomallei* ist ein fakultativ intrazelluläres bakterielles Pathogen. Es ist – wie Listerien und Shigellen – in der Lage, das Aktinfilamentsystem der infizierten Zellen umzufunktionieren. *B. pseudomallei* nutzt die modifizierten Aktinfilamente für die Bildung von Aktinschweiften, mit denen es sich innerhalb der Zelle fortbewegt. Die Arbeitsgruppe hat mit verschiedenen Methoden Zytoskelettproteine untersucht, die an der Ausbildung der von diesem Erreger induzierten Aktinschweife beteiligt sind. Es konnten verschiedene Zytoskelett-Komponenten identifiziert werden, die sowohl mit der Oberfläche als auch den Aktinschweiften assoziiert sind. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die von *B. pseudomallei* induzierte Aktinreorganisation von der anderer intrazellulärer Erreger wie *Listeria*, *Shigella*, *Rickettsia* oder *Vaccinia*-Viren unterscheidet.



- Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen in A normale und in B N-WASP-defekte Fibroblasten nach einer Infektion mit enteropathogenen *E. coli*. Diese bakteriellen Erreger benutzen das Aktinzytoskelett, um auf der Oberfläche der Wirtszelle pseudopodienartige Strukturen zu bilden, auf deren Spitze sie angeheftet sind (A). In N-WASP-defekten Zellen (B) findet noch eine Anheftung, aber keine Ausbildung von Pseudopodien statt.

Foto: Rohde, GBF



02.2 Molekulare Mechanismen der Streptokokken-Wirtszell-Interaktionen

PROJEKTLEITERIN | Dr. Susanne Talay | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

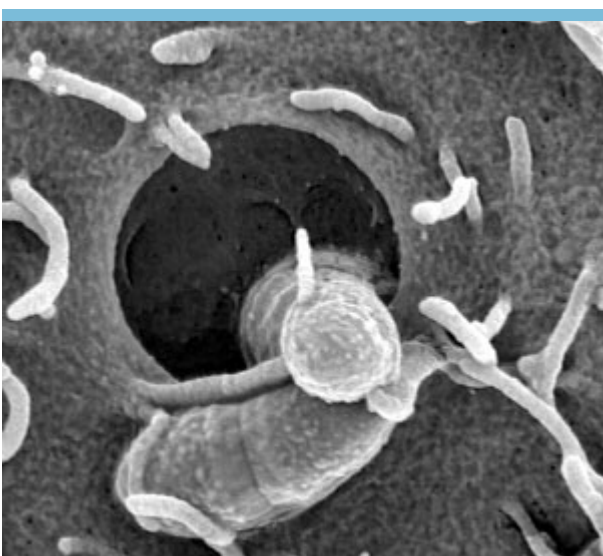
PROJEKTMITARBEITER | Katrin Dinkla | Dr. Wouter Jansen | Dr. Manfred Rohde



Die wesentlichen Prinzipien, die hinter einer Infektion mit Streptokokken stehen, sind die Fähigkeit zur Kolonisierung und die Umgehung der Phagozytose. Ein Ergebnis dieses Projekts ist die Aufklärung eines neuen Kolonisierungsmechanismus von *Streptococcus pyogenes* auf molekularer Ebene. Diese Bakterien sind in der Lage, humanes Kollagen über Fibronektin auf ihrer Oberfläche zu aggregieren – mit komplexen Rekrutierungsmechanismen und der Hilfe nur eines Proteins. Diese Interaktion hat bedeutende Konsequenzen im Infektionsgeschehen. Es bilden sich große Aggregate von Streptokokken, die mit menschlichem Kollagen und Fibronektin ummantelt sind. Dadurch entziehen sich die Bakterien der Erkennung – und damit Eliminierung – durch Phagozyten des Wirts. Außerdem ermöglicht die Fibronektin-vermittelte Rekrutierung von Kollagen die Adhärenz an Kollagenfasern.

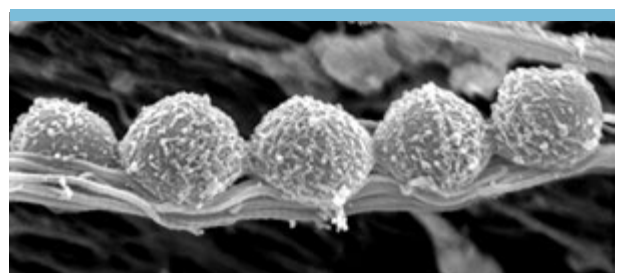
Tarnkappe aus Kollagen Ein weiterer Meilenstein dieses Projekts ist die Beobachtung, dass das M3-Protein der Streptokokken und der Hyaluronsäurekapsel als Rezeptoren für menschliches Typ-IV-Kollagen fungieren. Die Fähigkeit des M3-Proteins ist einzigartig und unterscheidet den M3-Serotyp von anderen Serotypen. *S. pyogenes*-Isolate des Serotyps M3 und stark bekapselte Stämme können über diese Interaktion an Kollagenfasern anheften. Eine fatale Folge ist das Auslösen einer Kollagen-spezifischen Autoimmunantwort, die zur Zerstörung menschlichen Kollagens und Gewebes führen kann.

Darüber hinaus wurden die zellulären Prozesse identifiziert, die zur Umorganisation der Wirtszellmembran und der sukzessiven aktiven Aufnahme der Bakterien führen. Die zellulären Kompartimente, die die Aufnahme der Streptokokken steuern, sind die Caveolae. Das Protein SfbI ist dabei der entscheidende bakterielle Faktor, über den Caveolae an die Zelloberfläche rekrutiert werden. Er löst die Fusion zu Caveosomen aus und treibt damit die Internalisierung der Streptokokken voran. Die intrazellulär lokalisierten Streptokokken können damit dem Zugriff des Immunsystems und der Wirkung spezifischer Antibiotika entgehen und stellen ein persistierendes Erregerreservoir dar.



● Caveolae vermittelte Zellinvasion von *S. pyogenes*

Foto: Rohde, GBF



● Kolonisation von *S. pyogenes* auf Kollagenfasern

Foto: Rohde, GBF

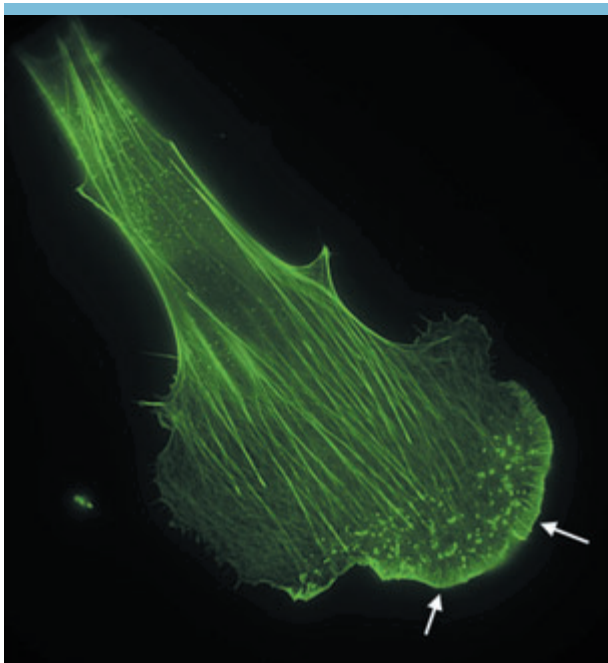


02.3 Signalübertragung zum Aktinzytoskelett

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jürgen Wehland | Abteilung Zellbiologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Christian Erck | Andrea Jenzora | Anika Steffen | Dr. Theresia Stradal

Veränderungen der Zellform sind essenziell für zelluläre Prozesse wie Zellbewegung und Zellteilung. Aktinpolymerisation an der Plasmamembran führt zur Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien. Etliche bakterielle Erreger nutzen diese Vorgänge, um in Wirtszellen einzudringen. Mit diesem Projekt sollen detaillierte Einblicke in die molekularen Mechanismen gewonnen werden, auf denen Aktin-vermittelte Zellformänderungen beruhen.



- Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer motilen Fibroblastenzelle, die am Vorderende (Pfeile) typische Lamellipodien ausgebildet hat. Dargestellt ist das Aktinzytoskelett.

Foto: GBF

N-WASP Die Proteine der WASP/Scar-Familie, vor allem aber N-WASP, wurden schon früher mit der Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien in Verbindung gebracht. Mit Hilfe von N-WASP-defekten Zellen konnte gezeigt werden, dass dieses Protein – entgegen früherer Spekulationen – für die oben genannten Prozesse nicht essenziell ist, sondern Vesikelbewegung im Zytoplasma vermittelt. In Analogie zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien wird bei der Vesikelbewegung die Aktinpolymerisation an der Vesikelmembran induziert. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten belegen erstmals einen definierten zellulären Phänotyp für den Verlust der N-WASP-Funktion.

Ein neues Protein: PREL1 Das bakterielle Oberflächenprotein ActA ist für die Aktin-abhängige intrazelluläre Bewegung von *Listeria monocytogenes* essenziell. Es rekrutiert in der infizierten Wirtszelle den Arp2/3-Komplex und Ena/VASP-Proteine an die Bakterienoberfläche. Ena/VASP-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellwanderung. Die Erforschung des Bindungsmechanismus von ActA an VASP hat wesentlich zum Verständnis der zellulären Funktion von VASP beigetragen. Eine Genexpressionsbank von HeLa-Zellen wurde auf neue zelluläre Liganden von VASP abgesucht, deren Bindungsmechanismus dem zwischen ActA- und Ena/VASP-Proteinen entspricht. Es gelang der Arbeitsgruppe, ein neues Protein zu identifizieren, welches PREL1 („Proline Rich EVH1 Ligand“) genannt wurde. PREL1 hat ein Molekulargewicht von 73 kDa und gehört der Adaptorproteinfamilie Grb7/10/14 an. Die Ergebnisse zeigten, dass PREL1 vornehmlich an lamellipodialen Spitzen lokalisiert ist und direkt mit Ena/VASP-Proteinen interagiert. Das legt die Vermutung nahe, dass auch PREL1 eine wichtige Rolle in der Regulation der dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts spielt.



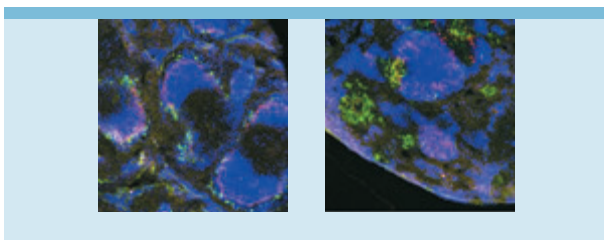


02.4 Wirtsreaktionen nach Infektion mit intrazellulären Bakterien

PROJEKTLEITER | Dr. Siegfried Weiß | Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Jan Buer | Dr. Kurt Dittmar | Nelson Gekara | Jadwiga Jablonska | Dr. Jörg Lauber | Dr. Stefan Linenklaus | Christofer Samuelsson

Dringt ein Mikroorganismus in einen Wirt ein, löst er dort eine Abwehrreaktion aus. Diese Abwehr richtet sich gegen die Substanzen, in denen sich Mikroorganismen und Wirt grundsätzlich unterscheiden, wie etwa Glykolipide oder unmethylierte DNA-Motive. Um lange genug überleben und eine Infektion etablieren zu können, haben Pathogene wiederum Virulenz-Mechanismen entwickelt, mit denen sie das Abwehrsystem des Wirtes umgehen. Diese Virulenzfaktoren lösen häufig ebenfalls wieder Signale in den Wirtszellen aus. Komplexe Interaktionen zwischen Wirt und Pathogen entscheiden also letztlich darüber, ob ein Pathogen aus dem Wirtsorganismus entfernt werden kann oder der Wirt der Infektion erliegt. Gerade die initialen Interaktionen sind entscheidend für den Ausgang einer Infektion – daher beschäftigt sich dieses Projekt mit den besonders frühen Ereignissen nach einer Infektion durch das intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* – an etablierten Mausmodellen und mit Erreger-Mutanten, denen bestimmte Virulenzfaktoren fehlen.



- Restrukturierung der Architektur der Milz nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*. In der Milz werden Listerien nach intravenösen Verabreichung von ERTR-9-Makrophagen (grün) aufgenommen, die sich am äußeren Rand der Marginalzone der lymphoiden Regionen befinden. Diese Makrophagen produzieren offensichtlich spezielle Chemokine nach Infektion mit Listerien und bilden die Kondensationskerne für die „Cluster“ von Makrophagen und dendritischen Zellen, die nach 24 Stunden beobachtet werden können. Im Gegensatz dazu wandern MOMA-1-Makrophagen (rot), die normalerweise am inneren Rand der Marginalzone zu finden sind, in die B-Zell-Regionen, die durch den Marker B220 (blau) gekennzeichnet sind.

Foto: GBF

Komplexe Chemokinexpression Bei einer intravenösen Infektion bilden Makrophagen in der Marginalzone der Milz die primären Zielzellen für *L. monocytogenes* – die Marginalzone umgibt die lymphoiden Regionen. Gegenwärtig ist es nicht möglich, ausreichende Mengen von diesen Makrophagen zu isolieren, um eine umfassende Analyse der Gene zu ermöglichen, die durch die Infektion reguliert werden. Deshalb hat die Arbeitsgruppe Zellen einer etablierten Makrophagenlinie infiziert und mit Hilfe von Expressions-Arrays untersucht. Die Versuche zeigten, dass hauptsächlich zytokinkodierende Gene induziert werden – vor allem Chemokine. Diese Proteine sind für das Anlocken von Effektorzellen zum Infektionsherd verantwortlich, aber auch für die Aktivierung weiterer mit der Infektion assoziierter Zellen. Dieses Expressionsmuster haben Experimente mit „Real Time RT-PCR“ an verschiedenen Typen von Makrophagen bestätigt.

Anschließend wurde das *in vivo* Chemokin- und Zytokinmuster nach der Infektion etabliert. Dabei zeigten sich gravierende Unterschiede zwischen den *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen. *Ex vivo*-Makrophagen produzierten kein Interferon-beta, obwohl dieses Zytokin in der Milz stark exprimiert wird. Histologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die infizierten Makrophagen offensichtlich plasmacytoide dendritische Zellen anlocken und aktivieren. Diese Zellen sind vermutlich für die Produktion der Typ-I-Interferone alpha und beta verantwortlich. Die detaillierte Analyse der Chemokinexpression offenbarte weitere interessante Phänomene: Einige Chemokine werden sehr schnell und in erstaunlicher Menge exprimiert, aber nach kurzer Zeit wieder fast vollständig reprimiert. Dafür übernehmen zu diesem Zeitpunkt andere, neu exprimierte Chemokine. Dieser Verlauf der Chemokinexpression – zusammen mit der Expression weiterer Zytokine – ist vermutlich für die Restrukturierung der Milz verantwortlich. Diese Untersuchungen wurden bisher mit BALB/c-Mäusen durchgeführt und jetzt auf zwei weitere Mausstämme ausgedehnt. Der Stamm C57Bl/6 ist resistent gegen Listerieninfektionen und der zweite – DBA/2 – sehr suszeptibel. In beiden Stämmen wurden von BALB/c abweichende Chemokinexpressionsmuster detektiert. Derzeit werden diese Expressionsmuster mit dem Resistenzstatus korreliert.



02.5 Pathogenese der Streptokokken im Tiermodell

PROJEKTLEITERIN | Dr. Eva Medina | Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung

PROJEKTMITARBEITER | Maïke Bolm | Dr. Wouter Jansen | Antonia Toppel

Streptokokken der Gruppe A (GAS) wie *Streptococcus pyogenes* verursachen ein weites Spektrum verschiedener Krankheitsbilder, die von einfachen Halsentzündungen bis zu sehr schweren Infektionen wie Nekrotisierender Fasciitis oder dem Streptokokken-Toxic-Shock-Syndrom reichen. Einige Studien zeigen, dass genetische Wirtsfaktoren für den Schweregrad der Infektion von Bedeutung sind.

Diese Hypothese wird durch Infektionsversuche mit *S. pyogenes* in Mausinzuchtstämmen unterstützt. Einige Mausstämmen (BALB/c, DBA/2) zeigten sich resistent gegenüber Infektionen mit *S. pyogenes*, andere hingegen (C3H/HeN, CBA/J) waren hoch anfällig und entwickelten schwere Infektionen. Um die genetischen Faktoren zu bestimmen, die den immunologischen Mechanismen zu Grunde liegen, die für die Resistenz und Anfälligkeit von Menschen gegenüber *S. pyogenes* Infektionen verantwortlich sind, kann ein Infektionsmodell in der Maus einen wesentlichen Beitrag leisten. Die Ergebnisse zeigten, dass der Ausgang der Infektion in resistenten Mäusen mit der Fähigkeit, das bakterielle Wachstum zu kontrollieren, und einer moderaten inflammatorischen Immunantwort korreliert ist. Diese ist nötig, um das eindringende Pathogen abzutöten. Im Gegensatz dazu können anfällige Mäuse das Wachstum der Bakterien nicht kontrollieren und zeigen eine massive inflammatorische Reaktion, die destruktiv ist und Gewebsschäden, Organversagen und den Tod der Tiere verursacht. Daraus lässt sich schließen, dass die Anfälligkeit der Mäuse gegenüber der Infektion mit *S. pyogenes* auf der Kombination von zwei Mechanismen beruht: Der Unfähigkeit das bakterielle Wachstum zu kontrollieren, und einer genetischen Prädisposition mit einer überschießenden inflammatorischen Immunantwort auf Produkte zu reagieren, die von *S. pyogenes* erzeugt werden.

S. pyogenes entkommt der Immunantwort Seit den späten 1980er Jahren wird ein weltweiter Anstieg invasiver GAS-Infektionen beobachtet. Der Anstieg schwerer Infektionsverläufe hat wieder das Interesse geweckt, den Virulenzmechanismen dieses Pathogens auf molekularer Ebene auf die Spur zu kommen. Die Zielsetzung dieses Teils des Projekts war es, das Verständnis der Strategien, mit denen *S. pyogenes* dem Verteidigungsmechanismen des Wirts entkommt und im infizierten Wirt überlebt, zu vertiefen. Neutrophile Granulozyten sind als wesentlicher Teil des Verteidigungsmechanismus gegenüber *S. pyogenes* bekannt. Sie können in großer Zahl lokal am Infektionsort nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es *S. pyogenes* möglich ist, dem Abtöten durch diese Zellen zu entgehen und in ihnen zu überleben. Damit scheinen GAS eine zusätzliche Möglichkeit zu haben, sich der Immunabwehr des Wirts zu entziehen und sich geschützt innerhalb dieses Zelltyps systemisch vom Infektionsort her auszubreiten. Intrazellulären Bakterien ist es dann möglich, aus den kurzlebigen Neutrophilen zu entkommen und sich an anderer Stelle im Wirtsorganismus zu etablieren. Ein besseres Verständnis der Pathogen-Wirt-Interaktion bei einer Infektion mit GAS ist für die Entwicklung neuer Therapeutika sowie neuer Behandlungsstrategien von großer Bedeutung.



- Die Konfokalmikroskopie in der GBF: Vorteil der Konfokalmikroskopie gegenüber konventioneller Mikroskopie ist die Möglichkeit Strukturen in Zellen und Geweben drei-dimensional darzustellen.

Foto: Bierstedt



Topic 03 – Immunbiologie

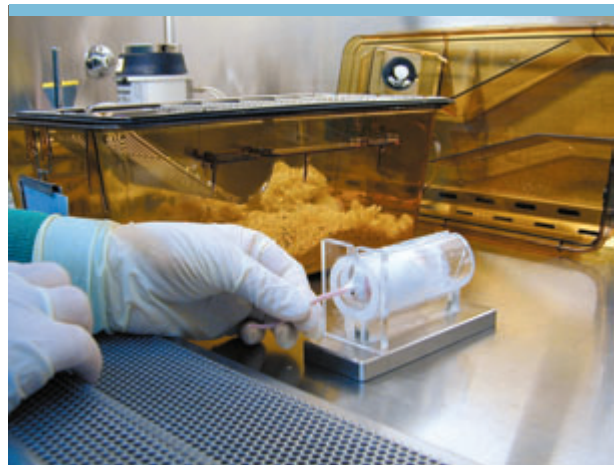
TOPICSPRECHER | Dr. Werner Müller | Abteilung Experimentelle Immunologie

- Das Forschungsthema Immunbiologie untersucht grundlegende Mechanismen des Immunsystems. Diese Mechanismen sorgen im Normalfall dafür, dass der Organismus Erreger abwehren kann. Kommt es jedoch zu Fehlfunktionen, richtet sich das Immunsystem gegen den Körper selbst und löst Allergien, chronisch entzündliche Prozesse oder Autoimmunität aus. Die Analyse dieser Mechanismen geschieht in Maus-Modellen. Gezielt veränderte genetische Informationen in der Maus ermöglichen eine ursachenorientierte Betrachtung von Krankheitsprozessen. Untersucht werden intrazelluläre Systeme wie die Signaltransduktion und Genregulation während der Immunreaktion. Interzelluläre Reaktionen wie die T-Zellen-Toleranz, Schleimhautimmunität oder die *in vivo*-Analyse der Dynamik von Zellen des Immunsystems während immunologischer Prozesse gehören ebenso zum Forschungsspektrum wie die theoretische Analyse – etwa die entwicklungsphysiologische Regulierung von Immunabwehrgenen und eine vergleichende Sequenzanalyse des murinen IgH-Lokus.



- *Probenvorbereitung*

Foto: Bierstedt



- *Blutabnahme zur Untersuchung von Immunzellen bei einer Maus*

Foto: Bierstedt



03.1 Signaltransduktion und Genregulation

PROJEKTLEITER | Dr. Hansjörg Hauser | Abteilung Genregulation und Differenzierung

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Thomas Böldicke | Thomas Frahm | Natali Froese | Dr. Gerhard Gross |

Dr. Andrea Hoffmann | Dr. Mario Köster | Dr. Andrea Kröger | Ina Niedick | Andreas Winkel | Dr. Manfred Wirth

Greifen Pathogene einen potenziellen Wirt an, induzieren sie Signalwege, die das angeborene Immunsystem aktivieren. Die dabei freigesetzten Zytokine und Entzündungssignale lösen wiederum Veränderungen in den Expressionsprofilen ihrer Zielzellen aus. Beide, Mikroorganismen und freigesetzte Zytokine, aktivieren die Genexpression durch Signalwege. Dabei nutzen sie Proteinfamilien, die sowohl für die Regulation der Pathogenabwehr als auch für die Kontrolle der normalen Zellproliferation, Differenzierung und den Zelltod entscheidend sind. Viele der zellulären Reaktionen auf Zytokine oder Pathogene vermitteln Membranrezeptoren und NF- κ B. Sie führen zur Sekretion verschiedener Modulatoren wie andere Zytokine, Chemokine und Interferone. Dabei aktivieren sie verschiedene Faktoren über die Kinase TAK 1, Mitglieder des Jak-STAT Signalweges sowie Proteinkinasen wie p38, JNK, IKK- β und PKB/Akt. Die Projektgruppe untersucht die Intermediate in den NF- κ B- und Jak-STAT-Signalwegen und die potenziellen Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Signalwegen, die durch Mediatoren wie TAK1/SMAD, SMAD/STAT und NF- κ B/TAK1 charakterisiert sind. Ein Ziel ist, das Netzwerk der Signalmediator-Interaktionen zu beschreiben und die biologischen Funktionen zu analysieren, in die bestimmte Signalmediatoren verwickelt sind.

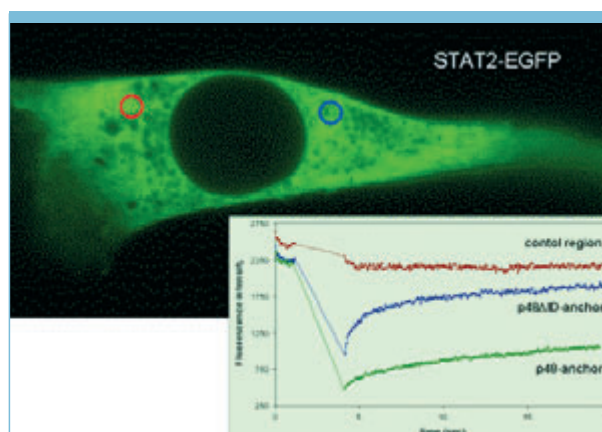
IRF-1, NRF und TAK 1 Der Transkriptionsaktivator „Interferon Regulatory Factor 1“ (IRF-1) wird durch viele Zytokine und Pathogene induziert. Eine wichtige Eigenschaft von IRF-1 ist die Reversion des transformierten Phänotyps von onkogen transformierten Zellen. Das zeigt sich in einer Normalisierung des Zellzyklus, Änderung in der Expression von relevanten Proteinen sowie in phänotypischen Effekten.

NF- κ B ist an der transkriptionalen Aktivierung von vielen Genen beteiligt. Der „NF- κ B Repressing Factor“ (NRF) ist dafür verantwortlich, dass einige dieser Gene im Ruhezustand vollkommen inaktiv sind. Dazu gehören die Zytokine IL-8 und IFN- β . Neue Arbeiten zeigen, dass dieser Mechanismus auch für die Regulation der NO-Synthetase iNOS gilt.

TAK1 – die MAP Kinase MAP3K – ist ein zentraler Signalmediator, der durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 sowie durch bakterielles LPS aktiviert wird. TAK1 ist in der Lage, direkt mit allen SMAD-Proteinen über eine konservierte SMAD-MH2-Domäne zu inter-

agieren. Dies führt zu ernststen biologischen Konsequenzen: Durch aktiviertes TAK 1 scheint die BMP-abhängige Geweberegeneration während Entzündung und Infektion vollständig blockiert zu sein.

STAT-Proteine Eine wichtige Komponente der Signalweiterleitung nach Zytokin-Stimulation sind die STAT-Proteine. Forschungsgegenstand sind ihre Aktivierungsmechanismen und die Regulation des intrazellulären Transports. Zur Untersuchung von Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen werden verschiedene Methoden der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie angewendet: „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET), „Fluorescence Loss in Photobleaching“ (FLIP) und „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP). Mit FRAP-Technik wurde die Wechselwirkung von STAT2 mit p48 untersucht. Zytoplasmatisch verankertes p48 in lebenden Zellen reduziert die intrazelluläre Mobilität eines STAT2-GFP-Fusionsproteins. Die Interaktionsmutante p48^{ID} hat hingegen keinen Einfluss.



- Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen durch FRAP. Der Einfluss von Membran-verankertem p48-Protein oder einer nicht-bindenden Mutante (p48^{ID}) auf die intrazelluläre Mobilität des STAT2-GFP-Fusionsproteins wurde untersucht. Die GFP-markierten STAT2-Moleküle im blauen Kreis wurden ausgebleicht, während die Moleküle in der rot-markierten Region als Kontrolle dienten. Die Bewegung von fluoreszierenden STAT2-Molekülen in beide Regionen wurde über die Zeit gemessen und graphisch aufgetragen. Das Membran-verankerte p48-Protein reduziert drastisch die intrazelluläre Mobilität von STAT2-GFP, während die Interaktionsmutante keinen Einfluss zeigt.



03.2 Epigenetische Grundlagen der Genregulation

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jürgen Bode | Arbeitsgruppe Epigenetische Regulationsmechanismen

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Alexandra Baer | Ellen Ernst | Sandra Götze | Yves Hüsemann | Martin Klar |
Dr. Angela Knopp | Kristina Nehlsen | André Oumard

Die Verfügbarkeit der Sequenzen eukaryontischer Genome zeigt, dass Informationen zu höheren Organisationsstufen dieser Genome erforderlich sind, um die Leistungen differenzierter Zellen verstehen zu können. Eine Klasse verantwortlicher Sequenzen – die „Scaffold/Matrix-Attachment“-Regionen (S/MARs) – zeigt eine deutliche Tendenz zur Strangtrennung und verfügt damit über eine Voraussetzung zur Sekundärstrukturbildung. Darauf basierend wurden biomathematische Regeln abgeleitet, mit denen sich funktionelle Gendomänen lokalisieren lassen. S/MARs haben Eigenschaften, die sie zu wertvollen Werkzeugen beim Aufbau integrierender und episomaler Systeme mit vorhersagbarer Expression werden ließen: Sie steigern transkriptionelle Initiationsraten nach einem von Enhancern unterscheidbaren Mechanismus, sie schirmen Einflüsse des genomischen Integrationsortes ab und sie unterdrücken „silencing“-Phänomene.

Die Techniken, die zum Verständnis genomischer Organisationsprinzipien entwickelt wurden, ermöglichen den Aufbau transgener Tiermodelle. An geeigneten genomischen Integrationsstellen können Markierungen angebracht werden. Diese erlauben, dass die Kasette – etwa eines Reportergens – durch „Recombinase-Mediated Cassette Exchange“ (RMCE) gegen eine analoge Kasette mit dem relevanten Gen ausgetauscht werden kann.

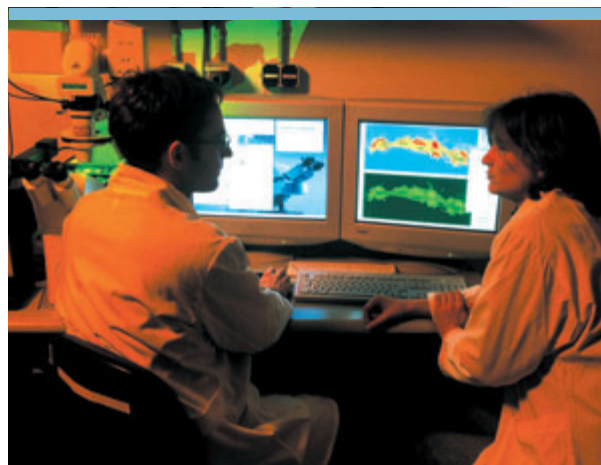
S/MAR-Datenbank und -Wirkungsspektrum

Gemeinsam mit der Arbeitsgruppe Bioinformatik wurde die erste verfügbare S/MAR-Datenbank aufgebaut. Sie ist eine Grundlage zur Entwicklung von Algorithmen, mit denen allgemeine Strukturprinzipien vorhergesagt werden können – getestet am humanen Typ-1-Interferon-Gencluster. Die Studien belegen eine enge Korrelation zwischen „Stress-Induced Duplex Destabilization“ (SIDD)-Minima, Affinität zur Kernmatrix und der biologischen Aktivität in verschiedenen Testsystemen. In einer ausgedehnten intergenischen Region wurden regelmäßig verteilte, hochaffine S/MARs eines neuen Typs entdeckt. Die Hypothese: Diese Stellen sind auf Grund eines speziellen Proteinbesatzes an der Organisation höherer Organisationsstufen des Chromatins beteiligt.

Nichtviraler episomaler Vektor Auf der Basis eines natürlichen S/MAR-Elements wurde ein neuartiger episomaler Vektor entwickelt, der ohne Selektionsdruck episomal verbleibt. Das primäre Bindungsprotein hnRNP-U wurde über eine neue *in vivo* „crosslinking“-Strategie bestimmt und die Bedeutung aktiver Transkription für den Erhalt des Episoms nachgewiesen. Auf der Grundlage von Ein- und Zwei-Episomensystemen wurden Antikörper-Expressionsstudien initiiert.

Fragile genomische Stellen Studien zu retroviralen Integrationsorten belegen, dass die Integration der Infektions-Vektoren an den S/MARs erfolgt, die gleichzeitig Marker fragiler Stellen sind. Das unterscheidet sie von analog aufgebauten Transfektanten. Der Mechanismus erklärt transkriptionelle Eigenschaften von Proviren und möglicherweise auch aktuelle Fehlschläge gentherapeutischer Ansätze mit retroviralen Vektoren.

Kassettenaustauschsystem Über das RMCE-Prinzip konnten unterschiedliche Konstrukte in Referenz-Integrationsstellen eingeführt und die Eigenschaften von S/MARs und genomischen „insulators“ mit neutraler DNA verglichen werden. Die Resultate belegen eine unerwartete Korrespondenz zwischen beiden Elementklassen.



• Mario Köster und Sandra Götze beim Studium der Zellkernarchitektur im Fluoreszenzmikroskop

Foto: Bierstedt

03.3 Posttranslationale Proteinmodifikation

PROJEKTLEITER | Dr. Harald Conradt | Arbeitsgruppe Proteinglykosylierung

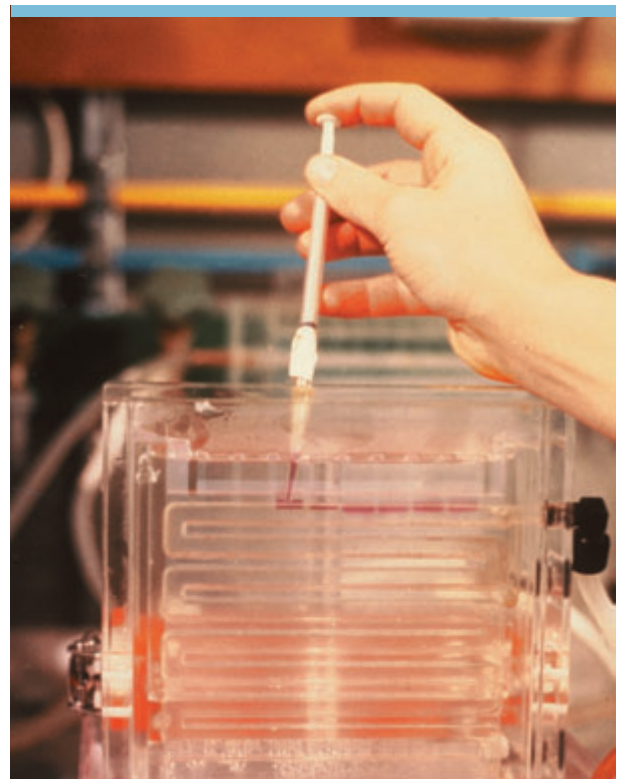
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Manfred Nimtz



Die Arbeitsgruppe hat das 2D-PAGE/MALDI/TOF-Mapping der Proteine aus menschlichen dendritischen Retikulumzellen (DCs) durchgeführt. Dabei wurden mehr als 200 Proteinpunkte identifiziert – einschließlich Zelloberflächenlektinen und Kohlenhydrat-Rezeptorproteinen. Zudem wurden die posttranslationalen Modifikationen – wie Glycosylierung, Sulfation und Phosphorylierung – ausgewählter Proteine analysiert.

Rekombinante Adenovirusvektoren Gemeinsam mit der Abteilung Genregulation und Differenzierung wurde ein rekombinanter Adenovirus-Vektor hergestellt, der die cDNA des humanen Erythropoetins (EPO) enthält. Nach der Infektion einer Reihe humaner und tierischer Primärzellen aus verschiedenen Zellen und Zelllinien wurde das abgesonderte EPO immunopurifiziert und detailliert auf N- und O-verknüpfte Kohlenhydratketten analysiert – einschließlich von MS-MS/MS-Techniken. Sowohl die cDNA-Transfektion als auch die Adenovirus-Infektion zeigten in allen Zellreihen ein identisches Glykosylierungsmuster für das EPO-Produkt. Rekombinante Adenovirusvektoren liefern daher ein vielseitiges Werkzeug zur Studie der posttranslationalen Modifikationsrepertoires primärer Tierzellen und -zelllinien.

Bibliothek für Affinitätsmatrizes In einer Oligosaccharid-Bibliothek wurden über 200 grundlegende komplexe N-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen erfasst. Diese Bibliothek kann durch *in vitro*-Glykosylierung erweitert werden, indem definierte Glycosyltransferasen an mehr als 1200 verschiedenen Oligosaccharidstrukturen verwendet werden. Die Oligosaccharid-Bibliothek wird für die Herstellung von Affinitätsmatrizes verwendet. Diese Matrizes sind für die Isolierung von kohlenhydratbindenden Rezeptoren bestimmt, die in der Zellerkennung involviert sind. Zudem wird sie für eine Studie über die biologische Signifikanz kohlenhydratbasierter Rezeptor-Liganden-Interaktionen eingesetzt – als Werkzeug für die Aufklärung der Zelloberflächenproteine und der Enzymmechanismen des Golgi-Apparates.



● Vorbereitung einer Gelelektrophorese

Foto: Bierstedt



03.4 Zellmodelle für die Infektionsbiologie

PROJEKTLEITER | Dr. Hansjörg Hauser | Abteilung Genregulation und Differenzierung

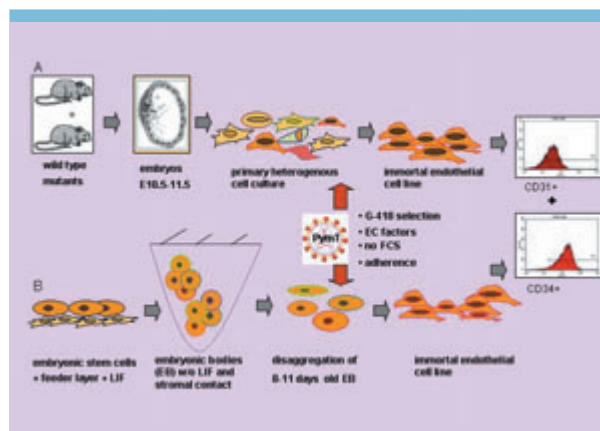
PROJEKTMITARBEITER | Tobias May | Dr. Peter P. Müller | Roland Schucht | Dr. Herbert Weich |

Dr. Dagmar Wirth | Claas Wodarczyk

Experimente mit Labortieren reflektieren zwar die hohe Komplexität des gesamten Organismus – andererseits sind sie zeitintensiv, schwierig zu reproduzieren und häufig erlauben solche Studien nicht, Ereignisse auf der zellulären oder sogar auf der molekularen Stufe zu erforschen. Um solche Mechanismen im Detail und unter genau kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen zu analysieren, dienen primäre Zellen oder Zelllinien als Werkzeug. Von homogenem Versuchsmaterial profitieren außerdem die neueren Methoden der Genexpressionsanalyse sowie die Genom- und Proteomforschung. Aus diesem Grund sind Zellkulturen ein wichtiges Hilfsmittel, um molekulare Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion zu analysieren.

Immortalisierte Zelltypen Zellen der hämatopoetischen Linien – etwa Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen – können einfach isoliert werden. Zudem ist es oftmals möglich, sie als homogene Populationen in Kultur zu halten. Dies gilt in der Regel nicht für Zellen, die aus soliden Gewebeverbänden isoliert werden müssen. Da die Maus das bevorzugte Tiermodell für Infektionsstudien ist, wurde damit begonnen, Mauszelllinien zu etablieren und zu charakterisieren. Dazu gehören auch immunrelevante Zelllinien von Mausmutanten oder embryonale Stammzellen. Die bisher in diesem Projekt immortalisierten Zelltypen stammen aus Fibroblasten oder dem Endothel.

Die Immortalisierung erlaubt die unbegrenzte Vermehrung eines bestimmten Zelltyps für experimentelle Zwecke. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise besteht jedoch darin, dass der Prozess der Immortalisierung selbst die zellulären Eigenschaften der Zielzelle beeinflussen kann. Eine Lösung dieses Problems wird durch die Reversion des Immortalisierungsprozesses erwartet. Um eine Immortalisierung rückgängig zu machen, wird das verantwortliche Gen mit Hilfe eines regulierbaren Promotorsystems unterdrückt. Erste Versuche, so genannte konditional immortalisierte Zellen aus Geweben zu erhalten, waren erfolgreich und werden in Zukunft mit verschiedenen Zelltypen weiter verfolgt.



- Zwei unterschiedliche Strategien der Endothelzell-Immortalisierung. A: Genetisch veränderte Mausstämme oder Wildtypstämme können zur Isolierung der Embryonen verwendet werden. Die isolierten primären Zellen des Embryos werden mit Polyoma-Virus-middle-T-tragenden Retroviren (PymT) infiziert. Diese Viren immortalisieren vorzugsweise Endothelzellen. Die so entstehenden Endotheliome werden durch Anwendung spezifischer Zellkulturbedingungen selektiert. B: Alternativ dazu können etablierte embryonale Stammzellen der Maus durch Beeinflussung der Umgebung differenziert werden. Die Mischung der so entstehenden differenzierten Zellen werden wieder mit PymT-Viren infiziert. Die daraus resultierenden Endotheliome werden auf das Vorhandensein spezifischer Mausendothel-Oberflächenmarker analysiert (z.B. CD31, CD34).



03.5 Genetische Mechanismen der angeborenen Immunantwort

PROJEKTLEITER | Dr. Andreas Lengeling | Arbeitsgruppe Infektionsgenetik

PROJEKTMITARBEITER | Jens Böse | Laura Helming | Dr. Bastian Pasche

Der Forschungsschwerpunkt der Nachwuchsgruppe Infektionsgenetik liegt in der Identifikation genetischer Wirtsfaktoren, die an der Immunabwehr von bakteriellen Pathogenen beteiligt sind. Ziel ist es, mit Hilfe von Mausmodellen Suszeptibilitätsgene zu identifizieren und ihre Funktion – zunächst im Tiermodell – zu entschlüsseln. Die in der Maus gewonnen Erkenntnisse können dann später genutzt werden, um gezielt genetische Prädispositionen für Infektionserkrankungen in humanen Patienten zu untersuchen.

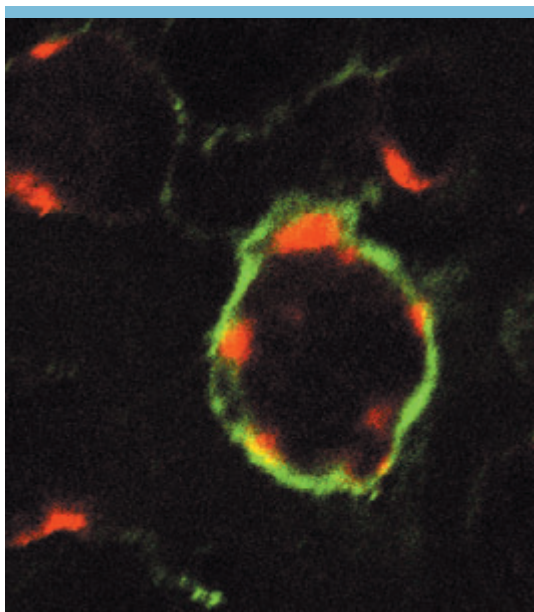
Suppression des Immunsystems durch Phagozytose apoptotischer Zellen Viele bakterielle und virale Pathogene induzieren in kritischen Phasen der Infektion den programmierten Zelltod – die Apoptose – ihrer Wirtszellen. Sie nutzen diesen Mechanismus, um der Abwehr des Immunsystems zu entgehen.

Durch Apoptose getötete Wirtszellen werden sehr schnell von Makrophagen aufgenommen, die dann aktiv immun-suppressive Zytokine ausschütten und so post-apoptotische Nekrose und deregulierte Entzündungsprozesse im Körper verhindern. Ein besonders wichtiges Protein für die Phagozytose von apoptotischen Zellen und die nachfolgende Immunsuppression durch Makrophagen ist der Phosphatidylserinrezeptor.

Durch Untersuchungen der Expression dieses Rezeptors in verschiedenen Mausgeweben und Makrophagenpopulationen konnte gezeigt werden, dass der Phosphatidylserin-Rezeptor geclustert auf der Zelloberfläche von Makrophagen exprimiert wird. Um die *in vivo* Funktion des Phosphatidylserinrezeptors zu entschlüsseln, werden Mausmodelle hergestellt.

Der Vitamin-D-Rezeptor – Suszeptibilitätsgen für Infektionen? Humangenetische Assoziationsstudien haben eine mögliche Verbindung zwischen dem Vitamin-D-Rezeptorgen (*Vdr*) und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Tuberkulose, chronischer Hepatitis und Dengue Fieber aufgezeigt. Die Hypothese: Vitamin D übt wichtige regulatorische Funktionen im Immunsystem aus. Um diese Hypothese zu überprüfen, verwendet die Arbeitsgruppe eine Mausmutante mit einem defekten *Vdr*-Gen. Damit konnte gezeigt werden, dass *Vdr*-„Knock-out“-Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* besitzen. Diese Versuche dienen nun als Grundlage, um herauszufinden, welche Immuneffektorzellen durch Vitamin D beeinflusst werden.

Empfindlichkeit gegenüber *Streptococcus pyogenes* Infektionen mit *Streptococcus pyogenes* können in der Maus, wie auch in humanen Patienten, zu einem septischem Schock und Multiorganversagen führen. Im Mausmodell ist Ursache dieser Pathogenität eine verminderte Fähigkeit, die Bakterien in einer frühen Phase der Infektion zu kontrollieren und abzutöten – allerdings nur in bestimmten Mausstämmen. Diese erhöhte Suszeptibilität ist genetisch bedingt. Mit Hilfe von Kopplungsanalysen ließen sich Gene, die am Infektionsgeschehen beteiligt sind, auf den Mausechromosomen 2, 7 und 17 kartieren.



- Expression des Phosphatidylserinrezeptors auf Thio-glykolat induzierten Makrophagen aus der Bauchhöhle der Maus. Die Doppelfärbung im konfokalen Mikroskop zeigt in Rot den Phosphatidylserinrezeptor und in Grün das Makrophagenoberflächenmolekül F4/80



03.6 T-Zell-Entwicklung und -Funktion

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Jan Buer | Arbeitsgruppe Mucosale Immunität

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Christian Becker | Dunja Bruder | Patricia Gatzlaff | Dr. Robert Geffers | Marcus Gereke | Ulrike Goelden | Dr. Lothar Gröbe | Wiebke Hansen | Katrin Hunger | Dr. Jörg Lauber | Dr. Andreas Matussek | Susanne Pfortner | Michael Templin | Astrid Westendorf

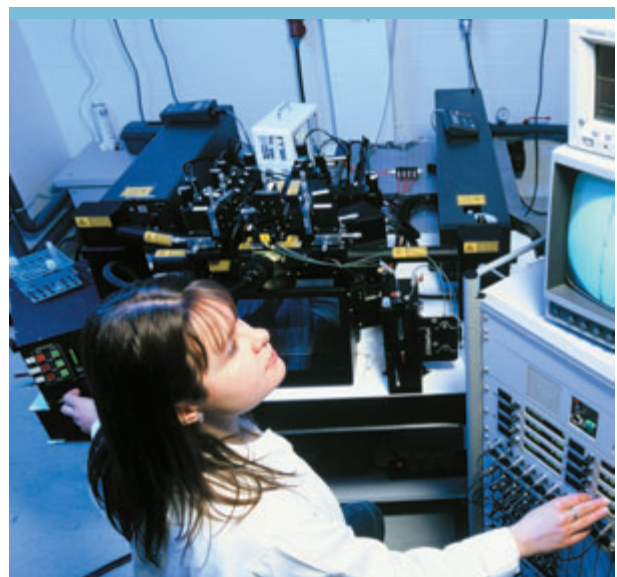
Die Forschungsaktivitäten der Arbeitsgruppe gliedern sich in die beiden Teilgebiete T-Zell-Toleranz und Mucosale Immunität. Im Mittelpunkt steht dabei die molekulare Erforschung der reziproken Wechselwirkung von mucosalem Immunsystem und Bakterien. Dies erfordert die Entwicklung und Anwendung von Methoden zur dynamischen Analyse der Genexpression *in vivo*. Ziel ist es, im Tiermodell und am Patienten völlig neue und hocheffektive Therapien für Erkrankungen mit gestörter mucosaler Immunfunktion zu entwickeln.

T-Zell-Toleranz Kürzlich konnte ein neuer molekularer Marker für periphere Immunregulation identifiziert und seine Relevanz für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz *in vivo* gezeigt werden. Durch den Einsatz einer Multiplex-Einzelzell-RT-PCR konnte erstmals die direkte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen in Inselzellen des Pankreas nachgewiesen werden. Dieses *in vivo*-Modell wird von der Arbeitsgruppe intensiv genutzt, um grundlegende Fragestellungen der peripheren Immunregulation aufzuklären.

Mucosale Immunität Eine zentrale Aufgabe des intestinalen Immunsystems ist die Entwicklung und Beibehaltung einer immunologischen Reaktionsunfähigkeit gegenüber zahlreichen Antigenen. Dies drückt sich in der verminderten Stimulierbarkeit mucosaler T-Lymphozyten durch Antigene und Mitogene aus sowie in der Produktion von Zytokinen mit Suppressoraktivitäten. Das Phänomen einer antigenspezifischen Suppression der systemischen Immunantworten nach Applikation oraler Antigene wird als Induktion oraler Toleranz bezeichnet. Systemische Toleranz wird hierbei entweder aktiv oder passiv erreicht. Erst in den letzten Jahren wurde die Bedeutung lokaler immunologischer Reaktionen in der Darmmucosa für die Pathogenese verschiedener intestinaler Erkrankungen erkannt. Untersuchungen an „Knock-out“-Mäusen haben gezeigt, dass dafür besonders eine gestörte Wechselwirkung von mucosalen T-Zellen und mikrobieller Normalflora wichtig ist. Die molekularen Grundlagen dieser mucosalen 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.

Schleimhaut-assoziiertes Immunsystem Tiermodelle, die der Erforschung des mucosalen Immunsystems des Darms dienen, haben inzwischen sehr vielversprechende Ergebnisse geliefert. Zusätzlich wird derzeit in der Arbeitsgruppe 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. Untersucht wird, ob sich durch Bakterien-vermittelte Antigenexpression im Gastrointestinaltrakt eine Modulation des mucosalen T-Zellsystems der Lunge erzielen lässt. Die Etablierung des Modellsystems ist inzwischen abgeschlossen – zurzeit wird die molekulare Charakterisierung durchgeführt.

Ein weiterer Schwerpunkt beschäftigt sich mit der molekularen Charakterisierung der komplexen Wechselwirkung – dem „Cross-Talk“ – von *E. coli* 0157 EHEC mit Wirtszellen. In Kooperation mit dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der MHH wurde untersucht, wie EHEC-Toxine auf Endothelzellen wirken.



• Zellsortierung von T-Zelllymphozyten

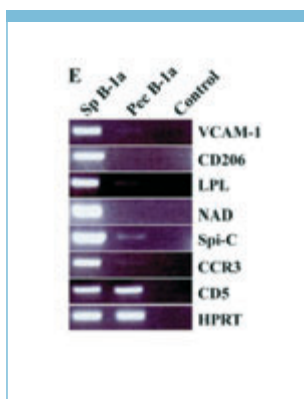
Foto: Bierstedt



03.7 B-Zell-Subpopulationen

PROJEKTLEITER | Dr. Siegfried Weiß | Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie

PROJEKTMITARBEITER | Sandra Düber | Dr. Karsten Kretschmer | Isabell Rode | Britta Störmann



- RT-PCR von differenziell exprimierten Genen von B1a-Zellen aus der Milz und der Bauchhöhle. Zellen wurden auf Grund ihrer Expression von IgM und CD5 isoliert und RNA von ca. 100 000 Zellen extrahiert. PCR-Amplifikation wurde nach reverser Transkription durchgeführt mit spezifischen Primern für VCAM-1 („Vascular Cell Adhesion Molecule 1“), CD206 (Mannose-Rezeptor), LPL (Lipoprotein Lipase), NAD (Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15), Spi-C (Transkriptionsfaktor) und CCR3 (Chemokinrezeptor). Die „housekeeping“-Gene CD5 und HPRT wurden als Kontrolle für die Unversehrtheit der cDNA und die geeignete Konzentration verwendet. Als Kontrolle für die Spezifität der Amplifikation wurde eine Probe ohne cDNA verwendet.

Antikörper-produzierende Zellen lassen sich in folliculäre B2-Zellen, B1a-, B1b- und B-Zellen der Marginalzone einteilen. Folliculäre B2-Zellen werden kontinuierlich im Knochenmark adulter Individuen generiert. Sie antworten spezifisch auf Antigene durch Differenzierung in Plasmazellen, Ig-Klassenswitch und somatische Hypermutation. Sie können sich auch zu Gedächtnis-B-Zellen entwickeln. Die B-Zellen der Marginalzone sind den folliculären B2-Zellen nahe verwandt. Allerdings zählen sie auf Grund ihrer schnellen proliferativen Antwort und ihrer Lokalisation in der Milz zur ersten Verteidigungslinie gegen blutständige Infektionen. B1a- und B1b-Zellen dominieren die Körperhöhlen wie die Bauchhöhle, aber B1a-Zellen sind auch in der Milz zu finden. B1-Zellen sind für die Produktion des größten Teils des IgM im Serum und der natürlichen Antikörper verantwortlich. Deshalb werden sie ebenfalls als erste humorale Verteidigungslinie gegen Infektionen betrachtet. B1-Zellen erneuern sich selbst, sie werden nur in der fötalen und neonatalen Phase gebildet und nicht mehr im erwachsenen Organismus.

Biologie der ersten Antikörper-Verteidigungslinie

Um die Physiologie der B-Zellen der ersten Verteidigungslinie zu verstehen, verwendet die Arbeitsgruppe einen rekombinanten Mausstamm, der eine Lambda-2-Immunglobulin-leichte Kette exprimiert. Die B-Zellpopulationen in dieser Maus gehören ausschließlich zur ersten Verteidigungslinie. Die Marginalzone enthält eine normale Anzahl an B-Zellen, die Milz und das Peritoneum werden von B1a-Zellen dominiert und folliculäre B2-Zellen sind nicht detektierbar.

Zunächst wurden die schweren Ketten dieser B-Zellen unter der Restriktion der transgenen leichten Kette analysiert. Das peritoneale B1a-Kompartiment wird von wenigen Sequenzen dominiert, die durch unabhängige Rearrangements zustande kommen.

Diese Sequenzen wurden bei B-Zellen aus der fötalen Leber, dem Entstehungsorgan der B1a-Zellen, nicht gefunden. Der Schluss: Auf diesen peritonealen Zellen lastet ein extrem hoher Selektionsdruck durch Autoantigene. Um diese Autoantigene zu charakterisieren, wurden verschiedene Hybridome von dominanten B1a-Zellklonen etabliert. Die Repertoirestudien wurden daraufhin auf B1a-Zellen der Milz ausgedehnt. Eine nur geringe Überlappung zwischen Sequenzen aus der Milz und dem Peritoneum lässt auf einen geringen Austausch von B1a-Zellen zwischen Milz und Bauchhöhle schließen. Transferexperimente konnten dies untermauern. Allerdings besitzen peritoneale B1a-Zellen die Kapazität, in die Milz zu wandern, wenn sie in Mäuse transferiert werden, die keine eigenen Lymphozyten besitzen.

Die einzigartige Situation, dass in einer Maus nur B-Zellen der ersten Verteidigungslinie vorhanden sind, erlaubte auch, das genetische Programm dieser B-Zellpopulationen zu untersuchen. Sortierte Zellen der verschiedenen B-Zellpopulationen wurden für eine Analyse mit Mikroexpressions-Arrays benutzt. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf physiologische Unterschiede zwischen peritonealen und Milz-B1a-Zellen zu – etwa auf ihre potenzielle Interaktion mit T-Zellen oder ihren Aktivierungsstatus. Diese Experimente wurden von funktionellen Tests begleitet, um Eigenschaften dieser B-Zellsubpopulationen, die aus den Arrayanalysen geschlossen wurden, zu bestätigen.



03.8 Biologie der Immunabwehr

PROJEKTLEITER | Dr. Werner Müller | Abteilung Experimentelle Immunologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Mariella Bollati Fogolin | Anne Fleige | Dr. Martin Hafner |

Rolf Hühne | Carola Neffgen | Ida Retter | Dr. Angela Schippers | Samira Schroeder | Gudrun Wessel

Eine wichtige Funktion des Immunsystems ist die Abwehr von Pathogenen. Es setzt sich aus spezifischen Organstrukturen zusammen, die entscheidend für lokale Immunantworten sind. Diese Strukturen bestehen aus unterschiedlichen Zelltypen, die ein ausgeprägtes Migrationsverhalten innerhalb des Körpers zeigen. Für die Regulation der Interaktionen zwischen diesen Zellen ist unter anderem das Zytokinnetzwerk verantwortlich. Die Arbeitsgruppe analysiert, wie Lymphozytenwanderungen während der Immunreaktion gesteuert werden und wie spezifische Zytokine das Immunsystem bei der Wirtsabwehr regulieren.

Den Ursachen für chronische Darmentzündungen auf der Spur Mittlerweile ist die gesamte Sequenz des Mausgenoms bekannt. Das erleichtert es, ausgewählte Gene spezifisch in der Keimbahn der Maus zu inaktivieren. Dieses kann auf zwei unterschiedliche Arten erreicht werden. Eine Methode führt zur kompletten Inaktivierung des entsprechenden Gens in der Maus, die andere – technisch ausgereifere – bewirkt eine induzierbare und Zelltyp-spezifische Inaktivierung zu einem definierten Zeitpunkt. Diese Methode der zielgerichteten Gen-Inaktivierung wendet die Arbeitsgruppe auf zwei Gruppen von Genen an: Auf Zytokingene und ihre zugehörigen Rezeptoren sowie auf die Gene der sogenannten „Homing“-Rezeptoren. Tiermodelle sind besonders wertvoll, da an ihnen Prozesse studiert werden können, die teilweise auch auf erworbene menschliche Krankheiten übertragen werden können. Der Fokus der Untersuchungen liegt auf dem darmassoziierten lymphatischen Gewebe, dessen Fehlregulation zu schweren chronischen Darmentzündungen wie Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa* führen kann. Zusätzlich zum Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Funktion des darmassoziierten Immunsystems soll auch die Auswirkung bakterieller Infektionen untersucht werden. Sie können ebenfalls starke entzündliche Reaktionen des Darms auslösen, wie Infektionsprozesse, die der humanmedizinisch relevante Erreger *Yersinia enterocolitica* bewirkt.

Maßgeschneiderte Mutanten Die Arbeitsgruppe unterstützt andere Wissenschaftler in der GBF bei der Erzeugung von spezifischen Mausmutanten, die die Infektionsprozesse und die Immunabwehr betreffen. Durch die systematische Herstellung zielgerichteter Mutationen wird so eine Kollektion von Mausmutanten erzeugt, die wertvolle Modellsysteme für die Erforschung von Infektionskrankheiten und der Immunabwehr darstellt. Durch den Einsatz bioinformatischer Werkzeuge wird die Arbeit komplettiert. Der von der Arbeitsgruppe etablierte und öffentlich zugängliche Server zur Sequenzanalyse – <http://ngfnblast.gbf.de/> – ermöglicht unter anderem die vergleichende Analyse von Genen des Menschen und der Maus. Für die Entwicklung von Mausmutanten ist er ein unentbehrliches Werkzeug. Mit bioinformatischen Methoden wird außerdem ein großes Gencluster analysiert, das für die Synthese von Antikörpern verantwortlich ist. Letztere sind Effektormoleküle der Immunabwehr und von besonderer Bedeutung bei der Eliminierung von Pathogenen aus dem Körper.



- Stammzellen der Maus werden unterm Mikroskop untersucht

Foto: Bierstedt



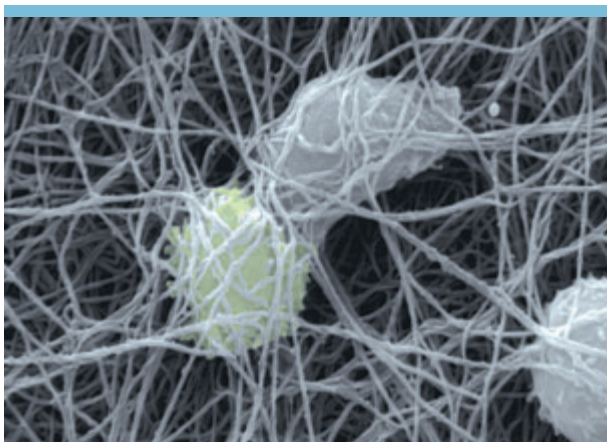
03.9 Visualisierung der zellulären Dynamik immunologischer Prozesse

PROJEKTLEITER | Dr. Matthias Gunzer | Arbeitsgruppe Immundynamik

PROJEKTMITARBEITER | Anja Hillmer | Michael Templin

Das Immunsystem ist grob in eine humorale und eine zelluläre Komponente aufgeteilt. Den humoralen Anteil vermitteln lösliche Faktoren wie Antikörper und Komplement, den zellulären Anteil T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen. Während sich die humorale Immunität nur indirekt erfassen lässt, können Zellen direkt „bei der Arbeit“ beobachtet werden.

Dendritische Zellen auf der Wanderung Als Antigen-präsentierende Zellen stehen dendritische Zellen (DCs) am Beginn jeder neuen zellulären Immunreaktion. In der Peripherie des Körpers nehmen sie ein- dringende Pathogene auf und transportieren sie zu den drainierenden Lymphknoten, um sie dort T-Zellen zu präsentieren. Obwohl er ein zentraler Bestandteil der zellulären Immunologie ist, wurde dieser Transportprozess bis heute nicht direkt beobachtet, und über seine Dynamik *in vivo* ist nichts bekannt. Bei immuntherapeutischen Ansätzen gegen Krebs, wird versucht, DCs als Träger von Tumoran-tigenen zu nutzen. Ein großes ungelöstes Problem dabei ist die optimale Route der Applikation der Zellen in den Patienten, ohne dabei ihr internes Migrationspotential zu stören. Gelänge es, eine Methode zu entwickeln, die die normale und gestörte DC-Wanderung *in vivo* analysiert, würde das einen besseren Einblick in diesen grundlegenden Prozess zulassen, Vakzinierungsprogramme verbessern oder helfen, die Vorgänge des Krankheitsgeschehens zu verstehen.



- Eine B-Zelle bindet eine antigenspezifische T-Zelle um ihr Antigen zu präsentieren. Die „Spaghetti“-Strukturen repräsentieren Fasern künstlicher extrazellulärer Matrix aus Kollagen.

T-APC-Zell-Interaktion Ein anderer intensiv untersuchter Aspekt der zellulären Immunität ist die physikalische Interaktion von T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Während die Mehrzahl der Untersuchungen zur T-APC-Interaktion *in vitro* durchgeführt wurde, ist es kürzlich gelungen, Einblicke in die Migrationsprozesse in echtem lymphatischem Gewebe zu bekommen. Bildgebungsverfahren gestatten den Blick in die äußerst dynamischen Migrationsprozesse in explantiertem lymphatischem Gewebe. Solche Studien führen zu einem völlig neuen Verständnis der T-Zell-Aktivierung *in vivo* und liefern Erklärungsansätze für die Fehler, die dem Organismus im Falle einer Krankheit oder tödlichen Infektion unterlaufen.

Mikroskopie im lebenden Gewebe Sehen ist verstehen. Das übergeordnete Ziel der Arbeitsgruppe ist die Visualisierung zellulärer Immunität in ihrer natürlichen Umgebung – also ein nicht-invasives Verfahren mit modernen Mikroskopietechniken. Dadurch soll ein weitreichender Einblick in die biophysikalische Dynamik gewonnen werden, die zellulären Immunprozessen zugrunde liegt. Parallel dazu werden bildgebende Verfahren aufgebaut. Mit Zeitraffer-Konfokal- sowie 2-Photonen-Mikroskopie sollen Mäusegewebe – zunächst explantiert, später *in situ* – untersucht werden. 2-Photonen-Mikroskopie erzeugt hochaufgelöste Bilder tief in lebendem Gewebe. Um ein vollständiges Bild zu gewinnen, erfolgt die Bildgebung dort, wo die Immunantworten ausgelöst werden – also in Lymphknoten, Milz und Darm – und dort, wo die Antwort letztlich stattfindet – im Darm, der Haut und in Tumormetastasen. Um den Einfluss einer Krankheit auf zellphysiologische Parameter des Immunsystems zu analysieren, sollen genetisch manipulierte Mäuse verwendet werden, die farblich markierte Moleküle wie MHCII oder CD3 und/oder genetische Defekte tragen. Standardisierte Tumor-, Infektions- und Allergiemodelle sollen eingesetzt werden, um den Einfluss einer Krankheit auf zellphysiologische Parameter des Immunsystems zu analysieren.



Topic 04 – Prävention und Therapie

TOPICSPRECHER | Priv.-Doz. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Arbeitsgruppe Impfstoffforschung



- Ein Drittel aller weltweiten Todesfälle verursachen infektiöse Agenzien. Mikroorganismen sind auch für mindestens 15% der neu entstehenden Krebsfälle verantwortlich und zudem an der Pathogenese von chronischen nicht-infektiösen Krankheiten beteiligt. Die Therapie von infizierten Patienten ist durch das Auftreten von Mehrfach-Antibiotikaresistenz sehr schwierig. Es ist deshalb äußerst wichtig, neue Werkzeuge zu entwickeln, um infektiösen Krankheiten vorzubeugen und diese behandeln zu können. Das Entwickeln solcher Werkzeuge ist das Hauptziel dieses Themenbereichs.

In dem Projekt „Anti-Infective Discovery“ werden auf der Suche nach neuen Wirkstoffen Strategien angewendet, die auf der Isolierung von Naturstoffen aus Mikroorganismen sowie auf der kombinatorischen chemischen Synthese basieren. Gesucht: Kleine Moleküle, die gegen Infektionen wirken. So wurde aus *Sorangium cellulosum* ein neuer steroid-artiger Wirkstoff isoliert, der selektiv gegen Mykobakterien wirkt. Epothilon-B-Amine – in der GBF isoliert und synthetisiert – werden in klinischen Studien als mögliches Antikrebsmittel getestet.

Im Projekt „Antigen-Liefersysteme und Impfstoffe“ werden Werkzeuge zur Immunintervention erforscht, um mit ihnen Impfstoffe gegen Krankheiten zu entwickeln. Da die meisten infektiösen Agenzien die Schleimhäute passieren müssen oder auf diese beschränkt sind, hat die Entwicklung von Schleimhautimpfstrategien höchste Priorität. Dabei wurde herausgefunden, dass ein synthetischer Abkömmling des aus Mykoplasma stammenden Makrophagen-aktivierenden Lipopeptides MALP-2 ein hochwirksames Adjuvans ist. Es wurden auch neue attenuierte Salmonellenstämme identifiziert, die als Impfstoffträgerstämme ein angemessenes Sicherheits- und Immunogenitätsprofil zeigen.



- Vorbereitung von Proben für gaschromatographische Untersuchungen

Foto: Bierstedt



04.1 Synthetische Kombinatorische Molekülrepertoires

PROJEKTLEITER | Dr. Ronald Frank | Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung

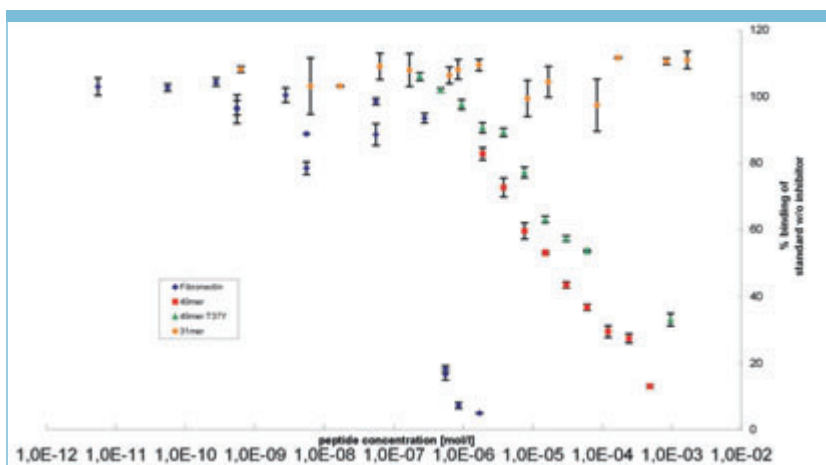
PROJEKTMITARBEITER | Dr. Antonius Dikmans | Undine Felgenträger | Agnes Hahn | Dr. Gerhard Höfle | Dr. Kathrin Michaelis | Dr. Michael Morr | Dr. Jutta Niggemann | Dr. Rene Rübenhagen | Dr. Werner Tegge | Dr. Norbert Zander

Komplementär zu der Wirkstoffsuche aus natürlichen Quellen – wie im Bereich Naturstoffforschung – verfolgt dieses Projekt einen alternativen empirischen Ansatz. Er nutzt die simultane und parallele chemische Synthese. Die entwickelten kombinatorischen Synthese- und Screeningverfahren für Peptid- und andere organische Substanzbibliotheken werden außerdem für die systematische Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren selektive Inhibition eingesetzt. Sie werden kontinuierlich für die Suche nach neuen Verbindungen mit antibiotischen, chemotherapeutischen und immunomodulatorischen Aktivitäten erweitert.

Inhibitoren der zellulären Invasivität *Streptococcus pyogenes*, ein pathogenes Bakterium der Gruppe A Streptokokken (GAS), kann sich sowohl dem Immunsystem als auch Arzneimitteln entziehen, indem es in Epithelzellen eindringt. Ein Projekt in Zusammenarbeit mit der Abteilung Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung hat die Einwirkung auf diesen Pathogenitätsmechanismus zum Ziel. Ein Hochdurchsatz-Test ermöglicht die parallele Evaluierung des inhibitorischen Potentials von Hunderten bis Tausenden unterschiedlicher chemischer Verbindungen. Er basiert auf einem entscheidenden Schritt im Invasionsprozess: Der Anbindung von nicht-pathogenem *S. gordonii* an Fibronektin. Peptide mit definierten Sequenzen und umfangreiche Peptidbibliotheken wurden getestet und kleine Peptidsequenzen identifiziert. Sie sollen als Ausgangsverbindungen für die Entwicklung von spezifischeren und *in vivo* einsetzbaren Verbindungen dienen.

Synthetisches MALP-2 – ein viel versprechendes Adjuvans für die nasale Impfung Die meisten Krankheitserreger greifen den Menschen über seine Schleimhaut, die Mukosa, an. Eine frühe Immunabwehr in diesem Gewebe wäre daher besonders wirksam. Bisher gibt es aber keine geeigneten Adjuvantien, um eine ausreichende Immunantwort gegen extern verabreichte Antigene in der Mukosa zu stimulieren. Das an der GBF entdeckte Makrophagen-aktivierende Lipopeptid MALP-2 aus Mykoplasmen könnte hier zu einem Durchbruch führen. Der chemisch-synthetische Zugang zu dieser Substanzklasse bildet die Grundlage für detaillierte Struktur-Aktivitätsuntersuchungen. In der Maus konnte kürzlich eine starke mukosale immunstimulatorische Wirkung von synthetischem MALP-2 nachgewiesen werden. Durch chemische Synthesen werden jetzt gezielt Analoga von MALP-2 mit verbesserten Eigenschaften entwickelt.

Die „Drug-Discovery“-Maschine Im Rahmen des von der Firma Evotec OAI AG geleiteten Verbundprojekts „Diagnose und Therapie mit den Mitteln der molekularen Medizin“ wurde ein Syntheseprogramm entwickelt, das besonders auf die miniaturisierte Hochdurchsatz-„Screening“-Technologie von Evotec – das EVOscreen – ausgelegt ist. Aus dem selektiven Abbau von 14 Naturstoffen wurden 34 originäre neue Bausteine erhalten, die mit der SPOT-Synthesetechnologie zu neuen Verbindungen verknüpft wurden. Durch die entsprechende Hochdurchsatz-Logistik konnten über 55 000 Substanzen für das Projekt hergestellt werden.



- Inhibition der Bindung von Streptokokken an markiertes Fibronektin durch synthetische Peptide und durch kompetitives unmarkiertes Fibronektin. Die Peptidsequenzen stammen aus dem bakteriellen Fibronektin-bindenden Protein SfbI.



04.2 Biologie mikrobieller Wirkstoffe

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Gerhard Höfle | Abteilung Naturstoffbiologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Ursula Bilitewski | Dr. Abass Yasser Elnakady | Dr. Meike Genrich | Dr. Klaus Gerth | Dr. Björn Henze | Dr. Herbert Irschik | Dr. Brigitte Kunze | Gaber Mersal | Dr. Hans Reichenbach | Dr. Florenz Sasse | Janine Wendler

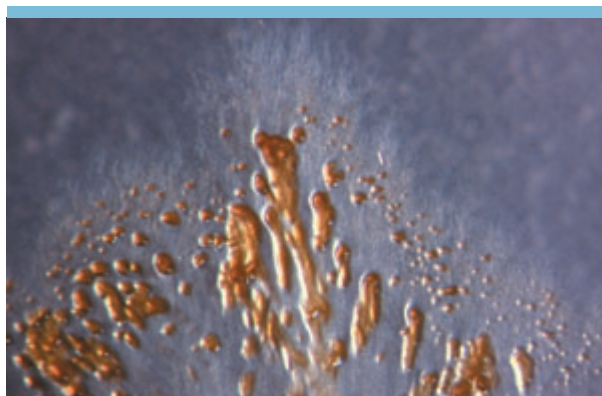
Die bestehende Sammlung von 6000 Myxobakterien und über 100 Neuisolaten bildete die Basis für die Suche nach neuen antibakteriellen, antifungischen und cytotoxischen Naturstoffen. Eine derzeit besonders wichtige Gruppe von solchen Naturstoffen sind die Tubulin-Inhibitoren Epothilon, Tubulysin und Disorazol. Ihr Wirkungsmechanismus wurde im Hinblick auf eine Anwendung als Krebstherapeutika weiter im Detail untersucht. In Kooperation mit unterschiedlichen Industriepartnern wurde die präklinische Entwicklung der Substanzen vorangetrieben. Die Phase II der klinischen Prüfung von Epothilon-B-Lactam durch Bristol Myers Squibb konnte erfolgreich abgeschlossen werden.



- Kalisalz Abraumhalde bei Königslutter (Niedersachsen), ein nicht marines salzhaltiges Biotop als Quelle für halophile Myxobakterien

Foto: Gerth, GBF

Neue Produktionsorganismen Früher wurden sie als schwierige Organismengruppe eingestuft – heute werden Myxobakterien routinemäßig isoliert, und es sind weltweit bereits mehrere kleine Stammsammlungen verfügbar. Kürzlich gelang es, aus bislang nicht explorierten Habitaten unter Verwendung unkonventioneller Kulturbedingungen neue Gruppen von Myxobakterien zu isolieren. Diese neuen Isolate haben bisher unbekannte physiologische Eigenschaften. So wurden in salzbelasteten Erdproben zahlreiche halotolerante und einige halophile Stämme entdeckt. Sie benötigen 2% Natriumchlorid für ein optimales Wachstum. Die 16S-r-DNA-Sequenzierung zeigte, dass diese Organismen einer neuen Gattung von Myxobakterien angehören. Außerdem wurden pH-tolerante Stämme isoliert, die noch bei pH 5 und 9 wachsen. Und es gelang zum ersten Mal, mesothermophile Myxobakterien zu isolieren, die bei 42 bis 43 °C optimal wachsen. Mit Generationszeiten von 2 bis 3 Stunden sollten sich diese Stämme besonders gut zur Expression von Biosynthesegenen eignen.



- Schwarmkolonie eines halophilen Myxobakteriums isoliert aus einer Bodenprobe vom Haldenfuß

Foto: Gerth, GBF



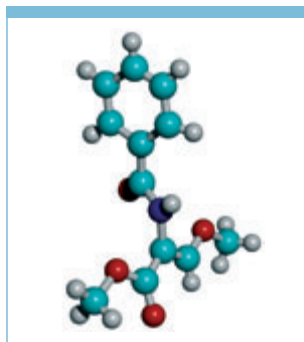
04.3 Chemie mikrobieller Wirkstoffe

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Gerhard Höfle | Abteilung Naturstoffchemie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Nicole Glaser | Dr. Thorsten Jahn | Dr. Rolf Jansen | Dr. Usama Karama | Dr. Thomas Leibold | Dr. Jutta Niggemann | Heinrich Steinmetz | Larissa Vollbrecht | Dr. Peter Washausen

Aus Myxobakterienkulturen konnten im vergangenen Jahr sieben neuartige Substanzgruppen isoliert werden. Ihr Wirkungsschwerpunkt liegt auf Gram-negativen und/oder Gram-positiven Bakterien. Vorläufige Strukturen wurden für Bysochloron, ein komplexes chlorhaltiges Polyketid, und ein ungewöhnliches Steroid-Antibiotikum mit selektiver Wirkung gegen Mykobakterien aufgeklärt.

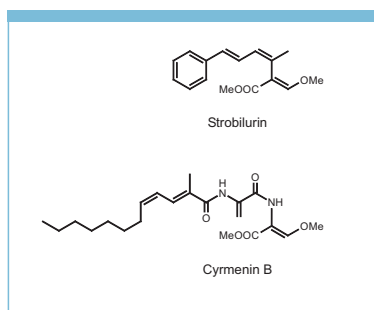
Cyrmenine Bei der Suche nach antifungischen Verbindungen wurden ein *Cystobacter armeniacae*- und ein *Archangium gephyra*-Stamm entdeckt, die beide eine neue Gruppe von ungesättigten N-Acyldipeptiden bilden, die so genannten Cyrmenine. Nach den spektroskopischen Daten und der Kristallstrukturanalyse einer synthetischen Modellverbindung handelt es sich bei den Cyrmeninen



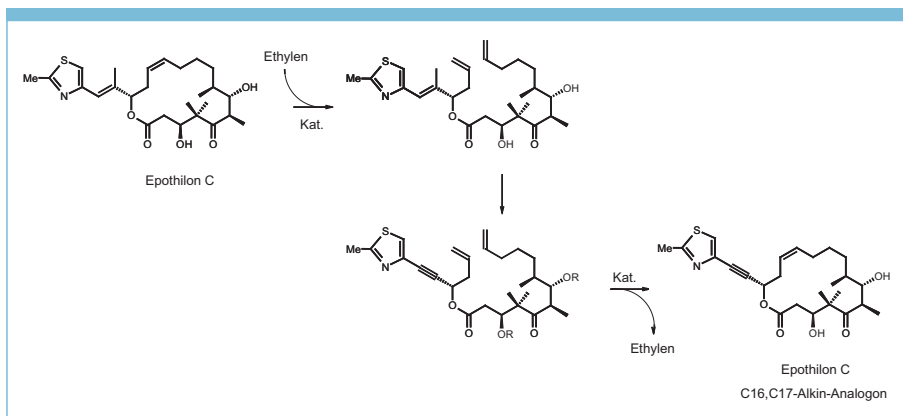
- Kristallstruktur einer synthetischen Modellverbindung für Cyrmenin. Sie zeigt die für den (Z)- β -Methoxyacrylat-Pharmakophor typische orthogonale Konformation, eine Voraussetzung für antifungische Aktivität.

um (Z)- β -Methoxyacrylate, die in α -Position durch ein Stickstoffatom mit dem Rest des Moleküls verbunden sind. Somit können die Cyrmenine als Aza-Analoga der Strobilurine aufgefasst werden, einer Verbindungsklasse, die in den letzten Jahren zu erfolgreichen Fungiziden für den Pflanzenschutz entwickelt worden ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Biogenese – Polyketid gegenüber Peptid – handelt es sich bei dem β -Methoxyacrylat-Pharmakophor der Cyrmenine um eine eigenständige Erfindung der Myxobakterien. Die antifungische Aktivität von Cyrmenin B und die Hemmung des Elektronentransports im bc_1 -Komplex der mitochondrialen Atmungskette liegen in der Größenordnung der Strobilurine.



Semisynthese Über einen oxidativen und hydrolytischen Abbau von komplexen Naturstoffen wurde eine Bibliothek von chiralen Bausteinen gewonnen und für die kombinatorische Synthese bereitgestellt. Alternativ dazu wurde erstmals die Olefin-Kreuzmetathese zum Abbau von ungesättigten Naturstoffen eingesetzt. Exemplarisch wurde dazu die C12,C13-Doppelbindung von Epothilon C mit Ethylen in Gegenwart von Grubbs Metathesekatalysator gespalten. Nach Austausch der Thiazol-Seitenkette durch einen Synthesebaustein mit Dreifachbindung ließ sich der Makrocyclus durch Olefinmetathese wieder schließen. Auf diesem Wege wurden erstmals 16,17-Alkin-Analoga von Epothilon A und C in nur sechs beziehungsweise fünf Synthesestufen zugänglich.





04.4 Antigen-Liefersysteme und Impfstoffe

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Dr. Carlos A. Guzmán | Arbeitsgruppe Impfstoffforschung

PROJEKTMITARBEITER | Heike Bauer | Stefan Borsutzky | Dr. Dunja Bruder | Dr. Jan Buer |

Dr. Thomas Ebensen | Dr. Claudia Link | Dr. Faiza Rharbaoui | Dr. Kai Schulze | Dr. Lothar H. Staendner |

Dr. Siegfried Weiß

Impfung ist die kosteneffektivste Methode zur Prophylaxe infektiöser Krankheiten, und sie wird zunehmend zu einem äußerst effizienten Werkzeug bei der Vorbeugung oder Behandlung einer breiten Palette von Krankheiten. Die Entwicklung und Validierung von Impfsystemen und Strategien für die Verabreichung von Protein-Antigenen oder DNA-Impfstoffen ist ebenso das Hauptziel des Projekts wie die anschließende Verwendung solcher Systeme zur Entwicklung von geeigneten Impfstoffkandidaten gegen spezielle Krankheiten. Die Optimierung der Immunogenität von Antigenen, die über die Schleimhäute verabreicht werden, ist dabei besonders wichtig, da es über die Schleimhaut-Immunsierung möglich ist, gezielt an den Stellen des Körpers eine Immunantwort hervorzurufen, die eine erste Barriere im Kampf gegen Infektionen sind.

MALP-2 als Schleimhaut-Adjuvans Das Adjuvans-Potenzial des synthetischen Derivats (S-[2,3-bis(palmitoyloxypropyl)] cysteinyl-GNNDESNISFKEK) des aus *Mycoplasma* stammenden Macrophagen-aktivierenden Lipopeptids MALP-2 wurde näher untersucht. Die Studien haben gezeigt, dass MALP-2 ein äußerst effektives Adjuvans ist, wenn es zusammen mit einem löslichen Antigen über die intranasale oder parenterale Route verabreicht wird. Dabei wurden nach der Impfung bis zu 3560-fach erhöhte Antigen-spezifische Serum-IgG-Titer und verstärkte zelluläre Antworten beobachtet. Auch das Schleimhautimmunsystem wurde nach intranasaler Impfung sehr effizient stimuliert – 36% beziehungsweise 23% Antigen-spezifischer IgA-Antikörper in Abwaschungen aus der Lunge und der Vagina. Funktionsstudien zeigten, dass in den nasalen Lymphgeweben MALP-2 behandelte Mäuse Antigen-präsentierende Zellen rekrutiert wurden, die vermehrt MHC-Klasse-I- und kostimulierende Moleküle exprimierten.

Stimulierung eines langanhaltenden Impfschutzes gegen *Streptococcus pyogenes* Durch Impfung mit der Fibronectin-bindenden Domäne des Proteins SfbI (H12-Fragment) – zusammen mit der B-Untereinheit des Cholera-Toxins (CTB) als mukosalem Adjuvans – kann ein Impfschutz gegen *S. pyogenes* induziert werden. Allerdings können bakterielle Toxine oder deren Derivate schwere Nebeneffekte hervorrufen, wenn sie intranasal verabreicht werden. Da das isolierte Protein SfbI ebenfalls über Adjuvansseigenschaften verfügt, wurde untersucht, ob eine Immunisierung mit dem H12-Fragment alleine ausreicht, um einen langanhaltenden Impfschutz zu stimulieren. Die immunisierten Mäuse waren unabhängig von dem CTB-Anteil sowohl 36 als auch 110 Tage nach der ersten Impfung vor den Auswirkungen einer letalen Dosis von *S. pyogenes* geschützt. Die beobachteten Adjuvansseigenschaften der Fibronectin-bindenden Domäne des Proteins SfbI verdeutlichen das Potenzial dieses Antigens für die Verwendung in Mehrfach-Komponenten-Impfstoffen gegen *S. pyogenes*.



- Dr. Carlos Guzman analysiert das Wachstum von klonierten *Salomellen*-Stämmen auf einer Agarplatte.

Foto: Bierstedt



04.5 Therapeutische zelluläre Vakzine

PROJEKTLEITER | Dr. Werner Lindenmaier | Abteilung Genregulation und Differenzierung

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Kurt E.J. Dittmar | Dr. Andrea Kröger | Lars Macke | Carsten Wiethe

Bei der Entwicklung zellulärer therapeutischer Impfstoffe wird eine Doppelstrategie verfolgt. Einerseits sollen die Arbeiten die Voraussetzungen für eine Genehmigung klinischer Studien schaffen. Andererseits werden Zellkulturen und Mausmodelle genutzt, um Fragen der Zell-Zell-Interaktion und der Kostimulation zu untersuchen.

Interaktion zwischen antigenpräsentierenden und Effektor-Zellen Neben den immunologischen Tests wurden in Kooperation mit der Abteilung für Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung Verfahren zur elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Zellen in lymphoiden Organen entwickelt. Mit hochauflösender konfokaler Mikroskopie wurden die Wanderung und die Interaktion der Zellen *in vivo* und *in vitro* verfolgt. Zusammen mit anderen Arbeitsgruppen der GBF wurde der Einfluss von Infektion und genetischer Modifikation analysiert.



- Wanderung lebender Zellen im Lymphknoten der Maus. Mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurden Zeitserien aufgenommen. Auswandernde (*) und einwandernde (▶) Lymphozyten bzw. Makrophagen (●) sind markiert. Zellkerne (blau), Zytoplasma (rot) und Retikulinfasern (grün) wurden angefärbt.

Foto: GBF

Einfluss des adenoviralen Gentransfers auf zelluläre Funktionen Mit rekombinanten Adenoviren, die Tumorantigene, immunmodulierende Gene und unterschiedliche Reporter-Gene kodieren, kann ein effizienter Gentransfer und kontrollierte Expression in primären Zellen erreicht werden, insbesondere in professionell antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen und Makrophagen. Dabei werden die posttranslationalen Modifikationen, die Muster der Zelloberflächenproteine und die Genexpression durch die Infektion mit rekombinanten Adenoviren nicht geändert. Das konnte durch die Analysen des Proteoms und mit DNA-Arrays gezeigt werden.

Vom Mausmodell zur klinischen Anwendung Die strukturellen und funktionellen Eigenschaften modifizierter dendritischer Zellen und der Einfluss immunmodulatorischer Gene wurden *ex vivo* in humanen Zellen und *in vivo* in einem murinen Modell untersucht. In Kooperation mit einer Arbeitsgruppe vom Sir Albert Sakzewski Virus Research Centre, Brisbane, Australien, wurde eine Verstärkung der Immunantwort gegen HPV E7 gezeigt, wenn die dendritischen Zellen außer mit dem E7-exprimierenden Adenovirus noch mit Viren für kostimulatorische Moleküle infiziert waren.

In einem zweiten Modell wird nach Transplantation eines Tumors mit aktivierbarem IRF1 eine protektive Antwort induziert. Um diesen IRF1-spezifischen Effekt auf die Immunantwort auch mit anderen Zelllinien untersuchen zu können, wurden adenovirale Vektoren etabliert. Tumorzellen, die mit IRF1-exprimierenden Adenoviren infiziert wurden, zeigten den gleichen Phänotyp wie die stabil IRF1 exprimierenden Linien: Inhibition der Zellteilung, Verstärkung der MHC-Klasse-I-Expression und Ifn- β -Expression.

Für die Produktion von adenoviralen Vektoren für klinische Anwendungen in der GBF-S2/GMP-Anlage wurden Standardprotokolle (SOPs) und Validierungen erstellt. Die Bedingungen für eine standardisierte Produktion genetisch modifizierter dendritischer Zellen aus Monozyten, die mit Hilfe von Leukapherese in ausreichender Menge aus dem menschlichen Blut gewonnen werden können, wurden in Zusammenarbeit mit industriellen und klinischen Partnern erarbeitet.



Programm „Vergleichende Genomforschung“

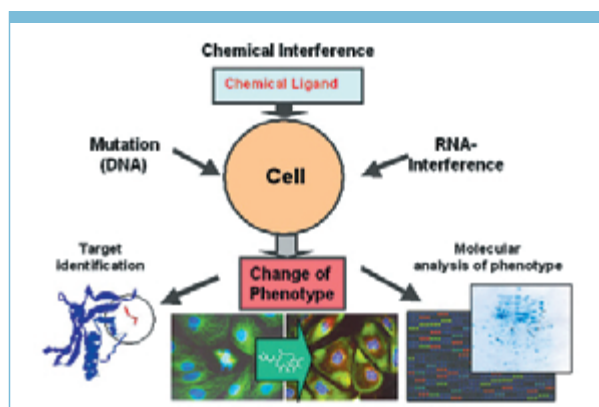
PROGRAMMSPRECHER | Dr. Helmut Blöcker | Abteilung Genomanalyse

- Ziel des Programms ist die Aufklärung zellulärer Funktionsanomalien, wie sie bei menschlichen Krankheiten auftreten. Die Entstehung von Erkrankungen hängt von den genotypischen, beziehungsweise phänotypischen Bedingungen ab. Dazu gehören die angeborenen genetischen Defekte oder Veranlagungen, aber auch Faktoren wie das Alter, die Lebensweise, Interaktionen zwischen Wirt und Erreger sowie Umweltstress. Vergleichende Analysen von Genominformationen sind ein äußerst wichtiges Element der Untersuchung genotypischer und phänotypischer Zusammenhänge in der Gesundheitsversorgung – sowohl für prognostische als auch diagnostische Zwecke. Darüber hinaus ist über die Rolle einzelner Gene innerhalb der Zelle und ihre Interaktion im Zellverband wenig bekannt. Dies gilt ebenso für ihre translationalen und post-translationalen Regelmechanismen. Um diese Fragestellungen zu lösen, lassen sich mit Modellorganismen menschliche Genvarianten – die im Zusammenhang mit der Genfunktion stehen – zu molekularen Ereignissen in Beziehung setzen. Die Forschungsthemen des Programms sind die funktionelle Genomanalyse sowie die Bioinformatik.



- Carola Berg bereitet 96 Proben für die simultane Analyse der DNA-Sequenz in einer Kapillarsequenziermaschine vor.

Foto: Bierstedt



- Drei komplementäre systematische Ansätze zur funktionellen Genomanalyse.



01 Sequenzierung und Funktionsanalyse von genomischer DNA und cDNA

PROJEKTLEITER | Dr. Helmut Blöcker | Abteilung Genomanalyse

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Michael Böcher | Frank Gößling | Michael Jarek | Bernard Neelen | Dr. Gabriele Nordsiek | Rosalila Peneido | Maren Scharfe | Dr. Oliver Schön | Harold Stiege | Dr. Maoyuang Yang

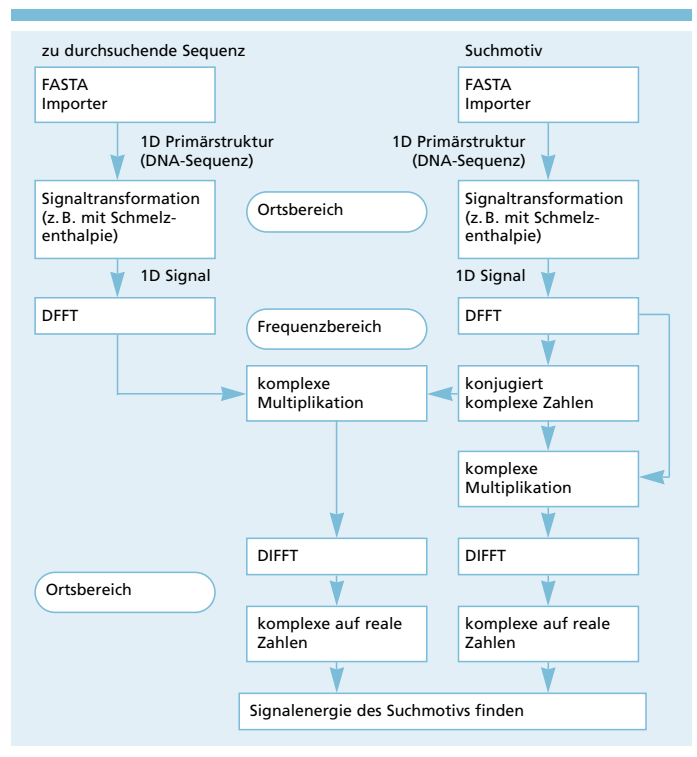
Ziel dieses Projektes ist es, Phänotyp-getriebene Genomforschung zu unterstützen und Genotyp-getriebene funktionsorientierte Genomforschung zu betreiben. Letztere beginnt normalerweise mit einer breiter angelegten Analyse von genomischen Sequenzen und führt über die Verwendung bioinformatischer Methoden schließlich zu Laborexperimenten. Aus den Experimenten verifizieren sich Hypothesen oder lassen sich neu entwickeln. Die drei prinzipiellen Stufen – Sequenzanalyse, Bioinformatik und Laborexperimente – werden im Rahmen dieses Projektes oder in Wechselwirkung mit anderen Projekten realisiert.

Sequenzanalyseprojekte Das Genomlabor der GBF deckt alle Arbeitsgänge von der Erstellung der Klonbibliotheken bis zur bioinformatischen Tiefenanalyse ab und war an mehreren internationalen Sequenzanalyseprojekten beteiligt. Zurzeit können bis zu 6.000 Klone pro Tag analysiert werden. Die Jahreskapazität liegt bei weit über 10 Megabasen bioinformatisch detailliert untersuchter Sequenzinformation. Aus den analysierten neuen Genen werden einige ausgewählte Gene, nachdem sie zellfrei oder in *E. coli* exprimiert werden, auf ihre Funktion analysiert.

Nach Beendigung der EU-Projekte zu Listerien und *Arabidopsis thaliana* laufen weiterhin größere Beteiligungen am Humangenomprojekt des BMBF. Bislang wurden etwa 8 Megabasen aus den Chromosomen 21 und 9 sequenziert und annotiert. Herausragende Ergebnisse waren die Veröffentlichung der Sequenz des humanen Chromosoms 21 und seine bioinformatische Analyse, das Ende der „working draft“-Phase des Humangenomprojektes und schließlich das Erstellen der gesamten menschlichen Genomsequenz in Abschlussqualität. Außerdem wurden von der Gruppe fast 3.0 Mb an neuer humaner cDNA aus organ- oder stadienspezifischen Banken analysiert. Kürzlich konnte die „Shotgun“-Phase der Analyse der gesamten Genome mehrerer Bakterien erfolgreich abgeschlossen werden. Im Rahmen des BMBF-Projektes „Krankheitsbekämpfung durch Genomforschung“ (NGFN) wurden ausgewählte Bereiche des Rattengenoms und des Chromosoms 22 des Schimpansen untersucht.

Neue Technologie Durch Eigenentwicklungen ist die Roboterstraße zur automatischen DNA-Präparation und anschließenden automatischen Sequenzierung weiter ausgebaut worden. Dieser Ausbau ermöglicht eine schnelle

Allgemeines Schema für den Vergleich von DNA-Sequenzen über einen Detektionsfilter



Erweiterung, Umgestaltung oder auch Umnutzung der Anlage. Für eine Weiterentwicklung der Software-Umgebung für die farbbasierte digitale Bildverarbeitung werden Prinzipien der Signaltheorie genutzt, um in komplexen und auch gestörten Bildern – exakter als dies bisher möglich gewesen ist – automatisch Objekte beliebiger Klassen zu erkennen. Auf einem ebenfalls signaltheoretischen Ansatz beruht eine völlig neuartige Bioinformatik-Technologie zur Analyse informationstragender Biomoleküle. Die Vorteile: Die Analysen beruhen auf physikochemischen Eigenschaften und nicht auf Buchstaben-Ähnlichkeiten oder Häufigkeiten und ermöglichen daher einen neuen Blickwinkel auf alte Probleme. Es ist möglich, einfache Fragestellungen zu komplexen mehrdimensionalen Fragen zu kombinieren, ohne an Geschwindigkeit zu verlieren. Und die Hardware ist günstig – etwa einfache Intel-basierte Rechner. Diese Technologie wird weiterentwickelt für vergleichende Protein- und DNA-Analyse, Mustererkennung in komplexen Bildern und Modellierung von Infektionsprozessen in Echtzeit-Nähe.



02 Modellierung regulatorischer Netzwerke

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Edgar Wingender* | Arbeitsgruppe Bioinformatik

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Torsten Crass | Frank Gössling | Dr. Ines Liebich | Dr. Holger Michael | Dr. Anatolij Potapov | Tilman Sauer | Dr. Klaus Seidl | Ekaterina Shelest

Die Arbeitsgruppe Bioinformatik entwickelte computergestützte Methoden zur Modellierung regulatorischer Netzwerke durch die Integration von Signaltransduktions- und Genregulationsprozessen.

Signaltransduktionswege und regulatorische Netzwerke Im Rahmen des vom BMBF geförderten Deutschen Human Genom Projektes 2 (DHGP2) wurden neue Methoden zur formalen Beschreibung von Signaltransduktionswegen und regulatorischen Netzwerken erarbeitet. Zudem wurde ein Computersystem zur Modellierung regulatorischer und metabolischer Netzwerke auf den verschiedenen Ebenen biologischer Organisation entwickelt. Dieses PheGe (Phenotype-Genotype)-System wurde als Plattform zur Verknüpfung von Genotypen und molekularen und klinischen Phänotypen entworfen. Als Anwendungsbeispiel wurde die Erfassung der genetischen und molekularen Grundlagen von Diabetes Typ II (MODY) und ihrer klinischen Erscheinungsbilder gewählt – gemeinsam mit den Verbundpartnern an den Universitäten Magdeburg, Köln und Tübingen/Reutlingen sowie der GSF in Neuherberg.

Promotoranalysen Im Rahmen des BMBF-Projektes „Intergenomics“ wurden Beiträge zur Erarbeitung und Verfeinerung von Methoden zur bioinformatischen Promotoranalyse geliefert. Die Gene, deren Promotoren analysiert wurden, sind an den Immunreaktionen nach Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt. Mit den entwickelten Verfahren lassen sich Genexpressionsdaten, die durch Microarray-Ansätze gewonnen wurden, in biologische Zusammenhänge bringen und erklären.

Datenbank-Entwicklungen Der Abschluss der systematischen Annotation von bekannten regulatorischen Elementen des Hefegenoms und der daran bindenden Transkriptionsfaktoren war das Ergebnis des EU-Projektes CYGD (Comprehensive Yeast Genome Database). Daraus entstand eine eigenständige und öffentlich zugängliche Datenbank, deren Struktur sich an der bekannten TRANSFAC®-Datenbank anlehnt (TSM, TRANSFAC *Saccharomyces* Module). Im Internet zu finden unter <http://transfac.gbf.de/homepage/databases/tsm/index.html>. Als Teil des Helmholtz-Netzwerkes für Bioinformatik (HNB) hat die Arbeitsgruppe weitere Datenbankprojekte durchgeführt. Hierzu gehören die S/MARt DB, eine Datenbank über „Scaffold/Matrix Attached Regions“ – Kernmatrix-Anheftungsregionen – eukaryoter Genome, und ReAlSplice, eine Datenbank über regulierte alternative Spleißstellen und die an diesen wirkenden Spleißfaktoren.

Darüber hinaus war die Arbeitsgruppe verantwortlich für die zentralen WWW-Services des HNB und hat das in der Bioinformatik übliche Tool-orientierte Serviceangebot durch einen nutzerfreundlichen Task- beziehungsweise Problem-orientierten Zugang zu bioinformatischen Problemlösungen ergänzt. Insbesondere konnten gemeinsam mit den Verbundpartnern eine Reihe von „Task-Kaskaden“ definiert werden, die den Nutzer automatisch durch eine Abfolge von Programmen leiten. Diese laufen auf den verschiedenen angeschlossenen Servern der beteiligten Institutionen und erzeugen so eine integrierte Ergebnisausgabe.

* Dr. E. Wingender ist einem Ruf auf die C4-Professur für Bioinformatik an der Georg-August-Universität Göttingen gefolgt:
Medizinische Fakultät, Abt. Bioinformatik
Georg-August-Universität Göttingen
Goldschmidtstraße 1
37077 Göttingen



03 Ligand-basierte Entdeckung biologischer Zielmoleküle

PROJEKTLEITER | Dr. Ronald Frank | Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung

PROJEKTMITARBEITER | Ulrike Beutling | Krzysztof Bialek | Dr. Antonius Dikmans |

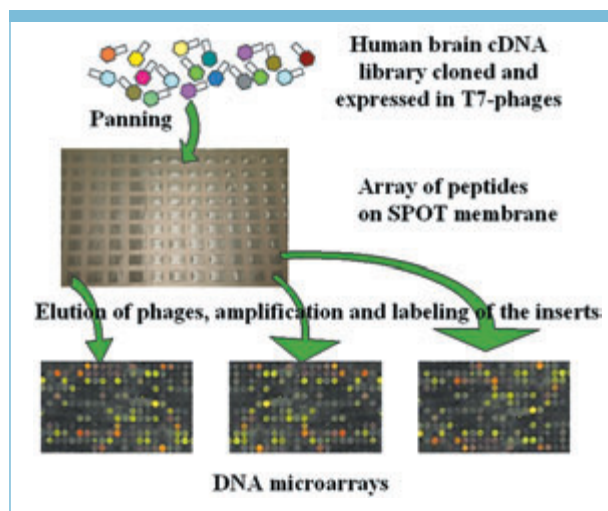
Varsha V. Gupte | Dr. Jutta Niggemann | Dr. Rene Rübenhagen | Andrzej Swistowski | Dr. Werner Tegge

Zufällige und gezielte Mutagenese sowie mRNA-Inaktivierung durch Antisense- und RNAi-Methoden sind die Ansätze der klassischen und reversen Genetik. Mit ihnen wird die Funktion von Genen gestört und über die phänotypische Auswirkung der Störung analysiert. Hierzu hat sich in den letzten Jahren ein attraktiver komplementärer Ansatz entwickelt. Mit chemischen Verbindungen werden die Genprodukte – im wesentlichen Proteine – direkt in ihrer Funktion beeinflusst. Die Proteine werden durch die Bindung der chemischen Liganden aktiviert oder inhibiert. Ein solches chemisches Interferenzkonzept ist mit entsprechend kompetenten und vielseitig konstruierten Molekülbibliotheken ebenso global-genomisch und systematisch angelegt wie die derzeit verwendeten Methoden der molekularen Genetik.

Chemische Interferenz Das Konzept der chemischen Interferenz für die Genomanalyse impliziert, dass gegen fast jedes Genprodukt ein selektiv bindender Ligand erzeugt werden kann. Die Machbarkeit dieses Konzeptes stützt sich auf die großen Erfolge kombinatorischer Synthese- und Selektionsverfahren, welche hochaffine Liganden gegen viele komplexe biologische Zielstrukturen empirisch, also durch systematische Suche aus umfangreichen Substanzsammlungen, entwickelt haben. Chemische Kombinatorik und funktionelle Genomanalyse kommen hier zusammen und entwickeln gemeinsame experimentelle Ansätze.

Hirnspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen

Das menschliche Gehirn wird mit neuen Bio-Chip-Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse untersucht – ein Forschungsvorhaben, das vom BMBF gefördert wird. Das Ziel ist ein automatisiertes Verfahren, das ausschließlich auf Hochdurchsatz-„Screening“-Methoden mit Chip-Technologie basiert. Mit ihm sollen die Interaktionen zwischen Protein-Domänen und Peptidliganden genomweit kartiert werden. Eine auf Bakteriophagen präsentierte cDNA-Expressionsbibliothek aus Hirn-mRNA dient als Quelle für die Protein-Domänen. Die Peptidliganden werden chemisch synthetisch hergestellt und als Arrays mit 103 bis 106 Elementen eingesetzt. Nach multipler Affinitätsanreicherung der peptidspezifischen Phagen auf dem Peptid-Array erfolgt eine ortsgerichtete Elution, Vermehrung und letztlich Identifizierung der gebundenen Phagenpopulationen mit Hilfe von DNA-Mikroarrays. Als Ergebnis erwarten wir ein umfangreiches Datennetz über hirnspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen und potenzielle Targets für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung.



- Verfahren zum genomweiten Kartieren von Protein-Peptid-Interaktionen.

Mit kombinatorischer chemischer Synthese werden auch Verbindungsbibliotheken entwickelt, deren Grundstrukturen von Naturstoffen abgeleitet sind. Solche Bibliotheken werden intern für Screeningprojekte vorgehalten, aber auch im Rahmen einer Förderung durch das NGFN für die von der GBF initiierte Plattform „Chemische Genomik“ hergestellt. Die GBF ist hier die zentrale chemische Syntheseeinheit und interagiert mit bis zu zehn Partnern aus den krankheitsorientierten medizinischen Netzwerken.

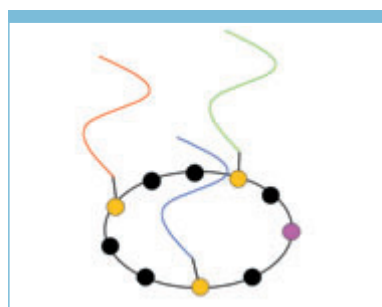


04 Konformationelle Protein-Ligand-Interaktionen

PROJEKTLEITERIN | Dr. Jutta Eichler | Arbeitsgruppe Konformationelle Protein-Ligand Interaktionen

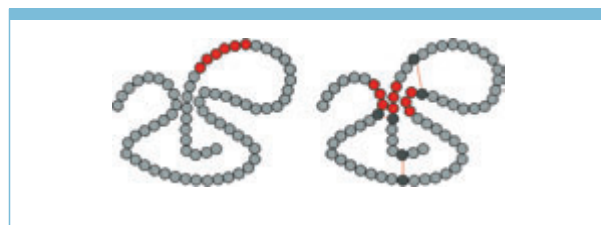
PROJEKTMITARBEITER | Numan Akyol | Dr. Christian Doll | Raimo Franke | Cornelia Hunke | Enge Sudarman

Biologische Prozesse basieren auf spezifischen Bindungsereignissen, die durch molekulare Erkennung zwischen Proteinen – Rezeptoren, Antikörpern oder Enzymen – und ihren Liganden – Antigenen, Hormonen oder Substraten – eingeleitet werden. Die systematische Erforschung dieser Erkennungsmechanismen auf molekularer und submolekularer Ebene ist sowohl ein wichtiger Beitrag zum strukturellen Verständnis von Protein-Ligand-Interaktionen als auch eine Voraussetzung für die gezielte Beeinflussung biologischer Funktionen, die durch die entsprechenden Interaktionen vermittelt werden. Synthetische Moleküle, die auf Grund ihrer spezifischen molekularen Architektur in der Lage sind, Proteinbindungsstellen nachzuahmen, eröffnen eine aussichtsreiche Strategie für die Erforschung und das Verständnis von Proteinstruktur und -funktion. Neben ihrer grundsätzlichen Bedeutung für das Verständnis von Protein-Ligand-Interaktionen sind solche synthetischen Proteinmimetika auch aussichtsreiche Kandidaten für vielfältige biomedizinische Anwendungen.



- *Cyclische Peptide als Gerüstmoleküle für diskontinuierliche Peptide. Schwarz: Rückgrataminosäuren zur Variierung der Ringgröße. Gelb: Diaminosäuren als regioselektiv adressierbare Anknüpfungstellen für Peptidfragmente. Rot, grün, blau: Aus der Proteinstruktur abgeleitete Peptidfragmente, die eine diskontinuierliche Proteinbindungsstelle bilden.*

Biomimetische Synthese Die Bindungsstellen vieler biomedizinisch relevanter Proteine sind nicht in kontinuierlichen Sequenzabschnitten des Proteins lokalisiert, sondern in Fragmenten, die in der Proteinsequenz weit auseinanderliegen. Sie werden erst durch Proteinfaltung in räumliche Nähe gebracht. Das Ziel der Arbeitsgruppe ist es, ein generelles Konzept für die Mimikry solcher diskontinuierlicher Proteinbindungsstellen durch synthetische Moleküle zu implementieren. Diese Moleküle werden entweder auf der Grundlage der bekannten Struktur der Proteinbindungsstelle, durch so genanntes „rational design“, entworfen oder durch das „Screening“ spezifisch gestalteter kombinatorischer Peptidbibliotheken identifiziert, in denen Peptidfragmente nichtlinear und diskontinuierlich über ein molekulares Gerüst präsentiert werden. Das bisher entwickelte Methoden-Repertoire ermöglicht die Synthese vielfältiger Gerüstmoleküle mit unterschiedlicher konformationeller Flexibilität für die Herstellung diskontinuierlicher Peptide als potentielle Proteinmimetika. Diese Gerüstmoleküle sind zyklische Peptide, deren Ringgröße zwischen 13 und 33 Atomen variiert. Das wird durch den Einbau von Aminosäuren unterschiedlicher Rückgratlänge erreicht. Orthogonal geschützte Diaminosäuren dienen als regioselektiv adressierbare Anknüpfungstellen für bis zu drei verschiedene Peptidfragmente. Targets sind Protein-Ligand-Interaktionen, deren Strukturen und Bindungsspezifitäten ausführlich untersucht und aufgeklärt sind. Dazu gehören die diskontinuierliche Bindungsstelle der Mena-EVH1-Domäne für Polyprolin-Liganden, die Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins Internalin A mit dem Wirtszell-Rezeptor E-Cadherin beziehungsweise von viralem Interleukin-6 mit dem Rezeptor gp130 sowie die diskontinuierliche Bindungsstelle des viralen Hüllproteins gp120 für den CD4-Rezeptor auf T-Zellen.



- *Sequenziell kontinuierliche (links) und diskontinuierliche (rechts) Proteinbindungsstellen (Aminosäurereste der Bindungsstelle sind rot).*





05 Vergleichende Strukturanalyse metaboler Stoffwechselwege

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Dirk Heinz | Abteilung Strukturbiologie

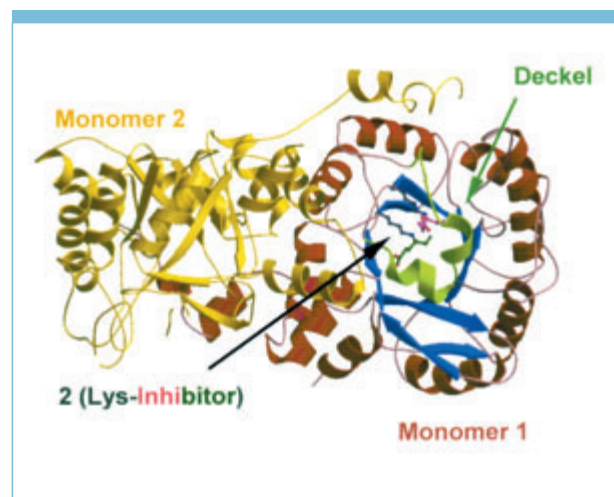
PROJEKTMITARBEITER | Isabell Astner | Dr. Wolf-Dieter Schubert | Jörg Schulze



Vielschichtige Parallelen zwischen dem menschlichen und dem bakteriellen Metabolismus unterstreichen die Darwinsche Hypothese eines gemeinsamen, evolutionären Ursprungs aller Lebensformen. Untersuchungen an Bakterien liefern folglich häufig vereinfachte Spiegelbilder des menschlichen Organismus und seiner Funktionsweise. Aber auch die offensichtlichen Unterschiede zwischen Mensch und Bakterium sind für die Forschung von Interesse. Abweichende Routen bei der biologischen Synthese wichtiger Stoffe bieten beispielsweise Angriffspunkte für die Entwicklung von Antibiotika, die spezifische Schwächen der Bakterien nutzen, ohne dabei den Menschen zu schädigen.

Tetrapyrrole wie Häm, Chlorophyll und Vitamin B12 sind als Kofaktoren vieler Enzyme unverzichtbar für alle Organismen. Aber auch als Energie- und Elektronenträger in der Photosynthese und Respiration sowie als Sauerstofftransporter im Blut sind sie von Bedeutung. Der erste gemeinsame Vorläufer aller Tetrapyrrole ist das Porphobilinogen, das von der Porphobilinogensynthase (PBGs) aus zwei asymmetrisch miteinander verknüpften Aminolävulinsäure-Molekülen synthetisiert wird. Die PBGS ist in allen Organismen zu finden, zeigt jedoch bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und Metallionenabhängigkeit deutliche Unterschiede.

1999 gelang es der Arbeitsgruppe, die Struktur der PBGS aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* bei hoher Auflösung aufzuklären. Dennoch blieb trotz dieser und weiterer Kristallstrukturen der katalytische Mechanismus des Enzyms unklar. Durch die Kokristallisation der PBGS mit dem Inhibitor 5-Fluorolävulinsäure – ein Analogon des natürlichen Substrats Aminolävulinsäure – gelang es nun, ein Reaktionsintermediat einzufangen und darüber einen plausiblen Reaktionsmechanismus zu formulieren. Erstmals zeigte diese Kristallstruktur eine Besetzung beider Bindungstaschen im aktiven Zentrum. Beide Inhibitoren, die mit dem natürlichen Substrat bis auf wenige Atome identisch sind, werden über Schiffsbasen kovalent an zwei Lysinreste gebunden. Eines der beiden Inhibitor-Moleküle wird dabei durch die Proteinumgebung in eine planare Konformation gebracht. Der dadurch angedeutete Übergangszustand unterstützt deutlich einen bereits postulierten Reaktionsmechanismus. Die Metallionen, die ebenfalls im aktiven Zentrum gebunden werden, scheinen für die korrekte Ausrichtung der Substratmoleküle verantwortlich zu sein. Weitere Untersuchungen sollen klären, weshalb die PBGS unterschiedlicher Organismen unterschiedliche Ionen-Spezifitäten besitzen.



- Die Kristallstruktur eines funktionellen PBGS-Dimers. Monomer 1 ist farbig dargestellt, Monomer 2 in gelb. Im aktiven Zentrum sind zwei Inhibitor-Moleküle (rot und grün) über Schiffsbasen an zwei Lysinreste gebunden.



06 Modellierung und Analyse metabolischer Netzwerke

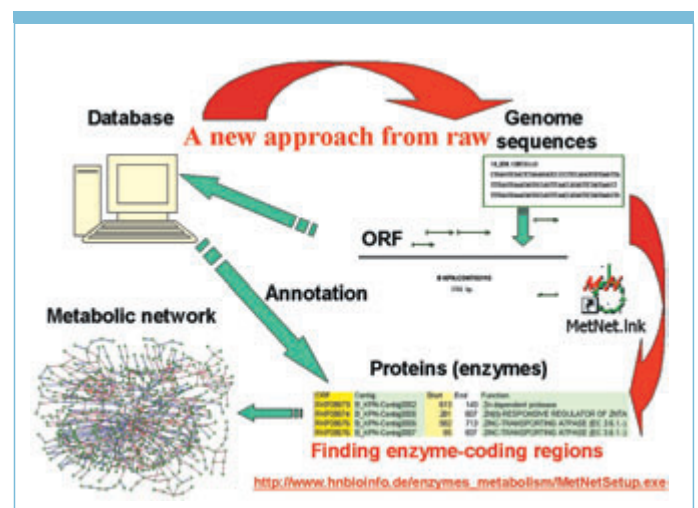
PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. An-Ping Zeng | Abteilung Genomanalyse

PROJEKTMITARBEITER | Marcio Rosa da Silva | Eun-Jin Kim | Dr. Hong Wu Ma | Dr. Wael Sabra | Jibin Sun

Eine Gen-Enzym-Reaktionsdatenbank wurde im Rahmen des Projektes erweitert und von 81 Organismen wurden die metabolischen Netzwerke über Genomdaten aufgestellt. Zur topologischen und funktionalen Analyse der Netzwerke wurde die Stoffwechselweglänge – „path length“ (PL) – neu definiert. Bei dem Vergleich der durchschnittlichen PL-Werte verschiedener Organismen zeigte sich, dass Eukaryoten und Archaeobakterien generell eine höhere PL aufweisen als Bakterien. Dies deutet auf strukturelle und evolutionäre Unterschiede der metabolischen Netzwerke hin.

Zur *in silico*-Rekonstruktion metabolischer Netzwerke aus nicht annotierten Sequenzdaten ist eine neue Methode entwickelt worden. Statt offene Leseraster (ORF) zur Abfrage in öffentlichen Datenbanken zu nutzen, werden Sequenzen aus öffentlichen DNA- und Protein-Datenbanken als Abfrage in einer lokalen Datenbank verwendet. Mit den rohen Genomsequenzen für einen bestimmten Organismus werden ORF-ähnliche Sequenzregionen (ORF-SRs) identifiziert. Sie kodieren metabolische Enzyme. Das Genom von *Salmonella typhimurium* LT2 wurde zur Demonstration der Methode herangezogen. Mit den Datenbanken SWISS-PROT und TrEMBL wurden 99% der 1050 ORFs als Enzyme mit einer EC-Nummer identifiziert und den gleichen Funktionen zugeordnet. Zwei Versionen der rohen Genomsequenzen von *Klebsiella pneumoniae* wurden zur Identifizierung von OFR-SRs miteinander verglichen. Mehr als 98% der Enzyme, die aus den 7,9fachen Genomdaten identifiziert wurden, konnten auch aus den nur 3,9fachen Genomsequenzen identifiziert werden. Diese Methode ist daher besonders gut geeignet für eine frühzeitige Analyse der metabolischen Netzwerke bei Genomsequenzierungsprojekten.

Modellierung metabolischer und genetischer Netzwerke Bei diesem Teilprojekt des BMBF-Projektes „Intergenomics“ wird angestrebt, mathematische Modelle für die Analyse und Simulation metabolischer und genetischer Netzwerke von *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 zu entwickeln, die an der Bildung von Virulenzfaktoren und von Faktoren des Stressmetabolismus beteiligt sind. Die dazu notwendigen Daten wurden durch Kultivierung unter definierten physiologischen Bedingungen generiert. Dabei ist die Arbeitsgruppe auf einen möglicherweise neuen Abwehrmechanismus gegen reaktive O₂-Spezies gestoßen, für den in der Literatur bislang hauptsächlich die Bildung von bestimmten Enzymen wie etwa Katalase diskutiert wurde. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass *P. aeruginosa* den Transport von O₂ in die Flüssigkeitsphase blockiert und dabei eine starke O₂-Limitierung verursachen kann. Dadurch steht nicht genügend O₂ für die Bildung von reaktiven Spezies zur Verfügung. Unter diesen Bedingungen wächst *P. aeruginosa* besser und bildet verstärkt bestimmte Virulenzfaktoren wie Elastase.



- Rekonstruktion metabolischer Netzwerke aus genomischen Informationen. Die blauen Pfeile zeigen den konventionellen Weg der Nutzung von annotierten Sequenzdaten über die Vorhersage von ORF. In der von uns entwickelten neuen Methode (rot markierte Pfeile und Texte) wurde der Abfragevorgang umgekehrt und der Annotationsprozess durch die einfachere Identifizierung der Enzyme kodierenden Sequenzregionen vereinfacht.



Programm „Nachhaltige Nutzung von Landschaften“

PROGRAMMSPRECHER | Prof. Dr. Kenneth N. Timmis | Abteilung Umweltmikrobiologie



- Mikroorganismen sind ubiquitär. Ihr Lebensraum definiert die Biosphäre, indem sie Umweltbedingungen tolerieren, die für höhere Organismen viel zu extrem sind. Mikrobielle Aktivitäten beeinflussen in hohem Maße sowohl globale Prozesse wie den Kohlenstoffkreislauf und die globale Erwärmung als auch lokale Prozesse. Sie verursachen Krankheiten bei Mensch und Tier und stellen essenzielle 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 einen Großteil der Krankheiten und Todesfälle, andere stellen uns Antibiotika zur Verfügung, mit denen sich genau diese Krankheiten behandeln lassen. 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 Aktivitäten 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 wachsen Mikroben jedoch in komplexen, diversen und dynamischen Gemeinschaften. Ihre Mitglieder interagieren und teilen die verfügbaren Ressourcen auf komplexe Weise. Es sind diese Interaktionen sowie diejenigen mit anderen biotischen und abiotischen Komponenten des Habitats, die die Aktivitäten der Gemeinschaft bestimmen.

Die Ziele des Forschungsprogramms „Mikrobielle Diversität“ bestehen darin, mikrobielle Gemeinschaften als funktionelle Einheiten zu verstehen und kritische Interaktionen aufzudecken, die die Aktivitäten von Gemeinschaften steuern, und desweiteren Interventionen zu entwickeln und zu validieren, die zu substanziellen Erhöhungen von biotechnologisch interessanten Aktivitäten führen sowie neue mikrobielle Produkte und Stoffwechselaktivitäten durch Exploration der mikrobiellen Diversität zu entdecken. Das Forschungsprogramm ist charakterisiert durch zwei Ansätze: Den multiskaligen Ansatz, der Gen, Organismus, Gemeinschaft, Reagenzglas, Chemostat und natürliches Habitat umfasst. Und den multidisziplinären Ansatz, der mikrobielle Ökologie, Physiologie, Phylogenetik, Biochemie, analytische Chemie, Genetik/Genomik, Bioinformatik und Modellbildung beinhaltet.

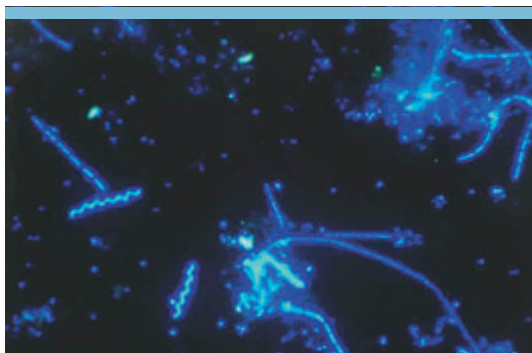


01 Funktionelle Genomik und Nischenspezifität

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Kenneth N. Timmis | Abteilung Umweltmikrobiologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Andreas Felske | Olga Golyshina | Filip Kamenski | Dr. Matthias Labrenz |
Dr. Alexander Neef | Daniela Regenhardt | Dr. Vitor Dos Santos | Massimo Strocchi | Dr. Roland Weller |
Dr. Dirk Wenderoth

In Zusammenarbeit mit den Firmen TIGR (USA) und Qiagen sowie dem Deutschen Krebsforschungsinstitut (DKFZ) und der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) konnte das gesamte Genom vom Sicherheitsstamm *Pseudomonas putida* KT2440 identifiziert und annotiert werden. Diese Untersuchungen brachten eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Genen hervor, deren Produkte in die Transkriptionsregulation, Transportmechanismen, Reaktion auf Umweltsignale und den Katabolismus involviert sind. Diese Ergebnisse bestätigen, dass *P. putida* umfangreiche zelluläre Mechanismen besitzt, die es den Zellen ermöglichen, in diversen Habitaten erfolgreich mit anderen Mikroorganismen zu konkurrieren. Genomvergleiche zwischen dem saprophytisch lebenden Stamm KT2440 und einem pflanzen- und tierpathogenen *Pseudomonas* Stamm zeigten, dass KT2440 Schlüsselvegene fehlen, die die Virulenz gegenüber einem potenziellen Wirt betreffen. Diese umfassen Gene für Exotoxine, spezifische hydrolytische Enzyme, Typ III Sekretionssysteme sowie Faktoren für spezifische hypersensitive Antworten des Stammes auf Umwelteinflüsse. Die genetischen Vergleiche zwischen KT2440 und dem pathogenen Stamm zeigten weiterhin, dass bestimmte Eigenschaften tatsächlich nur für eine effektive Kolonisierung und das Überleben auf Oberflächen nötig, jedoch nicht obligatorisch für die Pathogenität sind. Die Genomanalyse bestätigte die Nicht-Virulenz von KT2440 und stellte somit die genetische Basis für die biologische Sicherheit dieses Bakteriums dar.



- Um Bakterien aus der Umwelt studieren zu können, werden kultur-unabhängige Verfahren eingesetzt, denn die meisten von ihnen können bisher nicht im Labor kultiviert werden. Die Klonierung der Gesamt-DNA aus Umweltproben in Metagenom-Bibliotheken erschließt auch die nicht-kultivierten Bakterien biotechnologischen Anwendungen.

***P. putida* und *P. aeruginosa* – ein Vergleich** *In silico*-Modelle, die die Genotyp-Phänotyp-Interaktionen für *P. putida* und *P. aeruginosa* beschreiben, wurden von den entsprechenden Genomsequenzen, dem biochemischen Wissen und der stammspezifischen Information abgeleitet. Ein Vergleich des zentralen Stoffwechsels dieser Bakterien bestätigte, dass die Zahl der elementaren Abbaupfade bei *P. aeruginosa* zwei bis sechs Mal höher ist als von *P. putida*. Zusätzlich verfügt *P. aeruginosa* insgesamt über zwei zusätzliche Abbaureaktionen. Dies beweist die höhere Flexibilität im Stoffwechsel von *P. aeruginosa* verglichen mit *P. putida*. Dies ist offensichtlich eine Eigenschaft dieser Art von Genomanalyse, die mit herkömmlichen linearen Korrelationen auf Basis der Genlisten nicht möglich war.

Eine Proteinkarte von KT2440 wurde erstellt und die spezifische Antwort des Proteoms auf Umwelteinflüsse wie Adhäsion an Oberflächen, Eisenmangel und Wasserstress untersucht. Eine Vielzahl von verschiedenen exprimierten Proteinen konnte identifiziert werden. Eine Bibliothek mit Mini-Transposonmutanten wurde aufgebaut, um die *in silico*-Vorhersagen über das ökophysiologische Verhalten von *P. putida* zu beweisen.

Im Rahmen des Genomik-Netzwerks Bielefeld wird zurzeit die Genomsequenz von dem universell oligotrophen Bakterium *Alcanivorax borkumensis* bestimmt, eine Mutantenbank aufgebaut und das Proteom analysiert. Das gesamte Genom soll annotiert und ein *in silico*-Modell des Stoffwechsels – ähnlich wie bei den *Pseudomonas*-Stämmen – erstellt werden. Vergleiche mit dem universell copiotrophen *P. putida* Genom sollen Schlüsselfunktionen der unterschiedlichen Lebenszyklen zeigen, welche dann experimentell bestätigt werden können.



02 Biofilm-Gemeinschaften in Umwelt und Gesundheit

PROJEKTLEITER | Dr. Wolf-Rainer Abraham | Arbeitsgruppe Chemische Mikrobiologie

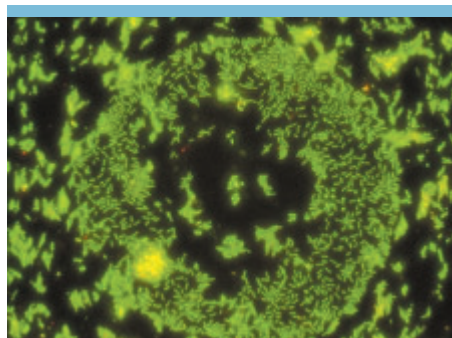
PROJEKTMITARBEITER | Wanda Fehr | Dr. Christa Hoch | Dr. Heidrun Jungnitz | Dr. Heinrich Lünsdorf |

Dr. Björg Pauling | Stefanie Tillmann | Prof. Dr. Kenneth Timmis | Dr. Irene Wagner-Döbler | Dr. Dirk Wenderoth |

Kerstin Wilke | Robert Witzig

Eine komplexe Biofilm-Lebensgemeinschaft, die aus einem mit polychlorierten Biphenylen (PCB) belasteten Boden stammt, konnte auf PCB-Tropfen gezogen werden. Sie enthält eine Vielzahl von *Burkholderia*-Stämmen, die auch in Reinkultur isoliert werden konnten. Diese Isolate sind zwar in der Lage, niedrig chlorierte PCB-Kongenere abzubauen, aber nur die Biofilm-Gemeinschaft kann tri- und tetrachlorierte PCBs verwerten. Um die Organismen zu identifizieren, die die höher chlorierten PCBs abbauen, wurden der PCB-Mischung ^{13}C -markierte Kongenere zugesetzt und in Mikrokosmen-Versuchen der Einbau der ^{13}C -Markierung in die bakterielle Biomasse durch Isotopen-Massenspektrometrie verfolgt. Um zwischen den verschiedenen Bakteriengruppen unterscheiden zu können, mussten spezifische Biomarker identifiziert werden. Es wurde eine Methode entwickelt, um taxaspezifische 23S-ribosomale RNA (rRNA) zu isolieren. Aber die 23S rRNA erwies sich als ein Zielmolekül, das einen nur sehr langsamen Isotopen-Einbau zeigte. Gleichzeitig wurden die Fettsäuren der Phospholipide aus demselben Experiment isoliert und eine gute Markierung für sie gefunden. Die Fettsäuren mit den höchsten Einbauraten in diesem Experiment waren dieselben, die auch in den *Burkholderia*-Isolaten gefunden wurden. Damit müssen die *Burkholderia*-Arten für den Abbau der höher chlorierten Kongenere zuständig sein. Durch den Einsatz der „Tracer“-Technologie konnte gezeigt werden, dass durch die komplexe Biofilm-Gemeinschaft Verbindungen abgebaut werden können, die nicht durch ihre Reinkulturen verwertet werden können. Um einen weiteren Einblick in das metabolische Potenzial der Biofilm-Gemeinschaft zu bekommen, wurde deren Gesamt-DNA – das sogenannte Metagenom – kloniert. Es wird zur Zeit in dem Projekt „Funktionale Genomik“ weiter untersucht.

Katheter-Biofilme Um den ungehinderten Abfluss des Gallensaftes sicherzustellen, wird Patienten mit entsprechenden Problemen ein Gallengang-Katheter eingesetzt. Durch den Aufwuchs von Bakterien im Katheter entsteht ein dicker Biofilm, der schließlich den Katheter verstopft und zu schweren Koliken führt, weshalb der Katheter ersetzt werden muss. Die Arbeitsgruppe untersuchte Katheter verschiedener Braunschweiger Patienten und verglich die Biofilm-Gemeinschaft mit denen von Patienten aus Kiel und Italien. Das Ergebnis war, dass einige Bakterienstämme in allen Proben vorkommen und jede Probe zusätzlich ihre eigenen spezifischen Stämme hatte. Biofilme aus Kathetern von Patienten einer Region waren untereinander ähnlicher als zu denen entfernter Regionen. In Mikrokosmen-Experimenten wurde mit dem Katheter-Inokulum eine ausgeprägte Sukzession bei der Kolonisierung beobachtet. Erstbesiedler war immer *Pseudomonas aeruginosa*, der auch in allen bisher untersuchten Katheter-Biofilmen nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Gallensaft einer der Hauptfaktoren ist, der die mikrobielle Lebensgemeinschaft bestimmt.



- Ein auf einem Mikrotröpfchen PCB aufgewachsener Biofilm. Die grün fluoreszierenden Bakterien leben, gelb gefärbte sind geschädigt und die wenigen rot gefärbten sind tot. Man beachte die verschiedenen Morphologien der Bakterien (z. B. die Gruppe im Zentrum).

Foto: GBF



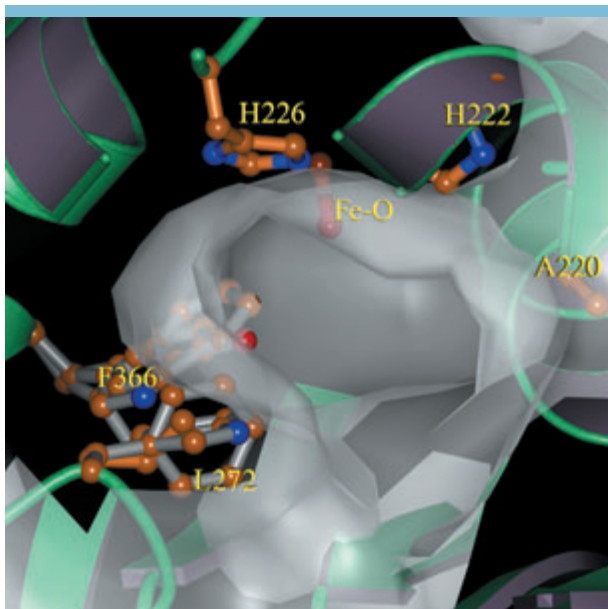
03 Metabolische Diversität

PROJEKTLEITER | Priv.-Doz. Dr. Dietmar Pieper | Arbeitsgruppe Biodegradation

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Hans-Adolf Arfmann | Wera Bode | Dr. Heike Görres | Dr. Bernd Hofer |

Howard A. Junca | Anna-Maria Kicinska | Patricia Nikodem | Dr. Peter Rapp | Carsten Strömpl | Sabine Wittrock

Mikroorganismen zeichnen sich sowohl durch ihre Vielfalt an metabolischen Leistungen als auch durch ihre Flexibilität in der Anpassung an neue Umweltbedingungen aus. Zur Charakterisierung mikrobieller Netzwerke ist sowohl ein detailliertes Verständnis des Stoffwechsels in Reinkulturen und Modellgemeinschaften als auch die Verfügbarkeit kultivierungsunabhängiger Werkzeuge zur Analyse komplexer mikrobieller Systeme notwendig. Das Projekt konzentriert sich auf den Stoffwechsel hydrophober Aromaten, die Diversität metabolischer Reaktionen in Umweltgemeinschaften und deren molekulare Determinanten. Um Struktur-Funktionsbeziehungen in Dioxygenasen, die den aromatischen Ring aktivieren und somit den Abbau einer Vielzahl an Schadstoffen einleiten, zu untersuchen, wurden Gene aus neuen bakteriellen Isolaten analysiert, Hybrid-Gene erzeugt und zielgerichtete Mutagenese durchgeführt. So konnten Mutanten mit neuen Spezifitäten zum Umsatz von Chlortoluolen und polychlorierten Biphenylen gewonnen werden. Durch Sequenzvergleiche konnten Enzymregionen identifiziert werden, die von besonderer Wichtigkeit für die Interaktion von Substraten mit dem aktiven Zentrum sind.



- Modell der Tetrachlorbenzol Dioxygenase, welches den Einfluss von Mutationen in Position 272 und insbesondere in Position 366 auf die Form der Substratbindungstasche zeigt.

Enzymaktivitäten in der Balance *Pseudomonas* MT1 stammt aus einer Chlorsalicylat abbauenden definierten Mischkultur, in der komplexe metabolische Interaktionen stattfinden, welche diese Gemeinschaft für Abbauprozesse robuster macht als Einzelstämme. Für den Abbau von Chlorsalicylat durch *P. MT1* wurde vermutet, dass dieser über das hochtoxische Protoanemonin erfolgt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Stamm einen neuen Mechanismus zur Verhinderung der Bildung dieses Stoffes entwickelt hat. Der Abbau von Chloraromaten setzt somit ein gut ausbalanciertes Netz an Enzymaktivitäten voraus. Da solch eine Balance nur ausnahmsweise in Einzelstämmen vorkommt, ist offensichtlich, dass komplexe mikrobielle Gemeinschaften bei Abbauprozessen von Vorteil sind.

Chloraromaten aus verschiedenen Habitaten Das Potenzial für den Abbau von Chloraromaten wurde in verschiedenen Habitaten untersucht. Hierzu wurden sowohl die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften als auch das Vorhandensein von Abbaugenen mittels PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern an drei Klassen von Schlüsselgenen bestimmt. Die Analyse der Zusammensetzung während der Biostimulation zeigte, dass sich unterschiedliche Chloraromaten abbauende Gemeinschaften entwickeln. Allerdings dominieren in allen Mikrokosmen nach der Stimulation Organismen, die Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenase-Aktivität aufweisen. Das konnte sowohl durch genetische als auch neue biochemische Methoden nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass die Untersuchung der Funktion mikrobieller Gemeinschaften eine Analyse der Zusammensetzung an katabolischen Genen erfordert. Eine reine Bestimmung der beteiligten Arten reicht nicht aus.

Sowohl Pseudomonaden, die direkt aus den Bodenproben isoliert werden konnten, als auch *Acidovorax*-Stämme aus biostimulierten Anreicherungen zeigten PCR-Amplifizierungssignale mit spezifischen Primern für Chlorbenzol Dioxygenasen und Chlorbrenzcatechin-1,2-Dioxygenasen. Das deutet darauf hin, dass diese Stämme einen klassischen Chlorbenzol-Abbauweg aufweisen, der auch für den Abbau unter Umweltbedingungen verantwortlich ist.



04 Naturstoffe

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Kenneth N. Timmis | Abteilung Umweltmikrobiologie

PROJEKTMITARBEITER | Dr. Tatiana Chernikova | Wanda Fehr | Dr. Manuel Ferrer | Dr. Christa Hoch |

Dr. Gabriella Molinari | Dr. Björg Pauling | Magally Romero-Tabarez | Dr. Irene Wagner-Döbler | Kerstin Wilke

Einerseits nimmt die Resistenzbildung pathogener Keime gegen die gebräuchlichen Wirkstoffe immer mehr zu, andererseits ist die Vielfalt der Mikroorganismen in der Umwelt enorm, und noch immer ist nur ein winziger Bruchteil von ihnen auf bioaktive Verbindungen untersucht worden. In diesem Projekt werden deshalb neuartige Umweltisolate auf die Bildung bioaktiver Substanzen untersucht, um so neue Wirkstoffe mit neuen Wirkmechanismen zu finden.

Ein neuer Metabolit aus 140 Extrakten Während der ersten Phase dieses Projektes wurden 140 Extrakte mit biologischer Aktivität zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Von diesen Extrakten hatten 78 antibakterielle und antifungale Aktivitäten und 27 waren cytotoxisch für Humanzellen. Die Extrakte wurden aufgereinigt, mittels HPLC-UV-MS analysiert und die erhaltenen Spektren mit denen von bekannten Verbindungen verglichen, um so bereits bekannte Verbindungen zu identifizieren. In Extrakten, die antibakterielle und antifungale Aktivität zeigten, wurden 55 Substanzen als bekannte Derivate von Actinomycin, Amicoumacin, Bacillaene, Bacylomycin, Bogorol, Difficidin, Fungichromin, Filipin, Moenomycin und Quinolonen identifiziert. Mehrere antibakterielle Peptide werden gegenwärtig charakterisiert. Weiterhin wird ein potenzieller neuer Metabolit, welcher zu der Gruppe der Makrolactine gehört, momentan weiter untersucht. Bereits bekannte Verbindungen, welche aber neue Aktivitäten besonders gegen Vancomycin-resistente Enterococci und *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Burkholderia cepacia* zeigen, erfordern weitere Studien, um ihre Strukturen zu bestätigen und ihre Nutzbarkeit zu bewerten.

Neue Herbizide und Insektizide Eine Chlorophyll-Fluoreszenz-Analyse des Pflanzenwuchses in Gegenwart der Extrakte erbrachte sechs herbizide Substanzen, welche gegenwärtig charakterisiert werden. 100 Extrakte wurden außerdem gegen *Anopheles albimanus*, einen Mückenvektor von Humankrankheiten, *Spodoptera frugiperda* und *Tenebrio molitor*, zwei landwirtschaftlich relevante Schadinsekten, und *Musca domestica*, einem biologischen Vektor zahlreicher Infektionskrankheiten, getestet. Zwanzig der getesteten Extrakte zeigten larvizide Aktivitäten gegen *Anopheles albimanus* und acht zeigten insektizide Aktivität gegen *Musca domestica*.



- Extreme Standorte wie diese heißen Quellen auf dem chilenischen Altiplano sind Lebensräume für ungewöhnliche Bakterien. Hier finden sich bisher unbekannte Bakterien, aus denen wir neue Wirkstoffe isolieren möchten.

Foto: Prof. Chong, Universidad Católica de Norte, Antofagasta, Chile, und Abraham, GBF

Um *Caenorhabditis elegans* als mögliches Wirtssystem zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Verbindungen zu testen, wurden 20 Extrakte aus dem primären Screen ausgewählt und in ihrer Aktivität gegenüber dem Nematoden getestet. Fünf dieser Extrakte töteten den Wurm und werden genauer charakterisiert.

Ein wichtiges Ziel des Projektes ist die Identifizierung von Substanzen, die gegenüber den momentan eingesetzten Verbindungen abweichende Wirkungsmechanismen haben. Es werden daher „Screening“-Systeme aufgebaut, die es erlauben werden, Verbindungen zu identifizieren, die kritische Schritte im Prozess der Krankheitsbildung inhibieren wie etwa die bakterielle Anheftung oder die Fähigkeit von Mikroorganismen, Biofilme zu bilden. Diese Substanzen können zu wichtigen alternativen chemotherapeutischen Strategien führen.

Technologie-Plattformen

- Für die wissenschaftlichen Projekte der GBF wird eine Reihe von technologischen Plattformen zur Verfügung gestellt, die für die Durchführung der Forschungsaktivitäten essenziell sind. Darüber hinaus unterstützen diese Plattformen im Rahmen von nationalen und internationalen Forschungsprogrammen die Kooperationen der GBF mit anderen Helmholtz-Forschungszentren, Universitäten, außeruniversitären Forschungseinrichtungen und der Industrie. Die wichtigsten Plattformen sind im Folgenden näher beschrieben.
-



- *Unser interner Synthese-Service nutzt auch neue, an der GBF entwickelte Verfahren. Hier prüft Dr. Norbert Zander die Qualität einer aus Polypropylen spritzgegossenen CD-Scheibe, die als Träger für die Herstellung von Peptid-Arrays eingesetzt werden soll.*

Foto: Bierstedt





01 Tierexperimentelle Einheit

LEITER | Dr. David Monner | Arbeitsgruppe Tierexperimentelle Einheit

WISSENSCHAFTLICHER MITARBEITER | Dr. Werner Müller

Die zentrale Aufgabe ist die Haltung und Bereitstellung von Versuchstieren – vorwiegend Mäusen – für die Wissenschaftler der GBF unter Beachtung geltender Tierschutzbestimmungen. Sämtliche Tiere werden unter modernsten Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Es werden die Erhaltungszuchten unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen oder in der Quarantäne betreut. Dazu umfassen die Arbeiten Rückkreuzungen und experimentelle Verpaarungen zur Generierung von neuen Mauslinien, Stammsanierungen durch Embryotransfer, die Aufrechterhaltung von Kernzuchten und die Archivierung von Mauslinien durch Kryokonservierung von Embryonen. Eine weitere Aufgabe ist die Zucht und Bereitstellung von Spendertieren und Ammen für die Generierung neuer genetisch-modifizierter Mauslinien durch ES-Zell-Injektionen in Blastozysten.

Serviceangebote Im Laufe des Jahres 2002 hat sich die Zahl der belegten Käfige im Tierhaus fast verdoppelt, auf ca. 2000 am Ende des Jahres. Über 100 verschiedene Mauslinien werden zur Zeit betreut. Neben der üblichen Versorgung und Umsetzung der Mäuse führen die Tierpfleger sämtliche Zuchten und experimentelle Verpaarungen durch – inklusive Datenbankpflege sowie Services wie Biopsien, Blutentnahmen, Immunisierungen und verschiedene Applikationen. Die Techniken der Mikromanipulation von Mausembryonen wurden im Herbst erfolgreich in der Einheit etabliert. Seit September wurden mehrere Mauslinien saniert und seit November einige Linien durch Kryokonservierung archiviert. Im August wurde ein Ausbildungsprogramm für Tierpfleger und Tierpflegerinnen etabliert.

Ausbau der Infektionsplattform Unter der Leitung der Arbeitsgruppe wurde der Gebäude-D-Anbau zu einer zweckbestimmten Infektionstierhaltung der Sicherheitsstufe 2 umgebaut. Die Anlage wurde im September 2003 in Betrieb genommen, und die Infektionsplattform wird nun in vollem Umfang ausgebaut.



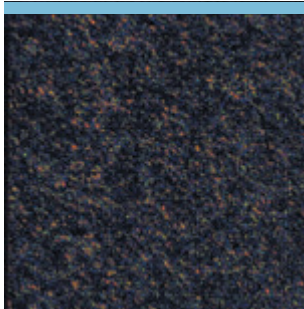
● Umsetzen und Kontrolle von Mäusen

Foto: Bierstedt



02 Expressionsarrays

LEITER | Dr. Jörg Lauber †, Dr. Robert Geffers | Arbeitsgruppe Mucosale Immunität



- Gesamte Ansicht eines Affymetrix-Arrays mit ca. 400 000 auf Glas synthetisierten Oligonukleotiden

Die der Serienfertigung von Affymetrix-Arrays zu Grunde liegende Methodik erlaubt die parallele Analyse der Expression von Tausenden von Genen. Gleichzeitig ermöglicht sie auf Grund ihrer Reproduzierbarkeit auch den Vergleich zeitlich auseinander liegender Experimente.

Dem Umfang des einzelnen Arrays entsprechend können so bis zu 40 000 Gene von Mensch-, Maus- und Rattengenom hinsichtlich ihrer Expression auf RNA-Ebene untersucht werden. Für die Kunden der GBF-„Array Facility“ – Universitäten, Krankenhäuser, GBF und andere Forschungsinstitutionen – stehen etwa 500 Gene humanen oder murinen Ursprungs zur Verifizierung von Array-Daten mit „Real Time PCR“ zur Verfügung. Die GBF-„Array Facility“ übernimmt auch die Identifizierung neuer Oligos für Gene, für die noch keine Primer vorhanden sind.

Bioinformatik Da die Versuche zunehmend komplexer werden, müssen vermehrt Programme und Algorithmen verwendet werden, die helfen, Versuchsergebnisse zu interpretieren. So wurde eine ganze Reihe von „Cluster-Software“ eingesetzt, die es erlaubt innerhalb der regulierten Gene Gruppen zu finden, die in einem bestimmten Signalweg wirken können. Dazu gehört auch das Berücksichtigen von so genannten GO („Gene Ontology“)-Annotationen, die eine Einteilung der regulierten Gene nach Funktionsmechanismen und -orten innerhalb der Zelle erlauben. Um Signalwege und funktionelle Zusammengehörigkeiten zu verdeutlichen, wird eine Software verwendet, die die Expressionsdaten graphisch auf der Ebene der beteiligten Proteine illustriert.

Es wurde eine Access-Datenbank programmiert und aufgebaut, die nicht nur den Zugriff auf sämtliche in der „Array Facility“ produzierten Daten erlaubt, sondern mit den entsprechenden Daten auch die dazu gehörige Software startet. Ferner kann durch die Datenbank ein Prozess gestartet werden, der die automatische Zusammenstellung versuchsrelevanter Daten nach dem MIAME-Format („Minimal Information About Microarray Experiments“) ausführt.

Themenschwerpunkte Die Thematik der einzelnen Arrays verteilt sich entsprechend der Auftraggeber und Kooperationspartner auf verschiedene Themen der Biologie und Medizin. Den Hauptanteil bilden Experimente, die die Wirt-Pathogen-Wechselwirkung und ihre Immunologie betreffen.

Im Bereich der Wirt-Pathogen-Wechselwirkung wurden *in vitro* unterschiedliche Pathogene wie EHEC, Mykobakterien, Salmonellen, Chlamydien, Yersenien oder Lysterien auf verschiedenen Zelllinien kultiviert, die unterschiedlichen Zielgeweben der Pathogene entsprechen. Es wurden aber auch Mäuse mit bestimmten Erregern infiziert, um aus ihnen nach definierten Zeiträumen bestimmte Zelltypen zu entnehmen und zu untersuchen.

Im Bereich Immunologie wurden hauptsächlich T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften untersucht. Hierunter fallen CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD45^{low} oder anerge Zellen aus verschiedenen transgenen Mausmodellen. Diese regulatorischen Zellen spielen unter anderem bei der Autoimmunität, aber auch bei der Regulation der Immunantwort im Verlaufe einer Infektion eine Rolle. Es wurden Zellen nach Sortierung aus Mäusen beziehungsweise Menschen miteinander verglichen, um die Gene zu finden, die an regulatorischen Eigenschaften beteiligt sind. Zurzeit wird ein Teil der betreffenden Gene in Überexpressions- und „Knock-out“-Versuchen näher untersucht.

† Dr. Jörg Lauber verstarb im Mai 2003. Mit ihm verliert die GBF einen hoch engagierten und verdienten Wissenschaftler.





03 Instrumentelle Analytik

LEITER | Dr. Victor Wray | Arbeitsgruppe Biophysikalische Analytik

WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITER | Dr. Heinrich Lünsdorf | Dr. Manfred Nitz | Dr. Manfred Rohde

Aufgabe dieser Plattform ist es, die drei-dimensionale Struktur aller Arten von Naturstoffen aufzuklären, und umfasst Massenspektrometrie (MS), Kernresonanzspektroskopie (NMR), Röntgenstrukturanalyse, Proteinsequenzierung, Elektronenmikroskopie und konfokale Laser-Mikroskopie. Die vollständige Struktur der Mehrzahl kleinerer Naturstoffe wird durch eine Kombination von MS und NMR aufgeklärt.

Routinemäßig wird die direkte Analyse großer intakter Biomoleküle wie Proteine, Oligonukleotide und komplexer Kohlenhydrate mit MALDI- und/oder ESI-MS angeboten. Ein wichtiger Pluspunkt der Massenspektrometrie ist die Möglichkeit, auch kleinste Mengen komplexer Gemische bearbeiten zu können. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von Peptiden und Proteinen in Lösung wird durch multidimensionale NMR-Spektroskopie untersucht. Voraussetzung ist allerdings ein mit stabilen Isotopen (^{15}N and ^{13}C) angereichertes Probenmaterial. Ein weiterer Schwerpunkt auf dem makromolekularen Arbeitsgebiet stellt die massenspektrometrische Strukturaufklärung von Glykoproteinen dar, insbesondere die Charakterisierung der ans Protein gebundenen Oligosaccharidketten mittels MALDI- und ESI-MS/MS-Techniken und hydrolytischer Mikroderivatisierungsmethoden.



- Dr. Victor Wray kontrolliert ein Röhrchen für eine NMR-Messung

Foto: Bierstedt

Große Anstrengungen wurden für eine Automatisierung von massenspektrometrischen Mikromethoden zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen aus 2D-Gelen aufgewandt. Neben der klassischen Identifizierung anhand des tryptischen Peptid-Fingerprints wurden auch die automatische Aufnahme und Identifizierung von Proteingemischen mit HPLC ESI-MS/MS-Spektren etabliert.

Röntgenstrukturanalyse Der Schwerpunkt der Röntgenstrukturanalyse liegt auf der Strukturanalyse von Proteinen auf atomarer Ebene. Ein Pipettier-Roboter und eine moderne Röntgenquelle mit Drehanode und Flächendetektor stehen für Kristallisationsversuche und Datenaufnahme zur Verfügung. Zudem hat die Abteilung Strukturbiologie privilegierten Zugang zur Synchrotron-Strahlung am DESY, Hamburg, kann dort hochauflösende Daten aufnehmen und Phasenbestimmung mittels anomaler Dispersion durchführen.

Edman-Abbau N-terminale Proteinsequenzierung wird mittels automatischem Edman-Abbau durchgeführt. Anwendungen dieser Technik bestehen in der Sequenzauflösung neuer Proteine, der Identifizierung von bekannten Proteinen durch Ansequenzieren als auch der Reinheitskontrolle rekombinanter Proteine. Sowohl gelöste als auch an PDF-Membran gebundene Proteine/Peptide können im niederen picomolaren Bereich analysiert werden.

FESEM-Techniken Die Elektronenmikroskopie wird zur Sichtbarmachung der Anheftung und Invasion von einer großen Vielzahl von Pathogenen in Wirtszellen eingesetzt. Spezielle Probenpräparationsprotokolle wurden entwickelt, die den Einsatz der Hochauflösungsfeldemissions-Raster-Elektronenmikroskopie (FESEM) für die Charakterisierung der verschiedenen Invasionswege von Pathogenen in Wirtszellen erlauben. Weiterhin wurden FESEM-Techniken entwickelt, um Pathogenitätsfaktoren durch an Antikörper gebundene kolloidale Goldpartikel nicht nur auf der bakteriellen Zelloberfläche oder der Berührungsfläche zwischen bakterieller und Wirtszellmembran sichtbar zu machen, sondern auch innerhalb der Wirtszelle.



04 Peptid- und chemische Synthese

LEITER | Dr. Werner Tegge | Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung

WISSENSCHAFTLICHE MITARBEITER | Dr. Ronald Frank | Susanne Frese | Dr. Michael Morr

Diese Plattform ist organisatorisch der Arbeitsgruppe Molekulare Erkennung des Bereichs Zellbiologie und Immunologie angegliedert. Sie stellt – in enger Absprache mit den Nutzern – synthetische lösliche Peptide, Arrays mit immobilisierten Verbindungen und spezielle, kommerziell nicht erhältliche chemische Verbindungen her. Für die Synthesen stehen eine Reihe moderner Geräte zur Verfügung. Lösliche Peptide werden durch HPLC und Massenspektrometrie routinemäßig direkt in der Plattform charakterisiert und bei Bedarf auch durch Aminosäureanalyse, Sequenzierung, spezielle Massenspektrometrie und NMR in der Abteilung Strukturbiologie.

Abhängig von der geplanten Verwendung und der Qualität der Rohprodukte werden Reinigungen durchgeführt, in der Regel durch präparative HPLC. Für spezielle Untersuchungen werden modifizierte Peptide benötigt und in entsprechender Form hergestellt. Die von der Plattform angebotenen Modifikationen beinhalten Phosphorylierungen, Biotinylierungen, Lipid-Additionen, Verzweigungen und Zyklisierungen.

SPOT-Arrays Die Synthese von Peptidarrays für die systematische und empirische Suche nach Peptidliganden erfolgt ebenfalls in enger Absprache und Kooperation mit entsprechenden Nutzern. Besonders bei dem Design dieser Arrays ist ein gutes Verständnis der biologischen Fragestellung essenziell. Die SPOT-Arrays werden nach der durch Dr. Ronald Frank entwickelten SPOT-Methode auf Papierblättern oder anderen polymeren Trägern halbautomatisch – und zukünftig mit Hilfe von neuen Synthesegeräten vollautomatisch – erzeugt. Im Jahr werden etwa 15.000 Peptide und Peptidgemische im Array-Format hergestellt und von den Nutzern für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Enzym-Substrat-Erkennung eingesetzt. In einer 20-stufigen Synthese wurde das Galactosylceramid hergestellt und an ein synthetisches Peptid gekoppelt. Diese Verbindungsklasse wird in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Impfstoffforschung für die Entwicklung von mukosalen Impfstoffen verwendet.



- Seit ihrer Einrichtung wurden in der Serviceeinheit an die 2000 lösliche Peptide hergestellt und charakterisiert. Essenziell ist dabei eine moderne apparative Ausstattung und persönliche Erfahrung.

Foto: Bierstedt



Programm „Bioverfahrenstechnik“

PROGRAMMSPRECHER | Dr. Holger Ziehr | Arbeitsgruppe Qualitäts- und Projektmanagement

- Die bioverfahrenstechnischen Einrichtungen der GBF wurden im Laufe des Jahres 2002 weiter zu einer Technologieplattform umgebaut, die Dienstleistungen für Klienten innerhalb und außerhalb der Helmholtz-Gemeinschaft durchführen kann. Diese Dienste bestehen aus der Entwicklung und dem Scale-up von Kultivierungsprozessen für Mikroorganismen und höhere Zellen sowie aus Aufreinigungsprozessen zur Isolation von Biomolekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren oder Antikörpern aus Zellmasse und Kulturüberständen. Für die Durchführung der Arbeiten stehen verschiedene biotechnische Pilotanlagen mit Bioreaktoren sowie Zentrifugen, Chromatographie- und Filtrationsanlagen zur Verfügung. Zudem verfügt die Bioverfahrenstechnik seit 1997 über eine Herstellungserlaubnis gem. §13 des Arzneimittelgesetzes (AMG). Sie ist damit in der Lage, neue pharmazeutische Wirkstoffe herzustellen, die für den späteren Einsatz in klinischen Prüfungen geeignet sind. Für alle in den Regelungsbereich des AMG fallenden Arbeiten steht seit 1999 eine hoch kompartimentierte Biotechnikumsanlage (GMP I) auf der Basis von Reinräumen zur Verfügung. Zur Ausweitung der Kapazität und Anpassung an gesteigerte Qualitätsanforderungen wurde im vorausgegangenen Jahr eine Neuanlage (GMP II) errichtet. Qualifizierung und Inbetriebnahme von GMP II waren für 2002 vorgesehen; die Arbeiten mussten aber im Herbst 2002 vorläufig unterbrochen werden. Im Jahr 2002 wurden für internes und externes Klientel im Biotechnikum insgesamt 240 Kultivierungen durchgeführt, davon 90 für externe Auftraggeber. Hiervon kamen 37 von Auftraggebern aus dem universitären und akademischen Umfeld und 53 aus der Industrie.

GMP-gerechte Wirkstoffherstellung Die Anzahl der auf GMP-gerechte Wirkstoffherstellung ausgerichteten Projekte ist auf Grund der Komplexität solcher Vorhaben weitaus niedriger – der Umfang der Arbeiten gemessen am Personaleinsatz jedoch weitaus höher: Für das ZMBH in Heidelberg wurde ein Kultivierungsprozess auf Grundlage von *E. coli* für die Herstellung von zwei Vakzin-Wirkstoffkandidaten (MSP-1(K1), MSP-1 (3D7)) gegen Malaria entwickelt. Die hergestellte Zellmasse wurde zur weiteren Prozessierung an das Walter-Reed Army Institute of Research (WRAIR) in Silver Springs, MD, USA abgegeben. Bedingt durch die wirtschaftliche Entwicklung in Deutschland und insbesondere den damit verbundenen Kapitalmangel von Biotech Start-Up Unternehmen ist die Nachfrage an GMP-Prozessentwicklungen und Wirkstoffherstellungen von diesen Firmen rückläufig. Dieser Rückgang wird jedoch durch eine gesteigerte Nachfrage in der pharmazeutisch-chemischen Industrie kompensiert. Im Berichtszeitraum wurden vermehrt Projekte für Unternehmen durchgeführt, die auf generische Produkte

ausgerichtet sind. Die Projekte bestehen vorwiegend aus Prozessentwicklungen und Machbarkeitsstudien und hatten ausnahmslos die Entwicklung von Herstellungsverfahren für rekombinante biopharmazeutische Wirkstoffe zum Inhalt.



- Stefan Kluger kontrolliert den 500-L-Bioreaktor in der Anlage GMP II

Foto: Bierstedt



01 Mikrobielle Expressions- und Produktionssysteme

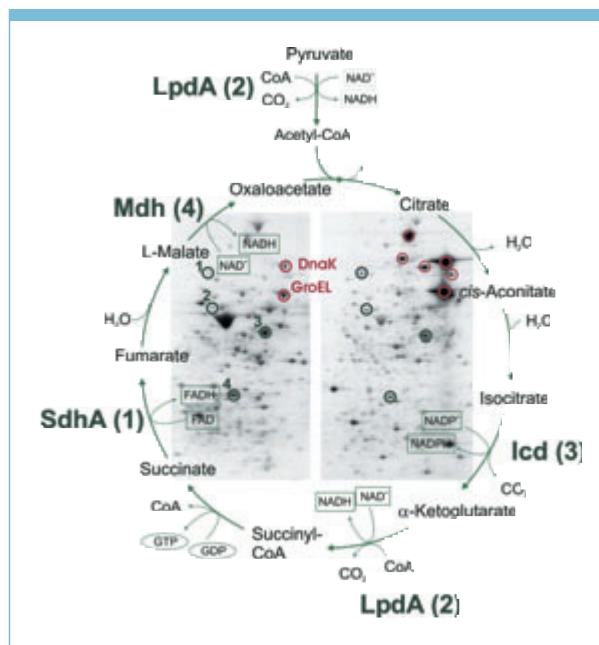
PROJEKTLEITERIN | Priv.-Doz. Dr. Ursula Rinas | Arbeitsgruppe Aufarbeitungstechnik (vormals AG Mikrobielle Systeme)

PROJEKTMITARBEITER | Eriola Betiku | Heike Baars-Hibbe | Luis Felipe Vallejo

Proteine aus rekombinanten Mikroorganismen Das Erkennen und Überwinden von Engpässen bei der Erzeugung von biologisch aktiven Proteinen mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen ist Ziel dieses Projektes. Die Arbeiten umfassen einerseits zellphysiologische Untersuchungen an proteinproduzierenden Zellen und die mathematische Beschreibung sowie die modellhafte Vorhersage von Reaktionen auf die erzwungene Fremdproteinsynthese etwa mit Proteom- und Stoffflussanalysen. Andererseits beschäftigt sich die Gruppe mit der Entwicklung von Prozessführungsstrategien zur effizienten Synthese, gegebenenfalls Renaturierung, und Reinigung biologisch aktiver Pharmaproteine mit mikrobiellen Expressionssystemen.

Erfolgreiche Proteinsynthese durch Kenntnis der Physiologie der produzierenden Zellfabrik Der Energiebedarf der produzierenden Zelle ist stark von den Umgebungsbedingungen der produzierenden Organismen und den spezifischen Eigenschaften des Zielproduktes abhängig. Bei der Synthese eines Proteins, das zur Bildung von Einschlusskörpern neigt und zudem proteolytisch sensitiv ist, kann ein erhöhter Energiebedarf eintreten. Das zeigt sich nicht nur in einer erhöhten respiratorischen Aktivität, sondern auch in einer Reorganisation der Synthese der metabolischen Enzyme aus dem Energiestoffwechsel.

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde ein Hochzell-dichteverfahren für die Herstellung von humanen Knochenwachstumsfaktoren wie beispielsweise hBMP-2 mit Hilfe rekombinanter *E. coli*-Stämme entwickelt. Dieses Verfahren führt zu einer Produktausbeute von 8 bis 9 g/L rhBMP-2 in Form von biologisch inaktiven Einschlusskörpern in der Hochzelldichtekultur. Eine für die Herstellung von biologisch aktivem hBMP-2 etablierte Renaturierungs- und Reinigungsstrategie führt zu einer Produktausbeute, die 750 mg aktivem Wachstumsfaktor pro Liter Kulturbrühe entspricht.



- Die Analyse des zellulären Proteinsynthesemusters mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigt eine erhöhte Synthese der cAMP-CRP kontrollierten Enzyme aus dem Zitronensäurezyklus (1: SdhA Succinatdehydrogenase, 2: LpdA Dihydrolipoamiddehydrogenase, Dehydrogenaseuntereinheit aus dem Multienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase und der Ketoglutaratdehydrogenase) nach der temperaturinduzierten Produktsynthese (Linke Seite: Proteom vor der Induktion; rechte Seite: Proteom nach der Induktion; 35S-Markierung). Die häufigen Dehydrogenasen aus dem Zitronensäurezyklus (3: Icd Isocitratdehydrogenase, 4: Mdh Malatdehydrogenase) zeigen eine leicht verringerten Synthese nach Induktion. Auffallend ist die verstärkte Synthese der Hitzeschockproteine nach der Induktion (rot markiert; DnaK und GroEL hervorgehoben).



02 Biologische Systemanalyse

PROJEKTLEITER | Dr. Volker Hecht | Arbeitsgruppe Kultivierungstechnik (vormals AG Umweltbioverfahrenstechnik)

PROJEKTMITARBEITER | Eriola Betiku | Heike Baars-Hibbe | Luis Felipe Vallejo

Während in der Vergangenheit die Entwicklung von Verfahrensstrategien für effektive biologische Abbauprozesse im Mittelpunkt des Interesses stand, haben sich die Arbeiten in der letzten Zeit stärker in Richtung systembiologischer Fragestellungen orientiert. Im Vordergrund steht die Aufklärung biologischer Reaktionsmechanismen, wobei experimentelle Methoden und mathematische Modellierung kombiniert werden. Auf der Basis mechanistischer Vorstellungen werden mathematische Modelle generiert, die die Systemdynamik beschreiben. Durch Diskriminierung verschiedener Modelle werden dann Rückschlüsse auf Reaktionsmechanismen und -wege gezogen.

Protoanemoninbildung bei *Alcaligenes eutrophus*

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biodegradation wurde an der Aufklärung eines neuen mikrobiellen Stoffwechselweges von *Alcaligenes eutrophus* gearbeitet. Er führt von der 2-Chlormuconsäure zu Protoanemonin. An dieser Reaktion sind zwei Enzyme beteiligt, eine Muconatcycloisomerase (MCI) und eine Muconolactonisomerase (MLI). Als Produkte entstehen neben Protoanemonin cis- und trans-Dienlacton, als Zwischenprodukte wurden 2- und 5-Chlormuconolacton (2CML und 5CML) identifiziert. Ein mathematisches Modell unterstützte die Aufklärung des Reaktionsmechanismus. Basierend auf der „Steady-state“-Methode wurden die Differentialgleichungen der einzelnen Reaktionen aufgestellt und numerisch mit der Software „Matlab“ gelöst. Experimentelle Erkenntnisse sowie eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment führten schließlich zu einem Reaktionsmechanismus, der zunächst über MCI zu einem Gleichgewicht zwischen dem Edukt und den zwei Zwischenprodukten führt. Während 2CML zu Protoanemonin abreagiert, entstehen aus 5CML cis- und trans-Dienlacton über irreversible Reaktionen. Das Modell beschreibt ebenfalls die Produktverhältnisse bei *in vitro* Versuchen, bei denen unterschiedliche Mengen der beiden Enzyme eingesetzt wurden.

Kinetik von Mischsubstratsystemen Für die gezielte Auslegung von Anlagen zur Dekontamination industrieller Abwässer auf reaktionskinetischer Grundlage ist es von großer Bedeutung, dass die Kinetik das System sowohl unter stationären als auch unter dynamischen Bedingungen beschreiben kann. Außerdem müssen die für einzelne Schadstoffe ermittelten Kinetiken auch auf Substratgemische übertragbar sein. Es konnte anhand des Modellsystems „Abbau von Phenol, Benzoat und Acetat durch *Burkholderia cepacia* G4“ gezeigt werden, dass Gemische der drei Verbindungen vollständig und simultan mineralisiert werden. Unter stationären Bedingungen lassen sich die aus dem Einzelsubstratabbau ermittelten stöchiometrischen und kinetischen Parameter auf das Gemisch übertragen.

Die Anwesenheit mehrerer Kohlenstoffquellen führt zu einer Erhöhung der kritischen Durchflussrate, bei der Substratakkumulation im Reaktor auftritt, so dass die Prozessleistung gesteigert werden kann. Unter dynamischen Bedingungen wurde eine Entkopplung der katabolischen und anabolischen Flüsse festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Mikroorganismen langsam an sich ändernde Umgebungsbedingungen adaptieren. Die Zeitkonstanten dieser Adaptation deuten auf eine genetische Regulation hin, etwa die Änderung des Enzym-pools der Zelle, nicht jedoch auf eine enzymatische Regulation. Makroskopisch führt dies dazu, dass unter dynamischen Bedingungen die kinetischen und stöchiometrischen Parameter nicht konstant sind und dass auch die „Kulturhistorie“ einen Einfluss auf die Kinetik hat.



03 Zellkulturtechnik

PROJEKTLEITER | Prof. Dr. Roland Wagner | Arbeitsgruppe Kultivierungstechnik (vormals AG Zellkulturtechnik)

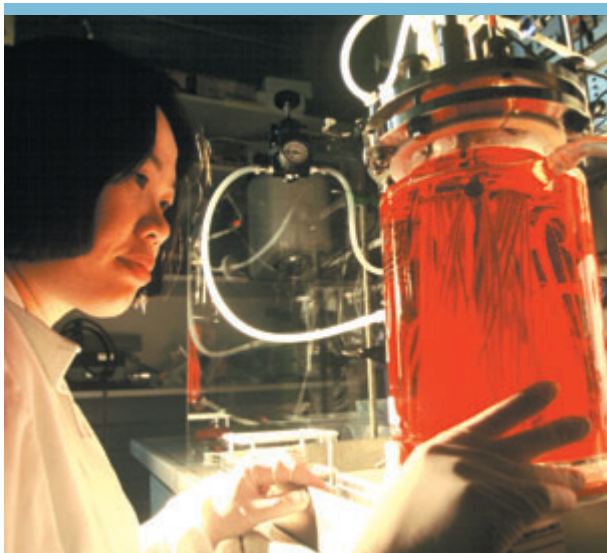
PROJEKTMITARBEITER | Christoph Priesner | Maria de los Milagros Bassani Molinas | Elsayed Ahmed Elsayed

Eine der wesentlichen Herausforderungen der Zellkulturtechnik ist die verlässliche und reproduzierbare Kultivierung von tierischen Zellen unter vollständig definierten Kulturbedingungen. Das Ziel ist dabei der Verzicht auf Komponenten tierischer Herkunft. Dabei sollen möglichst neue wirtschaftliche und kompetitive Prozesse eingesetzt werden.

Optimierung der Produktivität von HEK293-Zellen

Der zeitaufwendigste Teil bei der Proteinexpression in Säugerzellen ist die Herstellung der stabil produzierenden Zelllinie. Dagegen erlaubt die transiente Genexpression sofort nach dem Gentransfer die Proteinsynthese. Der Nachteil der transienten Transfektion: Eine geringe Menge Serum ist zum effizienten Gentransfer nötig.

Zur Optimierung von transient transfizierten HEK293s-Zellen wurde gemeinsam mit der Abteilung Genregulation und Differenzierung ein Modellproduktionssystem etabliert. Es wurden anfangs zwei verschiedene bicistronische Plasmide konstruiert, die das Zielgen in der ersten Position und ein Reportergen in der zweiten Position und umgekehrt enthielten. Auf Basis des Polykationen-vermittelten Gentransfers wurde ein Transfektionssystem entwickelt, dass unter vollständig definierten serumfreien Kulturbedingungen bis zu 70 % Transfektionseffizienz erreicht.



• Arbeiten im Zellkulturlabor: vor Beginn einer Fermentation

Foto: Bierstedt

Perfusionssystem in Säugerzell-Bioreaktoren Alle bisherigen Zellseparationssysteme sind nur eingeschränkt für die Verwendung als Perfusionssystem in Zellkulturprozessen anpassbar – bei der notwendigen Maßstabvergrößerung zur Produktproduktion. Daher wurde ein spezieller Hydrozyklon für die Trennung von Säugerzelllinien in kontinuierlich perfundierten Bioreaktoren entwickelt.

Der Hydrocyclon wurde nur drei Minuten in einer insgesamt zweistündigen quasi-stationären Kulturperiode in einem 6-L-Bioreaktor mit HeLa-Zellen betrieben – mit einer Flussrate von einem Liter pro Minute. Das entsprach einer Verweilzeit der Kulturbrühe von weniger als 0,2 s im Hydrozyklon. Die Zellviabilität war stets höher als 90 Prozent. Wird die Verweilzeit nicht signifikant geändert, kann eine Hydrozyklon-Leistung mit jedem anderen Perfusionssystem bis zu Bioreaktorvolumina von 1000 L aufrechterhalten werden.

Immortale Zellen für die Expression gewebespezifischer Funktionen *In vitro*-Modelle sind von großer Bedeutung für das Verständnis von Gewebefunktionen, Pharmakologie und Toxikologie und auch als Gewebeerersatz. Geeigneter sind Standard-Dauerzelllinien. Solche Zellen verlieren jedoch den größten Teil ihrer gewebespezifischen Funktionen bereits bei der Immortalisierung – sie dedifferenzieren ähnlich wie Tumorzellen.

Daher wurden mit dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover verschiedene immortalisierte Hepatocyten aus transgenen und „Knock-out“-Mäusen untersucht. Im Fokus: Ihr Potenzial hinsichtlich der Konservierung physiologischer Eigenschaften, wenn ein chemisch definiertes, serumfreies Nährkulturmedium verwendet wird. Die transgenen Zelllinien zeigten Cytochrom-P450-Aktivität, verbrauchten Lactat und sekretierten Albumin mit einer zellspezifischen Rate, die in der Größenordnung primärer Hepatocyten lag. Eine tumorähnliche Zelllinie aus einer neonatalen p53-„Knock-out“-Maus zeigte dagegen keine leberspezifischen Eigenschaften mehr. Das zeigt, dass transgene immortalisierte Zellen durchaus gewebespezifische Expressionsmuster konservieren können.

Veröffentlichungen 2002

Infektion und Immunität

- Akkoyun, A. and Bilitewski, U. Optimisation of glass surfaces for optical immunosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. 2002; **17(8)**:655-664.
- Arakawa, K.; Müller, R.; Mahmud, T.; Yu, T.-W., and Floss, H. G. Characterization of the early stage aminoshikimate pathway in the formation of 3-amino-hydroxybenzoic acid (ahba): the rifn protein specifically converts kanosamine into kanosamine 6-phosphate. **Journal of the American Chemical Society**. 2002; **124**:10644-10655.
- Babaahmady, K.; Bergmeier, L. A.; Whittall, T.; Singh, M.; Wang, Y., and Lehner, T. A comparative investigation of CC chemokines and SIV suppressor factors generated by CD8+ and CD4+ T cells and CD14+ monocytes. **Journal of Immunological Methods**. 2002; **264(1-2)**:1-10.
- Basso, H.; Rharbaoui, F.; Ständer, L. H.; Medina, E.; Garcia-Del Portillo, F., and Guzman, C. A. Characterization of a novel intracellular activated gene from *Salmonella enterica* serovar typhi. **Infection and Immunity**. 2002; **70**:5404-5411.
- Beissert, S. Use of mutant mice in photoimmunological and photocarcinogenic investigations. **Methods**. 2002; **28**:130-137.
- Bene, L.; Fust, G.; Huszti, Z.; Hernadi, Z.; Fekete, B.; Meszaros, M.; Veres, A.; Kovacs, A.; Miklos, K.; Singh, M.; Romics, L., and Prohaszka, Z. Impaired humoral immune response against mycobacterial 65-kDa heat shock protein (HSP65) in patients with inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**. 2002; **47(7)**:1432-1437.
- Benesch, S.; Lommel, S.; Steffen, A.; Stradal, T. E.; Scaplehorn, N.; Way, M.; Wehland, J., and Rottner, K. PIP2-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP and Grb2. **Journal of Biological Chemistry**. 2002; **277**:37771-37776.
- Bierne, H.; Mazmanian, S. K.; Trost, M.; Pucciarelli, M. G.; Dehoux, P.; the European *Listeria* Genome Consortium; Jänsch, L.; Garcia-del Portillo, E.; Schneewind, O., and Cossart, P. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. **Molecular Microbiology**. 2002; **43**:869-881.
- Billich, C.; Sauder, C.; Frank, R.; Herzog, S.; Bechter, K.; Takahashi, K.; Peters, H.; Staeheli, P., and Schwemmler, M. High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of borna disease virus proteins. **Biological Psychiatry**. 2002; **51(12)**:979-987.
- Birringer, M.; Pilawa, S., and Flohé, L. Trends in selenium biochemistry. **Natural Product Reports**. 2002; **19**:693-718.
- Boehme, C.; Conradt, H. S.; Nimtz, M.; Eckert, R.; Ragg, H., and Strathmann, A. Glycosylation pattern of human cofactor II from plasma and from recombinant CHO cells. **European Journal of Biochemistry**. 2002; **269(3)**:977-988.
- Brigelius-Flohé, R. and Flohé, L. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation. In: (Pompella, A.; Bánhegyi, G., and Wellman-Rousseau, M., editors). Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions. Ohmsha: IOS Press; 2002; **347**:96-106. (NATO Science Series. Life and behavioural sciences. ISBN: 1 58603 282 8).
- Budde, H. and Flohé, L. Enzymes of the thiol-dependent hydroperoxide metabolism in pathogens as potential drug targets. In: (Pompella, A.; Bánhegyi, G., and Wellman-Rousseau, M., editors). Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions. Ohmsha: IOS Press; 2002; **347**:85-95. (NATO Science Series. Life and behavioural sciences; v. I).
- Bächner, D.; Schröder, D., and Gross, G. mRNA expression of the murine glycoprotein (transmembrane) *nmb* (*Gpnmb*) gene is linked to the developing retinal pigment epithelium and iris. **Gene Expression Patterns**. 2002; **1**:159-165.
- Calmano, W.; Bilitewski, U.; Flemming, H. C.; Hofmann, T.; Peiffer, S.; Ternes, T., and Wilken, R. D. The German Water Chemical Society: Actual trends and fields of research in the principle committee „Basic Research“. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**. 2002; **29(6-7)**:419-427.
- Carvalhal, A. V.; Coroadinha, A. S.; Alves, P. M.; Moreira, J. L.; Hauser, H., and Carrondo, M. J. T. Metabolic changes during cell growth inhibition by the Irf-1 system. **Enzyme and Microbial Technology**. 2002; **30(1)**:95-109.
- Castro, H.; Budde, H.; Flohé, L.; Hofmann, B.; Lünsdorf, H.; Wissing, J., and Tomás, A. M. Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania* infantum. **Free Radical Biology & Medicine**. 2002; **33**:1563-1574.
- Castro, H.; Sousa, C.; Budde, H.; Lünsdorf, H.; da Silva, A. C.; Flohé, L., and Tomás, A. M. Complementary antioxidant defence by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania* infantum. **Free Radical Biology & Medicine**. 2002; **33**:1552-1562.
- Chhatwal, G. S. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. **Trends in Microbiology**. 2002; **10(5)**:205-208.
- Cruz, H. J.; Conradt, H. S.; Dunker, R.; Peixoto, C. M.; Cunha, A. E.; Thomaz, M.; Burger, C.; Dias, E. M.; Clemente, J.; Moreira, J. L.; Rieke, E., and Carrondo, M. J. Process development of a recombinant antibody/interleukin-2 fusion protein expressed in protein-free medium by BHK cells. **Journal of Biotechnology**. 2002; **96(2)**:169-183.
- Ehlers, S.; Lehmann, J.; Müller, K.; Buer, J., and Lauber, J. Measuring immune responses. In: (Kaufmann, S. H. E., Kabelitz D. eds.) Immunology of infection, 2nd ed., **Methods in Microbiology**. San Diego: Academic Press; 2002; **32**:403-431.
- Erben, R. G.; Soegiarto, D. W.; Weber, K.; Zeitz, U.; Lieberherr, M.; Gniadecki, R.; Moller, G.; Adamski, J., and Balling, R. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. **Molecular Endocrinology**. 2002; **16(7)**:1524-1537.
- Erdogan, S.; Fagan, P. K.; Talay, S. R.; Rohde, M.; Ferrieri, P.; Flores, A. E.; Guzman, C. A.; Walker, M. J., and Chhatwal, G. S. Molecular analysis of group B protective surface protein, a new cell surface protective antigen of group B streptococci. **Infection and Immunity**. 2002; **70(2)**:803-811.
- Feng, X. S.; Guo, Z.; Nourbakhsh, M.; Hauser, H.; Ganster, R. W.; Shao, L. F., and Geller, D. A. The Nf-6 B repressing factor (*Nrf*) mediates basal repression of the human inducible nitric oxide synthase (*Hinos*) gene. **Faseb Journal**. 2002; **16(4)**:A594.
- Flohe, L.; Budde, H.; Bruns, K.; Castro, H.; Clos, J.; Hofmann, B.; Kansal-Kalavar, S.; Krumme, D.; Menge, U.; Plank-Schumacher, K.; Sztajer, H.; Wissing, J.; Wylegalla, C., and Hecht, H. J. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania donovani*: molecular cloning, heterologous expression, specificity, and catalytic mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 2002; **397(2)**:324-335.
- Flohe, L.; Steinert, P.; Hecht, H. J., and Hofmann, B. Tryparedoxin and tryparedoxin peroxidase. **Methods in Enzymology**. 2002; **347**:244-258.
- Flohé, L.; Foresta, C.; Garolla, A.; Maiorino, M.; Roveri, A., and Ursini, F. Metamorphosis of the Selenoprotein PHGPx during Spermatogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2002; **973**:287-288.
- Foresta, C.; Flohé, L.; Garolla, A.; Roveri, A.; Ursini, F., and Maiorino, M. Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biology of Reproduction**. 2002; **67**:967-971.
- Frank, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports-principles and applications. **Journal of Immunological Methods**. 2002; **267(1)**:13-26.

- Frank, R. and Balling, R. Funktionelle Genomanalyse mit synthetischen Verbindungen: das NGFN unterstützt Initiative zur Chemischen Genomik. **GenomXPress**. 2002; **3**(02):20-21.
- Frank R. and Schneider-Mergener, J. SPOT-Synthesis - Scope of applications. In: (Koch J, Mahler M. eds.) *Peptide Arrays on Membrane Supports - Synthesis and Application*: Springer Verlag; 2002; pp. 1-24. (Springer lab manual).
- Gaitatzis, N.; Silakowski, B.; Kunze, B.; Nordsiek, G.; Blöcker, H.; Höfle, G., and Müller, R. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. **Journal of Biological Chemistry**. 2002; **277**(15):13082-13090.
- Geese, M.; Loureiro, J. J.; Bear, J. E.; Wehland, J.; Gertler, F. B., and Sechi, A. S. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. **Molecular Biology of the Cell**. 2002; **13**(7):2383-2396.
- Gerber, J. K.; Richter, T.; Kremmer, E.; Adamski, J.; Hofler, H.; Balling, R., and Peters, H. Progressive loss of PAX9 expression correlates with increasing malignancy of dysplastic and cancerous epithelium of the human oesophagus. **Journal of Pathology**. 2002; **197**(3):293-297.
- Gerth, K.; Steinmetz, H.; Höfle, G., and Reichenbach, H. Studies on the Biosynthesis of Epothilones: Hydroxylation of Epo a and B to Epothilones E and F. **Journal of Antibiotics**. 2002; **55**(1):41-45.
- Gillen, C. M.; Towers, R. J.; McMillan, D. J.; Delvecchio, A.; Sriprakash, K. S.; Currie, B.; Kreikemeyer, B.; Chhatwal, G. S., and Walker, M. J. Immunological response mounted by Aboriginal Australians living in the Northern Territory of Australia against *Streptococcus pyogenes* serum opacity factor. **Microbiology**. 2002; **148**(1): 169-178.
- Goldmann, O.; Rohde, M., and Medina, E. Phagocytosis of bacille Calmette-Guerin-infected necrotic macrophages induces a maturation phenotype and evokes antigen-presentation functions in dendritic cells. **Immunology**. 2002; **107**(4):500-506.
- Grabbe, S. and Gunzer, M. DC-T-cell synapses. **Trends in Immunology**. 2002; **23**(2):66.
- Grabenhorst, E.; Nimtz, M., and Conradt, H. S. Targeting of genetically engineered glycosyltransferases to in vivo functional Golgi subcompartments of mammalian cells. In: *Glycosylation*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers; 2002; pp. 149-170. (Al-Rubeai, M. ed.: Cell Engineering; v. 3).
- Gravesen, A.; Ramnath, M.; Reehinger, K. B.; Andersen, N.; Jänsch, L.; Héchar, Y.; Hastings, J. W., and Knochel, S. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**. 2002; **148**:2361-2369.
- Heim, S.; Del Mar Lleo, M.; Bonato, B.; Guzman, C. A., and Canepari, P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**:6739-6745.
- Henze, B.; Bebbber, C.; van den Heuvel, J., and Bilitewski, U. Detection of mRNA using the BIAcore. 2002. Notes: <http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2002/454/>
- Hetzer-Egger, C.; Schorpp, M.; Haas-Assenbaum, A.; Balling, R.; Peters, H., and Boehm, T. Thymopoiesis requires Pax9 function in thymic epithelial cells. **European Journal of Immunology**. 2002; **32**(4):1175-1181.
- Hillmann, G.; Steinkamp-Zucht, A.; Geurtsen, W.; Gross, G., and Hoffmann, A. Culture of primary human gingival fibroblasts on biodegradable membranes. **Biomaterials**. 2002; **23**(6):1461-1469.
- Hirschmann, F.; Verhoeven, E.; Wirth, D.; Bauwens, S.; Hauser, H., and Rudert, M. Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. **Osteoarthritis and Cartilage**. 2002; **10**(2):109-118.
- Hoffmann, A.; Czichos, S.; Kaps, C.; Bachner, D.; Mayer, H.; Kurkalli, B. G.; Zilberman, Y.; Turgeman, G.; Pelled, G.; Gross, G., and Gazit, D. The T-Box transcription factor brachyury mediates cartilage development in mesenchymal stem cell line C3h10t1/2. **Journal of Cell Science**. 2002; **115**(4):769-781.
- Hofmann, B.; Hecht, H. J., and Flohe, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**. 2002; **383**(3-4):347-364.
- Hollister, J.; Grabenhorst, E.; Nimtz, M.; Conradt, H. S., and Jarvis, D. L. Engineering of the protein N-glycosylation pathway in insect cells for the production of biantennary complex N-glycans. **Biochemistry-US**. 2002; **41**(50):15093-15104.
- Hollnagel, A.; Grund, C.; Franke, W. W., and Arnold, H. H. The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. **Molecular and Cellular Biology**. 2002; **13**:4760.
- Holtkötter, O.; Nieswandt, B.; Smyth, N.; Müller, W.; Hafner, M.; Schulte, V.; Krieg, T., and Eckes, B. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. **Journal of Biological Chemistry**. 2002; **277**(13):10789-94.
- Horvath, L.; Cervenak, L.; Oroszlan, M.; Prohaszka, Z.; Uray, K.; Hudecz, F.; Baranyi, E.; Madacsy, L.; Singh, M.; Romics, L.; Fust, G., and Panczel, P. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. **Immunology Letters**. 2002; **80**(3):155-62.
- Jansen, R.; Kunze, B.; Reichenbach, H., and Höfle, G. The Ajudazols a and B, Novel isochromanones from *Chondromyces crocatus* (Myxobacteria): Isolation and structure elucidation. **European Journal of Organic Chemistry**. 2002; **(5)**:917-921.
- Jansen, W. T. M.; Bolm, M.; Balling, R.; Chhatwal, G. S., and Schnabel, R. Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. **Infection and Immunology**. 2002; **70**:5202-5207.
- Jenke, B. H. C.; Fetzer, C. P.; Stehle, I. M.; Jonsson, F.; Fackelmayer, F. O.; Conradt, H.; Bode, J., and Lipps, H. J. An episomally replicating vector binds to the nuclear matrix protein Saf-a in vivo. **EMBO Reports**. 2002; **3**(4):349-354.
- Jorgensen, C.; Noel, D., and Gross, G. Could inflammatory arthritis be triggered by progenitor cells in the joints? **Annals of the Rheumatic Diseases**. 2002; **61**(1):6-9.
- Kalabay, L.; Fekete, B.; Czirjak, L.; Horvath, L.; Daha, M. R.; Veres, A.; Fonyad, G.; Horvath, A.; Viczian, A.; Singh, M.; Hoffer, I.; Fust, G.; Romics, L., and Prohaszka, Z. *Helicobacter pylori* infection in connective tissue disorders is associated with high levels of antibodies to mycobacterial hsp65 but not to human hsp60. **Helicobacter**. 2002; **7**(4):250-6.
- Kaps, C.; Bramlage, C.; Smolian, H.; Haisch, A.; Ungethüm, U.; Burmester, G. R.; Sittlinger, M.; Gross, G., and Haupl, T. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. **Arthritis and Rheumatism**. 2002; **46**(1):149-162.
- Kärst, U. Realis: Postgenomic Analysis of *Listeria monocytogenes*. **Comparative and Functional Genomics**. 2002; **3**(1):32-34.

- Katz, E.; Ichia, L. S. H.; Bückmann, A. F., and Willner, I. Dual biosensing by magneto-controlled bioelectrocatalysis. **Angewandte Chemie**. 2002; **114**:1399-1402.
- Kellersmann, R.; Lazarovits, A.; Grant, D.; Garcia, B.; Chan, B.; Kellersmann, A.; Wang, H.; Jevnikar, A.; Wagner, N.; Müller, W.; Ulrichs, K.; Thiede, A., and Zhong, R. Monoclonal antibody against beta 7 integrins, but not beta 7 deficiency, attenuates intestinal allograft rejection in mice. **Transplantation**. 2002; **74**:1327-1334.
- Kim, T.-Y.; Vargas, V.; Mayer, H.; Somjen, D., and Kaye, A. M. Selective anabolic effects of muteins of mid-region PTH fragments on skeletal tissues of prepubertal rats. **Bone**. 2002; **30**:78-84.
- Kreikemeyer, B.; Chhatwal, G. S., and Walker, M. J. Immunological response mounted by Aboriginal Australians living in the Northern Territory of Australia against *Streptococcus pyogenes* serum opacity factor. **Microbiology**. 2002; **148**:167-178.
- Kresse, A. U.; Ebel, F., and Guzman, C. A., authors. Functional modulation of pathogenic bacteria upon contact with host target cells. In: (Wilson, M., editor). *Advances in molecular and cellular microbiology Bacterial adhesion to host tissues: mechanisms and consequences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2002; Chapter 9:203-220.
- Kretschmer, K.; Engel, H., and Weiss, S. Strong antigenic selection shaping the immunoglobulin heavy chain repertoire of B1a- lymphocytes in 12 315 transgenic mice. **European Journal of Immunology**. 2002; **32** (8):2317-2327.
- Kröger, A.; Köster, M.; Schroeder, K.; Hauser, H., and Müller, P. P. Activities of IRF-1. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. 2002; **22**(1):5-14.
- Krumme, D.; Hecht, H. J.; Menge, U.; Ross, A.; Wray, V., and Flohe, L. 1H, 15N and 13C resonance assignments and secondary structure of tryptaredoxin-I from *Crithidia fasciculata*. **Journal of Biomolecular NMR**. 2002; **22**(4):375-376.
- Krusch, S.; Domann, E.; Frings, M.; Zelmer, A.; Diener, M.; Chakabarty, T., and Weiss, S. *Listeria monocytogenes* mediated CFTR transgene transfer to mammalian cells. **The Journal of Gene Medicine**. 2002; **4**(6):655-667.
- Kusnick, C.; Jansen, R.; Liberra, K., and Lindequist, U. Ascochital, a new metabolite from the marine ascomycete *Kirschsteiniothelia maritima*. **Pharmazie**. 2002; **57**(7):510-512.
- Lechner, O.; Bruder, D.; Lauber, J., and Buer, J. Anergie T-Zellen: Immunregulatoren mit Potential für die Klinik! **Die Gelben Hefte**. 2002; **42**:17-26.
- Lechner, O.; Bruder, D.; Lauber, J., and Buer, J. Anergic T-cells: immunoregulators with clinical implications! **Biomedical Progress**. 2002; **15**:11-16.
- Liebich, I.; Bode, J.; Frisch, M., and Wingender, E. S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. **Nucleic Acids Research**. 2002; **30**(1):372-374.
- Liebich, I.; Bode, J.; Reuter, I., and Wingender, E. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). **Nucleic Acids Research**. 2002; **30**(15):3433-3442.
- Lindroth, K.; Troye-Blomberg, M.; Singh, M.; Dieli, F.; Ivanyi, J., and Fernandez, C. The humoral response in TCR alpha-/- mice. Can gamma/delta-T cells support the humoral immune response? **Scandinavian Journal of Immunology**. 2002; **55**(3):256-263.
- Lührmann, A.; Deiters, U.; Skokowa, J.; Hanke, M.; Gessner, J. E.; Mühlradt, P. F.; Pabst, R., and Tschernig, T. In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after pulmonary application. **Infection and Immunity**. 2002; **70**(7):3785-3792.
- Mahmud, T.; Bode, H. B.; Silakowski, B.; Kroppenstedt, R. M.; Xu, M.; Nordhoff, S.; Höfle, G., and Müller, R. A novel biosynthetic pathway providing precursors for fatty acid biosynthesis and secondary metabolite formation in *Myxobacteria*. **Journal of Biological Chemistry**. 2002; **277**:32768-32774.
- Medina, E.; Anders, D., and Chhatwal, G. S. Induction of NF-6B nuclear translocation in human respiratory epithelial cells by group A streptococci. **Microbial Pathogenesis**. 2002; **33**(6):307-313.
- Medina, E. and Chhatwal, G. S. The potential for vaccine development against rheumatic fever. **Indian Heart Journal**. 2002; **54**(1):93-98.
- Meraro, D.; Gleit-Kielmanowicz, M.; Hauser, H., and Levi, B. Z. IFN-stimulated gene 15 is synergistically activated through interactions between the myelocyte/lymphocyte-specific transcription factors, PU.1, IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein, and IFN regulatory factor-4: characterization of a new subtype of IFN-stimulated response element. **Journal of Immunology**. 2002; **168**(12):6224-31.
- Mielke, C.; Benham, C.; Bode, J., and Breindl, M. Nuclear matrix association potential of regulatory elements in the collagen 1a1 gene. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2002; **84**:DOI 10.1002/jcb.10034.
- Mielke, C.; Christensen, M. O.; Westergaard, O.; Bode, J.; Benham, C. J., and Breindl, M. Multiple collagen I gene regulatory elements have sites of stress-induced DNA duplex destabilization and nuclear scaffold/matrix association potential. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2002; **84**(3):484-496.
- Morr, M.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Simon, M., and Mühlradt, P. F. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. **European Journal of Immunology**. 2002; **32**:3337-3347.
- Munder, A.; Krusch, S.; Tschernig, T.; Dorsch, M.; Lührmann, A.; van Griensven, M.; Tümmler, B.; Weiß, S., and Hedrich, H.-J. Pulmonary microbial infection in mice: comparison of different application methods and correlation of bacterial numbers and histopathology. **Experimental and Toxicologic Pathology**. 2002; **54**(2):127-133.
- Müller, K. and Wirth, M. Real-time RT-PCR detection of retroviral contaminations of cells and cell lines. **Cytotechnology**. 2002; **38**(1):147-153.
- Niggemann, J.; Frank, R.; Michaelis, K.; Zander, N., and Höfle, G. Natural product-derived building blocks for combinatorial synthesis: structural diversity by fragmentation and recombination of natural products from *Myxobacteria*. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions**. 2002; **1**:2490-2503.
- Olazabal, I.; Caron, E.; May, R.; Schilling, K.; Knecht, D., and Machesky, L. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcgammaR, phagocytosis. **Current Biology**. 2002; **12**(16):1413.
- Pägelow, U.; Wirth, M.; Buhr, P.; Macke, L.; Hannig, H.; Dittmar, K. E. J.; Berlin, J.; Wörmann, B., and Lindenmaier, W. Adenovirally modified dendritic cells for immunotherapy: from basic development to clinical application. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Press; 2002; pp. 510-516. (Lindner-Olsson, E. Chatzissavidou N. Lüllau E., eds.)
- Pasparakis, M.; Courtois, G.; Hafner, M.; Schmidt-Supprian, M.; Nenci, A.; Toksoy, A.; Krampert, M.; Goebeler, M.; Gillitzer, R.; Israel, A.; Krieg, T.; Rajewski, K., and Haase, I. TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific ablation of IKK2. **Nature**. 2002; **417**:861-866.
- Pradella, S.; Hans, A.; Spröer, C.; Reichenbach, H.; Gerth, K., and Beyer, S. Characterisation, genome size, and genetic manipulation of *Sorangium cellulosum* So ce56. **Archives of Microbiology**. 2002; **178**(6):484-492.

- Prohaszka, Z.; Singh, M.; Nagy, K.; Kiss, E.; Lakos, G.; Duba, J., and Fust, G. Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. **Cell Stress Chaperones**. 2002; **7(1)**: 17-22.
- Pukall, R.; Kramer, I.; Rohde, M., and Stackebrandt, E. Microbial diversity of cultivatable bacteria associated with the north sea bryozoan *Flustra foliacea*. **Systems of Applied Microbiology**. 2002; **24**: 623-633.
- Rasmussen, U. B.; Schreiber, V.; Schultz, H.; Mischler, F., and Schughart, K. Tumor cell-targeting by Phage-displayed peptides. **Cancer Gene Therapy**. 2002; **9(7)**:606-612.
- Regueiro-Ren, A.; Leavitt, K.; Kim, S.-H.; Höfle, G.; Gougoutas, J.; DiMarco, J.; Lee, F. Y. F.; Fairchild, C. R.; Long, B. H., and Vite, G. D. SAR and pH stability of cyano-substituted epothilones. **Organic Letters**. 2002; **4(22)**:3815-3818.
- D. J. Reinscheid, C. Stosser, K. Ehlert, R. W. Jack, K. Moller, B. J. Eikmanns, G. S. Chhatwal Influence of proteins Bsp and FemH on cell shape and peptidoglycan composing in group B streptococcus. **Microbiologie**. 2002; **148**:3245-54
- Rharbaoui, F.; Drabner, B.; Borsutzky, S.; Winckler, U.; Morr, M.; Ensolli, B.; Mühlradt, P. F., and Guzman, C. A. The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. **European Journal of Immunology**. 2002; **32**:2857-2865.
- Richter, T.; Shultz-Lockyear, L. L.; Oleschuk, R. D.; Bilitewski, U., and Harrison, D. J. Bi-enzymatic and capillary electrophoretic analysis of non-fluorescent compounds in microfluidic devices - determination of xanthine. **Sensors and Actuators B-Chemical**. 2002; **81(2-3)**:369-376.
- Rohde, M.; Schwienbacher, M.; Nikolaus, T.; Heesemann, J., and Ebel, F. Detection of early phase specific surface appendages during germination of *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**. 2002; **206**:99-105.
- Romanenko, L. A.; Schuhmann, P.; Rohde, M.; Mikhailov, V. V., and Stackebrandt, E. *Halomonas halocynthiae* sp. nov., isolated from the marine ascidian *Halocynthia aurantium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:1767-1772.
- Romanenko, L. A.; Schumann, P.; Rohde, M.; Lysenko, A. M.; Mikhailov, V. V., and Stackebrandt, E. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52(4)**:1291-1297.
- Römmling, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. **Research in Microbiology**. 2002; **153**:205-212.
- Roveri, A.; Flohé, L.; Maiorino, M., and Ursini, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in sperm. **Methods in Enzymology**. 2002; **347**:208-212.
- Ruzgas, T.; Lindgren, A.; Gorton, L.; Hecht, H.-J.; Reichelt, J., and Bilitewski, U., Electrochemistry of peroxidases. In: (Bajter-Toth, A. and Chambers, J. Q., editors). *Electroanalytical methods of biological materials*. Marcel Dekker Inc.; 2002; pp. 233-254.
- Sagi, D.; Peter-Katalinic, J.; Conradt, H. S., and Nimtz, M. Sequencing of tri- and tetraantennary N-glycans containing sialic acid by negative mode ESI QTOF tandem MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**. 2002; **13(9)**:1138-1148.
- Salo, H.; Aitio, O.; Ilves, K.; Bencomo, E.; Toivonen, S.; Penttilä, L.; Niemela, R.; Salminen, H.; Grabenhorst, E.; Renkonen, R., and Renkonen, O. Several poly(lactosamine)-modifying glycosyltransferases also use internal GalNAc β 1-4GlcNAc units of synthetic saccharides as acceptors. **Glycobiology**. 2002; **12(3)**:217-218.
- Sasse, F.; Steinmetz, H.; Schupp, T.; Petersen, F.; Memmert, K.; Hofmann, H.; Heusser, C.; Brinkmann, V.; Von Matt, P.; Hofle, G., and Reichenbach, H. Argryns, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria - I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. **Journal of Antibiotics**. 2002; **55(6)**:543-551.
- Schmidt, A.; Schumacher, J. T.; Reichelt, J.; Hecht, H. J., and Bilitewski, U. Mechanistic and molecular investigations on stabilization of horseradish peroxidase C. **Analytical Chemistry**. 2002; **74(13)**:3037-3045.
- Schrader, A. J.; Lechner, O.; Templin, M.; Dittmar, K. E.; Machtens, S.; Mengel, M.; Probst-Kepper, M.; Franzke, A.; Wollensak, T.; Gatzlaff, P.; Atzpodien, J.; Buer, J., and Lauber, J. CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. **British Journal of Cancer**. 2002; **86(8)**:1250-1256.
- Schroeder, K.; Koschmieder, S.; Ottmann, O. G.; Hoelzer, D.; Hauser, H., and Müller, P. P. Coordination of cell growth in cocultures by a genetic proliferation control system. **Biotechnology and Bioengineering**. 2002; **78(3)**:346-352.
- Schubert, A.; Zakikhany, K.; Schreiner, M.; Frank, R.; Spellerberg, B.; Eikmanns, B. J., and Renscheid, D. J. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand-binding sites. **Molecular Microbiology**. 2002; **2**:557-569.
- Schubert, W. D.; Moser, J.; Heinz, D. W., and Jahn, D. Structure and function of glutamyl-tRNA reductases, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and bacteria. **Photosynthesis Research**. 2002; **74**:205-215.
- Schubert, W.-D.; Urbanke, C.; Ziehm, T.; Beier, V.; Machner, M. P.; Domann, E.; Wehland, J.; Chakraborty, T., and Heinz, D. W. Structure of the complex of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes* with its human receptor, E-cadherin. **Cell**. 2002; **111**:825-836.
- Schughart, K. and Rasmussen, U. B. Solvoplex synthetic vector for intrapulmonary gene delivery. Preparation and use. **Methods in Molecular Medicine**. 2002; **69**:83-94.
- Schultz, A.; Laschat S.; Morr, M.; Diele, S.; Dreyer, M., and Bringmann, G. Highly branched alkanolic acids from the preen-gland wax of the domestic goose as building blocks for chiral triphenylenes. **Helvetica Chimica Acta**. 2002; **85**:3909-3018.
- Sechi, A. S.; Buer, J.; Wehland, J., and Probst-Kepper, M. Changes in actin dynamics at the T-cell/APC interface: implications for T-cell anergy? **Immunological Reviews**. 2002; **189**:98-110.
- Siggelkow, H.; Schenck, M.; Rohde, M.; Viereck, V.; Tauber, S., and Hüfner, M. Prolonged culture of HOS 58 osteosarcoma cells with 1,35-(OH) $_2$ -D $_3$, TGF beta and dexamethason reveal physiological regulation of alkaline phosphatase but compromised osteocalcin gene expression and protein synthesis and lack of mineralization. **Journal of Cellular Biochemistry**. 2002; **85**:279-294.
- Small, J. V.; Stradal, T.; Vignal, E., and Rottner, K. The lamellipodium :Where motility begins. **Trends in Cell Biology**. 2002; **12**:112-120.
- Stander, S.; Gunzer, M.; Metze, D.; Luger, T., and Steinhoff, M. Localization of micro-opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. **Regulatory Peptides**. 2002; **110(1)**:75-83.
- Stiene, M. and Bilitewski, U. Electrochemical characterization of screen-printed carbonaceous electrodes for the determination of peroxidase activity in novel screen-printed flow-through modules. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2002; **372(2)**:240-247.
- Sun, X.; Qiao, H.; Shi, J.; Kanwar, J. R.; Müller, W.; Wagner, N., and Krissansen, G. W. Beta7 integrins contribute to skin graft rejection. **Transplantation**. 2002; **74**:1202-1203.

- Sydora, B. C.; Wagner, N.; Lohler, J.; Yakoub, G.; Kronenberg, M.; Müller, W., and Aranda, R. Beta 7 integrin expression is not required for the localization of T cells to the intestine and colitis pathogenesis. **Clinical and Experimental Immunology**. 2002; **129(1)**:35-42.
- Tiedemann v., B. and Bilitewski, U. Characterization of the vascular endothelial growth factor - receptor interaction and determination of the recombinant protein by an optical receptor sensor. **Biosensors and Bioelectronics**. 2002; **17**:983-991.
- Toi, M.; Bando, H.; Ogawa, T.; Muta, M.; Hornig, C., and Weich, H. A. Significance of vascular endothelial growth factor (Vegf)/Soluble Vegf Receptor-1 relationship in breast cancer. **International Journal of Cancer**. 2002; **98(1)**:14-18.
- Trobonjaca, Z.; Kröger, A.; Stober, D.; Leithauser, F.; Moller, P.; Hauser, H.; Schirmbeck, R., and Reimann, J. Activating immunity in the liver. II. IFN-beta attenuates NK cell- dependent liver injury triggered by liver NKT cell activation. **Journal of Immunology**. 2002; **168(8)**:3763-3770.
- Van den Heuvel, J. and Heinz, D. W. „Plug and Play“-expression systems for high-quality production of recombinant proteins for structural analysis. **Gene Function and Diseases**. 2002; **3**:33-38.
- Van Griensven, M.; Lobenhoffer, P.; Barke, A.; Tschernig, T.; Lindenmaier, W.; Krettek, C., and Gerich, T. G. Adenoviral gene transfer in a rat fracture model. **Laboratory Animals**. 2002; **36**:455-461.
- Veres, A.; Fust, G.; Smieja, M.; McQueen, M.; Horvath, A.; Yi, Q.; Biro, A.; Pogue, J.; Romics, L.; Karadi, I.; Singh, M.; Gnarpe, J.; Prohaszka, Z., and Yusuf, S. Relationship of anti-60 kDa heat shock protein and anti-cholesterol antibodies to cardiovascular events. **Circulation**. 2002; **106(22)**:2775-80.
- Veres, A.; Prohaszka, Z.; Kilpinen, S.; Singh, M.; Füst, G., and Hurme, M. The promoter polymorphism of the IL-6 gene is associated with levels of antibodies to 60-kDa heat-shock proteins. **Immunogenetics**. 2002; **53(10-11)**:851-856.
- Veres, A.; Szamosi, T.; Ablonczy, M.; Szamosi, T. Jr.; Singh, M.; Karadi, I.; Romics, L.; Fust, G., and Prohaszka, Z. Complement activating antibodies against the human 60 kDa heat shock protein as a new independent family risk factor of coronary heart disease. **European Journal of Clinical Investigation**. 2002; **32(6)**:405-10.
- Vollbrecht, L.; Steinmetz, H.; Höfle, G.; Oberer, L.; Rhis, G.; Bovermann, G., and Von Matt, P. Argyrins, immunosuppressive cyclic peptides from Myxobacteria - II. Structure elucidation and stereochemistry. **Journal of Antibiotics**. 2002; **55**:715-721.
- Von Minden, H. M.; Morr, M.; Milkereit, G.; Heinz, E., and Vill, V. Synthesis and mesogenic properties of glycosyl diacylglycerols. **Chemistry and Physics of Lipids**. 2002; **114**:55-80.
- Wagner, A.; Ekhlasi-Hundrieser, M.; Hettel, C.; Petrunkina, A.; Waberski, D.; Nimtz, M., and Topfer-Petersen, E. Carbohydrate-based interactions of oviductal sperm reservoir formation-studies in the pig. **Molecular Reproduction and Development**. 2002; **61(2)**:249-57.
- Wang, Y.; Kelly, C. G.; Singh, M.; McGowan, E. G.; Carrara, A. S.; Bergmeier, L. A., and Lehner, T. Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. **Journal of Immunology**. 2002; **169(5)**:2422-9.
- Wilde, C.; Chhatwal, G. S., and Aktories, K. C3stau, a new member of the family of C3-like ADP-ribosyltransferases. **Trends in Microbiology**. 2002; **10(1)**:5-7.
- Winkler, J.; Hagelstein, S.; Rohde, M., and Laqua, H. Cellular and cytoskeletal dynamics within organ cultures of porcine neuroretina. **Experimental Eye Research**. 2002; **74**:777-788.
- Winterhoff, N.; Goethe, R.; Gruening, P.; Rohde, M.; Kalisz, H.; Smith, H. E., and Valentin-Weigand, P. Identification and characterization of two stress-induced surface-associated proteins of *Streptococcus suis* with high homologies to members of the arginine deiminase system of *Streptococcus pyogenes*. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**:6768-6776.
- Witmer, A. N.; Blaauwgeers, H. G.; Weich, H. A.; Alitalo, K.; Vrensen, G. F., and Schlingemann, R. O. Altered expression patterns of Vegf receptors in human diabetic retina and in experimental Vegf-induced retinopathy in monkey. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**. 2002; **43(3)**:849-857.
- Witmer, A. N.; Dai, J. P.; Weich, H. A.; Vrensen, G. F., and Schlingemann, R. O. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. 2002; **50(6)**:767-777.
- Zähler, D.; Kaminski K.; van der Linden, M.; Mascher, T.; Merai, M., and Hakenbeck, R. The ciaR/ciaH regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 2002; **4**:211-216.
- Zander, N. and Gausepohl, H., authors. Chemistry of Fmoc peptide synthesis on membranes. In: (Koch, J. and Mahler, M., editors). Peptide arrays on membrane supports - synthesis and applications: Springer lab manual. Berlin: Springer-Verlag; 2002; pp. 23-40.



- Hardt, I. H.; Steinmetz, H.; Gerth, K.; Sasse, F.; Reichenbach, H., and Höfle, G. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. **Journal of Natural Products**, 2001; **64(7)**:847-856. Die Arbeit wurde von der American Society of Pharmacognosy mit dem Arthur E. Schwarting Award als „Best Paper 2001“ im *Journal of Natural Products* ausgezeichnet. Mit freundlicher Genehmigung der American Chemical Society.

Vergleichende Genomforschung

- Bi, J. X.; Wirth, M.; Beer, C.; Kim, E. J.; Gu, M. B., and Zeng, A. P. Dynamic characterization of recombinant Chinese hamster ovary cells containing an inducible c-fos promoter GFP expression system as a biomarker. **Journal of Biotechnology**. 2002; **93(3)**:231-242.
- Chevrier, V.; Piel, Collomb, N.; Saoudi, Y.; Frank, R.; Paintrand, M.; Narumiya, S.; Bornens, M., and Job, D. The Rho-associated protein kinase p160ROCK is required for centrosome positioning. **Journal of Cellular Biology**. 2002; **157(5)**:807-817.
- Dostmann, W. R. G.; Tegge, W.; Frank, R.; Nickl, C. K.; Taylor, M. S., and Brayden, J. E. Exploring them mechanisms of vascular smooth muscle tone with highly specific, membrane-permeable inhibitors of cyclic GMP-dependent protein kinase I^o. **Pharmacology and Therapeutics**. 2002; **93(2-3)**:203-215.
- Eichler, J. and Houghten, R. A. Combinatorial synthesis. Goodman, M.; Felix, A.; Moroder, L., and Toniolo, C. Synthesis of peptides. Stuttgart: Thieme; 2002; chapter 4.3.7.

- Ernest, S.; Christensen, B.; Gilfix, B. M.; Mamer, O. A.; Hosack, A.; Rodier, M.; Colmenares, C.; McGrath, J.; Bale, A.; Balling, R.; Sankoff, D.; Rosenblatt, D. S., and Nadeau, J. H. Genetic and molecular control of folate-homocysteine metabolism in mutant mice. **Mammalian Genome**. 2002; **13(5)**:259-267.
- Frank, R. Chemische Genomik: funktionelle Genomanalyse mit synthetischen Verbindungen. **BioSpektrum**, Sonderausgabe „Proteomics and Drug Development“. 2002; 474-477.
- Frank, R. High-density synthetic peptide microarrays: emerging tools for functional genomics and proteomics. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**. 2002; **5**:327-335.
- Frank, R. and Balling, R. Funktionelle Genomanalyse mit synthetischen Verbindungen: das NGFN unterstützte Initiative zur Chemischen Genomik. **GenomXPress**. 2002; **3|02**:20-21.
- Frank, R.; Bialek, K., and Swistowski, A. Large-scale protein-interaction mapping with synthetic peptide arrays: epitope-targeted proteome analysis. **Peptides** 2002; Proceedings 27th European Peptide Symposium, pp. 102-103.
- Frere, F.; Schubert, W.-D.; Neier, R., and Jahn, D. Heinz D. W. Structure of porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with 5-fluoroolevulinic acid suggests a double Schiff base mechanism. **Journal of Molecular Biology**. 2002; **320**:237-247.
- Frisch, M.; Frech, K.; Klingenhoff, A. Cartharius, K.; Liebich, I., and Werner, T. In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. **Genome Research**. 2002; **12(2)**:349-54.
- Hartlep, M.; Hussmann, W.; Prayitno, N.; Maynial-Salles, I., and Zeng, A.-P. Study of two-stage processes for the microbial production of 1,3-propanediol from glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2002; **60**:60-66.
- Heinz, D. W. Modellsystem für Infektionen - Pathogene Bakterien auf ihrem unheilvollen Weg verfolgt. **Jahreshefte der Helmholtz-Gesellschaft**. 2002; 10-11.
- Heinz, D. W. and Jahn, D. Strukturbiologie zur gerichteten Wirkstoffentwicklung. **CHEManager**. 2002; **11**:14.
- Kel-Margoulis, O. V.; Ivanova, T. G.; Wingender, E., and Kel, A. E. Automatic annotation of genomic regulatory sequences by searching for composite clusters. **Pacific Symposium on Biocomputing**. 2002; **7**:187-98.
- Kel-Margoulis, O. V.; Kel, A. E.; Reuter, I.; Deineko, I. V., and Wingender, E. TRANSCOMPel®: a database on composite regulatory elements in eukaryotic genes. **Nucleic Acids Research**. 2002; **30(1)**:332-334.
- Kist, R.; Schrewe, H.; Balling, R., and Scherer, G. Conditional inactivation of Sox9: a mouse model for campomelic dysplasia. **Genesis**. 2002; **32(2)**:121-123.
- Kloos, D. U.; Choi, C., and Wingender, E. The TGF-beta-Smad network: introducing bioinformatic tools. **Trends in Genetics**. 2002; **18(2)**:96-103.
- Liebich, I.; Bode, J.; Frisch, M., and Wingender, E. S/MARt DB: a database on scaffold/matrix attached regions. **Nucleic Acids Research**. 2002; **30(1)**:372-374.
- Liebich, I.; Bode, J.; Reuter, I., and Wingender, E. Evaluation of sequence motifs found in scaffold/matrix-attached regions (S/MARs). **Nucleic Acids Research**. 2002; **30(15)**:3433-42.
- Ma, Z. Y.; Yuan, Y. J.; Wu, J. C., and Zeng, A. P. Apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Biotechnology Letters**. 2002; **24(7)**:573-577.
- Modak, J.; Deckwer, W.-D., and Zeng, A.-P. Metabolic control analysis of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multi-enzyme-complex. **Biotechnology Progress**. 2002; **18**:1157-1169.
- Moser, J.; Schuber, W.-D.; Heinz, D. W., and Jahn, D. Structure and function of glutamyl-tRNA-reductase involved in 5-aminolevulinic acid formation. **Biochemical Society of Transactions**. 2002; **30**:579-584.
- Potapov, A. P. and Wingender, E. Representing the architecture of signal transduction networks in an algebraic form: protein target finding. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 2002; **973**:1-2.
- Sabra, W.; Kim, E. J., and Zeng, A.-P. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic an aerobic culture. **Microbiology**. 2002; **148**:3195-3202.
- Schauer, S.; Chaturvedi, S.; Randau, L.; Moser, J.; Kitabatake, M.; Lorenz, S.; Verkamp, E.; Schubert, W.-D.; Nakayashiki, T.; Murai, M.; Wall, K.; Thomann, U.; Heinz, D. W.; Inokuchi, H.; Söll, D., and Jahn, D. Escherichia coli glutamyl-tRNA reductase: Trapping the thioester intermediate. **Journal of Biological Chemistry**. 2002; **247(50)**:48656-48663.
- Schubert, W. D.; Moser, J.; Heinz, D. W., and Jahn, D. Structure and function of glutamyl-tRNA reductases, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and bacteria. **Photosynthesis Research**. 2002; **74**:205-215.
- Schulz, H.; Johnner, C.; Eder, G.; Ziesenis, A.; Reitmeier, P.; Heyder, J., and Balling, R. Respiratory mechanics in mice: strain and sex specific differences. **Acta Physiologica Scandinavica**. 2002; **174(4)**:367-375.
- Schügerl, K. and Zeng, A.-P., authors. Tools and applications of biochemical engineering science. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Heidelberg: Springer Verlag; 2002; 74.
- Vreugde, S.; Ereven, A.; Kros, C. J.; Marcotti, W.; Fuchs, H.; Kurima, K.; Wilcox, E. R.; Friedman, T. B.; Griffith, A. J.; Balling, R.; De Angelis, M. H.; Avraham, K. B., and Steel, K. P. Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss Dfna36. **Nature Genetics**. 2002; **30(3)**:257-258.
- Wingender, E. Modeling regulatory pathways with the use of the TRANSFAC system. **Gene Function and Disease**. 2002; **3**:3-11.
- Xiu, Z.-L.; Chang, Z.-Y., and Zeng, A.-P. Nonlinear dynamics of regulation of bacterial trp operon: model analysis of integrated effects of repression, feedback inhibition and attenuation. **Biotechnology Progress**. 2002; **18**:686-693.
- Xiu, Z.-L.; Song, B.-H.; Sun, L.-H., and Zeng, A.-P. Theoretical analysis of effects of metabolic overflow and time delay on the performance and dynamic behavior of a two-stage fermentation process. **Biochemical Engineering Journal**. 2002; **11**:101-109.
- Yuan, Y.-J.; Li, C.; Hu, Z.-D.; Wu, J.-C., and Zeng, A.-P. Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. **Process Biochemistry**. 2002; **38**:193-198.
- Yuan, Y. J.; Ma, Z. Y.; Wu, J. C., and Zeng, A. P. Taxol-induced apoptotic cell death in suspension cultures of *Taxus cuspidata*. **Biotechnology Letters**. 2002; **24(8)**:615-618.
- Zander, N.; Dittrich, F.; Michaelis, K.; Tegge, W., and Frank, R. A new high-performance polypropylene-based membrane support for the parallel synthesis of peptides and small organic compounds. **Peptides** 2002, Proceedings 27th European Peptide Symposium. 2002; pp. 340-341.
- Zeng, A. P. and Biebl, H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. **Advances in Biochemical Engineering - Biotechnology**. 2002; **74**:239-59.
- Zeng, A.-P.; Modak, J., and Deckwer, W.-D. Nonlinear dynamics of eucaryotic pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex: Decarboxylation rate, oscillations and multiplicity. **Biotechnology Progress**. 2002; **18**:1265-1276.

Nachhaltige Nutzung von Landschaften

- Abraham, W.-R. Microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. In: (Ved Pal Singh and Raymond D. Stapleton Jr. editors) „Progress in Industrial Biotechnology“. Elsevier, Netherlands; 2002; 36: „Biotransformations: Bioremediation Technology for Health an Environmental Protection“ pp. 29-67.
- Abraham, W. R.; Nogales, B.; Golyshin, P. N.; Pieper, D. H., and Timmis, K. N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. **Current Opinion in Microbiology**. 2002; **5(3)**:246-253.
- Abraham, W. R. and Spassov, G. Biotransformations of alkaloids: a challenge. **Heterocycles**. 2002; **56(1-2)**:711-741.
- Abraham, W.-R.; Strömpl, C.; Bennisar, A.; Christ, R.; Vancanneyt, M.; Smit, J., and Moore, E. R. B. Phylogeny of *Maricaulis* Abraham et al. 1999 and proposal of *Maricaulis indicus* sp. nov., *M. virginiensis* sp. nov., *M. parjimensis* sp. nov., *M. washingtonensis* sp. nov., and *M. salignoratus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:2191-2201.
- Abraham, W.-R.; Strömpl, C.; Bennisar, A.; Vancanneyt, M.; Snuauwaert, C. Swings J.; Smit, J., and Moore E.R.B. **Phylogeny of *Maricaulis*** (1999). 2002; DOI10.1099/ijls.0.02248-0.
- Asolkar, R. N.; Kamat, V. P.; Wagner-Döbler, I., and Laatsch, H. Limnazine, the first bacterial azine derivative from *Bacillus* sp. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**:1664-1666.
- Brettar, I.; Christen, R., and Höfle, M. G. Polyphasic taxonomic approach to the description of *Rheinheimera baltica* gen. nov. sp. nov., a blue colored bacterium isolated from the central Baltic sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:1851-1857.
- Brettar, I.; Christen, R., and Höfle, M. G. Polyphasic taxonomic approach to the description of *Shewanella denitrificans*, sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:2211-2217.
- Brettar, I. and Höfle, M. G. Close correlation between the nitrate elimination rate by denitrification and the organic matter content in hardwood forest soils of the upper Rhine floodplain (France). **Wetlands**. 2002; **22(2)**:214-224.
- Brettar, I.; Sanchez-Perez, J. M., and Trémolières, M. Nitrate elimination by denitrification in hardwood forest soils of the Upper Rhine floodplain - correlation with redox potential. **Hydrobiologia**. 2002; **469**:11-21.
- Busse, H.-J. ; Kämpfer, P.; Denner, E. B. M.; Moore, E. R. B., and Salkinoja-Salonen, M. S. *Thermomonas haemolytica* gen. nov., sp. nov.: a (-)Proteobacterium from kaolin slurry. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:473-483.
- Collins, J.; Giorgio, T.; King, P.; Alley, J.; Lauten, H.; Winter, P.; Appenzeller, A.; Scriven, J.; Jonas, R.; Berger, C.; Eichelmann, P.; Jacobsen, H.-J., and Huchzermeyer, B. A German-US faculty/intern exchange program in biotechnology. Proceedings of the 2002 American Society for Engineering Education Annual Conference and Exposition; 2002; pp. 2227-2236.
- Collins, M. D.; Lawson, P. A.; Labrenz, M.; Tindall, B. J.; Weiss, N., and Hirsch, P. *Nesterenkonia lacusekhoensis* sp. nov., isolated from hypersaline Ekho Lake, East Antarctica, and emended description of the genus *Nesterenkonia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:1145-1150.
- Dominik, K. and Höfle, M. G. Changes in bacterioplankton community structure and activity with depth in a eutrophic lake as revealed by 5S rRNA analysis. **Applied of Environmental Microbiology**. 2002; **68(7)**:3606-13.
- Druschel, G. K.; Labrenz, M.; Thomsen-Ebert, T.; Fowle, D. A., and Banfield, J. F. Geochemical modeling of ZnS in biofilms: An example of ore depositional processes. **Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists**. 2002; **97(6)**:1319-1329.
- Felske, A. Streamlined representational difference analysis for comprehensive studies of numerous genomes. **Journal of Microbiological Methods**. 2002; **50**:305-311.
- Felske, A.; Vandieken, V.; Pauling, B. V.; von Canstein, H. F., and Wagner-Döbler, I. Molecular quantification of genes encoding for green fluorescent proteins. **Journal of Microbiological Methods**. 2002. online: October.
- Golyshin, P. N.; Chernikova, T. N.; Abraham, W. R.; Lünsdorf, H.; Timmis, K. N., and Yakimov, M. M. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:901-911.
- Kämpfer, P.; Witzemberger, R.; Denner, E. B. M.; Busse, H.-J., and Neef, A. *Sphingopyxis witzleriensis* sp. nov., isolated from activated sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:2029-2034.
- Katsivela, E.; Moore, E. R. B., and Kalogerakis, N. Characterization of active microbial communities degrading petroleum waste sludge. Proceedings of the International Conference „Protection and Restoration of the Environment VI“, July 1-5, 2002, Skiathos. Thessaloniki, Greece: Grafima Publ.; 2002; pp. 489-496. ISBN: 960-86574-2-3.
- Kämpfer, P.; Jureit, C.; Albrecht, A., and Neef, A. Immission of microorganisms from composting facilities. In: (Insam, H. et al., editors). *Microbiology of Composting*. Heidelberg: Springer; 2002; pp. 571-584. ISBN : 3-540-6768-X.
- Kämpfer, P.; Neef, A.; Salkinoja-Salonen, M. S., and Busse, H.-J. *Chelatobacter heintzii* (Auling et al. 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami et al. 1992). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:835-839.
- Kämpfer, P.; Witzemberger, R.; Denner, E. B. M.; Busse, H.-J., and Neef, A. *Novoshingobium hassiacum*, sp. nov., a new species isolated from an aerated sewage pond. **Systematic and Applied Microbiology**. 2002; **25**:37-45.
- Ledger, T.; Pieper, D. H.; Pérez-Pantoja, D., and González, B. Novel insights into interplay between xyl genes-encoded peripheral reactions and tfd genes-encoded chlorocatechol pathway for degradation of chlorobenzoates by *Ralstonia eutropha* JMP 134. **Microbiology UK**. 2002; **148**:3431-3440.
- Lünsdorf, H.; Wenderoth, D. F., and Abraham, W.-R. Microbial consortia in composite biofilms from acidic mining lakes. **Water, Air and Soil Pollution (Focus)**. 2002; **2**:69-79.
- Manaia, C. and Moore, E. R. B. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of *pseudomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; **52**:2203-2209.
- Maskey, R. P.; Asolkar, R. N.; Kapaun, E.; Wagner-Döbler, I., and Laatsch, H. Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. **Journal of Antibiotics**. 2002; **55**:643-649.
- Maskey, R. P.; Kock, I.; Shaaban, M.; Grün-Wollny, I.; Helmke, E.; Mayer, F.; Wagner-Döbler, I., and Laatsch, H. Low molecular weight oligo-hydroxybutyric acids and a monomeric amide thereof - new products from microorganisms. **Polymer Bulletin**. 2002; **49**:87-93.
- Muriithi, M. W.; Abraham, W. R.; Addae-Kyereme, J.; Scowen, I.; Croft, S. L.; Gitu, P. M.; Kendrick, H.; Njagi, E. N., and Wright, C. W. Isolation and in vitro antiplasmodial activities of alkaloids from *Teclaea trichocarpa*: In vivo antimalarial activity and X-ray crystal structure of normelicopicine. **Journal of Natural Products**. 2002; **65(7)**:956-959.

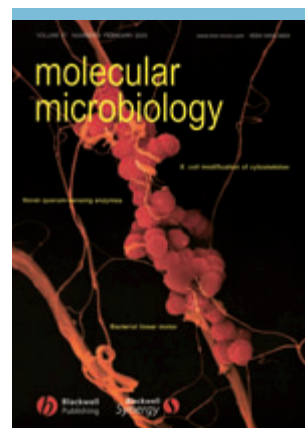
- Neef, A. and Kampfer, P. Molecular identification of airborne microorganisms from composting facilities. In: (Insam, H. et al, editors). *Microbiology of Composting*. Heidelberg: Springer Verlag; 2002; pp. 585-594. ISBN: 3-540-6768-X.
- Nelson, K. E.; Weinel, C.; Paulsen, I. T.; Dodson, R. J.; Hilbert; Martins dos Santos, V.; Fouts, D. Gill S. R.; Pop, M.; Holmes, M.; Khouri, H.; Hance, I.; Chris Lee, P.; Holtzapfle, E.; Scanlan, D.; Tran, K.; Deboy, R.; Moazzez, A.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Dagherty, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; White, O.; Utterback, T.; Rizzo, M.; Lee, K.; Kosack, D.; Moestl, D.; Wedler, H.; Lauber, J.; Hoheisel, J.; Strätz, M.; Heim, S.; Kiewitz, C.; Eisen, J.; Timmis, K. N.; Duesterhoft, A.; Tümmmler, B., and Fraser, C. M. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**. 2002; **4**:799-808.
- Pieper, D. H.; Pollmann, K.; Nikodem, P.; Gonzalez, B., and Wray, V. Monitoring key reactions in degradation of chloroaromatics by in situ H-1 nuclear magnetic resonance: Solution structures of metabolites formed from cis-Dienelactone. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**(5):1466-1470.
- Plumeier, I.; Perez-Pantoja, D.; Heim, S.; Gonzalez, B., and Pieper, D. H. Importance of different tfd genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**(15):4054-4064.
- Pollmann, K.; Kaschabek, S.; Wray, V.; Reineke, W., and Pieper, D. H. Metabolism of dichloromethylcatechols as central intermediates in the degradation of dichlorotoluenes by *Ralstonia* sp. strain PS12. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**:5261-5274.
- Pöhler, I.; Wenderoth, D. F.; Wendt-Potthoff, K., and Höfle, M. G. Bakterioplankton community structure and dynamics in enclosures during bioremediation experiments in an acid mining lake. **Water, Air and Soil Pollution: Focus**. 2002; **2**:111-121.
- Pöhler, I.; Wenderoth, D. F.; Wendt-Potthoff, K., and Höfle, M. G. Biozönotische Struktur und Tiefenverteilung des Bakterioplanktons in einem sauren Bergbaurestsee. Tagungsband DGL Tagung 2001 Kiel. Tutzing: DGL Verlag; 2002; 1 pp. 388-391. ISBN: 3-9805678-5-0.
- Regenhardt, D.; Heuer, H.; Heim, S.; Fernandez, D. U.; Strömpl, C.; Moore, E. R. B., and Timmis, K. N. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. **Environmental Microbiology**. 2002; **4**:912-915.
- Shaaban, M.; Maskey, R. P.; Wagner-Döbler, I., and Laatsch, H. Pharcaine, a natural p-cyclophane and other new indol derivatives from *Cytophaga* sp. strain AM13.1. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**:1660-1663.
- Skiba, A.; Hecht, V., and Pieper, D. H. Formation of protoanemonin from 2-chlorocis, cis-muconate by the combined action of muconate cycloisomerase and muconolactone isomerase. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**:5402-5409.
- Timmis K.N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. **Environmental Microbiology**. 2002; **4**:779-781.
- Tréfauld, N.; Clement, P.; Manzano, M.; Pieper, D. H., and Gonzalez, B. The copy number of the catabolic plasmid pJP4 affects growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on 3-chlorobenzoate. **FEMS Microbiology Letters**. 2002; **212**(1):95-100.
- Vasquez, M.; Gruttner, C.; Möeller, B., and Moore, E. R. B. Limited selection of sodium channel blocking toxin producing bacteria from paralytic shellfish toxin-contaminated mussels (*Aulacomya ater*). **Research in Microbiology**. 2002; **153**:333-338.
- Von Canstein, H.; Kelly, S.; Li, Y., and Wagner-Döbler, I. Species diversity improves the efficiency of mercury-reducing biofilms under changing environmental conditions. **Applied and Environmental Microbiology**. 2002; **68**(6):2829-2837.
- Von Canstein, H.; Li, Y.; Leonhauser, J.; Haase, E.; Felske, A.; Deckwer, W. D., and Wagner-Döbler, I. Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury-reducing biofilms in a technical-scale bioremediation system. **Applied and Environmental Microbiology**. 2002; **68**(4):1938-1946.
- Wagner-Döbler, I. Mercury remediation using natural and recombinant microbes. **Marine Biotechnology**. 2002; **8**:189-201.
- Wagner-Döbler, I.; Beil, W.; Lang, S.; Meiners, M., and Laatsch, H. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. 2002; **74**:207-38.
- Wagner-Döbler, I.; Rheims, H.; Felske, A.; Pukall, R., and Tindall, B. *Jannaschia helgolandensis*, gen. nov., sp. nov., a novel abundant member of the marine Roseobacter clade from the North Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2002; DOI 10.1099/ijls.0.02377-0.
- Wagner-Döbler, I.; von Canstein, H.; Leonhäuser, J.; Li, Y., and Deckwer, W.-D. Prozessintegrierte Quecksilberentfernung aus Abwässern der Chloralkali-Elektrolyse durch Mikroorganismen. **Chemie Ingenieur Technik**. 2002; **74**:1-8.
- Wagner-Döbler, I.; Von Canstein, H.; Li, Y.; Leonhäuser, J., and Deckwer, W. D. Process-integrated removal of mercury from chlor-alkali electrolysis by microorganisms. **Chemie Ingenieur Technik**. 2002; **74**(4):504-508.
- Weinbauer, M. G.; Fritz, I.; Wenderoth, D. F., and Höfle, M. G. Simultaneous extraction from bacterioplankton of total RNA and DNA suitable for quantitative structure and function analyses. **Applied and Environmental Microbiology**. 2002; **68**(3):1082-7.
- Weinbauer, M. G. and Höfle, M. G., authors. Quantification of nucleic acids from aquatic environments using green-fluorescent dyes and microtiter plates. *Manual of Molecular Microbial Ecology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2002; 2.1.3 pp. 1-10.
- Weinbauer, M. G.; Winter, C., and Höfle, M. G. Reconsidering transmission electron microscopy based estimates of viral infection of bacterio-plankton using conversion factors derived from natural communities. **Aquatic Microbial Ecology**. 2002; **27**(2):103-110.
- Wenderoth, D. F.; Rosenbrock, P.; Pieper, D., and Höfle, M. G. Assessment of population dynamics of specific in groundwater bioaugmentation experiments by two different molecular techniques. **Water, Air and Soil Pollution: Focus**. 2002; **2**:195-203.
- Witzemberger, R.; Neef, A., and Kämpfer, P. Abundance and ecophysiology of sphingomonads in municipalactivated sludges. **Water Intelligence Online**. 2002; 1(12). (<http://www.iwaponline.com/wio/2002/12/wio200212014.htm>)
- Yakimov, M. M.; Giuliano, L.; Crisafi, E.; Chernikova, T. N.; Timmis, K. N., and Golyshin, P. N. Microbial community of a saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). **Environmental Microbiology**. 2002; **4**(5):249-256.
- Zarnowski, R.; Felske, A.; Ellis, R. J.; Genus, J. M. C.; Zarnowska, E. D.; Lewicka, T., and Pietr., S. J. A Methylobacterium-like symbiont from algal crusts covering African electric tractions. **Journal of Applied Microbiology**. 2002; **93**:1012-1019.
- Zielinski, M.; Backhaus, S., and Hofer, B. The principal determinants for the structure of the substrate-binding pocket are located within a central core of a biphenyl dioxygenase subunit. **Microbiology**. 2002; **148**:2439-2448.

Plattformen

- Edrada, R. A.; Ebel, R.; Supriyono, A.; Wray, V.; Schupp, P.; Steube, K.; van Soest, R., and Proksch, P. Swinhoeamide A, a new highly active Calyculin derivative from the marine sponge, Theonella swinhoei. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**:1168-1172.
- Edrada, R. A.; Heubes, M.; Brauers, G.; Wray, V.; Berg, A.; Gräfe, U.; Wohlfahrt, M.; Mühlbacher, J.; Schaumann, K.; Sudarsono; Bringmann, G., and Proksch, P. Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**:1598-1604.
- Fester, T.; Hause, B.; Schmidt, D.; Halfmann, K.; Schmidt, J.; Wray, V.; Hause, G., and Strack, D. Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. **Plant Cell Physiology**. 2002; **43**(3):256-265.
- Jadulco, R.; Brauers, G.; Edrada, R. A.; Ebel, R.; Wray, V.; Sudarsono, and Proksch, P. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**(5):730-733.
- Kim, W. S.; Schollmeyer, M.; Nimtz, M.; Wray, V., and Geider, K. Genetics of biosynthesis and structure of the capsular exopolysaccharide from the Asian pear pathogen *Erwinia pyrifoliae*. **Microbiology**. 2002; **148**:4015-4024.
- Landtag, J.; Baumert, A.; Degenkolb, T.; Schmidt, J.; Wray, V.; Scheel, D.; Strack, D., and Rosahl, S. Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. **Phytochemistry**. 2002; **60**:683-689.
- Philp, J. C.; Kuyukina, M. S.; Ivshina, I. B.; Dunbar, S.; Ritchkova, M. I.; Lang, S., and Wray, V. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2002; **59**:318-324.
- Pieper, D. H.; Pollmann, K.; Nikodem, P.; Gonzalez, B., and Wray, V. Monitoring key reactions in degradation of chloroaromatics by in situ H-1 nuclear magnetic resonance: Solution structures of metabolites formed from cis-Dienelactone. **Journal of Bacteriology**. 2002; **184**(5):1466-1470.
- Riaz, M.; Krohn, K.; Wray, V., and Malik, A. Dicumarimyl ether Glycoside from the roots of *Daphne oleoides*. **European Journal of Organic Chemistry**. 2002; **(8)**:1436-1438.
- Schupp, P.; Proksch, P., and Wray, V. Further new staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. **Journal of Natural Products**. 2002; **65**(3):295-298.
- Wang, B. G.; Ebel, R.; Wang, C. Y.; Wray, V., and Proksch, P. New methoxylated aryltetrahydronaphthalene lignans and a norlignan from *Aglaia cordata*. **Tetrahedron Letters**. 2002; **43**:5783-5787.
- Gouda, M. K.; Kleeberg, I.; van den Heuvel, J.; Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. Production of a polyester degrading extracellular hydrolase from *Thermomonospora fusca*. **Biotechnology Progress**. 2002; **18**:927-929.
- Hoffmann, F.; Weber, J., and Rinas, U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induces recombinant protein synthesis. 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**. 2002; **80**:313-319.
- Irani, N.; Beccaria, A. J., and Wagner, R. Expression of recombinant cytoplasmic yeast pyruvate carboxylase for the improvement of the production of human erythropoietin by recombinant Bhk-21 cells. **Journal of Biotechnology**. 2002; **93**(3):269-282.
- Silveira, M. M. and Jonas, R. The biotechnological production of sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2002; **59**:400-408.
- Vallejo, L. F.; Brokelmann, M.; Marten, S.; Trappe, S.; Cabrera-Crespo, J.; Hoffmann, A.; Gross, G.; Weich, H. A., and Rinas, U. Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. 2002; **94**(2):185-194.
- Vallejo, L. F. and Rinas, U. Strategies for refolding inclusion body proteins. (Villaverde, A., editor). *Recent research development in biotechnology and bioengineering/protein production in bacterial cell factories*. Trivandrum -695 023, Kerala, India: Research Signpost; 2002; pp. 59-71.
- Weber, J.; Hoffmann, F., and Rinas, U. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induces recombinant protein synthesis. 2. Redirection of metabolic fluxes. **Biotechnology and Bioengineering**. 2002; **80**:320-330.
- Welzel, K.; Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. Enzymatischer Abbau von Polyester-Nanopartikeln. **Chemie Ingenieur Technik**. 2002; **74**(10):1496-1500.

Bioverfahrenstechnik

- Collins, J.; Giorgio, T.; King, P.; Alley, J.; Lauten, H.; Winter, P.; Appenzeller, A.; Scriven, J.; Jonas, R.; Berger, C.; Eichelmann, P.; Jacobsen, H.-J., and Huchzermeyer, B. A German-US faculty/intern exchange program in biotechnology. *Proceedings of the 2002 American Society for Engineering Education Annual Conference and Exposition*; 2002; pp. 2227-2236.
- Elias, C. B.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Wagner, R., and Kamen, A. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. **Biotechnology Progress**. 2002; ID-10.1021/bp025572x.



- Titelbild der Zeitschrift *Molecular Microbiology*, Vol. 47 (3), 2003 anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes Dinkla, K.; Rohde, M.; Jansen, W. T. M.; Carapetis, J. R.; Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface bound fibronectin: a novel colonisation and immune evasion mechanism. **Molecular Microbiology**. 2003; **47**:861-869. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlags.

Veröffentlichungen 2003

Infektion und Immunität

- Beer, C.; Buhr, P.; Hahn, H.; Laubner, D., and Wirth, M. Gene expression analysis of murine cells producing amphotropic mouse leukemia virus at a cultivation temperature of 32 and 37°C. **Journal of General Virology**. 2003; **84**:1677-1686.
- Beer, C.; Meyer, A.; Müller, K., and Wirth, M. The temperature stability of mouse retroviruses depends on the cholesterol levels of viral lipid shell and cellular plasma membrane. **Virology**. 2003; **308**:137-146.
- Bergmann, S.; Wild, D.; Diekmann, O.; Frank, R.; Bracht, D., and Hammerschmidt, S. Binding of human plasmin(ogen) to surface displayed -enolase is mediated via two binding sites in *Eno* of *Streptococcus pneumoniae*. **Molecular Microbiology**. 2003; **49(2)**:411-423.
- Bode, H. B. and Müller R. Possibility of bacterial recruitment of plant genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites. **Plant Physiology**. 2003; **132**:1153-1161.
- Bode, H. B.; Irschik, H.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H.; Müller, R., and Höfle, G. The leupyrrins: a structurally unique family of secondary metabolites from the *Myxobacterium Sorangium cellulosum*. **Journal of Natural Products**. 2003; **66**:1203-1206.
- Bode, H. B.; Zeggel, B.; Silakowski, B.; Wenzel, S. C.; Reichenbach, H., and Müller, R. Steroid biosynthesis in procaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(s)-oxidosqualen cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. **Molecular Microbiology**. 2003; **47**:471-481.
- Bode, J.; Götze, S.; Ernst, E.; Hüsemann, Y.; Baer, A.; Seibler, J., and Mielke, C. Architecture and utilization of highly-expressed genomic sites. In: (Makrides, S., editor). *New Comprehensive Biochemistry - Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*: Elsevier; 2003.
- Borsutzky, S.; Fiorelli, V.; Ebensen, T.; Tripiciano, A.; Rharbaoui, F.; Scoglio, A.; Link, C.; Nappi, E.; Morr, M.; Buttó, S.; Cafaro, A.; Mühlradt, P. F.; Ensoli, B., and Guzmán, C. A. Efficient mucosal delivery of the HIV-1 Tat protein using the synthetic lipopeptide MALP-2 as adjuvant. **European Journal of Immunology**. 2003; **33**:1548-1556.
- Breitbach, K.; Rottner, K.; Klocke, S.; Rohde, M.; Jenzora, A.; Wehland, J., and Steinmetz, I. Actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei* involves the Arp2/3 complex, but not N-WASP and Ena/VASP proteins. **Cellular Microbiology**. 2003; **5(6)**:385-393.
- Buer, J. and Baling, R. Mice, microbes and models of infection. **Nature Reviews Genetics**. 2003; **4**:195-205.
- Deckert, M.; Lutjen, S.; Leuker, C. E.; Kwok, L.-Y.; Strack, A.; Müller, W.; Wagner, N., and Schlüter, D. Mice with neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule-1 fail to control the parasite in *Toxoplasma encephalitis*. **European Journal of Immunology**. 2003; **33(5)**:1418-1428.
- Dietrich, G.; Spreng, S.; Favre, D.; Viret, J.-F., and Guzmán, C. A. Live attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**. 2003; **5**:10-19.
- Dietz-Pfeilstetter, A.; Arndt, N.; Kay, V., and Bode, J. Molecular structure and regulatory potential of a T-DNA integration site in *petunia*. **Transgenic Research**. 2003; **12**:83-99.
- Dinkla, K.; Rohde, M.; Jansen, W. T. M.; Carapetis, J. R.; Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. *Streptococcus pyogenes* recruits collagen via surface bound fibronectin: a novel colonisation and immune evasion mechanism. **Molecular Microbiology**. 2003; **47**:861-869.
- Dinkla, K.; Rohde, M.; Jansen, W. T. M.; Kaplan, E. L.; Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. Rheumatic fever associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. **Journal of Clinical Investigation**. 2003; **111(12)**:1905-1912.
- Duvar, S.; Berlin, J.; Ziehr, H., and Conradt, H. S. Modulation of the glycosylation repertoire of recombinant human EPO expressing model cell lines under different culture conditions. *Proceedings of the 18th ESACT-Meeting-Granada*. 2003.
- Fingerle-Rowson, G.; Petrenko, O.; Metz, C. N.; Forsthuber, T. G.; Mitchell, R.; Huss, R.; Moll, U.; Müller, W., and Bucala, R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. 2003; **100**:9354-9359.
- Franke, D.; Lorbach, V.; Esser, S.; Dose, C.; Sprenger, G. A.; Halfar, M.; Thömmes, J.; Müller R.; Takors, R., and Müller, M. (S,S)-2,3-Dihydroxy-2,3-dihydrobenzoic acid: Microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and applicability as starting material in natural-product synthesis. **Chemical European Journal**. 2003; **9**:4188-4196.
- Franzke, A.; Piao, W.; Lauber, J.; Gatzlaff, P.; Könecke, C.; Hansen W.; Schmitt-Thomsen, A.; Herstenstein, B.; Buer, J., and Ganser, A. G-CSF as immune regulator in t-cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. **Blood**. 2003; **102**:734-739.
- Goldmann, O. ; Chhatwal, G. S., and Medina, E. Immune mechanisms underlying host susceptibility to group A streptococcal infections. **Journal of Infectious Diseases**. 2003; **187**:854-861.
- Grenklo, S.; Geese, M.; Lidberg, U.; Wehland, J.; Karlsson, R., and Sechi, A. S. Critical role for profilin: actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. **EMBO Reports**. 2003; **4**:1-7.
- Götze, S. ; Gluch, A.; Benham, C., and Bode, J. Computational and in vitro analysis of destabilized DNA regions in the interferon gene cluster: the potential of predicting functional gene domains. **Biochemistry**. 2003; **42**:154-166.
- Goetze, S.; Huesemann, Y.; Baer, A., and Bode, J. Functional characterization of transgene integration patterns by halo-fluorescence in situ hybridization: electroporation versus retroviral infection. **Biochemistry**. 2003; **42 (23)**:7035-7043
- Heilmann C., Thumm G., Chhatwal G. S., Hartleib J., Uekotter A., Peters G. Identification and characterization of a novel autolysin (*Aae*) with adhesive properties from *Staphylococcus epidermidis*. **Microbiology**. 2003; **149**:2769-2778
- Höfle, G.; Glaser, N.; Karama, U.; Leibold, T.; Sasse, F., and Steinmetz, H. Semisynthesis and degradation of the tubulin inhibitors epothilone and tubulysin. **Pure and Applied Chemistry**. 2003; **75**:167-178.
- Hollister, J.; Conradt, H. S., and Jarvis, D. L. Evidence for a sialic acid salvaging pathway in lepidopteran insect cells. **Glycobiology**. 2003; **13(6)**:487-495.
- Jansen, R.; Kunze, B.; Reichenbach, H., and Höfle, G. +Chondrochloren A and B, new β -amino styrenes from *Chondromyces crocatus* (*Myxobacteria*). **European Journal of Organic Chemistry**. 2003; 2684-2689.
- Karama, U. and Höfle, G. Synthesis of epothilone 16,17-alkyne analogs by replacement of the C13-C15(O)-ring segment of natural epothilone C. **European Journal of Organic Chemistry**. 2003; **(6)**:1042-1049.
- Köster, M.; Lykke-Andersen, S.; Elnakady, Y. A.; Gerth, K.; Washausen, P.; Höfle, G.; Sasse, F.; Kjems, J., and Hauser, H. Ratjadones inhibit nuclear export by blocking DRM1/exportin 1. **Experimental Cell Research**. 2003; **286**:321-331.
- Kresse, A. U.; Dinesh, S. D.; Larbig, K., and Römling, U. Impact of large chromosomal inversions on the adaption and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. **Molecular Microbiology**. 2003; **47(1)**:145-158.

- Kretschmer, K.; Joungebloud, A.; Stopkowicz, J.; Störmann, B.; Hoffmann, R., and Weiss, S. Antibody repertoire and geneexpression profile: implications on different developmental and functional traits of splenic and peritoneal B-1 lymphocytes. **Journal of Immunology**. 2003; **171(3)**:1192-1201.
- Kröger, A.; Dallügge, A.; Kirchhoff, S., and Hauser, H. IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro an in vivo. **Oncogene**. 2003; **22(7)**:1045-1056.
- Kwissa, M.; Kröger, A.; Hauser, H.; Reimann, J., and Schirmbeck, R. Defining conditions for cytokine-facilitated priming of CD8+ T cell responses by DNA vaccination. **Journal of Molecular Medicine**. 2003; **81**:91-101.
- Lindenmaier, W. Gentechnik und Schöpfungsglaube. In: (Babke, H.-G. Fritsche A., editors). *Gerechtigkeit - ein globaler Wert*. München; 2003; pp. 163-177.
- Lipps, H. J.; Jenke, A. C. W.; Nehlsen, K.; Scinteie, M.; Stehle, I. M., and Bode, J. Chromosome-based vectors for gene therapy. **Gene**. 2003; **304**:23-33.
- Machner, M. P.; Frese, S.; Schubert, W.-D.; Orian-Rousseau, V.; Gherardi, E.; Wehland, J.; Niemann, H. H., and Heinz, D. W. Aromatic amino acids at the surface of In1B are essential for host cell invasion by *Lysteria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**. 2003; **48**:1525-1536.
- Maiorino, M.; Bosello, V.; Ursini, F.; Foresta, C.; Garolla, A.; Scapin, M.; Sztajer, H., and Flohé, L. Genetic variations of *gpx-4* and male infertility in humans. **Biology of Reproduction**. 2003; **68**:1134-1141.
- Manitz, M. P.; Horst, B.; Seeliger, S.; Strey, A.; Skryabin, B. V.; Gunzer, M.; Frings, W.; Schonlau, F.; Roth, J.; Sorg, C., and Nacken, W. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. **Molecular and Cellular Biology**. 2003; **23(3)**:1034-1043.
- Mascher, T.; Zähner, D.; Balmelle, N.; de Saizieu, A., and Hakenbeck, R. The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. **Journal of Bacteriology**. 2003; **185(1)**:60-70.
- Mataraza, J. M.; Briggs, M. W.; Li, Z.; Frank, R., and Sacks, D. B. Identification and characterization of the Cdc42-binding site of IQGAP1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2003; **305**:315-321.
- Matussek, A.; Lauber, J.; Bergau, A.; Hansen, W.; Rohde, M.; Dittmar, K. E.; Gunzer, M.; Mengel, M.; Gatzlaff, P.; Buer, J., and Gunzer, F. Molecular and functional analysis of Shiga toxin induced response patterns in human vascular endothelial cells. **Blood**. 2003; **102(4)**:1323-1332.
- McArthur, J. D.; West, N. P.; Cole, J. N.; Jungnitz, H.; Guzmán, C. A.; Chin, J.; Lehrbach, P. R.; Djordjevic, S. P., and Walker, M. J. An aromatic amino acid auxotrophic mutant of *Bordetella bronchiseptica* is attenuated and immunogenic in a mouse model of infection. **FEMS Microbiology Letters**. 2003; **221**:7-16.
- Medina, E.; Rohde, M., and Chhatwal, G. S. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. **Infection and Immunity**. 2003; **71**:5376-5380.
- Medina, E.; Goldmann, O.; Toppel, A.; Rohde, M., and Chhatwal, G. S. Exploitation of host phagocytic cells by *Streptococcus pyogenes* for persistence an systemic dissemination. **Journal of Infectious Diseases**. 2003; **187**:597-603.
- Mothana, R. A. A.; Awadh Ali, N. A.; Jansen, R.; Wegner, U.; Mentel, R., and Lindequist, U. Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma pfeifferi*. **Fitoterapia**. 2003; **74(1-2)**:177-180.
- Müller, P. P.; Wirth, D.; Unsinger, U., and Hauser, H. Genetic approaches to recombinant protein production in mammalian cells . In: (Vinci, V. A. and Parekh, S. R., editors). *Handbook of Industrial Cell Culture: Mammalian, Microbial and Plant Cells*. Humana Press; 2003; pp. 21-50.
- Mundt, S.; Kreitlow, S., and Jansen, R. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. **Journal of Applied Phycology**. 2003; **15(2)**:263-267.
- Mühling, J.; Kemminer, S. E.; Conrad, H. S.; Sagi, D.; Nimtz, M.; Karst, U., and Peter-Katalinic, J. Effects of buffering conditions and culture pH on production rates and glycosylation of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24. **Biotechnology and Bioengineering**. 2003; **83(5)**:321-334.
- Nakagawa, H.; Miki, H.; Nozumi, M.; Takenawa, T.; Miyamoto, S.; Wehland, J., and Small, J. V. IRSp53 is co-localised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. **Journal of Cell Science**. 2003; **116**:2577-2583.
- Noguera-Obenza, M.; Ochoa, T. J.; Gomez, H. F.; Guerrero, M. L.; Herrera-Insua, I.; Morrow, A. L.; Ruiz-Palacios, G.; Pickering, L. K.; Guzmán, C. A., and Cleary, T. G. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. **Emerging Infectious Diseases** (United States). 2003; **9**:545-551.
- Pulz, M.; Matussek, A.; Monazahian, M.; Tittel, A.; Nikolic, E.; Hartmann, M.; Bellin, T.; Buer, J., and Gunzer, F. Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two different types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. 2003; **41(10)**:4671-4675.
- Ranson, T.; Vosshehrich, C. A.; Corcuff, E.; Richard, O.; Müller, W., and Di Santo, J. P. IL-15 is essential mediator of peripheral NK cell homeostasis. **Blood**. 2003; **101**:4887-4893.
- Reinscheid, D. J.; Ehlert, K.; Chhatwal, G. S., and Eikmanns, B. J. Functional analysis of a Pcs-deficient mutant of group B streptococcus. **FEMS Microbiology Letters**. 2003; **221**:73-79.
- Rodriguez, A.; Troye-Blomberg, M.; Lindroth, K.; Ivanyi, J.; Singh, M., and Fernandez, C. B- and C-cell responses to the mycobacterium surface antigen PstS-1 in the respiratory tract and adjacent tissues. Role of adjuvants and routes of immunization. **Vaccine**. 2003; **21**:458-467.
- Rohde, M.; Müller, E.; Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. Host cell caveolae act as an entry-port for Group A streptococci. **Cellular Microbiology**. 2003; **5**:323-342.
- Salunkhe, P.; von Götz, F.; Wiehlmann, L.; Lauber, J.; Buer, J., and Tümmler, B. Gene-chip expression analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to paraquat induced superoxide stress. **Genome Letters**. 2003; **4**:165-174.
- Sasse, F.; Steinmetz, H.; Höfle, G., and Reichenbach, H. Archazolid A, new cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). **Journal of Antibiotics**. 2003; **56(6)**:520-525.
- Scheele, U.; Alves, J.; Frank, R.; Duwel, M.; Kalthoff, C., and Ungewickell, E. J. Molecular and functional characterization of clathrin and AP-2 binding determinants within a disordered domain of auxilin. **Journal of Biological Chemistry**. 2003; **278(28)**:25357-25368.
- Schomburg, L.; Schweizer, U.; Holtmann, B.; Flohé, L.; Sendtner, M., and Köhrle, J. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. **Biochemical Journal**. 2003; **370(2)**:397-402.
- Schrader, A. J.; Lauber, J.; Lechner, O.; Heidenreich, A.; Hofmann, R., and Buer, J. Application of real-time RT-PCR in urologic oncology. **Journal of Urology**. 2003; **169**:1858-1864.
- Schubert, W.-D. and Heinz, D. W. Details der Wechselwirkung zwischen Bakterium und Mensch. **Laborwelt**. 2003; **(1)**:16.

- Schulze, K.; Medina, E.; Chhatwal, G. S., and Guzmán, C. A. Stimulation of long-lasting protection against *Streptococcus pyogenes* after intranasal vaccination with non adjuvanted fibronectin-binding domain of the SfbI protein. **Vaccine**. 2003; **21**:1967-1973.
 - Spitzer, D.; Dittmar, K. E.; Rohde, M.; Hauser, H., and Wirth, D. Green fluorescent protein-tagged retroviral envelope protein for analysis of virus-cell interactions. **Journal of Virology**. 2003; **77**:6070-6075.
 - Stock, M.; Schafer, H.; Stricker, S.; Gross, G.; Mundlos, S., and Otto, F. Expression of galectin-3 in skeletal tissues is controlled by Runx2. **Journal of Biological Chemistry**. 2003; **278**:17360-17367.
 - Stradal, T. B.; Sechi, A. S.; Wehland, J., and Rottner, K. The cytoskeleton. In: *Essential Cell Biology Vol. 1- Cell Structure: Practical Approach Series*: Oxford University Press; 2003.
 - Streetz, K.; Wüstefeld, T.; Klein, C.; Kallen, K. J.; Tronche, F.; Betz, U.; Schütz, G.; Manns, M. P.; Müller, W., and Trautwein, C. Lack of gp 130 expression in hepatocytes promotes liver injury. **Gastroenterology**. 2003; **125**:532-543.
 - Streetz, K. L.; Tacke, F.; Leifeld, L.; Wüstefeld, T.; Graw, A.; Klein, C.; Kamino, K.; Spengler, U.; Kreipe, H.; Kubicka, S.; Müller, W.; Manns, M. P., and Trautwein, C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. **Hepatology**. 2003; **38**:218-229.
 - Toppel, A.; Rasmussen, M.; Medina, E., and Chhatwal, G. S. Contribution of protein G-related γ 2-macroglobulin binding protein to bacterial virulence in a mouse skin model of group A streptococcal infection. **Journal of Infectious Diseases**. 2003; **187**:1694-1703.
 - Voigt, J. and Frank, R. 14-3-3 proteins are constituents of the insoluble glycoprotein framework of the *Chlamydomonas* cell wall. **Plant Cell**. 2003; **15**(6):1399-1413.
 - Vosshenrich, C.; Cumano, A.; Müller, W.; Di Santo, J. P., and Vieira, P. Thymic stromal-derived lymphopoietin distinguishes fetal from adult B cell development. **Nature Immunology**. 2003; **4**(8):773-779.
 - Walter, U.; Toepfer, T.; Dittmar, K. E. D.; Kretschmer, K.; Lauber, J.; Weiß, S.; Servos, G.; Lechner, O.; Scherbaum, W. A.; Bornstein, S. R.; von Boehmer, H., and Buer, J. Pancreatic NOD beta-cells express MHC class II protein and frequency of I-A(g7) mRNA expressing beta-cells strongly increase during progression to autoimmune diabetes. **Diabetologia**. 2003; **46**(8):1106-1114.
 - Weiss, S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella* spp. **Journal of Medical Microbiology**. 2003; **293**:95-106.
 - Werhahn, W.; Jänsch, L., and Braun, H. P. Identification of novel subunits of the tom complex from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**. 2003; **41**:407-416.
 - Wieth, C.; Dittmar, K.; Doan, T.; Lindenmaier, W., and Tindler, R. Provision of 4-1bb ligand enhances effector and memory CTL responses generated by immunization with dendritic cells a human tumor-associated antigen. **Journal of Immunology**. 2003; **170**:2912-2922.
 - Wüstefeld, T.; Klein, C.; Streetz, K. L.; Betz, U.; Lauber, J.; Buer, J.; Manns, M. P.; Müller, W., and Trautwein, C. IL6/GP130-dependent pathways are protective during liver regeneration. **Journal of Biological Chemistry**. 2003; **278**:11281-11288.
 - Zähler, D.; Kaminski, K.; van der Linden, M.; Mascher, T.; Merai, M., and Hakenbeck, R. The *ciaR/ciaH* regulatory system of *Streptococcus pneumoniae* is involved in beta-lactam resistance and genetic competence. In: *Regulatory Networks in Prokaryotes*. Norfolk: Horizon Press; 2003; pp. 41-46.
 - Zander, N.; Gerhardt, J., and Frank, R. Polystyrylsulfonyl-3-nitro-1H-1,2,4-triazolide-resin: a new solid-supported reagent for the esterification of amino acids. **Tetrahedron Letters**. 2003; **44**(35):6557-6560.
 - zur Lage, S.; Goethe, R.; Darji, A.; Valentin-Weigand, P., and Weiss, S. Activation of macrophages and interference with CD4+ T cell stimulation by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* ssp. *avium*. **Immunology**. 2003; **108**(1):62-69.
- Infektion und Immunität – in press**
- Alter-Koltunoff, M.; Ehrlich, S.; Dror, N.; Azriel, A.; Eilers, M.; Hauser, H.; Bowen, H.; Barton, C.-H.; Tamura, T.; Ozato, K., and Levi, B.-Z. Nramp 1 mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1 and Miz-1. **Journal of Biological Chemistry**. 2003.
 - Barthold, M.; Majore, I.; Fargali, S.; Stahl, F.; Schulz, R.; Lose, S.; Mayer, H., and Jäger, V. 3D-cultivation and characterisation of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
 - Bassani Molinas, M. M.; Nelving, A.; Beer, C.; Hesse, F.; Wirth, M.; Durocher, Y.; Kamen, A., and Wagner, R. Intracellular nucleotide pools for optimizing product-oriented transient transfection of HEK293 cells in suspension. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
 - Bode, J.; Götz, S.; Heng, H.; Krawetz, A., and Benham, C. From DNA structure to gene expression: Mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. **Journal of Chromosome Research**. 2003.
 - Bode, J.; Götz, S.; Ernst, E.; Hüseman, A.; Baer, A.; Seibler, J., and Mielke, C. Architecture and utilization of highly-expressed genomic sites. In: (Makrides, S., editor.) „*New Comprehensive Biochemistry - Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*“; 2003.
 - Bollati Fogolin, M.; Irani, N.; Beccaria, A. J.; Schulz, C.; van den Heuvel, J.; Elias, C. B.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. B.; Wirth, M.; Kamen, A., and Wagner, R. Impact of the expression of yeast pyruvate carboxylase on the productivity of different animal host cell lines. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
 - Brigelius-Flohé, R.; Maiorino, M.; Ursini, F., and Flohé, L. Selenium - an Antioxidant? In: (Cadenas, E., Packer, L., editors.) *Handbook of Antioxidant*. 2.ed. New York: Marcel Dekker Inc.; 2003.
 - Bruns, K.; Fossen, T.; Wray, V.; Henklein, P.; Tessmer, U., and Schubert, U. Structural characterization of the HIV-1 Vpr N-terminus: Evidence of cis/trans proline isomerism. **Journal of Biological Chemistry**. 2003.
 - Buttó, S.; Fiorelli, V.; Tripiciano, A.; Ruiz-Alvarez, M. J.; Scoglio, A.; Ensoli, F.; Ciccozzi, M.; Collacchi, B.; Sabbatucci, M.; Cafaro, A.; Guzmán, C. A.; Borsetti, A.; Caputo, A.; Vardas, E.; Colvin, M.; Lukwija, M.; Rezza, G.; Ensoli, B., and the Tat Multicentric Study Group. Sequence conservation and antibody cross-recognition of the Clade B HIV-1 Tat protein vaccine candidate in HIV-1-infected Italian, Ugandan and South African individuals. **Journal of Infectious Diseases**. 2003.
 - Deiters, U.; Barsig, J.; Tawil, B., and Mührlradt, P. F. The macrophage activating lipopeptide MALP-2 accelerates wound healing in diabetic mice. **Journal of Investigative Dermatology**. 2003.
 - Deiters, U.; Gumenschneider, M.; Galanos, C., and Mührlradt, P. F. TLR2/6-mediated stimulation by the lipopeptide MALP-2 induces LPS-cross tolerance in mice, resulting in protection from TNF – but in only partial protection from lethal LPS doses. **Infection and Immunity**. 2003; 71.
 - Denecke, J.; Kranz, C.; Nimtz, M.; Conrad, H. S.; Brune, T.; Kienz, T.; Harms, E.; Heimpel, H., and Marquardt, T. Characterization of the N-glycosylation phenotype of erythrocyte membrane proteins in congenital dyserythropoetic anemia type II (CD45/HEM-PAS). **Blood**. 2003.

- Dietrich, G.; Spreng, S.; Favre, D.; Viret, J.-F., and Guzmán, C. A. Delivery of cancer DNA vaccines by live attenuated bacteria. **Enhancer-Immunotherapy of Cancer**. 2003.
- Ding, H.; Griesel, C. H.; Conrath, H.; Nimtz, M.; Weich, H. A., and Jäger, V. Molecular cloning, expression, purification and characterisation of soluble human interleukin-3 (IL-3) with a baculovirus-insect cell expression system. **Protein Expression and Purification**. 2003.
- Düber, S.; Engel, H.; Rolink, A.; Kretschmer, K., and Weiss, S. Germline transcripts of immunoglobulin light chain variable regions are structurally diverse and differentially expressed. **Molecular Immunology**. 2003.
- Ebensen, T.; Link, C., and Guzmán, C. A. Classical bacterial vaccines. In: (Kaufman, S. H. E., editor). *Novel Vaccination Strategies*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2003.
- Ehlers, S.; Lauber, J.; Buer, J., and Lehmann, J. Measuring immune responses. In: (Kaufmann, S. H. E., Kabelitz, D., editors). *Immunology of infection/Methods in Microbiology*. 2nd Edition ed. San Diego: Academic Press; 2003; 32.
- Erck, C.; McLeod, R., and Wehland, J. Cloning and genomic organization of the TTL gene on mouse chromosome 2 and human chromosome 2q13. **Cytogenetic Genome Research**. 2003.
- Eubel, H.; Jänsch, L., and Braun, H. P. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria: supercomplexes and a unique composition of complex II. **Plant Physiology**. 2003.
- Fargali, S.; Barthild, M.; Rohde, M.; Majore, I., and Jäger, V. In vitro cultivation of rabbit mesenchymal stromal cells on 3D biore-sorbable calcium phosphate scaffolds for the generation of bone tissue implants. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2003.
- Feng, X.; Guo, Z.; Nourbakhsh, M.; Hauser, H.; Ganster, R.; Shao, L., and Geller, D. A. Identification of a negative response element in the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter: the role of NF- κ B repressing factor (NRF) in basal repression of the iNOS gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.** 2003.
- Focke, M.; Gieringer, E.; Schwan, S.; Jänsch, L.; Binder, S., and Braun, H. P. Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: malonyl-CoA is integrated by a mitochondrial-localized acetyl-CoA carboxylase. **Plant Physiology**. 2003.
- Gerth, K.; Pradella, S.; Perlova, O.; Beyer, S., and Müller, R. Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. **Journal of Biotechnology**. 2003.
- Grenklo, S.; Geese, M.; Lindberg, U.; Wehland, J.; Karlsson, R., and Sechi, A. S. Critical role for profilin:actin in the intracellular motility of *Listeria monocytogenes*. **EMBO Reports**. 2003.
- Guido, D.; Spreng, S.; Favre, D.; Viret, J.-F., and Guzmán, C. A. Live Attenuated bacteria as vectors to deliver plasmid DNA vaccines. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**. 2003.
- Heesemann, J.; Heinz, D. W.; Rüssmann, H.; Wehland, J.; Goebel, W., and Kuhn, M. Lektionen aus der Bakterienwelt: Ausnutzung von Wirtszellprozessen durch pathogene Mikroben. **BioSpektrum**. 2003.
- Helloin, E.; Jänsch, L., and Phan-Thanh, L. Carbon starvation survival of *Listeria monocytogenes* in planktonic state and in biofilm: a proteomic study. **Proteomics**. 2003.
- Kim, E.-J.; Sabra, W., and Zeng, A.-P. Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. **Microbiology**. 2003.
- Kröger, A.; Daliège, A.; Kirchoff, S., and Hauser, H. IRF_1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo. **Oncogene**. 2003.
- Kuhlmeier, D.; Rodda, E.; Kolarik, L. O.; Furlong, D. N., and Bili-teuski, U. Application of atomic force microscopy and grating coupler for the characterization of biosensor surfaces. **Biosensors and Bioelectronics**. 2003.
- Leibold, T.; Sasse, F.; Reichenbach, H., and Höfle, G. Cyrmenins, novel antifungal peptides containing a nitrogen-linked β -methoxy-acrylate pharmacophore: Isolation and structure elucidation. **European Journal of Organic Chemistry**. 2003.
- Ma, H. and Zeng, A.-P. Phylogenetic comparison of metabolic capacities of organisms at genome level. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2003.
- Paschen, A.; Schadendorf, P., and Weiss, S. Bacteria as vector for gene therapy of cancer. In: (Templeton, N. S., Lasic, D. D., editors). *Gene Therapy: Therapeutic mechanisms and strategies*. New York, Basel: Marcel Dekker; 2003.
- Ramnath, M.; Reehinger, K. B.; Jänsch, L.; Hastings, J. W.; Knochel, S., and Gravesen, A. The development of a *Listeria monocytogenes* EGDe proteome reference map and comparison with food isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003.
- Rasmussen, U.; Schreiber, V.; Schultz, H.; Mischler, F., and Schughart, K. Tumor cell targeting by phage displayed peptides. **Cancer Gene Therapy**. 2003.
- Sasse, F.; Leibold, T.; Kunze, B.; Höfle, G., and Reichenbach, H. Cyrmenins, new β -Methoxyacrylate of the respiratory chain isolated from Myxobacteria. **European Journal of Organic Chemistry**. 2003.
- Satyanarayana, A.; Wiemann, S. U.; Buer, J.; Lauber, J.; Wüstefeld, T.; Blasco, M.; Manns, M. P., and Rudolph, K. L. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibition of cell cycle re-entry in a sub-population of cells with critical short telomeres. **EMBO Journal**. 2003.
- Schubert, W.-D. and Heinz, D. W. Structural aspects of adhesion and invasion of host cells by the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **ChemBioChem**. 2003.
- Schulze, K. and Guzmán, C. A. Identification of the domains of the fibronectin-binding protein I of *Streptococcus pyogenes* responsible for adjuvanticity. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 2003.
- Söker, U.; Kunze, B.; Reichenbach, H., and Höfle, G. Dawenol, a new polyene metabolite from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. **Zeitschrift für Naturforschung**. 2003.

- Toppel, A.; Rasmussen, M.; Rohde, M.; Medina, E., and Chhatwal, G. S. Contribution of protein GRAB to bacterial virulence in a murine skin model of group A streptococcal infection. **Journal of Infectious Diseases**. 2003.
 - Viret, J.-F.; Moser, C.; Rharbaoui, F.; Metcalfe, I. C., and Guzmán, C. A. Virosomal technology and mucosal adjuvants. In: (Kaufmann, S. H. E., editor). *Novel Vaccination Strategies*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2003.
 - Wehmhöner, D.; Haussler, S.; Tümmeler, B.; Jänsch, L.; Wehland, J., and Steinmetz, I. Inter- and intracolon diversity of *Pseudomonas aeruginosa* proteome manifests within the secretome. **Journal of Bacteriology**. 2003.
 - Weinig, S.; Hecht, H. J.; Mahmud, T., and Müller, R. Myxothiazol and the melithiazol biosynthesis in myxobacteria: Novel insights into hybrid PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of SAM-dependent methyl transferase from *Mellittangium lichenicola* Me 146. **Chemistry and Biology**. 2003.
 - Weinig, S.; Mahmud, T., and Müller, R. Markerless in frame deletions and point mutations in the myxothiazol biosynthetic genes provide evidence for a delicate megasynthetase with a superfluous nonribosomal peptide synthetase domain. **Chemistry and Biology**. 2003.
 - Weiss, S. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian hosts by attenuated *Salmonella* spp. **International Journal of Medicine and Microbiology**. 2003.
 - Weiss, S. and Chakraborty, T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by gram-negative bacteria. In: (Goebel, W., Dietrich, G., editors). *Vaccines: Delivery systems* Chapt.: Horizon Scientific Press; 2003; 13.
 - Wieth, C.; Dittmar, K. E. J.; Doan, T.; Lindenmaier, W., and Tindler, R. Provision of 4-1BBL enhances effector and memory CTL responses generated by immunisation with dendritic cells expressing a human tumour associated antigen. **Journal of Immunology**. 2003.
 - Wirth, D. and Hauser, H. Flp-mediated integration of expression cassettes into FRT tagged chromosomal loci. In: (Balbas, P., Lorence, A., editors). *Recombinant Protein Protocols*: Humana Press Inc., 2003.
 - Zander, K.; Sherman, M. P.; Tessmer, U.; Bruns, K.; Wray, V.; Prechter, A. T.; Schubert, E.; Henklein, P.; Neidleman, J., and Greene, W. C. Schubert U. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 Vpr. **Journal of Biological Chemistry**. 2003.
 - Zielinski, M.; Kahl, S.; Hecht, H.-J., and Hofer, B. Pinpointing biphenyl dioxygenase residues that are crucial for substrate interaction. **Journal of Bacteriology**. 2003.
- ### Vergleichende Genomforschung
- Bi, J.-X.; Buhr, P.; Zeng, A. P., and Wirth, M. Human *c-fos* promoter mediates high-level, inducible expression in various mammalian cell lines. **Biotechnology and Bioengineering**. 2003; **81**:848-854.
 - Bialek, K.; Swistowski, A., and Frank, R. Epitope-targeted proteome analysis: Towards a large-scale automated protein-protein-interaction mapping utilizing synthetic peptide arrays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2003; **376(7)**:1006-1013.
 - Budde, H.; Flohé, L.; Hecht, H.-J.; Hofmann, B.; Stehr, M.; Wisning, J., and Lünsdorf, H. Kinetics and redox-sensitive oligomerisation reveal negative subunit cooperativity in trypanoxin peroxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. **Biological Chemistry**. 2003; **384**:619-633.
 - Eichler, J. *Kombinatorische Chemie. Konzepte und Strategien*. Teubner Studienbücher Chemie. Stuttgart: Teubner, B. G.; 2003.
 - Eichler, J.; Hirsch, T., and Overwin, H. Synthetic mimicry of conformationally defined protein binding sites: hYAP-WW domain. In: (Benedetti, E. Cedone C., editors). *Peptides 2002*. Napoli, Italy; 2003; pp. 740-741.
 - Krull, M.; Voss, N.; Choi, C.; Pistor, S.; Potapov, A., and Wingender, E. TRANSPATH®: an integrated database on signal transduction and a tool for array analysis. **Nucleic Acids Research**. 2003; **31**:97-100.
 - Kuper, J.; Winking, J.; Hecht, H.-J.; Mendel, R. R., and Schwarz, G. The active site of molybdenum cofactor biosynthetic protein domain Cnx 1 G. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 2003; **41**:36-46.
 - Ma, H. and Zeng, A.-P. Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. **Bioinformatics**. 2003; **19**:270-277.
 - Matys, V.; Fricke, E.; Geffers, R.; Gößling, E.; Haubrock, M.; Hehl, R.; Hornischer, K.; Karas, D.; Kel, A. E.; Kel-Margoulis, E. V.; Kloos, D. U.; Land, S.; Lewicki-Potapov, B.; Michael, H.; Münch, R.; Reuter, I.; Rotert, S.; Saxel, H.; Scheer, M.; Thiele, S., and Wingender, E. TRANSFAC®: transcriptional regulation, from patterns to profiles. **Nucleic Acids Research**. 2003; **31**:374-378.
 - Moser, J.; Frere, F.; Heinz, D. W.; Jahn, D., and Schubert, W.-D. Die tRNA-abhängige Tetrapyrrol-Biosynthese. **BioSpektrum**. 2003; **9**:133-137.
 - Münch, R.; Hiller, K.; Barg, H.; Heldt, D.; Linz, S.; Wingender, E., and Jahn, D. PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation. **Nucleic Acids Research**. 2003; **31**:266-269.
 - Shelest, E.; Kel, A. E.; Gößling, E., and Wingender, E. Prediction of potential C/EBP/NF-kappaB composite elements using the matrix-based search methods. **In Silico Biology**. 2003; **3(1-2)**:71-79.
 - Sobrado, V.; Montemartini-Kalisz, M.; Kalisz, H.; De La Fuente, M. C.; Hecht, H.-J., and Nowicki, C. Involvement of conserved asparagine and arginine residues from the n-terminal region in the catalytic mechanism of rat liver and *Trypanosoma cruzi* tyrosine aminotransferases. **Protein Sciences**. 2003; **12**:1039-1050.
 - Sun, J.; van den Heuvel, J.; Soucaille, P.; Qu, Y., and Zeng, A. P. Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in microorganisms. **Biotechnology Progress**. 2003; **19**:263-272.
 - Wang, W.; Sun, J.; Hartlep, M.; Deckwer, W.-D., and Zeng, A.-P. Combined use of proteomics analysis and enzyme activity assay for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**. 2003; **83**:525-536.
 - Zander, N.; Gerhardt, J., and Frank, R. Polystyrylsulfonyl-3-nitro-1H-1,2,4-triazolide-resin: a new solid-supported reagent for the esterification of amino acids. **Tetrahedron Letters**. 2003; **44(35)**:6557-6560.

Vergleichende Genomforschung – in press

- Franke, D.; Lorbach, V.; Dose, C.; Essner, S.; Halfar, M.; Thömmes, J.; Müller, R.; Takors, R.; Sprenger, G. A., and Müller, M. (5S,6S)-Dihydroxy-cyclohexa-1,3-dienecarboxylic acid: microbial access with engineered cells of *Escherichia coli* and applicability as starting material in natural product synthesis. **Chemistry - A European Journal**. 2003.
- Jahn, D.; Moser, J.; Schubert, W.-D., and Heinz, D. W. Transfer RNA-dependent aminolevulinic acid formation: structure and function of glutamyl-tRNA synthase, reductase and glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase. In: *Chlorophylls*. Boca Raton: CRC Press; 2003.
- Kauer, G. and Blöcker, H. Applying signal theory to the analysis of biomolecules. **Bioinformatics**. 2003.
- Ma, H. and Zeng, A. P. The connectivity structure, giant strong component and centrality of metabolic networks. **Bioinformatics**. 2003.
- Schubert, W.-D.; Moser J.; Heinz, D. W., and Jahn, D. Structure and function of glutamyl-tRNA reductases, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and bacteria. **Photosynthesis Research**. 2003.
- Wang, W.; Sun, J.; Nimtz, M.; Zeng, A.-P., and Deckwer, W.-D. Protein identification from 2-dimensional gel electrophoresis analysis of *Klebsiella pneumoniae* by combined use of mass spectrometry data and unannotated genome sequences. **Biotechnology Progress**. 2003.
- Zander, N. and Frank, R. The use of polystyrylsulfonyl chloride resin as a solid supported condensation reagent for the formation of esters: Synthesis of *N*-Butyl-β-(2-[*N*-ethyl-4-(4-nitro-phenylazo)-anilino]-ethyl)-*N*-(9-fluorenyl-methoxy-carbonyl)-*L*-aspartate. **Organic Synthesis**. 2003.
- Zeng, A.-P. and Bi, J. Cell culture kinetics and modelling. In: (Ozturk, S. S., Hu, W.-S., editors). *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Therapies*; 2003; p. Chapter 16.



- Titelbild der Zeitschrift *Environmental Microbiology*, Vol. 4 (12), 2002 anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes Nelson, K. E.; Weinel, C.; Paulsen, I. T.; Dodson, R. J.; Hilbert; Martins dos Santos, V.; Fouts, D. Gill S. R.; Pop, M.; Holmes, M.; Khouri, H.; Hance, I.; Chris Lee, P.; Holtzapple, E.; Scanlan, D.; Tran, K.; Deboy, R.; Moazzez, A.; Brinkac, L.; Beanan, M.; Daugherty, S.; Kolonay, J.; Madupu, R.; Nelson, W.; White, O.; Utterback, T.; Rizzo, M.; Lee, K.; Kosack, D.; Moestl, D.; Wedler, H.; Lauber, J.; Hoheisel, J.; Strätz, M.; Heim, S.; Kiewitz, C.; Eisen, J.; Timmis, K. N.; Duesterhoft, A.; Tümmler, B., and Fraser, C. M. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental Microbiology**. 2002; 4:799-808. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlags.

Nachhaltige Nutzung von Landschaften

- Abraham, W.-R. and Hesse, C. Isotope fractionations in the biosynthesis of cell compounds by different fungi: A basis for environmental carbon flux studies. **FEMS Microbiology Ecology**. 2003; **46**:121-128.
- Abraham, W.-R.; Lünsdorf, H.; Strömpl, C.; Nogales, B.; Moore, E. R. B., and Timmis, K. N. Microbial communities in composite biofilms participating in the degradation of PCB. **Air Soil Pollution: Focus: Bioremediation**. 2003; **3**:57-64.
- Abraham, W.-R. and Wenderoth, D. F. Schicksal fakultativ pathogener Mikroorganismen während und nach dem Sommerhochwasser an Elbe und Mulde. In: (Geller, W.; Ockenfeld, K.; Böhme, M.; Voigt, M., editors). *Schadstoffbelastung im Mulde- und Elbeinzugsgebiet nach dem Augusthochwasser 2002, Magdeburg*. 2003; pp. 6-9.
- Allgaier, M.; Uphoff, H.; Felske, A., and Wagner-Döbler, I. Aerobic anoxygenic photosynthesis in Roseobacter clade from diverse marine habitats. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003; **69**(9):5051-5059.
- Bertini, I.; Provenzani, A.; Viezzoli, M. S.; Pieper, D. H., and Timmis, K. N. NMR spectroscopy as a tool to investigate the degradation of aromatic compounds by a *Pseudomonas putida* strain. **Magnetic Resonance in Chemistry**. 2003; **41**:615-621.
- Brettar, I.; Christen, R., and Höfle, M.G. *Idiomarina baltica*, sp. nov., a marine bacterium with high temperature optimum isolated from surface water of the Central Baltic Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; **53**:407-413.
- Brummer, I. H.; Felske, A., and Wagner-Döbler, I. Diversity and seasonal variability of beta-Proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003; **69**(8):4463-73.
- Demnerova, K.; Stiborova, H.; Leigh, M. B.; Pieper, D. H.; Pazlarova, J.; Brenner, V., and Macek, T. Bacteria degrading PCBs and CBs isolated from long-term PCB contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution: Focus**. 2003; **3**:47-55.
- Hahn, M. W.; Lünsdorf, H.; Wu, Q.; Schauer, M.; Höfle, M.G.; Boenigk, J., and Stadler, P. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003; **69**:1442-1451.
- Kahl, S. and Hofer, B. A genetic system for the rapid isolation of aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase activities. **Microbiology**. 2003; **149**:1475-1481.
- Kämpfer, P.; Dreyer, U.; Neef, A.; Dott, W., and Busse, H.-J. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; **53**:93-97.
- Lucas, F.; Bertru, G., and Höfle, M.G. Characterization of free-living and attached bacteria in sediments colonized by *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor*. **Aquatic Microbial Ecology**. 2003; **32**:165-174.
- McKay, D.; Prucha, W.; Reineke, K.; Timmis, K. N., and Pieper, D. H. Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6. **Journal of Bacteriology**. 2003; **185**:2944-2951.
- Perez-Pantoja, D. T.; Ledger, D.; Pieper, D., and Gonzalez, B. Efficient turnover of chlorocatechols is essential for growth of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) in 3-chlorobenzoic acid. **Journal of Bacteriology**. 2003; **185**:1534-1542.
- Von Canstein, H. F.; Li, Y.; Leonhäuser, J.; Deckwer, W.-D., and Wagne-Döbler, I. Mikrobielle Reinigung von quecksilberhaltigen Industrieabwässern. **BIOspektrum**. 2003; **(2)**:150-152.
- Wagner-Döbler, I. Microbial inoculants - snake oil or panacea. In: (Singleton, I.; Milner, M. G., Head, I. M., editors). *Bioremediation - A Critical Review*: Horizon Press; 2003;(Chapter 10): pp. 1-31.
- Wagner-Döbler, I.; Rheims, H.; Felske, A.; Pukall, R., and Tindall, B. *Jannaschia helgolandensis*, gen. nov., a novel abundant member of the marine Roseobacter clade from the North Sea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; **53**:731-738.
- Wagner-Döbler, I.; von Canstein, H. F.; Li, Y.; Leonhäuser, J., and Deckwer, W.-D. Process-integrated microbial mercury removal from wastewater of chlor-alkali electrolysis plants. **Engineering in Life Sciences**. 2003; **3**(4):177-181.
- Witte, U.; Wenzhöfer, F.; Sommer, S.; Boetius, A.; Heinz, P.; Aberle, N.; Sand, M.; Cremer, A.; Abraham, W.-R.; Jörgensen, B. B., and Pfannkuche, O. In situ experimental evidence of the fate of a phyto-detritus pulse at the abyssal sea floor. **Nature**. 2003; **424**:763-766.
- Yakimov, M. M.; Giuliano, L.; Gentile, G.; Cristafi, E.; Chernikova, T. N.; Abraham, W.-R.; Lünsdorf, H.; Timmis, K. N., and Golyshin, P. N. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a new hydrocarbonoclastic marine bacterium, isolated from an antarctic coastal seawater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; **53**:779-785.
- Yakimov, M. M.; Lünsdorf, H., and Golyshin, P. N. *Thermoleophilum album* and *Thermoleophilum minutum* are culturable representatives of group 2 of the Rubrobacteidae (Actinobacteria). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; **53**:377-380.

Nachhaltige Nutzung von Landschaften – in press

- Barreiros, L.; Nogales, B.; Manaia, C. M.; Ferreira, A. C. S.; Pieper, D. H.; Reis, A. M., and Nunes, O. C. A novel pathway for mineralization of the thiocarbamate herbicide molinate by a defined bacterial consortium. **Environmental Microbiology**. 2003.
- Brummer, I. H. M.; Felske, A., and Wagner-Döbler, I. Diversity and seasonal variability of b-Proteobacteria in biofilms of polluted rivers analyzed by TGGE and cloning. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003.
- Druschel, G. K.; Labrenz, M.; Thomsen-Ebert, T.; Fowle, D. A., and Banfield, J. F. Geochemical modeling of ZnS in biofilms: An example of ore depositional processes. **Economic Geology and the Bulletin of the Society of Economic Geologists**. 2003.
- Golyshin, P. N.; Harayama, S.; Timmis, K. N., and Yakimov, M. M. Family Alcanivoraceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer; 2003.
- Hallworth, J. E.; Prior, B. A.; Nomura, Y., and Timmis, K. N. Compatible solutes protect against chaotrope-(ethanol-) induced, non-osmotic water stress. **Applied and Environmental Microbiology**. 2003.
- Heim, S.; Heuer, H.; Regenhardt, D.; Ferrer, M.; Nimtz, M., and Timmis, K. N. Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for gene profiling analysis: comparative whole genome analysis of iron deprivation in KT2440 and *P. aeruginosa* strain PAO1. **Environmental Microbiology**. 2003; **5**.
- Höfle, M.G. Genotyping of bacterial isolates from the environment using low-molecular-weight RNA fingerprints. In: (Akkermans, A. D. L., Elsas, J. D., de Bruijn, F. J., editors). *Molecular Microbial Ecology Manual*. 2nd ed., Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2003.

- Junca H. and Pieper, D. H. Amplified functional DNA restriction analysis to determine catechol 2,3 dioxygenase gene diversity in soil bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. 2003.
 - Labrenz, M. and Hirsch, P. The Genus *Antarctobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Bergey's Manual Trust*; 2003.
 - Labrenz, M. and Hirsch, P. The Genus *Roseovarius*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Bergey's Manual Trust*; 2003.
 - Labrenz, M. and Hirsch, P. The Genus *Staleyia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Bergey's Manual Trust*; 2003.
 - Labrenz, M.; Lawson, P. A.; Tindall, B. J.; Collins, M. D., and Hirsch, P. *Saccharospirillum impatiens* gen. nov., sp. nov., a novel gamma-Proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake (East Antarctica). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003; 53.
 - Pieper, D. H. and Reineke, W. Degradation of chloroaromatics by *Pseudomonas*(d)s. *The Pseudomonads Vol. III. Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.
 - Prucha, M.; McKay, D.; Timmis, K. N., and Pieper, D. H. Substrate specificity and expression of three 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenases from *Rhodococcus globerulus* strain P6. **Journal of Bacteriology**. 2003.
 - Rapp, P. and Gabriel-Jürgens, L. H. E. Degradation of alkanes, highly chlorinated benzenes and production of biosurfactants by a psychotrophic *Rhodococcus* sp. Genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase. **Microbiology**. 2003.
 - Torres, K. N.; Jaenecke, S.; Timmis, K. N.; Garcia, J., and Diaz, E. A dual lethalsystem to enhance predictability of recombinant microorganisms. **Environmental Microbiology**. 2003; 5.
 - Vancanneyt, M.; Segers, P.; Abraham, W.-R., and de Vos, P. Genus *Brevundimonas* Segers, Vancanneyt, Pot, Torck, Hoste Dewettinck, Falsen, Kersters, de Vos 1994, 507VP emend. Abraham, Strömpl, Meyer, Lindholm, Moore, Christ, Vancanneyt, Tindall, Bennisar, Smit, Tesar 1999, 1070VP. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; 2003; 2(George M. Garrity).
 - Wenderoth, D. F.; Rosenbrock, P.; Abraham, W. R.; Pieper, D. H., and Höfle, M.G. Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. **Microbial Ecology**. 2003.
 - Yakimov, M. M.; Giuliano, L.; Denaro, R.; Cristafi, E.; Chernikova, T.; Abraham, W.-R.; Luensdorf, H.; Timmis, K. N., and Golyschin, P. N. *Thalassolituus oleivorans*, gen. nov. sp. nov., and new marine bacterium confined to the utilization of hydrocarbons. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 2003.
- ### Plattformen
- Bringmann, G.; Mühlbacher, J.; Messer, K.; Deyer, M.; Ebel, R.; Nugroho, B. W.; Wray, V., and Proksch, P. Cyclorocaglamide, the first bridged cyclopentatetrahydrobenzofuran and a related „open chain“ rocaglamide derivative from *Alaia oligophylla*. **Journal of Natural Products**. 2003; 66:80-85.
 - Clauss, M.; Pipp, F.; Issbrücker, K.; Weich, H.; Heil, M., and Schaper, W. Dissection of monocyte and endothelial activities by using VEGF-receptor specific ligands. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 2003; 522:75-82.
 - Häußler, S.; Rohde, M.; von Neuhoff, N.; Nimtz, M., and Steinmetz, I. Structural and functional cellular changes induced by *Burholderia pseudomallei* rhamnolipid. **Infection and Immunity**. 2003; 71:2970-2975.
 - Lin, W.; Brauers, G.; Ebel, R.; Wray, V.; Berg, A.; Sudarsono, and Proksch, P. Novel chromone derivatives from the fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the marine sponge *Xestospongia exiqa*. **Journal of Natural Products**. 2003; 66:57-61.
 - Marxen, J. C.; Nimtz, M.; Becker, W., and Mann, K. The major soluble 19,6kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermapontin. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2003; 1650:92-98.
 - Münzenberger, B.; Hammer, E.; Wray, V.; Shauer, F.; Schmidt, J., and Strack, D. Detoxification of ferulic acid by ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**. 2003; 13:117-121.
 - Pipp, F.; Heil, M.; Issbrücker, K.; Ziegelhoeffer, T.; Martin, S.; van den Heuvel, J.; Weich, H.; Fernandez, B.; Colomb, G.; Caremeliet, P.; Schaper, W., and Claus, M. The VEGFR-1 selective VEGF-homologue PIGF is arteriogenic: evidence for a monocyte mediated mechanism. **Circulation Research**. 2003; 92:378-385.
 - Pollmann, K.; Wray, V.; Hecht, H.-J., and Pieper, D. H. Rational engineering of the regioselectivity of TecA tetrachlorobenzene dioxygenase for the transformation of chlorinated toluenes. **Microbiology**. 2003; 149:903-913.
 - Proksch, P.; Ebel, R.; Erada, R. A.; Schupp, P.; Lin, W. H.; Sudarsono; Wray, V., and Steube, K. Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi. **Pure and Applied Chemistry**. 2003; 75:337-346.
 - Schultz, A.; Laschat, S.; Diele, S., and Nimtz, M. Tetraphenylethene-derived columnar crystals and their oxidative photocyclization. **European Journal of Organic Chemistry**. 2003; 2829-2839.
 - Schupp, P.; Poehner, T.; Erada, R.; Ebel, R.; Wray, V., and Proksch, P. Eudistomins W and X, two new β -carboline derivatives from the Micronesian Tunicate *Eudistoma viride*. **Journal of Natural Products**. 2003; 66:272-275.
 - Wang, C.-Y.; Wang, B.-G.; Wiroyowidago, S.; Wray, V.; van Soest, R.; Steube, K. G.; Guan, H.-S.; Proksch, P., and Ebel, R. Melophins C-O, thirteen novel terpenic acids from the marine sponge *Melophlus sarassinorum*. **Journal of Natural Products**. 2003; 66:51-56.
 - Zogai, X.; Bokranz, W.; Nimtz, M., and Römling, U. Cellulose and curli fimbriae producing enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**. 2003; 71:4151-4158.
 - Zorn, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M., and Berger, R. G. Cleavage of β , β -carotene to flavour compounds by *Lepista irina* versatile peroxidase. **Biochemical Journal**. 2003; 384:1049-1056.

Plattformen – in press

- Ding, H.; Griesel, C. H.; Conrads, H.; Nimtz, M.; Weich, H. A., and Jäger, V. Molecular cloning, expression, purification and characterisation of soluble human interleukin-3 (IL-3) with a baculovirus-insect cell expression system. **Protein Expression and Purification**. 2003.
- Eming, S. A.; Lauer, G.; Cole, M.; Jurk, S.; Christ, H.; Hornig, C.; Krieg, T., and Weich, H. Increased levels of the soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-1 (sflt-19) are associated with poor prognosis in wound healing. **Lancet**. 2003.
- Heil, M.; Mittnacht-Krauss, R.; Issbrücker, K.; van den Heuvel, J.; Dehio, C.; Schaper, W.; Clauss, M., and Weich, H. A. An engineered heparin-binding form of VEGF-E: biological effects in vitro and mobilisation of precursor cells. **Angiogenesis**. 2003.
- Satyanarayana, A.; Wiemann, S. U.; Buer, J.; Lauber, J.; Wüstefeld, T.; Blasco, M.; Manns, M. P., and Rudolph, K. L. Telomere shortening impairs organ regeneration by inhibition of cell cycle re-entry in a sub-population of cells with critical short telomeres. **EMBO Journal**. 2003.

Bioverfahrenstechnik

- Elias, C. B.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Wagner, R., and Kamen, A. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and *Trichoplusia ni* insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. **Biotechnology Progress**. 2003; **19**:90-97.
- Hesse, F.; Ebel, M.; Konisch, N.; Sterlinski, R.; Kessler, W., and Wagner, R. Comparison of a production process in a membrane-aerated stirred tank and up to 1000 L airlift bioreactors using BHK-21 cells and chemically defined protein-free medium. **Biotechnology Progress**. 2003; **19**:833-843.
- Müller, C.; Richter, S., and Rinas, U. Kinetic control preferential heterodimer formation of platelet-derived growth factor from unfolded A- and B-chains. **Journal of Biological Chemistry**. 2003; **278**:18330-18335.
- Priesner, C.; Elmahouhoub, A., and Wagner, R. Immortale Hepatocytoten zur Analyse leberspezifischer Funktionen. **Bioforum**. 2003; **1-2**:35-37.
- Wang, W.; Sun, J.; Hartlep, M.; Deckwer, W.-D., and Zeng, A.-P. Combined use of proteomics analysis and enzyme activity assay for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Biotechnology and Bioengineering**. 2003; **83**:525-536.

Bioverfahrenstechnik – in press

- Ahmed Elsayed, A.; Piehl, G.-W.; Medronho, R. A.; Deckwer, W.-D., and Wagner, R. Use of a hydrocyclone as an efficient and easily scalable perfusion system for mammalian cell bioreactors. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
- Barthold, M.; Majore, I.; Fargali, S.; Stahl, F.; Schulz, R.; Lose, S.; Mayer, H., and Jäger, V. 3D-cultivation and characterisation of osteogenic cells for the production of highly viable bone tissue implants. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
- Bassani Molinas, M. M.; Nelving, A.; Beer, C.; Hesse, F.; Wirth, M.; Durocher, Y.; Kamen, A., and Wagner, R. Intracellular nucleotide pools for optimizing product-oriented transient transfection of HEK293 cells in suspension. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.

- Bollati Fogolin, M.; Irani, N.; Beccaria, A. J.; Schulz, C.; van den Heuvel, J.; Elias, C. B.; Carpentier, E.; Durocher, Y.; Bisson, L.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. B.; Wirth, M.; Kamen, A., and Wagner, R. Impact of the expression of yeast pyruvate carboxylase on the productivity of different animal host cell lines. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
- Hesse, F.; Nelving, A., and Wagner, R. Correlation of intracellular nucleotide pools to amino acid concentrations in culture media by the application of multivariate methods. In: *Animal Cell Technology Meets Genomics*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 2003.
- Hoffmann, F. and Rinas, U. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2003.
- Hoffmann, F. and Rinas, U. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2003.
- Hoffmann, F.; van den Heuvel, J.; Zidek, N., and Rinas, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003.
- Vallejo, F. and Rinas, U. Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration. **Biotechnology and Bioengineering**. 2003.



- Titelbild der Zeitschrift *Cellular Microbiology*, Vol. 5 (5), 2003 anlässlich der Veröffentlichung des Aufsatzes Rohde, M.; Müller, E.; Chhatwal, G. S., and Talay, S. R. Host cell caveolae act as an entry-port for Group A streptococci. **Cellular Microbiology**. 2003; **5**:323-342. Mit freundlicher Genehmigung des Blackwell Publishing Verlags

ERGEBNISBERICHT

FOKUS BERICHTE AUS DER FORSCHUNG



Richard Radloff macht die Teilnehmer des InWEnt-GBF-Kurses 2003 aus Südostasien mit der GBF vertraut (li). Ein Vortrag im Rahmen des Workshops des Niedersächsischen Verbundprojekts „Marine Biotechnologie“ im GBF-FORUM (mi). Eine entspannte Atmosphäre am GBF-FORUM (re).

Fotos: GBF (li), Bierstedt (mi), Radde (re)

WISSENSCHAFTLICHER ERGEBNISBERICHT INNOVATIONSBERICHT





INNOVATIONSBERICHT

Prof. Dr. Rainer Jonas | Abteilung Wissenschaftliche Information

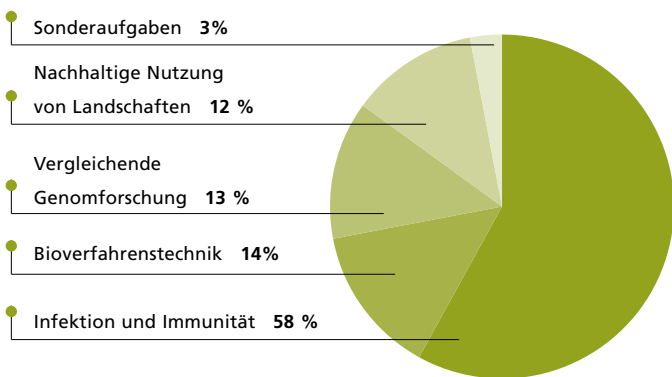
1. Daten zur Forschungsfinanzierung

Die Gesamtkosten der GBF beliefen sich in 2002 auf 47,8 Mio €, wovon mehr als die Hälfte, 27,3 Mio €, auf das Programm „Infektion und Immunität“ entfielen. Die drei übrigen Programme „Vergleichende Genomforschung“, „Nachhaltige Nutzung von Landschaften“ und „Bioverfahrenstechnik“ wiesen mit etwa 6 Mio. € ähnliche Kosten auf.

Kosten nach Kategorien und Programmen (in T€)

Forschungsbereich	Programm	Vollkosten
Gesundheit	Infektion und Immunität	27 275
	Vergleichende Genomforschung	6 220
Gesamt		33 495
Erde und Umwelt	Nachhaltige Nutzung von Landschaften	5 804
Gesamt		5 804
Leistungskategorie II	Bioverfahrenstechnik	6 932
Sonderaufgaben		1 604
Gesamt		47 836

Vollkosten 2002

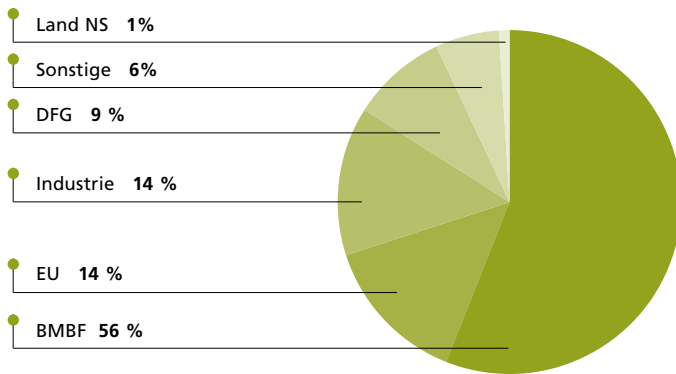


Drittmittelfinanzierung Bei der Drittmittelfinanzierung entfiel der größte Anteil mit mehr als 60% auf national ausgeschriebene Projektförderungen. Mittel aus der EU und der Industrie wurden zu etwa gleichen Teilen eingeworben (je 14%).

Drittmittelfinanzierung (in T€)

Quelle	Summe
BMBF	7 290,67
DFG	1 117,05
EU	1 851,21
Industrie	1 733,07
Land NS	109,39
Sonstige	731,25
Gesamt	12 832,64

Drittmittelfinanzierung 2002



Patente/Lizenzen Im Berichtszeitraum 2002 wurden insgesamt 8 Patente neu angemeldet, davon 4 in Deutschland und 4 in Europa. Sieben dieser Patentanmeldungen erfolgten für den Forschungsbereich Gesundheit. Im gleichen Zeitraum wurden 7 Patente erteilt, alle für den Bereich der Gesundheitsforschung. Die Anzahl der Lizenzvereinbarungen erhöhten sich gegenüber dem Vorjahr um 2.

Patente und Lizenzen, Berichtsjahr 2002

	Insgesamt	Inland	Ausland
Prioritätsbegründende Anmeldungen	8	4	4
Prioritätsbegründende Anmeldung insgesamt (Ifd. Verfahren)	129	107	22
Erteilte Patente	7	1	6
Gesamtbestand gehaltener Patente*	74	16	58
Lizenzvereinbarungen (Gesamtbestand)	38	24	14
Lizenzehinnahmen** (in T€)	308	243	65

*Die stark veränderte Zahl des Gesamtbestandes der gehaltenen Patente (im Vergleich zu früheren Angaben) ergibt sich aus einer Neubetrachtung der Angaben zu den Patenten: Alle als Europäisches Patent angemeldeten Patente wurden als ein Patent gewertet und nicht mehr wie früher für jedes einzelne Land gezählt (es gibt hierfür auch nur eine Patenterteilung).

**Einschließlich Einnahmen aus sonstigen „Know-how“-Verträgen

Veröffentlichungen, Berufungen, DFG-Programme und Gastwissenschaftler

Die Gesamtzahl der Veröffentlichungen blieb in den vergangenen Jahren konstant, wobei sich für 2002 Verschiebungen zugunsten von veröffentlichten Arbeiten in Zeitschriften ergab. In 2002 und 2003 hat es dabei eine Reihe von Veröffentlichungen in namhaften Zeitschriften wie „Nature“ und „Cell“ gegeben (s. u. Veröffentlichungen im Teil *Wissenschaftlicher Ergebnisbericht*)

Quantitative Parameter	Art	2000	2001	2002
Veröffentlichungen	Veröffentlichungen in ISI-registrierten Zeitschriften	206	205	222
	Bücher und Veröffentlichungen in anderen Zeitschriften	47	38	27
	Gesamtzahl	253	243	249
	Habilitationen	2	4	3
	Dissertationen	26	29	14
Berufungen	C3- und C4-Berufungen an Universitäten	0	3	3
	Spezielle DFG-Programme			
Spezielle DFG-Programme	Sonderforschungsbereiche, Transregios	2	9	13
	DFG-Schwerpunkt	6	7	6
	Graduiertenkollegs	1	3	1
	Gesamtzahl	9	19	20
Gastwissenschaftler		116	94	107



2. Schaffung innovativer Strukturen

In der GBF besteht ein großes Potenzial an der Entwicklung innovativer Produkte, Verfahren und Dienstleistungen, insbesondere in Kooperation mit industriellen Partnern. Ein wichtiges Ziel der GBF ist es daher, die im Rahmen der Forschung erbrachten Ergebnisse durch Technologietransfer zur Anwendung zu bringen. Deshalb sind für die GBF Ausgründungen von Firmen, Lizenzvergabe, Service und Dienstleistungen im Rahmen von Industriekooperationen wichtige Parameter für die Umsetzung ihrer FuE-Ergebnisse. Aus diesem Grund ist die GBF Mitglied in Vereinigungen wie BioRegion und dem Transferkolleg Biotechnologie e.V. und beteiligt sich aktiv in der BioRegion GmbH und dem BioProfil „Funktionelle Genomanalyse“.

Das GBF-Existenzgründerzentrum Es stehen in der 3. und 4. Etage des Y-Gebäudes der GBF rund 1900 qm Labor- und Bürofläche für Existenzgründer zur Verfügung, wobei einige Räume mit Geräten über eine Förderung durch das Niedersächsische Wirtschaftsministerium als Infrastrukturräume dienen. Trotz des Wegzugs einiger Firmen ist der zur Verfügung stehende Raum vollständig belegt, da neben den Neuansiedlungen auch ansässige Firmen expandierten. Das BioTec-Gründerzentrum der Stadt Braunschweig direkt neben dem GBF-Gelände ist seit Ende 2002 bezugsfertig (offizielle Einweihung war Ende August 2002).

Technologieverwertung Im Jahr 2002 wurde die Ascenion GmbH, eine Technologieverwertungsgesellschaft von Helmholtz-Zentren mit Hauptsitz in München, gegründet. Sie unterhält ein Büro auf dem GBF-Campus.

Ascenion wurde von den überwiegend im Bereich der Gesundheitsforschung tätigen Helmholtz-Zentren gegründet. Sie soll die Erfindungen und Forschungsergebnisse („Intellectual Properties“) sowohl der vier beteiligten Zentren als auch anderer interessierter Forschungseinrichtungen im „Life Science“-Bereich vermarkten.

Zum 1. April 2002 hat die Ascenion GmbH ihre Arbeit in einem Büro in der Existenzgründeretage auf dem GBF-Campus aufgenommen. Das Büro ist mit zwei naturwissenschaftlich ausgebildeten Mitarbeiterinnen besetzt, deren Schwerpunkte auf Forschung und Entwicklung bzw. auf Vermarktung und Unternehmensführung liegen.

Die Ascenion GmbH übernimmt folgenden Aufgaben für die GBF:

- Erfindungsakquisition und Erfinderbetreuung an der GBF vor Ort
- Technologiebewertung und Schutzrechtsanmeldung
- Konzeption von Verwertungsstrategien für angemeldete bzw. erteilte Schutzrechte mit NPV („Net Present Value“) Berechnung

GBF-FORUM Die Belegung des GBF-FORUMs nahm im 3. Jahr des Bestehens weiter zu. In 2002 wurden an 252 Tagen im Jahr insgesamt 1002 Veranstaltungen durchgeführt.



Liste der auf dem GBF-Gelände ansässigen Firmen (Stichtag: 30.09.2003)

Firma	Geschäftsführer und/oder Ansprechpartner	Telefon/Fax	E-Mail	Internet
Ascenion GmbH	Dr. Sabina Heim/ Tina Damm	0531-6181-961/-962; Fax: -963	she@ascenion.de tda@ascenion.de	www.ascenion.de
Hartmann Analytic GmbH	Dr. Ursula Hartmann	0531-26028-0; Fax: -28	hartmann@hartmann- analytic.de	www.hartmann-analytic.de
Cosmix GmbH	Dr. Ralf Kaufmann/ Ute Heidrich (Sekretariat)	0531-12086-0; Fax: -99	rka@cosmix.de uhe@cosmix.de	www.cosmix.de
AIMS Scientific Products GmbH	Dr. Norbert Zander	0531-2602-865; 0177- 7637299; Fax: 2602-866	nza@aims-scientific- products.de	www.aims-scientific- products.de
RELIATech GmbH	Dr. Bernhard Barleon	0531-260-1832; Fax: -1833	info@reliatech.de	www.reliatech.de
Lionex GmbH	Dr. Ralf Spallek/ Dr. Eva Gebhardt-Singh	0531-6180-653/-652; Fax:2601159	msi@lionex.de	www.lionex.de
IBA Biologics GmbH	Dr. J. Bertram/Dr. Garke	0551-50672118; GBF: 170		
AMODIA Biosciences GmbH	Dr. Ulrich Krause/ Dr. Sabine Peters	0531-260-1764; Fax: -1766	sabine-peters@amodia.de ulrich.krause@amodia.de	www.amodia.com
Eugene GbR	Dr. Werner Müller	0531-6181-687	wmu@gbf.de	
BIOS- Biotechnologisches Schülerlabor	Dr. Iris Eisenbeiser/ Arntraud Meyer	0531-6181-945; Fax: -949	Bios.lab@gbf.de	

Liste der Firmen im Biotec-Zentrum der Stadt Braunschweig (Stichtag: 30.09.2003)

Firma	Geschäftsführer und/oder Ansprechpartner	Telefon/Fax	E-Mail	Internet
Forschungsgruppe Wundheilung der TU Braunschweig	Prof. Dr. Peter Mühlradt	0531-1217-954; Fax: -958		
Vakzine Management GmbH	Dr. Albrecht Läufer	0531-2850-40; Fax: -429	jacobi@vakzine-manager.de	www.vakzine-manager.de
BioRegion	Dr. Albrecht Läufer/ Hannes Schlender	0531-2850-415/-416; Fax: -428	braunschweig@ bioregion.de	www.bioregion.de
GlycoThera GbR	Dr. Harald Conradt	0531-7996-785; 0531- 6181-287	hco@gbf.de	www.glycothera.de
Forum Funktionelle Genomanalyse in der BioRegion	Hannes Schlender	0531-2850-416; Fax: -428	Hannes.schlender@ bioregion.de	www.forum- genomanalyse.de

3. Personal, Struktur und Organisation

Personal Der Personalstand betrug am 31.12.2002 insgesamt 636 Personen mit Voll- und Teilzeitbeschäftigung. Hinzu kamen 101 Gäste in Projekten, deren Bezahlung durch Dritte außerhalb der GBF erfolgte. An der GBF waren zum 31.12.02 255 Wissenschaftler beschäftigt. Darunter befanden sich 86 Postdocs und 75 Doktoranden, die über institutionelle Mittel oder Drittmittel bezahlt wurden.

Organe und Gremien der GBF Die Organe der GBF sind die Gesellschafterversammlung, der Aufsichtsrat, das Wissenschaftliche Komitee und die Geschäftsführung.

Gesellschafterversammlung In der Gesellschafterversammlung sind die beiden Gesellschafter der GBF, die Bundesrepublik Deutschland und das Land Niedersachsen, durch ihre federführenden Ressorts, das Bundesministerium für Bildung, Forschung und Technologie und das Niedersächsische Ministerium der Finanzen vertreten.

Aufsichtsrat Der Aufsichtsrat besteht aus höchstens 15 Mitgliedern. Er überwacht die Rechtmäßigkeit, Zweckmäßigkeit und Wirtschaftlichkeit der Geschäftsführung und entscheidet über die allgemeinen Forschungsziele sowie die wichtigen forschungspolitischen und finanziellen Angelegenheiten der Gesellschaft.

Wissenschaftliches Komitee Das Wissenschaftliche Komitee besteht aus Mitgliedern des Aufsichtsrats und extern berufenen Wissenschaftlern. Es berät den Aufsichtsrat in Fragen der wissenschaftlichen Ausrichtung und Strategie der GBF.

Mitglieder des Aufsichtsrats und des Wissenschaftlichen Komitees (Stand 30.5.2003)

Funktion	Name, Titel	Organisation	Ort
Vorsitz AR	Lange, MinDirig Dr. Peter	BMBF	Bonn
Stellvertreter Vorsitz AR	Weise, MinDir Dr. Dr. Christian	NMWK	Hannover
AR	Warmuth, MinR Dr. Ekkehard	BMBF	Berlin
AR	Kuhny, RD Corinna	NMF	Hannover
WK	Apweiler, Dr. Rolf	European Bioinformatics	Cambridge
WK	Pfeffer, Prof. Dr. Klaus	Universität	Düsseldorf
AR + WK	Daniel, Prof. Dr. Hannelore	TU	München
WK	Winterfeldt, Prof. Dr. Ekkehard	Universität	Hannover
AR	Bilitewski, Prof. Dr. Ursula	GBF	Braunschweig
AR	Bode, Prof. Dr. Jürgen	GBF	Braunschweig
WK	Schendel, Prof. Dr. Dolores	GSF	München
WK	Birchmeier, Prof. Dr. Walter	MDC	Berlin-Buch
WK	Mann, Prof. Dr. Matthias	Universität	Odense/Dänemark
AR + WK	Jockusch, Prof. Dr. Brigitte	TU	Braunschweig
AR + WK	Schiebler, Dr. Werner	Förderv. Humangenomforschung	Frankfurt
AR + WK	Bitter-Suermann, Prof. Dr. Dieter	MHH	Hannover
AR + WK stell. Vorsitz WK	Grummt, Prof. Dr. Ingrid	DKFZ	Heidelberg
AR + WK Vorsitz WK	Jäckle, Prof. Dr. Herbert	MPI	Göttingen
WK	Röllinghoff, Prof. Dr. Martin	Universität	Erlangen
WK	Wittinghofer, Prof. Dr. Alfred	Universität	Dortmund
AR + WK	Pfeiffer, Dr. Dorothea	BST	Berlin
AR + WK	Müller-Kuhrt, Dr. Lutz	AnalytiCon AG	Potsdam

Geschäftsführer Die Geschäftsführer der GBF im Berichtszeitraum sind:

- Wissenschaft: Prof. Dr. Rudi Balling
- Administration: Dr. Georg Frischmann



● Prof. Dr. Rudi Balling (li), Dr. Georg Frischmann (re)

Foto: Bierstedt

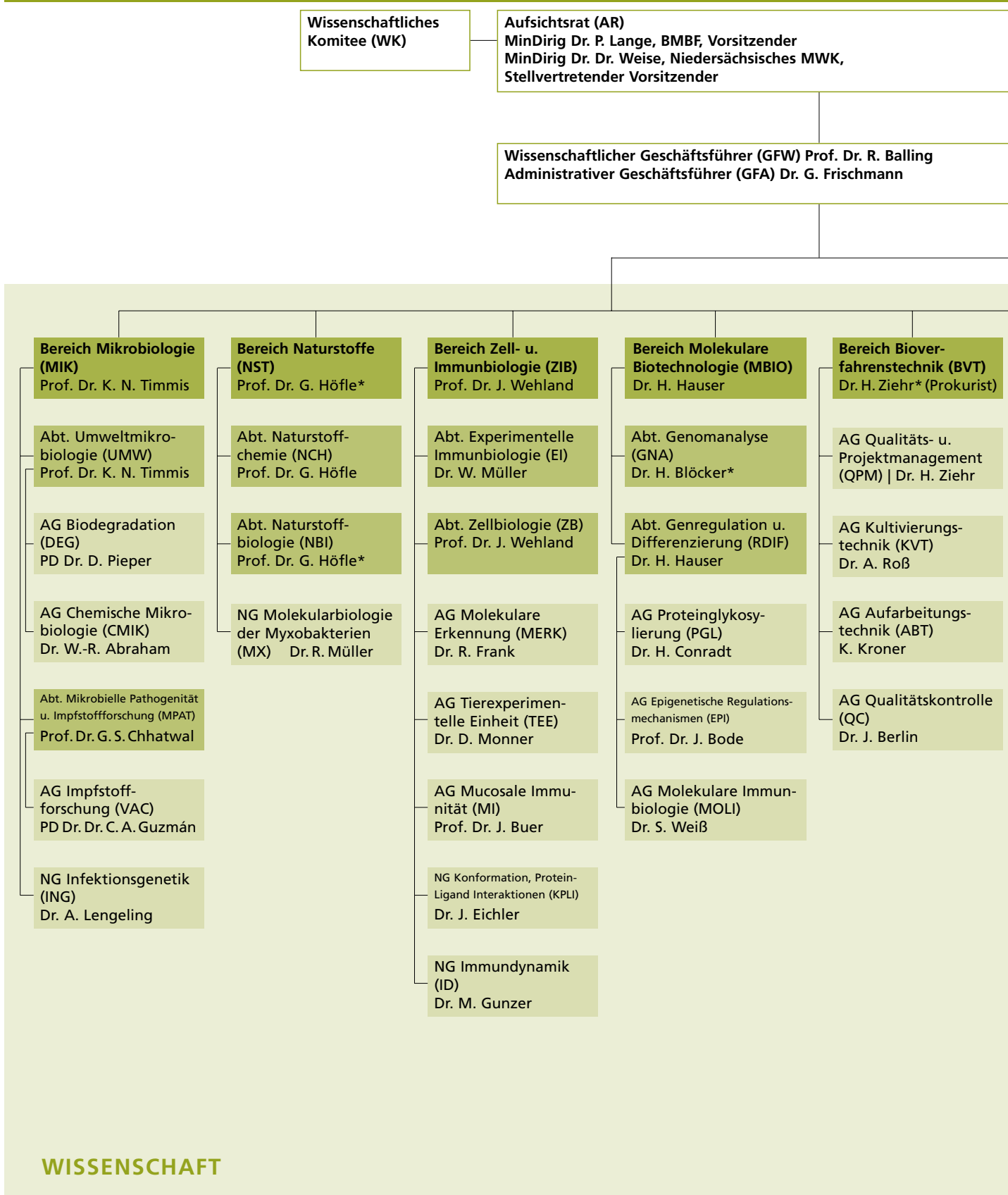
Wissenschaftler-Versammlung Die Wissenschaftler-Versammlung berät die Geschäftsführung in Angelegenheiten von grundsätzlicher wissenschaftlicher Bedeutung. Ihr gehören 22 gewählte Mitarbeiter aus dem Kreis der angestellten Wissenschaftler an. Die Geschäftsführung, Bereichsleiter, Arbeitsgruppenleiter der Nachwuchsgruppen und Doktoranden-Vertreter sind Gäste in der Wissenschaftler-Versammlung. Vorsitzender im Berichtszeitraum waren Dr. Anton Roß (bis Mai 2003) und Dr. Wolf-Rainer Abraham (seit Mai 2003), Stellvertreter ist Dr. Siegfried Weiß.

Direktorium Das Direktorium berät die Geschäftsführung der GBF in allen wichtigen Angelegenheiten des Zentrums. Ihm gehören neben der Geschäftsführung die Bereichsleiter, ein Vertreter der Nachwuchsgruppen und der Vorsitzende der Wissenschaftlerversammlung an.

Betriebsrat Dem Betriebsrat gehören zurzeit 11 Mitglieder an. Vorsitzender ist John Aubert.

Frauenbeauftragte in diesem Zeitraum war Evelyn Rohn-Stenzel.

Organisationsdiagramm, Stand 01. Oktober 2003

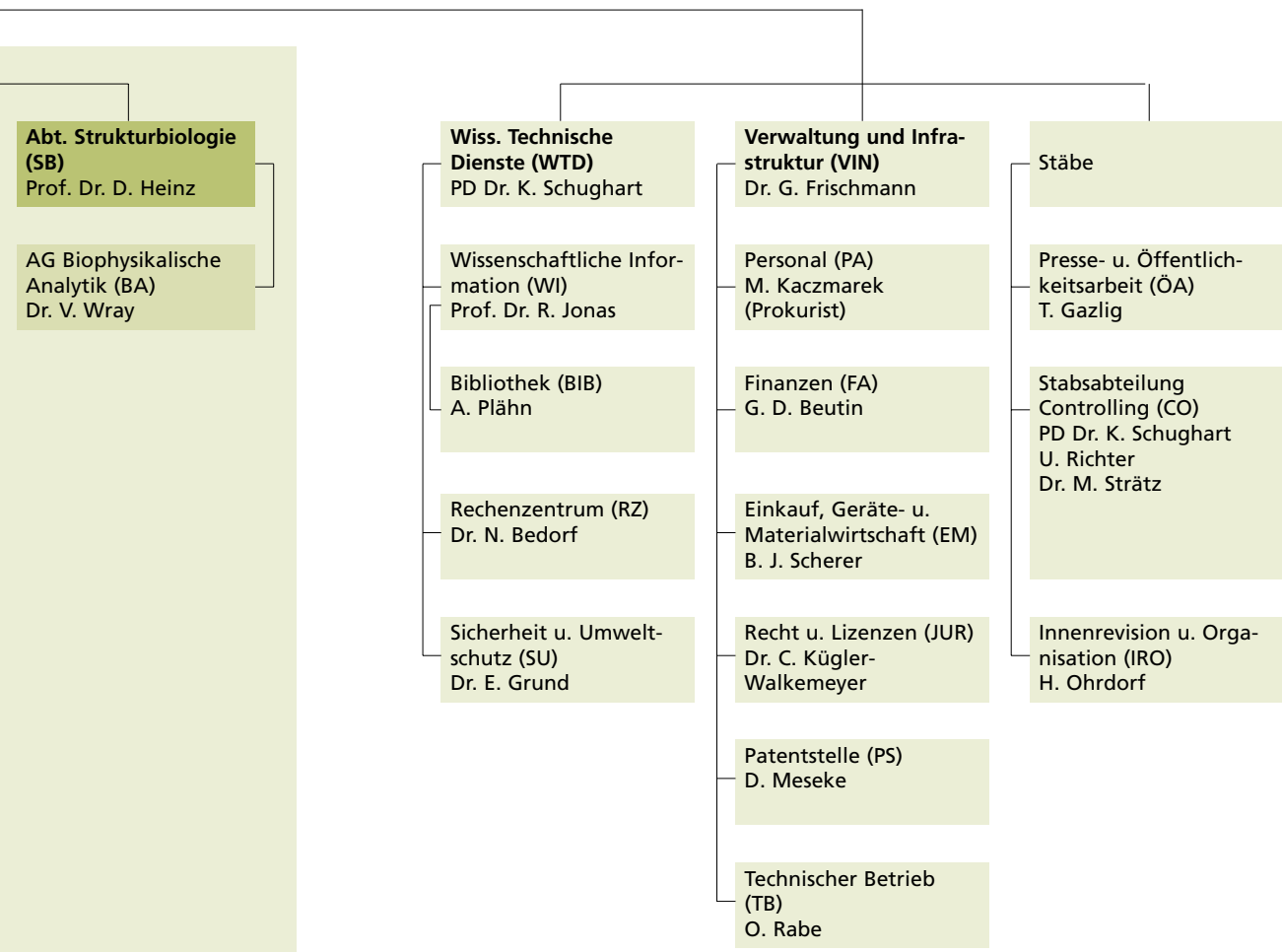


Wissenschaftliches
Direktorium (DR)

Betriebsrat
J. Aubert

Wissenschaftler-
versammlung (WV)
Dr. W.-R. Abraham

Gleichstellungs-
beauftragte
E. Rohn-Stenzel



- **Abkürzungen:**
 Abt. Abteilung
 AG Arbeitsgruppe
 NG Nachwuchsgruppe

- * mit der Wahrnehmung beauftragt

Ergebnisbericht 2002/2003

Herausgegeben von:

GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH

Mascheroder Weg 1

D-38124 Braunschweig

Telefon (+49) 5 31/61 81-0

Telefax (+49) 5 31/61 81-515

info@gbf.de | www.gbf.de

Mitglied der Helmholtz-Gemeinschaft

Deutscher Forschungszentren

Redaktion:

Prof. Dr. Rainer Jonas (V.i.S.d.P.) | rjo@gbf.de

Priv.-Doz. Dr. Klaus Schughart | kls@gbf.de

Dipl.-Journ. Dipl.-Biol. Thomas Gazlig | gaz@gbf.de

Erweitertes Redaktionskomitee:

Prof. Dr. Ursula Bilitewski

Dr. Rolf-Joachim Müller

Dr. Siegfried Weiß

Dr. Victor Wray

Redaktionsassistentin: Monica Kirchner

© 2003 GBF Braunschweig

Fotografien:

Die Portraits wurden fotografiert von Thomas Ammerpohl: Seiten 55, 61, 63, 66, 74, 89, 90 | Frank

Bierstedt: Seiten 4, 8, 22, 31, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 56, 57, 59, 60, 64, 65, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 88,

112 | Manfred Braun: Seite 86 | Heinz Gramann:

Seite 14 | Bei allen übrigen Fotografien wurden die

Autoren unter den Legenden genannt.

Layout und Gestaltung:

wir-design GmbH, Braunschweig

welcome@wir-design.de | www.wir-design.de

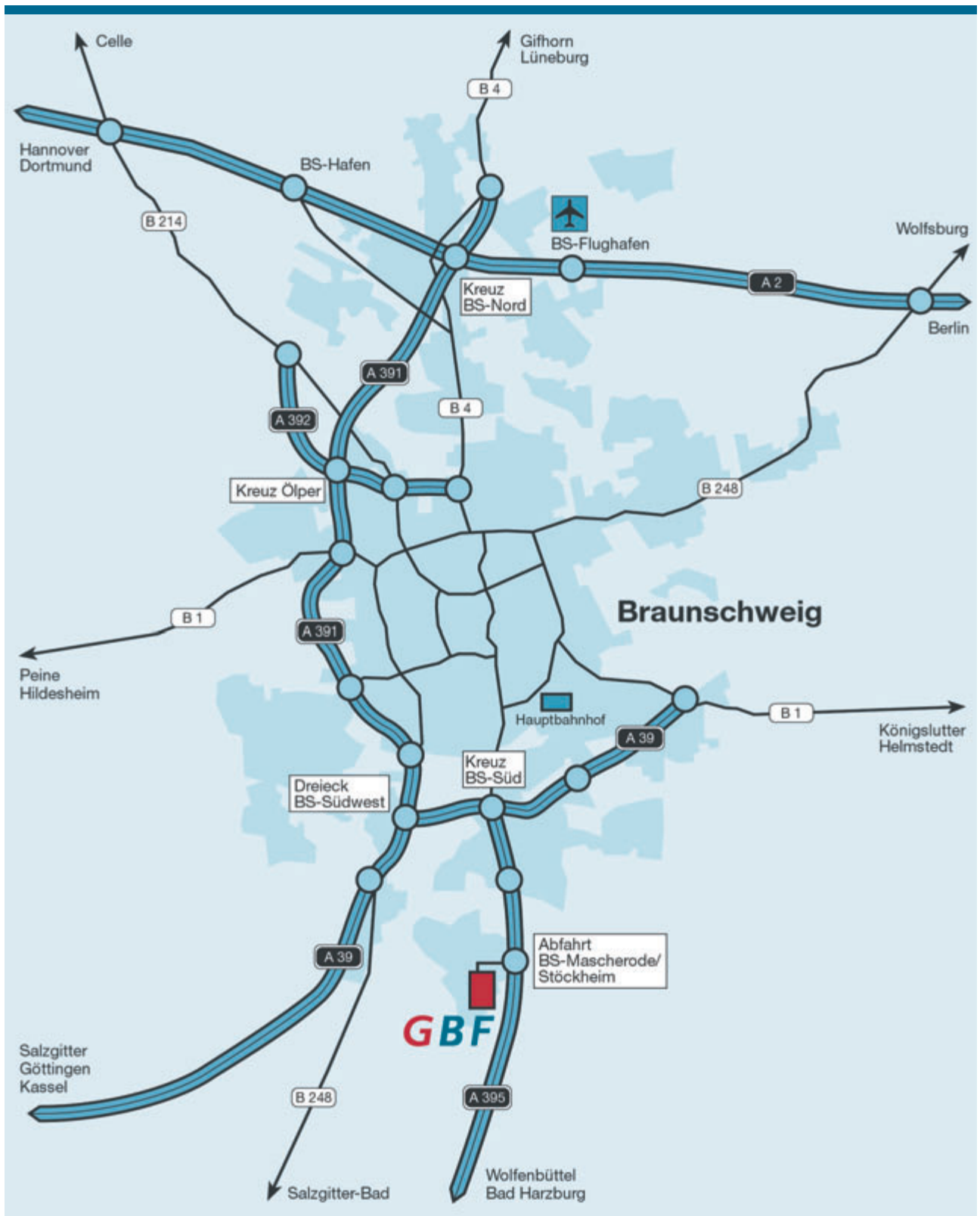
Herstellung:

Döring Druck, Druckerei und Verlag GmbH,

Braunschweig

Gedruckt auf chlorfrei gebleichtem Papier

ISSN 0935-0497



• Lageplan der GBF

ISSN 0935-0497

GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH

Maschroder Weg 1 | 38124 Braunschweig

<http://www.gbf.de> | e-mail: info@gbf.de

